

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 018 137**

51 Int. Cl.:

A61P 9/00 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2020 PCT/EP2020/066273**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2020 WO20249713**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2020 E 20731870 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2025 EP 3983066**

54 Título: **Tratamiento de la insuficiencia cardíaca y la fibrosis en sujetos humanos**

30 Prioridad:

14.06.2019 EP 19180308

08.01.2020 EP 20150700

10.03.2020 EP 20162110

18.05.2020 EP 20175240

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

14.05.2025

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.00%)

Novo Allé 1

2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

THUM, THOMAS;

ULBRICH, CLAUDIA;

HAUKE, WILFRIED;

RUMP, STEFFEN y

BATKAI, SANDOR

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 3 018 137 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de la insuficiencia cardíaca y la fibrosis en sujetos humanos

- 5 La presente invención se refiere a un oligonucleótido que es un inhibidor eficaz del microARN miR-132, y su uso en medicina, particularmente en la prevención o el tratamiento de trastornos cardíacos y/o trastornos fibróticos en sujetos humanos. La invención también se refiere a métodos para monitorear la eficacia de la prevención o el tratamiento con un oligonucleótido para su uso en la invención. La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.
- 10 La insuficiencia cardíaca es una de las principales causas patológicas de mortalidad en el mundo. El infarto de miocardio (MI) es la causa más importante de insuficiencia cardíaca, ya que el MI conduce a una remodelación progresiva subsecuente del corazón que da como resultado una insuficiencia cardíaca con un pronóstico deficiente. Las opciones farmacológicas terapéuticas actualmente usadas para la insuficiencia cardíaca incluyen agentes moduladores de la angiotensina, betabloqueadores, diuréticos, antagonistas de la aldosterona, inhibidores de neprilisina combinados con bloqueadores del receptor de angiotensina II, vasodilatadores o agentes inotrópicos.
- 15 Aunque varios estudios clínicos han demostrado disminuciones significativas en las tasas de mortalidad inducidas por insuficiencia cardíaca para todos estos agentes, la tasa de mortalidad a 5 años sigue siendo inaceptablemente de casi 50 %. Por lo tanto, existe una gran necesidad de desarrollar enfoques terapéuticos novedosos y más eficientes para la insuficiencia cardíaca.
- 20 El crecimiento hipertrófico patológico de los cardiomiocitos puede conducir al desarrollo de remodelación cardíaca, insuficiencia cardíaca y muerte cardíaca súbita. El crecimiento hipertrófico de los cardiomiocitos es una respuesta al aumento del estrés en la pared cardíaca causado por el volumen y/o la sobrecarga de presión cardíaca. Inicialmente, la hipertrofia cardíaca es un mecanismo compensatorio que tiene como objetivo disminuir el estrés de la pared y aumentar el gasto cardíaco. Sin embargo, la hipertrofia cardíaca prolongada progresa a disfunción contráctil, descompensación cardíaca y, finalmente, insuficiencia cardíaca (Hill y Olson, 2008; Barry y Townsend, 2010). La transición de la hipertrofia fisiológica a la patológica puede ocurrir en dependencia de muchos factores, que incluyen la pérdida de miocitos a través de la apoptosis o necrosis, alteraciones en la autofagia, defectos en la respuesta contráctil, disregulación de la homeostasis del calcio, desensibilización de los receptores adrenérgicos o fibrosis cardíaca (Hill y Olson, 2008; Barry y Townsend, 2010). La señalización hipertrófica está mediada en gran medida por la vía de señalización de insulina (DeBosch y Muslin, 2008; Barry y Townsend, 2010). Tanto la insulina como el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) activan vías prohipertróficas en cardiomiocitos a través del receptor de IGF-1, que activa la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) (McMullen y otros, 2004). La actividad de PI3K conduce a la activación de la serina/treonina cinasa Akt a través de su fosforilación y Akt activo fosforila factores de transcripción FoxO antihipertróficos, lo que conduce a su desestabilización y prevención de la localización nuclear (Datta y otros, 1999; Skurk y otros, 2005; Ronnebaum y Patterson, 2010). Por el contrario, la acetilación de los factores FoxO por sirtuina-1 (Sirt-1) conduce a su estabilización y translocación nuclear (Frescas y otros, 2005). Los factores de transcripción FoxO estabilizados se localizan en el núcleo para regular la expresión de genes antihipertróficos. Las funciones antihipertróficas de las proteínas FoxO están mediadas en gran medida a través de la supresión de la vía de señalización de calcineurina prohipertrófica mediante la expresión de los genes antihipertróficos diana de los factores FoxO, tales como atrogin-1 (Ni y otros, 2006; Ronnebaum y Patterson, 2010; Glas, 2010). Además, los factores de transcripción FoxO también inducen la apoptosis y regulan la autofagia en los cardiomiocitos (Ronnebaum y Patterson, 2010).
- 45 Hinkel y otros (2017) generalmente se refiere a inhibidores de miR-132 basados en LNA y describe su efecto cardioprotector en un modelo porcino. Ucar y otros (2012) se refiere al papel de la familia de miARN-212/132 en la regulación de la hipertrofia cardíaca y la autofagia de los cardiomiocitos. Se ha demostrado que los microARN tienen un papel clave en el remodelado cardíaco adverso. El documento WO 2013/034653 describe que miR-132 y/o miR-212 pueden inducir la hipertrofia cardíaca y, por lo tanto, constituyen dianas terapéuticas potenciales para el
- 50 tratamiento de la insuficiencia cardíaca.
- El documento WO 2016/042561 describe un método para tratar un trastorno relacionado con lípidos mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente polinucleotídico que es sustancialmente complementario a una secuencia de nucleótidos de un miR-132 humano.
- 55 Los presentes inventores han identificado un análogo de oligonucleótido novedoso que es un inhibidor eficaz de la expresión de miR-132 en cardiomiocitos. El análogo de oligonucleótido, en la CDR132L designada a continuación, es un oligómero mixto que consiste en bloques estructurales de ADN y LNA, que tienen enlaces fosforotioato internucleosídicos.
- 60 Los estudios de farmacología preclínica se llevaron a cabo con CDR132L en ratones y cerdos. En un modelo de ratón transgénico de hipertrofia cardíaca, CDR132L condujo a una remodelación cardíaca inversa asociada con una expresión reducida de miR-132. En un modelo de ratón de insuficiencia cardíaca pos-MI se encontró que el tratamiento con CDR132L reduce la disfunción ventricular izquierda pos-MI y los parámetros independientes de la carga de la función de contracción sistólica. Además, la administración de CDR132L dio como resultado una mejora de la función cardíaca y reduce la expresión de miR-132, la señalización de estrés cardíaco y la hipertrofia pos-MI.
- 65

- 5 En un modelo porcino de insuficiencia cardíaca pos-MI, se encontró que el tratamiento con CDR132L evita la remodelación inadaptada y mejora la función ventricular izquierda. Además, CDR132L normaliza la expresión tisular de marcadores de insuficiencia cardíaca patológica tales como BNP, ANP y proporciona un cambio en las isoformas de la cadena pesada de miosina (relación MYH7/6). En modelos porcinos de insuficiencia cardíaca pos-MI, se descubrió que CDR132L curaba la insuficiencia cardíaca subaguda y crónica.
- 10 CDR132L también carece de toxicidad significativa en una línea celular hepática humana y cardiomiocitos de rata neonatales aislados. Por medio de estudios *in vivo* de toxicidad realizados en ratas y cerdos mini se encontró que el agente activo se toleró bien incluso a altas dosis de 20 y 40 mg/kg, respectivamente.
- 15 Los estudios farmacocinéticos que implican la administración intravenosa o subcutánea de CDR132L a ratas sanas y cerdos sanos confirmaron una dependencia de la dosis de los niveles tisulares de CDR132L.
- Además, se demostró que CDR132L exhibe efectos superiores en comparación con otros análogos de oligonucleótidos que tienen la misma secuencia de nucleótidos pero una distribución diferente de bloques estructurales de LNA.
- 20 En un estudio adicional, los presentes inventores han identificado efectos terapéuticos antifibróticos para el análogo de oligonucleótido CDR132L en un modelo de ratón de infarto de miocardio *in vivo* y modelos de fibrosis hepática y fibrosis pulmonar *in vitro*.
- 25 Además, se encontró una relación significativa entre la cantidad de miR-132 en los fluidos corporales circulantes y la eficacia terapéutica de CDR132L. Por lo tanto, la cantidad de miR-132 en un fluido corporal es un biomarcador relevante para el monitoreo de la terapia.
- 30 En base a los resultados anteriores, se ha desarrollado un protocolo de un estudio clínico de fase I para administrar CDR132L a pacientes humanos que padecen insuficiencia cardíaca crónica. Mientras tanto, esta fase clínica 1b se ha completado con éxito.
- Por lo tanto, el oligonucleótido CDR132L es útil como un agente activo en medicina, particularmente en la prevención o el tratamiento de trastornos cardíacos y/o trastornos fibróticos.
- 35 En la presente descripción se describe un análogo de oligonucleótido, que comprende una secuencia de fórmula I:
5'-ATGGCTGTAGACTGTT-3'
- en donde A, T, G y C son bloques estructurales de desoxirribonucleótidos y
en donde al menos un bloque estructural G o T es un bloque estructural de nucleótidos con puente. Este oligonucleótido es particularmente adecuado en la prevención y/o tratamiento de un trastorno, más particularmente un trastorno cardíaco en un sujeto humano.
- 40 En la presente descripción también se describe un oligonucleótido que comprende o tiene la secuencia de fórmula II:
5'-A+TG+GC+TG+TA+GACTG+T+T-3'
- 45 en donde A, T, G y C son bloques estructurales de desoxirribonucleótidos y
en donde +G y +T son bloques estructurales de nucleótidos de puente y/o bloques estructurales de morfolinonucleótidos, particularmente en donde +G y +T son bloques estructurales de LNA. Este oligonucleótido es particularmente adecuado en la prevención o el tratamiento de un trastorno, más particularmente de un trastorno cardíaco o fibroso, en un sujeto humano.
- 50 El análogo oligonucleotídico de fórmula I o fórmula II puede comprender al menos un enlace internucleosídico modificado, por ejemplo, un enlace internucleosídico que se estabiliza contra la digestión por nucleasa, por ejemplo, un enlace fosfortioato o fosfordiamidato. En modalidades específicas, todos los enlaces internucleosídicos son enlaces modificados, particularmente enlaces fosfortioato.
- 55 La invención se refiere al oligonucleótido CDR132L como se describe en la presente descripción.
- El oligonucleótido CDR132L tiene una secuencia de fórmula III:
5'-dA*+T*dG*+G*dC*+T*dG*+T*dA*+G*dA*dC*dT*dG*+T*+T-3'
- 60 en donde dA es 2'-desoxiadenosina, dG es 2'-desoxiguanosina, dC es 2'-desoxicidina y T es timidina,
en donde +T es un bloque estructural LNA-T y +G es un bloque estructural LNA-G y en donde * es un enlace fosfortioato. Este oligonucleótido es particularmente adecuado en la prevención o el tratamiento de un trastorno, más particularmente de un trastorno cardíaco o fibroso, en un sujeto humano.
- 65 La presente invención también describe una composición farmacéutica que comprende como un agente activo un análogo de oligonucleótido que comprende una secuencia de fórmula I, II o III y un portador farmacéuticamente

aceptable, particularmente para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno, más particularmente de un trastorno cardíaco o fibrótico, en un sujeto humano.

5 Como se describió anteriormente, un análogo de oligonucleótido que comprende una secuencia de fórmula I, II o III, es adecuado para uso médico.

Específicamente, en la presente descripción se proporciona un oligonucleótido que comprende la secuencia de fórmula III:

10 5'-dA*+T*dG*+G*dC*+T*dG*+T*dA*+G*dA*dC*dT*dG*+T*+T-3'

en donde dA es 2'desoxiadenosina, dG es 2'desoxiguanosina, dC es 2'desoxicitidina y T es timidina, en donde +T es un bloque estructural LNA-T y +G es un bloque estructural LNA-G y en donde * es un enlace fosforotioato,

15 para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno cardíaco en un sujeto humano, en donde el trastorno cardíaco se selecciona de (i) insuficiencia cardíaca aguda o subaguda, (ii) insuficiencia cardíaca crónica y/o crónica en empeoramiento, (iii) insuficiencia cardíaca estable, (iv) un estado menos avanzado de insuficiencia cardíaca o de un estado avanzado de insuficiencia cardíaca, (v) insuficiencia cardíaca de etapa I y/o II de NYHA, de etapa I, II y/o III de NYHA o de etapa III y/o IV de NYHA, y (vi) insuficiencia cardíaca derecha.

20 En una modalidad, el sujeto humano padece insuficiencia cardíaca y tiene una bomba implantada. En una modalidad, la bomba es un dispositivo de asistencia ventricular izquierda.

En una modalidad, el oligonucleótido para el uso de la invención se administrará como tal o el oligonucleótido se administrará conjugado a un resto heterólogo.

25 En una modalidad, el oligonucleótido para el uso de la invención se administrará en combinación con (i) al menos un diurético, (ii) al menos un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, (iii) al menos un betabloqueador y opcionalmente (iv) un bloqueador del receptor de angiotensina II y (v) opcionalmente un inhibidor del canal If tal como ivabradina y opcionalmente (vi) un inhibidor de neprilisina-receptor de angiotensina, y opcionalmente (vii) un inhibidor del cotransportador de glucosa 2 tal como empagliflozina y dapagliflozina, y opcionalmente (viii) agentes terapéuticos con células madre, y opcionalmente (ix) anti-miARN dirigidos a diferentes vías, y/u opcionalmente (x) un inhibidor de SGLT-2.

35 En una modalidad, el sujeto humano padece de insuficiencia cardíaca estable de origen isquémico.

En una modalidad, el oligonucleótido para el uso de la invención se administrará a un sujeto humano en una dosis de aproximadamente 0,1 - 100 mg/kg de peso corporal por aplicación, particularmente en una cantidad de aproximadamente 3 - 10 mg/kg de peso corporal por aplicación, particularmente en donde el oligonucleótido se administrará por vía parenteral. En una modalidad, la administración es por inyección o infusión, particularmente por inyección intravenosa o subcutánea. En una modalidad, el oligonucleótido se administrará por vía tópica.

45 En una modalidad, el oligonucleótido para el uso de la invención se administrará a un sujeto humano en un régimen, seleccionado de: administración diaria, administración cada segundo día, administración cada tercer día y administración cada cuarto día, en donde el oligonucleótido se administrará por vía parenteral, particularmente por inyección intravenosa o subcutánea, (i) en donde el oligonucleótido se administra en una dosis dependiente del peso corporal, particularmente en una dosis de 0,01 mg/kg de peso corporal a 50 mg/kg de peso corporal, en una dosis de 0,02 mg/kg de peso corporal a 10 mg/kg de peso corporal o en una dosis de 0,05 mg/kg de peso corporal a 5 mg/kg de peso corporal por aplicación; o (ii) en donde el oligonucleótido se administra en una dosis fija, particularmente en una dosis fija de 1 mg a 5000 mg, en una dosis fija de 2 mg a 1000 mg, o en una dosis fija de 5 mg a 500 mg por aplicación.

55 En una modalidad, el oligonucleótido para el uso de la invención se administrará a un sujeto humano en un régimen, seleccionado de: administración semanal, administración cada segunda semana, administración cada tercera semana, administración cada cuarta semana o cada mes, administración cada sexta semana, administración cada segundo mes, administración cada tercer mes, administración cada sexta mes, y administración una vez al año, en donde el oligonucleótido se administrará por vía parenteral, particularmente por inyección intravenosa o subcutánea, (i) en donde el oligonucleótido se administrará en una dosis dependiente del peso corporal, particularmente en una dosis de 0,01 mg/kg de peso corporal a 50 mg/kg de peso corporal, en una dosis de 0,05 mg/kg de peso corporal a 20 mg/kg de peso corporal, en una dosis de 0,1 mg/kg de peso corporal a 10 mg/kg de peso corporal o en una dosis de 3 mg/kg de peso corporal a 10 mg/kg de peso corporal por aplicación; o (ii) en donde el oligonucleótido se administrará en una dosis fija, particularmente en una dosis fija de 1 mg a 5000 mg, en una dosis fija de 5 mg a 2000 mg, o en una dosis fija de 10 mg a 1000 mg por aplicación.

65 En una modalidad, el oligonucleótido se administrará en una dosis inicial, opcionalmente 1 o 2 dosis iniciales, y subsecuentemente en al menos una dosis de mantenimiento, que es diferente de la dosis inicial. En una modalidad, la dosis inicial comprende 1 o 2 dosis iniciales.

En una modalidad, el oligonucleótido se administrará mediante un régimen basado en la demanda, en donde el régimen comprende particularmente las etapas: (i) medir la cantidad de miR-132 en una muestra de fluido corporal, opcionalmente en una muestra de sangre total, suero o plasma u orina, de un sujeto que se trata con el oligonucleótido, (ii) administrar el oligonucleótido en una dosis y/o intervalo de tiempo entre dosis individuales según se determina de acuerdo con la cantidad medida de miR-132 en la etapa (i), particularmente en donde se administra una nueva dosis del oligonucleótido si la cantidad de miR-132 en la muestra de fluido corporal se encuentra por encima de un valor predeterminado.

En una modalidad, el uso comprende determinar la cantidad y/o actividad de un marcador, particularmente un marcador cardíaco y/o fibroso, antes, durante y/o después de la administración del oligonucleótido, particularmente en donde el marcador se selecciona de BNP, opcionalmente NT-proBNP, ANP, isoformas de cadena pesada de miosina, opcionalmente la relación MYH7/6, FoxO3 SERCA2, un marcador de deposición de colágeno y/o fibroso tal como colágeno 1A1, colágeno 1A2, colágeno 3A1, propéptido C-terminal de procolágeno de tipo I (PICP), y/o galectina-3 (Gal-3), y/o una metaloproteínasa de matriz tal como la metaloproteínasa de matriz 1 (MMP-1) y/o la metaloproteínasa de matriz 2 (MMP-2), y más particularmente en donde el marcador se selecciona de NT-proBNP, propéptido C-terminal de procolágeno de tipo I (PICP), y/o galectina-3 (Gal-3), y/o metaloproteínasa de matriz 1 (MMP-1).

En una modalidad, el uso comprende determinar un parámetro del ECG durante el ciclo de terapia particularmente seleccionado de la medición del QRS, ondas T, bloqueo de la rama izquierda del haz de His (LBBB) y/o bloqueo de la rama derecha del haz de His (RBBB); y/o progresión R, antes, durante y/o después de la administración del oligonucleótido.

También se proporciona en la presente descripción un oligonucleótido que comprende la secuencia de fórmula III: 5'-dA*+T*dG*+G*dC*+ T*dG*+T*dA*+G*dA*dC*dT*dG*+ T*+T-3', en donde dA es 2'desoxiadenosina, dG es 2'desoxiguanosina, dC es 2'desoxicitidina y T es timidina, en donde +T es un bloque estructural LNA-T y +G es un bloque estructural LNA-G y en donde * es un enlace fosforotioato, para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno fibrótico, en donde el oligonucleótido se administrará en una dosis inicial, opcionalmente 1 o 2 dosis iniciales, y subsecuentemente en al menos una dosis de mantenimiento, que es diferente de la dosis inicial.

En una modalidad, el trastorno fibrótico es fibrosis cardíaca, fibrosis hepática o fibrosis pulmonar.

También se proporciona en la presente descripción un método para monitorear la eficacia de la prevención o el tratamiento con un oligonucleótido para el uso de acuerdo con la invención, en donde el método comprende determinar los niveles de miR-132 circulante en una muestra seleccionada de sangre, plasma, suero o fracciones de estos de un sujeto al que se ha administrado el oligonucleótido, en donde la determinación se lleva a cabo una vez o varias veces durante el ciclo de terapia, en donde una reducción de miR-132 después de la administración del oligonucleótido es un indicio de tratamiento exitoso.

En una modalidad, en base al resultado de la determinación, se lleva a cabo al menos una de las siguientes etapas: (i) determinar si el sujeto a tratar es un respondedor a la terapia, (ii) ajustar la dosis del oligonucleótido a administrar, y (iii) ajustar el intervalo de tiempo del oligonucleótido a administrar.

En determinadas modalidades, el uso médico se refiere a un uso para el tratamiento o la prevención de un trastorno asociado con, acompañado de y/o causado por la expresión patológica de miR-132. En determinadas modalidades, el uso médico se refiere al tratamiento o prevención de trastornos cardíacos, particularmente trastornos asociados a la hipertrofia cardíaca. En determinadas modalidades, el uso médico se refiere al tratamiento de trastornos fibróticos, por ejemplo, trastornos asociados con, acompañados por y/o causados por fibrosis patológica, particularmente trastornos fibróticos cardíacos, trastornos fibróticos pulmonares o trastornos fibróticos hepáticos.

El oligonucleótido de fórmula I, II o III puede consistir en bloques estructurales de ADN de desoxirribonucleótido y bloques estructurales de nucleótidos enlazados. A "nucleótido con puente" se refiere a un ribonucleótido modificado en donde el resto de ribosa comprende un puente de dos o tres átomos que conecta el átomo de carbono 2' y el átomo de carbono 4'. Por ejemplo, el puente puede comprender la estructura 2'-O-CH₂-4', 2'-O-CH₂-CH₂-4', 2'-O-CH(CH₃)-4' o una estructura correspondiente donde O se reemplaza por S o NH. En una modalidad particular, el al menos un bloque estructural de nucleótido en puente es un bloque estructural de ácido nucleico cerrado (LNA) que tiene un 2'-O-CH₂-4'-puente.

El oligonucleótido de fórmula I, II o III puede tener una longitud de al menos 16 bloques estructurales, por ejemplo, una longitud de 16 a 20 bloques estructurales. En una modalidad particular, el oligonucleótido de fórmula III tiene una longitud de 16 bloques estructurales.

El oligonucleótido de fórmula I, II o III puede comprender de 5 a 10, por ejemplo, 6 a 8, particularmente, 7 bloques estructurales de nucleótidos enlazados, por ejemplo, bloques estructurales de LNA. En algunas modalidades, el oligonucleótido de fórmula III comprende de 5 a 10, por ejemplo, 6 a 8, particularmente, 7 bloques estructurales de nucleótidos enlazados, por ejemplo, bloques estructurales de LNA.

- El oligonucleótido de fórmula I, II o III puede ser un oligonucleótido desnudo. En algunas modalidades, el oligonucleótido de fórmula III es un oligonucleótido desnudo. En algunas modalidades, el oligonucleótido se conjuga con al menos un resto heterólogo, por ejemplo, un resto que no contribuye a la unión del oligonucleótido a miR-132. El resto heterólogo puede ser un resto que mejora el direccionamiento y/o la captación celular, por ejemplo, un resto lipídico tal como colesterol o un ácido graso, un resto de sacárido o amino sacárido tal como un resto que contiene N-galactosamina, un resto peptídico o polipeptídico o un resto nucleosídico o nucleotídico tal como un aptámero. Un resto heterólogo puede conjugarse con el extremo 5' y/o 3' terminal del análogo de oligonucleótido por medio de un enlace covalente o un espaciador.
- El oligonucleótido de la presente invención es adecuado para su uso en medicina, que incluye la medicina humana y veterinaria. En determinadas modalidades, el compuesto es útil en la prevención o el tratamiento de un trastorno asociado con, acompañado de y/o causado por la expresión patológica, por ejemplo, sobreexpresión de miR-132. Se encontró que la administración del compuesto reduce significativamente la expresión de miR-132 *in vitro* e *in vivo*.
- En algunas modalidades, el compuesto se administra a pacientes que muestran una sobreexpresión de miR-132 en comparación con sujetos sanos. En algunas modalidades, el compuesto se administra a pacientes que no muestran una sobreexpresión de miR-132 en comparación con sujetos sanos pero que aún necesitan una reducción del nivel de miR-132.
- El término "prevención" en el contexto de la presente invención se refiere a la administración del compuesto a un paciente que se conoce que tiene un riesgo aumentado de desarrollar un trastorno determinado. El término "tratamiento" en el contexto de la presente invención se refiere a la administración del compuesto a un paciente que ya ha desarrollado signos y/o síntomas de un trastorno determinado. El término "paciente" se refiere a un sujeto que necesita la administración del compuesto de la invención en el campo de la medicina humana o veterinaria. En modalidades específicas, el paciente es un paciente humano.
- En determinadas modalidades, el compuesto de la presente invención es útil en la prevención o el tratamiento de trastornos cardíacos, particularmente de trastornos asociados con la hipertrofia cardíaca. Por ejemplo, el compuesto es útil en la prevención o el tratamiento de la disfunción contráctil, descompensación cardíaca, insuficiencia cardíaca o para la prevención o el tratamiento del remodelado cardíaco después del infarto de miocardio, miocarditis, enfermedades cardíacas valvulares tales como estenosis aórtica o insuficiencia de la válvula mitral, trastornos cardíacos genéticos con hipertrofia cardíaca, por ejemplo, miocardiopatía no obstructiva e hipertrófica y obstructiva o enfermedad de Fabry.
- El compuesto es útil para la administración a pacientes seleccionados de
- (i) pacientes con mayor riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca,
 - (ii) pacientes que padecen insuficiencia cardíaca (congestiva), por ejemplo, pacientes que tienen un mayor riesgo de progresión de la insuficiencia cardíaca,
 - (iii) pacientes con infarto de miocardio previo y/o
 - (iv) pacientes con enfermedades cardíacas congénitas asociadas con hipertrofia cardíaca, tales como estenosis de la vena aórtica y/o pulmonar, defectos del septo auricular o ventricular.
- En determinadas modalidades, el compuesto, particularmente CDR132L, es útil para la administración a pacientes humanos que padecen insuficiencia cardíaca aguda, a pacientes humanos que padecen insuficiencia cardíaca subaguda, o a pacientes humanos que padecen insuficiencia cardíaca crónica y/o crónica en empeoramiento.
- En determinadas modalidades, el compuesto, particularmente CDR132L, es útil para la administración a pacientes humanos que padecen insuficiencia cardíaca estable, por ejemplo, de insuficiencia cardíaca estable de origen no isquémico y/o isquémico.
- En determinadas modalidades, el compuesto, particularmente CDR132L, es útil para la administración a pacientes humanos que padecen insuficiencia cardíaca de origen no isquémico y/o isquémico.
- En determinadas modalidades, el compuesto, particularmente CDR132L, es útil para la administración a pacientes humanos que padecen una etapa menos avanzada de insuficiencia cardíaca o pacientes humanos que padecen una etapa avanzada de insuficiencia cardíaca.
- En determinadas modalidades, el compuesto, particularmente CDR132L, es útil para la administración a pacientes humanos que padecen insuficiencia cardíaca en las etapas I, II, III y/o IV de acuerdo con la clasificación de la Asociación cardíaca de Nueva York (NYHA), por ejemplo, pacientes que padecen insuficiencia cardíaca de acuerdo con las etapas I y/o II de NYHA, pacientes que padecen insuficiencia cardíaca de acuerdo con las etapas I, II y/o III de NYHA o pacientes que padecen insuficiencia cardíaca de acuerdo con las etapas III y/o IV de NYHA.

En determinadas modalidades, el compuesto, particularmente CDR132L, es útil para la administración a pacientes humanos que padecen insuficiencia cardíaca y que tienen una bomba implantada, por ejemplo, un dispositivo de asistencia ventricular izquierda (LVAD).

5 En una modalidad particular, el compuesto es útil para prevenir y/o tratar la insuficiencia cardíaca de lado izquierdo, que incluye la insuficiencia cardíaca sistólica, la insuficiencia cardíaca diastólica y una afección asociada con la insuficiencia cardíaca sistólica y/o la insuficiencia cardíaca diastólica.

10 La insuficiencia cardíaca sistólica es un tipo de insuficiencia cardíaca asociada con una fracción expulsada reducida, particularmente con una fracción expulsada del 40 % o menos, en donde el ventrículo izquierdo pierde su capacidad de contraerse normalmente. La administración del compuesto de la invención en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca sistólica puede dar como resultado una estabilización, un aumento y/o una normalización de la fracción expulsada. El compuesto de la invención es adecuado para la administración a pacientes en riesgo para desarrollar disfunción sistólica, por ejemplo, pacientes que padecen hipertensión, o bloqueos en las arterias coronarias.

15 La insuficiencia cardíaca diastólica es un tipo de insuficiencia cardíaca asociada con una relajación ventricular izquierda alterada con o sin un aumento de la presión de llenado. En muchos casos, la insuficiencia cardíaca diastólica se asocia con una fracción expulsada conservada. La administración del compuesto de la invención en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca diastólica puede dar como resultado la estabilización, mejora y/o normalización de la relajación ventricular izquierda. El compuesto de la invención es adecuado para la administración a pacientes en riesgo de desarrollar disfunción diastólica, por ejemplo, pacientes que padecen hipertensión, hiperlipidemia, diabetes, apnea obstructiva del sueño, enfermedades de almacenamiento cardíaco, insuficiencia cardíaca hereditaria (por ejemplo, mutaciones en *titin* u otros genes estructurales).

20 En una modalidad particular adicional, el compuesto es útil para prevenir y/o tratar la insuficiencia cardíaca de lado derecho, particularmente la insuficiencia cardíaca de lado derecho, que se produce como resultado de la insuficiencia cardíaca de lado izquierdo.

25 En determinadas modalidades, el compuesto de la presente invención es útil en la prevención o el tratamiento de trastornos fibróticos, particularmente trastornos asociados con, acompañados por y/o provocados por fibrosis patológica.

30 La fibrosis patológica es la formación de tejido conectivo fibroso en exceso en un órgano o tejido, particularmente asociado con, acompañado y/o causado por un estado patológico. La fibrosis patológica puede ocurrir en muchos órganos y tejidos diferentes dentro del cuerpo, típicamente como resultado de la inflamación o el daño.

35 En una determinada modalidad, la fibrosis es una fibrosis cardíaca, por ejemplo, una afección que involucra fibrosis patológica en el corazón. Los tipos ilustrativos de fibrosis cardíaca incluyen fibrosis atrial, fibrosis endomiocárdica o fibrosis resultante de un infarto de miocardio previo.

40 En una modalidad adicional, la fibrosis es una fibrosis pulmonar, por ejemplo, una afección que involucra fibrosis patológica en el pulmón. Los tipos ilustrativos de fibrosis pulmonar incluyen trastornos fibróticos causados por factores ocupacionales o ambientales, por ejemplo, por exposición a toxinas y contaminantes tales como polvo de sílice, fibras de asbesto, polvo de metales, polvo de carbón, polvo de granos, excrementos de aves y animales. Otros tipos de trastornos fibróticos pulmonares son causados por el tratamiento con radiación y/o el tratamiento con medicamentos tales como fármacos quimioterapéuticos, fármacos cardíacos, antibióticos o fármacos antiinflamatorios. Aún otros tipos de trastornos fibróticos pulmonares son causados por trastornos que incluyen fibrosis pulmonar idiopática, dermatitis, polimiositis, enfermedad mixta del tejido conectivo, una enfermedad autoinmunitaria tal como artritis reumatoide, esclerodermia, síndrome de Sjogren o lupus eritematoso sistémico, sarcoidosis, neumonía, una infección viral o enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD).

45 En una modalidad adicional, la fibrosis es fibrosis hepática, por ejemplo, una afección que involucra fibrosis patológica en el hígado. Los tipos ilustrativos de fibrosis hepática son causados por una infección viral, por ejemplo, por virus de hepatitis B y/o C, trastornos metabólicos hereditarios, hepatitis autoinmunitaria, obstrucción biliar, sobrecarga de hierro, enfermedad del hígado graso no alcohólico, que incluye hígado graso no alcohólico (NAFL) e esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y enfermedad del hígado por alcohol.

50 En aún modalidades adicionales, la fibrosis es una fibrosis vascular, por ejemplo, rigidez arterial, una fibrosis cutánea, por ejemplo, formación de queloides o fibrosis sistémica nefrótica, una artrofibrosis, algunas formas de capsulitis adhesiva, fibrosis de tejidos blandos tales como fibrosis mediastínica o fibrosis retroperitoneal o fibrosis de médula ósea tal como mielofibrosis.

55 En determinadas modalidades, la invención abarca determinar la cantidad y/o actividad de ciertos parámetros fisiológicos en el sujeto a tratar antes, durante y/o después de la administración del compuesto de la invención. Este procedimiento de diagnóstico concomitante puede proporcionar asistencia para el uso médico como se describió

anteriormente. Por ejemplo, el procedimiento de diagnóstico puede proporcionar asistencia en la evaluación del riesgo, la estratificación del paciente, el monitoreo del curso del tratamiento y/o el control posterior al tratamiento.

En determinadas modalidades, la invención abarca determinar la cantidad y/o actividad de miR-132 en el sujeto a tratar antes, durante y/o después de la administración de los compuestos de la invención. En modalidades adicionales, la invención abarca determinar la cantidad y/o actividad de al menos un marcador particularmente seleccionado de marcadores cardíacos y/o marcadores fibróticos. En determinadas modalidades, la invención abarca la determinación de la cantidad y/o actividad de marcadores cardíacos tales como BNP, por ejemplo, NT-proBNP, ANP o isoformas de la cadena pesada de miosina, por ejemplo, la relación MYH7/6 y/o los niveles de FoxO3 y/o SERCA2. En modalidades particulares, la invención abarca la determinación de la cantidad de NT-proBNP. En aún modalidades adicionales, la invención abarca determinar la cantidad y/o actividad de marcadores fibróticos tales como colágeno, por ejemplo, deposición de colágeno y/o expresión de genes de marcadores fibróticos tales como - pero sin limitarse a - colágeno 1A1, colágeno 1A2, colágeno 3A1, propéptido C-terminal de procolágeno de tipo I (PICP) y/o galectina-3 (Gal-3), y/o una metalopeptidasa (metaloproteínasa) de matriz tal como metaloproteínasa de matriz 1 (MMP-1) y/o metaloproteínasa de matriz 2 (MMP-2).

La determinación de los parámetros anteriores puede llevarse a cabo en muestras de fluidos corporales tales como sangre, plasma o suero o en muestras de tejido de acuerdo con métodos conocidos a nivel de ácido nucleico y/o proteína y puede proporcionar información diagnóstica útil, por ejemplo, sobre el curso de la enfermedad y/o el curso y/o el éxito de la terapia.

Además, los inventores han descubierto por medio de un método de detección basado en PCR que la cantidad de miR-132 en el tejido cardíaco muestra una correlación positiva con la cantidad de miR-132 en un fluido corporal circulante, por ejemplo, sangre total, plasma o suero. Por lo tanto, las mediciones de la cantidad de miR-132 en una muestra de fluido corporal, por ejemplo, una muestra de sangre total, plasma o suero proporcionan un indicio de la cantidad de miR-132 en el tejido diana, particularmente en el tejido cardíaco.

En determinadas modalidades, la invención abarca determinar la cantidad y/o actividad de miR-132 en el sujeto a tratar, por ejemplo, un sujeto humano, durante el ciclo de terapia. El término "ciclo de terapia" en este contexto debe entenderse como la administración de un compuesto de la invención, particularmente la administración de CDR132L, a un sujeto que lo necesita, particularmente un sujeto humano, durante un cierto período de tiempo, por ejemplo, un período de tiempo de al menos un día, al menos una semana, al menos dos semanas o al menos un mes. Esta determinación puede llevarse a cabo una o varias veces durante el ciclo de terapia. En modalidades particulares, la cantidad de miR-132 se determina cuantitativamente en una muestra de un fluido corporal, por ejemplo, en una muestra de un fluido corporal circulante tal como una muestra de sangre, plasma o suero. Particularmente, la muestra es una muestra de plasma. La cantidad y/o actividad de miR-132 se correlaciona inversamente o negativamente con la concentración del compuesto en el órgano diana previsto, particularmente el corazón, pero también para su actividad y/o su eficacia terapéutica. Por lo tanto, la determinación permite el ajuste de la dosis a administrar y/o el ajuste del intervalo entre las dosis individuales. Además, la determinación permite la estratificación de los pacientes con respecto a su respuesta terapéutica, por ejemplo, distinguir a los respondedores de los no respondedores. En particular, la determinación se lleva a cabo en pacientes con enfermedad crónica, por ejemplo, pacientes con enfermedad cardíaca crónica, varias veces durante el ciclo de terapia. Por ejemplo, la determinación puede llevarse a cabo en intervalos semanales, quincenales y/o mensuales.

En determinadas modalidades, la invención abarca la determinación de cambios en los parámetros del ECG durante el ciclo de terapia. Los parámetros del ECG relevantes para los pacientes con insuficiencia cardíaca incluyen, entre otros, la medición del QRS, las ondas T, el bloqueo de la rama izquierda del haz de His (LBBB) y/o el bloqueo de la rama derecha del haz de His (RBBB); y/o la progresión R. Particularmente relevante es la medición del QRS.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, el oligonucleótido se administra en un régimen basado en la demanda, por ejemplo, mediante el ajuste de la dosis y/o el intervalo de tiempo entre dosis individuales de acuerdo con la cantidad medida de miR-132 en una muestra de fluido corporal. Por ejemplo, si se encuentra que la cantidad de miR-132 en la muestra de fluido corporal está por encima de un valor predeterminado, se administra una nueva dosis del oligonucleótido.

Por lo tanto, la presente invención se refiere al oligonucleótido como se describió anteriormente para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno cardíaco en un sujeto humano, en donde el oligonucleótido se administra mediante un régimen basado en la demanda, que comprende particularmente las etapas:

- (i) medir la cantidad de miR-132 en una muestra de fluido corporal, por ejemplo, en una muestra de sangre total, suero o plasma, de un sujeto que se trata con el oligonucleótido,
- (ii) administrar el oligonucleótido en una dosis y/o intervalo de tiempo entre dosis individuales según se determine de acuerdo con la cantidad medida de miR-132 en la etapa (i), particularmente en donde se administra una nueva dosis del oligonucleótido si se encuentra que la cantidad de miR-132 en la muestra de fluido corporal es

Por encima de un valor predeterminado, por ejemplo, el valor inicial.

El compuesto de la invención puede administrarse como una composición farmacéutica que comprende un portador farmacológicamente aceptable. La administración puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos, en donde el compuesto se introduce en la célula o el órgano diana deseado del sujeto a tratar.

5 El compuesto puede administrarse como tal o como un conjugado con un resto heterólogo como se describió anteriormente.

Para aplicaciones farmacéuticas, la composición puede estar en forma de una solución, por ejemplo, una solución inyectable, emulsión, suspensión o similar.

10 La composición puede administrarse de cualquier manera adecuada, por ejemplo, por vía parenteral, en particular por inyección, tal como inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraarterial, o infusión, por vía oral o inhalatoria y/o por aplicación dérmica, o mediante aplicación local al órgano diana, por ejemplo, por perfusión intracoronaria. El portador puede ser cualquier portador farmacéutico adecuado. Preferentemente, se usa un portador que es capaz de aumentar la eficacia de las moléculas de oligonucleótidos para entrar en las células diana. Los ejemplos adecuados de tales portadores son los liposomas, por ejemplo, liposomas catiónicos o exosomas prediseñados.

15 En determinadas modalidades, el compuesto, particularmente CDR132L, se administra mediante inyección intravenosa o mediante inyección subcutánea.

20 El compuesto se administra en una dosis farmacéuticamente eficaz en dependencia de la vía de administración y el tipo o gravedad de la enfermedad.

25 En determinadas modalidades, el compuesto se administra a un sujeto humano en una dosis de aproximadamente 0,1 -100 mg/kg de peso corporal por aplicación, por ejemplo, aproximadamente 0,2 – 50 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 0,8 – 20 mg/kg de peso corporal por aplicación, o aproximadamente 3 - 10 mg/kg de peso corporal por aplicación, por ejemplo, mediante aplicación parenteral, particularmente mediante inyección o infusión, por ejemplo, mediante inyección intravenosa o mediante inyección subcutánea.

30 En un estudio farmacocinético se descubrió que el compuesto tenía un tiempo de vida media largo de aproximadamente tres semanas en el tejido cardíaco y un tiempo de vida media bifásica corto en plasma. Estos resultados demuestran que el compuesto es adecuado en una variedad de regímenes de tratamiento diferentes, por ejemplo, en un régimen de tratamiento que comprende aplicaciones en intervalos de tiempo de menos de una semana y en un régimen de tratamiento que comprende aplicaciones en intervalos de tiempo de una semana o más.

35 En determinadas modalidades, el oligonucleótido se administra a un sujeto humano en un régimen seleccionado de administración diaria, administración cada segundo día, administración cada tercer día y administración cada cuarto día, particularmente en donde el oligonucleótido se administra por vía parenteral, más particularmente por inyección intravenosa o subcutánea, por ejemplo, autoinyección subcutánea por parte del paciente.

40 En estas modalidades, el oligonucleótido se administra en una dosis dependiente del peso corporal y/o en una dosis fija. Por ejemplo, el oligonucleótido puede administrarse en una dosis de 0,01 mg/kg de peso corporal a 50 mg/kg de peso corporal, en una dosis de 0,02 mg/kg de peso corporal a 10 mg/kg de peso corporal o en una dosis de 0,05 mg/kg de peso corporal a 5 mg/kg de peso corporal por aplicación. Alternativamente, el oligonucleótido puede administrarse en una dosis fija de 1 mg a 5000 mg, en una dosis fija de 2 mg a 1000 mg, o en una dosis fija de 5 mg a 500 mg por aplicación.

45 En aún otras modalidades, el oligonucleótido se administra a un sujeto humano en un régimen seleccionado de administración semanal, administración cada segunda semana, administración cada tercera semana, administración cada cuarta semana o cada mes, administración cada sexta semana, administración cada segundo mes, administración cada tercer mes, administración cada sexto mes, y administración una vez al año, particularmente en donde el oligonucleótido se administra por vía parenteral, más particularmente por inyección intravenosa o subcutánea, por ejemplo, autoinyección subcutánea por parte del paciente.

50 En estas modalidades, el oligonucleótido se administra en una dosis dependiente del peso corporal o en una dosis fija. Por ejemplo, el oligonucleótido puede administrarse en una dosis de 0,01 mg/kg de peso corporal a 50 mg/kg de peso corporal, en una dosis de 0,05 mg/kg de peso corporal a 20 mg/kg de peso corporal o en una dosis de 0,1 mg/kg de peso corporal a 10 mg/kg de peso corporal por aplicación. Alternativamente, el oligonucleótido puede administrarse en una dosis fija de 1 mg a 5000 mg, en una dosis fija de 5 mg a 2000 mg, o en una dosis fija de 10 mg a 1000 mg por aplicación.

55 En aún otras modalidades, el compuesto se administra a un paciente humano en una dosis inicial, por ejemplo, 1 o 2 dosis iniciales, y subsecuentemente en al menos una dosis de mantenimiento, que es diferente de la dosis inicial. Por ejemplo, la dosis inicial puede ser mayor que la dosis de mantenimiento, tal como aproximadamente 1,5 - 3 veces, por ejemplo, aproximadamente 2 veces más alta que la dosis de mantenimiento. La dosis inicial y/o la dosis de mantenimiento pueden administrarse como una dosis dependiente del peso corporal o en una dosis fija. En

modalidades específicas, la dosis inicial es de aproximadamente 3 - 10 mg/kg, y la dosis de mantenimiento es de aproximadamente 1 - 7,5 mg/kg. Adicionalmente, una dosis de mantenimiento puede ajustarse, por ejemplo, mediante titulación, en base a la cantidad de miR-132 en fluidos corporales tales como sangre, plasma o suero.

5 En un estudio clínico humano de fase Ib, se encontró que el compuesto demuestra una excelente tolerabilidad y seguridad en pacientes humanos con insuficiencia cardíaca en dosis únicas y repetidas en dosis crecientes además del estándar de atención. El perfil farmacocinético no muestra signos de acumulación y un alto nivel de linealidad de la dosis. Su modo de acción único en la insuficiencia cardíaca se confirmó en los parámetros farmacodinámicos relevantes y el acoplamiento a la diana. No se observaron eventos adversos graves ni reacciones en el lugar de la inyección, y ningún paciente se retiró del estudio debido a eventos adversos. El compuesto se toleró bien y no mostró signos de toxicidad en dosis de hasta 10 mg/kg.

10 El compuesto puede administrarse como una monoterapia o en combinación con un medicamento diferente adicional, particularmente un medicamento adecuado para la prevención o el tratamiento de trastornos cardíacos o trastornos fibróticos como se describió anteriormente.

15 Los ejemplos de medicamentos adicionales adecuados para la prevención o el tratamiento de trastornos cardíacos son agentes moduladores de la angiotensina, betabloqueadores, diuréticos, antagonistas de la aldosterona, vasodilatadores, agentes inotrópicos, estatinas, inhibidores de neprilisina, o inhibidores de SGLT-2 o sus combinaciones, por ejemplo, una combinación de un inhibidor de neprilisina, por ejemplo, sacubitrilo, con un bloqueador del receptor de angiotensina II, por ejemplo, valsartán.

20 En determinadas modalidades, el compuesto se administra junto con (i) al menos un diurético, (ii) al menos un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, (iii) al menos un betabloqueador, opcionalmente (iv) un bloqueador del receptor de angiotensina II y/o (v) opcionalmente un inhibidor del canal If tal como ivabradina y opcionalmente (vi) un inhibidor de neprilisina-receptor de angiotensina, y opcionalmente (vii) un inhibidor del cotransportador de glucosa 2 tal como empagliflozina y dapagliflozina, y/u opcionalmente (viii) agentes terapéuticos de células madre y/u opcionalmente (ix) anti-miARN dirigidos a diferentes vías, y/u opcionalmente (x) un inhibidor de SGLT-2. El experto en la técnica puede seleccionar inhibidores, agentes terapéuticos de células madre y/o miARN adecuados dirigidos a diferentes vías. Los compuestos e inhibidores de acuerdo con (i) - (ix) pueden seleccionarse y combinarse independientemente de cualquier manera adecuada.

25 Los ejemplos de medicamentos adicionales adecuados para la prevención del tratamiento de trastornos fibróticos son medicamentos para la prevención o el tratamiento de la fibrosis cardíaca, tales como inhibidores de la ACE, por ejemplo, lisinopril, bloqueadores del receptor de angiotensina II, por ejemplo, antagonistas de aldosterona, por ejemplo, espironolactona y/o inhibidores de TGF beta, por ejemplo, pirfenidona o tranilast, medicamentos para la prevención o el tratamiento de la fibrosis pulmonar, tales como agentes antifibróticos, por ejemplo, nintedanib o pirfenidona, agentes antiinflamatorios, por ejemplo, corticoesteroides, azatioprina, ciclofosfamida y micofenolato de mofetilo, agentes antirreflujo, por ejemplo, inhibidores de la bomba de proteínas o H₂ bloqueadores y/o agentes y medicamentos antitúxicos para la prevención y/o tratamiento de la fibrosis hepática, tales como inhibidores de la ACE, por ejemplo, benazeprilo, lisinopril o ramipril, agentes antivirales o agonistas de PPAR α .

35 Aún más, la invención se refiere al uso de un compuesto de la invención como se describe en la presente descripción anterior para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un trastorno cardíaco.

40 Aún más, la invención se refiere al uso de un compuesto de la invención como se describe en la presente descripción anterior para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un trastorno fibrótico.

45 Aún más, la invención se refiere a un método para la prevención o el tratamiento de un trastorno cardíaco que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto como se describe en la presente descripción.

50 Aún más, la invención se refiere a un método para la prevención o el tratamiento de un trastorno fibrótico que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto como se describe en la presente descripción.

55 Aún más, la invención se refiere a un kit para monitorear la terapia con un oligonucleótido como se describió anteriormente que comprende determinar la cantidad y/o actividad de miR-132 de un sujeto al que se ha administrado el oligonucleótido. El kit puede comprender un cebador que se une al ADN codificante de miR-132 o ADN que es complementario a este, preferentemente el cebador tiene miR-132, un cebador que se une al ADN codificante de miR-39 o ADN que es complementario a este, preferentemente el cebador cel-miR-39 y opcionalmente un control positivo hsa-miR-132 y opcionalmente un control positivo cel-miR-39.

60 De acuerdo con una modalidad preferida, los cebadores hsa-miR-132 y miR-39 se usan juntos. Además, el kit puede comprender compuestos adicionales, por ejemplo, una mezcla maestra de qPCR y agua libre de nucleasas. En una modalidad preferida, el kit comprende el iniciador hsa-miR-132, el iniciador cel-miR-39 los controles positivos citados

anteriormente y la mezcla maestra de qPCR y agua libre de nucleasas. Los cebadores adecuados pueden seleccionarse por el experto en la técnica.

Además, la presente invención se describirá con más detalle mediante las siguientes Figuras y Ejemplos.

5

Ejemplo 1 - Silenciamiento de la expresión de miR-132 en cardiomiocitos

Se llevó a cabo un ensayo cuantitativo *in vitro* para determinar la actividad inhibitoria de miARN de numerosos compuestos análogos de la estructura derivados de una biblioteca anti-miR-132. El silenciamiento de la expresión de miARN se cuantificó mediante un ensayo TaqMan® y PCR cuantitativa en tiempo real.

10

El estudio se realizó en cardiomiocitos de rata aislados después de la estimulación hipertrófica mediante el tratamiento con fenilefrina/isoproterenol en concentraciones de 10 µM. Las células se incubaron durante 48 horas en medio de cultivo celular estándar. Los compuestos de prueba se administraron individualmente en una concentración de 100 nM. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado.

15

El compuesto CDR132L, un mezclador LNA-DNA que tiene una cadena principal de fosforotioato, se identificó como el compuesto más potente de la biblioteca de análogos de la estructura anti-miR-132.

20

La estructura de CDR132L es la siguiente:

5'-dA*+T*dG*+G*dC*+T*dG*+T*dA*+G*dA*dC*dT*dG*+T*+T-3'

en donde dA es 2'-desoxiadenosina, dG es 2'-desoxiguanosina, dC es 2'-desoxicidina y T es timidina,

en donde +T es un bloque estructural LNA-T y +G es un bloque estructural LNA-G

y en donde * es un enlace fosforotioato.

25

Ejemplo 2 - Perfil toxicológico

2.1 Objetivo del estudio: Perfil de toxicidad de CDR132L

30

2.2 Esquema del estudio:

Se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad *in vitro* en células de células hepáticas humanas (HepG2) y cardiomiocitos neonatales aislados (NRCM). Se usó un ensayo de MTT comercial colorimétrico para evaluar la citotoxicidad. Después de la adición de compuestos individuales, las células se incubaron en medio DMEM durante 48 h. El efecto de CDR132L (rojo) se comparó con un oligonucleótido de LNA alterado, usado como control (azul) en un intervalo de dosis de 0,01-100 µM. El intervalo de dosis terapéutica se marca en gris.

35

2.3 Resultados: No se encontró toxicidad significativa de CDR132L en células HepG2 y NRCM en el intervalo de dosis terapéutica (ver Figuras 1A y 1B).

40

Ejemplo 3 – Remodelación inversa del ventrículo izquierdo del corazón insuficiente mediante la administración de CDR132L en un modelo de ratón transgénico

3.1 Objetivo del estudio: Evaluar la eficacia de CDR132L en la reversión de la insuficiencia cardíaca en un modelo de ratón de insuficiencia cardíaca.

45

3.2 Esquema del estudio:

Modelo de hipertrofia cardíaca: Los ratones transgénicos (TG) con sobreexpresión cardíaca de miR-132 (Ucar y otros, 2012).

50

Tratamiento: semanal 20 mg/kg ip. CDR132L o placebo (cf. Figura 2A) Grupos: compañeros de camada de tipo silvestre (WT) +placebo, WT+CDR132L, TG+placebo, TG+CDR132L. n=6/grupo.

55

Los niveles de expresión de miR-132 se detectaron mediante qPCR. Prueba estadística: prueba de la t para datos independientes. (Figura 2B). **p<0,01, n=6/grupo.

3.3 Resultados:

60

Imágenes ecocardiográficas representativas del corazón (Figura 3A).

CDR132L revierte la hipertrofia medida por la masa cardíaca y el volumen telediastólico (LVEDV) (Figura 3B).

CDR132L mejora la función contráctil regional en la mayoría de los segmentos del ventrículo izquierdo (AB, anterior basal; AM, anterior medio; AA, ápice anterior; PA, ápice posterior; PM, medio posterior y PB, basal posterior) (Figura 3C).

5 Ejemplo 4 - Administración de CDR132L en un modelo de ratón de insuficiencia cardíaca pos-MI

4.1 Objetivo del estudio: Evaluación de la eficacia de CDR132L en un modelo de ratón de insuficiencia cardíaca pos-MI

10 4.2 Esquema del estudio:

Modelo de infarto de miocardio (MI) en ratones: ligadura de la arteria coronaria (LAD) permanente en ratones C57BL/6N (Kolk y otros, 2009).

15 Grupos: MI o simulación, tratado con CDR132L o placebo
 Tratamiento: 20 mg/kg ip, el día 7 y 14 pos-MI
 Criterio de valoración: Función de LV el día 28 pos-MI. n=6-7/grupo. (Figura 4),

20 4.3 Resultados:

El tratamiento con CDR132L mejora la disfunción ventricular izquierda pos-MI (Figura 5A). Los parámetros independientes de carga de la función contráctil sistólica también mejoraron (Figura 5B) (*p<0,05).

25 El tratamiento con CDR132L también mejora la tasa de deformación longitudinal (LSR) y, por lo tanto, revierte la disfunción contráctil pos-MI en segmentos cardíacos individuales en el área remota del corazón. (*p<0,05) (Figura 6).

El tratamiento con CDR132L silencia eficazmente la expresión de miR-132 en tejidos cardíacos, en por ejemplo, área remota (no infarto) y zona periinfarto (Figura 7A).

30 A nivel histológico, CDR132L reduce el tamaño de los cardiomiocitos en el área remota del corazón pos-MI (Figura 7B).

A nivel tisular, CDR132L reduce la expresión de la señal de estrés cardíaco ANP en el corazón pos-MI (Figura 7C).

35 Ejemplo 5 - Prueba de CDR132L en un modelo porcino de insuficiencia cardíaca pos-MI

5.1 Objetivo del estudio: Prueba de eficacia de CDR132L *in vivo* en un modelo clínicamente relevante de infarto de miocardio posterior.

40 5.2 Diseño del estudio:

- Modelo porcino de infarto de miocardio provocado por isquemia de 90 min (oclusión de LAD) y reperfusión subsecuente.
- Grupos: Placebo o CDR132L, n=6 por grupo.
- Tratamiento: dos veces, el día 3 y el día 28 pos-MI, 0,3 mg/kg intracoronario y 0,5 mg/kg intravenoso, respectivamente (Figura 8).
- Final del estudio: 8 semanas pos-MI. Mediciones de resultado primarias: EF y remodelación de LV.

50 5.3 Resultados:

- El tratamiento con CDR132L evita la remodelación inadaptada y mejora la función, según se determina mediante la medición del volumen telediastólico, el volumen telesistólico, la fracción expulsada y la función ventricular izquierda (Figuras 9A-D).
- El tratamiento con CDR132L mejora la contractilidad segmentaria en segmentos correspondientes al miocardio sobreviviente/remoto; MRI cardíaca al final del estudio: n=6/grupo, área roja: p<0,05 (Figura 9E).
- El tratamiento con CDR132L evita la remodelación inadaptada y mejora la viabilidad del LV en el área apical según se determina por NOGA, mapeo electroanatómico al final del estudio: n=6/grupo, placebo frente a CDR132L: p<0,05 (Figura 10)
- CDR132L normaliza la expresión tisular de marcadores patológicos de insuficiencia cardíaca en ANP y BNP y proporciona un cambio en las isoformas de la cadena pesada de la miosina, es decir, la relación MYH7/6 (Figura 11).
- A nivel histológico, el tratamiento con CDR132L reduce eficazmente la hipertrofia de los cardiomiocitos en áreas del LV remotas representativas imágenes de fotomicrografía del área del LV (tinción WGA/DAPI 20x) (Figura 12A) y representación gráfica (Figura 12B), n=6/grupo, placebo frente a CDR132L: p<0,05.

65 Ejemplo 6 – Perfil farmacodinámico/acoplamiento a la diana de CDR132L en cerdos

6.1 Diseño del estudio:

Tratamiento: 1x, día 0, 0,5 mg/kg o 5 mg/kg de perfusión intracoronaria, n=3 cerdos/grupo, placebo frente a CDR132L: p<0,05.

5

- Ensayo de miARN de tejido por qPCR al final del estudio (24 h después del tratamiento).

6.2 Resultados:

- Una única dosis de CDR132L silencia en dosis-dependiente los niveles de miR-132 cardíaco (Figura 13).

Ejemplo 7 – Perfil toxicológico orgánico

7.1 Diseño del estudio:

15

- Tratamiento: dos veces, el día 3 y el día 28 pos-MI, 0,3 mg/kg intracoronario y 0,5 mg/kg intravenoso, respectivamente.
- Muestreo sanguíneo seriado, final del estudio: 72 h después del tratamiento, n=6 cerdos/grupo, placebo frente a CDR132L: p<0,05.

20

7.2 Resultados:

- El tratamiento con CDR132L in vivo no provoca ninguna toxicidad orgánica en cerdos (Figura 14).

25

Se llevaron a cabo estudios de toxicidad de dosis repetidas subsecuentes en ratas y minicerdos.

De acuerdo con un estudio de toxicidad de 4 semanas en ratas mediante el uso de una inyección de bolo intravenosa de CDR132L a 4, 20 y 100 mg/kg en los días 1 y 28, seguido de un período de recuperación de 4 semanas, el "No se observó nivel de efecto adverso" (NOAEL) en ratas se consideró que era de 20 mg/kg. Esto corresponde a una dosis equivalente humana de 3,23 mg/kg de peso corporal.

30

De acuerdo con un estudio de toxicidad de 4 semanas en minicerdos mediante el uso de una inyección de bolo intravenosa de CDR132L a 4, 20 y 40 mg/kg en los días 1 y 28, seguido de un período de recuperación de 4 semanas, el "nivel de efecto no observado" (NOEL) en minicerdos se consideró de 40 mg/kg. Esto corresponde a una dosis equivalente humana de 36,36 mg/kg de peso corporal.

35

Ejemplo 8 - Niveles cardíacos de ARNm de FoxO3 y SERCA2 en un modelo de ratón de insuficiencia cardíaca

Los niveles de ARNm de FoxO3 y Serca2 cardíacos se midieron en ratones de control y de miR-132 TG tratados con inyección intraperitoneal de oligonucleótido control o CDR132L, semanalmente, 4 veces. Todos los valores representan media ± SEM. *P < 0,05 (Figuras 15A y 15B).

40

Ejemplo 9 – Comparación de diferentes oligonucleótidos

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto terapéutico del nuevo inhibidor de miR-132-3p CDR132L de acuerdo con la invención preventiva con dos oligonucleótidos comparativos. Los dos oligonucleótidos comparativos presentan la misma secuencia de oligonucleótidos y una cadena principal de fosforotioato como CDR132L pero difieren en la distribución de los bloques de LNA dentro de la molécula. CDR2u1 alberga dos bloques estructurales de LNA en el extremo 5' y el 3', mientras que para CDR301, cada nucleótido porta un bloque estructural de LNA.

50

Para evaluar la eficiencia, los diferentes oligonucleótidos se administraron a cardiomiocitos de ratas neonatales (NRCM). Los efectos de este tratamiento se monitorearon mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) después de las alteraciones en la expresión de miR-132-3p y su gen diana conocido FoxO3 (caja de Forkhead O3).

55

El diseño experimental y los resultados se muestran en la Figura 16: (A) Descripción general del diseño experimental. Los cardiomiocitos de rata neonatal se sembraron el día 0 y se trataron con los oligonucleótidos CDR132L, CDR2u1 o CDR301 (100 nM cada uno) el día 1. Al final del estudio, las células se cosechan para el análisis de la expresión génica. (B) Niveles de expresión de miR-132-3p después del tratamiento con CDR132L, CDR2u1 o CDR301. (C) Niveles de expresión del gen diana de miR-132-3p caja de Forkhead O3 (FoxO3) después del tratamiento con CDR132L, CDR2u1 o CDR301. Los datos son media ± DE. Los valores de P de oligonucleótidos frente al placebo se determinaron mediante la prueba de la t de Student bilateral.

60

El tratamiento de los NRCM con CDR132L y CDR301 condujo a una reducción significativa de los niveles de miR-132-3p en un 96 %, mientras que CDR2u1 redujo la expresión de miARN en un 30 % (Fig. 16A-B). Además, el tratamiento con CDR132L condujo a una depresión significativa del gen diana de miR-132-3p Foxo3, que no se logró con CDR2u1 y CDR301 (Figura 16C).

65

En resumen, nuestros datos demuestran un efecto inhibitorio superior de CDR132L en comparación con CDR2u1 y CDR301 indicado por niveles de expresión significativamente reducidos o miR-132-3p y represión significativa de su gen diana FoxO3.

5 Ejemplo 10 – Efectos de CDR132L en la fibrosis cardíaca

El propósito de este estudio fue evaluar los efectos terapéuticos antifibróticos de CDR132L en un modelo de fibrosis *in vivo*.

10 Para la prueba de actividad antifibrótica *in vivo*, se usó el modelo de ratón de infarto de miocardio (MI) por ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) en ratones C57BL/6N. El tratamiento con CDR132L se aplicó el día 7 y 14 con placebo (oligo aleatorizado de CDR132L, 20 mg/kg) y CDR132L (20 mg/kg). Los grupos incluyeron el grupo operado de control (ratones operados simulados) y los ratones con ligadura de LAD (MI, infarto de miocardio), que recibieron placebo o CDR132L: Simulación+placebo, Simulación+CDR132L, MI+placebo, MI+CDR132L. n=6-7/grupo. El diseño experimental se describe en la Figura 17. La evaluación del efecto antifibrótico de CDR132L *in vivo* en la insuficiencia cardíaca pos-MI se muestra en la Figura 18. La fibrosis (mostrada como % de deposición de colágeno detectada por tinción de rojo picrosirio (PSR) y expresión génica de cadena alfa 1 de colágeno tipo III (Col3a1) con relación a β -actina) se atenuó después del MI mediante el tratamiento con CDR132L. Los grupos incluyeron el grupo de operación de control (ratones operados simulados) y ratones con ligadura de LAD (MI), que recibieron ya sea placebo (columna negra) o CDR132L (columna blanca): Simulación+placebo, Simulación+CDR132L, MI+placebo, MI+CDR132L. Se realizó una prueba estadística (prueba de la t para datos independientes) entre ratones MI tratados con placebo o CDR132L. **p<0,01, n=6-7/grupo.

25 De acuerdo con los resultados histológicos, la fibrosis se atenuó después del tratamiento con CDR132L (Figura 18A). Esto se confirmó a nivel molecular, con expresión génica reducida para marcadores de fibrosis como la cadena alfa 1 del colágeno tipo III (Col3a1) (Figura 18B).

Ejemplo 11 – Efectos de CDR132L en la fibrosis pulmonar y hepática

30 El efecto antifibrótico de CDR132L se probó en modelos para fibrosis pulmonar y hepática *in vitro*. Para ello, los fibroblastos primarios humanos derivados del hígado (fibroblastos hepáticos primarios humanos, HPLF, PeloBiotech) y del pulmón (fibroblastos pulmonares primarios humanos, NHLF, Lonza) se estimularon con agentes profibróticos y se trataron con CDR132L. Los efectos terapéuticos de CDRL132L se monitorearon mediante el seguimiento de procesos clave dentro de la vía fibrótica, que incluyen la velocidad de proliferación y las alteraciones en la expresión de los genes marcadores fibróticos al final del estudio. Además, se evaluó la expresión de miR-132-3p para demostrar el tratamiento eficaz con CDR132L.

40 Para determinar la proliferación celular, se usó un kit de ELISA de proliferación celular (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas) (proporcionado por Roche). Este ensayo colorimétrico permite cuantificar la proliferación celular en base a la medición de BrdU (bromodesoxiuridina) incorporado en el ADN recién sintetizado de células en proliferación. La cantidad de BrdU incorporado se ha detectado y cuantificado. Los valores de absorbancia se correlacionan directamente con la cantidad de síntesis de ADN y, de esta manera, con el número de células en proliferación en los microcultivos respectivos. La expresión génica se ha evaluado mediante el uso de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) que mide los niveles de expresión de miR-132-3p y marcadores fibróticos que incluyen colágeno 1A1 (COL1A1), colágeno 1A2 (COL1A2) y metalopeptidasa de matriz 2 (MMP2).

50 La Figura 19 se refiere al modelo de fibrosis hepática *in vitro*: (A) Descripción general del diseño experimental. Los fibroblastos hepáticos primarios humanos (proporcionados por PeloBiotech) se sembraron el día 0 y se trataron con estímulo fibrótico (10 ng/ml de TGF- β en medio de crecimiento normal (medio de fibroblastos completo suplementado con FBS al 10 %) y CDR132L (100 nM) el día 1. Al final del estudio, se ha evaluado la proliferación celular y la expresión génica de los marcadores fibróticos. (B) Niveles de expresión de miR-132-3p después del tratamiento con CDR132L. (C) Proliferación evaluada mediante el monitoreo de la incorporación de BrdU durante la síntesis de ADN. El reactivo de BrdU se añadió al medio 20 h antes del final del estudio. (D) Niveles de expresión de genes de marcadores fibróticos (colágeno 1A1 (COL1A1), colágeno 1A2 (COL1A2) y metalopeptidasa de matriz 2 (MMP2)). En (B) y (D) la línea discontinua indica el nivel de expresión de células de control no estimuladas. Los datos son media \pm DE. Los valores de P de CDR132L frente al control se determinaron mediante la prueba de la t de Student bilateral.

60 La estimulación de HPLF con factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Figura 19A) condujo a una inducción leve de miR-132-3p que se redujo significativamente mediante el tratamiento con CDR132L (Figura 19B). Además, este compuesto redujo la proliferación de fibroblastos (Figura 19C) y la expresión génica fibrótica, que incluye COL1A1, COL1A2 y MMP2 (Figura 19D).

65 La Figura 20 se refiere al modelo de fibrosis pulmonar *in vitro*: (A) Descripción general del diseño experimental. Los fibroblastos pulmonares humanos normales (proporcionados por Lonza) se sembraron el día 0 y se trataron con un estímulo fibrótico (FBS alto (5 %) en medio de crecimiento de fibroblastos y CDR132L (100 nM) el día 1. Al final del estudio, se ha evaluado la proliferación celular y la expresión génica. (B) Niveles de expresión de miR-132-3p después

del tratamiento con CDR132L. (C) Proliferación evaluada mediante el monitoreo de la incorporación de BrdU durante la síntesis de ADN. El reactivo de BrdU se ha añadido al medio 20 h antes del final del estudio. En (B) la línea discontinua indica el nivel de expresión de células de control no estimuladas. Los datos son media \pm DE. Los valores de *P* de CDR132L frente al control se determinaron mediante la prueba de la *t* de Student bilateral.

5 En las células NHLF, después de la estimulación fibrótica con FBS alto (5 % en comparación con las condiciones de crecimiento normales de FBS al 2 %) (Figura 20A) no se observó elevación de miR-132-3p (Figura 20B). Sin embargo, el tratamiento con CDR132L condujo a una reducción significativa del microARN diana (Figura 20B) y la proliferación de fibroblastos (Figura 20C).

10 En resumen, nuestros datos demuestran un efecto antifibrótico significativo del análogo de oligonucleótido CDR132L en fibroblastos derivados del hígado o los pulmones, así como también en el tejido cardíaco. Se supone que este efecto puede basarse en la capacidad antiproliferativa del fármaco y/o en su efecto sobre la expresión de proteínas de la matriz extracelular.

15 Ejemplo 12 – Protocolo de un estudio clínico en seres humanos

12.1 Protocolo:

20 Fundamentación

25 El estado actual de la farmacoterapia para la insuficiencia cardíaca se limita principalmente a las etapas de la enfermedad menos avanzadas (etapa I y II de la Asociación cardíaca de Nueva York; NYHA I/II). Sin embargo, los fármacos no pueden evitar la progresión a etapas avanzadas (NYHA III y IV), que se asocian con hospitalizaciones frecuentes y una mortalidad a 1 año que supera el 70 % (13). Como último recurso, las bombas implantadas (dispositivos de asistencia ventricular izquierda, LVAD) y, en última instancia, el trasplante de corazón pueden ser las únicas opciones para salvar vidas para unos pocos pacientes con insuficiencia cardíaca en etapa terminal.

30 Por lo tanto, se necesitan urgentemente agentes terapéuticos novedosos, eficaces y que detengan la enfermedad, que reduzcan la mortalidad y la hospitalización para ofrecer una esperanza curativa a los pacientes. El enfoque de los presentes inventores ofrece una nueva oportunidad para revolucionar la práctica médica, mejorar la atención al paciente y reducir los costos de la atención de la insuficiencia cardíaca.

35 El modo de acción de CDR132L tiene los siguientes elementos clave que forman la base de su papel como un fármaco de próxima generación en la insuficiencia cardíaca:

- 40
- a) normalización de los niveles cardíacos anormales de miR-132,
 - b) normalización de la señalización del calcio y la contractilidad, y la función cardíaca,
 - c) mejora en la autofagia y la homeostasis cardíacas, y
 - d) atenuación de la remodelación cardíaca inadaptada.

Los resultados de los estudios preclínicos demostraron que el perfil de seguridad de CDR132L es adecuado para avanzar con el desarrollo clínico.

45 Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo evaluar la seguridad, farmacocinética y algunos parámetros farmacodinámicos en pacientes con insuficiencia cardíaca estable de origen isquémico (NYHA I-III) en base a los efectos terapéuticos significativos demostrados en el estudio de animales grandes clínicamente relevante. Para este estudio se planea aplicar un esquema de aumento escalonado de la dosis.

50 Objetivo principal

- Para evaluar la seguridad de una dosis única y una dosis repetida de CDR132L en pacientes con insuficiencia cardíaca estable de origen isquémico (NYHA etapas I, II y III).

55 Objetivo secundario

- Caracterizar el perfil farmacocinético (PK) de CDR132L en pacientes con insuficiencia cardíaca estable de origen isquémico.

60 Objetivo exploratorio

- Determinar el efecto de CDR132L sobre los parámetros farmacodinámicos (PD).

Criterios de valoración primarios

65 El criterio de valoración primario es la seguridad de CDR132L medida por:

- La incidencia y la gravedad de los eventos adversos surgidos del tratamiento (TEAE),
- Proporción de sujetos con cambios clínicamente significativos en las pruebas de seguridad de laboratorio (hematología, química, coagulación y análisis de orina),
- Proporción de sujetos con anomalías morfológicas y/o de ritmo en el electrocardiograma (ECG),
- 5 • Proporción de sujetos con cambios clínicamente significativos en los intervalos de tiempo del ECG (intervalos PR, QRS, QT y QTc),
- Proporción de sujetos con cambios clínicamente significativos en los signos vitales (presión arterial sistólica, presión arterial diastólica y frecuencia de pulso),
- 10 • Proporción de sujetos con cambios clínicamente significativos en los marcadores de daño orgánico de daño cardíaco (troponina T cardíaca de alta sensibilidad), renal (creatinina) y hepático (aspartato transaminasa y alanina transaminasa) y de descongestión (propéptido natriurético tipo B N-terminal).

Criterios de valoración secundarios

- 15 Parámetros PK derivados por métodos no compartimentales que incluyen la concentración plasmática máxima observada ($C_{m\acute{a}x}$), tiempo hasta la concentración plasmática máxima ($t_{m\acute{a}x}$), área bajo la curva de concentración-plasma tiempo desde el tiempo cero hasta la última concentración plasmática detectable (AUC_{0-t}), área bajo la curva de concentración-plasma tiempo desde el tiempo cero extrapolada al infinito (AUC_{0-inf}), aclaramiento de sangre (CL), constante de velocidad de eliminación terminal (λ_z), vida media de eliminación terminal ($t_{1/2}$), volumen de distribución (V_{dss}).
- 20

Criterios de valoración exploratorios

- Los parámetros de PD que incluyen, entre otros, los siguientes biomarcadores: microARN 132 (miR-132) para el acoplamiento a la diana, propéptido natriurético tipo b N-terminal (NT-pro-BNP) para la descongestión y lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) como marcador de remodelación cardíaca. Pueden requerirse parámetros adicionales.
 - Para identificar biomarcadores que pueden (1) predecir la respuesta al tratamiento con CDR132L, (2) explicar la variabilidad en la PK/PD del fármaco, (3) predecir la susceptibilidad a las interacciones fármaco-fármaco o (4) predecir la aparición de problemas de seguridad. El objetivo de dicha investigación exploratoria será desarrollar una mejor comprensión de los factores intrínsecos y extrínsecos que pueden afectar la farmacocinética de CDR132L en sujetos humanos. Esto no incluirá ninguna secuenciación del genoma (ADN) de los pacientes.
- 25
- 30

35 Diseño del estudio

Este es un estudio de fase I, aleatorizado, con doble enmascaramiento y controlado con placebo para evaluar la seguridad, los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de CDR132L en pacientes con insuficiencia cardíaca estable de origen isquémico (NYHA etapas I-III).

40

Se inscribirán un máximo de veintiocho pacientes. Las cuatro cohortes planificadas con tamaño de cohorte máximo se enumeran a continuación. Cada una de estas cohortes consistirá en hasta 7 pacientes. Los pacientes se asignarán al azar para recibir una infusión intravenosa de 15 minutos de CDR132L o placebo en una relación de hasta 5:2.

- Tratamiento 1 (n= hasta 7) - 0,32 mg/kg de CDR132L; placebo
 - Tratamiento 2 (n= hasta 7) - 1,00 mg/kg de CDR132L; placebo
 - Tratamiento 3 (n= hasta 7) - 3,00 mg/kg de CDR132L; placebo
 - Tratamiento 4 (n= hasta 7) - 10,00 mg/kg de CDR132L; placebo.
- 45

50 Los pacientes se seleccionarán dentro de los 41 días previos a la entrada en el estudio el día -1. Cada sujeto recibirá información verbal y escrita seguida de la firma del Formulario de Consentimiento Informado (ICF) antes de que se lleven a cabo cualquier procedimiento de selección. Los sujetos se admitirán en la unidad de estudio el día -1 y se darán de alta el día 4, se readmitirán el día 27 y se darán de alta el día 31. El día 1, los voluntarios recibirán CDR132L o placebo, recibirán una segunda dosis coincidente cuando se readmitan el día 27, con una segunda dosificación que se producirá el día 28. Todos los pacientes deben recibir terapia de Estándar de Atención (SoC) para la insuficiencia cardíaca de origen isquémico, de acuerdo con las últimas guías europeas (14). Se administrará CDR132L o placebo como terapia complementaria al tratamiento SoC.

55

60 Todos los sujetos asistirán a la unidad para visitas ambulatorias planificadas los días 10-14, 56, 84 y 112. Todas las evaluaciones realizadas durante el estudio se detallan en el cronograma de evaluaciones del estudio (Tabla 2 y Tabla 3). Las características del diseño del estudio pueden adaptarse de acuerdo con las características adaptativas (Tabla 4). Este estudio usará una estrategia de dosificación centinela, para obtener todos los detalles ver la Sección 3.3.5.

65 Número de sujetos

Veintiocho pacientes con insuficiencia cardíaca estable de origen isquémico se reclutaron para las cohortes de dosificación 1, 2, 3 y 4.

5 Criterios principales de admisión

C18036_CDR132L-FIH01_Clinical Study Protocol_v1.0_17Apr2019

10 Plantilla de protocolo de estudio clínico (versión 6) 14 MAR 2019 Página 16 de 85 Los sujetos se incluirán si tienen entre 30 y 80 años de edad con un índice de masa corporal (IMC) entre 18,0-28,0 kg/m² y se confirmó la insuficiencia cardíaca estable de origen isquémico.

15 Los criterios de exclusión principales son: Insuficiencia cardíaca de origen no isquémico (enfermedad cardíaca hipertensiva, miocarditis, miocardiopatía alcohólica e insuficiencia cardíaca debida a fibrilación auricular rápida), enfermedad actual o recurrente; que no incluye insuficiencia cardíaca estable (por ejemplo, hematológica, neurológica, endocrina, inmunológica, renal, hepática o gastrointestinal u otras afecciones) que podrían afectar la acción, absorción o disposición de CDR132L, o podrían afectar las evaluaciones clínicas o las evaluaciones de laboratorio clínico.

Tratamiento(s) de prueba y modo de administración

- 20 Cohorte 1: infusión intravenosa de CDR132L a 0,32 mg/kg (15 min; 20 ml) en los días 1 y 28 (n=5)
 Cohorte 2: infusión intravenosa de CDR132L a 1,00 mg/kg (15 min; 20 ml) en los días 1 y 28 (n=5)
 Cohorte 3: infusión intravenosa de CDR132L a 3,00 mg/kg (15 min; 20 ml) en los días 1 y 28 (n=5)
 Cohorte 4: infusión intravenosa de CDR132L a 10,00 mg/kg (15 min; 20 ml) en los días 1 y 28 (n=5)
 25 Tratamiento(s) de referencia y modo de administración

Infusión intravenosa (15 min; 20 ml) de placebo (n=8) para igualar CDR132L.

Criterios de evaluación

- 30 - Análisis de seguridad

35 Las evaluaciones de seguridad incluirán pruebas de seguridad de laboratorio estándar (hematología, coagulación, bioquímica y análisis de orina), signos vitales (presión arterial sistólica [PAS], presión arterial diastólica [PAD], frecuencia respiratoria, frecuencia del pulso y temperatura timpánica), exámenes físicos, ECG de 12 derivaciones (intervalos RR, PR, QRS, QT, QTcF y frecuencia cardíaca [FC]), telemetría, evaluación de biomarcadores y monitoreo de eventos adversos.

- Análisis farmacocinético

40 Los siguientes parámetros farmacocinéticos se calcularán a partir de las concentraciones plasmáticas medidas de CDR132L: concentración plasmática máxima observada ($C_{m\acute{a}x}$), tiempo hasta la concentración plasmática máxima ($t_{m\acute{a}x}$), área bajo la curva de concentración-plasma tiempo desde el tiempo cero hasta la última concentración plasmática detectable (AUC_{0-t}), área bajo la curva de concentración-plasma tiempo desde el tiempo cero extrapolada al infinito (AUC_{0-inf}), aclaramiento de sangre (CL), constante de velocidad de eliminación terminal (λ_z), vida media de eliminación terminal ($t_{1/2}$), volumen de distribución (V_{dss}).

- Análisis de farmacodinámica

50 Las evaluaciones farmacodinámicas serán exploratorias y se evaluarán mediante la obtención de muestras de sangre para determinar la concentración de los siguientes biomarcadores: microARN 132 (miR-132) para el acoplamiento a la diana, péptido natriurético tipo b N-terminal (NT-pro-BNP) para la descongestión y lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) como marcador de remodelación cardíaca. Pueden requerirse parámetros adicionales.

55 Métodos estadísticos

Se redactará y firmará un plan de análisis estadístico (SAP) que contenga la metodología estadística detallada antes del bloqueo total de la base de datos. El plan puede actualizarse para reflejar las características adaptativas del estudio según sea apropiado.

- 60 - Análisis estadístico de parámetros de seguridad

Los eventos adversos (AE), los signos vitales, los parámetros del ECG y los datos de laboratorio clínico se enumerarán y resumirán mediante el uso de estadísticas descriptivas.

El número (y %) de sujetos que tuvieron cualquier AE se resumirá para cada dosis. Todos los AE se enumerarán por clase de órgano del sistema (SOC) y término preferido (PT) asignado al evento mediante el uso del Diccionario médico para actividades reguladoras (MedDRA). Además, estos eventos se resumirán por la intensidad máxima. También se resumirá el número de sujetos que tuvieron AE relacionados con el fármaco. Se enumerarán todos los eventos adversos graves (SAE) y/o eventos adversos que condujeron a la suspensión.

- Análisis estadísticos de parámetros farmacocinéticos

Las concentraciones plasmáticas se enumerarán y resumirán por punto de tiempo. Los parámetros de PK se enumerarán para cada sujeto y se resumirán para cada grupo de tratamiento mediante el uso de estadísticas descriptivas. Para evaluar preliminarmente la proporcionalidad de la dosis para $C_{m\acute{a}x}$ y AUC, $C_{m\acute{a}x}$ en plasma normalizada por dosis, AUC_{0-t} y AUC_{0-inf} se calcularán y resumirán descriptivamente. Además, se ajustará un modelo de potencia con log (parámetro PK) como variable de respuesta y log(dosis) como predictor a los datos para $C_{m\acute{a}x}$ en plasma, AUC_{0-t} y AUC_{0-inf} . Una pendiente de 1 en este modelo corresponde a la proporcionalidad de la dosis. La pendiente se estimará con su CI de 90 % y 95 % de 2 lados.

- Análisis estadísticos de parámetros farmacodinámicos

Los datos de los parámetros de PD se enumerarán y resumirán: valores absolutos junto con los cambios con respecto al valor inicial, mediante el uso de estadísticas descriptivas.

Para cada grupo de dosis, se investigará la relación entre la concentración plasmática y los parámetros de PD mediante el uso de la representación gráfica de cada parámetro de PD frente a las concentraciones plasmáticas. Esta relación se investigará mediante el uso de la intersección de la PK y la población de PD relevante. Cuando las estadísticas resumidas y las representaciones gráficas indican una relación entre la concentración plasmática y el parámetro de PD, puede desarrollarse un modelo estadístico apropiado para explicar más esta relación.

12.2 Características del paciente:

28 Pacientes con insuficiencia cardíaca (HF) estable de origen isquémico (NYHA 1-3) se incluyeron en un estudio aleatorizado con doble enmascaramiento controlado con placebo. Las características del paciente incluyeron además diabetes tipo 2, eventos previos de infarto de miocardio, fibrilación auricular, hipertensión arterial, intervención percutánea y/o cirugía de derivación de arteria coronaria. La fracción expulsada ventricular izquierda estuvo en el intervalo entre 31 % y 56 %.

Los pacientes recibieron tratamiento de fondo para comorbilidades a discreción del médico y estaban en terapia estable para su afección de HF individual. La mayoría de los pacientes recibieron terapia dual/triple (un betabloqueador combinado con un inhibidor de la ECA o un bloqueador del receptor de la angiotensina y un antagonista mineralocorticoide). 2 pacientes con placebo y 2 con Verum tenían un marcapasos biventricular; 3 pacientes con Verum tenían un desfibrilador cardioversor implantado (ICD).

12.3 Resultados preliminares:

Perfil farmacocinético (PK)

El perfil PK de CDR132L en humanos confirmó el perfil de seguridad sin signos de acumulación. Se confirmaron el perfil de PK y la traducibilidad de cerdo a humano. Alto nivel de linealidad de la dosis en $C_{m\acute{a}x}$ y AUG permitieron la proyección de los parámetros PK para otras dosis (por ejemplo, 5 mg/kg). En base a los resultados preliminares del estudio de fase Ib, la dosis inicial para una fase de estudio clínico II se sugiere entre 3 y 10 mg/kg seguido de la dosis de mantenimiento entre aproximadamente 3 y 5 mg/kg.

Acoplamiento a la diana

Los niveles de miR-132 circulantes en los pacientes con Verum disminuyeron significativamente y dependiendo de la dosis y permanecieron bajos con el tiempo (hasta el final del estudio el día 112).

Resultados del ECG

La mayoría de los pacientes con Verum tenían un ECG anormal en la selección. Muchos de ellos mostraron normalización o mejora sustancial dependiente de la dosis (por ejemplo, normalización de las ondas T; estrechamiento del QRS o ausencia de bloqueo de la rama izquierda del haz de His (LBBB) y/o bloqueo de la rama derecha del haz de His (RBBB); normalización de la progresión R) bajo el tratamiento con CDR132L. Ninguno tuvo empeoramiento de los ECG con respecto al valor inicial con el tratamiento con CDR132L. En base a los datos de QT y QTc no se encontró indicio de un potencial proarrítmico.

Parámetros farmacodinámicos (PD)

Se encontró un impacto positivo en la fracción expulsada (EF) en la mayoría de los pacientes tratados. El NT-proBNP como marcador de seguridad cardíaca no se vio afectado negativamente por el tratamiento con CDR132L. Los pacientes del grupo de dosis más alta (10 mg/kg) mostraron una disminución sólida en los niveles de NT-proBNP el día 28 y 122 en comparación con el valor inicial. El tratamiento 2x con CDR132L (dosis 1-10 mg/kg) condujo a una mejora de la EF y/o reducción de los valores de NT-proBNP en > 50 % de todos los pacientes. Se encontró una reducción en el tiempo de relajación isovolumétrica (IVRT), un marcador importante de la relajación ventricular izquierda, en pacientes con EF > 45 %, sugiriendo un beneficio en pacientes con disfunción diastólica.

Marcadores biológicos

Los biomarcadores de fibrosis cardíaca, el propéptido C-terminal de procolágeno de tipo I (PICP) y la galectina-3 (Gal-3) muestran niveles reducidos en pacientes con HF tratados con CDR132L, lo que indica efectos antifibróticos. Además, el biomarcador de fibrosis de la metaloproteinasa de matriz 1 (MMP-1) se correlacionó positivamente con los niveles de miR-132 circulantes y se redujo en pacientes de grupos de dosis más alta (cohortes 3 y 4). Al final del estudio, los niveles de MMP-1 estuvieron por debajo del límite de detección en la cohorte 4.

Seguridad y tolerancia

No se encontraron eventos adversos graves (SAE). No se identificaron efectos patológicos ni señales de seguridad en los parámetros bioquímicos y hematológicos, signos vitales y ECG:

12.4 Conclusión:

Los pacientes con insuficiencia cardíaca humana toleraron bien CDR132L y no mostraron signos de toxicidad en dosis de hasta 10 mg/kg.

Ejemplo 13 - Monitoreo de la terapia con CDR132L mediante cuantificación de miR-132-3p circulante en plasma

El propósito de este estudio fue evaluar los niveles de miR-132-3p en plasma como un biomarcador para el monitoreo de la terapia con CDR132L.

El miR-132-3p circulante se midió en muestras de plasma de un modelo porcino controlado con placebo de insuficiencia cardíaca (HF) inducida por infarto de miocardio (MI) (Figura 21). Los animales se sometieron a MI y se sometieron a diferentes esquemas de tratamiento de CDR132L, que incluyen dos aplicaciones el día 3 y el mes 1 (intracoronaria/intravenosa (ICIV) frente a intravenosa/intravenosa (IVIV)) y tres niveles de dosis de CDR132L (bajo: 1 mg/kg, medio: 5 mg/kg o alto: 10 mg/kg).

El estudio estuvo acompañado de muestreo sanguíneo en serie hasta el mes 2. En muestras de plasma de los niveles de miR-132-3p circulantes al final del estudio se monitorearon mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) mediante el uso de sondas TaqMan para miR-132-3p. Los datos se normalizaron a un microARN sintético (cel-miR-39) añadido durante el procedimiento de extracción de ARN.

El tratamiento con CDR132L condujo a un aumento dependiente de la dosis de la sustancia farmacológica en el órgano diana, el corazón, y una reducción significativa de miR-132-3p funcional en muestras de plasma. La Figura 22 muestra un análisis de correlación de la concentración de CDR132L en tejido cardíaco (región remota de MI de LV) de todos los animales incluidos (IVIV e ICIV) y los niveles de miR-132-3p circulantes normalizados a cel-miR-39. Los datos son animales individuales como medias \pm SEM. Los valores de P se evaluaron mediante la prueba de Mann-Whitney U bilateral no paramétrica (panel izquierdo). La correlación se realizó mediante la correlación de momentos del producto de Pearson y la correlación de orden de rango de Spearman (panel derecho). En consecuencia, el miR-132-3p circulante se correlacionó fuertemente con la concentración de CDR132L en el tejido cardíaco de animales tratados. Estos datos indican que el miR-132-3p circulante es un marcador indicativo de la presencia de CDR132L en el tejido cardíaco.

Además, evaluamos si otros biomarcadores establecidos indican la presencia de CDR132L en el tejido cardíaco. El propéptido natriurético tipo B N-terminal (NT-proBNP) es bien conocido como un marcador de estrés cardíaco, que se correlaciona con la gravedad de la insuficiencia cardíaca. En línea con los niveles de miR-132-3p, la Figura 23 muestra un análisis de correlación de la concentración de CDR132L en tejido cardíaco (región remota de MI de LV) de todos los animales incluidos (IVIV e ICIV) y los niveles plasmáticos de NT-proBNP (propéptido natriurético tipo b N-terminal). Los datos son animales individuales como medias \pm SEM. Los valores de P se evaluaron mediante la prueba de Mann-Whitney U bilateral no paramétrica (panel izquierdo). La correlación se realizó mediante la correlación de momentos del producto de Pearson y la correlación de orden de rango de Spearman (panel derecho). Se observó una reducción de NT-proBNP en el plasma de animales tratados con CDR132L (Figura 23). Sin embargo, la dependencia de la dosis fue menos evidente y la correlación con CDR132L cardíaco fue menos significativa.

Aparte de la relación entre miR-132 circulante en plasma y CDR132L en el corazón, evaluamos si la sustancia farmacológica inhibe eficientemente su microARN diana miR-132-3p. Los niveles funcionales de miR-132-3p se

redujeron significativamente en el tejido cardíaco (región remota de MI de LV) y esta reducción fue más fuerte cuanto mayor fue la dosis.

La Figura 24 muestra un análisis de correlación de los niveles funcionales de miR-132-3p en tejido cardíaco (región remota de MI de LV) de todos los animales incluidos (IVIV e ICIV) y los niveles circulantes de este microARN normalizados a cel-miR-39. Los datos son animales individuales como medias \pm SEM. Los valores de P se evaluaron mediante la prueba de Mann-Whitney U bilateral no paramétrica (panel izquierdo). La correlación se realizó mediante la correlación de momentos del producto de Pearson y la correlación de orden de rango de Spearman (panel derecho). La correlación de miR-132-3p en plasma y cardíaco no reveló una asociación negativa significativa entre ambos parámetros, lo que indica que los niveles plasmáticos de miR-132-3p son indicativos de la actividad de CDR132L en su miR-132-3p diana.

Se ha demostrado que el tratamiento con CDR132L mejora la función cardíaca después del MI. En consecuencia, probamos si esta mejora funcional, el cambio en la fracción expulsada ventricular izquierda (EF) comparado entre el día 3 después del MI y el mes 2 (delta EF), corresponde con el miR-132-3p circulante. Se observó una correlación negativa significativa para ambos parámetros, lo que indica que el nivel de miR-132-3p circulante es indicativo de la mejora de la función cardíaca.

La Figura 25 muestra un análisis de correlación de delta EF (mejora de EF desde el día 3 hasta el mes 2) de todos los animales incluidos (IVIV e ICIV) y los niveles circulantes de este microARN normalizados a cel-miR-39. Los datos son animales individuales como medias \pm SEM. Los valores de P se evaluaron mediante la prueba de Mann-Whitney U bilateral no paramétrica (panel izquierdo). La correlación se realizó mediante la correlación de momentos del producto de Pearson y la correlación de orden de rango de Spearman (panel derecho).

La asociación negativa fue tan fuerte como la correlación entre la mejora funcional y el marcador de estrés cardíaco NT-proBNP.

La Figura 26 muestra un análisis de correlación de los niveles plasmáticos de NT-proBNP de todos los animales incluidos (IVIV e ICIV) y delta EF (mejora de EF desde el día 3 hasta el mes 2). Los datos son animales individuales como medias \pm SEM. Los valores de P se evaluaron mediante la prueba de Mann-Whitney U bilateral no paramétrica (panel izquierdo). La correlación se realizó mediante la correlación de momentos del producto de Pearson y la correlación de orden de rango de Spearman (panel derecho).

Además, un bajo nivel de NT-proBNP circulante corresponde con un bajo nivel de miR-132-3p circulante de manera lineal.

La Figura 27 muestra un análisis de correlación de los niveles plasmáticos de NT-proBNP de todos los animales incluidos (IVIV e ICIV) y los niveles de miR-132-3p circulantes normalizados a cel-miR-39. Los datos son animales individuales como medias \pm SEM. Los valores de P se evaluaron mediante la prueba de Mann-Whitney U bilateral no paramétrica (panel izquierdo). La correlación se realizó mediante la correlación de momentos del producto de Pearson y la correlación de orden de rango de Spearman (panel derecho).

Ejemplo 14 – CDR132L en insuficiencia cardíaca subaguda

14.1 Objetivo del estudio: Evaluación de la eficacia de CDR132L en un modelo porcino de insuficiencia cardíaca (HF) subaguda pos-MI

14.2 Esquema del estudio:

- Modelo de HF después de infarto de miocardio con seguimiento de 56 días en 135 animales
- Cerdos domésticos con aumento de peso lento (“raza mangalica”)
- Control de placebo y 3 grupos de dosis
1, 5, 10 mg/kg b.s. tratados dos veces, en los días 3 y 28 (Figura 28).
- Comparación de aplicaciones intracoronaria/intravenosa (IC/IV) e intravenosa/intravenosa (IV/IV).

- Animales considerados para el análisis de datos: 79 animales.

14.3 Resultados:

Cambio en la fracción expulsada Delta EF (EF día 56 – EF día 3)

NB: Criterios de inclusión, EF el día 3 < 40 %

Se encontraron cambios significativos en la EF desde el día 3 hasta el día 56 (delta EF) pos-MI en los grupos de IV/IV y IC/IV de dosis media y alta, lo que indica una mejora funcional (Figura 29).

5 Correlación de NT-proBNP circulante y delta EF (día 56 – día 3)

El aumento relacionado con HF de NT-proBNP pos-MI se invirtió en los grupos de dosis media y alta el día 56. Un nivel bajo de concentración circulante de NT-proBNP corresponde con una mejora de la función cardíaca indicada por el aumento de la delta EF. El NT-proBNP sirve como un biomarcador potencial para el inicio de acoplamiento a la diana (ver Ejemplo 13).

Fibrosis (%) al final del estudio (día 56) en la región remota de MI de LV

NB: Criterios de inclusión, EF el día 3 < 40 %

Se encontraron cambios significativos en el desarrollo de la fibrosis en el grupo de dosis media y alta que contribuyeron a la mejora funcional (Figura 30).

Respuesta terapéutica (día 56)

NB: Criterios de inclusión, EF el día 3 < 40 %

Un análisis de respuesta desveló una respuesta dependiente de la dosis en la mejora del EF. El 85,7 % del grupo de dosis alta de IVIV mostró una delta EF de >7 % mientras que solo el 4,6 % de todos los animales de placebo mostraron una recuperación de >7 % (Figura 31).

14.4 Conclusiones:

La CDR132L mejora eficazmente la función cardíaca, en base a las mediciones de la MRI cardíaca de referencia en un modelo de animales grandes clínicamente relevante y aceptado de HF pos-MI. Se observó una relación de dosis lineal para la mejora de la función cardíaca. El grupo de dosis alta de IVIV mostró un aumento del 10,38 % en la EF el día 56 en comparación con el día 3 (corregido con placebo). La eficacia demostrada de CDR132L tiene una alta relevancia clínica (para la comparación, la trasplante de células cardíacas aumenta en el mejor de los casos en un 3 - 4 % de EF).

Ejemplo 15 – CDR132L para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica

15.1 Objetivo del estudio: Evaluación de la eficacia de CDR132L en un modelo porcino de insuficiencia cardíaca (HF) crónica pos-MI

15.2 Esquema del estudio:

Validación de la eficacia de CDR132L en un modelo porcino de insuficiencia cardíaca (HF) crónica pos-MI

- Modelo crónico de HF pos-MI con seguimiento de 6 meses (Figura 32)
- Cerdos domésticos con aumento de peso lento (“raza de mangalica”)
- Tres grupos de tratamiento:

5x mensual placebo
5x mensual CDR132L
3x mensual CDR132L

- Dosis: 5 mg/kg
- Vía de administración: IV
- Animales considerados para el análisis de datos: 29 animales.

15.3. Resultados:

Fracción expulsada (EF)

NB: Criterios de inclusión, EF en el mes 1 < 40 %

Se encontraron cambios significativos de EF >7 % de mes 1 a mes 6 pos-MI en todos los grupos de tratamiento en comparación con el placebo (Figura 33).

Análisis de respuesta

NB: Criterios de inclusión, EF en el mes 1 < 40 %

Se observó una fuerte correlación entre la cantidad de tratamiento y la mejora del EF (delta EF M6-M1) (Figura 33). El 87,5 % del grupo de tratamiento 5x mostró una delta EF de > 7 % mientras que solo 2 de 11 animales de control mostraron una recuperación de > 3 %.

Niveles de CDR132L y miR-132-3p después de 6 meses

NB: Criterios de inclusión, EF el día del mes 1 < 40 %

Se observó una distribución del tejido cardíaco de CDR132L dependiente de la dosis (región remota de MI de LV). La concentración tisular de CDR132L corresponde a un nivel funcional bajo de miR-132-3p (Figura 34).

Volumen telesistólico del ventrículo izquierdo (LVESV)

El tratamiento con CDR132L mostró un efecto beneficioso sobre el remodelado ventricular izquierdo adverso y atenuó significativamente el aumento pos-MI del LVESV durante un período de seguimiento de 6 meses en ambos grupos de tratamiento en comparación con el placebo.

Aurícula izquierda (LA)

El tratamiento con CDR132L redujo el remodelado crónico atrial posterior a la MI según se evaluó mediante imágenes. El volumen de LA y el índice de LA (volumen de LA normalizado al área de superficie corporal) se redujeron significativamente en ambos grupos de tratamiento en comparación con el placebo.

Función sistólica y contractilidad

La función sistólica y la contractilidad mejoraron significativamente con el tratamiento con CDR132L en el corazón con insuficiencia pos-MI, evaluado mediante medición hemodinámica invasiva al final del estudio de 6 meses. El análisis de los parámetros independientes de la carga reveló una mejora dependiente del tratamiento de CDR132L de la contractilidad miocárdica (relación presión-volumen telesistólico y trabajo sistólico de precarga reclutable) que se tradujo claramente en una mejor función sistólica general.

Función diastólica

El tratamiento con CDR132L mejoró significativamente la función diastólica. El parámetro diastólico global (velocidad mínima de cambio de presión en el ventrículo) y el parámetro EDPVR independiente de la carga (relación presión-volumen telediastólico), un marcador sensible de la rigidez y la capacitancia cardíacas, mejoraron ambos con el tratamiento con CDR132L.

15.4 Conclusiones:

CDR132L mejora fuertemente la función cardíaca en un modelo porcino de insuficiencia cardíaca crónica. Un aumento del 7,14 % en EF se demostró en el mes 6 en animales que recibieron cinco tratamientos mensuales con CDR132L (corregido con placebo). El 87,5 % de los animales respondieron al tratamiento con una mejora de más del 7 % en EF. No se observaron eventos adversos relacionados con la terapia ni cambios en la hematología o la química de laboratorio. La eficacia demostrada de CDR132L es clínicamente muy relevante como opción de tratamiento en la insuficiencia cardíaca crónica.

Además, los tratamientos con CDR132L administrados mensualmente mejoran eficazmente el remodelado, función sistólica (por ejemplo, contractilidad cardíaca) y función diastólica (por ejemplo, relajación cardíaca) en un modelo de insuficiencia cardíaca crónica pos-MI.

Ejemplo 16 - Estudio farmacocinético

Para evaluar además el potencial terapéutico de CDR132L, diseñamos un estudio farmacocinético (PK) de animales grandes para evaluar la exposición y distribución en tejidos en el tejido diana de nuestro compuesto en cerdos. La administración intravenosa (IV) es una vía de aplicación clínicamente preferida, sin embargo, muchos enfoques de terapia novedosos dependen de una vía de administración alternativa, tal como la perfusión intracoronaria (IC), como suele ser el caso de los estudios de terapia génica cardíaca. Encontramos exposición tisular dependiente de la dosis en las muestras de tejido cardíaco comparable tanto para la administración IV como IC de CDR132L (Fig. 36 a,b). La actividad de CDR132L se confirmó mediante la reducción dependiente de la dosis recíproca del nivel de miR-132 diana en comparación con los animales de control no tratados. Hubo una fuerte correlación inversa entre la concentración de anti-miR-132 cardíaco y los niveles funcionales de miR-132 (Figura 36 c) independientemente de la vía de administración. La vida media del compuesto en el tejido cardíaco se calculó en aproximadamente 3 semanas

(Figura 36 d) y para el plasma se encontró una eliminación bifásica del compuesto con una fase alfa rápida y una fase beta larga (Figura 36 e).

Referencias

- 5 1. Barry, S.P.; Townsend, P.A. (2010). What causes a broken heart-Molecular insights into heart failure. *Int Rev Cell Mol Biol* 284, 113-179.
2. Datta, S.R.; Brunet, A.; Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13, 2905-2927.
- 10 3. DeBosch, B.J.; Muslin, A.J. (2008). Insulin signaling pathways and cardiac growth. *J Mol Cell Cardiol.* 44, 855-864.
4. Frescas, D.; Valenti, L.; Accili, D. (2005). Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt1-dependent deacetylation promotes expression of gluco-genetic genes. *J Biol Chem.* 280, 20589-20595.
5. Glas, D.J. (2010). PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 346, 267-278.
6. Gottlieb, R.A.; Gustafsson, A.B. (2011). Mitochondrial turnover in the heart. *Biochim Biophys Acta.* 1813, 1295-1301.
7. Hill JA, Olson (2008). Cardiac plasticity. *N Engl J Med.* 358(13):1370-1380.
8. Hinkel, R.; Klett, K.; S. Straub, A. Howe, S. Baktai, R. Kozlik-Feldmann; T. Thum; y C. Kupatt. (2002). P5384LNA-based miR132 inhibition is cardioprotective in a pig model of percutaneous transverse aortic constriction (pTAC). *Cardiovascular cell bio* p. 1139.
- 20 9. Kolk, M.V.; Meyberg, D.; DenseT.; Tang-Quam, K. R.; Robbins R.C.; Reichenspurner, H.; Schrepfer. S (2009), *J. Vis Exp.* 32, pii: 1438. doi: 103791/1438.
10. McMullen, J.R.; Shioi, T.; Huang, W.Y.; Zhang, L.; Tarnavski, O.; Bisping, E.; Schinke, M.; Kong, S.; Sherwood, M.C.; Brown, J. y otros (2004). The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase (p110alpha) pathway. *J Biol Chem.* 279, 4782-4793.
- 25 11. Ni, Y.G.; Berenji, K.; Wang, N.; Oh, M.; Sachan, N.; Dey, A.; Cheng, J.; Lu, G.; Morris, D.J.; Castrillon, D.H. y otros (2006). Foxo transcription factors blunt cardiac hypertrophy by inhibiting calcineurin signaling. *Circulation.* 114, 1159-1168.
- 30 12. Ronnebaum, S.M.; Patterson, C. (2010). The foxO family in cardiac function and dysfunction. *Annu Rev Physiol.* 72, 81-94.
13. Skurk, C.; Izumiya, Y.; Maatz, H.; Razeghi, P.; Shiojima, I.; Sandri, M.; Sato, K.; Zeng, L.; Schiekofer, S.; Pimentel, D. y otros (2005). The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling. *J Biol Chem.* 280, 20814-23.
- 35 14. Ucar, A. y otros (2012), The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. *Nat. Commun.* 3: 1078. doi: 10,1038/ncomms2009.
15. Grech, E.D. & Ramsdale, D.R. (2003), Acute coronary syndrome: unstable angina and non-ST segment elevation myocardial infarction. *BMJ.* 326: 1259-61.
- 40 16. Ponikowski, P. y otros (2016), *Eur. Heart J.* 37: 2129-2200.

45

50

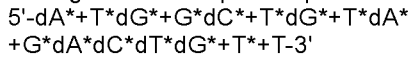
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que comprende la secuencia de fórmula III:



en donde dA es 2'desoxiadenosina, dG es 2'desoxiguanosina, dC es 2'desoxicitidina y T es timidina, en donde +T es un bloque estructural LNA-T y +G es un bloque estructural LNA-G y en donde * es un enlace fosforotioato,

para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno cardíaco en un sujeto humano, en donde el trastorno cardíaco se selecciona de (i) insuficiencia cardíaca aguda o subaguda, (ii) insuficiencia cardíaca crónica y/o crónica en empeoramiento, (iii) insuficiencia cardíaca estable, (iv) un estado menos avanzado de insuficiencia cardíaca o de un estado avanzado de insuficiencia cardíaca, (v) insuficiencia cardíaca de etapa I y/o II de NYHA, de etapa I, II y/o III de NYHA o de etapa III y/o IV de NYHA, y (vi) insuficiencia cardíaca derecha.

2. El oligonucleótido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto humano padece insuficiencia cardíaca y tiene una bomba implantada, opcionalmente un dispositivo de asistencia ventricular izquierda.

3. El oligonucleótido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el oligonucleótido se administrará como tal o en donde el oligonucleótido se administrará conjugado a un resto heterólogo.

4. El oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el oligonucleótido se administrará en combinación con (i) al menos un diurético, (ii) al menos un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, (iii) al menos un betabloqueador, y opcionalmente (iv) un bloqueador del receptor de angiotensina II y (v) opcionalmente un inhibidor del canal If tal como ivabradina y opcionalmente (vi) un inhibidor de neprilisina-receptor de angiotensina, y opcionalmente (vii) un inhibidor del cotransportador de glucosa 2 tal como empagliflozina y dapagliflozina, y opcionalmente (viii) agentes terapéuticos de células madre, y opcionalmente (ix) anti-miARN dirigidos a diferentes vías, y/u opcionalmente (x) un inhibidor de SGLT-2.

5. El oligonucleótido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto humano padece de insuficiencia cardíaca estable de origen isquémico.

6. El oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el oligonucleótido se administrará a un sujeto humano en una dosis de aproximadamente 0,1 - 100 mg/kg de peso corporal por aplicación, particularmente en una cantidad de aproximadamente 3 - 10 mg/kg de peso corporal por aplicación, particularmente en donde el oligonucleótido se administrará por vía parenteral, opcionalmente por inyección o infusión, particularmente por inyección intravenosa o subcutánea, o en donde el oligonucleótido se administrará por vía tópica.

7. El oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el oligonucleótido se administrará a un sujeto humano en un régimen, seleccionado de:

- Administración diaria
- Administración cada segundo día,
- Administración cada tercer día, y
- Administración cada cuarto día,

en donde el oligonucleótido se administrará por vía parenteral, particularmente por inyección intravenosa o subcutánea,

(i) en donde el oligonucleótido se administra en una dosis dependiente del peso corporal, particularmente en una dosis de 0,01 mg/kg de peso corporal a 50 mg/kg de peso corporal, en una dosis de 0,02 mg/kg de peso corporal a 10 mg/kg de peso corporal o en una dosis de 0,05 mg/kg de peso corporal a 5 mg/kg de peso corporal por aplicación; o

(ii) en donde el oligonucleótido se administra en una dosis fija, particularmente en una dosis fija de 1 mg a 5000 mg, en una dosis fija de 2 mg a 1000 mg, o en una dosis fija de 5 mg a 500 mg por aplicación.

8. El oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el oligonucleótido se administrará a un sujeto humano en un régimen, seleccionado de:

- Administración semanal,
- Administración cada segunda semana,
- Administración cada tercera semana,
- Administración cada cuarta semana o cada mes,
- Administración cada sexta semana,
- Administración cada segundo mes,
- Administración cada tercer mes,

- Administración cada sexto mes, y
- Administración una vez al año,

en donde el oligonucleótido se administrará por vía parenteral, particularmente por inyección intravenosa o subcutánea,

- (i) en donde el oligonucleótido se administrará en una dosis dependiente del peso corporal, particularmente en una dosis de 0,01 mg/kg de peso corporal a 50 mg/kg de peso corporal, en una dosis de 0,05 mg/kg de peso corporal a 20 mg/kg de peso corporal, en una dosis de 0,1 mg/kg de peso corporal a 10 mg/kg de peso corporal o en una dosis de 3 mg/kg de peso corporal a 10 mg/kg de peso corporal por aplicación; o
- (ii) en donde el oligonucleótido se administrará en una dosis fija, particularmente en una dosis fija de 1 mg a 5000 mg, en una dosis fija de 5 mg a 2000 mg o en una dosis fija de 10 mg a 1000 mg por aplicación.

9. El oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 u 8, en donde el oligonucleótido se administrará en una dosis inicial, opcionalmente 1 o 2 dosis iniciales, y subsecuentemente en al menos una dosis de mantenimiento, que es diferente de la dosis inicial.

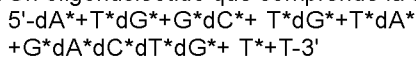
10. El oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, 8 o 9, en donde el oligonucleótido se administrará mediante un régimen basado en la demanda, que comprende particularmente las etapas:

- (i) medir la cantidad de miR-132 en una muestra de fluido corporal, opcionalmente en una muestra de sangre total, suero o plasma u orina, de un sujeto que se trata con el oligonucleótido,
- (ii) administrar el oligonucleótido en una dosis y/o intervalo de tiempo entre dosis individuales según se determina de acuerdo con la cantidad medida de miR-132 en la etapa (i), particularmente en donde se administra una nueva dosis del oligonucleótido si se encuentra que la cantidad de miR-132 en la muestra de fluido corporal está por encima de un valor predeterminado.

11. El oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 u 8-10, que comprende determinar la cantidad y/o actividad de un marcador, particularmente un marcador cardíaco y/o uno fibrótico, antes, durante y/o después de la administración del oligonucleótido, particularmente en donde el marcador se selecciona de BNP, opcionalmente NT-proBNP, ANP, isoformas de cadena pesada de miosina, opcionalmente la relación MYH7/6, FoxO3 SERCA2, un marcador de deposición de colágeno y/o fibrótico tal como colágeno 1A1, colágeno 1A2, colágeno 3A1, propéptido C-terminal de procolágeno de tipo I (PICP), y/o galectina-3 (Gal-3), y/o una metaloproteínasa de matriz tal como la metaloproteínasa de matriz 1 (MMP-1) y/o la metaloproteínasa de matriz 2 (MMP-2), y más particularmente en donde el marcador se selecciona de NT-proBNP, propéptido C-terminal de procolágeno de tipo I (PICP) y/o galectina-3 (Gal-3), y/o metaloproteínasa de matriz 1 (MMP-1).

12. El oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende determinar un parámetro de ECG durante el ciclo de terapia particularmente seleccionado de la medición del QRS, ondas T, bloqueo de la rama izquierda del haz de His (LBBB) y/o bloqueo de la rama derecha del haz de His (RBBB); y/o progresión R, antes, durante y/o después de la administración del oligonucleótido.

13. Un oligonucleótido que comprende la secuencia de fórmula III:



en donde dA es 2'desoxiadenosina, dG es 2'desoxiguanosina, dC es 2'desoxicitidina y T es timidina, en donde +T es un bloque estructural LNA-T y +G es un bloque estructural LNA-G y en donde * es un enlace fosforotioato, para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno fibrótico, en donde el oligonucleótido se administrará en una dosis inicial, opcionalmente 1 o 2 iniciales, y subsecuentemente en al menos una dosis de mantenimiento, que es diferente de la dosis inicial.

14. Un oligonucleótido para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el trastorno fibrótico es fibrosis cardíaca, fibrosis hepática o fibrosis pulmonar.

15. Un método para monitorear la eficacia de la prevención o el tratamiento con un oligonucleótido para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el método comprende determinar los niveles de miR-132 circulante en una muestra seleccionada de sangre, plasma, suero o fracciones de estos de un sujeto al que se ha administrado el oligonucleótido, en donde la determinación se lleva a cabo una o varias veces durante el ciclo de terapia, en donde una reducción de miR-132 después de la administración del oligonucleótido es un indicio de tratamiento exitoso.

16. El método de la reivindicación 15, en donde en base al resultado de la determinación, se lleva a cabo al menos una de las siguientes etapas:

- (i) determinar si el sujeto a tratar es un respondedor a la terapia,
- (ii) ajustar la dosis del oligonucleótido a administrar, y
- (iii) ajustar el intervalo de tiempo del oligonucleótido a administrar.

Figura 1

Figura 1A

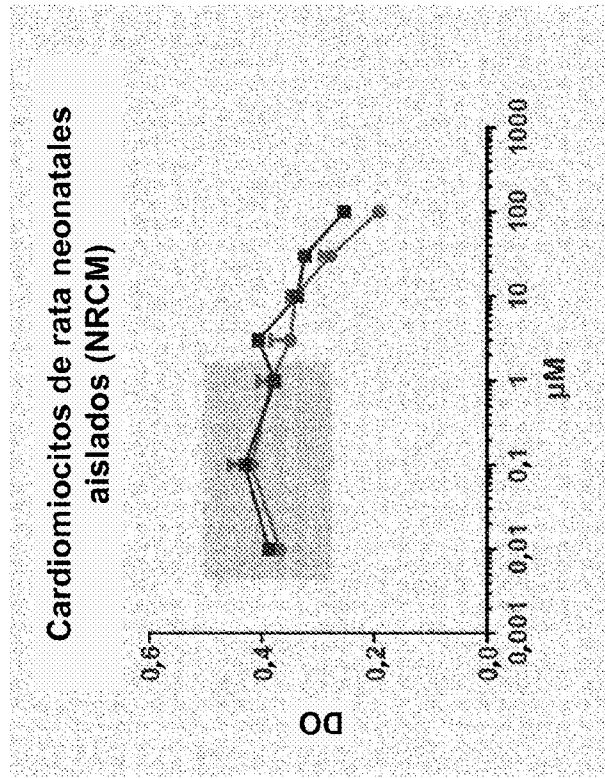
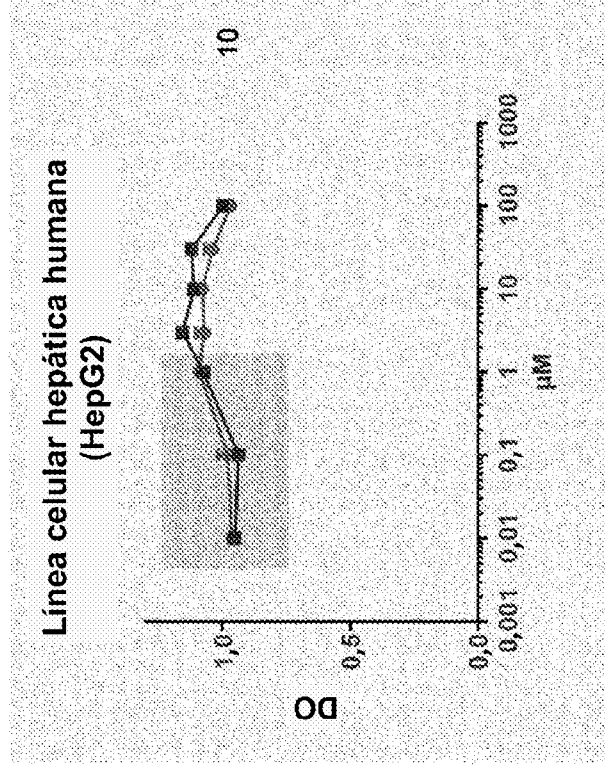


Figura 1B



■ LNA-scr
▨ CDRI32L

Figura 2

Figura 2A

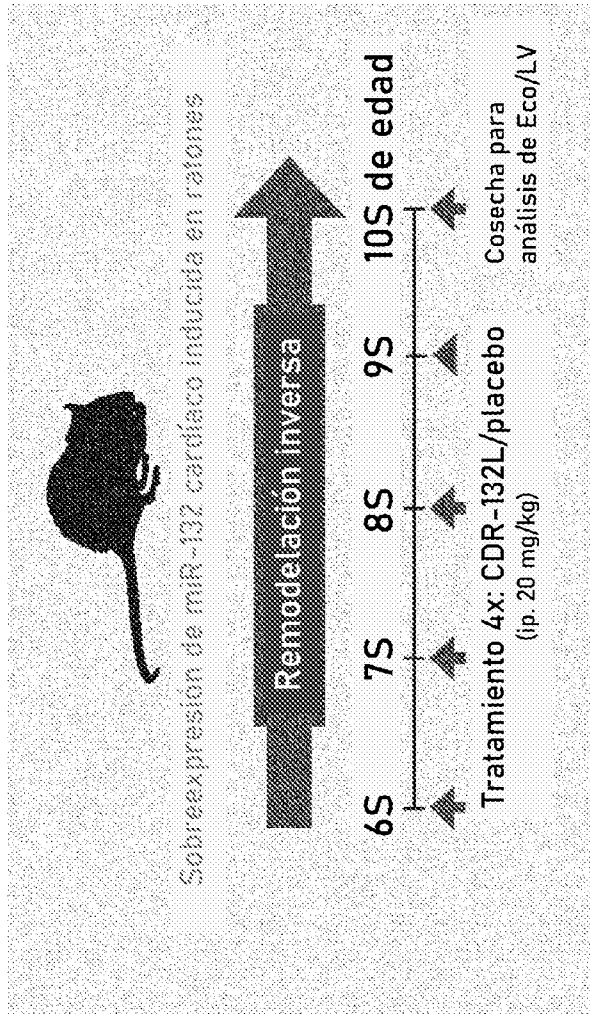


Figura 2B

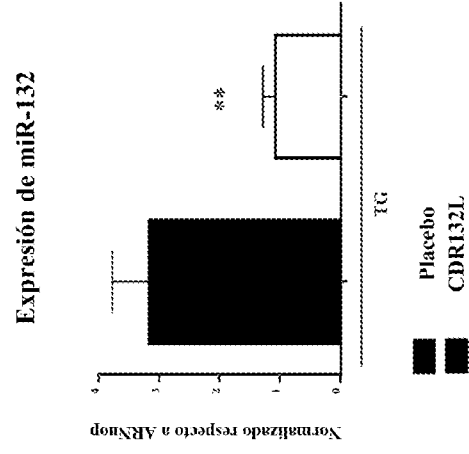


Figura 3

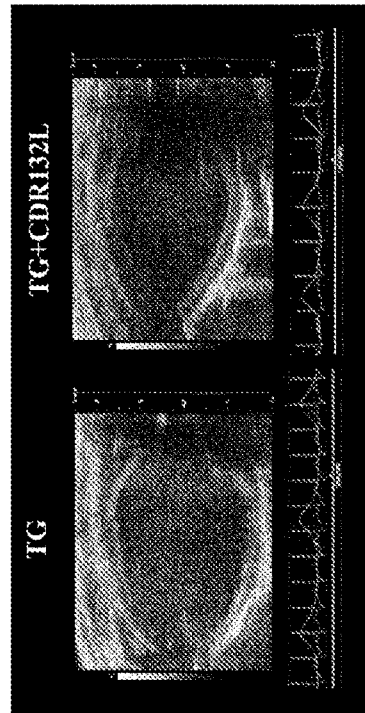
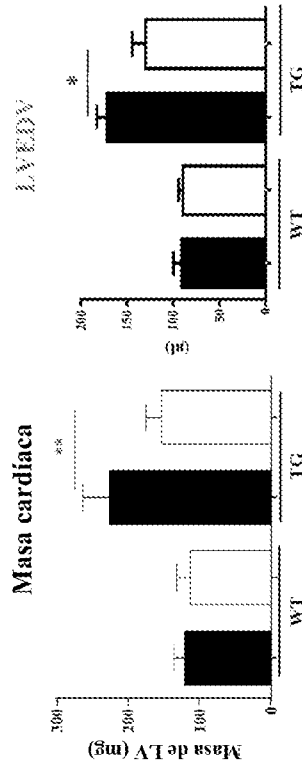


Figura 3A

Figura 3B



■ Placebo
 ■ CDR132L

Figura 3C

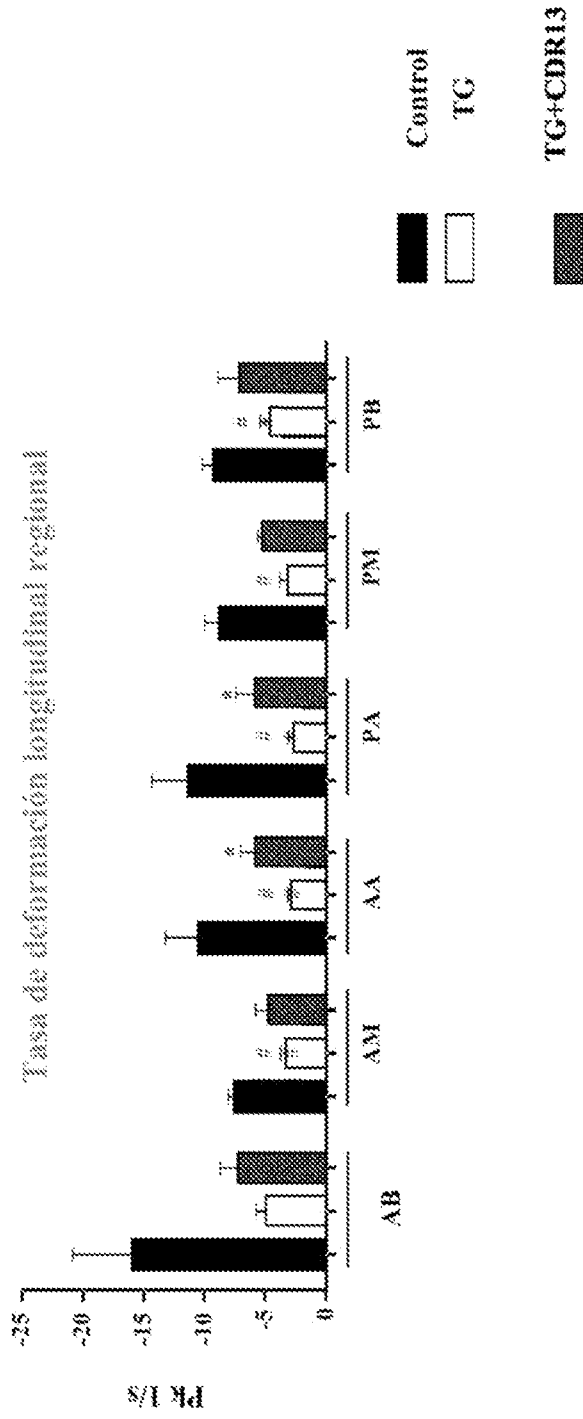


Figura 4

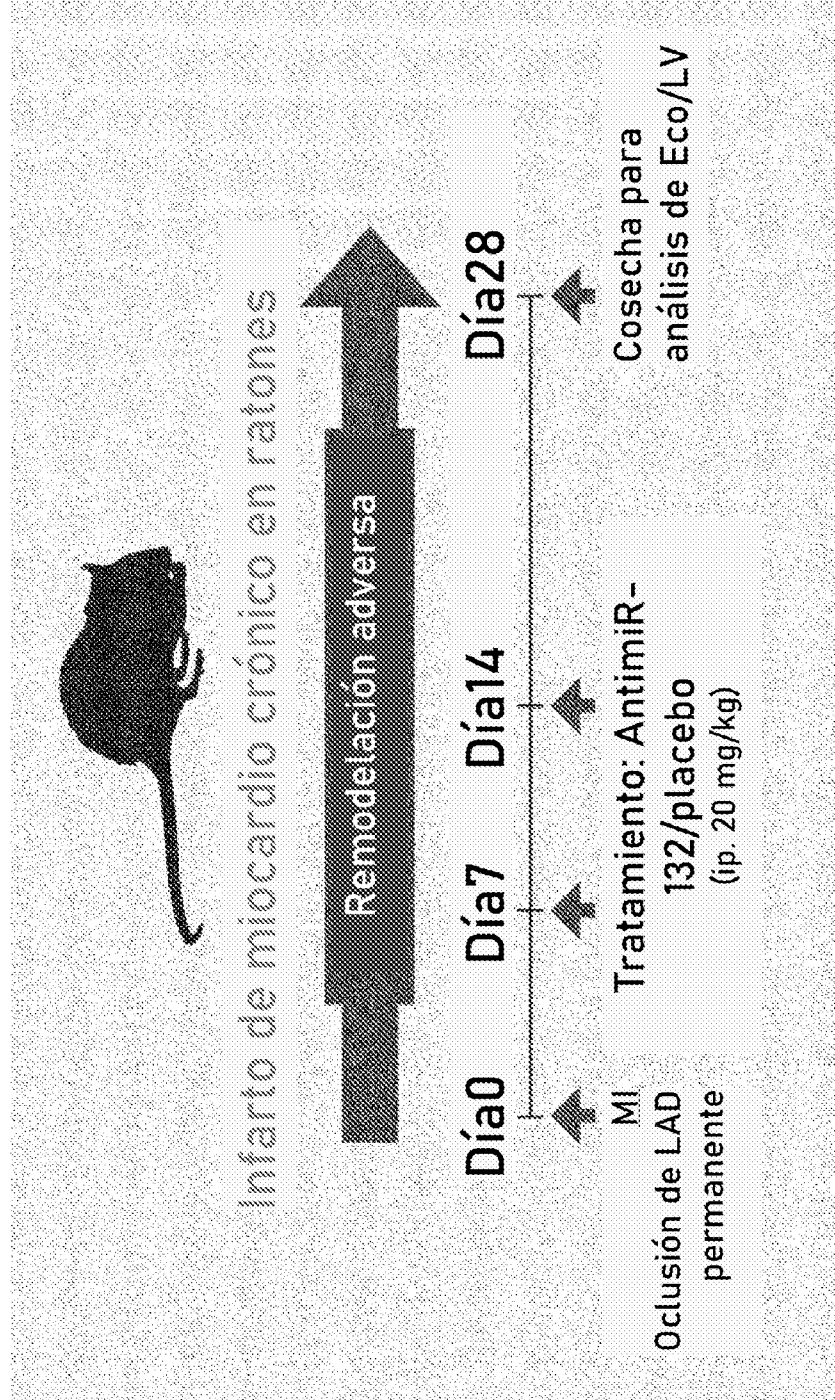


Figura 5

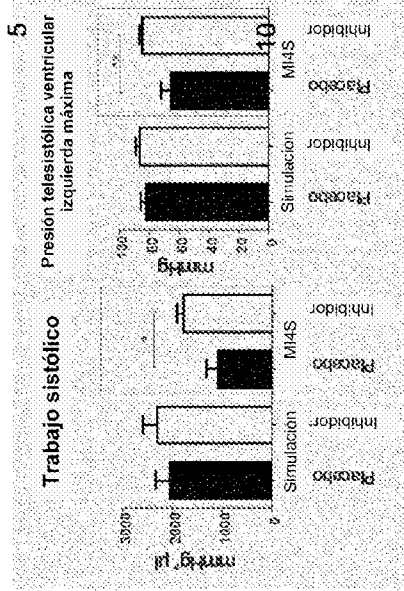


Figura 5B

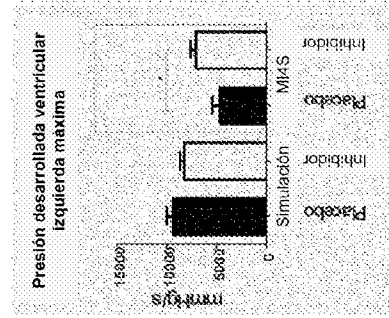


Figura 5A

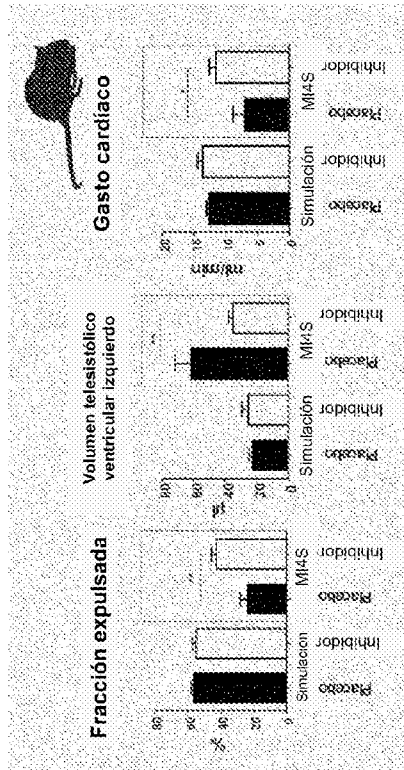


Figura 6

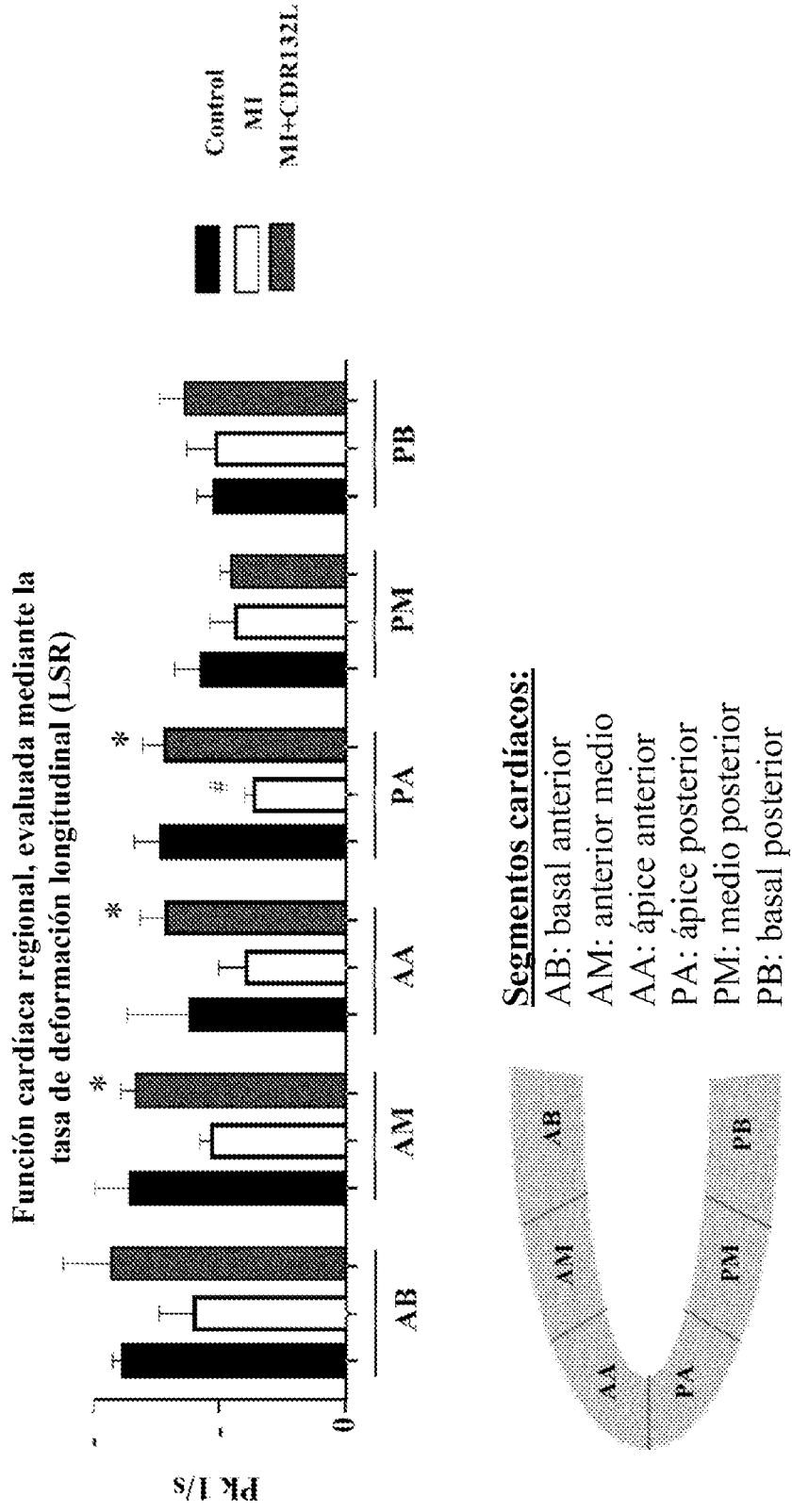


Figura 7

Figura 7A

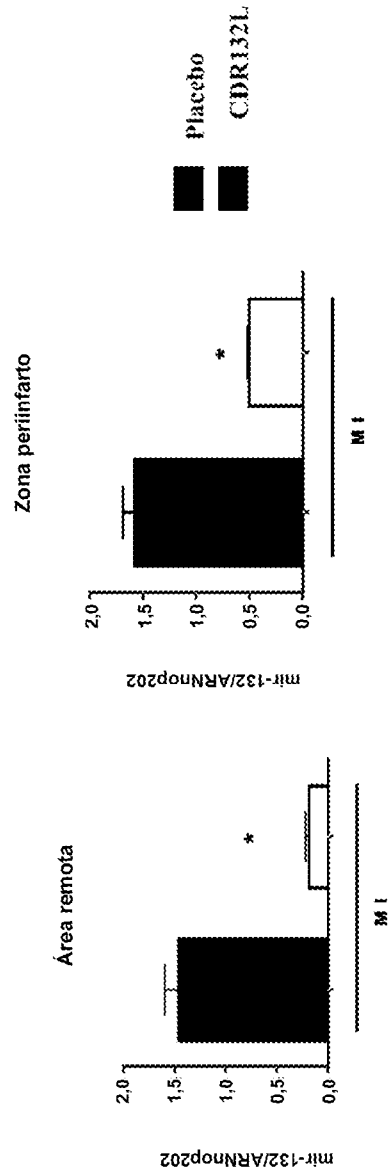


Figura 7B

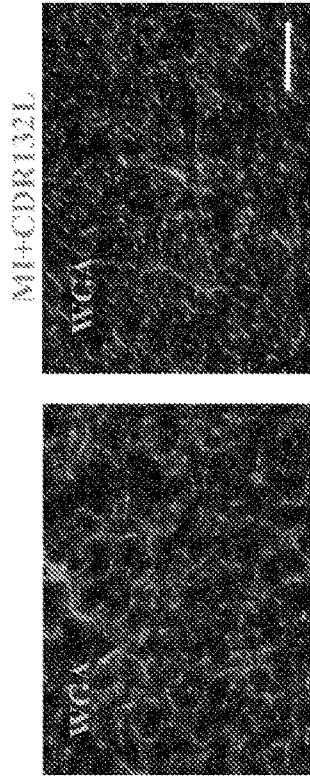


Figura 7C

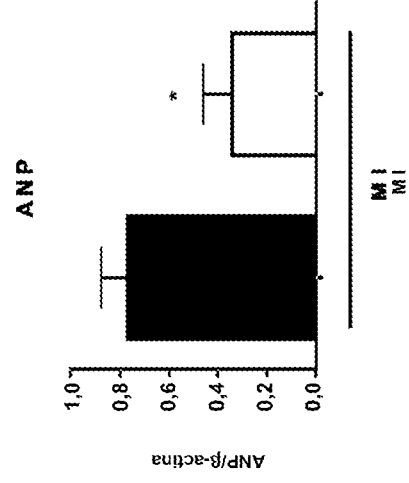


Figura 8

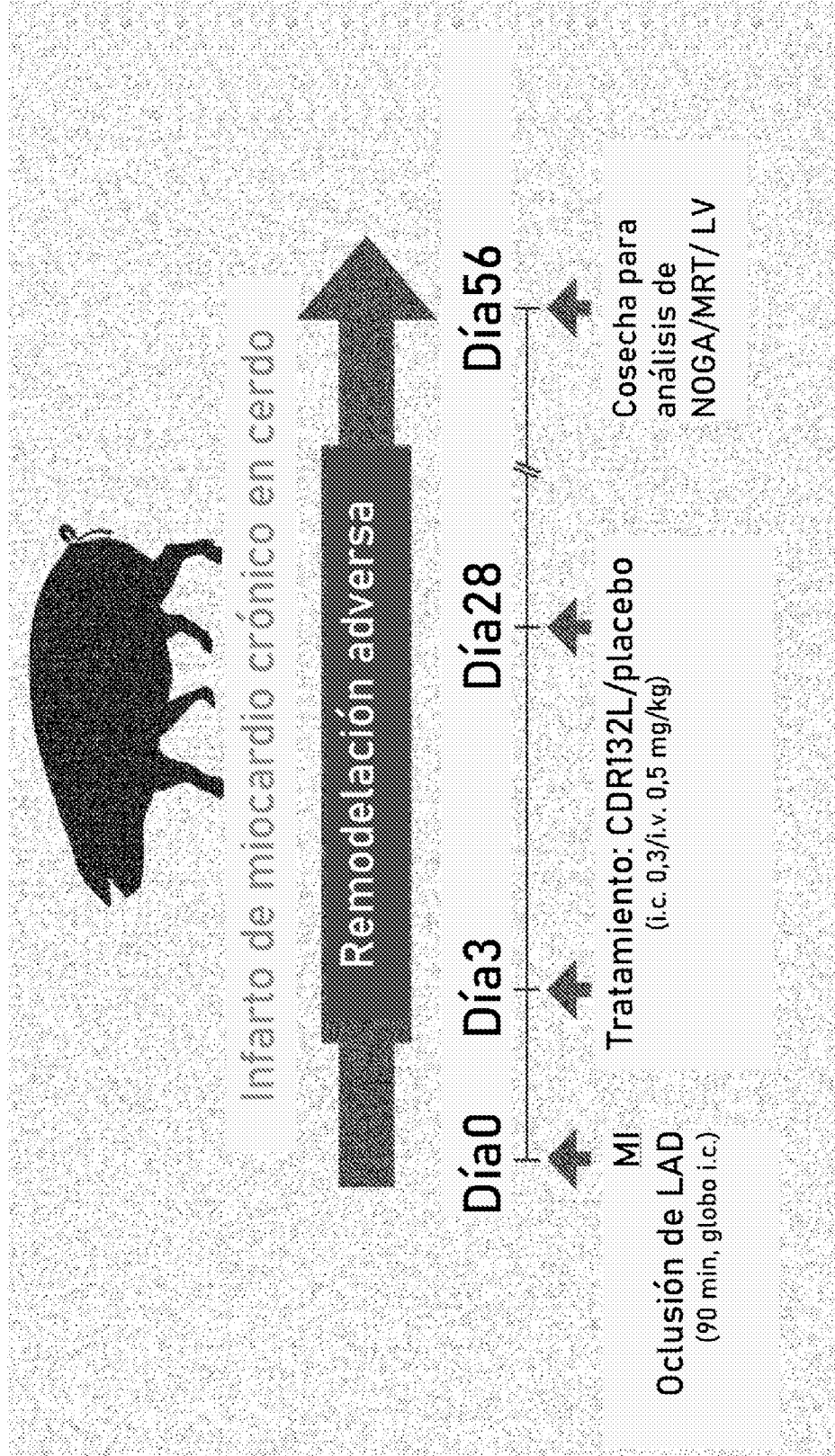


Figura 9

Figura 9A

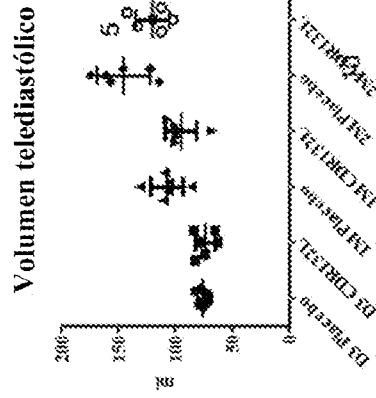


Figura 9C

Figura 9D

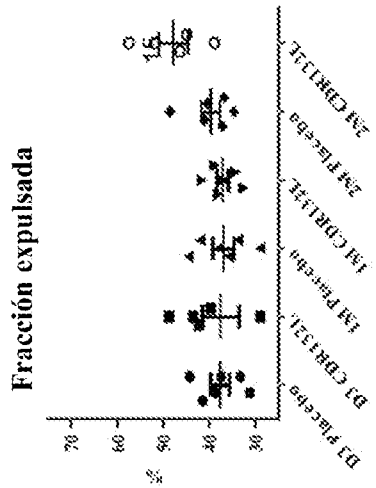


Figura 9B

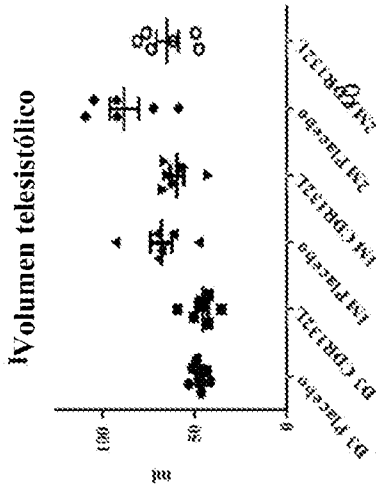


Figura 9E

Masa ventricular izquierda

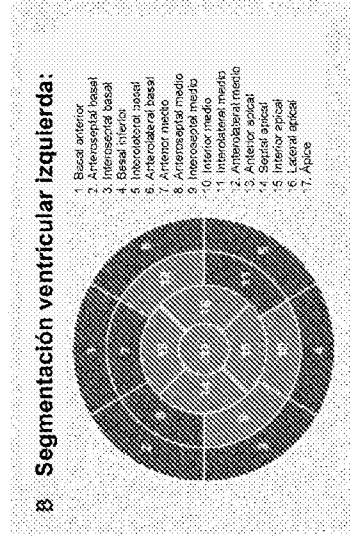
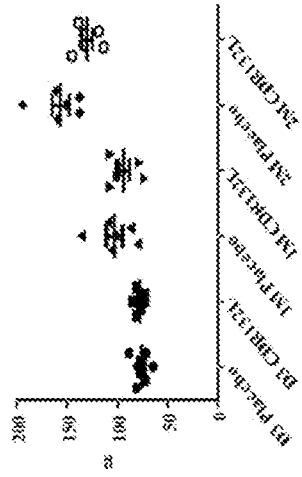
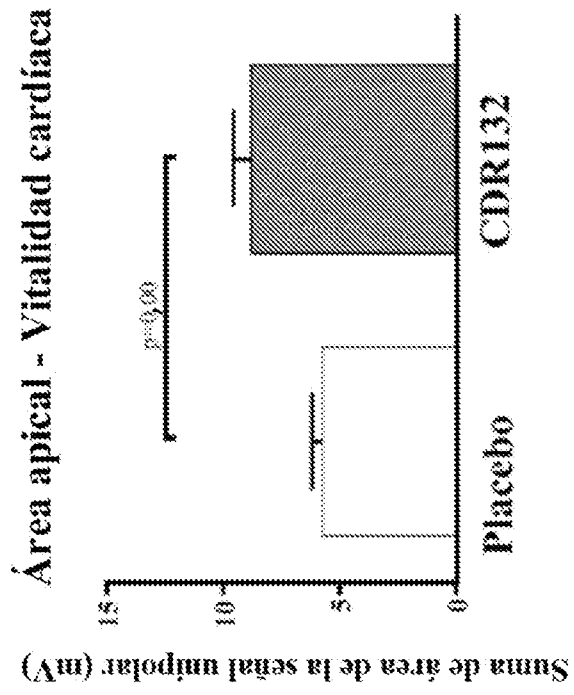
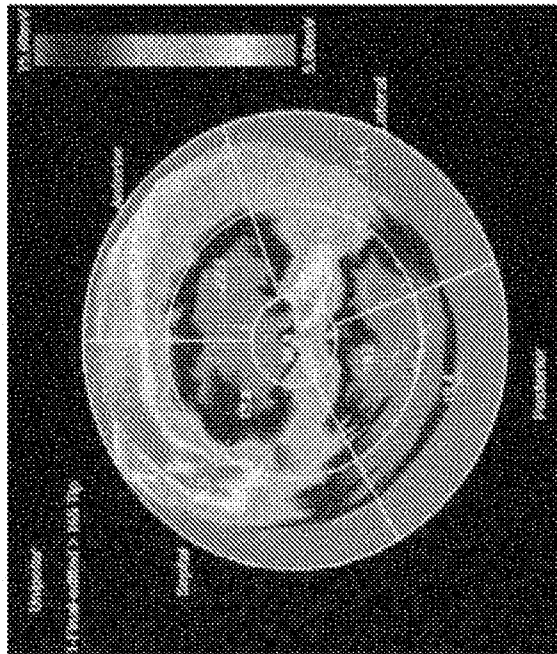


Figura 10



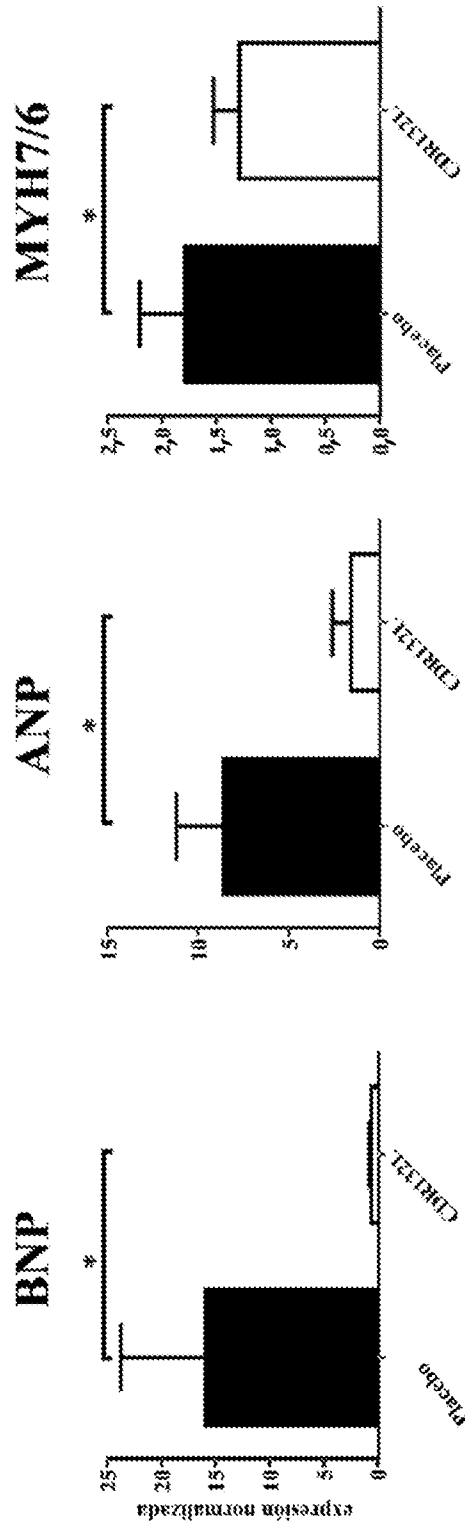
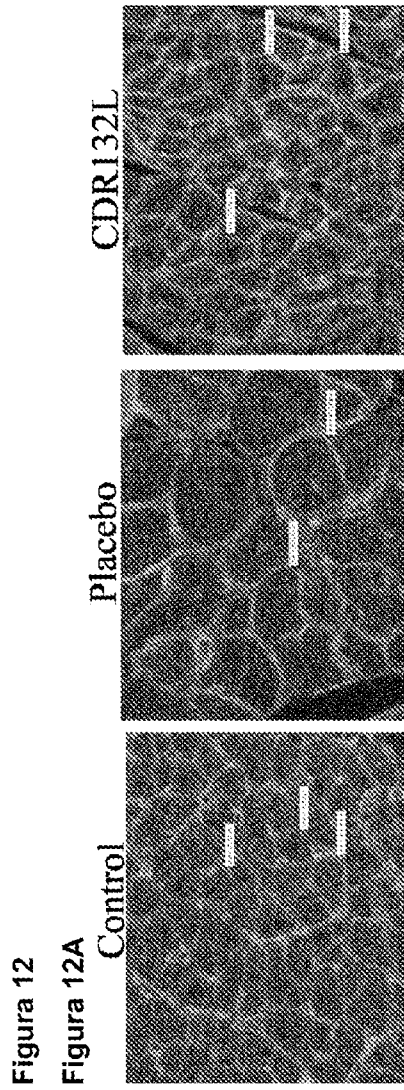


Figura 11



Área de cardiomiocitos

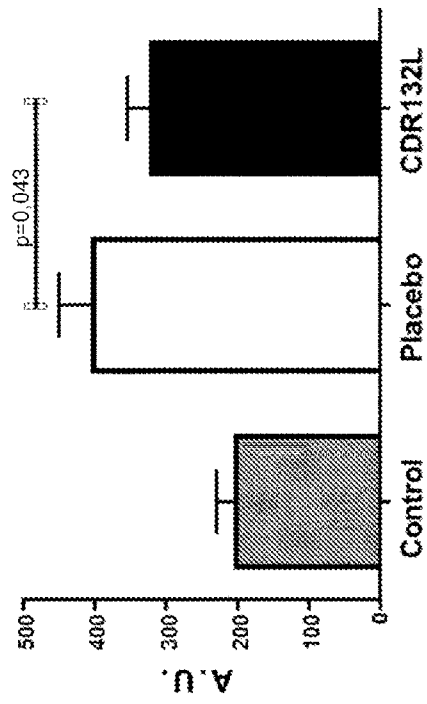


Figura 13

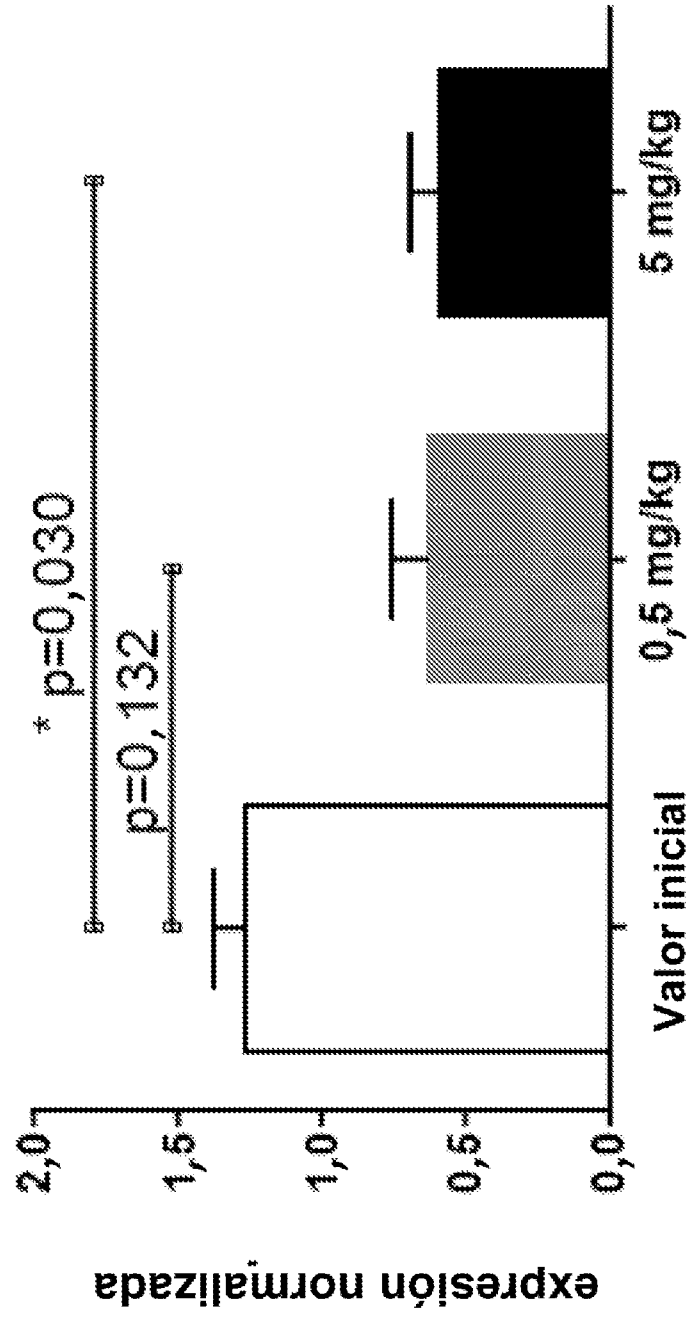


Figura 15

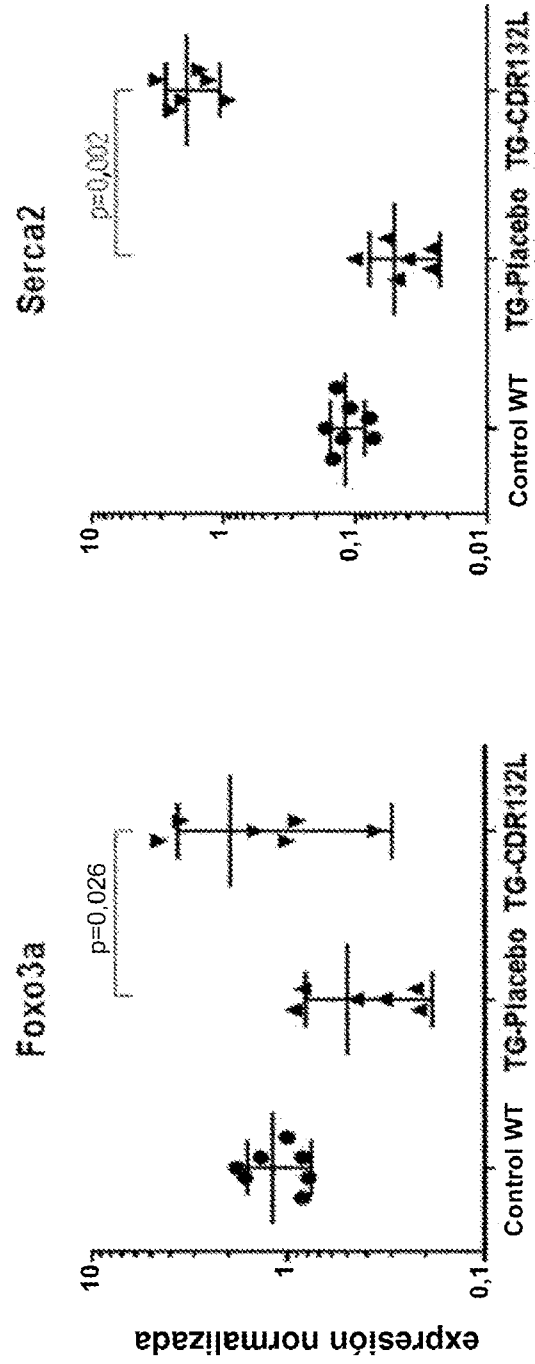


Figura 16

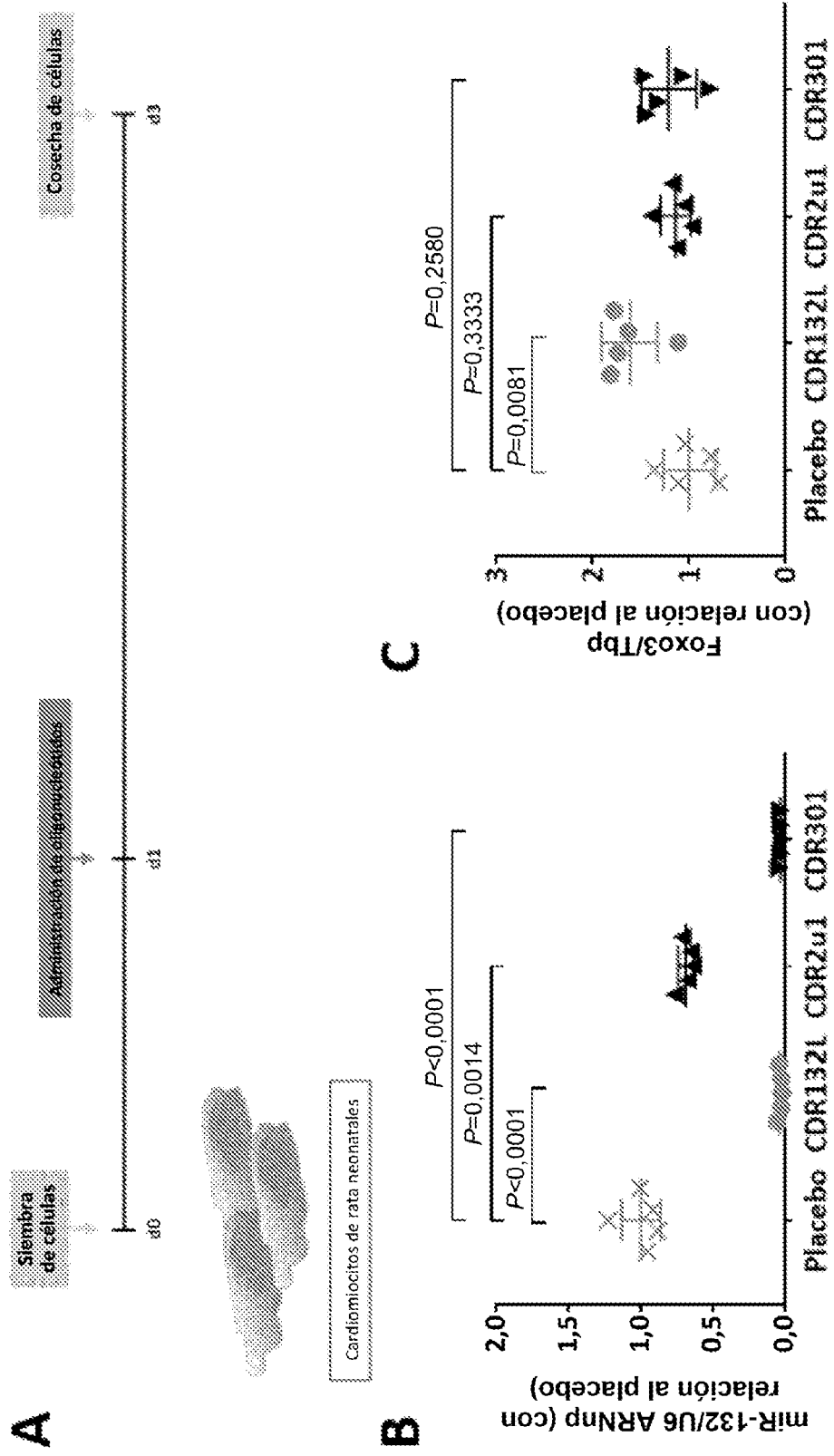


Figura 17

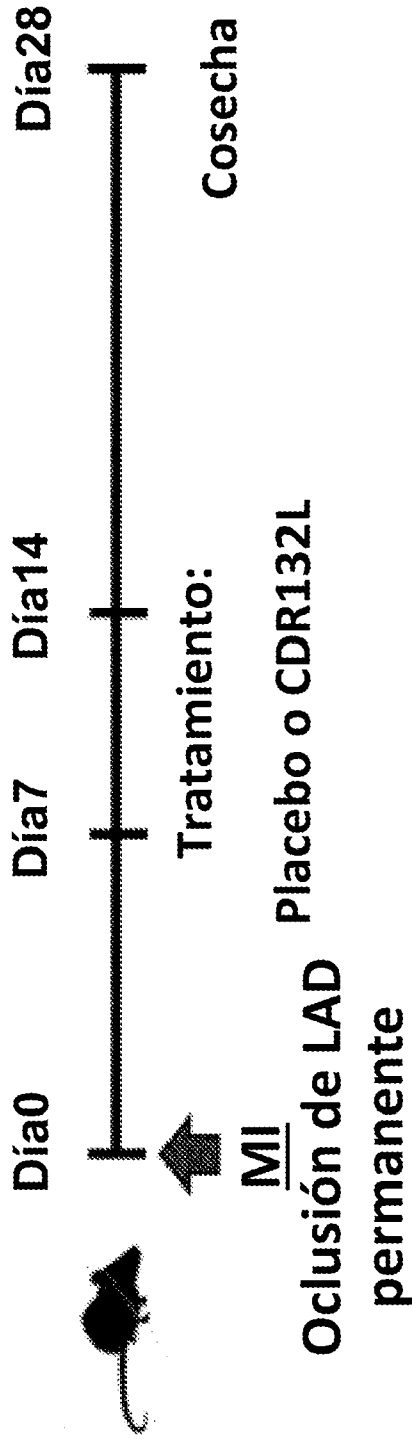


Figura 18

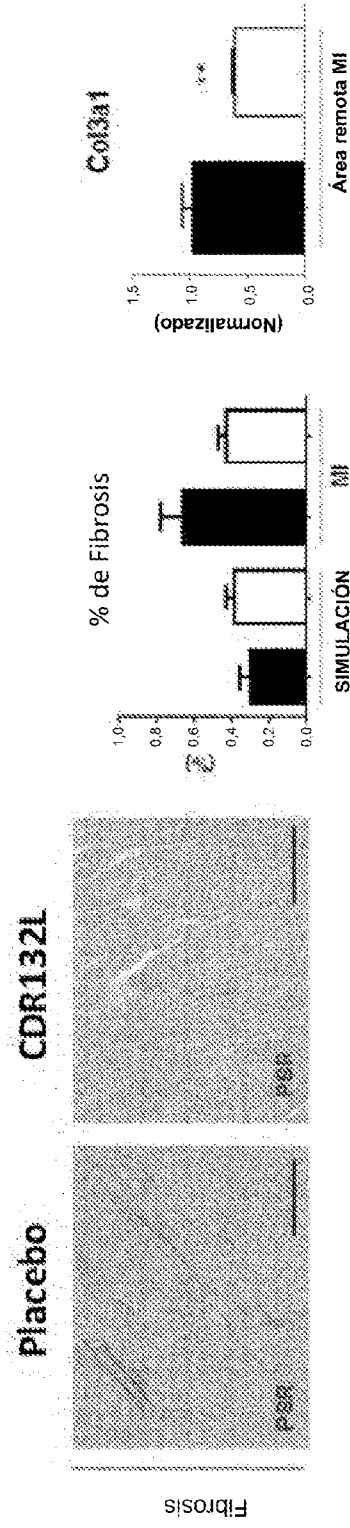


Figura 20

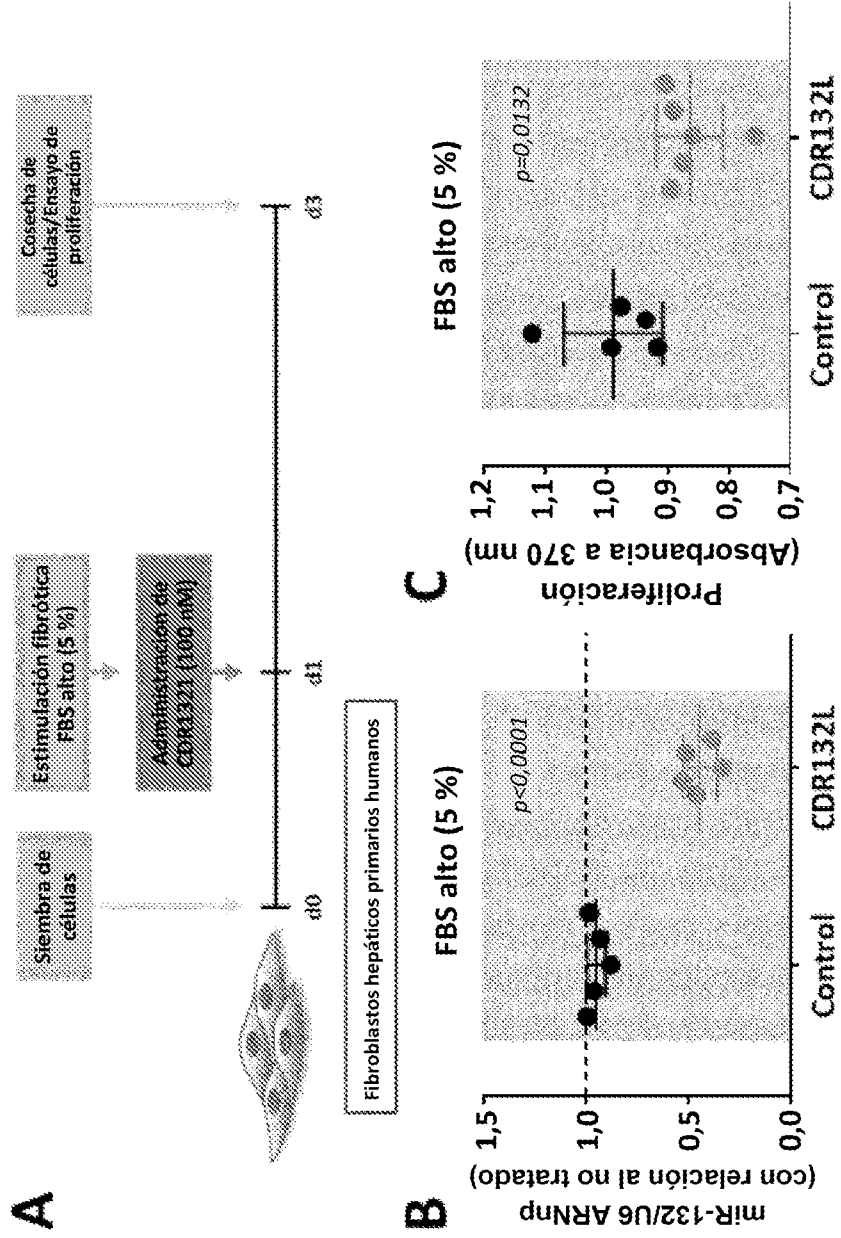


Figura 21

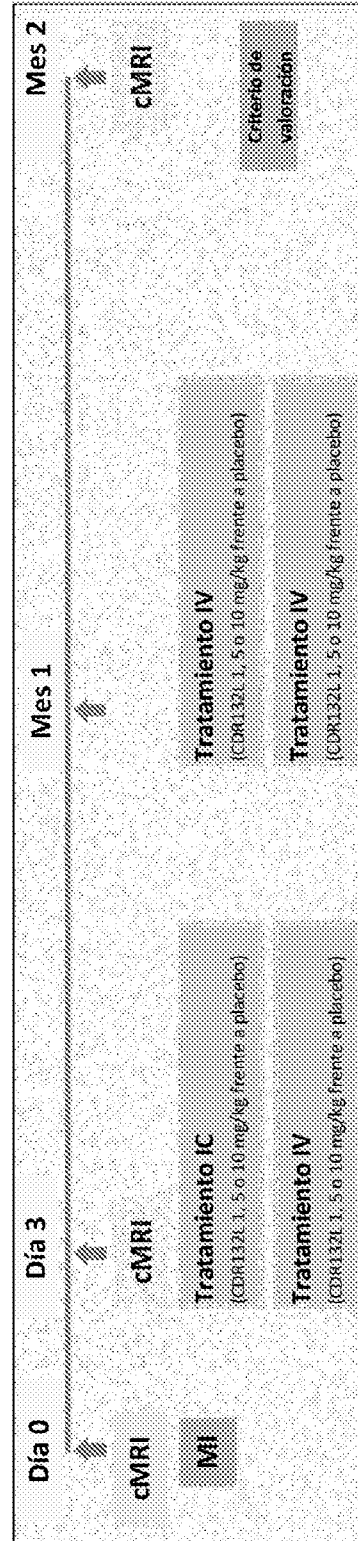


Figura 22

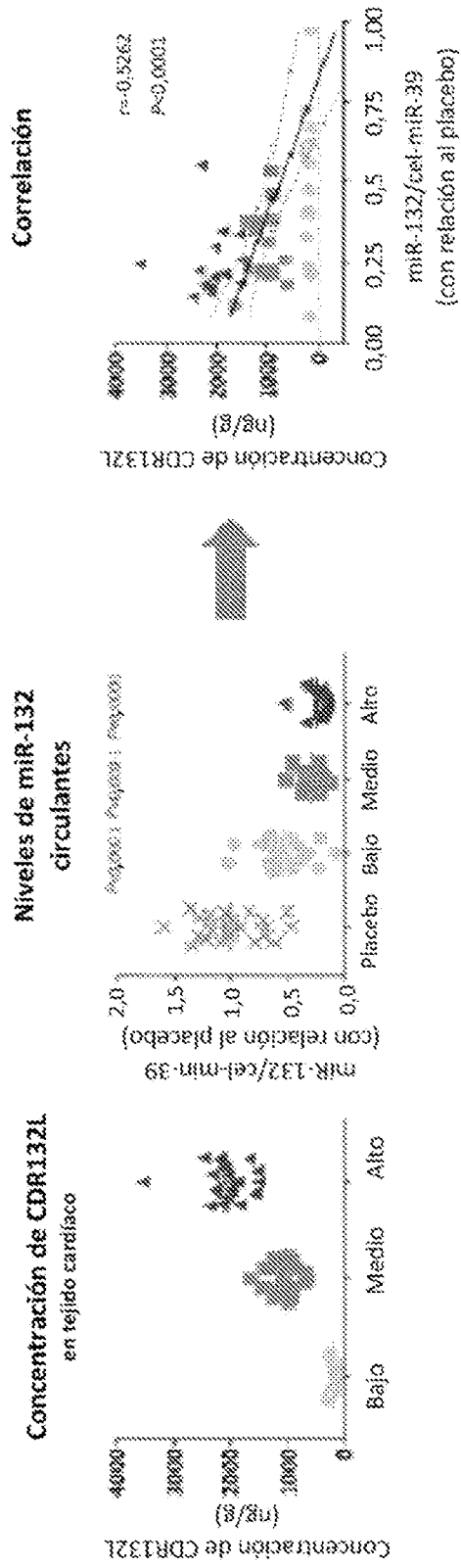


Figura 23

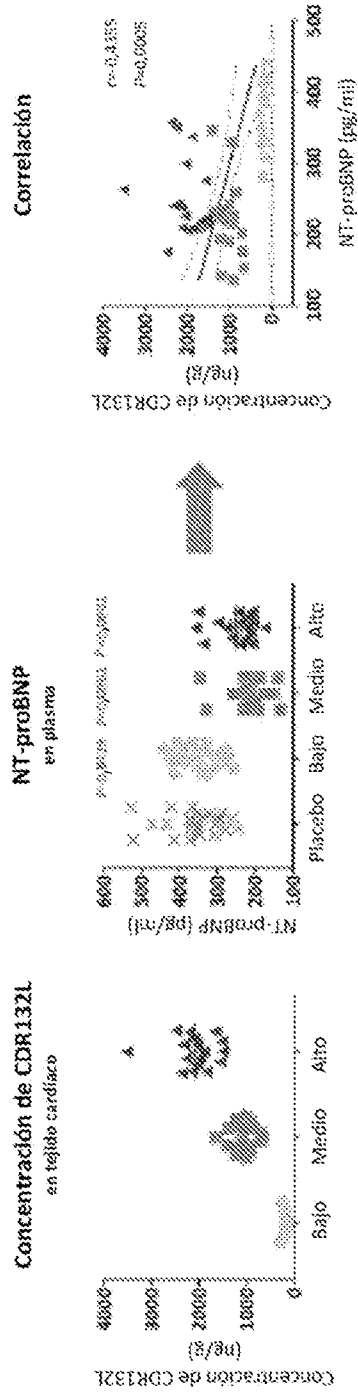


Figura 24

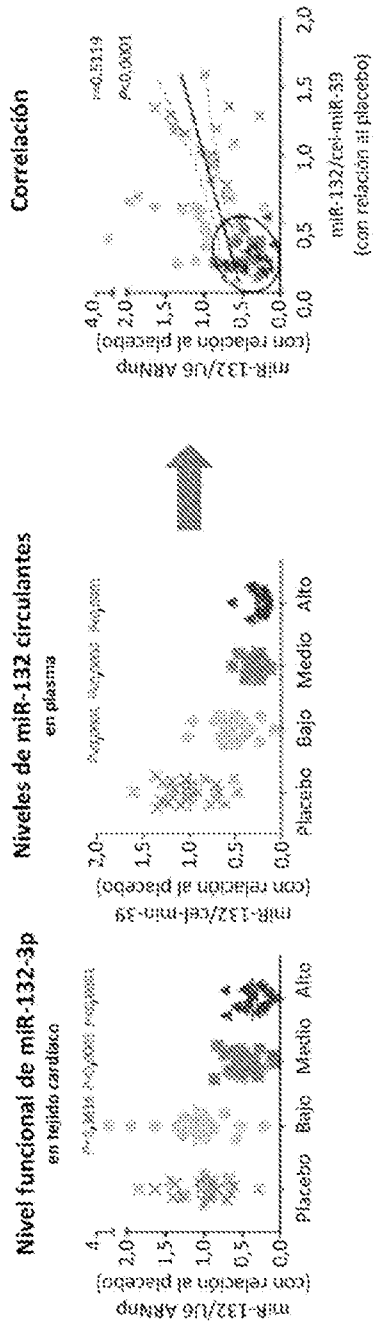


Figura 25

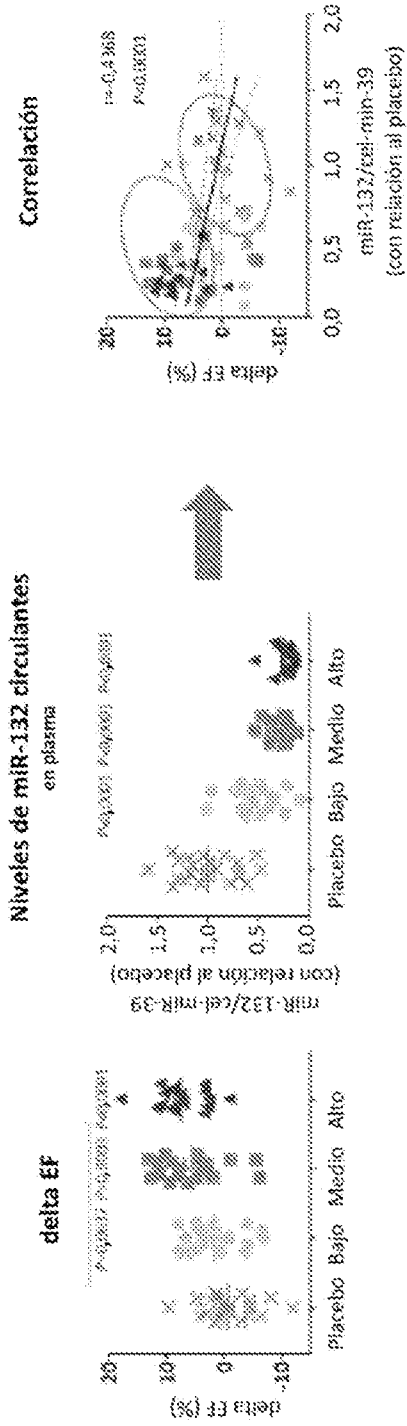


Figura 26

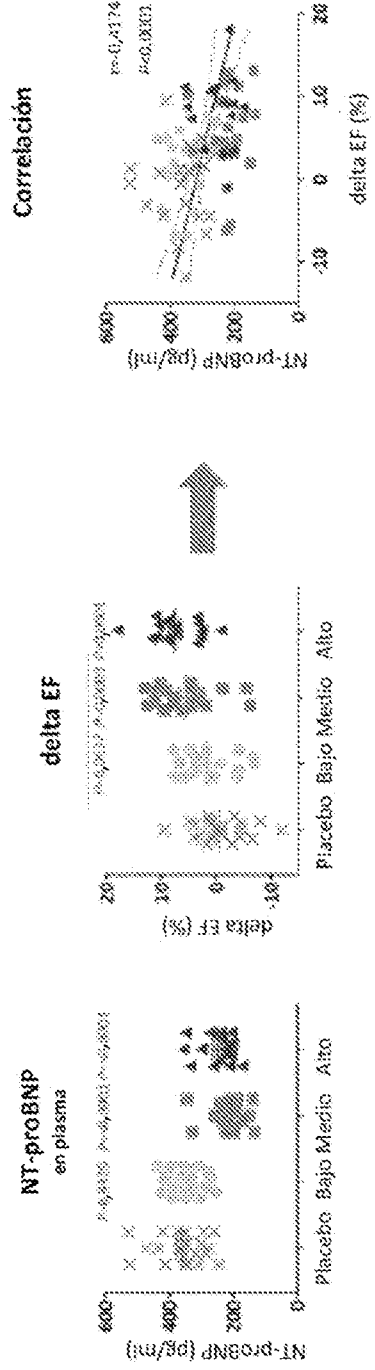


Figura 27

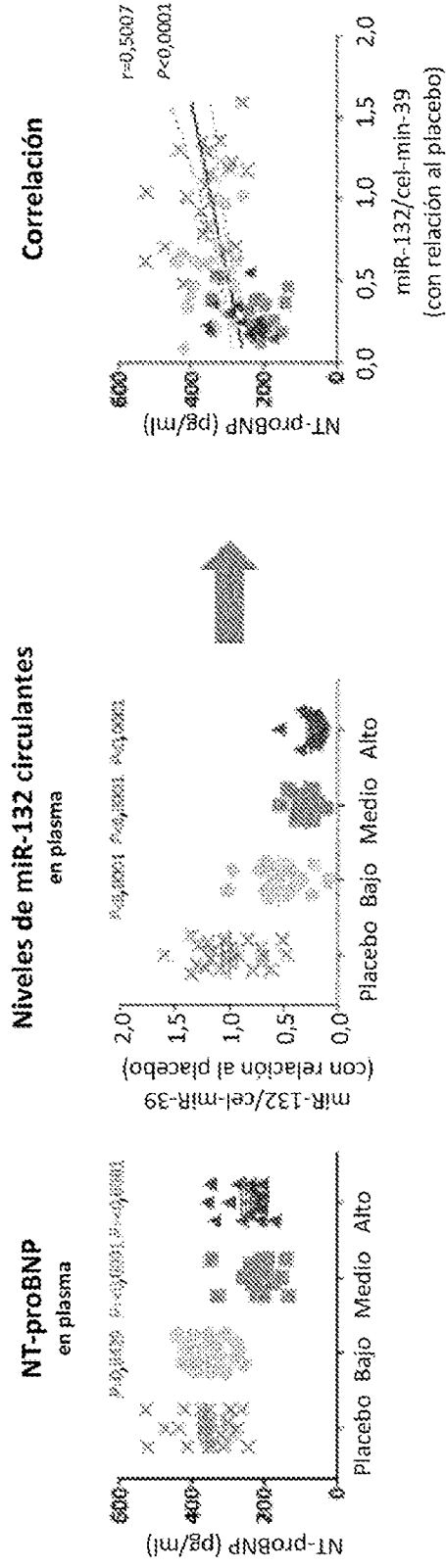


Figura 28

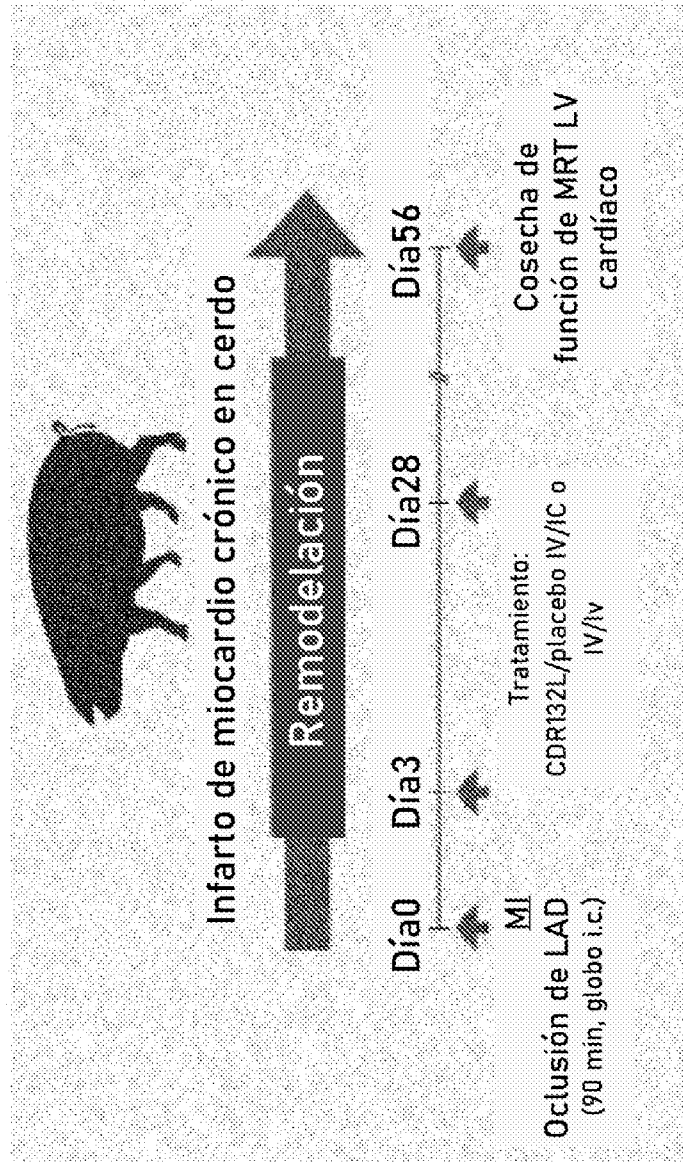


Figura 29

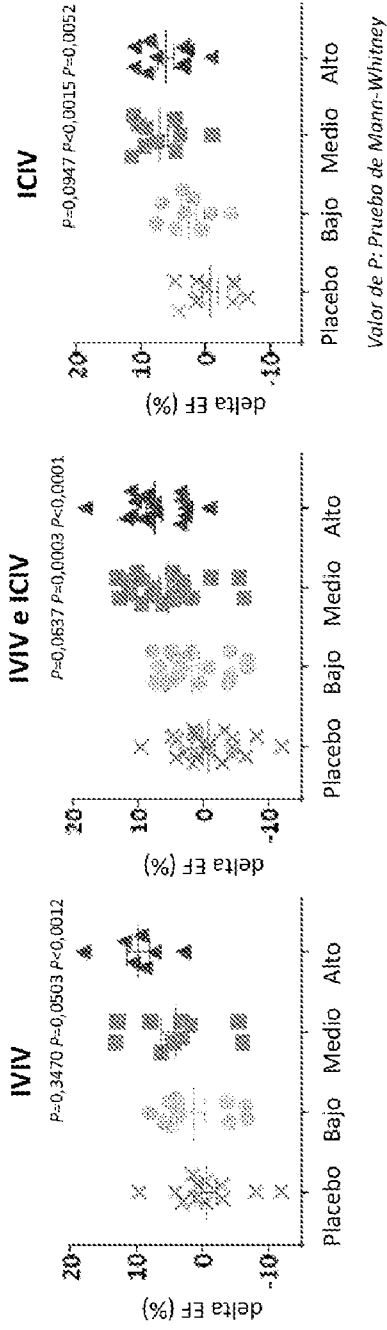


Figura 30

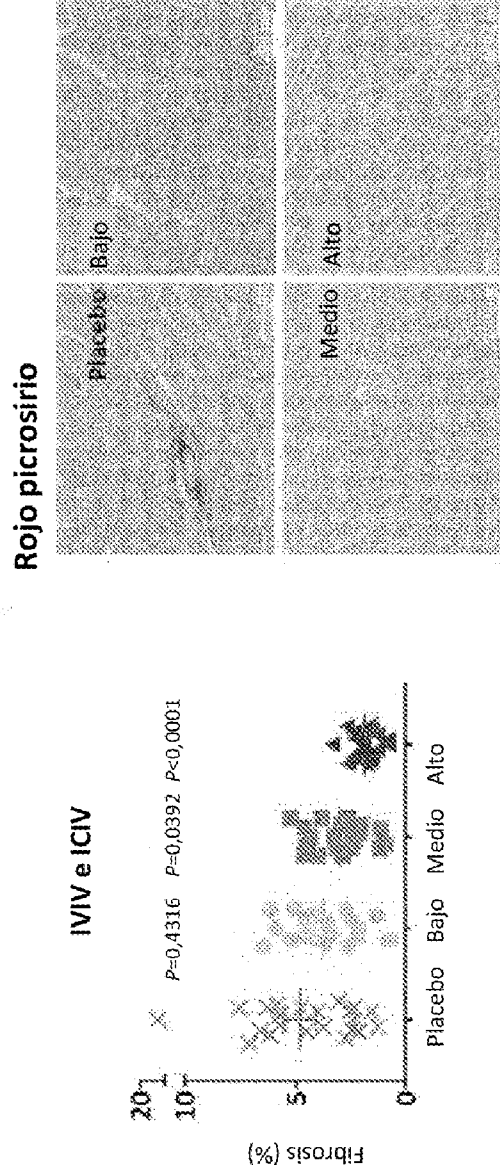


Figura 31

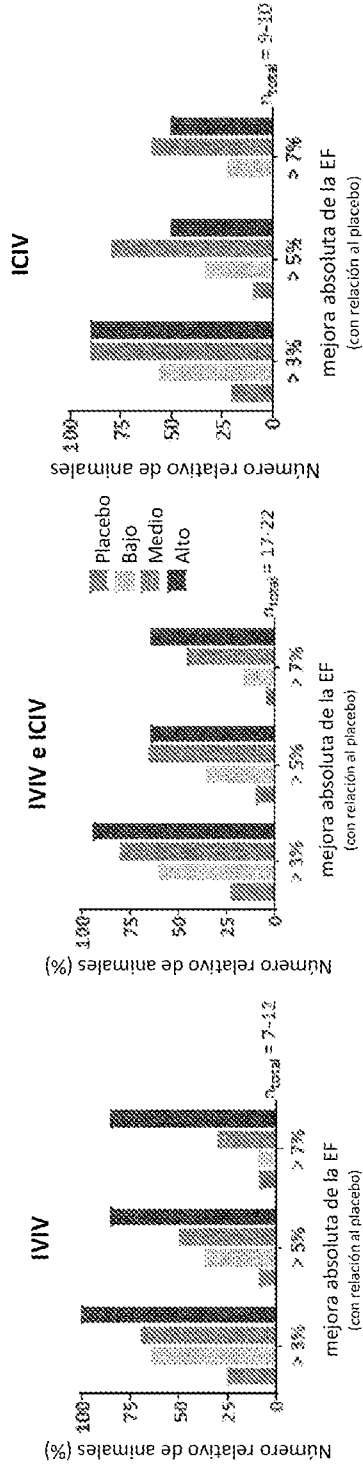


Figura 32

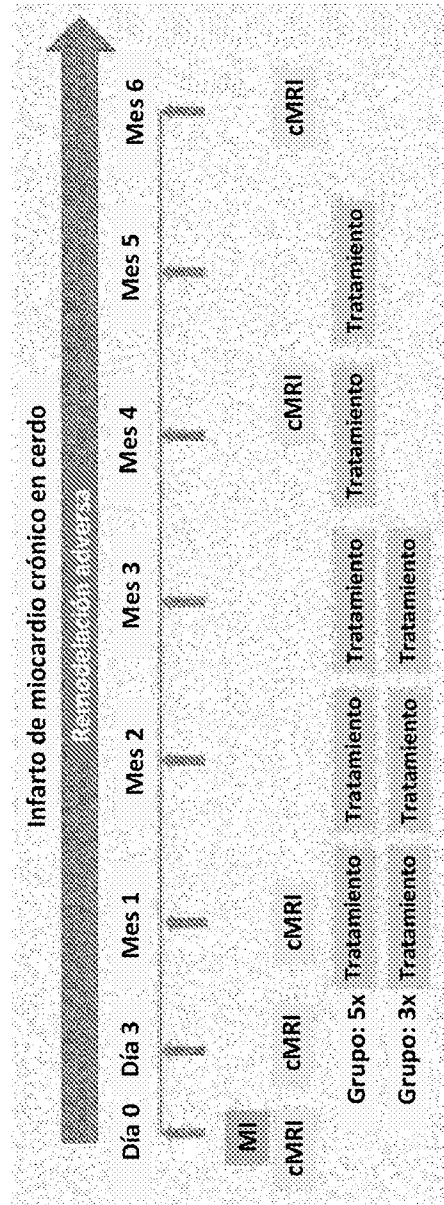


Figura 33

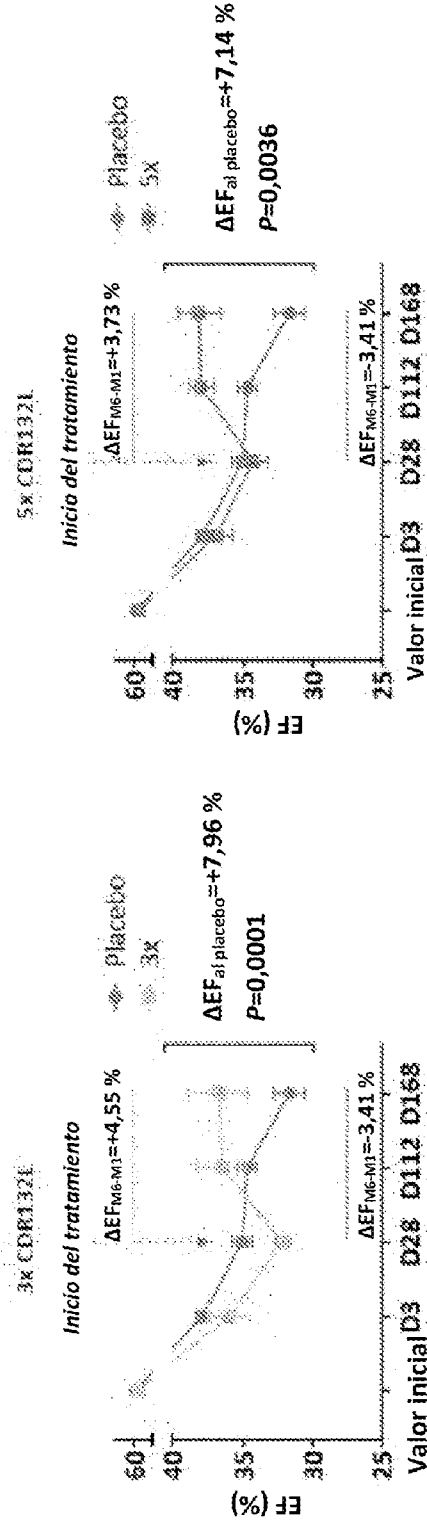


Figura 34

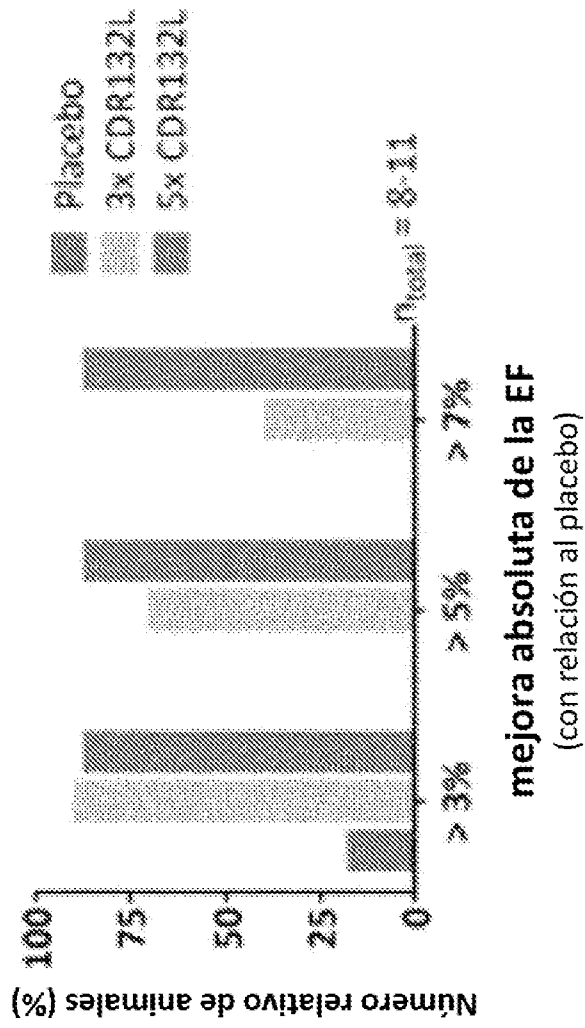


Figura 35

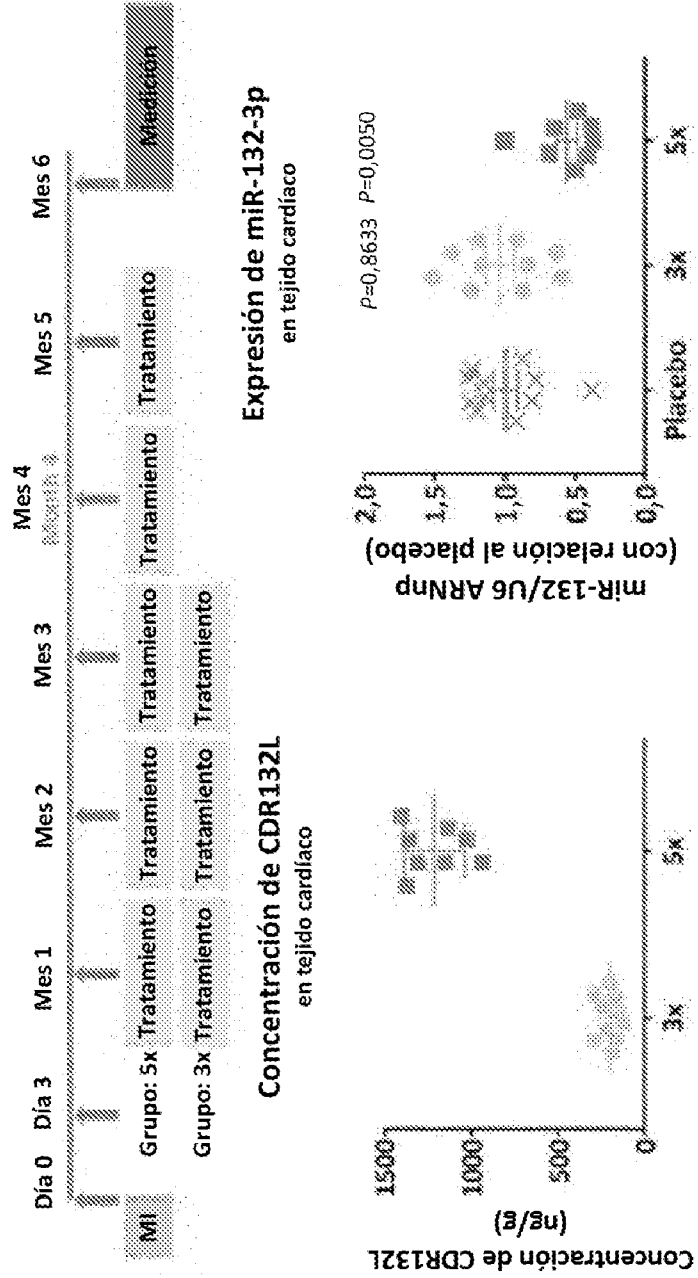


Figura 36

