

**COMPUESTOS DE MICROARN Y MÉTODOS PARA MODULAR LA ACTIVIDAD DE
MIR-21**

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de los EE. UU. Nos. 61/478,767, presentada el 25 de abril de 2011, y 61/565,779, presentada el 1° de diciembre de 2011, que se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad a todos los efectos.

CAMPO DE LA INVENCION

En la presente se proporcionan métodos y composiciones para la modulación de la actividad de miR-21.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

Los microARN (microARN), también llamados "microARN maduro" son pequeñas (de aproximadamente 18-24 nucleótidos de longitud) moléculas de ARN no codificante codificadas en los genomas de plantas y animales. En ciertos casos, los microARN expresados endógenamente, altamente conservados regulan la expresión de genes uniéndose a las regiones sin traducir en 3' (3'-UTR) de ARNm específicos. Se han identificado más de 1000 microARN diferentes en plantas y animales. Ciertos microARN maduros parecen originarse de largos transcritos de microARN primarios endógenos (también llamados pri-microARN, pri-mir, pri-miR o pri-pre-microARN) que frecuentemente tienen cientos de nucleótidos de longitud (Lee, et al., EMBO J., 2002, 21(17), 4663-4670).

Los análisis funcionales de microARN revelaron que estos pequeños ARN no codificantes contribuyen en diferentes procesos fisiológicos en animales, incluidos tiempo de desarrollo, organogénesis, diferenciación, modelización, embriogénesis, control del crecimiento y muerte celular programada. Ejemplos de procesos específicos en los que participan microARN incluyen diferenciación de células madre, neurogénesis, angiogénesis, hematopoyesis y exocitosis (estudiados por Alvarez-Garcia and Miska, Development, 2005, 132, 4653-4662).

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

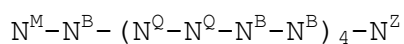
En la presente se proporcionan compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a miR-21 y en donde el oligonucleótido modificado tiene un patrón de nucleósidos descrito en la presente.

En la presente se proporcionan métodos para inhibir la actividad de miR-21 que comprenden poner en contacto una célula con un compuesto descrito en la presente. En algunas realizaciones, la célula está *in vivo*. En algunas realizaciones, la célula está *in vitro*.

En la presente se proporcionan métodos para tratar una enfermedad asociada con miR-21 que comprenden administrar a un individuo que tiene una enfermedad asociada con miR-21 un compuesto descrito en la presente. En algunas realizaciones, el animal es un humano.

Los compuestos descritos en la presente se proporcionan para uso en terapia.

En la presente se proporcionan compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado que consiste en 8 a 19 nucleósidos ligados, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a miR-21 (SEQ ID NO: 1) y en donde el oligonucleótido modificado comprende al menos 8 nucleósidos contiguos del siguiente patrón de nucleósidos V en el sentido 5' a 3':



en donde N^M es un nucleósido modificado que no es un nucleósido bicíclico; cada N^B es un nucleósido bicíclico; cada N^Q es un nucleósido no bicíclico; y N^Z es un nucleósido modificado.

En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, el oligonucleótido modificado comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21 o 22

nucleósidos contiguos del patrón de nucleósidos V. En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, el oligonucleótido modificado consiste en 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleósidos ligados del patrón de nucleósidos V.

En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es al menos 90% complementaria, es al menos 95% complementaria o es 100% complementaria a la secuencia de nucleobase de miR-21 (SEQ ID NO: 1).

En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, la nucleobase en la posición 1 de miR-21 se empareja con la primera nucleobase en el extremo 3' del oligonucleótido modificado.

En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, cada nucleósido bicíclico se selecciona independientemente de un nucleósido LNA, un nucleósido cEt y un nucleósido ENA.

En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, al menos dos nucleósidos no bicíclicos comprenden restos de azúcar que son diferentes entre sí. En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, cada nucleósido no bicíclico tiene el mismo tipo de resto de azúcar.

En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, cada nucleósido bicíclico es un nucleósido cEt. En algunas realizaciones, el nucleósido cEt es un nucleósido S-cEt. En algunas realizaciones, el nucleósido cEt es un nucleósido R-cEt. En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, cada nucleósido bicíclico es un nucleósido LNA.

En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, cada nucleósido no bicíclico se selecciona independientemente de un β -D-

desoxirribonucleósido, un β -D-ribonucleósido, 2'-O-metil nucleósido, un 2'-O-metoxietil nucleósido y un 2'-fluoronucleósido. En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, cada nucleósido no bicíclico se selecciona independientemente de un β -D-desoxirribonucleósido y un 2'-O-metoxietil nucleósido. En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, cada nucleósido no bicíclico es un β -D-desoxirribonucleósido. En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, cada nucleósido no bicíclico es un 2'-O-metoxietil nucleósido.

En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, cada nucleósido bicíclico comprende una nucleobase no metilada.

En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, no más de dos nucleósidos no bicíclicos son 2'-O-metoxietil nucleósidos. En algunas realizaciones, cada uno de los otros nucleósido no bicíclico es un β -D-desoxirribonucleósido.

En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, los nucleósidos no bicíclicos más hacia 5' y más hacia 3' son 2'-O-metoxietil nucleósidos y cada uno de los otros nucleósidos no bicíclicos es un β -D-desoxirribonucleósido. En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, dos nucleósidos no bicíclicos son 2'-MOE nucleósidos y cada uno de los otros nucleósidos no bicíclicos es un β -D-desoxirribonucleósido.

En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, al menos un enlace internucleósido es un enlace internucleósido modificado. En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, cada enlace internucleósido es un enlace internucleósido modificado. En algunas

realizaciones, el enlace internucleósido modificado es un enlace internucleósido de fosforotioato.

En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, al menos un nucleósido comprende una nucleobase modificada. En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, al menos una citosina es una 5-metilcitosina. En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, cada citocina es una 5-metilcitosina. En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, la citocina en la posición dos del oligonucleótido modificado es una 5-metilcitosina.

En algunas realizaciones del patrón de nucleósidos V, N^M es un 2'-O-metoxietil nucleósido; cada N^B es un nucleósido S-cEt; cada N^Q es un β -D-desoxirribonucleósido; y N^Z es un 2'-O-metoxietil nucleósido.

En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, el oligonucleótido modificado tiene la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 3, en donde cada T en la secuencia se selecciona independientemente de T y U. En algunas realizaciones de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente, el oligonucleótido modificado tiene la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 4, en donde cada T en la secuencia se selecciona independientemente de T y U.

En la presente se proporcionan métodos para inhibir la actividad de miR-21 que comprenden poner en contacto una célula con un compuesto proporcionado en la presente. En algunas realizaciones, la célula está *in vivo*. En algunas realizaciones, la célula está *in vitro*. En algunas realizaciones, la célula es un fibroblasto, una célula hiperproliferativa, un queratinocito o una célula hipóxica. En algunas realizaciones, el fibroblasto es un fibroblasto hiperproliferativo.

En la presente se proporcionan métodos para disminuir la expresión de colágeno en una célula que comprenden poner en contacto una célula con un compuesto proporcionado en la presente.

5 En la presente se proporcionan métodos para tratar, prevenir o retrasar el inicio de una enfermedad asociada con miR-21, que comprende administrar a un individuo que padece dicha enfermedad cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente.

10 En algunas realizaciones, la enfermedad es fibrosis. En algunas realizaciones, la fibrosis es fibrosis renal, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis cardíaca, fibrosis cutánea, fibrosis senil, fibrosis del bazo, esclerodermia o fibrosis postrasplante.

15 En algunas realizaciones, la fibrosis es fibrosis renal y está presente en un individuo que tiene una enfermedad seleccionada de glomeruloesclerosis, fibrosis tubulointersticial, nefropatía por IgA, fibrosis intersticial/atrofia tubular; daño renal crónico, enfermedad
20 glomerular, glomerulonefritis, diabetes mellitus, glomeruloesclerosis focal y segmentaria idiopática, nefropatía membranosa, glomerulopatía colapsante, infección renal recurrente crónica y enfermedad renal terminal. En algunas realizaciones, la fibrosis renal resulta de
25 traumatismo agudo o repetitivo al riñón.

 En algunas realizaciones, la fibrosis es una fibrosis hepática y está presente en un individuo que padece una enfermedad seleccionada de lesión hepática crónica, infección por hepatitis, esteatohepatitis no alcohólica y cirrosis.

30 En algunas realizaciones, la fibrosis pulmonar es fibrosis pulmonar idiopática o el individuo tiene enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

 En algunas realizaciones, la enfermedad es una enfermedad inflamatoria.

En la presente se proporcionan métodos para promover la curación de heridas en un individuo que comprende administrar a un individuo que tiene una herida aguda o crónica cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente.

5 En algunas realizaciones, la herida crónica es una herida quirúrgica aguda o crónica, una lesión por penetración, una lesión por avulsión, una lesión por aplastamiento, una lesión por cizallamiento, una lesión por quemadura, una laceración, un herida por mordedura, una úlcera arterial, una úlcera
10 venosa, una úlcera por presión o una úlcera diabética. En algunas realizaciones, el compuesto se administra tópicamente a la herida.

En la presente se proporcionan métodos para tratar un trastorno fibroproliferativo en un individuo que comprende
15 administrar al individuo cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente.

Cualquiera de los métodos proporcionados en la presente puede comprender seleccionar un individuo que tenga expresión elevada de miR-21 en uno o más tejidos.

20 En algunas realizaciones, la administración de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente a un individuo reduce la expresión de colágeno.

En algunas realizaciones, un individuo necesita una función orgánica mejorada, en donde la función orgánica se
25 selecciona de función cardíaca, función pulmonar, función hepática y función renal. En algunas realizaciones, la administración de cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente mejora una función orgánica en el individuo, en donde la función orgánica se selecciona de función
30 cardíaca, función pulmonar, función hepática y función renal.

Cualquiera de los métodos proporcionados en la presente comprende evaluar la función renal en un individuo, que puede incluir medir el nitrógeno ureico en sangre en la sangre del individuo; medir la creatinina en la sangre del individuo; medir el aclaramiento de creatinina en el individuo; medir la

proteinuria en el individuo; medir la relación albúmina:Cr en el individuo; y/o medir la diuresis en el individuo.

Cualquiera de los métodos proporcionados en la presente puede comprender evaluar la función hepática en un individuo, que puede incluir medir los niveles de alanina aminotransferasa en la sangre del individuo; medir los niveles de aspartato aminotransferasa en la sangre del individuo; medir los niveles de bilirrubina en la sangre del individuo; medir los niveles de albúmina en la sangre del individuo; medir el tiempo de protrombina en el individuo; medir la ascitis en el individuo; y/o medir la encefalopatía en el individuo.

Cualquiera de los métodos proporcionados en la presente puede comprender evaluar la función pulmonar en un individuo, que puede incluir medir la capacidad vital en el individuo; medir la capacidad vital máxima en el individuo; medir el volumen de espiratorio máximo en el primer segundo en el individuo; medir la tasa de flujo espiratorio pico en el individuo; medir el flujo espiratorio máximo en el individuo; medir la ventilación voluntaria máxima en el individuo; determinar la relación entre el volumen de espiratorio máximo en el primer segundo y la capacidad vital máxima en el individuo; medir la relación ventilación/perfusión en el individuo; medir el lavado de nitrógeno en el individuo; y/o medir el volumen absoluto de aire en uno o más pulmones de un individuo.

Cualquiera de los métodos proporcionados en la presente puede comprender evaluar la función cardíaca en un individuo, que puede incluir medir el gasto cardíaco en el individuo; medir el volumen sistólico en el individuo; medir la tasa media de eyección sistólica en el individuo; medir la presión sanguínea sistólica en el individuo; medir la fracción de eyección de ventrículo izquierdo en el individuo; determinar el índice sistólico en el individuo; determinar el índice cardíaco en el individuo; medir el porcentaje de acortamiento

fraccional del ventrículo izquierdo en el individuo; medir la velocidad media del acortamiento de fibras circunferenciales en el individuo; medir el patrón de velocidad de afluencia del ventrículo izquierdo en el individuo; medir el patrón de velocidad de flujo venoso pulmonar en el individuo; y/o medir la velocidad diastólica inicial pico del anillo mitral del individuo.

Cualquiera de los métodos proporcionados en la presente pueden comprender administrar a un individuo al menos un agente terapéutico seleccionado de un agente antiinflamatorio, un agente inmunosupresor, un agente antidiabético, digoxina, un vasodilator, inhibidores de enzima convertidora de angiotensina II (ECA), bloqueadores de receptor de angiotensina II (BRA), un bloqueador de canal de calcio, un dinitrato de isosorbida, una hidralazina, un nitrato, una hidralazina, un beta-bloqueador, péptidos natriuréticos, un heparinoide y un inhibidor de factor de crecimiento de tejido conectivo. En algunas realizaciones, el agente antiinflamatorio es un agente antiinflamatorio no esteroide, en donde el agente antiinflamatorio no esteroide se selecciona opcionalmente de ibuprofeno, un inhibidor de COX-1 y un inhibidor de COX-2. En algunas realizaciones, el agente inmunosupresor se selecciona de un corticoesteroide, ciclofosfamida y micofenolato mofetilo. En algunas realizaciones, un agente antiinflamatorio es un corticoesteroide, en donde el corticoesteroides es opcionalmente prednisona. En algunas realizaciones, los inhibidores re la enzima convertidora de angiotensina II (ECA) se seleccionan de captopril, enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril, fosinopril y ramipril. En algunas realizaciones, los bloqueadores del receptor de angiotensina II (BRA) se selecciona de candesartán, irbesartán, olmesartán, losartán, valsartán, telmisartán y eprosartán.

En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de hígado, cáncer

de mama, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer hematológico, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de la lengua, cáncer de estómago, cáncer de piel o
5 cáncer de tiroides. En algunas realizaciones, el cáncer de hígado es carcinoma hepatocelular. En algunas realizaciones, el cáncer de cerebro es glioblastoma multiforme. En algunas realizaciones, el cáncer hematológico es leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia monocítica aguda,
10 mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, linfoma hodgkiniano o linfoma nohodgkiniano.

En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente comprenden administrar al menos una terapia
15 anticancerosa adicional al individuo. En algunas realizaciones, la terapia anticancerosa es un agente que daña el ADN, un inhibidor de proliferación, un antifolato, un inhibidor del receptor del factor de crecimiento, un agente antiangiogénico, un inhibidor de la tirosina cinasa del
20 receptor, un inhibidor de cinasa, un inhibidor del factor de crecimiento, un agente citotóxico, radioterapia o resección quirúrgica de un tumor. En algunas realizaciones, el agente que daña el ADN es 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea, busulfan, carboplatino, carmustina, clorambucil, cisplatino,
25 ciclofosfamida, dacarbazina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, etopósido, idarrubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina, mecloretamina, melfalán, mitomicina C, mitoxantrona, oxaliplatino, temozolomida o topotecán. En algunas realizaciones, el antifolato es metotrexato,
30 aminopterina, timidilato sintasa, serina hidroximetiltransferasa, foliilpoliglutamil sintetasa, g-glutamil hidrolasa, glicinamida-ribonucleótido transformilasa, leucovorina, amino-imidazol-carboxamida-ribonucleótido transformilasa, 5-fluorouracilo o un transportador de folato. En algunas realizaciones, el

inhibidor del receptor del factor de crecimiento es erlotinib o gefitinib. En algunas realizaciones, el inhibidor de angiogénesis es bevacizumab, talidomida, carboxiamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN- α , factor de plaquetas 4, suramina, SU5416, trombospondina, un antagonista de VEGFR, factor inhibidor de angiogénesis derivado de cartílago, un inhibidor de metaloproteinasa de matriz, angiostatina, endostatina, 2-metoxiestradiol, tecogalán, tetratiomolibdato, prolactina o linomida. En algunas realizaciones, el inhibidor de cinasa es bevacizumab, BIBW 2992, cetuximab, imatinib, trastuzumab, gefitinib, ranibizumab, pegaptanib, sorafenib, dasatinib, sunitinib, erlotinib, nilotinib, lapatinib, panitumumab, vandetanib, E7080, pazopanib, mubritinib o fostamatinib.

En algunas realizaciones, la administración a un individuo que tiene cáncer resulta en la reducción del tamaño del tumor y/ o en la cantidad de tumores. En algunas realizaciones, la administración a un individuo que tiene cáncer previene o retrasa un aumento en el tamaño del tumor y/ o en la cantidad de tumores. En algunas realizaciones, la administración a un individuo que tiene cáncer previene o frena la progresión metastásica. En algunas realizaciones, la administración a un individuo que tiene cáncer prolonga el tiempo de sobrevida total y/o la sobrevida libre de progresión del individuo. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente comprenden seleccionar un individuo que tiene niveles elevados de alfa-fetoproteína en suero y/o niveles elevados de des-gamma-carboxiprotrombina en suero. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente comprenden reducir la alfa-fetoproteína en suero y/o la des-gamma-carboxiprotrombina en suero. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente comprenden seleccionar un animal que tiene una función hepática anormal.

En cualquiera de los métodos proporcionados en la presente, el individuo es un humano.

En cualquiera de los métodos proporcionados en la presente, el compuesto está presente como una composición farmacéutica.

Cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente pueden usarse en terapia. Cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente pueden usarse en el tratamiento de la fibrosis. Cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente pueden usarse para promover la curación de heridas. Cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente pueden usarse en el tratamiento del cáncer. Cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente pueden usarse para prevenir y/o retrasar el inicio de la metástasis.

Cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente pueden usarse en el tratamiento de una enfermedad cardíaca.

Cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente pueden usarse en la preparación de un medicamento. Cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente pueden usarse en la preparación de un medicamento para tratar la fibrosis. Cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente pueden usarse en la preparación de un medicamento para promover la curación de heridas. Cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente pueden usarse en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer. Cualquiera de los compuestos proporcionados en la presente pueden usarse en la preparación de un medicamento para prevenir y/o retrasar el inicio de la metástasis.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 2 muestra la expresión de (A) colágeno 1A1 y (B) colágeno 3A1 en riñones de ratones del modelo de UUO a los que se administró compuestos anti-miR21, tal como se describe en el Ejemplo 6.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A menos que se defina de otra forma, todos los términos científicos y técnicos utilizados en la presente tienen el mismo significado comúnmente conocido por un experto en la técnica a quien está dirigida esta invención. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritos en la presente son aquellos conocidos y usados comúnmente en la técnica. En caso de existir varias definiciones para los términos en la presente, prevalecerán las indicadas en esta sección. Se pueden usar técnicas estándares para síntesis química, análisis químico, preparación, formulación y administración farmacéutica y para tratamiento de los individuos. Ciertas técnicas y procedimientos pueden encontrarse por ejemplo en "Carbohydrate Modifications in Antisense Research" Editado por Sangvi and Cook, American Chemical Society , Washington D.C., 1994; y "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., 18a edición, 1990; y que se incorporan a la presente a modo de referencia a todos los efectos. Cuando esté permitido, todas las patentes, solicitudes de patente, solicitudes publicadas y publicaciones, secuencias de GENBANK, sitios web y otros materiales publicados mencionados a lo largo de toda la divulgación en la presente, a menos que se indique lo contrario, se incorporan a modo de referencia en su totalidad. Cuando se haga referencia a una URL u otro identificador o dirección, se entenderá que dichos identificadores pueden cambiar y la información específica en internet puede cambiar, pero se podrá encontrar información equivalente buscando en internet. La referencia a los mismos evidencia la disponibilidad y difusión pública de dicha información.

Antes de que las presentes composiciones y métodos se divulguen y describan, se entenderá que la terminología usada

en la presente es solamente a efectos de describir realizaciones específicas y no se pretende que sea limitante. Cabe señalar que, como se utilizan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "uno/a" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Definiciones

"Fibrosis" significa la formación o desarrollo de tejido conectivo fibroso excesivo en un órgano o tejido. En algunas realizaciones, la fibrosis ocurre como un proceso reparados o reactivo. En algunas realizaciones, la fibrosis ocurre en respuesta a un daño o lesión. El término "fibrosis" se entenderá como la formación o desarrollo de tejido conectivo fibroso excesivo en un órgano o tejido como un proceso reparador o reactivo, en oposición a una formación de tejido fibroso como constituyente normal de un órgano o tejido.

Un "individuo que se sospecha que tiene" significa un individuo que exhibe uno o más indicadores clínicos de una enfermedad.

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

"Fibroblasto" significa una célula que da origen al tejido conectivo.

"Trastorno fibroproliferativo" significa una trastorno caracterizado por la proliferación excesiva y/o activación de fibroblastos.

"Cáncer de hígado" significa un tumor maligno en el hígado, ya sea un cáncer primario o un cáncer producto de metástasis. En algunas realizaciones, el cáncer de hígado incluye, a modo no taxativo, cáncer que surge de hepatocitos, tal como, por ejemplo, hepatomas y carcinomas hepatocelulares; carcinoma fibrolamelar; y colangiocarcinomas (o cáncer de vías biliares).

“Metástasis” significa el proceso por el que el cáncer se extiende desde el lugar donde se originó como un tumor primario a otras ubicaciones en el cuerpo. La progresión metastásica de un tumor primario refleja múltiples estadios, incluidos disociación de las células tumorales primarias circundantes, supervivencia en la circulación y crecimiento en una ubicación secundaria.

“Tiempo de sobrevida total” significa el período de tiempo que un individuo sobrevive después del diagnóstico o tratamiento de una enfermedad. En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer. En algunas realizaciones, el tiempo de sobrevida total es la sobrevida después del diagnóstico. En algunas realizaciones, el tiempo de sobrevida total es la sobrevida después del inicio del tratamiento.

“Sobrevida libre de progresión” significa un período de tiempo en el que un individuo que tiene una enfermedad sobrevive, sin que la enfermedad empeore. En algunas realizaciones, la sobrevida libre de progresión se evalúa mediante estadificación o valoración de la enfermedad. En algunas realizaciones, la sobrevida sin progresión de un individuo que tiene cáncer de hígado se evalúa determinando el tamaño del tumor, la cantidad de tumores y/o la metástasis.

“Anti-miR” significa un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a un microARN. En algunas realizaciones, un anti-miR es un oligonucleótido modificado.

“Anti-miR-X” donde “miR-X” designa un microARN específico, significa un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a miR-X. En algunas realizaciones, un anti-miR-X es totalmente complementario a miR-X. En algunas realizaciones, un anti-miR-X es al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% complementario a miR-X. En algunas realizaciones, un anti-miR-X es un oligonucleótido modificado.

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

5 "secuencia tallo-bucle de miR-21" significa la secuencia tallo-bucle que tiene la secuencia de nucleobase UGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUCAUGGCAACACCAGUCGAUGG GCUGUCUGACA (SEQ ID NO: 2).

10 "Ácido nucleico objetivo" significa un ácido nucleico para el que se diseña un compuesto oligomérico para hibridación.

"Direccionamiento" significa el proceso de diseño y selección de la secuencia de nucleobase que se hibridará con un ácido nucleico objetivo.

15 "Dirigido a" significa que tiene una secuencia de nucleobase que permitirá la hibridación con un ácido nucleico objetivo.

20 "Acoplamiento objetivo" significa la interacción de un oligonucleótido con el microARN al que es complementario, de una forma que cambia la actividad, expresión o nivel del microARN. En algunas realizaciones, el acoplamiento objetivo significa un anti-miR que interactúa con el microARN al que es complementario, de forma se inhibe que la actividad del microARN.

25 "Modulación" significa una perturbación de la función, cantidad o actividad. En algunas realizaciones, la modulación significa un aumento en la función, cantidad o actividad. En algunas realizaciones, la modulación significa una disminución en la función, cantidad o actividad.

30 "Expresión" significa cualesquiera funciones y etapas por la que una información codificada por un gen se convierte en estructuras presentes y operantes en una célula.

"Sitio objetivo en 5'" significa la nucleobase de un ácido nucleico objetivo que es complementaria a la nucleobase más próxima a 3' de un oligonucleótido específico.

"Sitio objetivo en 3'" significa la nucleobase de un ácido nucleico objetivo que es complementaria a la nucleobase más próxima a 5' de un oligonucleótido específico.

"Región" significa una porción de nucleósidos ligados dentro de un ácido nucleico. En algunas realizaciones, un oligonucleótido tiene una secuencia de nucleobase que es complementaria a una región de un ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, en algunas realizaciones un oligonucleótido es complementario a una región de una secuencia tallo-bucle de un microARN. En algunas realizaciones, un oligonucleótido es totalmente complementario a una región de una secuencia tallo-bucle de un microARN.

"Segmento" significa una porción más pequeña o subporción de una región.

"Secuencia de nucleobase" significa el orden de nucleobases contiguas en un compuesto oligomérico o ácido nucleico, típicamente indicado en sentido 5' a 3', independiente de cualquier azúcar, enlace y/o modificación de nucleobase.

"Nucleobases contiguas" significa nucleobases inmediatamente adyacentes entre sí en un ácido nucleico.

"Complementariedad de nucleobase" significa la capacidad de dos nucleobases para emparejarse no covalentemente a través de enlaces de hidrógeno.

"Complementariedad" significa que un ácido nucleico es capaz de hibridarse con otro ácido nucleico u oligonucleótido. En algunas realizaciones, la complementariedad se refiere a un oligonucleótido capaz de hibridarse con un ácido nucleico objetivo.

"Totalmente complementario" significa que cada nucleobase de un oligonucleótido es capaz de emparejarse con una nucleobase en cada posición correspondiente en un ácido nucleico objetivo. En algunas realizaciones, un oligonucleótido es totalmente complementario a un microARN, es decir, cada nucleobase del oligonucleótido es

complementaria a una nucleobase en una posición correspondiente en el microARN. En algunas realizaciones, un oligonucleótido en donde cada nucleobase tiene complementariedad con una nucleobase dentro de una región de una secuencia tallo-bucle de un microARN es totalmente complementaria a la secuencia tallo-bucle del microARN.

"Porcentaje de complementariedad" significa el porcentaje de nucleobases de un oligonucleótido que son complementarias a una porción de igual longitud de un ácido nucleico objetivo. El porcentaje de complementariedad se calcula dividiendo la cantidad de nucleobases del oligonucleótido que son complementarias a nucleobases en posiciones correspondientes en el ácido nucleico objetivo entre la cantidad total de nucleobases en el oligonucleótido.

"Porcentaje de identidad" significa la cantidad de nucleobases en un primer ácido nucleico que son idénticas a las nucleobases en posiciones correspondientes en un segundo ácido nucleico, dividida entre la cantidad total de nucleobases en el primer ácido nucleico. En algunas realizaciones, el primer ácido nucleico es un microARN y el segundo ácido nucleico es un microARN. En algunas realizaciones, el primer ácido nucleico es un oligonucleótido y el segundo ácido nucleico es un oligonucleótido.

"Hibridar" significa el apareamiento de ácidos nucleicos complementarios que ocurre por medio de la complementariedad de nucleobases.

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

"Idéntico" en el contexto de las secuencias de nucleobase, significa tener la misma secuencia de nucleobase, independiente del azúcar, enlace y/o modificaciones de nucleobase e independiente del estado de metilación de cualquier pirimidina presente.

"MicroARN" significa un ARN no codificante endógeno de entre 18 y 25 nucleobases de longitud, que es producto de la escisión de un pre-microARN mediante la enzima Dicer. Se encuentran ejemplos de microARN maduros en la base de datos de microARN denominada miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>). En algunas realizaciones, microARN se abrevia "microARN" o "miR."

"Pre-microARN" o "pre-miR" significa un ARN no codificante que tiene una estructura de horquilla, que es producto de la escisión de un pri-miR mediante la ribonucleasa específica de ARN bicatenario denominada Drosha.

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

"Pre-microARN" o "pre-miR" significa un ARN no codificante que tiene una estructura de horquilla que es sustrato para la ribonucleasa específica de ARN bicatenario Drosha.

"Precursor de microARN" significa un transcrito que se origina a partir de ADN genómico y que comprende un ARN estructurado no codificante que comprende una o más secuencias de microARN. Por ejemplo, En algunas realizaciones un precursor de microARN es un pre-microARN. En algunas realizaciones, un precursor de microARN es un pri-microARN.

"Transcrito regulado por microARN" significa un transcrito que es regulado por un microARN. "Transcrito monocistrónico" significa un precursor de microARN que contiene una única secuencia de microARN.

"Transcrito policistrónico" significa un precursor de microARN que contiene dos o más secuencias de microARN.

"Secuencia semilla" significa una secuencia de nucleobase que comprende de 6 a 8 nucleobases contiguas de

las nucleobases 1 a 9 del extremo 5' de una secuencia de microARN maduro.

"Secuencia coincidente con semilla" significa una secuencia de nucleobase que es complementaria a una secuencia semilla y que tiene la misma longitud que la secuencia semilla.

"Compuesto oligomérico" significa un compuesto que comprende una pluralidad de subunidades monoméricas ligadas. Los compuestos oligoméricos incluyen oligonucleótidos.

"Oligonucleótido" significa un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos ligados, pudiendo estar cada uno modificado o no modificado, independientes entre sí.

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

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

"Enlace internucleósido" significa un enlace covalente entre nucleósidos adyacentes.

"Nucleósidos ligados" significa nucleósidos acoplados mediante un enlace covalente.

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

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

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

"Compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en" una cantidad de nucleósidos ligados significa un compuesto que incluye un oligonucleótido modificado que tiene una cantidad especificada de nucleósidos ligados. Por consiguiente, el compuesto puede incluir sustituyentes o conjugados adicionales. A menos que se indique lo contrario, el compuesto no incluye ningún nucleósido adicional además de los del oligonucleótido.

"Compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en" una cantidad de nucleósidos ligados significa un compuesto que incluye un oligonucleótido modificado que tiene una cantidad especificada de nucleósidos ligados. Por consiguiente, el compuesto puede incluir sustituyentes o conjugados adicionales. A menos que se indique lo contrario, el compuesto no incluye ningún nucleósido adicional además de los del oligonucleótido modificado.

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

"Oligonucleótido modificado de hebra simple" significa un oligonucleótido modificado que no se hibrida con una hebra complementaria.

"Nucleósido modificado" significa un nucleósido que tiene cualquier cambio con respecto a un nucleósido de origen natural. Un nucleósido modificado puede tener un azúcar modificado y una nucleobase no modificada. Un nucleósido modificado puede tener un azúcar modificado y una nucleobase modificada. Un nucleósido modificado puede tener un azúcar natural y una nucleobase modificada. En algunas realizaciones, el nucleósido modificado es un nucleósido bicíclico. En algunas realizaciones, el nucleósido modificado es un nucleósido no bicíclico.

"Enlace internucleósido modificado" significa cualquier cambio con respecto a un enlace internucleósido de origen natural.

"Enlace internucleósido fosforotioato" significa un enlace entre nucleósidos donde uno de los átomos que no forma puentes es un átomo de azufre.

"Resto de azúcar modificado" significa una sustitución y/o cualquier cambio con respecto a un azúcar natural.

"Nucleobase no modificada" significa las bases heterocíclicas de origen natural de ARN o ADN: las bases purínicas adenina (A) y guanina (G) y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) (incluida 5-metilcitosina) y uracilo (U).

"5-metilcitosina" significa una citosina que comprende un grupo metilo acoplado a la posición 5.

"Citosina no metilada" significa una citosina que no tiene un grupo metilo acoplado a la posición 5.

"Nucleobase modificada" significa cualquier nucleobase que no es un nucleobase no modificada.

"Furanosilo" significa una estructura que comprende un anillo de 5 miembros que consiste en cuatro átomos de carbono y un átomo de oxígeno.

"Furanosilo de origen natural" significa un ribofuranosilo tal como se encuentra en el ARN de origen natural o un desoxirribofuranosilo tal como se encuentra en el ADN de origen natural.

"Resto de azúcar" significa un furanosilo de origen natural o un resto de azúcar modificado.

"Resto de azúcar modificado" significa un resto de azúcar sustituido o un subrogado de azúcar.

"Resto de azúcar sustituido" significa un furanosilo que no es un furanosilo de origen natural. Los restos de azúcar sustituidos incluyen, a modo no taxativo, restos de azúcar que comprenden modificaciones en la posición 2', en la posición 5' y/o en la posición 4' de un furanosilo de origen natural. Determinados restos de azúcar sustituidos son restos de azúcar bicíclicos.

"Subrogado de azúcar" significa una estructura que no comprende un furanosilo y que es capaz de reemplazar el furanosilo de origen natural de un nucleósido, de forma que el nucleósido resultante sea capaz de (1) incorporarse a un oligonucleótido y (2) hibridarse con un nucleósido complementario. Dichas estructuras incluyen cambios

relativamente simples en el furanosilo, tales como anillos que comprenden una cantidad diferente de átomos (por ejemplo, anillos de 4, 6 o 7 miembros); reemplazo del oxígeno del furanosilo con un átomo que no es oxígeno (por ejemplo, carbono, azufre o nitrógeno); o un cambio en la cantidad de átomos y un reemplazo del oxígeno. Dichas estructuras también pueden comprender sustituciones correspondientes a las descritas para los restos de azúcar sustituidos (por ejemplo, subrogados de azúcar de 6 miembros carbocíclicos bicíclicos que comprenden opcionalmente sustituyentes adicionales). Los subrogados de azúcar también incluyen reemplazos de azúcar más complejos (por ejemplo, los sistemas no anulares del ácido nucleico peptídico). Los subrogados de azúcar incluyen, a modo no taxativo, morfolinos, ciclohexenilos y ciclohexitoles.

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

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

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

"Resto de azúcar bicíclico" significa un resto de azúcar modificado que comprende un anillo de 4 a 7 miembros (incluido, a modo no taxativo, un furanosilo) que comprende un puente que conecta dos átomos del anillo de 4 a 7 miembros para formar un segundo anillo, resultando en una estructura bicíclica. En algunas realizaciones, el anillo de 4 a 7 miembros es un anillo de azúcar. En algunas realizaciones, el anillo de 4 a 7 miembros es un furanosilo. En algunas realizaciones, el puente conecta el carbono en 2' y el carbono en 4' del furanosilo.

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

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

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

10 "Resto de azúcar de etilo limitado (cEt)" significa un resto de azúcar sustituido que comprende un puente CH(CH₃)-O entre los átomos del anillo furanosa en 4' y 2'. En algunas realizaciones, el puente CH(CH₃)-O se limita en el sentido S. En algunas realizaciones, el (CH₂)₂-O se limita en el sentido R.

"Resto de azúcar S-cEt" significa un resto de azúcar sustituido que comprende un puente CH(CH₃)-O limitado en S entre los átomos del anillo furanosa en 4' y 2'.

15 "Resto de azúcar R-cEt" significa un resto de azúcar sustituido que comprende un puente CH(CH₃)-O limitado en R entre los átomos del anillo furanosa en 4' y 2'.

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

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

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

30 "Nucleósido bicíclico" significa un nucleósido modificado en 2' que tiene un resto de azúcar bicíclico. Un nucleósido bicíclico puede comprender una nucleobase modificada o no modificada.

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

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

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

5 "Nucleósido no bicíclico" significa un nucleósido que tiene un azúcar distinto a un azúcar bicíclico. En algunas realizaciones, un nucleósido no bicíclico comprende un azúcar de origen natural. En algunas realizaciones, un nucleósido no bicíclico comprende un azúcar modificado. En algunas
10 realizaciones, un nucleósido no bicíclico es un β -D-desoxirribonucleósido. En algunas realizaciones, un nucleósido no bicíclico es un nucleósido 2'-O-metoxietilo.

" β -D-desoxirribonucleósido" significa un nucleósido de ADN de origen natural. Un β -D-desoxirribonucleósido puede
15 comprender una nucleobase modificada o no modificada.

" β -D-ribonucleósido" significa un nucleósido de ARN de origen natural. Un β -D-ribonucleósido puede comprender una nucleobase modificada o no modificada.

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

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

"Motivo" significa un patrón de nucleobases, azúcares y/o enlaces internucleósidos modificados y/o no modificados
25 en un oligonucleótido. En algunas realizaciones, un motivo es un patrón nucleosídico.

"Patrón nucleosídico" significa un patrón de modificaciones de nucleósidos en un oligonucleótido modificado o una región del mismo. Un patrón nucleosídico es
30 un motivo que describe la disposición de las modificaciones de nucleósidos en un oligonucleótido.

"Oligonucleótido completamente modificado" significa que cada nucleobase, cada azúcar y/o cada enlace internucleósido está modificado.

"Oligonucleótido modificado uniformemente" significa que cada nucleobase, cada azúcar y/o cada enlace internucleósido tiene la misma modificación en todo el oligonucleótido modificado.

5 "Modificación estabilizante" significa una modificación en un nucleósido que proporciona estabilidad mejorada a un oligonucleótido modificado, en presencia de nucleasas, con respecto a las proporcionadas por los 2'-desoxinucleósidos ligados mediante enlaces internucleósidos fosfodiéster. Por
10 ejemplo, en algunas realizaciones, un modificación estabilizante es un modificación de nucleósido estabilizante. En algunas realizaciones, un modificación estabilizante es un modificación de enlace internucleósido.

"Nucleósido estabilizante" significa un nucleósido
15 modificado para proporcionar estabilidad de nucleasa mejorada a un oligonucleótido, con respecto a la proporcionada por un 2'-desoxinucleósido. En un realización, un nucleósido estabilizante es un nucleósido modificado en 2'.

"Enlace internucleósido estabilizante" significa un
20 enlace internucleósido que proporciona estabilidad de nucleasa mejorada a un oligonucleótido con respecto a la proporcionada mediante un enlace internucleósido fosfodiéster. En una realización, el enlace internucleósido estabilizante es un enlace internucleósido fosforotioato.

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

"Individuo que lo necesita" significa el estadio en el que un individuo se identifica como en necesidad de una terapia o tratamiento.

30 Un "individuo que se sospecha que tiene" significa un individuo que exhibe uno o más indicadores clínicos de una enfermedad.

"Administrar" significa proporciona un agente o composición farmacéutico a un individuo, e incluye, a modo no

taxativo, administración por medio de un profesional médico y autoadministración.

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

5 Administración parenteral incluye, a modo no taxativo, administración subcutánea, administración intravenosa o administración intramuscular.

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

10 "Administración intravenosa" significa administración en una vena.

15 "Administración intracardiaca" significa administración en el corazón. En algunas realizaciones, la administración intracardiaca ocurre por medio de un catéter. En algunas realizaciones, la administración intracardiaca ocurre por medio de cirugía a corazón abierto.

"Administración pulmonar" significa administración a los pulmones.

20 "Administrados concomitantemente" se refiere a la coadministración de dos agentes de una forma en que los efectos farmacológicos de ambos se manifiesten en el paciente al mismo tiempo. La administración concomitante no requiere que ambos agentes se administren en una única composición farmacéutica, ni en la misma forma de dosificación ni
25 mediante la misma vía de administración. No es necesario que los efectos de ambos agentes se manifiesten al mismo tiempo. Los efectos solo deben superponerse durante un período de tiempo y no necesitan ser coextensivos.

30 "Duración" significa el período de tiempo en el que una actividad o evento continua. En algunas realizaciones, la duración del tratamiento es el período de tiempo en que se administran dosis de un agente farmacéutico o composición farmacéutica.

"Terapia" significa un método de tratamiento de enfermedad. En algunas realizaciones, la terapia incluye, a

modo no taxativo, quimioterapia, radioterapia o administración de un agente farmacéutico.

“Tratamiento” significa la aplicación de uno o más procedimientos específicos usados para la cura o mejora de una enfermedad. En algunas realizaciones, el procedimiento específico es la administración de uno o más agentes farmacéuticos.

“Mejora” significa la disminución de la gravedad de al menos un indicador de una afección o enfermedad. En algunas realizaciones, la mejora incluye un retraso o enlentecimiento en la progresión de uno o más indicadores de una afección o enfermedad. La gravedad de los indicadores puede determinarse mediante mediciones subjetivas u objetivas que son conocidas para los expertos en la técnica.

“En riesgo de desarrollar” significa el estado en que un individuo está predispuesto a desarrollar una afección o enfermedad. En determinadas realizaciones, un individuo en riesgo de desarrollar una afección o enfermedad exhibe uno o más síntomas de la afección o enfermedad, pero no exhibe una cantidad suficiente de síntomas para recibir el diagnóstico de la afección o enfermedad. En determinadas realizaciones, un individuo en riesgo de desarrollar una afección o enfermedad exhibe uno o más síntomas de la afección o enfermedad, pero en una medida menor a la necesaria para recibir el diagnóstico de la afección o enfermedad.

“Evitar el inicio de” significa evitar el desarrollo de una afección o enfermedad en un individuo que está en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección. En algunas realizaciones, un individuo en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección recibe un tratamiento similar al tratamiento recibido por un individuo que ya tiene la enfermedad o afección.

“Retrasar el inicio de” significa retrasar el desarrollo de una afección o enfermedad en un individuo que está en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección. En algunas

realizaciones, un individuo en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección recibe un tratamiento similar al tratamiento recibido por un individuo que ya tiene la enfermedad o afección.

5 “Agente terapéutico” significa un agente farmacéutico usado para la cura, mejora o prevención de un enfermedad.

 “Dosis” significa una cantidad especificada de un agente farmacéutico proporcionado en una única administración. En algunas realizaciones, una dosis puede administrarse en dos o
10 más bolos, comprimidos o inyecciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, donde se desea la administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen que no se suministra fácilmente mediante una única inyección. En dichas realizaciones, se pueden usar dos o más inyecciones para
15 alcanzar la dosis deseada. En algunas realizaciones, una dosis puede administrarse en dos o más inyecciones para minimizar la reacción del sitio de inyección en un individuo. En algunas realizaciones, una dosis se administra como una infusión lenta.

20 “Unidad de dosificación” significa una forma en la que se proporciona una agente farmacéutico. En algunas realizaciones, una unidad de dosificación es un vial que contiene oligonucleótido liofilizado. En algunas realizaciones, una unidad de dosificación es un vial que
25 contiene oligonucleótido reconstituido.

 “Cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad de un agente farmacéutico que proporcione un beneficio terapéutico a un animal.

30 “Composición farmacéutica” significa una mezcla de sustancias adecuadas para administrar a un individuo que incluye un agente farmacéutico. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender una solución acuosa estéril.

 “Agente farmacéutico” significa una sustancia que proporciona un efecto terapéutico cuando se administra a un individuo.

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

5 "Función orgánica mejorada" significa una cambio en una función orgánica hacia límites normales. En algunas realizaciones, una función orgánica se evalúa midiendo moléculas encontradas en la sangre de un individuo. Por ejemplo, En algunas realizaciones, la función hepática mejorada se mide por medio de una reducción en los niveles de
10 transaminasa hepáticas en sangre.

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

15 "Efecto secundario" significa una respuesta fisiológica atribuible a un tratamiento distinto a los efectos deseados. En algunas realizaciones, los efectos secundarios incluyen, a modo no taxativo, reacciones en el sitio de inyección, anormalidades en la prueba de función hepática, anormalidades en la función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal,
20 anormalidades en el sistema nervioso central y miopatías. Dichos efectos secundarios pueden detectarse directa o indirectamente. Por ejemplo, niveles aumentados de aminotransferasa en suero pueden indicar toxicidad hepática o anormalidad en la función hepática. Por ejemplo, bilirrubina
25 aumentada puede indicar toxicidad hepática o anormalidad en la función hepática.

"Reacción en el sitio de inyección" significa inflamación o enrojecimiento anormal de la piel en un sitio de inyección en un individuo.

30 "Cumplimiento del individuo" significa la observancia de una terapia recomendada o prescrita por parte de un individuo.

"Cumplir" significa la observancia de una terapia recomendada por parte de un individuo.

"Terapia recomendada" significa un tratamiento recomendado por un profesional médico para tratar, mejorar, retrasar o prevenir una enfermedad.

Presentación

5 El miR-21 es un microARN expresado ubicuamente que está relacionado con una variedad de procesos celulares, incluidos diferenciación, proliferación, apoptosis y el recambio de matriz celular. Adicionalmente, el miR-21 se asocia con múltiples enfermedades. El miR-21 frecuentemente aparece
10 aumentado en el cáncer, y la inhibición de miR-21 ha demostrado una reducción en el crecimiento tumoral en varios modelos animales de cáncer. La inhibición de miR-21 en un modelo animal de hipertrofia cardíaca demostró que miR-21 tiene un papel en la enfermedad cardíaca. Se demostró que
15 tiene un papel en la fibrosis en modelos animales de fibrosis cardíaca, fibrosis renal y fibrosis pulmonar. Un estudio de la inhibición de miR-21 en un modelo de explantes de tejido ilustró que la inhibición de miR-21 promueve la curación de heridas. Como tal, los inhibidores de miR-21 son útiles en
20 una variedad de escenarios investigativos y clínicos.

Para identificar inhibidores potentes de miR-21, se diseñaron grandes cantidades de compuestos anti-miR-21. Los compuestos variaban en longitud, en la cantidad, disposición e identidad de los nucleósidos bicíclicos y los nucleósidos
25 no bicíclicos. Una serie inicial de compuestos se sometió a prueba en un ensayo de luciferasa *in vitro*, que identificó un subconjunto de compuestos como compuestos activos *in vitro*. Estos compuestos activos *in vitro* a continuación se evaluaron en ensayos *in vivo* para identificar aquellos
30 compuestos que son inhibidores potentes de miR-21 *in vivo*. A partir de las detecciones iniciales *in vitro* e *in vivo*, se seleccionaron determinados compuestos como la base para el diseño de compuestos adicionales. Las correlaciones observadas experimentalmente entre la estructura y la actividad (*in vitro* e *in vivo*) se usaron para informar el

diseño de estos compuestos adicionales, con variaciones adicionales en la longitud, selección y disposición de los nucleósidos bicíclicos y no bicíclicos. A continuación, se repitieron los ensayos de detección *in vitro* e *in vivo* para estos compuestos adicionales. Determinados compuestos también de evaluaron para determinar otras propiedades, por ejemplo, susceptibilidad a la actividad de exonucleasa. Se observó que los compuestos más activos *in vitro* no eran necesariamente los compuestos más activos *in vivo* y además que algunos compuestos moderadamente activos *in vitro* eran compuestos altamente activos *in vivo*. De 178 compuestos sometidos a detección *in vitro* durante este proceso, se identificaron 60 como activos en el ensayo de luciferasa. De estos 60 compuestos activos *in vitro*, se identificó un subconjunto como activo *in vivo*. A lo largo de este proceso iterativo de diseño y detección de compuestos, se observó que los compuestos que tenían patrones específicos de modificaciones bicíclicas y no bicíclicas eran inhibidores potentes de miR-21 *in vivo*. Como tal, estos compuestos son útiles para la modulación de los procesos celulares que son promovidos por la actividad de miR-21. Además, dichos compuestos son útiles para tratar, prevenir y/o retrasar el inicio de enfermedades asociadas con miR-21. Dichas enfermedades puede caracterizarse por la expresión anormalmente alta de miR-21, con respecto a muestras no enfermas. Dichas enfermedades incluyen, a modo no taxativo, fibrosis, lesión renal aguda, hipertrofia cardíaca, infarto de miocardio y cáncer. Adicionalmente, las composiciones y métodos proporcionados en la presente pueden usarse para promover la curación de heridas.

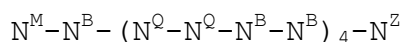
Determinados oligonucleótidos modificados dirigidos a miR-21

En la presente se proporcionan oligonucleótidos modificados que tienen determinados patrones de nucleósidos bicíclicos y no bicíclicos. Los oligonucleótidos modificados

que tienen los patrones identificados en la presente son inhibidores efectivos de la actividad de miR-21.

Cada uno de los patrones de nucleósidos ilustrados en la presente se muestran en el sentido 5' a 3'.

5 En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado que consiste en 8 a 19 nucleósidos ligados, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a miR-21 (SEQ ID NO: 1) y en donde el
10 oligonucleótido modificado comprende al menos 8 nucleósidos contiguos del siguiente patrón de nucleósidos V en el sentido 5' a 3':



en donde N^M es un nucleósido modificado que no es un
15 nucleósido bicíclico;

cada N^B es un nucleósido bicíclico;

cada N^Q es un nucleósido no bicíclico; y

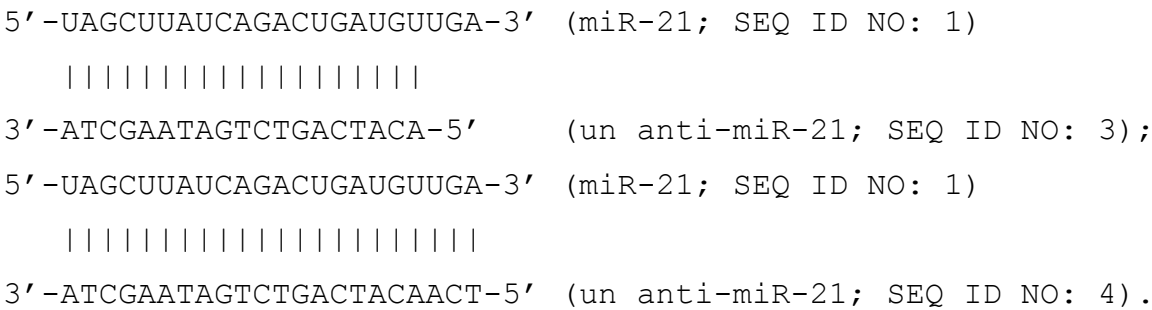
N^Z es un nucleósido modificado.

Las siguientes realizaciones son aplicables al patrón de
20 nucleósidos V.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido modificado comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21 o 22
25 nucleósidos contiguos de un patrón de nucleósidos descrito en la presente.

En algunas realizaciones de cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente, la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es al menos 90% complementaria a miR-21 (SEQ ID NO: 1). En algunas
30 realizaciones, la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es al menos 95% complementaria a (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es al menos 100% complementaria a (SEQ ID NO: 1).

En algunas realizaciones de cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente, la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a miR-21 de forma que la posición 1 del microARN se empareja con la nucleobase del extremo 3' del oligonucleótido. Por ejemplo:



Se entenderá que en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, cada "T" en la secuencia puede ser independientemente una nucleobase "T" o una nucleobase "U" y que un compuesto que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 puede comprender todas las T, todas las U o cualquier combinación de U y T. Por consiguiente, la presencia de "T" en varias posiciones en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 a lo largo de la presente divulgación en el listado de secuencias adjunto, no es limitante con respecto a si dicha nucleobase específica es una "T" o una "U."

En algunas realizaciones de cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente, cada nucleósido bicíclico se selecciona independientemente de un nucleósido LNA, un nucleósido cEt y un nucleósido ENA. En algunas realizaciones, los restos de azúcar de al menos dos nucleósidos bicíclicos son diferentes entre sí. En algunas realizaciones, todos los nucleósidos bicíclicos tienen los mismos restos de azúcar. En algunas realizaciones, cada nucleósido bicíclico es un nucleósido cEt. En algunas realizaciones, cada nucleósido bicíclico es un nucleósido LNA.

En algunas realizaciones de cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente, un nucleósido cEt es

un nucleósido S-cEt. En algunas realizaciones de cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente, un nucleósido cEt es un nucleósido R-cEt.

En algunas realizaciones de cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente, cada nucleósido no bicíclico se selecciona independientemente de un β -D-desoxirribonucleósido, un β -D-ribonucleósido, un nucleósido 2'-O-metilo, un nucleósido 2'-O-metoxietilo y un 2'-fluoronucleósido.

En algunas realizaciones de cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente, cada nucleósido no bicíclico se selecciona independientemente de un β -D-desoxirribonucleósido y un nucleósido 2'-O-metoxietilo.

En algunas realizaciones de cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente, al menos dos nucleósidos bicíclicos comprenden restos de azúcar que son diferentes entre sí y se seleccionan independientemente de un β -D-desoxirribonucleósido, un β -D-ribonucleósido, un nucleósido 2'-O-metilo, un nucleósido 2'-O-metoxietilo y un 2'-fluoronucleósido.

En algunas realizaciones de cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente, al menos dos nucleósidos bicíclicos comprenden restos de azúcar que son diferentes entre sí y se seleccionan independientemente de un β -D-desoxirribonucleósido y un nucleósido 2'-O-metoxietilo.

En algunas realizaciones de cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente, cada nucleósido no bicíclico tiene el mismo tipo de resto de azúcar y se selecciona de β -D-desoxirribonucleósido, un β -D-ribonucleósido, un nucleósido 2'-O-metilo, un nucleósido 2'-O-metoxietilo y un 2'-fluoronucleósido.

En algunas realizaciones de cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente, cada nucleósido no bicíclico es un β -D-desoxirribonucleósido. En algunas

realizaciones, cada nucleósido no bicíclico es un nucleósido 2'-O-metilo.

En algunas realizaciones de cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente, no más de 3 de los nucleósidos no bicíclicos son nucleósidos 2'-O-metoxietilo. En algunas realizaciones, no más de 2 de los nucleósidos no bicíclicos son nucleósidos 2'-O-metoxietilo. En algunas realizaciones, no más de 1 de los nucleósidos no bicíclicos es un nucleósido 2'-O-metoxietilo.

En algunas realizaciones de cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente, un nucleósido no bicíclico es un nucleósido 2'-MOE y cada uno de los otros nucleósidos no bicíclicos es un β -D-desoxirribonucleósido. En algunas realizaciones, dos nucleósidos no bicíclicos son nucleósidos 2'-O-metoxietilo y cada uno de los otros nucleósidos no bicíclicos es un β -D-desoxirribonucleósido. En algunas realizaciones, tres nucleósidos no bicíclicos son nucleósidos 2'-O-metoxietilo y cada uno de los otros nucleósidos no bicíclicos es un β -D-desoxirribonucleósido.

En algunas realizaciones de cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente, los nucleósidos no bicíclicos más hacia 5' y los nucleósidos no bicíclicos más hacia 3' son nucleósidos 2'-O-metoxietilo y cada uno de los otros nucleósidos no bicíclicos es un β -D-desoxirribonucleósido.

En algunas realizaciones del patrón de nucleósidos V, N^M es un nucleósido 2'-O-metoxietilo; cada N^B se selecciona de un nucleósido S-cEt y un nucleósido LNA; cada N^Q se selecciona de un β -D-desoxirribonucleósido y un nucleósido 2'-O-metoxietilo; y N^Z se selecciona de un nucleósido 2'-O-metoxietilo, un nucleósido LNA y un nucleósido S-cEt. En algunas realizaciones, el oligonucleótido modificado del patrón V tiene la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 3, en donde cada T en la secuencia se selecciona independientemente de T y U.

En algunas realizaciones del patrón de nucleósidos V, N^M es un 2'-O-metoxietil nucleósido; cada N^B es un nucleósido S-cEt; cada N^Q es un β-D-desoxirribonucleósido; y N^Z se selecciona de un nucleósido 2'-O-metoxietilo y un nucleósido S-cEt. En algunas realizaciones, el oligonucleótido modificado del patrón V tiene la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 3, en donde cada T en la secuencia se selecciona independientemente de T y U.

En algunas realizaciones del patrón de nucleósidos V, N^M es un nucleósido 2'-O-metoxietilo; cada N^B es un nucleósido S-cEt; cada N^Q es un β-D-desoxirribonucleósido; y N^Z es un nucleósido 2'-O-metoxietilo. En algunas realizaciones, el oligonucleótido modificado del patrón V tiene la secuencia de nucleobase de SEQ ID NO: 3, en donde cada T en la secuencia se selecciona independientemente de T y U.

En algunas realizaciones, un compuesto proporcionado en la presente tiene una secuencia de nucleobase y modificaciones tales como se muestran en la Tabla 1. Las modificaciones de nucleósidos se indican tal como se muestra: los nucleósidos no seguidos por un subíndice indican β-D-desoxirribonucleósidos; los nucleósidos seguidos por un subíndice "E" indican nucleósidos 2'-MOE; los nucleósidos seguidos por un subíndice "S" indican nucleósidos S-cEt. Cada enlace internucleósido es un enlace internucleósido fosforotioato.

Tabla 1: Compuestos anti-miR-21

Compuesto No.	Secuencia y química (5' a 3')	SEQ ID NO
25220	A _E C _S ATC _S A _S GTC _S U _S GAU _S A _S AGC _S U _S A _E	3

En algunas realizaciones de cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente, un oligonucleótido modificado consiste en 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, el oligonucleótido modificado comprende al

menos 8 nucleósidos ligados de un patrón de nucleósidos establecido en el patrón de nucleósidos V.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado que tiene cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente comprende al menos un enlace internucleósido modificado. En algunas realizaciones, cada enlace internucleósido es un enlace internucleósido modificado. En algunas realizaciones, el enlace internucleósido modificado es un enlace internucleósido fosforotioato.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobase en donde al menos una nucleobase es una citosina. En algunas realizaciones, al menos una citosina es una citosina 5-metilo. En algunas realizaciones, cada citosina es una citosina 5-metilo. En algunas realizaciones, al menos un nucleósido comprende una nucleobase modificada.

Los oligonucleótidos modificados pueden sufrir escisión por exonucleasas y/o endonucleasas en varias posiciones a lo largo del oligonucleótido modificado. Los productos de dicha escisión enzimática pueden conservar la actividad inhibidora de miR-21, y como tal se consideran metabolitos activos. Como tal, un producto metabólico de un oligonucleótido modificado puede usarse en los métodos descritos en la presente.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado dirigido a miR-21 tiene un patrón de nucleósidos seleccionado de la Tabla 2C, en donde N^M es un nucleósido modificado que no es un nucleósido bicíclico; cada N^B es un nucleósido bicíclico; cada N^Q es un nucleósido no bicíclico; y N^Z es un nucleósido modificado.

Tabla 2C: Productos metabólicos del patrón de nucleósidos V

5'																		3'
N ^M	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Z
	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Z
		N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Z

5

10

15

20

25

30

			N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Z
				N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Z
					N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Z
						N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Z
							N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Z
								N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Z
									N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Z
										N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Z
											N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Z
N ^M	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	
N ^M	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B		
	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^Y	
	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B		
		N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	
		N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B		
			N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	
			N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B		
				N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	
				N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	
					N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	
					N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	
						N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	
						N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	
							N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	
								N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B
									N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B
									N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B
										N ^Q	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	
										N ^Q	N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	
											N ^Q	N ^Q	N ^B	N ^B	N ^Q	N ^Q	N ^B	

En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado dirigido a miR-21 tiene un patrón de nucleósidos y una secuencia de nucleobase seleccionados de la Tabla 3D. Los nucleósidos que no están seguidos por un subíndice indican β -D-desoxirribonucleósidos. Los nucleósidos seguidos por un subíndice "E" indican nucleósidos 2'-MOE. Los nucleósidos seguidos por un subíndice "S" indican nucleósidos S-cEt. Cada enlace internucleósido es un enlace internucleósido fosforotioato. Las nucleobases pueden comprender o no un grupo metilo en la posición 5'.

Tabla 3D: Productos metabólicos del compuesto No. 25220

5'																		3'
N ₁	N ₂	N ₃	N ₄	N ₅	N ₆	N ₇	N ₈	N ₉	N ₁₀	N ₁₁	N ₁₂	N ₁₃	N ₁₄	N ₁₅	N ₁₆	N ₁₇	N ₁₈	N ₁₉
A _E	C _S	A	T	C _S	A _S	G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	A _E
	C _S	A	T	C _S	A _S	G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	A _E
		A	T	C _S	A _S	G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	A _E
			T	C _S	A _S	G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	A _E
				C _S	A _S	G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	A _E
					A _S	G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	A _E
						G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	A _E
							T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	A _E
								C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	A _E
									U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	A _E
										G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	A _E
											A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	A _E
A _E	C _S	A	T	C _S	A _S	G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	
A _E	C _S	A	T	C _S	A _S	G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S		

5

10

15

20

	C _S	A	T	C _S	A _S	G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	
	C _S	A	T	C _S	A _S	G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S		
		A	T	C _S	A _S	G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	
		A	T	C _S	A _S	G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S		
			T	C _S	A _S	G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	
			T	C _S	A _S	G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S		
				C _S	A _S	G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	
				C _S	A _S	G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S		
					A _S	G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	
					A _S	G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S		
						G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	
						G	T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S		
							T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	
							T	C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S		
								C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	
								C _S	U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S		
									U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	

									U _S	G	A	U _S	A _S	A	G	C _S		
										G	A	U _S	A _S	A	G	C _S	U _S	

5

10

15

20

En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en más de 19 nucleósidos ligados, y comprende un patrón de nucleósidos descrito en la presente. Los nucleósidos que están presentes además de los

5 nucleósidos descritos por el patrón de nucleósidos son modificados o no modificados. Por ejemplo, un oligonucleótido modificado que consiste en 21 nucleósidos ligados y que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a miR-21 puede tener el patrón de

10 nucleósidos V, que tiene una longitud de 19 nucleósidos ligados. Los dos nucleósidos adicionales pueden comprender restos de azúcar modificados o no modificados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 19 nucleósidos ligados y comprende cualquiera de los patrones

15 de nucleósidos descritos en la presente. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 20 nucleósidos ligados y comprende cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 21

20 nucleósidos ligados y comprende cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 22 nucleósidos ligados y comprende cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente. En algunas

25 realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 23 nucleósidos ligados y comprende cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 24 nucleósidos ligados y comprende cualquiera de los patrones

30 de nucleósidos descritos en la presente. En algunas

realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 25 nucleósidos ligados y comprende cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente.

Determinados usos de la invención

5 Modulación de la actividad de miR-21

Los compuestos proporcionados en la presente son inhibidores potentes y específicos de la actividad de miR-21 y, por consiguiente, son útiles para modular la actividad de miR-21.

10 Los microARN se unen y reprimen la expresión de ARN mensajeros. En determinados casos, la inhibición de la actividad de un microARN conduce a la desrepresión del ARN mensajero, es decir, la expresión del ARN mensajero aumenta al nivel del ARN y/o proteína. En la presente se
15 proporcionan métodos para modular la expresión de un transcrito regulado por miR-21, que comprenden poner en contacto una célula con un compuesto de la invención, en donde el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que tiene un secuencia complementaria a un miR-21.

20 En algunas realizaciones, un transcrito regulado por miR-21 es YOD1 y la inhibición de miR-21 resulta en un aumento en el nivel de ARNm de YOD1. En algunas realizaciones, un transcrito regulado por miR-21 es PPAR-
25 alfa y la inhibición de miR-21 resulta en un aumento en el nivel de ARNm de PPAR-alfa. En algunas realizaciones, un transcrito regulado por miR-21 es RNF167.

En algunas realizaciones, un transcrito regulado por miR-21 es SPG20. En algunas realizaciones, la inhibición de miR-21 en el hígado resultan en un aumento en el nivel de
30 ARNm de SPG20.

En algunas realizaciones, luego de poner en contacto una célula con un compuesto de la invención, se observa al menos un aumento de 1.5 veces en el nivel de ARNm de un transcrito regulado por miR-21. En algunas realizaciones, luego de poner en contacto una célula con un compuesto de la invención, se observa al menos un aumento de 2.0 veces en el nivel de ARNm de un transcrito regulado por miR-21. En algunas realizaciones, el nivel de ARNm del transcrito regulado por el microARN aumenta al menos 2.5 veces. En algunas realizaciones, el nivel de ARNm del transcrito regulado por el microARN aumenta al menos 3.0 veces. En algunas realizaciones, el nivel de ARNm del transcrito regulado por el microARN aumenta al menos 3.5 veces. En algunas realizaciones, el nivel de ARNm del transcrito regulado por el microARN aumenta al menos 4.0 veces. En algunas realizaciones, el nivel de ARNm del transcrito regulado por el microARN aumenta al menos 4.5 veces. En algunas realizaciones, el nivel de ARNm del transcrito regulado por el microARN aumenta al menos 5.0 veces.

Ciertos microARN se conocen por dirigirse a varios ARN mensajeros, en algunos casos a cientos de ARN mensajeros. La inhibición de la actividad de un único microARN puede conducir a cambios detectables en la expresión de muchos de los microARN objetivo. En la presente se proporcionan métodos para modular múltiples transcritos regulados por miR-21, que comprenden inhibir la actividad de miR-21, en donde se producen amplios cambios en la expresión génica.

En algunas realizaciones, se pueden observar cambios fenotípicos luego de la inhibición de un miR-21 con un

compuesto de la invención. Dichos cambios fenotípicos pueden producir con o sin cambios detectables en la expresión de un transcrito regulado por miR-21.

Trastornos fibroproliferativos

5 Una respuesta fisiológica normal al daño o lesión en un órgano o tejido implica la reparación del tejido dañado, que es un proceso biológico fundamental necesario para la supervivencia. Durante el proceso de reparación, después de eliminar materiales extraños, bacterias y tejido dañado,
10 los fibroblastos migran al sitio de la lesión para depositar una nueva matriz extracelular, que a continuación queda estructuralmente organizada como parte de la fase de remodelación del tejido.

Los fibroblastos son las células más comunes
15 encontradas en el tejido conectivo, y son responsables por la síntesis de reticulina y otras fibras elásticas que sostienen la matriz extracelular y tienen un papel importante en la curación normal de heridas (Sempowski, G.D. et al., 2002. Wound Repair Regeneration. 3: 120-131).
20 Los fibroblastos son responsables por el depósito de colágeno, que es necesario para reparar el tejido lesionado y restituir su estructura y función. Durante el proceso de curación de la herida, los fibroblastos activados se transforman en miofibroblastos, que son fibroblastos alfa-SMA+ que secretan colágeno. En las etapas iniciales del
25 proceso de curación de la herida, los miofibroblastos producen metaloproteasas de matriz, que alteran la membrana basal y permiten que las células inflamatorias se reúnan eficazmente en el sitio de la lesión. Durante las últimas
30 etapas de la reparación de la lesión, los miofibroblastos

promueven la contracción de la herida, proceso por el que los bordes de la herida migran hacia el centro de la herida. Por consiguiente, la actividad de los fibroblastos es esencial para el proceso de curación normal.

5 Los fibroblastos que participan en el proceso de reparación de lesión normal pueden derivar de células mesenquimales locales, tomadas de la médula ósea o derivadas mediante transición epitelial-mesenquimal. La transición epitelial-mesenquimal (EMT) describe una serie
10 de cambios rápidos de fenotipo celular (Kalluri, R. and Neilson, E.G. 2003. J. Clin. Invest. 112: 1776-1784) en los que las células epiteliales estáticas pierden los contactos célula-célula, adquieren características mesenquimales y manifiestan un fenotipo migratorio. Los fibroblastos
15 residentes, fibrocitos infiltrantes o células similares a pericitos también pueden participar en el proceso de reparación de lesión.

En algunas condiciones, el proceso de reparación de tejido se produce en exceso, resultando en una acumulación
20 excesiva de componentes de matriz extracelular (ECM) y remodelación sustancial de la ECM, que contribuyen a la formación de una cicatriz fibrótica permanente. La formación de este tejido conectivo fibroso en exceso, un proceso conocido como fibrosis, contribuye a cambios
25 anormales en la arquitectura tisular e interfiere en la función orgánica normal.

La fibrosis se puede producir en cualquier parte del cuerpo y puede resultar en una variedad de lesiones físicas, metabólicas, isquémicas, infecciosas,
30 inflamatorias o inmunológicas. Aunque las ubicaciones,

orígenes y manifestaciones clínicas de la fibrosis pueden ser diversas, existen características patológicas importantes comunes a todos los tipos de fibrosis. Independientemente de la ubicación en que se produce la fibrosis, el proceso fibrótico implica la secreción y activación de citosinas profibróticas, la expansión y activación de poblaciones de células mesenquimales y la síntesis y organización de la matriz extracelular y finalmente conduce a la destrucción del tejido normal. Sin no se trata, la fibrosis puede conducir a una variedad de afecciones en el corazón, pulmones, riñones, hígado, ojos y piel, entre otros tejidos.

Tal como se demuestra en la presente, la inhibición del miR-21 en un modelo de fibrosis conduce a una disminución en el depósito de colágeno. Por lo tanto, en la presente se proporcionan composiciones y métodos para tratar, prevenir y/o retrasar el inicio de la fibrosis, que comprenden administrar un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado, en donde el oligonucleótido modificado es complementario a miR-21, a un individuo. El individuo puede haber recibido un diagnóstico de fibrosis, puede estar en riesgo de desarrollar fibrosis o puede sospecharse que padece fibrosis.

En algunas realizaciones, un individuo que tiene fibrosis tiene fibrosis renal, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis cardíaca, fibrosis cutánea, fibrosis senil, fibrosis del bazo, esclerodermia o fibrosis postrasplante.

Muchas enfermedades y anomalías del riñón se caracterizan por la presencia de fibrosis. Como tal, los

compuestos proporcionados en la presente son útiles para tratar, mejorar, prevenir y/o retrasar el inicio de cualquier enfermedad renal que se caracteriza por la presencia de fibrosis. En algunas realizaciones, un individuo que tiene fibrosis tiene una enfermedad o afección renal. En algunas realizaciones, un individuo que está en riesgo de desarrollar fibrosis tiene una enfermedad o afección renal. En algunas realizaciones, un individuo que se sospecha que tiene fibrosis tiene una enfermedad o afección renal. Por lo tanto, en la presente se proporcionan métodos para tratar a un individuo que tiene, está en riesgo de desarrollar o se sospecha que tiene fibrosis, en donde el individuo tiene una enfermedad o afección renal. La enfermedad o afección renal puede ser una o más de, a modo no taxativo, enfermedad glomerular, fibrosis tubulointersticial, nefropatía por IgA, fibrosis intersticial/atrofia tubular, glomeruloesclerosis, glomerulonefritis, diabetes mellitus, glomeruloesclerosis focal y segmentaria idiopática, nefropatía membranosa, glomerulopatía colapsante, infección renal recurrente crónica, diabetes mellitus, nefropatía diabética, infección renal recurrente crónica, hipertensión, hipertensión sistémica, hipertensión intraglomerular o enfermedad renal terminal.

La enfermedad renal crónica puede caracterizarse por la presencia de fibrosis. Por lo tanto, En algunas realizaciones, la enfermedad o afección renal es una enfermedad renal crónica. En algunas realizaciones, el individuo corre el riesgo de desarrollar una enfermedad renal crónica. En algunas realizaciones, un individuo que

tiene un lesión renal aguda corre el riesgo de desarrollar fibrosis y/o enfermedad renal crónica. Por lo tanto, las composiciones y métodos proporcionados en la presente pueden administrarse a un individuo que tiene un lesión renal aguda, para prevenir o retrasar el inicio de la fibrosis y/o enfermedad renal crónica.

En algunas realizaciones, un individuo que tiene fibrosis tiene fibrosis renal que resulta de traumatismo agudo o repetitivo al riñón. El traumatismo puede resultar de cirugía, quimioterapia, radioterapia, rechazo de aloinjerto, rechazo de trasplante crónico y rechazo de trasplante agudo.

En algunas realizaciones, la fibrosis renal puede resultar de la exposición a cualquier agente que puede ser nefrotóxico después de la exposición aguda o crónica. Dichos agentes incluyen agentes farmacéuticos, incluidos, a modo no taxativo, analgésicos, fármacos antiinflamatorios no esteroides, antibióticos, litio, ciclosporina, mesalazina, medio de contraste, agentes quimioterapéuticos; toxinas del ambiente laboral, incluidos, a modo no taxativo, metales pesados; y toxinas ambientales incluidos, a modo no taxativo, metales pesados (por ejemplo, cadmio, cloruro mercurio) o nefrotoxinas vegetales (por ejemplo, ácido aristolóquico).

Muchas enfermedades o anomalías del hígado se caracterizan por la presencia de fibrosis. Como tal, En algunas realizaciones, un individuo que tiene fibrosis tiene una enfermedad o afección hepática. En algunas realizaciones, un individuo que corre riesgo de desarrollar fibrosis tiene una enfermedad o afección hepática. En

algunas realizaciones, un individuo que se sospecha que tiene fibrosis tiene una enfermedad o afección hepática. Por lo tanto, en la presente se proporcionan métodos para tratar a un individuo que tiene, corre riesgo de desarrollar o se sospecha que tiene fibrosis, en donde el individuo tiene una enfermedad o afección hepática. En algunas realizaciones, una enfermedad o afección hepática puede ser una o más de, a modo no taxativo, lesión hepática crónica, infección por virus de la hepatitis (incluida infección por el virus de la hepatitis C e infección por el virus de la hepatitis B), esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad hepática alcohólica (ALD), esteatohepatitis alcohólica, fibrosis en puente o cirrosis. En algunas realizaciones un enfermedad o afección hepática se asocia con la exposición a químicos tóxicos. En algunas realizaciones, una enfermedad o afección hepática resulta de la exposición a agentes farmacéuticos, por ejemplo, acetaminofen. En algunas realizaciones, un individuo que recibe quimioterapia corre el riesgo de desarrollar fibrosis hepática y/o lesión hepática crónica.

La fibrosis puede estar presente en muchas enfermedades y anormalidades de los pulmones. Como tal, En algunas realizaciones, un individuo que tiene fibrosis tiene una enfermedad o afección pulmonar. En algunas realizaciones, un individuo que corre riesgo de desarrollar fibrosis tiene una enfermedad o afección pulmonar. En algunas realizaciones, un individuo que se sospecha que tiene fibrosis tiene una enfermedad o afección pulmonar. Por lo tanto, en la presente se proporcionan métodos para

tratar a un individuo que tiene, corre riesgo de desarrollar o se sospecha que tiene fibrosis, en donde el individuo tiene una enfermedad o afección pulmonar. En algunas realizaciones, una enfermedad o afección pulmonar puede ser una o más de, a modo no taxativo, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática o enfermedad pulmonar obstructiva crónica. En algunas realizaciones, la fibrosis pulmonar puede resultar de la inhalación de materia en partículas, tal como la encontrada en el gel de sílice, amiantosis, contaminantes del aire y humo de cigarrillos.

En algunas realizaciones, la fibrosis es fibrosis cardíaca.

En algunas realizaciones, la fibrosis es fibrosis cutánea. En algunas realizaciones, la fibrosis es fibrosis senil. En algunas realizaciones, la fibrosis es fibrosis del bazo.

La esclerodermia es una enfermedad autoinmune crónica caracterizada por la fibrosis, entre otros síntomas. En algunas realizaciones, un individuo que tiene fibrosis tiene esclerodermia. En algunas realizaciones, un individuo que tiene esclerodermia tiene fibrosis en órganos internos, además de fibrosis cutánea.

La fibrosis frecuentemente se produce en órganos trasplantados y conduce a la pérdida de la función orgánica y finalmente al rechazo crónico del órgano trasplantado. La prevención o tratamiento de la fibrosis en órganos trasplantados puede prevenir o retrasar el rechazo crónico del órgano trasplantado o, en otras palabras, puede prolongar la función del órgano trasplantado. Por

consiguiente, en ciertas realizaciones un individuo tiene fibrosis postrasplante. En algunas realizaciones, la fibrosis postrasplante es fibrosis postrasplante de riñón. En algunas realizaciones, la fibrosis asociada con trasplante es fibrosis postrasplante de hígado. En algunas realizaciones, un compuesto descrito en la presente se administra antes del trasplante. En algunas realizaciones, un compuesto descrito en la presente se administra simultáneamente con el trasplante. En algunas realizaciones, un compuesto descrito en la presente se administra luego del trasplante.

En la presente se proporcionan métodos para tratar a un individuo que tiene un trastorno fibroproliferativo. En algunas realizaciones, dichos métodos comprenden administrar a un individuo que tiene o se sospecha que tiene un trastorno fibroproliferativo un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobase que es complementaria a un miARN o un precursor del mismo. En algunas realizaciones, el miARN es miR-21.

Cáncer y metástasis

La expresión anormalmente alta de miR-21 se ha demostrado en numerosos tipos de cáncer. Además, la inhibición de miR-21 en modelos in vitro e in vivo ha demostrado que los inhibidores de miR-21 son útiles para la inhibición de procesos celulares que sustenta el crecimiento de células cancerosas, así como para el tratamiento del cáncer.

Por lo tanto, En algunas realizaciones, los compuestos proporcionados en la presente se usan para tratar, prevenir, mejorar y/o retrasar el inicio del cáncer. En

algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, leucemia, linfoma, cáncer cerebral, cáncer esofágico, linfoma de Hodgkin, linfoma nohodgkiniano, cáncer de riñón, melanoma, mieloma, cáncer oral, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de tiroides o cáncer testicular. En algunas realizaciones, el cáncer de hígado es carcinoma hepatocelular. En algunas realizaciones, el cáncer de hígado se debe a metástasis de cáncer que se origina en otra parte del cuerpo, por ejemplo, cáncer óseo, cáncer de colon o cáncer de mama.

En algunas realizaciones, en el cáncer de hígado, el miR-21 es elevado y el nivel de uno o más transcritos regulados por miR-21 se reduce. En algunas realizaciones, el transcrito regulado por miR-21 reducido es SPG20.

En algunas realizaciones, el cáncer de hígado es carcinoma hepatocelular (HCC). El diagnóstico de carcinoma hepatocelular se hace típicamente mediante pruebas con imágenes del hígado tales como ecografía abdominal, tomografía computada helicoidal (TC) o TC trifásica. Dichas pruebas con imágenes pueden llevarse a cabo junto con la medición de los niveles en sangre de alfa-fetoproteína y/o los niveles en sangre de des-gamma-carboxiprotrombina. En determinados individuos, se puede usar MRI (siglas de resonancia magnética nuclear) en lugar de TC. Las pruebas con imágenes del hígado permiten la evaluación del tamaño del tumor, la cantidad, ubicación, metástasis fuera del hígado, permeabilidad o invasión de las arterias y venas del hígado por el tumor. Esta evaluación ayuda a tomar la

decisión en relación con el modo de intervención terapéutica o paliativa que es apropiada. El diagnóstico final típicamente se confirma mediante biopsia con aguja y examen histopatológico.

5 Por lo tanto, en algunas realizaciones, en cáncer de hígado se detecta luego de una tomografía computada (TC) que detecta tumores. En algunas realizaciones, el cáncer de hígado se detecta luego de una resonancia magnética nuclear (MRI). En algunas realizaciones, el HCC se caracterizado
10 por único tumor primario. En algunas realizaciones, el HCC se caracterizado por múltiples tumores primarios. En algunas realizaciones, el HCC se caracteriza por un tumor primario escasamente definido con un patrón de crecimiento infiltrante. En algunas realizaciones, el HCC es un único
15 tumor primario con invasión vascular. En algunas realizaciones, el HCC se caracteriza por múltiples tumores primarios con invasión vascular. En algunas realizaciones, el HCC ha hecho metástasis en uno o más ganglios linfáticos. En algunas realizaciones, los ganglios
20 linfáticos son ganglios linfáticos regionales. En algunas realizaciones, el HCC ha hecho metástasis en uno o más tejidos distantes. En algunas realizaciones, el HCC ha hecho metástasis en otras regiones del hígado, la vena porta, ganglios linfáticos, glándulas suprarrenales, huesos
25 o pulmones. En algunas realizaciones, la fibrosis está presente.

Se han utilizado varios sistemas empleados para predecir el pronóstico para HCC, incluido el sistema TNM, el sistema Okuda, el Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) y
30 el puntuación CLIP. Cada uno de estos sistemas incorpora

cuatro características que han sido reconocidas como determinantes importantes de la supervivencia: la gravedad de la enfermedad hepática subyacente, el tamaño del tumor, la extensión del tumor en las estructuras adyacentes y la presencia de metástasis. El sistema TNM clasifica al HCC en estadio I, II, III, IV o V. El BCLC clasifica el HCC como de Estadio A1, A2, A3, A4, B, C y D, e incluye la consideración de una puntuación Child-Pugh.

En algunas realizaciones, el cáncer de hígado se clasifica como en Estadio 1, Estadio 2, Estadio 3A, Estadio 3B, Estadio 3C o Estadio 4. El Estadio 1 se caracteriza por un cáncer que no tiene más de 2 cm de tamaño y que todavía no ha comenzado a propagarse. En el Estadio 2, el cáncer afecta los vasos sanguíneos en el hígado y hay más de un tumor en el hígado. En el Estadio 3A, el cáncer tiene más de 5 cm de tamaño o se ha propagado a los vasos sanguíneos cercanos al hígado. En el Estadio 3B, el cáncer se ha propagado a los órganos cercanos, tales como el intestino o el estómago, pero no se ha propagado a los ganglios linfáticos. En el Estadio 3C el cáncer puede tener cualquier tamaño y se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos. En el Estadio 4 el cáncer se ha propagado a partes del cuerpo más alejadas del hígado, tal como los pulmones.

Los biomarcadores en la sangre de un individuo pueden usarse para incrementar un diagnóstico de cáncer de hígado, estadio de cáncer de hígado o desarrollar un pronóstico de supervivencia. Dichos marcadores incluyen biomarcadores tumorales sanguíneos, tales como alfa-fetoproteína y des-gamma carboxiprotrombina. En algunas realizaciones, el

individuo tiene un nivel elevado de alfa-fetoproteína en sangre. En algunas realizaciones, el individuo tiene un nivel elevado de des-gamma-carboxiprotrombina en sangre.

Un individuo que tiene cáncer de hígado también puede tener una función hepática anormal. La función hepática puede evaluarse mediante pruebas para determinar la función hepática, que miden, entre otras cosas, los niveles en sangre de transaminasas hepáticas. En algunas realizaciones, un individuo que tiene una función hepática anormal tiene transaminasas hepáticas en sangre elevadas. Las transaminasas hepáticas en sangre incluyen alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST). En algunas realizaciones, un individuo que tiene una función hepática anormal tiene bilirrubina en sangre elevada. En algunas realizaciones, un individuo tiene niveles de albúmina en sangre elevadas.

En algunas realizaciones, la función hepática de un individuo se evalúa mediante el sistema de clasificación de Child-Pugh, que define tres clases de función hepática. En este sistema de clasificación, se asignan puntos a mediciones en una de cinco categorías: niveles de bilirrubina, niveles de albúmina, tiempo de protrombina, ascitis y encefalopatía. Se asigna un punto por cada una de las siguientes características presentes: bilirrubina en sangre menor que 2.0 mg/dl; albúmina en sangre mayor que 3.5 mg/dl; un tiempo de protrombina menor que 1.7 razón internacional normalizada (INR); ascitis ausente; o encefalopatía ausente. Se asignan dos puntos por cada una de las siguientes características presentes: bilirrubina en sangre de 2-3 mg/dl; bilirrubina en sangre de 3.5 a 2.8

mg/dl; tiempo de protrombina 1.7-2.3 INR; ascitis leve a moderada; o encefalopatía leve. Se asignan tres puntos por cada una de las siguientes características presentes: bilirrubina en sangre mayor que 3.0 mg/dl; albúmina en
5 sangre de 2.8 mg/dl; tiempo de protrombina mayor que 2.3 INR; ascitis grave a resistente al tratamiento; o encefalopatía grave. Se suman las puntuaciones y se asigna Clase A para una puntuación de 5-6 puntos, se asigna Clase B a un puntuación de 7-9 puntos y se asigna Clase C a una
10 puntuación de 10-15 puntos.

Un individuo que tiene cáncer de hígado puede haber tenido anteriormente o puede tener simultáneamente infección por hepatitis C crónica, infección por hepatitis B crónica, esteatosis hepática no alcohólica o cirrosis.
15 Los individuos que tienen cáncer de hígado acompañado y/o resultante de infección por hepatitis C, infección por hepatitis B, esteatosis hepática no alcohólico o cirrosis pueden tratarse mediante los métodos descritos en la presente.

20 La respuesta de un individuo al tratamiento puede evaluarse mediante pruebas similares a aquellos usados para diagnosticar el cáncer de hígado, incluidas, a modo no taxativo, TC, MRI y biopsia con aguja. La respuesta al tratamiento también puede evaluarse midiendo los
25 biomarcadores en sangre, para comparar con los niveles de los biomarcadores pretratamiento.

El miR-21 también se ha ligado al proceso de la metástasis. Aunque la EMT se produce en procesos fisiológicos normales, la EMT se ha relacionado con el
30 proceso de la metástasis. La importancia de la EMT en el

progreso del tumor ha sido examinada en varios estudios (Greenburg, G. and Hay, E. 1986. Dev. Biol. 115: 363-379; Boyer, B. et al., 1989. J. Cell. Biol. 109: 1495-1509; Uehara, Y. et al., 1992. J. Cell. Biol. 117: 889-894). Las
5 células epiteliales se mantienen juntas a través de integrinas en una matriz extracelular subyacente (ECM) denominada membrana basal. Las células mesenquimales, por otro lado, tienen la capacidad de invadir y moverse a través de la estructura tridimensional de la ECM. Por lo
10 tanto, la EMT al menos superficialmente se parece a la transformación de las células adherentes normales en el fenotipo metastásico.

En la presente se proporcionan métodos para tratar, prevenir, mejorar y/o retrasar el inicio de la metástasis.
15 La metástasis puede resultar de la migración de células canceroso desde un cualquier sitio primario de cáncer a cualquier sitio secundario de cáncer.

Lesión renal aguda

Lesión renal aguda es una rápida pérdida de la función
20 renal, que puede producirse por varias causas, incluido bajo volumen de sangre, exposición a toxinas y obstrucción urinaria. Se ha observado miR-21 elevado en un modelo de lesión renal aguda. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los compuestos proporcionados en la presente se usan para
25 tratar, prevenir, mejorar y/o retrasar el inicio de una lesión renal aguda. En algunas realizaciones, la lesión renal aguda puede resultar de la exposición a sustancias tóxicas, tales como toxinas ambientales o agentes terapéuticos para el cáncer. La lesión renal aguda puede
30 surgir de un daño a los propios riñones, por ejemplo, en

condiciones tales como glomerulonefritis, necrosis tubular aguda y nefritis intersticial aguda. En algunas realizaciones, la lesión renal aguda es provocada por una obstrucción del tracto urinario, tal como la relacionada con la hiperplasia prostática benigna, cálculos renales, catéter urinario obstruido, cálculo vesical, neoplasia de vejiga, uretra o renal. En algunas realizaciones, la lesión renal aguda puede evolucionar a fibrosis y/o enfermedad renal crónica. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los compuestos proporcionados en la presente pueden administrarse a un individuo que tiene una lesión renal aguda, para prevenir o retrasar el inicio de la fibrosis y/o enfermedad renal crónica. En algunas realizaciones, los compuestos proporcionados en la presente se administran a un individuo para mejorar la recuperación de una lesión renal aguda.

Enfermedades cardíacas

Se ha encontrado expresión elevada de miR-21 en la enfermedad cardíaca humana y la inhibición de miR-21 en modelos animales relevantes ha demostrado mejoras en la fibrosis cardíaca y la función cardíaca. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los compuestos proporcionados en la presente se usan para tratar, prevenir, mejorar y/o retrasar el inicio de una o más enfermedades cardíacas. En algunas realizaciones, una enfermedad cardíaca es fibrosis cardíaca, cardiomegalia, hipertrofia cardíaca, dilatación cardíaca, cardiomiopatía hipertrófica, insuficiencia cardíaca, remodelación posinfarto de miocardio, infarto de miocardio, cardiomiopatía (por ejemplo, cardiomiopatía hipertrófica, cardiomiopatía restrictiva, cardiomiopatía

dilatada (DCM), cardiomiopatía dilatada idiopática o cardiomiopatía dilatada con arritmias), insuficiencia cardíaca diastólica, fibrilación auricular crónica, hipertensión pulmonar primaria, síndrome de dificultad respiratoria agudo, síndrome de Brugada, enfermedad de la conducción cardíaca progresiva, pericarditis urémica, cardiomiopatía por antraciclinas, fibrosis arterial, fibrosis linfática posradiación, sarcoidosis, esclerodermia, fibroelastosis endocárdica, exceso serotoninérgico, valvulopatía cardíaca, fibrosis auricular, fibrilación auricular, enfermedad valvular mitral, hipertensión, disfunción ventricular crónica, sobrecarga de presión y volumen o fibrosis miocárdica.

Procesos celulares

En la presente se proporcionan composiciones y métodos para prevenir o evitar la proliferación o activación de fibroblastos. Además se proporcionan en la presente composiciones y métodos para inhibir la síntesis de matriz extracelular, que incluye, a modo no taxativo, síntesis de colágeno, fibronectina, colagenasa o un inhibidor tisular de metaloproteinasa.

En la presente se proporcionan métodos para modular los procesos celulares asociados con la transición epitelial-mesenquimal (EMT). Dichos métodos comprenden poner en contacto una célula epitelilal con un compuesto que consiste en un oligonucleótido modificado, en donde el oligonucleótido modificado es complementario a miR-21. En algunas realizaciones, el contacto retrasa la transición de una célula epitelial a un fibroblasto. En algunas

realizaciones, el contacto evita la transición de una célula epitelial a un fibroblasto.

En algunas realizaciones, un compuesto proporcionado en la presente puede detener, enlentecer o reducir la proliferación de células cancerosas. En algunas realizaciones, un compuesto proporcionado en la presente puede inducir la apoptosis en células cancerosas. En algunas realizaciones, un compuesto proporcionado en la presente puede reducir la supervivencia de células cancerosas.

En algunas realizaciones, la célula epitelial es una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el contacto retrasa la metástasis de la célula cancerosa. En algunas realizaciones, el contacto evita la metástasis de la célula cancerosa.

Determinados resultados clínicos

En algunas realizaciones, la administración de los compuestos o métodos proporcionados en la presente resulta en uno o más resultados clínicamente deseables en un individuo. Dichas mejoras pueden usarse para determinar la medida en que un individuo está respondiendo al tratamiento.

En algunas realizaciones, un resultado clínicamente deseable es la mejora de la fibrosis. En algunas realizaciones, un resultado clínicamente deseable es el enlentecimiento de la evolución de la fibrosis. En algunas realizaciones, un resultado clínicamente deseable es el detenimiento de la evolución adicional de la fibrosis. En algunas realizaciones, un resultado clínicamente deseable es una reducción en la fibrosis. En algunas realizaciones,

un resultado clínicamente deseable es una reducción en el contenido de colágeno en el órgano que tiene fibrosis.

En algunas realizaciones, un resultado clínicamente deseable es la mejora de la fibrosis en cualquier órgano o tejido. En algunas realizaciones, un resultado clínicamente deseable es el enlentecimiento de la evolución de la fibrosis. En algunas realizaciones, un resultado clínicamente deseable es el detenimiento de la evolución adicional de la fibrosis. En algunas realizaciones, un resultado clínicamente deseable es una reducción en la fibrosis. En algunas realizaciones, un resultado clínicamente deseable es una reducción en el contenido de colágeno en el órgano afectado.

En algunas realizaciones, un resultado clínicamente deseable es una función renal mejorada. La función renal puede evaluarse mediante uno o más métodos conocidos comúnmente que se llevan a cabo en un escenario clínico, incluidos, a modo no taxativo: medir el nitrógeno ureico en la sangre del individuo; medir la creatinina en la sangre del individuo; medir el aclaramiento de creatinina en el individuo; medir la proteinuria en el individuo; medir la relación albúmina:creatinina en el individuo; medir la diuresis en el individuo; medir los niveles de ARNm de la molécula de lesión renal-1 (KIM-1) en la orina; y/o los niveles de clusterina en la orina.

En algunas realizaciones, un resultado clínicamente deseable es una función hepática mejorada. La función hepática puede evaluarse mediante uno o más métodos comúnmente conocidos que se llevan a cabo en un escenario clínico, incluidos, a modo no taxativo, medir los niveles

de alanina aminotransferasa en la sangre del individuo; medir los niveles de aspartato aminotransferasa en la sangre del individuo; medir los niveles de bilirrubina en la sangre del individuo; medir los niveles de albúmina en la sangre del individuo; medir el tiempo de protrombina en el individuo; medir la ascitis en el individuo; y/o medir la encefalopatía en el individuo.

En algunas realizaciones, un resultado clínicamente deseable es una función pulmonar mejorada en un individuo que tiene fibrosis pulmonar. En algunas realizaciones el individuo tiene fibrosis pulmonar idiopática. Se puede evaluar la función pulmonar mediante uno o más métodos conocidos comúnmente que se llevan a cabo en un escenario clínico, incluidos, a modo no taxativo: medir la capacidad vital máxima en el individuo; medir el volumen de espiratorio máximo en el primer segundo en el individuo; medir la tasa de flujo espiratorio pico en el individuo; medir el flujo espiratorio máximo en el individuo; medir la ventilación voluntaria máxima en el individuo; determinar la relación entre el volumen de espiratorio máximo en el primer segundo y la capacidad vital máxima en el individuo; medir la relación ventilación/perfusión en el individuo; medir el lavado de nitrógeno en el individuo; y/o medir el volumen absoluto de aire en uno o más pulmones de un individuo; y aplicar la prueba de caminata de 6 minutos.

En algunas realizaciones, un resultado clínicamente deseable es una función cardíaca mejorada en un individuo que tiene fibrosis cardíaca. Se puede evaluar la función cardíaca mediante uno o más métodos conocidos que se llevan a cabo en un escenario clínico, incluidos, a modo no

taxativo: medir el gasto cardíaco en el individuo; medir el volumen sistólico en el individuo; medir la tasa media de eyección sistólica en el individuo; medir la presión sanguínea sistólica en el individuo; medir la fracción de eyección de ventrículo izquierdo en el individuo; determinar el índice sistólico en el individuo; determinar el índice cardíaco en el individuo; medir el porcentaje de acortamiento fraccional del ventrículo izquierdo en el individuo; medir la velocidad media del acortamiento de fibras circunferenciales en el individuo; medir el patrón de velocidad de afluencia del ventrículo izquierdo en el individuo; medir el patrón de velocidad de flujo venoso pulmonar en el individuo; y/o medir la velocidad diastólica inicial pico del anillo mitral del individuo.

En algunas realizaciones un resultado clínicamente deseable es la reducción de la cantidad de tumores y/o la reducción del tamaño del tumor en un individuo que tiene cáncer. En algunas realizaciones, un resultado clínicamente deseable es una reducción en la cantidad de células cancerosas en un individuo que tiene cáncer. Los resultados clínicamente deseables adicionales incluyen la extensión del tiempo de sobrevida total del individuo y/o la extensión del tiempo de sobrevida libre de progresión del individuo. En algunas realizaciones, la administración de un compuesto proporcionado en la presente evita un aumento en el tamaño del tumor y/o en la cantidad de tumores. En algunas realizaciones, la administración de un compuesto proporcionado en la presente evita la progresión metastásica. En algunas realizaciones, la administración de un compuesto proporcionado en la presente enlentece o

detiene la progresión metastásica. En algunas realizaciones, la administración de un compuesto proporcionado en la presente evita la recidiva de tumores. En algunas realizaciones, la administración de un compuesto proporcionado en la presente evita la recidiva de la metástasis tumoral.

Determinados resultados clínicamente deseables pueden evaluarse mediante mediciones de biomarcadores sanguíneos. En algunas realizaciones, la administración de un compuesto proporcionado en la presente puede resultar en la disminución de la alfa-fetoproteína en sangre y/o la des-gamma carboxiprotrombina en sangre. La administración de una compuesto proporcionado en la presente puede resultar además en la mejora de la función hepática, tal como se evidencia mediante una reducción en los niveles de ALT y/o AST en sangre.

Determinadas terapias adicionales

Los tratamientos para fibrosis o cualesquiera afecciones indicadas en la presente pueden comprender más de una terapia. Como tal, En algunas realizaciones proporcionadas en la presente, hay métodos para tratar un individuo que tiene o se sospecha que tiene fibrosis, que comprenden administrar al menos una terapia además de administrar un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a un miR-21.

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

En algunas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen agentes antiinflamatorios. En algunas realizaciones, los agentes antiinflamatorios incluyen un

agente antiinflamatorio esteroide. En algunas realizaciones, un agente antiinflamatorio esteroide es un corticoesteroide. En algunas realizaciones, el corticoesteroide es prednisona. En algunas realizaciones, un agente antiinflamatorio es un fármaco antiinflamatorio no esteroide. En algunas realizaciones, un agente antiinflamatorio no esteroide es ibuprofeno, un inhibidor de COX-I o un inhibidor de COX-2.

En algunas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen agentes inmunosupresores. En algunas realizaciones, el agente inmunosupresor es un corticoesteroide, ciclofosfamida y micofenolato mofetilo.

En algunas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen agentes antidiabéticos. Los agentes antidiabéticos incluyen, a modo no taxativo, biguanidas, inhibidores de glucosidasa, insulinas, sulfonilureas y tiazolidinedionas.

En algunas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen bloqueadores del receptor de angiotensina II (BRA). En algunas realizaciones, el bloqueador del receptor de angiotensina II (BRA) es candesartán, irbesartán, olmesartán, losartán, valsartán, telmisartán o eprosartán.

En algunas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen, a modo no taxativo, diuréticos (por ejemplo, espironolactona, eplerenona, furosemida), inótropos (por ejemplo, dobutamina, milrinona), digoxina, vasodilatadores, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II (ECA) (por ejemplo, son captopril, enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril, fosinopril y ramipril), bloqueadores de canal de calcio, dinitrato de isosorbida, hidralazina, nitratos (por ejemplo, mononitrato de isosorbida, dinitrato

de isosorbida), hidralazina, beta-bloqueadores (por ejemplo, carvedilol, metoprolol) y péptidos natriuréticos (por ejemplo, nesiritida).

5 En algunas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen heparinoides. En algunas realizaciones, el heparinoide es polisulfato de pentosán.

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

10 En algunas realizaciones, un agente farmacéutico es una terapia antifactor de crecimiento de tejido conectivo. En algunas realizaciones, una terapia anti-CTGF es un anticuerpo monoclonal contra CTGF.

15 En algunas realizaciones, una terapia adicional puede ser un agente farmacéutico que mejora el sistema inmunitario del cuerpo, incluido ciclofosfamida en dosis bajas, timostimulina, vitaminas y complementos nutricionales (por ejemplo, antioxidantes, incluidas vitaminas A, C, E, beta-caroteno, zinc, selenio, glutatión, 20 coenzima Q-10 y echinacea) y vacunas, por ejemplo, el complejo inmunoestimulador (ISCOM), que comprende una formulación de vacuna que combina una presentación multimérica del antígeno y un adyuvante.

25 En algunas realizaciones, la terapia adicional se selecciona para tratar o mejorar un efecto secundario de una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. Dichos efectos secundarios incluyen, a modo no taxativo, reacciones en el sitio de inyección, anormalidades en la prueba de función hepática, 30 anormalidades en la función renal, toxicidad hepática,

toxicidad renal, anormalidades en el sistema nervioso central y miopatías. Por ejemplo, niveles aumentados de aminotransferasa en suero pueden indicar toxicidad hepática o anormalidad en la función hepática. Por ejemplo, bilirrubina aumentada puede indicar toxicidad hepática o anormalidad en la función hepática.

Ejemplos adicionales de agentes farmacéuticos adicionales incluyen, a modo no taxativo, inmunoglobulinas, incluidas, a modo no taxativo inmunoglobulina intravenosa (IVIg); analgésicos (por ejemplo, acetaminofen); salicilatos; antibióticos; antivirales; antifúngicos; modificadores adrenérgicos; hormonas (por ejemplo, esteroides anabólicos, andrógeno, estrógeno, calcitonina, progestina, somatostatina y hormonas tiroideas); inmunomoduladores; relajantes musculares; antihistaminas; agentes para la osteoporosis (por ejemplo, bifosfonatos, calcitonina y estrógenos); prostaglandinas, agentes antineoplásicos; agentes psicoterapéuticos; sedantes; productos de roble venenoso o zumaque venenoso; anticuerpos; y vacunas.

Los tratamientos para el cáncer a menudo comprenden más de una terapia. Como tal, En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para reducir o evitar la metástasis que comprenden administrar a un individuo un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado, en donde el oligonucleótido modificado es complementario a miR-21, y administrar al menos una terapia adicional que es una terapia anticancerígena.

En algunas realizaciones, una terapia anticancerígena es quimioterapia. Agentes quimioterapéuticos adecuados

incluyen docetaxel, ciclofosfamida, ifosfamida, metotrexato, vinblastina, cisplatino, 5-fluorouracilo, gemcitabina, doxorubicina, mitomicina C, sorafenib, etopósido, carboplatino, epirubicina, irinotecán y oxaliplatino. Un agente quimioterapéutico adicional adecuado incluye un compuesto oligomérico, distinto a una composición dirigida a miR-21 proporcionada en la presente, que se usa para tratar el cáncer.

En algunas realizaciones, una terapia anticancerosa es radioterapia. En algunas realizaciones, una terapia anticancerosa es resección quirúrgica de un tumor. En algunas realizaciones, la terapia anticancerosa es un agente que daña el ADN, un inhibidor de proliferación, un antifolato, un inhibidor del receptor del factor de crecimiento, un agente antiangiogénico, un inhibidor de la tirosina cinasa del receptor, un inhibidor de cinasa, un inhibidor del factor de crecimiento o un agente citotóxico.

En algunas realizaciones, un agente que daña el ADN es 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea, busulfan, carboplatino, carmustina, clorambucil, cisplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, etopósido, idarrubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina, mecloretamina, melfalán, mitomicina C, mitoxantrona, oxaliplatino, temozolomida o topotecán.

En algunas realizaciones, un antifolato es metotrexato, aminopterina, timidilato sintasa, serina hidroximetiltransferasa, foliilpoliglutamyl sintetasa, g-glutamyl hidrolasa, glicinamida-ribonucleótido transformilasa, leucovorina, amino-imidazol-carboxamida-

ribonucleótido transformilasa, 5-fluorouracilo o un transportador de folato.

En algunas realizaciones, un receptor del factor de crecimiento es erlotinib o gefitinib.

5 En algunas realizaciones, un inhibidor de angiogénesis es bevacizumab, talidomida, carboxiamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN- α , factor de plaquetas 4, suramina, SU5416, trombospondina, un antagonista de VEGFR, factor inhibidor de angiogénesis derivado de cartílago, un inhibidor de
10 metaloproteínasa de matriz, angiostatina, endostatina, 2-metoxiestradiol, tecogalán, tetratiomolibdato, prolactina o linomida.

En algunas realizaciones, un inhibidor de cinasa es bevacizumab, BIBW 2992, cetuximab, imatinib, trastuzumab,
15 gefitinib, ranibizumab, pegaptanib, sorafenib, dasatinib, sunitinib, erlotinib, nilotinib, lapatinib, panitumumab, vandetanib, E7080, pazopanib, mubritinib o fostamatinib.

Determinadas secuencias de nucleobase de microARN

Los oligonucleótidos modificados que tiene un patrón
20 de nucleósidos descrito en la presente tienen una secuencia de nucleobase que es complementaria miR-21 (SEQ ID NO: 1) o un precursor del mismo (SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, cada nucleobase del oligonucleótido modificado es capaz sufrir un emparejamiento de bases con
25 una nucleobase en cada posición correspondiente en la secuencia de nucleobase de miR-21, o un precursor del mismo. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleobase de un oligonucleótido modificado puede tener una o más pares de bases malemparejados con respecto a la secuencia

30

de nucleobase de miR-21 o una secuencia precursora, y permanece capaz de hibridarse con su secuencia objetivo.

5 Ya que la secuencia de miR-21 está contenida dentro de la secuencia precursora de miR-21, un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobase complementaria a miR-21 también es complementaria a una región del precursor de miR-21.

10 En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en una cantidad de nucleósidos ligados que es igual a la longitud de miR-21.

En algunas realizaciones, la cantidad de nucleósidos ligados de un oligonucleótido modificado es menor que la longitud del miR-21. Un oligonucleótido modificado que tiene una cantidad de nucleósidos modificados que es menor
15 que la longitud de miR-21, en donde cada nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a cada nucleobase en una posición correspondiente del miR-21, se considera que es un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobase que es completamente
20 complementaria a una región de la secuencia de miR-21. Por ejemplo, un oligonucleótido modificado que consiste en 19 nucleósidos ligados, donde cada nucleobase es complementaria a una posición correspondiente de miR-21 que tiene 22 nucleobases de longitud, es completamente
25 complementaria a una región de 19 nucleobases de miR-21. Dicho oligonucleótido modificado tiene aproximadamente 86% de complementariedad total con la longitud total de miR-21 y tiene 100% de complementariedad con una porción de 19 nucleobases de miR-21.

30

En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado comprende una secuencia de nucleobases que es complementaria a una secuencia semilla, es decir, un oligonucleótido modificado comprende una secuencia que coincide con la semilla. En algunas realizaciones, una secuencia semilla es una secuencia semilla hexámera. En algunas realizaciones, una secuencia semilla tiene 1-6 nucleobases de miR-21. En algunas realizaciones, una secuencia semilla tiene 2-7 nucleobases de miR-21. En algunas realizaciones, una secuencia semilla tiene 3-8 nucleobases de miR-21. En algunas realizaciones, una secuencia semilla es una secuencia semilla heptámera. En algunas realizaciones, una secuencia semilla heptámera tiene 1-7 nucleobases de miR-21. En algunas realizaciones, una secuencia semilla heptámera tiene 2-8 nucleobases de miR-21. En algunas realizaciones, una secuencia semilla es una secuencia semilla octámera. En algunas realizaciones, una secuencia semilla octámera tiene 1-8 nucleobases de miR-21. En algunas realizaciones, una secuencia semilla octámera tiene 2-9 nucleobases de miR-21.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que tiene un malemparejamiento con respecto a la secuencia de nucleobases de miR-21 o un precursor de la misma. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que tiene dos malemparejamientos con respecto a la secuencia de nucleobases de miR-21 o un precursor de la misma. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que no tiene más de dos

malemparejamientos con respecto a la secuencia de nucleobases de miR-21 o un precursor de la misma. En algunas realizaciones, las nucleobases malemparejadas son contiguas. En algunas realizaciones, las nucleobases malemparejadas no son contiguas.

En algunas realizaciones, la cantidad de nucleósidos ligados de un oligonucleótido modificado es mayor que la longitud del miR-21. En algunas realizaciones, la nucleobase de un nucleósido adicional es complementaria a una nucleobase de la secuencia tallo-bucle de miR-21. En algunas realizaciones, la cantidad de nucleósidos ligados de un oligonucleótido modificado es una vez mayor que la longitud del miR-21. En algunas realizaciones, el nucleósido adicional está en el extremo 5' de un oligonucleótido. En algunas realizaciones, el nucleósido adicional está en el extremo 3' de un oligonucleótido. En algunas realizaciones, la cantidad de nucleósidos ligados de un oligonucleótido modificado es dos veces mayor que la longitud del miR-21. En algunas realizaciones, los dos nucleósidos adicionales están en el extremo 5' de un oligonucleótido. En algunas realizaciones, los dos nucleósidos adicionales están en el extremo 3' de un oligonucleótido. En algunas realizaciones, un nucleósido adicional se ubica en el extremo 5' y un nucleósido adicional se ubica en el extremo 3' de un oligonucleótido. En algunas realizaciones, un región del oligonucleótido puede ser completamente complementaria a la secuencia de nucleobases de miR-21, pero todo el oligonucleótido modificado no es completamente complementario a miR-21. Por ejemplo, un oligonucleótido modificado que consiste en 24

nucleósidos ligados, donde las nucleobases de los nucleósidos 1 a 23 son cada una complementaria a una posición correspondiente de miR-21 que tiene 22 nucleobases de longitud, tiene una porción de 22 nucleósidos que es completamente complementaria a la secuencia de nucleobases de miR-21 y tiene aproximadamente 96% de complementariedad total con la secuencia de nucleobases de miR-21.

Determinados oligonucleótidos modificados

En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 8 a 30 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 15 a 30 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 15 a 25 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 15 a 19 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 15 a 16 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 19 a 24 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 21 a 24 nucleósidos ligados.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 8 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 9 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 10 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 11 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 12 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un

oligonucleótido modificado consiste en 13 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 14 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 15 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 16 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 17 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 18 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 19 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 20 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 21 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 22 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 23 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 24 nucleósidos ligados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado consiste en 25 nucleósidos ligados.

Las secuencias de nucleobases establecidas en la presente, incluidas, a modo no taxativo, aquellas encontradas en los ejemplos y en el listado de secuencias, son independientes de cualquier modificación al ácido nucleico. Como tal, los ácidos nucleicos definidos mediante una SEQ ID NO pueden comprender, independientemente, una o más modificaciones a uno o más restos de azúcar, a uno o más enlaces internucleósidos y/o a una o más nucleobases.

Aunque el listado de secuencias que acompaña esta presentación identifica cada secuencia de nucleobases como "ARN" o "ADN", según sea necesario, en la práctica, dichas secuencias pueden modificarse con cualquier combinación de modificaciones químicas. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que dichas designaciones de "ARN" o "ADN" para describir oligonucleótidos modificados son, de cierta forma, arbitrarias. Por ejemplo, un oligonucleótido modificado que comprende un nucleósido que comprende un resto de azúcar 2'-OH y una base de timina podría describirse como un ADN que tiene un azúcar modificado (2'-OH en lugar del 2'-H natural del ADN) o como un ARN que tiene una base modificada (timina (uracilo metilado) en lugar del uracilo natural del ARN).

Por consiguiente, las secuencia de ácido nucleico proporcionadas en la presente, pero no limitadas a las que se encuentran en el listado de secuencias, pretenden abarcar los ácidos nucleicos que contienen cualquier combinación de ARN y/o ADN natural o modificado, incluidos, pero no limitados a dichos ácidos nucleicos que tienen nucleobases modificadas. A modo de ejemplo adicional y sin limitación, un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleobases "ATCGATCG" abarca cualquier oligonucleótido que tiene dicha secuencia de nucleobases, ya sea modificada o no modificada, incluidos, a modo no taxativo, dichos compuestos que comprenden bases de ARN, tales como las que tienen la secuencia "AUCGAUCG" y aquellos que tienen algunas bases de ADN y algunas bases de ARN tales como "AUCGATCG" y oligonucleótidos que tienen otras bases modificadas, tales como "AT^{me}CGAUCG," en donde ^{me}C indica

una citosina 5-metilo. De forma similar, un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleobases "AUCGAUCG" abarca cualquier oligonucleótido que tiene dicha secuencia de nucleobases, ya sea modificada o no modificada, incluidos, a modo no taxativo, dichos compuestos que comprenden bases de ADN, tales como las que tienen la secuencia "ATCGATCG" y aquellos que tienen algunas bases de ADN y algunas bases de ARN tales como "AUCGATCG" y oligonucleótidos que tienen otras bases modificadas, tales como "AT^{me}CGAUCG," en donde ^{me}C indica una citosina 5-metilo.

Determinadas modificaciones

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos proporcionados en la presente pueden comprender una o más modificaciones a una nucleobase, azúcar y/o enlace internucleósido, y como tal es un oligonucleótido modificado. Una nucleobase, azúcar y/o enlace internucleósido modificado puede seleccionarse con respecto a una forma no modificada debido a sus propiedades deseables tales como, por ejemplo, absorción celular mejorada, afinidad mejorada con otros oligonucleótidos o ácidos nucleicos objetivo y estabilidad aumentada en presencia de nucleobases.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado comprende uno o más nucleósidos modificados. En algunas realizaciones, un nucleósido modificado es un nucleósido estabilizante. Un ejemplo de un nucleósido estabilizantes es un nucleósido con azúcar modificado.

En algunas realizaciones, un nucleósido modificado es un nucleósido con azúcar modificado. En algunas

realizaciones, los nucleósidos con azúcar modificado pueden comprender además un resto de base heterocíclico natural o modificado y/o un enlace internucleósido natural o modificado y pueden incluir modificaciones adicionales independientes de la modificación del azúcar. En algunas realizaciones, un nucleósido con azúcar modificado es un nucleósido modificado en 2', en donde el anillo de azúcar se modifica en el carbono en 2' de la ribosa o 2'-desoxiribosa natural.

En algunas realizaciones, el nucleósido modificado en 2' es un resto de azúcar bicíclico. En algunas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar D en la configuración alfa. En algunas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar D en la configuración beta. En algunas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar L en la configuración alfa. En algunas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar L en la configuración beta.

En algunas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende un grupo puente entre los átomos de carbono en 2' y 4'. En algunas realizaciones, el grupo puente comprende de 1 a 8 grupos birradicales ligados. En algunas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende de 1 a 4 grupos birradicales ligados. En algunas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende 2 o 3 grupos birradicales ligados. En algunas realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende 2 grupos birradicales ligados. Ejemplos de dichos sustituyentes de azúcar en 4' a 2', incluyen, a modo no taxativo: $-[C(R_a)(R_b)]_n-$, $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$, $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$ o $-C(R_aR_b)-O-N(R)-$; 4'-CH₂-2', 4'-

(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2'; 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (cEt) y 4'-C-H(CH₂OCH₃)-O-2' y análogos de los mismos (ver, por ejemplo, Patente de los EE. UU. 7.399.845, expedida el 15 de julio de 2008); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' y análogos del mismo, (ver, por ejemplo, WO2009/006478, publicada el 8 de enero de 2009); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' y análogos del mismo (ver, por ejemplo, WO2008/150729, publicada el 11 de diciembre de 2008); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (ver, por ejemplo, US2004/0171570, publicada el 2 de setiembre de 2004); 4'-CH₂-O-N(R)-2' y 4'-CH₂-N(R)-O-2'-, en donde cada R es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C₁-C₁₂; 4'-CH₂-N(R)-O-2', en donde R es H, alquilo C₁-C₁₂ o un grupo protector (ver, Patente de los EE. UU. 7.427.672, expedida el 23 de setiembre de 2008); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (ver, por ejemplo, Chattopadhyaya, et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); y 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' y análogos del mismo (ver, la Solicitud Internacional PCT publicada WO 2008/154401, publicada el 8 de diciembre de 2008).

En algunas realizaciones, dichos puentes en 4' a 2' comprenden independientemente 1 o de 2 a 4 grupos ligados seleccionados independientemente de - [C(R_a)(R_b)]_n-, -C(R_a)=C(R_b)-, -C(R_a)=N-, -C(=NR_a)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R_a)₂-, -S(=O)_x- y -N(R_a)-;

en donde:

x es 0, 1 o 2;

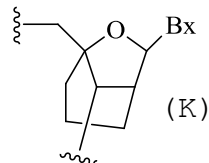
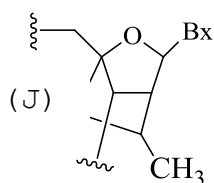
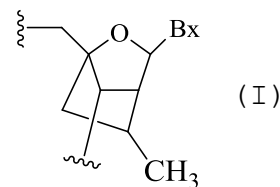
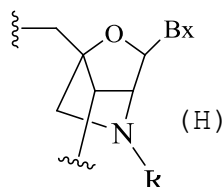
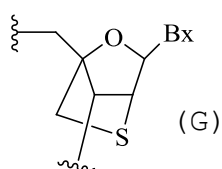
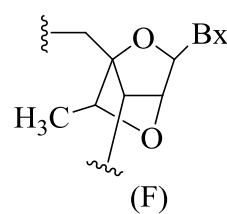
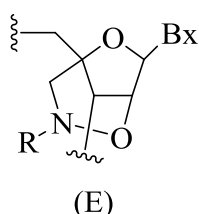
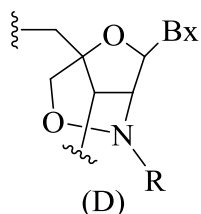
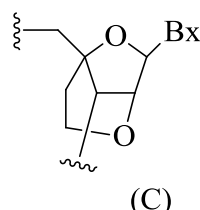
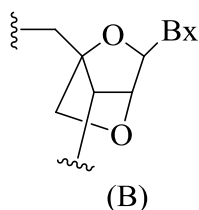
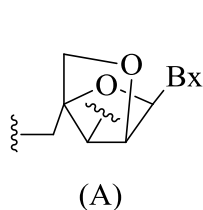
n es 1, 2, 3 o 4;

cada R_a y R_b es, independientemente, H, un grupo protector, hidroxilo, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-

C₁₂, alquinilo C₂-C₁₂ sustituido, arilo C₅-C₂₀, arilo C₅-C₂₀ sustituido, radical heterociclo, radical heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical alicíclico C₅-C₇, radical alucíclico C₅-C₇ sustituido, halógeno, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, CN, sulfonilo (S(=O)₂-J₁) o sulfoxilo (S(=O)-J₁); y

cada J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alquenilo C₂-C₁₂, alquenilo C₂-C₁₂ sustituido, alquinilo C₂-C₁₂, alquinilo C₂-C₁₂ sustituido, arilo C₅-C₂₀, arilo C₅-C₂₀ sustituido, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, aminoalquilo C₁-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂ sustituido o un grupo protector.

Los nucleósidos que comprenden dichos restos de azúcar bicíclicos se denominan nucleósidos bicíclicos o BNA. En algunas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos incluyen, a modo no taxativo, (A) BNA α-L-Metilenoxi (4'-CH₂-O-2'); (B) BNA β-D-Metilenoxi (4'-CH₂-O-2'); (C) BNA Etilenoxi (4'-(CH₂)₂-O-2'); (D) BNA Aminooxi (4'-CH₂-O-N(R)-2'); (E) BNA Oxiamino (4'-CH₂-N(R)-O-2'); (F) BNA Metil(metilenoxi) (4'-CH(CH₃)-O-2') (también denominada etilo limitado o cEt); (G) BNA metileno-tio (4'-CH₂-S-2'); (H) BNA metileno-amino (4'-CH₂-N(R)-2'); (I) BNA metil carbocíclico (4'-CH₂-CH(CH₃)-2'); (J) BNA c-MOE (4'-CH₂-OMe-2') y (K) BNA propileno carbocíclico (4'-(CH₂)₃-2') tal como se representa a continuación.



en donde Bx es un resto de nucleobase y R es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C₁-C₁₂. En algunas realizaciones, un nucleósido modificado en 2' comprende un grupo sustituyente en 2' seleccionado de halo, alilo, amino, azido, SH, CN, OCN, CF₃, OCF₃, O-, S- o N(R_m)-alquilo; O-, S- o N(R_m)-alquenilo; O-, S- o N(R_m)-alquinilo; O-alquilenil-O-alquilo, alquinilo, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo, O-aralquilo, O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n) o O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), donde cada R_m y R_n es, independientemente, H, un grupo amino protector o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o insustituido. Estos grupos sustituyentes en 2' pueden sustituirse adicionalmente por

uno o más grupos sustituyentes seleccionados independientemente de hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro (NO₂), tiol, tioalcoxi (S-alquil), halógeno, alquilo, arilo, alquenilo y alquinilo.

5 En algunas realizaciones, un nucleósido modificado en 2' comprende un grupo sustituyente en 2' seleccionado de F, NH₂, N₃, OCF₃, O-CH₃, O(CH₂)₃NH₂, CH₂-CH=CH₂, O-CH₂-CH=CH₂, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n), - O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂ y acetamida (O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n) sustituido por N donde cada R_m y R_n es, independientemente, 10 H, un grupo amino protector o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o insustituido.

En algunas realizaciones, un nucleósidos modificado en 2' comprende un grupo sustituyente en 2' seleccionado de F, 15 OCF₃, O-CH₃, OCH₂CH₂OCH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(CH₃)₂, -O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂ y O-CH₂-C(=O)-N(H)CH₃.

En algunas realizaciones, un nucleósido modificado en 2' comprende un grupo sustituyente en 2' seleccionado de F, O-CH₃ y OCH₂CH₂OCH₃.

20 En algunas realizaciones, un nucleósido con azúcar modificado es un nucleósido 4'-tio modificado. En algunas realizaciones, un nucleósido con azúcar modificado es un nucleósido 4'-tio-2' modificado. Un nucleósido 4'-tio modificado tiene un β-D-ribonucleósido donde el 4'-O se 25 reemplaza por 4'-S. Un nucleósido 4'-tio-2' modificado es un nucleósido 4'-tio modificado que tiene el 2'-OH reemplazado por un grupo sustituyente en 2'. Los grupos sustituyentes en 2' adecuados incluyen 2'-OCH₃, 2'-O-(CH₂)₂-OCH₃ y 2'-F.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado comprende una o más modificaciones internucleósido. En algunas realizaciones, cada enlace internucleósido de un oligonucleótido modificado es un
5 enlace internucleósido modificado. En algunas realizaciones, un enlace internucleósido modificado comprende un átomo de fósforo.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado comprende al menos un enlace internucleósido fosforotioato. En algunas realizaciones, cada enlace
10 internucleósido de un oligonucleótido modificado es un enlace internucleósido fosforotioato.

En algunas realizaciones, un enlace internucleósido modificado no comprende un átomo de fósforo. En algunas
15 realizaciones, un enlace internucleósido se forma mediante un enlace internucleósido alquilo de cadena corta. En algunas realizaciones, un enlace internucleósido se forma mediante un enlace internucleósido cicloalquilo. En algunas realizaciones, un enlace internucleósido se forma mediante
20 un heteroátomo mixto y enlace internucleósido alquilo. En algunas realizaciones, un enlace internucleósido se forma mediante un heteroátomo mixto y enlaces internucleósido cicloalquilo. En algunas realizaciones, un enlace internucleósido se forma mediante uno o más enlaces
25 internucleósido heteroatómicos de cadena corta. En algunas realizaciones, un enlace internucleósido se forma mediante uno o más enlaces internucleósido heterocíclicos. En algunas realizaciones, un enlace internucleósido tiene un esqueleto amida. En algunas realizaciones, un enlace

internucleósido tiene partes componentes mixtas de N, O, S y CH₂.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado comprende una o más nucleobases modificadas. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado comprende una o más citocinas 5-metilo. En algunas realizaciones, cada citosina de un oligonucleótido modificado comprende una citocina 5-metilo.

En algunas realizaciones, una nucleobase modificada se selecciona de citocina 5-hidroximetilo, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina. En algunas realizaciones, una nucleobase modificada se selecciona de 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. En algunas realizaciones, una nucleobase modificada se selecciona de pirimidinas sustituidas en 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas N-2, N-6 y O-6, incluidas 2 aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina.

En algunas realizaciones, una nucleobase modificada comprende un heterociclo policíclico. En algunas realizaciones, una nucleobase modificada comprende un heterociclo tricíclico. En algunas realizaciones, una nucleobase modificada comprende un derivado de fenoxazina. En algunas realizaciones, la fenoxazina puede modificarse adicionalmente para formar una nucleobase conocida en la técnica como G-clamp.

Determinadas composiciones farmacéuticas

En la presente se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden oligonucleótidos. En algunas realizaciones, dichas composiciones farmacéuticas se usan para el tratamiento de trastornos metabólicos y afecciones

asociadas. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en la presente comprende un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en 8 a 30 nucleósidos ligados y que tiene una
5 secuencia de nucleobases complementaria a miR-21 o un precursor del mismo. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en la presente comprende un compuesto que consiste en un oligonucleótido modificado que consiste en 8 a 30 nucleósidos ligados y que
10 tiene una secuencia de nucleobases complementaria a miR-21 o un precursor del mismo.

Las vías de administración adecuadas incluyen, a modo no taxativo, oral, rectal, transmucosal, intestinal, entérica, tópica, supositorio, a través de inhalación,
15 intratecal, intracardiaca, intraventricular, intraperitoneal, intranasal, intraocular, intratumoral y parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intramedular y subcutánea). En algunas realizaciones, se administran intratecales farmacéuticos para lograr
20 exposiciones locales en lugar de sistémicas. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden inyectarse directamente en el área del efecto deseado (por ejemplo, en el hígado).

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica se administra en forma de una unidad de dosificación (por
25 ejemplo, comprimido, cápsula, bolo, etc.). En algunas realizaciones, una composición farmacéutica comprende un oligonucleótido modificado a una dosis dentro de un rango seleccionado de 25 mg a 800 mg, 25 mg a 700 mg, 25 mg a 600
30 mg, 25 mg a 500 mg, 25 mg a 400 mg, 25 mg a 300 mg, 25 mg a

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

mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg y 800mg.

En algunas realizaciones, un agente farmacéutico es un oligonucleótido modificado liofilizado estéril que se reconstituye con un diluyente adecuado, por ejemplo, agua estéril para inyección o solución salina estéril para inyección. El producto reconstituido se administra como una inyección subcutánea o como una infusión intravenosa después de la dilución en solución salina. El producto farmacológico liofilizado consiste en un oligonucleótido modificado que se ha preparado en agua para inyección o en solución salina para inyección, se ha ajustado hasta pH 7.0-9.0 con ácido o base durante la preparación y luego se ha liofilizado. El oligonucleótido modificado liofilizado puede ser 25-800 mg de un oligonucleótido. Se entenderá que abarca 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775 y 800 mg de oligonucleótido liofilizado modificado. Además, en algunas realizaciones, el oligonucleótido modificado liofilizado es una cantidad de un oligonucleótido dentro de un rango seleccionado de 25 mg a 800 mg, 25 mg a 700 mg, 25 mg a 600 mg, 25 mg a 500 mg, 25 mg a 400 mg, 25 mg a 300 mg, 25 mg a 200 mg, 25 mg a 100 mg, 100 mg a 800 mg, 200 mg a 800 mg, 300 mg a 800 mg, 400 mg a 800 mg, 500 mg a 800 mg, 600 mg a 800 mg, 100 mg a 700 mg, 150 mg a 650 mg, 200 mg a 600 mg, 250 mg a 550 mg, 300 mg a 500 mg, 300 mg a 400 mg y 400 mg a 600 mg. El producto farmacológico liofilizado puede envasarse en un vial de vidrio claro Tipo I de 2 mL (tratado con sulfato de amonio), taponado con un cierre de

caucho de bromobutilo y sellado con un sobresello de aluminio FLIP-OFF®.

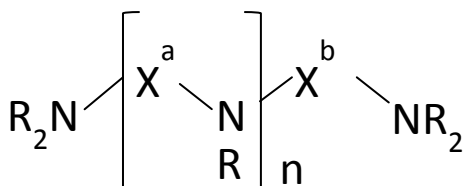
En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente pueden contener
5 adicionalmente otros componentes adjuntos que se encuentran convencionalmente en las composiciones farmacéuticas, en sus niveles de uso establecidos en la técnica. Por consiguiente, por ejemplo, las composiciones puede contener materiales adicionales, compatibles, farmacéuticamente
10 activos tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles para la formulación física de varias formas de dosificación de las composiciones de la presente invención,
15 tales como tintes, agentes saborizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, dichos materiales, cuando se agregan, no deben interferir indebidamente en las actividades biológicas de los componentes de las
20 composiciones de la presente invención. Las formulaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, soluciones
25 amortiguadores, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no interactúan perjudicialmente con el/los oligonucleótido(s) de la formulación.

Se han usado restos lipídicos en terapias con ácido nucleico en una variedad de métodos. En un método, el ácido
30 nucleico se introduce en liposomas o lipoplexos fabricados

hechos con mezclas de lípidos catiónicos y lípidos neutros. En otro método, se forman complejos de ADN con lípidos mono o policationicos sin la presencia de un lípido neutro. En algunas realizaciones, un resto lipídico se selecciona para
5 aumentar la distribución de un agente farmacéutico en una célula o tejido específico. En algunas realizaciones, un resto lipídico se selecciona para aumentar la distribución de un agente farmacéutico en tejido graso. En algunas realizaciones, un resto lipídico se selecciona para
10 aumentar la distribución de un agente farmacéutico en tejido muscular.

En algunas realizaciones, se usa INTRALIPID para preparar una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido. Intralipid es una emulsión grasa preparada
15 para administración intravenosa. Está compuesta por 10% de aceite de soja, 1.2% de fosfolípidos de yema de huevo, 2.25% de glicerina y agua para inyección. Además, se agrega hidróxido de sodio para ajustar el pH a fin de que el rango de pH del producto final sea 6 a 8.9.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en la presente comprende un compuesto de poliamina o un resto lipídico formando un complejo con un ácido nucleico. En algunas realizaciones, dichas preparaciones comprenden uno o más compuestos teniendo cada
25 uno individualmente una estructura definida por la fórmula (Z) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,



5

en donde cada X^a y X^b , para cada caso, es independientemente alquileno C_{1-6} ; n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; cada R es independientemente H, en donde al menos $n + 2$ de los restos R en al menos aproximadamente 80% de las moléculas del compuesto de fórmula (Z) en la preparación no son H; m es 1, 2, 3 o 4; Y es O, NR^2 o S; R^1 es alquilo, alquenilo o alquinilo; cada uno se sustituye opcionalmente por uno o más sustituyentes; y R^2 es H, alquilo, alquenilo o alquinilo; cada uno se sustituye opcionalmente por uno o más sustituyentes; siempre que, se $n = 0$, entonces al menos $n + 3$ de los restos R no son H. Dichas preparaciones se describen en la publicación PCT WO/2008/042973, que se incorpora a modo referencia a la presente en su totalidad para la divulgación de preparaciones lipídicas. Determinadas preparaciones adicionales se describen en Akinc et al., *Nature Biotechnology* **26**, 561 - 569 (01 de mayo de 2008), que se incorpora a modo referencia a la presente en su totalidad para la divulgación de preparaciones lipídicas.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente comprenden uno o más oligonucleótidos modificados y uno o más excipientes. En algunas realizaciones, los excipientes se seleccionan de agua, soluciones de sal, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilasa, estearato de magnesio, talco,

ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en la presente se prepara usando técnicas conocidas, incluidas, a modo no taxativo, mezclado, disolución, granulación, formación de grageas, levigación, emulsión, encapsulado, atrapamiento o formación de comprimidos.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en la presente es un líquido (por ejemplo, una suspensión, elixir y/o solución). En algunas realizaciones, una composición farmacéutica líquida se prepara usando ingredientes conocidos en la técnica, incluidos, a modo no taxativo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservantes y agentes colorantes.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en la presente es un sólido (por ejemplo, un polvo, comprimido y/o cápsula). En algunas realizaciones, una composición farmacéutica sólida que comprende uno o más oligonucleótidos se prepara usando ingredientes conocidos en la técnica, incluidos, a modo no taxativo, almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes y agentes desintegrantes.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en la presente se fórmula como una preparación de depósito. Algunas de dichas preparaciones de depósito con típicamente de acción más larga que las preparaciones que no son de depósito. En algunas realizaciones, dichas preparaciones se administran mediante

implantación (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. En algunas realizaciones, las preparaciones de depósito se preparan usando materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, una sal moderadamente soluble.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en la presente comprende un sistema de administración. Ejemplos de sistemas de administración incluyen, a modo no taxativo, liposomas y emulsiones. Determinados sistemas de administración son útiles para preparar determinadas composiciones farmacéuticas incluidas aquellas que comprenden compuestos hidrófobos. En algunas realizaciones, se usan determinados disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en la presente comprende una o más moléculas de administración específica en un tejidos diseñadas para administrar los uno o más agentes farmacéuticos de la presente invención a tejidos o tipos celulares específicos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas incluyen liposomas revestidos con un anticuerpo específico de tejido.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en la presente comprende un sistema codisolvente. Algunos de dichos sistemas codisolventes comprenden, por ejemplo, alcohol bencílico, un tensioactivo no polar, un polímero orgánico miscible en agua y una fase

acuosa. En algunas realizaciones, dichos sistemas codisolventes se usan para compuestos hidrófobos. Un ejemplo no taxativo de uno de dichos sistemas codisolventes es el sistema codisolvente VPD, que es una solución de alcohol absoluto que comprende 3% p/v de alcohol bencílico, 8% p/v de tensioactivo no polar Polysorbate 80™ y 65% p/v de polietilenglicol 300. Las proporciones de dichos sistemas codisolventes pueden variar considerablemente sin alterar de forma significativa sus características de solubilidad y toxicidad. Además, la identidad de los componentes codisolventes puede variar: por ejemplo, se pueden usar otros tensioactivos en lugar de Polysorbate 80™; el tamaño de fracción del polietilenglicol puede variarse; otros polímeros biocompatibles puede reemplazar el polietilenglicol, por ejemplo, polivinil pirrolidona; y otros azúcares o polisacáridos puede sustituir a la dextrosa.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en la presente comprende un sistema de liberación sostenida. Un ejemplo no taxativo de dicho sistema de liberación sostenida es una matriz semipermeable de polímeros hidrófobos sólidos. En algunas realizaciones, los sistema de liberación sostenida, dependiendo de su naturaleza química, pueden liberar agentes farmacéuticos durante un período de horas, días, semanas o meses.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en la presente se prepara para administración oral. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica se formula combinando uno o más compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado con uno o más

portadores farmacéuticamente aceptables. Algunos de dichos portadores permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, emulsiones y similares para ingestión oral por parte de un individuo. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas para uso oral se obtuvieron mezclando el oligonucleótido y uno o más excipientes sólidos. Los excipientes adecuados incluyen, a modo no taxativo, cargadas, tales como azúcares, incluidas lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de papa, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona (PVP). En algunas realizaciones, dicha mezcla se muele opcionalmente y se agregan auxiliares opcionalmente. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se forman para obtener núcleos de comprimidos o grageas. En algunas realizaciones, se agregan agentes desintegrantes (por ejemplo, polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio).

En algunas realizaciones, los núcleos de grageas se proporcionan con revestimientos. En algunas realizaciones, se pueden usar soluciones de azúcar concentradas, que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolvente o mezclas disolventes orgánicas adecuadas. Se pueden agregar

tintes o pigmentos a los revestimientos de comprimidos o grageas.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas para administración oral son cápsulas duras hechas con gelatina. Algunas de dichas cápsulas duras comprenden uno o más agentes farmacéuticos de la presente invención mezclados con una o más cargas tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas para administración oral son cápsulas blandas selladas hechas con gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. En determinadas cápsulas blandas, uno o más agentes farmacéuticos de la presente invención se disuelven o suspenden en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden agregar estabilizantes.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se preparan para administración bucal. Algunas de dichas composiciones farmacéuticas son comprimidos o grageas formulados de forma convencional.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica se prepara para administración mediante inyección (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). En algunas de dichas realizaciones, una composición farmacéutica comprende un portador y se formula en solución acuosa, tal como agua o soluciones amortiguadoras fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer o solución amortiguadora salina fisiológica. En algunas realizaciones, se incluyen otros

ingredientes (por ejemplo, ingredientes que auxilian en la solubilidad o sirven como conservantes). En algunas realizaciones, las suspensiones inyectables se preparan usando portadores líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares. Algunas composiciones farmacéuticas para inyección se presentan en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en contenedores de dosis múltiples. Algunas composiciones farmacéuticas para inyección son suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Algunos disolventes adecuados para uso en composiciones farmacéuticas para inyección incluyen, a modo no taxativo, disolventes lipofílicos y aceites grasos, tales como aceite de sésamo, ésteres de ácido graso sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, y liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, dichas suspensiones también pueden contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de agentes farmacéuticos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica se prepara para administración transmucosal. En algunas de dichas realizaciones, se usan penetrantes apropiados para permear la barrera en la formulación. Dichos penetrantes se conocen bien en la técnica.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica se prepara para administración por inhalación. Algunas de dichas composiciones farmacéuticas para inhalación se preparan en forma de un pulverizador en aerosol en un
5 envase presurizado o un nebulizador. Algunas de dichas composiciones farmacéuticas comprenden un propulsor, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En algunas realizaciones que usan un aerosol
10 presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse con una válvula que administra una cantidad medida. En algunas realizaciones, se pueden formular cápsulas o cartuchos para uso en un inhalador o insuflador. Algunas de dichas formulaciones comprende una mezcla en polvo de un
15 agente farmacéutico de la invención y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica se prepara para administración rectal, tal como supositorios o enema de retención. Algunas de dichas
20 composiciones farmacéuticas comprenden ingredientes conocidos, tales como mantequilla de cacao y/u otros glicéridos.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica se prepara para administración tópica. Algunas de dichas
25 composiciones farmacéuticas comprenden bases hidratantes suaves, tales como ungüentos o cremas. Bases de ungüento adecuadas ejemplares incluyen, a modo no taxativo, petrolato, petrolato más siliconas volátiles y lanolina y agua en emulsiones oleosas. Bases de crema adecuadas

ejemplares incluyen, a modo no taxativo, crema fría y ungüento hidrófilo.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en la presente comprende un oligonucleótido modificado en una cantidad terapéuticamente efectiva. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para evitar, aliviar o mejorar los síntomas de la enfermedad o prolongar la supervivencia del individuo que está siendo tratado. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, uno o más oligonucleótidos modificados proporcionados en la presente se formulan como un profármaco. En algunas realizaciones, tras la administración *in vivo*, un profármaco se convierte químicamente en la forma biológicamente, farmacéuticamente o terapéuticamente más activa de un oligonucleótido. En algunas realizaciones, los profármacos son útiles porque son más fáciles de administrar que la forma activa correspondiente. Por ejemplo, en ciertos casos, un profármaco puede ser más biodisponible (por ejemplo, a través de administración oral) que su forma activa correspondiente. En ciertos casos, un profármaco puede tener solubilidad mejorada en comparación con la forma activa correspondiente. En algunas realizaciones, los profármacos son menos solubles en agua que la forma activa correspondiente. En ciertos casos, dichos profármacos poseen transmisión superior a través de las membranas celulares, donde la solubilidad en agua es perjudicial para la movilidad. En algunas realizaciones, un profármaco es un

éster. En algunas realizaciones, el éster se hidroliza metabólicamente en ácido carboxílico tras la administración. En ciertos casos, el compuesto que contiene ácido carboxílico es la forma activa correspondiente. En algunas realizaciones, un profármaco comprende un péptido corto (poliaminoácido) unido a un grupo ácido. En algunas de dichas realizaciones, el péptido se escinde tras la administración para formar la forma activa correspondiente.

En algunas realizaciones, un profármaco se produce modificando un compuesto farmacéuticamente activo a fin de que el compuesto activo se regenere tras la administración *in vivo*. El profármaco puede diseñarse para alterar la estabilidad metabólica o las características de transporte de un fármaco, para enmascarar efectos secundarios o toxicidad, para mejorar el sabor de un fármaco o para alterar otras características o propiedades de un fármaco. En virtud del conocimiento sobre procesos farmacodinámicos y metabolismo de fármacos *in vivo*, los expertos en la técnica, una vez conocido un compuesto farmacéuticamente activo, puede diseñar profármacos del compuesto (ver, por ejemplo, Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, páginas 388-392).

Algunas vías de administración

En algunas realizaciones, la administración a un individuos comprende administración parenteral. En algunas realizaciones, la administración a un individuos comprende administración intravenosa. En algunas realizaciones, la administración a un individuo comprende administración subcutánea.

En algunas realizaciones, la administración a un individuo comprende administración intraarterial. En algunas realizaciones, la administración a un individuo comprende administración intracardiaca. Los medios
5 adecuados para administración intracardiaca incluyen el uso de un catéter, o administración durante una cirugía a corazón abierto. En algunas realizaciones, la administración comprende el uso de un stent.

En algunas realizaciones, la administración incluyen
10 administración pulmonar. En algunas realizaciones, la administración pulmonar comprende administración del oligonucleótido aerosolizado al pulmón de un individuo mediante inhalación. Tras la inhalación por parte del individuo del oligonucleótido aerosolizado, el
15 oligonucleótido se distribuye a las células del tejido pulmonar inflamado y normal, incluidos los macrófagos alveolares, eosinófilis, epitelio, endotelio de vasos sanguíneos y epitelio bronqueolar. Un dispositivo adecuado para la administración de una composición farmacéutica que
20 comprende un oligonucleótido modificado incluye, a modo no taxativo, un dispositivo nebulizador estándar. Las formulaciones y métodos para modular el tamaño de las gotitas usando los dispositivos nebulizadores para porciones específicas objetivo del tracto respiratorio y
25 pulmones se conocen en la técnica. Dispositivos adecuados adicionales incluyen inhaladores de polvo seco o inhaladores de dosis medida.

En algunas realizaciones, se administran composiciones farmacéuticas para lograr exposiciones locales en lugar de
30 sistémicas. Por ejemplo, la administración pulmonar

administra una composición farmacéutica al pulmón, con mínima exposición sistémica.

Las vías de administración adecuadas adicionales incluyen, a modo no taxativo, oral, rectal, transmucosal, intestinal, entérica, tópica, supositorio, intratecal, intraventricular, intraperitoneal, intranasal, intraocular intramuscular, intramedular e intratumoral.

Algunos compuestos

En la presente se proporcionan compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado que tiene determinados patrones de nucleósidos y usos de estos compuestos para modular la actividad, nivel o expresión de un ácido nucleico objetivo. En algunas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido. En algunas realizaciones, el compuesto consiste en un oligonucleótido. En algunas realizaciones, el oligonucleótido es un oligonucleótido modificado. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado es complementario a un ARN pequeño no codificante. En algunas realizaciones, el ARN pequeño no codificante es miR-21.

En algunas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado hibridado a una hebra complementaria, es decir, el compuesto comprende un compuesto oligomérico de doble hebra. En algunas realizaciones, la hibridación de un oligonucleótido modificado a una hebra complementaria forma al menos un extremo romo. En algunas de dichas realizaciones, la hibridación de un oligonucleótido modificado con una hebra complementaria forma un extremo romo en cada extremo del compuesto oligomérico de doble hebra. En algunas

realizaciones, el extremo de un oligonucleótido modificado comprende uno o más nucleósidos ligados adicionales con respecto a la cantidad de nucleósidos ligados de la hebra complementaria. En algunas realizaciones, los uno o más nucleósidos adicionales están en el extremo 5' de un oligonucleótido. En algunas realizaciones, los uno o más nucleósidos adicionales están en el extremo 3' de un oligonucleótido. En algunas realizaciones, al menos una nucleobase de un nucleósido de los uno o más nucleósidos adicionales es complementaria al ARN objetivo. En algunas realizaciones, cada nucleobase de cada uno de los uno o más nucleósidos adicionales es complementaria al ARN objetivo. En algunas realizaciones, el extremo de una hebra complementaria comprende uno o más nucleósidos ligados adicionales con respecto a la cantidad de nucleósidos ligados de un oligonucleótido. En algunas realizaciones, los uno o más nucleósidos adicionales están en el extremo 3' de la hebra complementaria. En algunas realizaciones, los uno o más nucleósidos adicionales están en el extremo 5' de la hebra complementaria. En algunas realizaciones dos nucleósidos ligados adicionales se ligan a un extremo. En algunas realizaciones, un nucleósido adicional se liga a un extremo.

En algunas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado conjugado a uno o más restos que potencian la actividad, distribución celular o absorción celular de los oligonucleótidos no codificantes resultantes. En algunas de dichas realizaciones, el resto es un resto colesterol. En algunas realizaciones, el resto es un resto lipídico. Restos adicionales para conjugación

incluyen carbohidratos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, coumarinas y tintes. En algunas realizaciones, un grupo conjugado se acopla directamente a un oligonucleótido. En algunas realizaciones, un grupo conjugado se acopla a un oligonucleótido modificado mediante un resto de ligación seleccionado de amino, hidroxilo, ácido carboxílico, tiol, insaturaciones (por ejemplo, uniones dobles o triples), ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), ácido 6-aminohexanoico (AHEx o AHA), alquilo C1-C10 sustituido, alqueno C2-C10 sustituido o insustituido y alquino C2-C10 sustituido o insustituido. En algunas de dichas realizaciones, un grupo sustituyente se selecciona de hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alqueno y alquino.

En algunas de dichas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que tiene uno o más grupos estabilizantes que se acoplan a uno o ambos extremos de un oligonucleótido modificado para potenciar las propiedades tales como, por ejemplo, la estabilidad de la nucleasa. Los grupos estabilizantes incluyen estructuras funda. Estas modificaciones terminales protegen al oligonucleótido modificado de la degradación por exonucleasas y puede ayudar en la administración y/o localización dentro de una célula. La funda puede estar presente en el extremo 5' (funda en 5') o en el extremo 3' (funda en 3') o puede estar presente en ambos extremos. Las

estructuras de funda incluyen, por ejemplo, fundas abásicas desoxi invertidas.

Las estructuras de funda adecuadas incluyen un nucleótido 4',5'-metileno, un nucleótido 1-(beta-D-eritrofuranosilo), un nucleótido 4'-tio, un nucleótido carbocíclico, un nucleótido 1,5-anhidrohexitol, un nucleótido L, un nucleótido alfa, un nucleótido de base modificada, un enlace fosforoditioato, un nucleótido treopentofuranosilo, un nucleótido acíclico 3',4'-seco, un nucleótido acíclico 3,4-dihidroxibutilo, un nucleótido acíclico 3,5-dihidroxipentilo, un resto nucleotídico 3'-3'-invertido, un resto abásico 3'-3'-invertido, un resto nucleotídico 3'-2'-invertido, un resto abásico 3'-2'-invertido, un 1,4-butanodiol fosfato, un 3'-fosforamidato, un hexilfosfato, un aminohexil fosfato, un 3'-fosfato, un 3'-fosforotioato, un fosforoditioato, un resto formador de puente metilfosfonato y un resto no formador de puente metilfosfonato 5'-amino-alquil fosfato, un 1,3-diamino-2-propil fosfato, 3-aminopropil fosfato, un 6-aminohexil fosfato, un 1,2-aminododecil fosfato, un hidroxipropil fosfato, un resto nucleotídico 5'-5'-invertido, un resto abásico 5'-5'-invertido, un 5'-fosforamidato, un 5'-fosforotioato, un 5'-amino, un 5'-fosforamidato formador de puentes y/o no formador de puentes, un fosforotioato y un resto 5'-mercapto.

Determinadas terapias adicionales

Los tratamientos para una enfermedad asociada con miR-21 pueden comprender más de una terapia. Como tal, En algunas realizaciones proporcionadas en la presente, hay métodos para tratar un individuo que tiene o se sospecha

que tiene una enfermedad asociada con miR-21, que comprenden administrar al menos una terapia además de administrar un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobases complementaria a un microARN.

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

 En algunas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen agentes antiinflamatorios. En algunas realizaciones, los agentes antiinflamatorios incluyen un
10 agente antiinflamatorio esteroide. En algunas realizaciones, un agente antiinflamatorio esteroide es un corticoesteroide. En algunas realizaciones, el corticoesteroide es prednisona. En algunas realizaciones, un agente antiinflamatorio es un fármaco antiinflamatorio
15 no esteroide. En algunas realizaciones, un agente antiinflamatorio no esteroide es ibuprofeno, un inhibidor de COX-I o un inhibidor de COX-2.

 En algunas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen agentes antidiabéticos. Los agentes antidiabéticos
20 incluyen, a modo no taxativo, biguanidas, inhibidores de glucosidasa, insulinas, sulfonilureas y tiazolidinedionas.

 En algunas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen, a modo no taxativo, diuréticos (por ejemplo, espironolactona, eplerenona, furosemida), inótropos (por
25 ejemplo, dobutamina, milrinona), digoxina, vasodilatadores, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II (ECA) (por ejemplo, son captopril, enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril, fosinopril y ramipril), bloqueadores del receptor de angiotensina II (BRA) (por ejemplo,
30 candesartán, irbesartán, olmesartán, losartán, valsartán,

telmisartán, eprosartán), bloqueadores de canal de calcio, dinitrato de isosorbida, hidralazina, nitratos (por ejemplo, mononitrato de isosorbida, dinitrato de isosorbida), hidralazina, beta-bloqueadores (por ejemplo, carvedilol, metoprolol) y péptidos natriuréticos (por ejemplo, nesiritida).

En algunas realizaciones, los agentes farmacéuticos incluyen heparinoides. En algunas realizaciones, el heparinoide es polisulfato de pentosán.

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

En algunas realizaciones, un agente farmacéutico es una terapia antifactor de crecimiento de tejido conectivo. En algunas realizaciones, una terapia anti-CTGF es un anticuerpo monoclonal contra CTGF.

En algunas realizaciones, una terapia adicional puede ser un agente farmacéutico que mejora el sistema inmunitario del cuerpo, incluido ciclofosfamida en dosis bajas, timostimulina, vitaminas y complementos nutricionales (por ejemplo, antioxidantes, incluidas vitaminas A, C, E, beta-caroteno, zinc, selenio, glutatión, coenzima Q-10 y echinacea) y vacunas, por ejemplo, el complejo inmunoestimulador (ISCOM), que comprende una formulación de vacuna que combina una presentación multimérica del antígeno y un adyuvante.

En algunas realizaciones, la terapia adicional se selecciona para tratar o mejorar un efecto secundario de una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención. Dichos efectos secundarios incluyen, a modo no

taxativo, reacciones en el sitio de inyección, anormalidades en la prueba de función hepática, anormalidades en la función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anormalidades en el sistema nervioso central y miopatías. Por ejemplo, niveles aumentados de aminotransferasa en suero pueden indicar toxicidad hepática o anormalidad en la función hepática. Por ejemplo, bilirrubina aumentada puede indicar toxicidad hepática o anormalidad en la función hepática.

Ejemplos adicionales de agentes farmacéuticos adicionales incluyen, a modo no taxativo, inmunoglobulinas, incluidas, a modo no taxativo inmunoglobulina intravenosa (IVIg); analgésicos (por ejemplo, acetaminofen); salicilatos; antibióticos; antivirales; antifúngicos; modificadores adrenérgicos; hormonas (por ejemplo, esteroides anabólicos, andrógeno, estrógeno, calcitonina, progestina, somatostatina y hormonas tiroideas); inmunomoduladores; relajantes musculares; antihistaminas; agentes para la osteoporosis (por ejemplo, bifosfonatos, calcitonina y estrógenos); prostaglandinas, agentes antineoplásicos; agentes psicoterapéuticos; sedantes; productos de roble venenoso o zumaque venenoso; anticuerpos; y vacunas.

Determinados kits

La presente invención también proporciona kits. En algunas realizaciones, los kits comprenden uno o más compuestos de la invención que comprenden un oligonucleótido modificado, en donde la secuencia de nucleobase del oligonucleótido es complementaria a la secuencia de nucleobases de miR-21. Los compuestos

complementarios a miR-21 puede tener cualquiera de los patrones de nucleósidos descritos en la presente. En algunas realizaciones, los compuestos complementarios a miR-21 puede estar presentes dentro de un vial. Un pluralidad de viales, tal como 10, pueden estar presentes, por ejemplo, en envases dispensadores. En algunas realizaciones, el vial se fabrica a fin de ser accesible mediante una jeringa. El kit también puede contener instrucciones para usar los compuestos complementarios a miR-21.

En algunas realizaciones, los kits pueden usarse para administración del compuesto complementario a miR-21 a un individuo. En tales casos, además de los compuestos complementarios a miR-21, el kit puede comprender adicionalmente uno o más de los siguientes: jeringa, hispo de alcohol, bola de algodón y/o almohadilla de gasa. En algunas realizaciones, los compuestos complementarios a miR-21 pueden estar presentes en una jeringa precargada (tal como jeringas de dosis simple con, por ejemplo, un jeringa de paso 27, de ½ pulgada con una guarda de aguja), en lugar de en un vial. Un pluralidad de jeringas precargadas, tal como 10, pueden estar presentes, por ejemplo, en envases dispensadores. El kit también puede contener instrucciones para usar los compuestos complementarios a miR-21.

Algunos modelos experimentales

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para usar y/o evaluar oligonucleótidos modificados de la presente invención en un modelo experimental. Los expertos en la técnica son capaces de

seleccionar y modificar los protocolos para dichos modelos experimentales para evaluar un agente farmacéutico de la invención.

En general, los oligonucleótidos modificados primer se
5 evalúan en células cultivadas. Los tipos celulares adecuados incluyen aquellos que están relacionados con el tipo celular al que se desea administrar un oligonucleótido modificado *in vivo*. Por ejemplo, los tipos celulares adecuados para el estudio de los métodos descritos en la
10 presente incluyen células primarias o cultivadas.

En algunas realizaciones, la medida en que un oligonucleótido modificado interfiere con la actividad de miR-21 se evalúa en células cultivadas. En algunas realizaciones, la inhibición de la actividad del microARN
15 puede evaluarse midiendo los niveles del microARN. Alternativamente, se puede medir el nivel de un transcrito regulados por microARN previsto o validado. Una inhibición en la actividad del microARN puede resultar en el aumento del transcrito regulado por miR-21 y/o de la proteína
20 codificada por el transcrito regulado por miR-21. Además, en algunas realizaciones, se pueden pedir determinados resultados fenotípicos.

Existen varios modelos animales disponibles para los expertos en la técnica para el estudio de miR-21 en modelos
25 de enfermedad humana. Por ejemplo, se pueden estudiar los inhibidores de miR-21 en modelos de cáncer, tales como modelos de xenoinjerto ortotópicos, modelos de cáncer inducido por toxina o modelos de cáncer inducidos genéticamente. En dichos modelos de cáncer, los estudios
30 pueden llevarse a cabo para evaluar los efectos de los

inhibidores de miR-21 en el tamaño del tumor, la cantidad de tumores, la sobrevida total y/o la sobrevida libre de progresión.

Los efectos de los inhibidores de miR-21 en la función
5 cardíaca y la fibrosis pueden estudiarse en modelos de
operación de ligadura transaórtica o infarto de miocardio,
induciendo cada uno la función cardíaca anormal y fibrosis.
Los modelos de fibrosis renal incluyen obstrucción uretral
unilateral y lesión por isquemia/reperfusión. Durante los
10 primeros puntos de tiempo, el modelo de lesión renal por
reperfusión isquémica pueden usarse como modelo para lesión
renal aguda, mientras que en los puntos de tiempo finales
sirven como modelo para la fibrosis renal. Los modelos de
fibrosis hepática se inducen, por ejemplo mediante
15 intoxicación con tetracloruro de carbono o resección de las
vías biliares. Los efectos de miR-21 en la fibrosis
pulmonar pueden estudiarse, por ejemplo, en un modelo de
fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Los modelos de
curación de heridas también están disponibles para el
20 experto en la técnica, por ejemplo, los ratones C57Bl/KsJ-
db/db, que exhiben varias características de la diabetes no
dependiente de insulina, tal como retraso marcado del
cierre de heridas.

Algunos ensayos de cuantificación

25 Los efectos de la inhibición no codificante de miR-21
luego de la administración de oligonucleótidos modificadas
puede evaluarse mediante una variedad de métodos conocidos
en la técnica. En algunas realizaciones, estos métodos se
usan para cuantificar los niveles de microARN en células o
30 tejidos *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, se

miden los cambios en los niveles de microARN mediante análisis de micromatrices. En algunas realizaciones, los cambios en los niveles de microARN se miden mediante uno de varios ensayos PCR disponibles en el mercado, tales como el TaqMan® MicroRNA Assay (Applied Biosystems). En algunas realizaciones, la inhibición no codificante de miR-21 se evalúa midiendo el nivel de ARNm y/o proteína de un miR-21 objetivo. La inhibición no codificante de miR-21 generalmente resulta en el aumento en el nivel de ARNm y/o proteína del microARN objetivo.

Ensayo de acoplamiento objetivo

La modulación de la actividad de microARN con un anti-miR o mimico de microARN puede evaluarse midiendo el acoplamiento objetivo. En algunas realizaciones, el acoplamiento objetivo se miden mediante creación de perfiles de micromatriz de ARNm. Las secuencias de los ARNm que se modulan (en aumento o disminución) mediante el anti-miR o mimico de microARN se someten a búsqueda para determinar las secuencias semilla del microARN, para comparar la modulación de ARNm que son objetivos del microARN, para la modulación de ARNm que no son objetivos del microARN. De esta forma, la interacción del anti-miR con el miR-21, o mimico de miR-21 con sus objetivos puede evaluarse. En el caso de un anti-miR, los ARNm cuyos niveles de expresión aumentan se someten a detección para determinar las secuencias de ARNm que comprenden una coincidencia de semilla con el microARN al que el anti-miR es complementario.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se presentan a efectos de ilustrar más completamente algunas realizaciones de la invención. No deben interpretarse de ningún modo como limitantes del amplio alcance de la invención.

Los expertos en la técnica adoptarán fácilmente los principios subyacentes de este descubrimiento para diseñar varios compuestos sin apartarse del espíritu de la presente invención.

Ejemplo 1: Detección in vitro de compuestos anti-miR-21

Se evaluaron varios anti-miR dirigidos a miR-21 y que comprenden nucleósidos cEt para determinar sus efectos inhibidores sobre la actividad de miR-21. Estos compuestos varían en longitud y cantidad, tipo y disposición de los nucleósidos modificados.

Los compuestos se evaluaron para determinar la actividad inhibidora de miR-21 en un ensayo de luciferasa. Se manipuló una construcción de sensor de luciferasa en microARN usando pGL3-MCS2 (Promega). La construcción se introdujo en células Hela para someter a prueba la capacidad de los compuestos anti-miR para inhibir la actividad de miR-21. En este ensayo, el miR-21 presente en las células Hela se une a su sitio(s) cognado(s) en la construcción de sensor de luciferasa y suprime la expresión de luciferasa. Cuando el anti-miR apropiado se introduce en las células, se une a miR-21 y atenúa la expresión de luciferasa. Por consiguiente, en este ensayo los anti-miR que son inhibidores efectivos de la expresión de miR-21 provocarán un aumento en la expresión de luciferasa.

Día 1: Se sembraron células Hela (ATCC), transfectadas de forma estable con una construcción de luciferasa manipulada para contener un secuencia complementaria a miR-21 en matraces T-170 (BD Falcon) a 3.5×10^6 células/matraz. Las células Hela se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium with High Glucose (Invitrogen).

Día 2: Cada matraz de células Hela se transfectó con 0.5ug de un plásmido sensor phRL (Promega) que expresaba Renilla para usarse en la normalización. Las células Hela se transfectaron usando 20ul de Lipofectamine 2000/matraz (Invitrogen). 4 horas después de la transfección, las células se lavaron con PBS y se tripsinizaron. Las células Hela se colocaron en placas a 40k/pocillo en placas de 24 pocillos (BD Falcon) y se dejaron toda la noche.

Día 3: Las células Hela se transfectaron con anti-miR usando Lipofectin (Invitrogen) a 2.5ul de Lipofectin/100nM ASO/ml Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen) durante 4 horas. Después de la transfección ASO, se volvió a colocar medio Dulbecco's Modified Eagle Medium with High Glucose (Invitrogen) en las células Hela.

Día 4: Las células Hela se lisaron pasivamente y se midió la actividad de luciferasa usando el sistema Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega).

El ensayo de luciferasa se llevó a cabo para someter a prueba la capacidad de los anti-miR con los patrones de nucleósidos descritos en la presente para inhibir la actividad de miR-21. Los resultados se compararon con un tratamiento "simulado", en el que las células no recibieron tratamiento anti-miR. El valor de luciferasa se normalizó con respecto a la actividad de beta-galactosidasa.

Varios compuestos que contenían cEt demostraron una inhibición de miR-21 de forma dependiente de la dosis.

5 **Ejemplo 3: Comparación de patrones de nucleósidos que confieren actividad a los compuestos anti-miR-21**

10 Para determinar la relación entre los patrones de nucleósidos que confieren actividad a los compuestos anti-miR-21, la disposición de nucleósidos modificados y no modificados se comparó en los compuestos anti-miR-21 activos.

15

20

25

30

La comparación de la disposición de nucleósidos modificados y no modificados reveló que determinados patrones de nucleósidos eran comunes a cada compuesto anti-miR-21 altamente activo.

5 Para determinar la relación entre los patrones de nucleósidos que confieren la actividad a los compuestos anti-miR-21 activos que tienen una longitud de 19 nucleósidos ligados, se comparó la disposición de nucleósidos modificados y no modificados en todos los
10 compuestos altamente activos.

La comparación de la disposición de nucleósidos modificados y no modificados reveló determinados patrones de nucleósidos que eran comunes a cada compuesto anti-miR-21 altamente activo que tiene una longitud de 19
15 nucleósidos ligados.

Los datos proporcionados en la presente demuestran que el patrón de nucleósidos confiere actividad a un compuesto anti-miR-21 y además que la actividad del compuesto se mantiene con una variedad de nucleósidos modificados.

20 Se llevaron a cabo análisis similares con el grupo de compuestos anti-miR-21 que incluye 25220. Como resultado de los análisis precedentes, se estableció la fórmula V.

Ejemplo 2: Inhibición de miR-21 en un modelo de fibrosis renal

25 La obstrucción uretral unilateral (UUO) es un modelo experimental establecido de lesión renal que conduce a fibrosis intersticial y, por consiguiente, se usa como modelo experimental que refleja la enfermedad renal humana. La UUO se induce ligando quirúrgicamente un único uréter.
30 Dado que la fibrosis se caracteriza por un aumento en el

colágeno, la presencia y extensión de la fibrosis renal pueden determinarse midiendo el contenido de colágeno. Se miden el colágeno 1A1 (Col 1A1) y el colágeno 3A1 (Col 3A1) para evaluar el contenido de colágeno. La fibrosis renal puede visualizarse tiñendo muestras de tejido con rojo picrosirius para detectar los aumentos en el contenido de colágeno. La fibrosis renal también puede observarse midiendo la cantidad de hidroxiprolina, que es un componente fundamental del colágeno, en una muestra.

Se trataron grupos de 8 animales de la siguiente forma: UUO solo, UUO con PBS o UUO con compuesto anti-miR-21. Con respecto al día del procedimiento de UUO, se administraron PBS o compuesto anti-miR-21 los días -3, -1 y +5. Los compuestos anti-miR-21 se administraron a una dosis de 20 mg/kg. Dado que los compuestos anti-miR se administraron antes del procedimiento UUO, este régimen de dosificación se considera un tratamiento profiláctico. El día 11, los animales se sacrificaron y el riñón se aisló para mediar la expresión de colágeno. La expresión de colágeno se midió mediante PCR en tiempo real y se normalizó primero con respecto a GAPDH y luego con respecto a animales testigos de simulación.

Ejemplo 3: Comparación de anti-miR-21 con un bloqueador del receptor de angiotensina

El bloqueador del receptor de angiotensina irbesartán ha demostrado bloquear la formación de fibrosis tubulointersticial en un modelo de lesión renal crónica caracterizado por fibrosis.

Los grupos de tratamiento testigos incluían UUO solo (simulación) y UUO con PBS administrado subcutáneamente. Un

grupo testigo adicional incluía UUO con portador Tween-MC/20 peroralmente. Se administra subcutáneamente el compuesto Anti-miR-21 a una dosis de 20 mg/kg 5 días antes, 2 días antes y 3 días después del procedimiento de UUO. El irbesartán se administró peroralmente diariamente los días 0 a 7 luego del procedimiento de UUO. Los animales se sacrificaron el Día 10 luego del procedimiento de UUO. Se recogió tejido del riñón para medir la expresión del colágeno 1A1 y el colágeno 3A1.

Un indicador adicional de la fibrosis es el porcentaje de tejido renal que exhibe la expresión de colágeno luego del procedimiento de UUO. Por lo tanto, también se recogió tejido renal para análisis histológico, para evaluar la fracción de tejido renal que exhibe expresión de colágeno aumentada. La 'fracción de área de colágeno' se mide histológicamente a través de procesamiento de imágenes cuantitativo del área del tejido renal que se mancha con rojo mediante rojo picrosirius; el porcentaje detectado como rojo se normaliza por el área de sección del riñón.

Estos resultados demuestran que la inhibición de miR-21 inhibe la expresión de colágeno con mayor actividad que irbesartán.

Ejemplo 4: Inhibición de miR-21 en un modelo de lesión por isquemia/reperfusión

Se crea un modelo de lesión por isquemia reperfusión (IRI) en el ratón a través de pinzado unilateral o bilateral de las arterias renales, que conduce a daño tubular, inflamación y fibrosis. La insuficiencia renal puede producirse temprano (<5 días) o tarde (>7 días) en

este modelo, siendo los primeros puntos de tiempo útiles para probar agentes candidatos para el tratamiento de la lesión renal aguda y los últimos puntos de tiempo útiles para el modelo de fibrosis crónica.

5 Se sometieron a prueba los compuestos anti-miR-21 en el modelo de IRI unilateral. La IRI unilateral se indujo durante un período de 30 minutos. PBS o el compuesto anti-miR se administraron los días 5, 6 y 7 luego de la IRI y los animales se sacrificaron 14 días después de la IRI.
10 Dado que el compuesto anti-miR se administra 5 días después de la lesión en el riñón o después, cuando la fibrosis ya se ha produciendo en alguna medida, este régimen de tratamiento se considera un régimen terapéutico en lugar de un régimen profiláctico.

15 Se recogió tejido renal para análisis de la expresión de colágeno 1A1 y colágeno 3A1 y la fracción de área del colágeno.

Un estudio similar se llevó a cabo con los mismos grupos de tratamiento y días adicionales de tratamiento. En
20 este estudio, los tratamientos se administraron intraperitonealmente los días 5, 6, 7, 14 y 21 luego del procedimiento de IRI. Los animales se sacrificaron el Día 27 y se recogió tejido de los riñones para el análisis de la expresión del colágeno 1A1 y el colágeno 3A1, así como
25 la fracción de área del colágeno.

Estos estudios demuestran una reducción en el contenido de colágeno luego de la inhibición de miR-21 en un modelo de lesión renal aguda.

30 A efectos de evaluar la flexibilidad de la administración del compuesto anti-miR-21, la actividad del

compuesto en el estudio de 14 días anterior, donde anti-miR-21 se administró los días 3, 5 y 7 luego del procedimiento de IRI, con un estudio de 14 días diferente donde el anti-miR-21 se administró intraperitonealmente los días 3, 5 y 7 luego del procedimiento de IRI. Los datos en la Tabla S demuestran que se observó una inhibición similar de la expresión del colágeno en ambos estudios, indicando que el esquema de dosificación puede ser flexible.

Ejemplo 5: Inhibición de miR-21 en un modelo de lesión por isquemia reperfusión / nefrectomía

Se crea un modelo de lesión por isquemia reperfusión/nefrectomía (IR/Nx) en el ratón a través de pinzado unilateral temporal de una arteria en un riñón, lo que conduce a daño tubular, inflamación y fibrosis, seguido por la extirpación del segundo riñón en un punto de tiempo posterior. En este modelo, la fase de insuficiencia renal aguda es útil para evaluar agentes candidatos para el tratamiento de la lesión renal aguda (es decir, hasta aproximadamente los primeros 5 días) y las últimas fases de la insuficiencia renal son útiles para el modelo de fibrosis crónica (es decir, después de aproximadamente los primeros 5 días).

Se sometieron a prueba los compuestos anti-miR-21 en el modelo de IR/Nx.

La IR unilateral se indujo durante un período de 30 minutos. PBS o anti-miR se administraron los días 2, 3, 4 y 8 luego de IR. El día 8, el riñón sano se retiró mediante nefrectomía de cada animal y los animales se sacrificaron el día 9. Justo antes del sacrificio, se recogió orina mediante punción directa de la vejiga.

Se midió la relación entre la albúmina en la orina y la creatinina en la orina de cada ratón. En este estudio, los compuestos anti-miR-21 produjeron reducciones estadísticamente significativas en la relación entre la albúmina en la orina y la creatinina. Los niveles de nitrógeno ureico en sangre y creatinina en suero fueron similares en todos los ratones IR/Nx y fueron elevados con respecto a los ratones testigo solo con nefrectomía (no se muestran los datos).

Ejemplo 6: Sobrevida de los ratones del modelo IR/Nx luego de la administración de los compuestos anti-miR-21

Se determinó la tasa de sobrevida de los ratones del modelo IR/Nx dos días después de la nefrectomía en seis experimentos diferentes para determinar si la administración de los compuestos anti-miR-21 aumentaba la sobrevida. En los primeros tres experimentos, se administró el compuesto anti-miR-21 los días 5, 6 y 7 después de la lesión por isquemia reperusión y la nefrectomía se produjo el día 10 o el día 11. En los segundos tres experimentos, se administró el compuesto anti-miR-21 los días 2, 3 y 4 y la nefrectomía se produjo el día 7. En los primeros tres experimentos, en los que la nefrectomía se produjo el día 10 o el día 11, la tasa de sobrevida de los ratones tratados con PBS fue de 55%, mientras que la tasa de sobrevida de los ratones tratados con anti-miR-21 fue 80% ($P=0.02$ usando una prueba de 1 lado Fisher's Exact Test). En los segundos tres experimentos, en los que la nefrectomía se produjo el día 7, la tasa de sobrevida de los ratones tratados con PBS fue de 52%, mientras que la tasa de sobrevida de los ratones tratados

con anti-miR-21 fue 69% ($P=0.11$ usando una prueba de 1 lado Fisher's Exact Test).

Ejemplo 7: Diseño de compuestos anti-miR-21 adicionales

Se diseñaron compuestos adicionales y estos compuestos se sometieron a prueba para determinar la estabilidad *ex vivo* e *in vivo*. El *ex vivo* se llevó a cabo como se describió anteriormente. Para la evaluación *in vivo*, se administraron los compuestos a ratones, se aisló el tejido renal y la extracción y detección del compuesto se llevó a cabo tal como en el ensayo *ex vivo*. La Tabla U muestra las estructuras para el compuesto 25220, y los resultados de las mediciones de estabilidad.

Tabla U: Estabilidad de 25220 *ex vivo* e *in vivo*

Compuesto	Estructura	ex vivo (hígado)			in vivo (riñón)	
		N _↑ (%)	N-1 (%)	%Endo	N (%)	N-1 (%)
25220	A _E C _S ATC _S A _S GTC _S U _S GAU _S A _S AGC _S UsA _E	3	0	3	67±16	16±6

El compuesto 25220 se probó en el modelo UUO por sus efectos en la fibrosis. Grupos de 8 animales se trataron de la siguiente forma: cirugía simulada, UUO con PBS, UUO con 25220. Con respecto al día del procedimiento de UUO, se administraron PBS o compuesto anti-miR-21 los días -5, -3 y +3. Los compuestos anti-miR-21 se administraron a una dosis de 20 mg/kg. Dado que los compuestos anti-miR se administraron antes del procedimiento UUO, este régimen de dosificación se considera un tratamiento profiláctico. El día 10, los animales se sacrificaron y el riñón se aisló

para mediar la expresión de colágeno. La expresión de colágeno se midió mediante PCR en tiempo real y se normalizó con respecto a GAPDH.

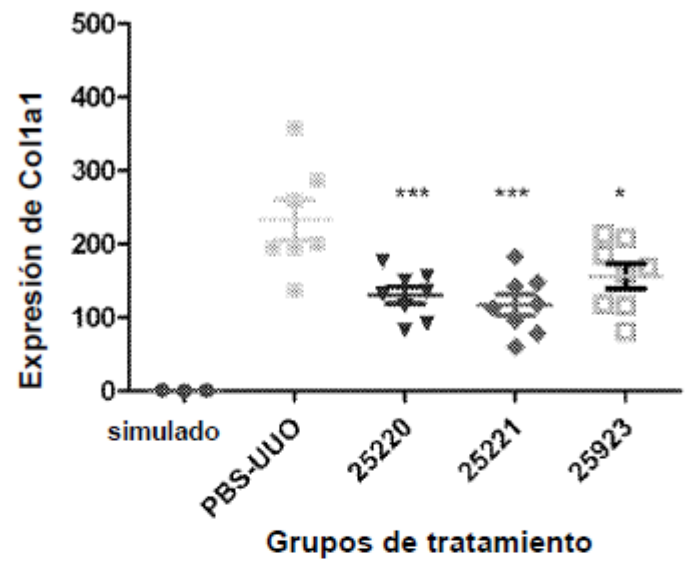
Los resultados de dicho experimento se muestran en la Figura 2. La expresión del colágeno 1A1 y el colágeno 3A1 se muestran en la Figura 2A y 2B, respectivamente. La administración del compuesto 25220 redujo la expresión del colágeno 1A1 y el colágeno 3A1 en una cantidad estadísticamente significativa (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

Varias modificaciones de la invención, además de las descritas en la presente, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción precedente. También se pretende que dichas modificaciones entren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Cada referencia (incluidos, a modo no taxativo, artículos periodísticos, patentes de los EE. UU. y no de los EE. UU., publicaciones de solicitudes de patente, publicaciones de solicitudes de patentes internacionales, números de acceso a GENBANK® y similares) mencionados en la presente solicitud se incorporan específicamente a la presente a modo de referencia en su totalidad.

RESUMEN

En la presente se describen composiciones y métodos para la inhibición de la actividad de miR-21. Las composiciones tienen determinados patrones de modificación de nucleósidos que proporcionan potentes inhibidores de la actividad de miR-21. Las composiciones pueden usarse para inhibir miR-21 y también para tratar enfermedades asociadas con la expresión anormal de miR-21, tal como fibrosis y cáncer.

A



B

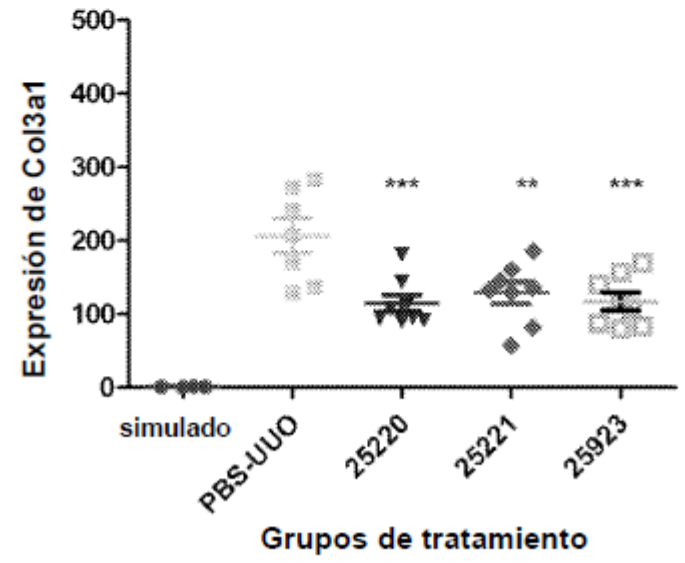


FIG.2