

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD RENAL POLIQUÍSTICA

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 [0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 63/253,933, presentada el 8 de octubre de 2021, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia a todos los efectos.

CAMPO

- 10 [0002] En el presente documento se proporcionan composiciones y métodos para el tratamiento de la enfermedad renal poliquística.

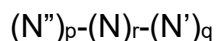
ANTECEDENTES

- 15 [0003] La enfermedad renal poliquística se caracteriza por la acumulación de numerosos quistes llenos de líquido en el riñón. Estos quistes están revestidos por una sola capa de células epiteliales llamada epitelio del quiste. Con el tiempo, los quistes aumentan de tamaño debido a la proliferación celular elevada y la secreción activa de líquido por parte del epitelio del quiste. Los quistes agrandados comprimen el tejido normal circundante, lo que provoca una disminución de la función renal. La enfermedad eventualmente progresa a enfermedad renal en etapa terminal, que requiere diálisis o trasplante de riñón. En esta etapa, los quistes pueden estar rodeados por áreas de fibrosis que contienen túbulos atróficos. La enfermedad renal
- 20 poliquística también puede ocasionar el desarrollo de quistes en el hígado y en otras partes del cuerpo.

- [0004] Una serie de trastornos genéticos pueden dar lugar a la enfermedad renal poliquística (PKD, por sus siglas en inglés). Las diversas formas de PKD se distinguen por la forma de herencia, por ejemplo, herencia autosómica dominante o autosómica recesiva; la afectación de
- 25 órganos y presentación de fenotipos fuera del riñón; la edad de inicio de la enfermedad renal en etapa terminal, por ejemplo, al nacer, en la niñez o en la edad adulta; y la mutación genética subyacente que está asociada con la enfermedad. Véase, por ejemplo, Kurschat et al., 2014, Nature Reviews Nephrology, 10: 687–699.

COMPENDIO

- 30 Modalidad 1 Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado, en donde el oligonucleótido modificado tiene la siguiente estructura en la orientación 5' a 3':



en donde cada N'' es, independientemente, un nucleósido modificado o no modificado; p es de 0 a 14; en donde si p no es 0, la secuencia de nucleobases de $(N'')_p$ es complementaria a una porción de igual longitud de la secuencia de nucleobases de miR-17;

cada N de $(N)_r$ es, independientemente, un nucleótido modificado o no modificado, y la secuencia de nucleobases de $(N)_r$ es 5'-AGCACUUU-3';

N' es un nucleósido que comprende un resto de azúcar modificado;

q es 0 o 1; en donde si q es 1, la nucleobase de N' es una nucleobase de uracilo, una nucleobase de citosina o una nucleobase de purina, siempre que la nucleobase de purina no tenga un aceptor de enlaces de hidrógeno en la posición 6; y

cada citosina se selecciona independientemente de una citosina no metilada y una 5-metilcitosina; o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Modalidad 2 El compuesto de la modalidad 1, en donde la estructura de $(N)_r$ es:



en donde los nucleósidos seguidos del subíndice "M" son nucleósidos de 2'-O-metilo; los nucleósidos seguidos del subíndice "F" son nucleósidos de 2'-fluoro; y los nucleósidos seguidos del subíndice "S" son nucleósidos S-cEt.

Modalidad 3 El compuesto de la modalidad 1 o la modalidad 2, en donde al menos un enlace internucleósido es un enlace internucleósido fosforotioato.

Modalidad 4 El compuesto de cualquiera de las modalidades 1 a 3, en donde cada enlace internucleósido es un enlace internucleósido fosforotioato.

Modalidad 5 El compuesto de cualquiera de las modalidades 1 a 4, en donde q es 1.

Modalidad 6 El compuesto de cualquiera de las modalidades 1 a 4, en donde q es 0.

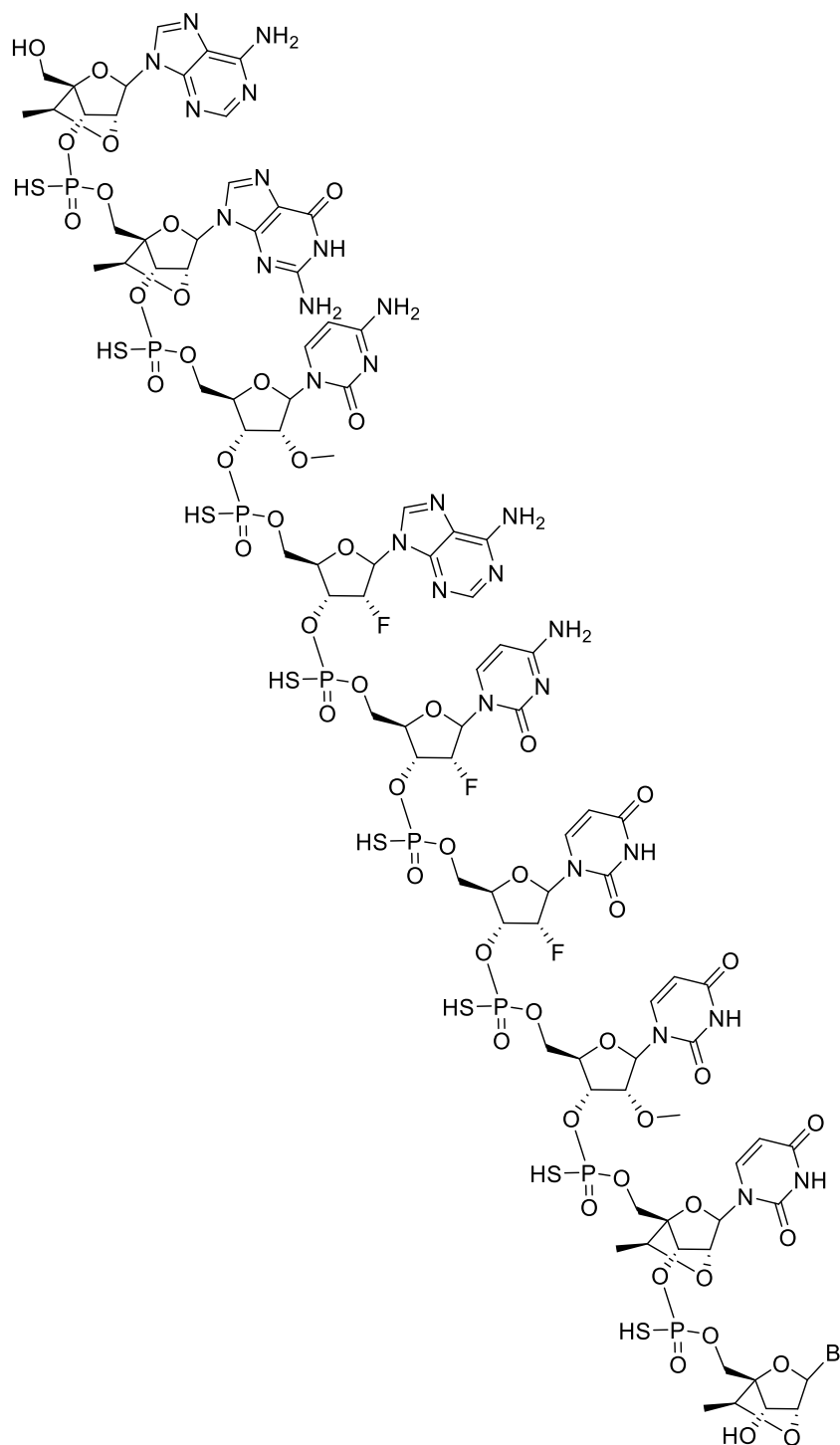
Modalidad 7 El compuesto de cualquiera de las modalidades 1 a 6, en donde p es 0.

Modalidad 8 El compuesto de cualquiera de las modalidades 1 a 6, en donde p se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14.

Modalidad 9 El compuesto de la modalidad 8, en donde la secuencia de nucleobases de $(N'')_p$ no tiene más de un desajuste con la secuencia de nucleobases de miR-17 (SEQ ID NO: 1).

Modalidad 10 El compuesto de la modalidad 8, en donde la secuencia de nucleobases de $(N'')_p$ no tiene desajustes con la secuencia de nucleobases de miR-17 (SEQ ID NO: 1).

- Modalidad 11 El compuesto de cualquiera de las modalidades 8, 9 o 10, en donde la secuencia de nucleobases de (N'')_p se selecciona de CUACCUGCACUGUA (SEQ ID NO: 7), CUACCUGCACUGU (SEQ ID NO: 8), CUACCUGCACUG (SEQ ID NO: 9), CUACCUGCACU (SEQ ID NO: 10), CUACCUGCAC (SEQ ID NO: 11), CUACCUGCA, CUACCUGC, CUACCUG, CUACCU, CUACC, CUAC, CUA, CU, y C.
- Modalidad 12 El compuesto de cualquiera de las modalidades 1 a 5 o 7 a 11, en donde la nucleobase de N' es una nucleobase de purina que no tiene un aceptor de enlaces de hidrógeno en la posición 6.
- Modalidad 13 El compuesto de la modalidad 12, en donde la nucleobase de N' se selecciona de adenosina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina e isoguanosina.
- Modalidad 14 El compuesto de cualquiera de las modalidades 1 a 13, en donde el resto de azúcar de N' no es un azúcar 2'-O-metilo.
- Modalidad 15 El compuesto de cualquiera de las modalidades 1 a 14, en donde el resto de azúcar de N' es un azúcar 2'-O-metoxietilo o un azúcar S-cEt.
- Modalidad 16 El compuesto de la modalidad 2, en donde la estructura del oligonucleótido modificado es 5'-AsGsC_MA_FC_FU_FU_MU_SAs-3', en donde cada citosina es una citosina no metilada.
- Modalidad 17 El compuesto de la modalidad 2, en donde la estructura del oligonucleótido modificado es 5'-AsGsC_MA_FC_FU_FU_MU_SU_S-3', en donde cada citosina es una citosina no metilada.
- Modalidad 18 El compuesto de la modalidad 2, en donde la estructura del oligonucleótido modificado es 5'-AsGsC_MA_FC_FU_FU_MU_SC_S-3', en donde cada citosina es una citosina no metilada.
- Modalidad 19 El compuesto de la modalidad 2, en donde la estructura del oligonucleótido modificado es 5'-AsGsC_MA_FC_FU_FU_MU_S-3', en donde cada citosina es una citosina no metilada.
- Modalidad 20 El compuesto de cualquiera de las modalidades 1 a 19, en donde el compuesto consiste en el oligonucleótido modificado.
- Modalidad 21 El compuesto de cualquiera de las modalidades 1 a 20, en donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de sodio.
- Modalidad 22 Un oligonucleótido modificado que tiene la estructura:



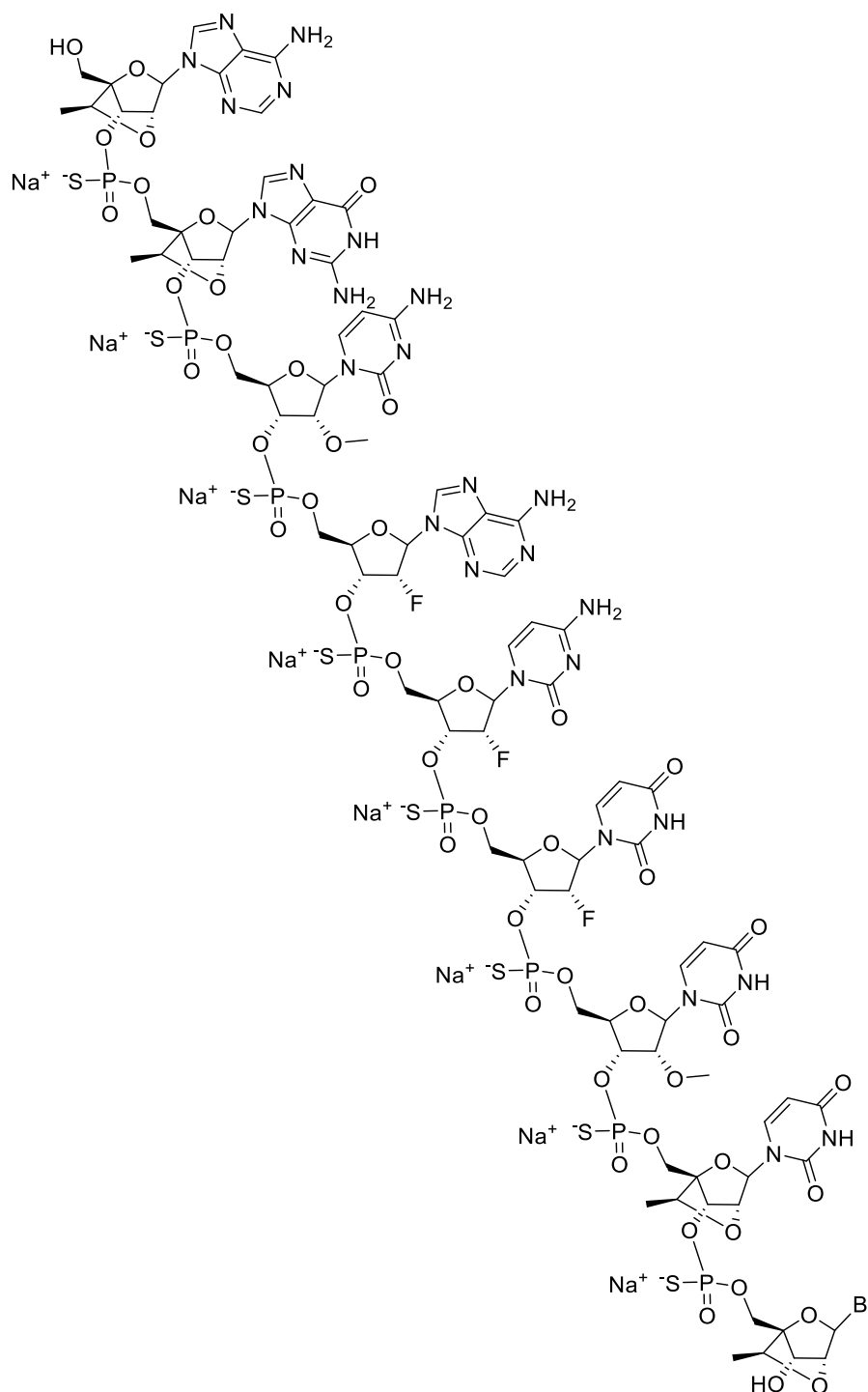
en donde B es una nucleobase de uridina, una nucleobase de citosina o una nucleobase de purina, siempre que la nucleobase de purina no tenga un aceptor de enlaces de hidrógeno en la posición 6; o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas.

5 Modalidad 23 El oligonucleótido modificado de la modalidad 22, en donde B se selecciona

de adenosina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina e isoguanosina.

Modalidad 24 El oligonucleótido modificado de la modalidad 22 o la modalidad 23, en donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de sodio.

Modalidad 25 Un oligonucleótido modificado que tiene la estructura:

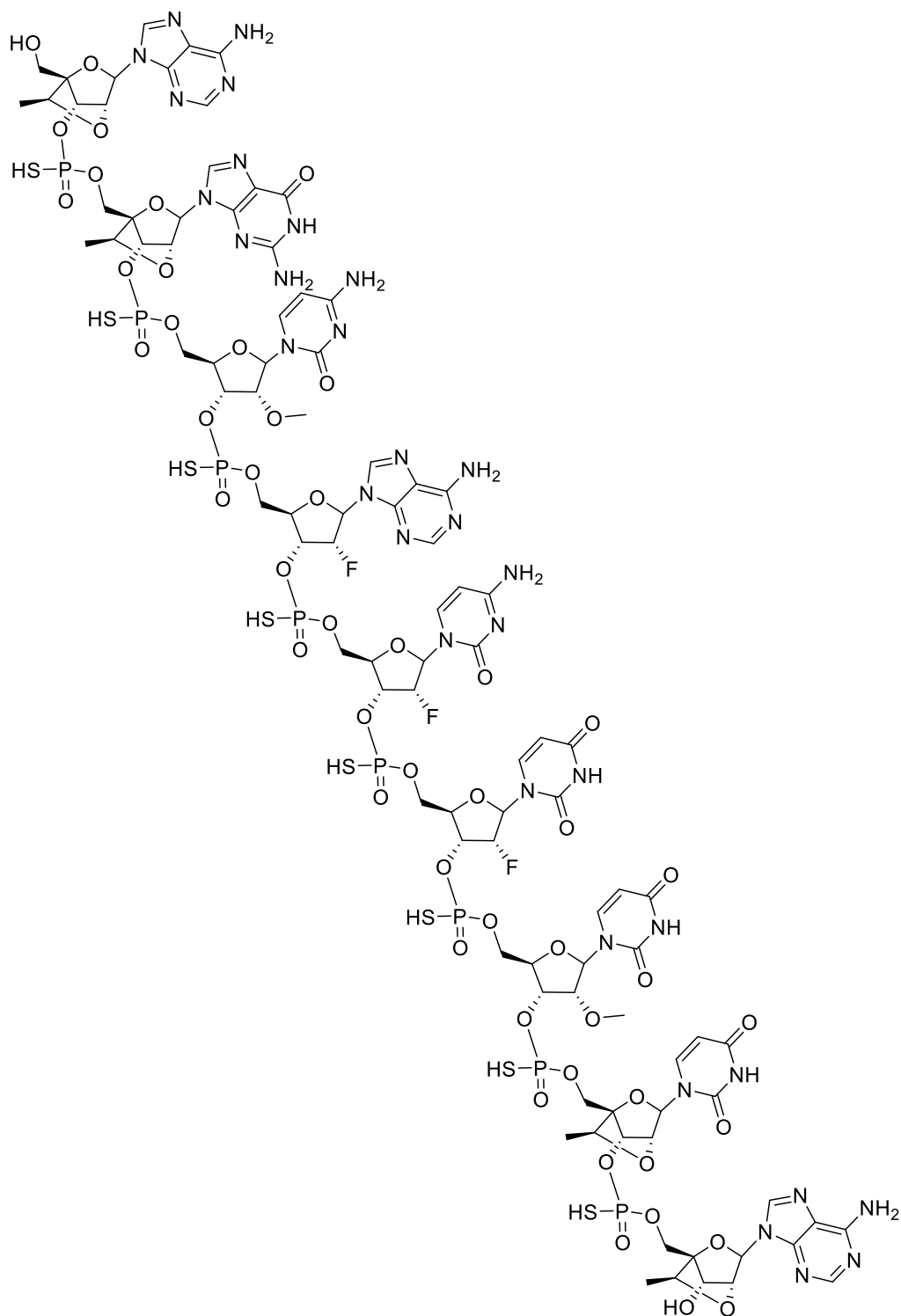


en donde B es una nucleobase de uridina, una nucleobase de citosina o una nucleobase

de purina, siempre que la nucleobase de purina no tenga un aceptor de enlaces de hidrógeno en la posición 6.

Modalidad 26 El oligonucleótido modificado de la modalidad 25, en donde B se selecciona de adenosina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina e isoguanosina.

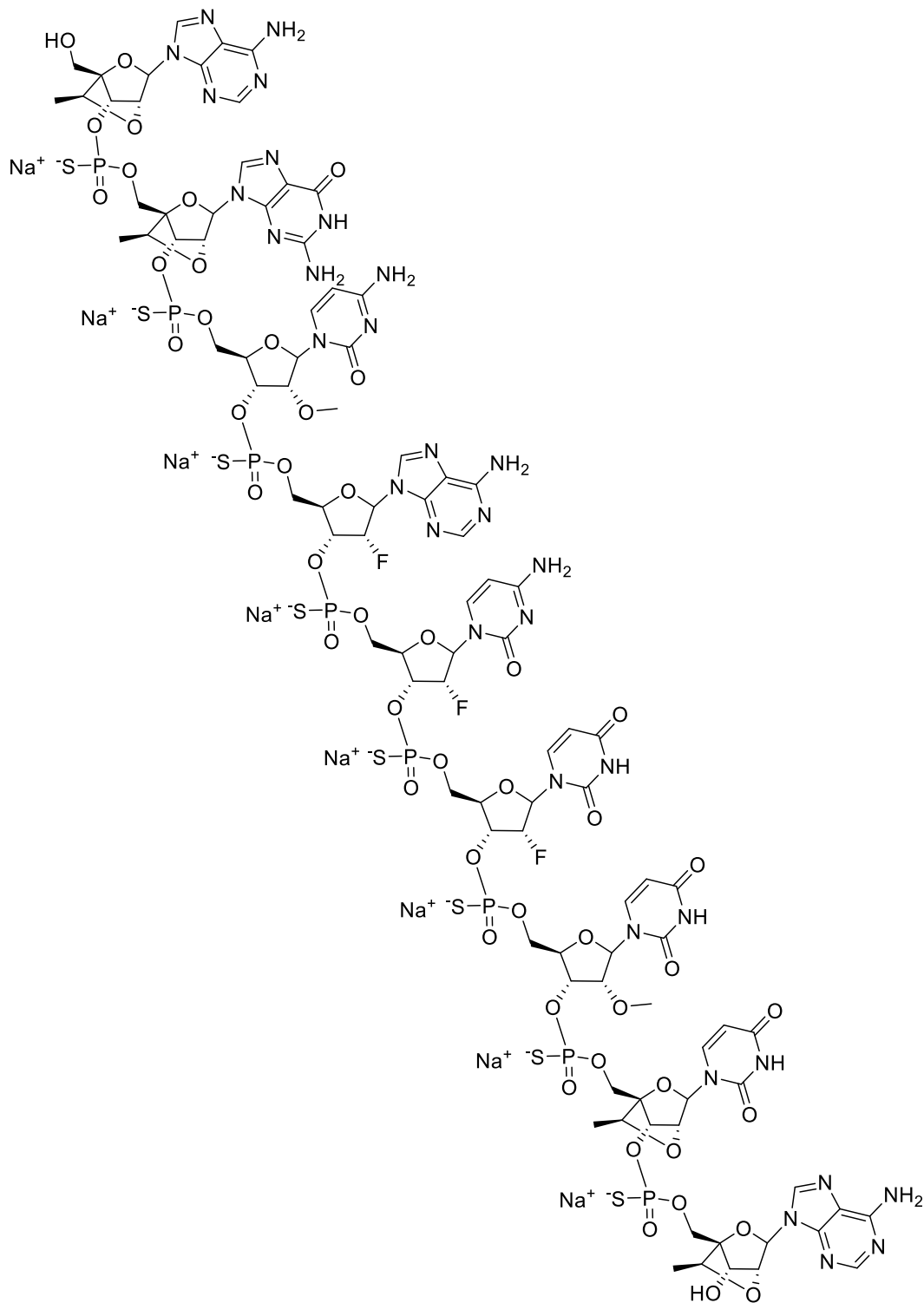
5 Modalidad 27 Un oligonucleótido modificado que tiene la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Modalidad 28 El oligonucleótido modificado de la modalidad 27, en donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de sodio.

5 Modalidad 29 Un oligonucleótido modificado que tiene la estructura:



Modalidad 30 Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las modalidades 1 a 21 o un oligonucleótido modificado de cualquiera de las modalidades 22 a 29 y un diluyente farmacéuticamente aceptable.

5 Modalidad 31 La composición farmacéutica de la modalidad 30, en donde el diluyente

farmacéuticamente aceptable es una solución acuosa.

Modalidad 32 La composición farmacéutica de la modalidad 31, en donde la solución acuosa es una solución salina.

5 Modalidad 33 Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las modalidades 1 a 21 o un oligonucleótido modificado de cualquiera de las modalidades 22 a 29, que es una composición liofilizada.

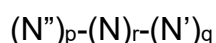
Modalidad 34 Una composición farmacéutica que consiste esencialmente en un compuesto de cualquiera de las modalidades 1 a 21 o un oligonucleótido modificado de cualquiera de las modalidades 22 a 29 en una solución salina.

10 Modalidad 35 Un método para inhibir la actividad de uno o más miembros de la familia miR-17 en una célula, que comprende poner en contacto la célula con un compuesto de cualquiera de las modalidades 1 a 21 o un oligonucleótido modificado de cualquiera de las modalidades 22 a 29.

15 Modalidad 36 Un método para inhibir la actividad de uno o más miembros de la familia miR-17 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto de cualquiera de las modalidades 1 a 21, un oligonucleótido modificado de cualquiera de las modalidades 22 a 29, o una composición farmacéutica de cualquiera de las modalidades 30 a 34.

Modalidad 37 El método de la modalidad 36, en donde el sujeto tiene una enfermedad asociada con miR-17.

20 Modalidad 38 Un método para tratar la enfermedad renal poliquística que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado, en donde el oligonucleótido modificado tiene la siguiente estructura en la orientación 5' a 3':



25 en donde cada N'' es, independientemente, un nucleósido modificado o no modificado; p es de 0 a 14; en donde si p no es 0, la secuencia de nucleobases de $(N'')_p$ es complementaria a una porción de igual longitud de la secuencia de nucleobases de miR-17;

30 cada N de $(N)_r$ es, independientemente, un nucleótido modificado o no modificado, y la secuencia de nucleobases de $(N)_r$ es 5'-AGCACUUU-3';

N' es un nucleósido que comprende un resto de azúcar modificado;

q es 0 o 1; en donde si q es 1, la nucleobase de N' es una nucleobase de uridina, una nucleobase de citosina o una nucleobase de purina, siempre que la nucleobase de purina no tenga un aceptor de enlace H en la posición 6; y

cada citosina se selecciona independientemente de una citosina no metilada y una 5-metilcitosina; o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

5

Modalidad 39 El método de la modalidad 38, en donde la estructura de (N)_r es:



en donde los nucleósidos seguidos del subíndice "M" son nucleósidos de 2'-O-metilo;

los nucleósidos seguidos del subíndice "F" son nucleósidos de 2'-fluoro; y los nucleósidos

10

seguidos del subíndice "S" son nucleósidos S-cEt.

Modalidad 40 El método de la modalidad 38 o la modalidad 39, en donde al menos un enlace internucleósido es un enlace internucleósido fosforotioato.

Modalidad 41 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 40, en donde cada enlace internucleósido es un enlace internucleósido fosforotioato.

15

Modalidad 42 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 41, en donde q es 1.

Modalidad 43 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 41, en donde q es 0.

Modalidad 44 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 43, en donde p es 0.

Modalidad 45 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 43, en donde p se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14.

20

Modalidad 46 El método de la modalidad 45, en donde la secuencia de nucleobases de (N")_p no tiene más de un desajuste con la secuencia de nucleobases de miR-17 (SEQ ID NO: 1).

Modalidad 47 El compuesto de la modalidad 45, en donde la secuencia de nucleobases de (N")_p no tiene desajustes con la secuencia de nucleobases de miR-17 (SEQ ID NO: 1).

25

Modalidad 48 El compuesto de la modalidad 47, en donde la secuencia de nucleobases de (N")_p se selecciona de CUACCUGCACUGUA (SEQ ID NO: 7), CUACCUGCACUGU (SEQ ID NO: 8), CUACCUGCACUG (SEQ ID NO: 9), CUACCUGCACU (SEQ ID NO: 10), CUACCUGCAC (SEQ ID NO: 11), CUACCUGCA, CUACCUGC, CUACCUG, CUACCU, CUACC, CUAC, CUA, CU, y C.

30

Modalidad 49 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 42 o 44 a 48, en donde la nucleobase de N' es una nucleobase de purina que no tiene un aceptor de enlaces de

hidrógeno en la posición 6.

Modalidad 50 El método de la modalidad 49, en donde la nucleobase de N' se selecciona de adenosina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina e isoguanosina.

5 Modalidad 51 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 50, en donde el resto de azúcar de N' no es un azúcar 2'-O-metilo.

Modalidad 52 El compuesto de cualquiera de las modalidades 38 a 51, en donde el resto de azúcar de N' es un azúcar 2'-O-metoxietilo o un azúcar S-cEt.

Modalidad 53 El método de la modalidad 39, en donde la estructura del oligonucleótido modificado es 5'-AsGsC_MA_FC_FU_FU_MU_SA_S-3', y cada citosina es una citosina no metilada.

10 Modalidad 54 El método de la modalidad 39, en donde la estructura del oligonucleótido modificado es 5'-AsGsC_MA_FC_FU_FU_MU_SU_S-3', en donde cada citosina es una citosina no metilada.

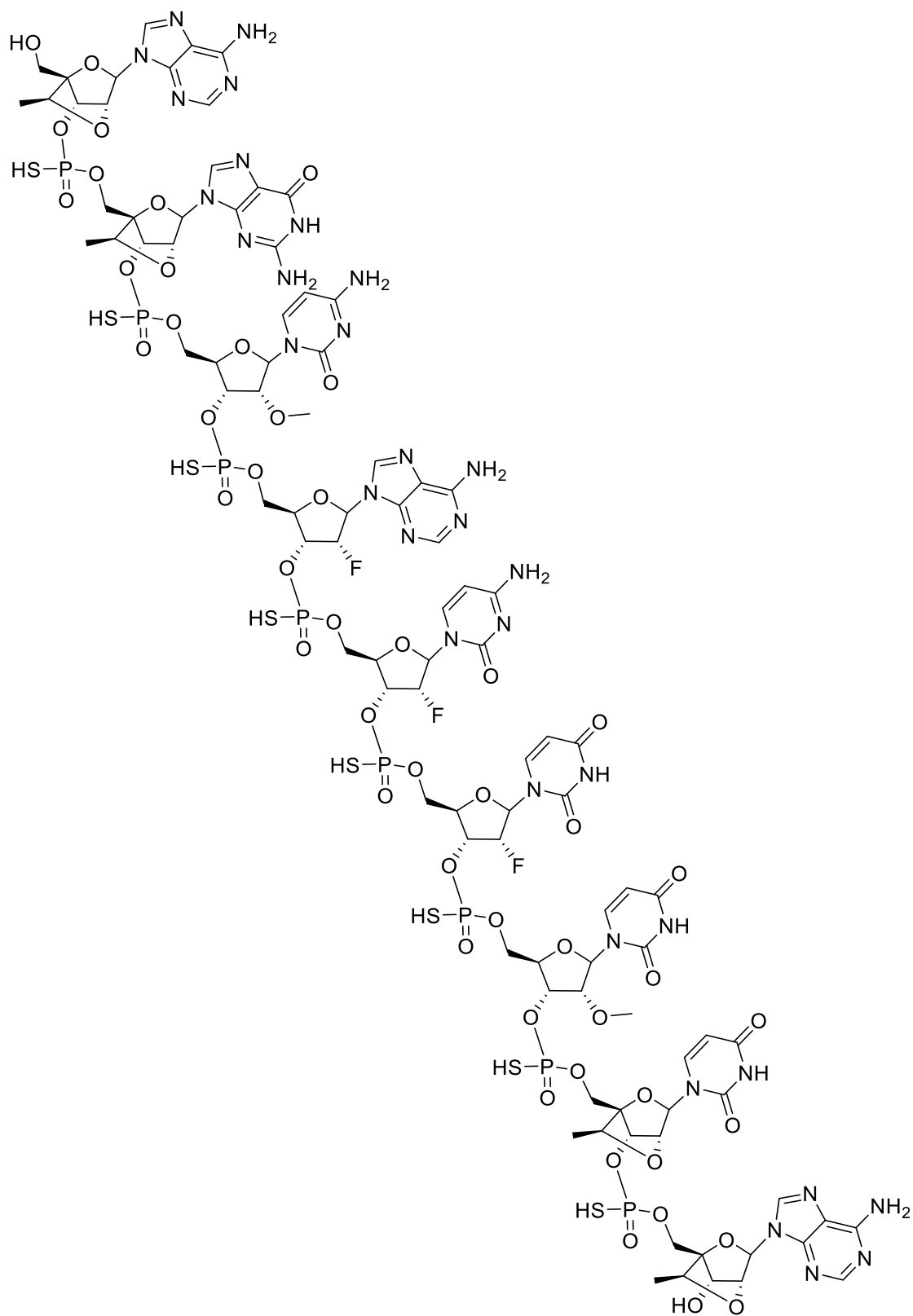
Modalidad 55 El método de la modalidad 39, en donde la estructura del oligonucleótido modificado es 5'-AsGsC_MA_FC_FU_FU_MU_SC_S-3', en donde cada citosina es una citosina no metilada.

15 Modalidad 56 El método de la modalidad 39, en donde la estructura del oligonucleótido modificado es 5'-AsGsC_MA_FC_FU_FU_MU_S-3' en donde cada citosina es una citosina no metilada.

Modalidad 57 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 56, en donde el compuesto consiste en el oligonucleótido modificado.

Modalidad 58 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 57, en donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de sodio.

20 Modalidad 59 Un método para tratar la enfermedad renal poliquística que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un oligonucleótido modificado que tiene la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Modalidad 60 El método de la modalidad 59, en donde la sal farmacéuticamente

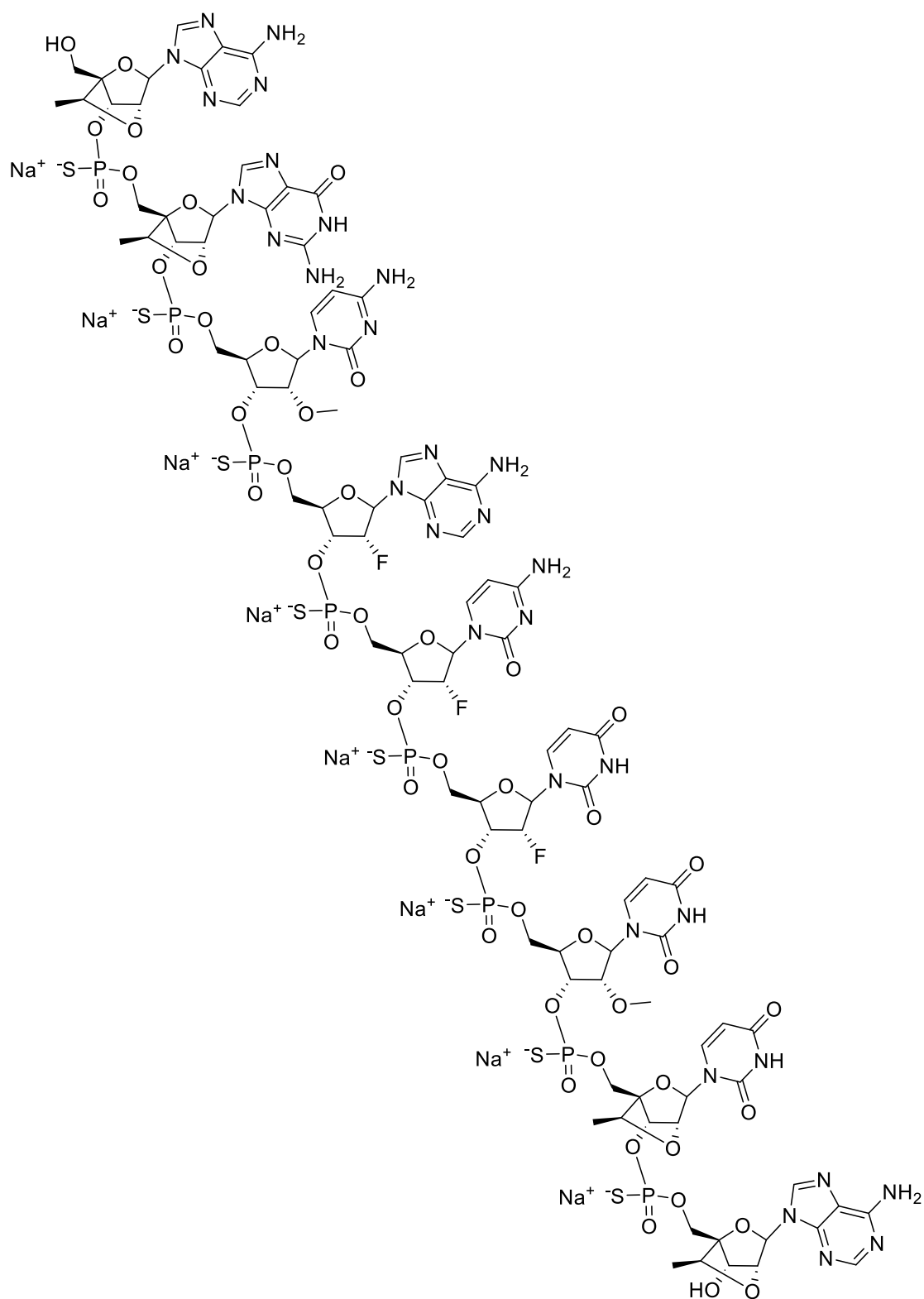
aceptable es una sal de sodio.

Modalidad 61 El método de la modalidad 60, en donde el oligonucleótido modificado está presente en una composición farmacéutica que comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable.

- 5 Modalidad 62 El método de la modalidad 61, en donde el diluyente farmacéuticamente aceptable es una solución acuosa estéril.

Modalidad 63 El método de la modalidad 62, en donde la solución acuosa estéril es una solución salina.

- 10 Modalidad 64 Un método para tratar la enfermedad renal poliquística que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un oligonucleótido modificado que tiene la estructura:



Modalidad 65 El método de la modalidad 64, en donde el oligonucleótido modificado está presente en una composición farmacéutica que comprende un diluyente farmacéuticamente

aceptable.

Modalidad 66 El método de la modalidad 65, en donde el diluyente farmacéuticamente aceptable es una solución acuosa estéril.

5 Modalidad 67 El método de la modalidad 66, en donde la solución acuosa estéril es una solución salina.

Modalidad 68 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 67, en donde el sujeto tiene enfermedad renal poliquística.

Modalidad 69 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 67, en donde se sospecha que el sujeto tiene enfermedad renal poliquística.

10 Modalidad 70 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 68, en donde se ha diagnosticado que el sujeto tiene enfermedad renal poliquística mediante criterios clínicos, histopatológicos, y/o genéticos.

Modalidad 71 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 70, en donde se determinó que el sujeto, antes de la administración del compuesto, el oligonucleótido modificado
15 o la composición farmacéutica, tenía un nivel reducido de policistina 1 (PC1) y/o policistina 2 (PC2) en el riñón, la orina o la sangre del sujeto.

Modalidad 72 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 71, en donde la enfermedad renal poliquística es una enfermedad renal poliquística autosómica recesiva.

20 Modalidad 73 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 71, en donde la enfermedad renal poliquística es una enfermedad renal poliquística autosómica dominante.

Modalidad 74 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 73, en donde el sujeto tiene una mutación seleccionada de una mutación en el gen PKD1 o una mutación en el gen PKD2.

25 Modalidad 75 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 74, en donde el sujeto tiene un volumen renal total aumentado.

Modalidad 76 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 75, en donde el sujeto tiene hipertensión.

Modalidad 77 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 76, en donde el sujeto tiene función renal deteriorada.

30 Modalidad 78 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 77, en donde la administración reduce el volumen renal total en el sujeto.

- Modalidad 79 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 78, en donde la administración ralentiza la tasa de aumento del volumen renal total en el sujeto.
- Modalidad 80 El método de la modalidad 78 o la modalidad 79, en donde el volumen renal total es el volumen renal total ajustado a la altura.
- 5 Modalidad 81 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 80, en donde la administración ralentiza la tasa de disminución de la tasa de filtración glomerular en el sujeto.
- Modalidad 82 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 81, en donde la administración aumenta la tasa de filtración glomerular en el sujeto.
- 10 Modalidad 83 El método de la modalidad 81 o la modalidad 82, en donde la tasa de filtración glomerular es la tasa de filtración glomerular estimada.
- Modalidad 84 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 83, en donde la administración ralentiza el aumento del crecimiento de quistes en el riñón y/o el hígado del sujeto.
- 15 Modalidad 85 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 84, en donde la administración:
- a) mejora la función renal en el sujeto;
 - b) retrasa el empeoramiento de la función renal en el sujeto;
 - c) reduce el dolor de riñón en el sujeto;
 - d) ralentiza el aumento del dolor renal en el sujeto;
 - 20 e) retrasa el inicio del dolor renal en el sujeto;
 - f) reduce la hipertensión en el sujeto;
 - g) ralentiza el empeoramiento de la hipertensión en el sujeto;
 - h) retrasa el inicio de hipertensión en el sujeto;
 - i) reduce la fibrosis en el riñón del sujeto;
 - 25 j) ralentiza el empeoramiento de la fibrosis en el riñón del sujeto;
 - k) retrasa el inicio de la enfermedad renal en etapa terminal en el sujeto;
 - l) retrasa el tiempo hasta la diálisis del sujeto;
 - m) retrasa el tiempo hasta el trasplante renal para el sujeto; y/o
 - n) mejora la esperanza de vida del sujeto.
- 30 Modalidad 86 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 85, en donde la administración:

- a) reduce la albuminuria en el sujeto;
 - b) ralentiza el empeoramiento de la albuminuria en el sujeto;
 - c) retrasa el inicio de albuminuria en el sujeto;
 - d) reduce la hematuria en el sujeto;
 - 5 e) ralentiza el empeoramiento de la hematuria en el sujeto;
 - f) retrasa el inicio de la hematuria en el sujeto;
 - g) reduce el nivel de nitrógeno ureico en sangre en el sujeto;
 - h) reduce el nivel de creatinina en suero en el sujeto;
 - i) mejora el aclaramiento de creatinina en el sujeto;
 - 10 j) reduce la proporción albúmina:creatinina en el sujeto;
 - k) aumenta la policistina 1 (PC1) en la orina del sujeto;
 - l) aumenta la policistina 2 (PC2) en la orina del sujeto;
 - m) reduce la proteína lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL, por sus siglas en inglés) en la orina del sujeto; y/o
 - 15 n) reduce la proteína de la molécula de daño renal 1 (KIM-1) en la orina del sujeto.
- Modalidad 87 El método de una de las modalidades 38 a 86, que comprende:
- a) medir el volumen renal total en el sujeto;
 - b) medir la hipertensión en el sujeto;
 - c) medir el dolor renal en el sujeto;
 - 20 d) medir la policistina 1 (PC1) en la orina del sujeto;
 - e) medir la policistina 2 (PC2) en la orina del sujeto;
 - f) medir la fibrosis en el riñón del sujeto;
 - g) medir el nivel de nitrógeno ureico en sangre en el sujeto;
 - h) medir el nivel de creatinina en suero en el sujeto;
 - 25 i) medir el aclaramiento de creatinina en el sujeto;
 - j) medir la albuminuria en el sujeto;
 - k) medir la proporción albúmina:creatinina en el sujeto;
 - l) medir la tasa de filtración glomerular en el sujeto;
 - m) medir la proteína lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) en la orina
 - 30 del sujeto; y/o
 - n) medir la proteína de la molécula de lesión renal 1 (KIM-1) en la orina del sujeto.

- Modalidad 88 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 87, que comprende administrar al menos una terapia adicional, en donde al menos una terapia adicional es un agente antihipertensivo.
- 5 Modalidad 89 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 87, que comprende administrar al menos una terapia adicional seleccionada de un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina II (ACE), un bloqueador del receptor de angiotensina II (ARB), un diurético, un bloqueador de los canales de calcio, un inhibidor de quinasa, un antagonista de los receptores adrenérgicos, un vasodilatador, una benzodiazepina, un inhibidor de la renina, un antagonista de los receptores de aldosterona, un bloqueador de los receptores de endotelina,
- 10 un inhibidor de la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR), un análogo hormonal, un antagonista del receptor de vasopresina 2, un antagonista del receptor de aldosterona, un inhibidor de la glucosilceramida sintasa, un agente antihiperglicémico, diálisis y trasplante de riñón.
- 15 Modalidad 90 El método de la modalidad 89, en donde el inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina II (ACE) se selecciona de captopril, enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril, fosinopril y ramipril.
- Modalidad 91 El método de la modalidad 89, en donde el bloqueador del receptor de angiotensina II (ARB) se selecciona de candesartán, irbesartán, olmesartán, losartán, valsartán, telmisartán y eprosartán.
- 20 Modalidad 92 El método de la modalidad 89, en donde el antagonista del receptor 2 de vasopresina es tolvaptán.
- Modalidad 93 El método de la modalidad 89, en donde el antagonista del receptor de aldosterona es espironolactona.
- 25 Modalidad 94 El método de la modalidad 89, en donde el inhibidor de quinasa se selecciona de bosutinib y KD019.
- Modalidad 95 El método de la modalidad 89, en donde el inhibidor de mTOR se selecciona de everolimus, rapamicina y sirolimus.
- Modalidad 96 El método de la modalidad 89, en donde el análogo hormonal se selecciona de somatostatina y hormona adrenocorticotrófica.
- 30 Modalidad 97 El método de la modalidad 89, en donde el inhibidor de la glucosilceramida sintasa es venglustat.

- Modalidad 98 El método de la modalidad 89, en donde el agente antihiper glucémico es metformina.
- Modalidad 99 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 96, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto.
- 5 Modalidad 100 El método de cualquiera de las modalidades 38 a 99, en donde el sujeto es un sujeto humano.
- Modalidad 101 Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado, en donde el oligonucleótido modificado tiene la siguiente estructura en la orientación 5' a 3':
 $(N'')_p-(N)_r-(N')_q$
- 10 en donde cada N'' es, independientemente, un nucleósido modificado o no modificado; p es de 0 a 14; en donde si p no es 0, la secuencia de nucleobases de $(N'')_p$ es complementaria a una porción de igual longitud de la secuencia de nucleobases de miR-17;
- cada N de $(N)_r$ es, independientemente, un nucleótido modificado o no modificado, y la secuencia de nucleobases de $(N)_r$ es 5'-AGCACUUU-3';
- 15 N' es un nucleósido que comprende un resto de azúcar modificado; q es 0 o 1; en donde si q es 1, la nucleobase de N' es una nucleobase de uridina, una nucleobase de citosina o una nucleobase de purina, siempre que la nucleobase de purina no tenga un aceptor de enlace H en la posición 6; y
- cada citosina se selecciona independientemente de una citosina no metilada y una 5-
 20 metilcitosina; o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en terapia.
- Modalidad 102 El compuesto de la modalidad 101, en donde la terapia es el tratamiento de la enfermedad renal poliquística.
- Modalidad 103 El compuesto de la modalidad 102, en donde la enfermedad renal poliquística es enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ADPKD).
- 25 Modalidad 104 El compuesto de la modalidad 102, en donde la enfermedad renal poliquística es enfermedad renal poliquística autosómica recesiva (ARPKD).
- Modalidad 105 Un compuesto de cualquiera de las modalidades 1 a 22, un oligonucleótido modificado de cualquiera de las modalidades 23 a 29, o una composición farmacéutica de cualquiera de las modalidades 30 a 33, para su uso en terapia.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0005]Figura 1. Estructuras de nucleobases de purina.

[0006]Figura 2A-2C. Eficacia de RG-NG-1015 en el modelo *Pkd1-F/RC* de PKD. Efectos del tratamiento sobre (2A) la relación entre el peso del riñón y el peso corporal, (2B) el nivel de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y (2C) el nivel de creatinina en sangre.

5 **[0007]Figura 3.** Estudio de dosis máxima tolerada (MTD, por sus siglas en inglés) y evaluación de la dosis comparativa de RG-NG-1001, RGLS4326 y RG-NG-1017. Se dosificaron ratones C57BL/6J macho de 6-7 semanas con una única inyección intracerebroventricular (ICV) de RG-NG-1001 y RGLS4326 (oligos anti-miR-17 que inhiben AMPA-R) y RG-NG-1017 (oligos anti-miR-17 que no inhiben AMPA-R; RG-NG-1017) en diferentes niveles de dosis en un volumen
10 de 4 µL y se monitorearon durante 7 días. La mortalidad de los ratones se indicó para los tres compuestos diferentes con diferentes dosificaciones.

[0008]Figura 4A-4F. Se expone la evaluación de la actividad de RG-NG-1015 y RGLS4326 contra la actividad de los sensores de luciferasa miR-17 (4A), miR-20a (4B), miR-93 (4C) y miR106(a) (4D) en células HeLa in vitro. Se expone la evaluación de la actividad de RG-NG-
15 1015 y RGLS4326 contra los sensores de luciferasa que contienen la región no traducida de longitud completa (UTR, por sus siglas en inglés) 3' de los genes diana directos miR-17 PKD1 (4E) y PKD2 (4F).

[0009]Figura 5A-5D. Se midió la farmacocinética y el acoplamiento a la diana (según se midió mediante miPSA) de RGLS4326 y RG-NG-1015 luego de una única administración subcutánea
20 en ratones C57BL6. Se muestran la concentración en plasma (5A), la concentración en tejido (5B), el acoplamiento a la diana en riñón (5C) y el acoplamiento a la diana en hígado (5D).

[00010] Figura 6A-6E. Se midió el efecto de RG-NG-1015 en diferentes dosificaciones y regímenes y junto con tolvaptán en el modelo de ratón *Pcy/DBA* de PKD. El cronograma de dosificación se muestra en la Figura 6A y la leyenda de las gráficas en las Figuras 6C-6E se
25 muestra en la Figura 6B. Se muestran el peso del riñón/peso corporal (6C), el área quística (%) (6D) y la Ngal/Cr en orina (6E). Las barras de error representan desviaciones estándar. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,001, (ns)p>0,05 en comparación con el grupo tratado con vehículo Pcy; ANOVA unidireccional prueba de comparación múltiple de Bonferroni. #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001, ####p<0,001, #####p<0,001, (ns)p>0,05 en comparación con el grupo tratado solo con
30 Tolvaptán; ANOVA unidireccional prueba de comparación múltiple de Sadik. \$p<0,05, \$\$p<0,01, \$\$\$p<0,001, \$\$\$\$p<0,001, (ns)p>0,05 en comparación con el grupo tratado con RG-

NG-1015 solo con coincidencia de dosis; ANOVA unidireccional prueba de comparación múltiple de Sadik.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 **[00011]** A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que normalmente les atribuye el experto en la técnica a la que pertenece la invención. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con la química analítica, la química orgánica sintética y la química farmacéutica y médica descrita en este documento, y los procedimientos y técnicas de las mismas, es aquella bien conocida y comúnmente utilizada en la técnica. En caso de existir una pluralidad de definiciones de términos en el presente, prevalecerán las de esta sección. Pueden usarse técnicas estándar para síntesis química, análisis químico, preparación farmacéutica, formulación y suministro, y tratamiento de sujetos. Ciertas técnicas y procedimientos de este tipo se pueden encontrar, por ejemplo, en “Carbohydrate Modifications in Antisense Research” editado por Sanghvi y Cook, American Chemical Society, Washington D.C., 1994; y “Remington's Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, 18ª edición, 1990; y que se incorpora aquí por referencia para cualquier propósito. Cuando esté permitido, todas las patentes, solicitudes de patentes, solicitudes y publicaciones publicadas, secuencias de GENBANK, sitios web y otros materiales publicados a los que se hace referencia en toda la descripción del presente, a menos que se indique lo contrario, se incorporan por referencia en su totalidad. Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección similar, se entiende que dichos identificadores pueden cambiar y la información particular en Internet puede cambiar, pero se puede encontrar información equivalente buscando en Internet. La referencia al mismo prueba la disponibilidad y difusión pública de dicha información.

25 **[00012]** Antes de divulgar y describir las presentes composiciones y métodos, debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir modalidades particulares únicamente y no pretende ser limitativa. Cabe destacar que, tal como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen las formas plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Definiciones

[00013] La “enfermedad renal poliquística” o “PKD” es una enfermedad renal quística caracterizada por la acumulación de numerosos quistes llenos de líquido en el riñón. Se forman múltiples quistes en al menos un riñón, lo que con frecuencia conduce al agrandamiento del o de los riñones afectados y a la pérdida progresiva de la función renal.

[00014] “Marcador de enfermedad renal poliquística” se refiere a un parámetro médico que se utiliza para evaluar la gravedad de la enfermedad renal poliquística, la función renal, y/o respuesta de un sujeto que tiene enfermedad renal poliquística al tratamiento. Los ejemplos no limitativos de marcadores de enfermedad renal poliquística incluyen el volumen renal total, la hipertensión, la tasa de filtración glomerular y el dolor renal.

[00015] “Marcador de la función renal” significa un parámetro médico que se utiliza para evaluar la función renal en un sujeto. Los ejemplos no limitativos de marcadores de la función renal incluyen la tasa de filtración glomerular, el nivel de nitrógeno ureico en sangre y el nivel de creatinina en suero.

[00016] La “enfermedad renal poliquística autosómica dominante” o “ADPKD” es una enfermedad renal poliquística causada por una o más mutaciones genéticas en el gen *PKD1* y/o *PKD2*. El 85 % de la ADPKD es causada por mutaciones en *PKD1*, que se encuentra en el cromosoma 16, y la mayoría de los casos restantes de ADPKD son causados por mutaciones en *PKD2*, que se encuentra en el cromosoma 4.

[00017] La "enfermedad renal poliquística autosómica recesiva" o "ARPKD" es una enfermedad renal poliquística causada por una o más mutaciones genéticas en el gen *PKHD1*, que se encuentra en el cromosoma 6. Hasta el 50 % de los recién nacidos con ARPKD mueren por complicaciones de la enfermedad renal intrauterina, y alrededor de un tercio de los que sobreviven desarrollan enfermedad renal en etapa terminal (ESRD, por sus siglas en inglés) dentro de los 10 años.

[00018] “Nefronoptosis” o “NPHP” significa una enfermedad renal quística autosómica recesiva caracterizada por quistes corticomedulares, alteración de la membrana basal tubular y nefropatía tubulointersticial.

[00019] El "volumen renal total" o "TKV" es una medida del volumen renal total. El volumen total del riñón se puede determinar mediante imágenes por resonancia magnética (IRM),

tomografía computarizada (TC) o imágenes por ultrasonido (US), y el volumen se puede calcular mediante una metodología estándar, como una ecuación de volumen elipsoide (para ultrasonido) o estereología cuantitativa o rastreo de límites (por TC/IRM).

[00020] El “volumen renal total ajustado a la altura” o “HtTKV” es una medida del volumen renal total por unidad de altura. Se predice que pacientes con un valor de HtTKV ≥ 600 ml/m desarrollarán enfermedad renal crónica en etapa 3 dentro de 8 años.

[00021] “Dolor de riñón” significa dolor de riñón clínicamente significativo que requiere licencia médica, tratamiento farmacológico (agentes analgésicos de último recurso o narcóticos) o intervención invasiva.

[00022] “Hipertensión que empeora” significa un cambio en la presión arterial que requiere iniciar o aumentar el tratamiento hipertensivo.

[00023] “Fibrosis” significa la formación o desarrollo de un exceso de tejido conjuntivo fibroso en un órgano o tejido. En ciertas modalidades, la fibrosis se produce como un proceso reparador o reactivo. En ciertas modalidades, la fibrosis se produce en respuesta a daño o lesión. El término “fibrosis” debe entenderse como la formación o desarrollo de un exceso de tejido conjuntivo fibroso en un órgano o tejido como proceso reparador o reactivo, en contraposición a la formación de tejido fibroso como constituyente normal de un órgano o tejido.

[00024] “Hematuria” significa la presencia de glóbulos rojos en la orina.

[00025] “Albuminuria” significa la presencia de exceso de albúmina en la orina e incluye, sin limitación, albuminuria normal, albuminuria normal alta, microalbuminuria y macroalbuminuria. Normalmente, la barrera de permeabilidad de filtración glomerular, que está compuesta por podocitos, membrana basal glomerular y células endoteliales, evita que la proteína sérica se filtre a la orina. La albuminuria puede reflejar lesión de la barrera de permeabilidad de filtración glomerular. La albuminuria se puede calcular a partir de una muestra de orina de 24 horas, una muestra de orina durante la noche o una muestra de orina puntual.

[00026] “Albuminuria normal alta” significa albuminuria elevada caracterizada por (i) la excreción de 15 a < 30 mg de albúmina en la orina cada 24 horas y/o (ii) una proporción albúmina/creatinina de 1,25 a $< 2,5$ mg/mmol (o 10 a < 20 mg/g) en hombres o 1,75 a $< 3,5$ mg/mmol (o 15 a < 30 mg/g) en mujeres.

[00027] “Microalbuminuria” significa albuminuria elevada caracterizada por (i) la excreción de 30 a 300 mg de albúmina en la orina cada 24 horas y/o (ii) una proporción albúmina/creatinina

de 2,5 a <25 mg/mmol (o 20 a < 200 mg/g) en hombres o 3,5 a <35 mg/mmol (o 30 a <300 mg/g) en mujeres.

[00028] “Macroalbuminuria” significa albuminuria elevada caracterizada por la excreción de más de 300 mg de albúmina en la orina cada 24 horas y/o (ii) una proporción albúmina/creatinina de >25 mg/mmol (o >200 mg/g) en hombres o >35 mg/mmol (o >300 mg/g) en mujeres.

[00029] “Proporción de albúmina/creatinina” significa la proporción de albúmina en orina (mg/dL) por creatinina en orina (g/dL) y se expresa como mg/g. En ciertas modalidades, la proporción albúmina/creatinina se puede calcular a partir de una muestra de orina puntual y se puede usar como una estimación de la excreción de albúmina durante un período de 24 horas.

[00030] “Tasa de filtración glomerular” o “TFG” significa la tasa de flujo de líquido filtrado a través del riñón y se utiliza como indicador de la función renal en un sujeto. En ciertas modalidades, la TFG de un sujeto se determina calculando una tasa de filtración glomerular estimada. En ciertas modalidades, la TFG de un sujeto se mide directamente en el sujeto, utilizando el método de la inulina.

[00031] “Tasa de filtración glomerular estimada” o “TFGe” significa una medida de qué tan bien los riñones están filtrando la creatinina y se usa para aproximar la tasa de filtración glomerular. Dado que la medición directa de la TFG es compleja, la TFGe se utiliza con frecuencia en la práctica clínica. Los resultados normales pueden oscilar entre 90 y 120 mL/min/1,73 m². Niveles por debajo de 60 mL/min/1,73 m² durante 3 o más meses pueden ser un indicador de enfermedad renal crónica. Niveles por debajo de 15 mL/min/1,73 m² pueden ser un indicador de insuficiencia renal.

[00032] “Proteinuria” significa la presencia de un exceso de proteínas séricas en la orina. La proteinuria puede caracterizarse por la excreción de > 250 mg de proteína en la orina cada 24 horas y/o una proporción de proteína en orina a creatinina de $\geq 0,20$ mg/mg. Las proteínas séricas elevadas en asociación con la proteinuria incluyen, entre otras, la albúmina.

[00033] “Nivel de nitrógeno de urea en sangre” o “nivel de BUN” significa una medida de la cantidad de nitrógeno en la sangre en forma de urea. El hígado produce urea en el ciclo de la urea como producto de desecho de la digestión de proteínas, y los riñones eliminan la urea de la sangre. La sangre humana adulta normal puede contener entre 7 y 21 mg de nitrógeno ureico por 100 ml (7-21 mg/dL) de sangre. La medición del nivel de nitrógeno ureico en sangre

se utiliza como indicador de la salud renal. Si los riñones no pueden eliminar la urea de la sangre normalmente, el nivel de BUN de un sujeto aumenta.

[00034] “Elevado” significa un aumento en un parámetro médico que se considera clínicamente relevante. Un profesional de la salud puede determinar si un aumento es clínicamente significativo.

[00035] “Enfermedad renal en etapa terminal (ESRD)” significa la falla completa o casi completa de la función renal.

[00036] “Calidad de vida” significa la medida en que el funcionamiento físico, psicológico y social de un sujeto se ve afectado por una enfermedad y/o tratamiento de una enfermedad.

La calidad de vida puede verse reducida en sujetos que tienen enfermedad renal poliquística.

[00037] “Función renal deteriorada” significa función renal reducida, en relación con la función renal normal.

[00038] “Ralentizar el empeoramiento de” y “ralentizar el empeoramiento” significan reducir la velocidad a la que una condición médica avanza hacia un estado avanzado.

[00039] “Retrasar el tiempo hasta la diálisis” significa mantener una función renal suficiente para retrasar la necesidad del tratamiento de diálisis.

[00040] “Retrasar el tiempo hasta el trasplante renal” significa mantener una función renal suficiente para retrasar la necesidad de un trasplante renal.

[00041] “Mejora la esperanza de vida” significa alargar la vida de un sujeto tratando uno o más síntomas de una enfermedad en el sujeto.

[00042] “Sujeto” hace referencia a un animal humano o no humano seleccionado para un tratamiento o una terapia.

[00043] “Sujeto que lo necesita” significa un sujeto que se identifica como que necesita una terapia o tratamiento.

[00044] “Se sospecha que el sujeto tiene” significa un sujeto que presenta uno o más indicadores clínicos de una enfermedad.

[00045] “Enfermedad asociada con miR-17” significa una enfermedad o afección que está modulada por la actividad de uno o más miembros de la familia miR-17.

[00046] “Administrar” significa proporcionar un agente o composición farmacéutica a un sujeto e incluye, entre otros, la administración por parte de un profesional médico y la autoadministración.

[00047] “Administración parenteral” significa administración a través de inyección o infusión.

La administración parenteral incluye, pero no se limita a, administración subcutánea, administración intravenosa y administración intramuscular.

5 **[00048]** “Administración subcutánea” significa administración justo debajo de la piel.

[00049] “Administración intravenosa” significa administración en una vena.

10 **[00050]** “Administrado concomitantemente” se refiere a la administración conjunta de dos o más agentes de cualquier manera en la que los efectos farmacológicos de ambos se manifiesten en el paciente al mismo tiempo. La administración concomitante no requiere que ambos agentes se administren en una sola composición farmacéutica, en la misma forma de dosificación o por la misma vía de administración. No es necesario que los efectos de ambos agentes se manifiesten al mismo tiempo. Los efectos solo necesitan superponerse durante un período y no necesitan ser coextensivos.

15 **[00051]** “Duración” significa el período durante el cual continúa una actividad o evento. En ciertas modalidades, la duración del tratamiento es el período durante el cual se administran las dosis de un agente farmacéutico o una composición farmacéutica.

[00052] “Terapia” significa un método de tratamiento de una enfermedad. En ciertas modalidades, la terapia incluye, pero no se limita a, la administración de uno o más agentes farmacéuticos a un sujeto que padece una enfermedad.

20 **[00053]** “Tratar” significa aplicar uno o más procedimientos específicos utilizados para mejorar al menos un indicador de una enfermedad. En ciertas modalidades, el procedimiento específico es la administración de uno o más agentes farmacéuticos. En ciertas modalidades, el tratamiento de PKD incluye, pero no se limita a, reducir el volumen renal total, mejorar la función renal, reducir la hipertensión, y/o reducir el dolor de riñón.

25 **[00054]** “Mejorar” significa disminuir la gravedad de al menos un indicador de una afección o enfermedad. En ciertas modalidades, la mejora incluye un retraso o ralentización del avance de uno o más indicadores de una afección o enfermedad. La gravedad de los indicadores puede determinarse mediante mediciones subjetivas u objetivas, conocidas por los expertos en la técnica.

30 **[00055]** “En riesgo de desarrollar” significa el estado en el que un sujeto está predispuesto a desarrollar una afección o enfermedad. En ciertas modalidades, un sujeto en riesgo de

desarrollar una afección o enfermedad presenta uno o más síntomas de la afección o enfermedad, pero no muestra un número suficiente de síntomas para que se le diagnostique la afección o enfermedad. En ciertas modalidades, un sujeto en riesgo de desarrollar una afección o enfermedad presenta uno o más síntomas de la afección o enfermedad, pero en menor medida de la que se requiere para que se le diagnostique la afección o enfermedad.

[00056] “Prevenir el inicio de” significa prevenir el desarrollo de una afección o enfermedad en un sujeto que está en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección. En ciertas modalidades, un sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección recibe un tratamiento similar al tratamiento recibido por un sujeto que ya tiene la enfermedad o afección.

[00057] “Retrasar el inicio de” significa retrasar el desarrollo de una afección o enfermedad en un sujeto que está en riesgo de desarrollar la enfermedad o condición. En ciertas modalidades, un sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección recibe un tratamiento similar al tratamiento recibido por un sujeto que ya tiene la enfermedad o afección.

[00058] “Dosis” significa una cantidad específica de un agente farmacéutico proporcionada en una sola administración. En ciertas modalidades, una dosis puede administrarse en dos o más bolos, comprimidos o inyecciones. Por ejemplo, en ciertas modalidades, donde se desea la administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen que no se puede acomodar fácilmente con una sola inyección. En tales modalidades, se pueden usar dos o más inyecciones para lograr la dosis deseada. En ciertas modalidades, una dosis puede administrarse en dos o más inyecciones para minimizar la reacción en el lugar de la inyección en un individuo. En ciertas modalidades, una dosis se administra como una infusión lenta.

[00059] “Unidad de dosificación” significa una forma en la que se proporciona un agente farmacéutico. En ciertas modalidades, una unidad de dosificación es un vial que contiene un oligonucleótido liofilizado. En ciertas modalidades, una unidad de dosificación es un vial que contiene un oligonucleótido reconstituido.

[00060] “Cantidad terapéuticamente eficaz” hace referencia a una cantidad de un agente farmacéutico que proporciona un beneficio terapéutico a un animal.

[00061] “Composición farmacéutica” hace referencia a una mezcla de sustancias adecuada para su administración a un individuo que incluye un agente farmacéutico. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender una solución acuosa estéril.

[00062] “Agente farmacéutico” significa una sustancia que proporciona un efecto terapéutico cuando se administra a un sujeto.

[00063] “Ingrediente farmacéutico activo” significa la sustancia en una composición farmacéutica que proporciona un efecto deseado.

5 **[00064]** “Sal farmacéuticamente aceptable” significa una sal fisiológica y farmacéuticamente aceptable de un compuesto proporcionado en el presente documento, es decir, una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto y no tiene efectos toxicológicos no deseados cuando se administra a un sujeto. Los ejemplos no limitantes de sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos proporcionados en el presente
10 documento incluyen formas de sal de sodio y potasio. Los términos "compuesto", "oligonucleótido" y "oligonucleótido modificado", tal como se usan en el presente documento, incluyen sus sales farmacéuticamente aceptables, a menos que se indique específicamente lo contrario.

[00065] “Solución salina” significa una solución de cloruro de sodio en agua.

15 **[00066]** “Función de los órganos mejorada” significa un cambio en la función de los órganos hacia los límites normales. En ciertas modalidades, la función de los órganos se evalúa midiendo las moléculas que se encuentran en la sangre o la orina de un sujeto. Por ejemplo, en ciertas modalidades, la función renal mejorada se mide mediante una reducción del nivel de nitrógeno ureico en sangre, una reducción de la proteinuria, una reducción de la albuminuria,
20 etc.

[00067] “Perfil de seguridad aceptable” significa un patrón de efectos secundarios que está dentro de los límites clínicamente aceptables.

[00068] “Efecto secundario” significa una respuesta fisiológica atribuible a un tratamiento distinta de los efectos deseados. En ciertas modalidades, los efectos secundarios incluyen,
25 entre otros, reacciones en el lugar de inyección, anomalías en pruebas de la función hepática, anomalías en la función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anomalías en el sistema nervioso central y miopatías. Dichos efectos secundarios pueden detectarse directa o indirectamente. Por ejemplo, un aumento en los niveles de aminotransferasa en suero puede indicar una toxicidad hepática o una anomalía en la función hepática. Por ejemplo, un aumento
30 de la bilirrubina puede indicar toxicidad hepática o una anomalía en la función hepática.

[00069] El término "sangre", como se usa en este documento, abarca sangre entera y

fracciones de sangre, como suero y plasma.

[00070] "Anti-miR" significa un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleobases complementaria a un microARN. En ciertas modalidades, un anti-miR es un oligonucleótido modificado.

5 **[00071]** "Anti-miR-17" significa un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobases complementaria a uno o más miembros de la familia miR-17. En ciertas modalidades, un anti-miR-17 es completamente complementario (es decir, 100 % complementario) a uno o más miembros de la familia miR-17. En ciertas modalidades, un anti-miR-17 es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 % complementario a uno o más miembros de la familia miR-17.

[00072] "miR-17" significa el miARN maduro que tiene la secuencia de nucleobase 5'-CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG-3' (SEQ ID NO: 1).

[00073] "miR-20a" significa el miARN maduro que tiene la secuencia de nucleobase 5'-UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG-3' (SEQ ID NO: 2).

15 **[00074]** "miR-20b" significa el miARN maduro que tiene la secuencia de nucleobase 5'-CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG-3' (SEQ ID NO: 3).

[00075] "miR-93" significa el miARN maduro que tiene la secuencia de nucleobase 5'-CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG-3' (SEQ ID NO: 4).

20 **[00076]** "miR-106a" significa el miARN maduro que tiene la secuencia de nucleobase 5'-AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG-3' (SEQ ID NO: 5).

[00077] "miR-106b" significa el miARN maduro que tiene la secuencia de nucleobases 5'-UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU-3' (SEQ ID NO: 6).

[00078] "Secuencia semilla de miR-17" significa la secuencia de nucleobases 5'-AAAGUG-3', que está presente en cada uno de los miembros de la familia miR-17.

25 **[00079]** "Miembro de la familia miR-17" significa un miARN maduro que tiene una secuencia de nucleobases que comprende la secuencia semilla de miR-17 y que se selecciona de miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-93, miR-106a y miR-106b.

[00080] "Familia miR-17" significa el siguiente grupo de miARN: miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-93, miR-106a y miR-106b, cada uno con una secuencia de nucleobases que
30 comprende la secuencia semilla de miR-17.

[00081] "Ácido nucleico diana" significa un ácido nucleico con el que un compuesto

oligomérico está diseñado para hibridarse.

[00082] “Direccionamiento” significa el proceso de diseño y selección de la secuencia de nucleobases que se hibridará con un ácido nucleico diana.

5 **[00083]** “Dirigido a” significa tener una secuencia de nucleobases que permitirá la hibridación con un ácido nucleico diana.

[00084] “Modulación” significa una perturbación de función, cantidad o actividad. En ciertas modalidades, la modulación significa un aumento de la función, la cantidad o la actividad. En ciertas modalidades, la modulación significa una disminución de la función, la cantidad o la actividad.

10 **[00085]** “Expresión” significa cualquier función y paso mediante el cual la información codificada de un gen se convierte en estructuras presentes y operativas en una célula.

[00086] “Secuencia de nucleobases” se refiere al orden de las nucleobases contiguas en un compuesto oligomérico o ácido nucleico, generalmente enumeradas en una orientación de 5' a 3', e independiente de cualquier modificación de nucleobase, azúcar y/o enlace.

15 **[00087]** Las “nucleobases contiguas” hacen referencia a nucleobases inmediatamente adyacentes entre sí en un ácido nucleico.

[00088] “Complementariedad de nucleobases” significa la capacidad de dos nucleobases para emparejarse de forma no covalente a través de enlaces de hidrógeno.

20 **[00089]** “Complementario” significa que un ácido nucleico es capaz de hibridarse con otro ácido nucleico u oligonucleótido. En ciertas modalidades, complementario se refiere a un oligonucleótido capaz de hibridarse con un ácido nucleico diana.

[00090] “Totalmente complementario” significa que cada nucleobase de un oligonucleótido es capaz de emparejarse con una nucleobase en cada posición correspondiente en un ácido nucleico diana. En ciertas modalidades, un oligonucleótido es completamente complementario (también denominado 100 % complementario) a un microARN, es decir, cada nucleobase del oligonucleótido es complementaria a una nucleobase en una posición correspondiente en el microARN. Un oligonucleótido modificado puede ser completamente complementario a un microARN y tener un número de nucleósidos enlazados menor que la longitud del microARN. Por ejemplo, un oligonucleótido con 16 nucleósidos enlazados, en el que cada nucleobase del oligonucleótido es complementaria a una nucleobase en una posición correspondiente en un microARN, es completamente complementario al microARN. En ciertas modalidades, un

25
30

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

[00091] "Porcentaje de complementariedad" significa el porcentaje de nucleobases de un oligonucleótido que son complementarias a una porción de igual longitud de un ácido nucleico diana. El porcentaje de complementariedad se calcula dividiendo el número de nucleobases del oligonucleótido que son complementarias a las nucleobases en las posiciones correspondientes en el ácido nucleico diana por el número total de nucleobases en el oligonucleótido.

[00092] "Porcentaje de identidad" significa el número de nucleobases en un primer ácido nucleico que son idénticas a las nucleobases en las posiciones correspondientes en un segundo ácido nucleico, dividido por el número total de nucleobases en el primer ácido nucleico. En ciertas modalidades, el primer ácido nucleico es un microARN y el segundo ácido nucleico es un microARN. En ciertas modalidades, el primer ácido nucleico es un oligonucleótido y el segundo ácido nucleico es un oligonucleótido.

[00093] "Hibridar" significa la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que se produce a través de la complementariedad de nucleobases.

[00094] "Desajuste" significa una nucleobase de un primer ácido nucleico que no es capaz de emparejarse mediante Watson-Crick con una nucleobase en una posición correspondiente de un segundo ácido nucleico.

[00095] "Idéntica" en el contexto de las secuencias de nucleobases, significa tener la misma secuencia de nucleobases, independientes de modificaciones de nucleobases, enlaces y/o azúcar e independientes del estado de metilación de cualquier pirimidina presente.

[00096] "MicroARN" significa un ARN no codificante endógeno de entre 18 y 25 nucleobases de longitud, que es el producto de la escisión de un pre-microARN por la enzima Dicer. Se encuentran ejemplos de microARN maduros en la base de datos de microARN conocida como miRBase (microrna.sanger.ac.uk/). En ciertas modalidades, el microARN se abrevia como "miR".

[00097] "Transcrito regulado por microARN" significa un transcrito que está regulado por un microARN.

[00098] "Secuencia semilla emparejada" significa una secuencia de nucleobases que es complementaria a una secuencia semilla, y tiene la misma longitud que la secuencia semilla.

- [00099]** “Compuesto oligomérico” significa un compuesto que comprende una pluralidad de subunidades monoméricas enlazadas. Los compuestos oligoméricos incluyen oligonucleótidos.
- 5 **[000100]** “Oligonucleótido” significa un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos enlazados, cada uno de los cuales puede estar modificado o sin modificar, independientemente uno del otro.
- [000101]** “Enlace internucleósido de origen natural” hace referencia a un enlace fosfodiéster 3' a 5' entre nucleósidos.
- 10 **[000102]** “Azúcar natural” hace referencia a un azúcar que se encuentra en el ADN (2'-H) o ARN (2'-OH).
- [000103]** “Enlace internucleósido” significa un enlace covalente entre nucleósidos adyacentes.
- [000104]** “Nucleósidos enlazados” significa nucleósidos unidos mediante un enlace covalente.
- 15 **[000105]** “Nucleobase” significa un resto heterocíclico capaz de emparejarse de forma no covalente con otra nucleobase.
- [000106]** “Nucleósido” hace referencia a una nucleobase enlazada a un resto de azúcar.
- [000107]** “Nucleótido” hace referencia a un nucleósido con un grupo fosfato enlazado de manera covalente a la parte de azúcar de un nucleósido.
- 20 **[000108]** “Compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste en” una cantidad de nucleósidos enlazados significa un compuesto que incluye un oligonucleótido modificado que tiene la cantidad especificada de nucleósidos enlazados. Por tanto, el compuesto puede incluir sustituyentes o conjugados adicionales. A menos que se indique lo contrario, el oligonucleótido modificado no se hibrida con una cadena complementaria y el
- 25 compuesto no incluye ningún nucleósido adicional además de los del oligonucleótido modificado.
- [000109]** “Oligonucleótido modificado” significa un oligonucleótido monocatenario que tiene una o más modificaciones en relación con un extremo natural, azúcar, nucleobase, y/o enlace internucleósido. Un oligonucleótido modificado puede comprender nucleósidos no modificados.
- 30 **[000110]** “Nucleósido modificado” significa un nucleósido que tiene cualquier cambio con respecto a un nucleósido de origen natural. Un nucleósido modificado puede tener un azúcar

modificado y una nucleobase no modificada. Un nucleósido modificado puede tener un azúcar modificado y una nucleobase modificada. Un nucleósido modificado puede tener un azúcar natural y una nucleobase modificada. En ciertas modalidades, un nucleósido modificado es un nucleósido bicíclico. En ciertas modalidades, un nucleósido modificado es un nucleósido no bicíclico.

[000111] “Enlace internucleósido modificado” significa cualquier cambio de un enlace internucleósido natural.

[000112] “Enlace internucleósido fosforotioato” significa un enlace entre nucleósidos donde uno de los átomos no puente es un átomo de azufre.

[000113] “Resto de azúcar modificado” hace referencia a la sustitución y/o cualquier cambio de un azúcar natural.

[000114] “Nucleobase no modificada” se refiere a las bases heterocíclicas naturales de ARN o ADN: las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) (incluida la 5-metilcitosina) y uracilo (U).

[000115] “5-metilcitosina” hace referencia a una citosina que comprende un grupo metilo que se une a la posición 5.

[000116] “Citosina no metilada” significa una citosina que no tiene un grupo metilo unido a la posición 5.

[000117] “Nucleobase modificada” significa cualquier nucleobase que no sea una nucleobase no modificada.

[000118] “Resto de azúcar” significa un furanosilo de origen natural o un resto de azúcar modificado.

[000119] “Resto de azúcar modificado” significa un resto de azúcar sustituido o un sustituto del azúcar.

[000120] “Azúcar 2'-O-metilo” o “azúcar 2'-OMe” significa un azúcar que tiene una modificación O-metilo en la posición 2'.

[000121] “Azúcar 2'-O-metoxietilo” o “azúcar 2'-MOE” significa un azúcar que tiene una modificación O-metoxietilo en la posición 2'.

[000122] “2'-fluoro” o “2'-F” significa un azúcar que tiene una modificación fluoro de la posición 2'.

[000123] “Resto de azúcar bicíclico” hace referencia a un resto de azúcar modificado que

comprende un anillo de 4 a 7 miembros (lo cual incluye, de modo no taxativo, un furanosilo) que comprende un puente que conecta dos átomos del anillo de 4 a 7 miembros para formar un segundo anillo, lo cual produce una estructura bicíclica. En ciertas modalidades, el anillo de 4 a 7 miembros es un anillo de azúcar. En determinadas ciertas, el anillo de 4 a 7 miembros es un furanosilo. En ciertas modalidades de ese tipo, el puente conecta el carbono en 2' y el carbono en 4' del furanosilo. Los restos de azúcar bicíclicos ejemplares no limitantes incluyen LNA, ENA, cEt, S-cEt y R-cEt.

[000124] “Resto de azúcar de ácido nucleico bloqueado (LNA, por sus siglas en inglés)” se refiere a un resto de azúcar sustituido que comprende un puente (CH₂)-O entre los átomos del anillo de furanosa 4' y 2'.

[000125] “Resto de azúcar ENA” se refiere a un resto de azúcar sustituido que comprende un puente (CH₂)₂-O entre los átomos del anillo de furanosa 4' y 2'.

[000126] “Resto de azúcar de etilo (cEt) restringido” significa un resto de azúcar sustituido que comprende un puente CH(CH₃)-O entre los átomos del anillo de furanosa 4' y 2'. En ciertas modalidades, el puente CH(CH₃)-O está restringido en la orientación S. En ciertas modalidades, el puente CH(CH₃)-O está restringido en la orientación R.

[000127] “Resto de azúcar S-cEt” significa un resto de azúcar sustituido que comprende un puente CH(CH₃)-O restringido en S entre los átomos del anillo de furanosa 4' y 2'.

[000128] “Resto de azúcar R-cEt” significa un resto de azúcar sustituido que comprende un puente CH(CH₃)-O restringido en R entre los átomos del anillo de furanosa 4' y 2'.

[000129] “Nucleósido 2'-O-metilo” significa un nucleósido modificado en 2' que tiene una modificación de azúcar 2'-O-metilo.

[000130] “Nucleósido 2'-O-metoxietilo” significa un nucleósido modificado en 2' que tiene una modificación de azúcar 2'-O-metoxietilo. Un nucleósido 2'-O-metoxietilo puede comprender una nucleobase modificada o no modificada.

[000131] “Nucleósido 2'-fluoro” significa un nucleósido modificado en 2' que tiene una modificación de azúcar 2'-fluoro. Un nucleósido 2'-fluoro puede comprender una nucleobase modificada o no modificada.

[000132] “Nucleósido bicíclico” significa un nucleósido modificado en 2' que tiene un resto de azúcar bicíclico. Un nucleósido bicíclico puede tener una nucleobase modificada o no modificada.

[000133] “Nucleósido cEt” significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar cEt. Un nucleósido cEt puede comprender una nucleobase modificada o no modificada.

[000134] “Nucleósido S-cEt” significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar S-cEt.

5 **[000135]** “Nucleósido R-cEt” significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar R-cEt.

[000136] “ β -D-desoxirribonucleósido” significa un nucleósido de ADN de origen natural.

[000137] “ β -D-ribonucleósido” significa un nucleósido de ARN de origen natural.

[000138] “Nucleósido LNA” significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar LNA.

10 **[000139]** “Nucleósido ENA” significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar ENA.

[000140] “Aceptor de enlace de hidrógeno” significa el componente de un enlace de hidrógeno que no suministra el átomo de hidrógeno compartido.

[000141] “Donante de enlace de hidrógeno” significa el enlace o molécula que suministra el átomo de hidrógeno de un enlace de hidrógeno.

15

Visión general

[000142] La enfermedad renal poliquística (PKD) es una forma hereditaria de enfermedad renal en la que se desarrollan quistes llenos de líquido en los riñones, lo que provoca insuficiencia renal y, a menudo, enfermedad renal en etapa terminal. Ciertas PKD también se caracterizan por agrandamiento de los riñones. La proliferación excesiva de quistes es una característica patológica distintiva de la PKD. En el manejo de la PKD, el objetivo principal del tratamiento es controlar síntomas como la hipertensión y las infecciones, mantener la función renal y prevenir el inicio de la enfermedad renal terminal (ESRD), que a su vez mejora la esperanza de vida de los sujetos con PKD.

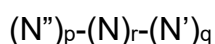
20 **[000143]** miR-17 ha sido identificado como una diana para el tratamiento de PKD. El compuesto anti-miR-17 RGLS4326 se descubrió analizando una biblioteca químicamente diversa y racionalmente diseñada de oligonucleótidos anti-miR-17 para obtener propiedades farmacéuticas óptimas. RGLS4326 se distribuye preferentemente a los quistes derivados de los conductos colectores y los riñones, desplaza el miR-17 de los polisomas activos en la traducción y desreprime múltiples dianas de ARNm de miR-17, incluidos Pkd1 y Pkd2. Es importante
30 destacar que RGLS4326 atenúa el crecimiento de quistes en modelos humanos de ADPKD *in*

vitro y múltiples modelos de ratones con PKD después de la administración subcutánea. En octubre de 2020 se inició un ensayo clínico de fase 1b de RGLS4326 para el tratamiento de pacientes con enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ADPKD).

[000144] Después del inicio del ensayo clínico de fase 1b, los estudios de toxicología no clínicos revelaron hallazgos relacionados con el SNC, que incluyen marcha anormal, actividad motora reducida, y/o postración, a altas dosis de RGLS4326 en ratones. Se descubrió que RGLS4326 es un antagonista del receptor AMPA (AMPA-R), un receptor de glutamato y canal iónico en las sinapsis excitatorias en el sistema nervioso central (SNC) que media la neurotransmisión excitatoria rápida y, por lo tanto, es un componente clave de todas las redes neuronales. El antagonismo del receptor AMPA podría explicar los hallazgos mediados por el SNC observados con dosis altas de RGLS4326 en modelos toxicológicos no clínicos. Si bien no se observaron hallazgos relacionados con el SNC en sujetos humanos, es preferible evitar el antagonismo del receptor AMPA. En consecuencia, se analizó una biblioteca de compuestos anti-miR-17 para identificar compuestos con propiedades fisicoquímicas y farmacológicas comparables a RGLS4326, que también tienen un perfil de seguridad más favorable. Uno de estos compuestos, RG-NG-1015, se identificó y seleccionó como agente terapéutico candidato para el tratamiento de ADPKD.

Compuestos

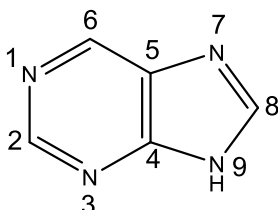
[000145] En la presente se proporciona un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado, en donde el oligonucleótido modificado tiene la siguiente estructura en la orientación 5' a 3':



en donde cada N'' es, independientemente, un nucleósido modificado o no modificado; p es de 0 a 14; en donde si p no es 0, la secuencia de nucleobases de $(N'')_p$ es complementaria a una porción de igual longitud de la secuencia de nucleobases de miR-17; cada N de $(N)_r$ es, independientemente, un nucleótido modificado o no modificado, y la secuencia de nucleobases de $(N)_r$ es 5'-AGCACUUU-3'; N' es un nucleósido que comprende un resto de azúcar modificado; q es 0 o 1; en donde si q es 1, la nucleobase de N' es una nucleobase de uracilo, una nucleobase de citosina o una nucleobase de purina, siempre que la nucleobase de purina no tenga un aceptor de enlaces de hidrógeno en la posición 6; y cada citosina se selecciona

independientemente de una citosina no metilada y una 5-metilcitosina; o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

[000146] Los átomos de las nucleobases de purina están numerados del uno al nueve, de acuerdo con la convención de numeración estándar para las nucleobases, como se muestra en la siguiente estructura:



[000147] Los átomos o grupos unidos al átomo del anillo de la nucleobase tienen el mismo número que el átomo del anillo al que están unidos.

[000148] Ciertas nucleobases, por ejemplo guanosina e inosina, contienen aceptores de enlaces de hidrógeno en la posición 6. El aceptor de enlaces de hidrógeno en la posición 6 de la guanosina es el oxígeno unido al carbono de la posición 6. El aceptor de enlaces de hidrógeno en la posición 6 de la inosina es el oxígeno unido al carbono de la posición 6.

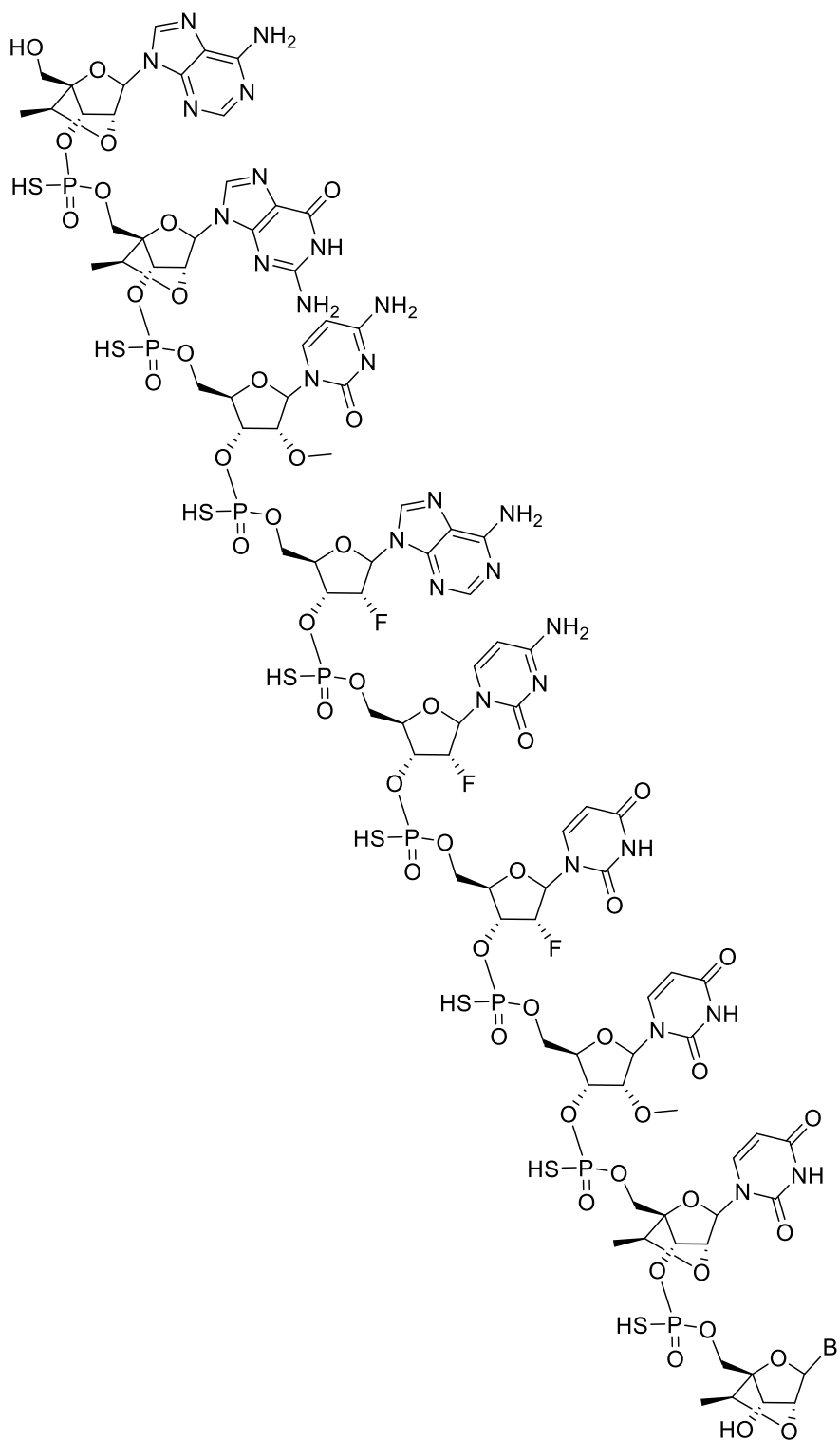
[000149] Las nucleobases de purina que no tienen un aceptor de enlaces de hidrógeno en la posición 6 incluyen, sin limitación, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, isoguanosina y adenosina. El NH₂ presente en la posición 6 de cada una de las funciones de 2,6-diaminopurina, isoguanosina y adenosina como un donante de enlaces de hidrógeno. La posición 6 de la 2-aminopurina no tiene sustituyentes y, por lo tanto, carece de un aceptor o donante de enlaces de hidrógeno.

[000150] En ciertas modalidades, la estructura de (N)_r es: A_SG_SC_MA_FC_FU_FU_MU_S, en donde los nucleósidos seguidos del subíndice “M” son nucleósidos de 2'-O-metilo; los nucleósidos seguidos del subíndice “F” son nucleósidos 2'-fluoro; y los nucleósidos seguidos del subíndice “S” son nucleósidos S-cEt.

[000151] En ciertas modalidades, al menos un enlace internucleósido es un enlace internucleósido fosforotioato. En ciertas modalidades, cada enlace internucleósido es un enlace internucleósido fosforotioato.

[000152] En ciertas modalidades, en donde q es 1. En ciertas modalidades, q es 0. En ciertas modalidades, p es 0. En ciertas modalidades, p se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14.

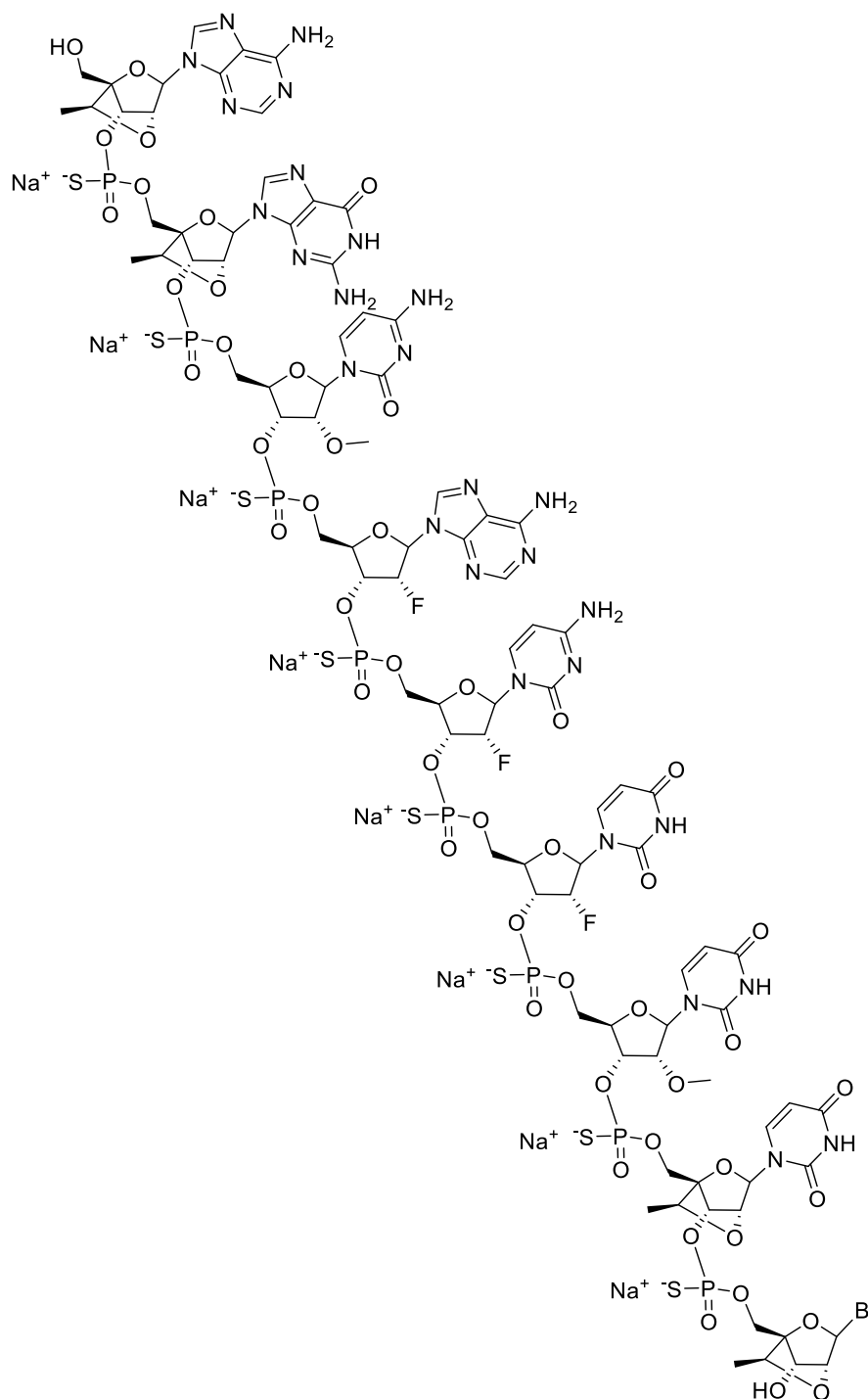
- [000153]** En ciertas modalidades, la secuencia de nucleobases de (N'')_p no tiene más de un desajuste con la secuencia de nucleobases de miR-17 (SEQ ID NO: 1). En ciertas modalidades, la secuencia de nucleobases de (N'')_p no tiene desajustes con la secuencia de nucleobases de miR-17 (SEQ ID NO: 1). En ciertas modalidades, la secuencia de nucleobases de (N'')_p se selecciona de CUACCUGCACUGUA (SEQ ID NO: 7), CUACCUGCACUGU (SEQ ID NO: 8), CUACCUGCACUG (SEQ ID NO: 9), CUACCUGCACU (SEQ ID NO: 10), CUACCUGCAC (SEQ ID NO: 11), CUACCUGCA, CUACCUGC, CUACCUG, CUACCU, CUACC, CUAC, CUA, CU, y C.
- [000154]** En ciertas modalidades, la nucleobase de N' es una nucleobase de purina que no tiene un aceptor de enlaces de hidrógeno en la posición 6. En ciertas modalidades, la nucleobase de N' se selecciona de adenosina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina e isoguanosina.
- [000155]** En ciertas modalidades, el resto de azúcar de N' no es un azúcar 2'-O-metil. En ciertas modalidades, el resto de azúcar de N' es un azúcar 2'-O-metoxietilo o un azúcar S-cEt.
- [000156]** En ciertas modalidades, la estructura del oligonucleótido modificado es 5'-AsGsC_MA_FC_FU_FU_MU_SAs-3', en donde cada citosina es una citosina no metilada. En ciertas modalidades, la estructura del oligonucleótido modificado es 5'-AsGsC_MA_FC_FU_FU_MU_SU_S-3', en donde cada citosina es una citosina no metilada. En ciertas modalidades, la estructura del oligonucleótido modificado es 5'-AsGsC_MA_FC_FU_FU_MU_SC_S-3', en donde cada citosina es una citosina no metilada. El compuesto de la reivindicación 2, en donde la estructura del oligonucleótido modificado es 5'-AsGsC_MA_FC_FU_FU_MU_S-3', en donde cada citosina es una citosina no metilada.
- [000157]** En ciertas modalidades, el compuesto consiste en el oligonucleótido modificado.
- [000158]** En ciertas modalidades, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de sodio.
- [000159]** En el presente documento se proporciona un oligonucleótido modificado que tiene la estructura:



en donde B es una nucleobase de uridina, una nucleobase de citosina o una nucleobase de purina, siempre que la nucleobase de purina no tenga un aceptor de enlaces de hidrógeno en la posición 6; o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas. En ciertas modalidades,

B se selecciona de adenosina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina e isoguanosina.

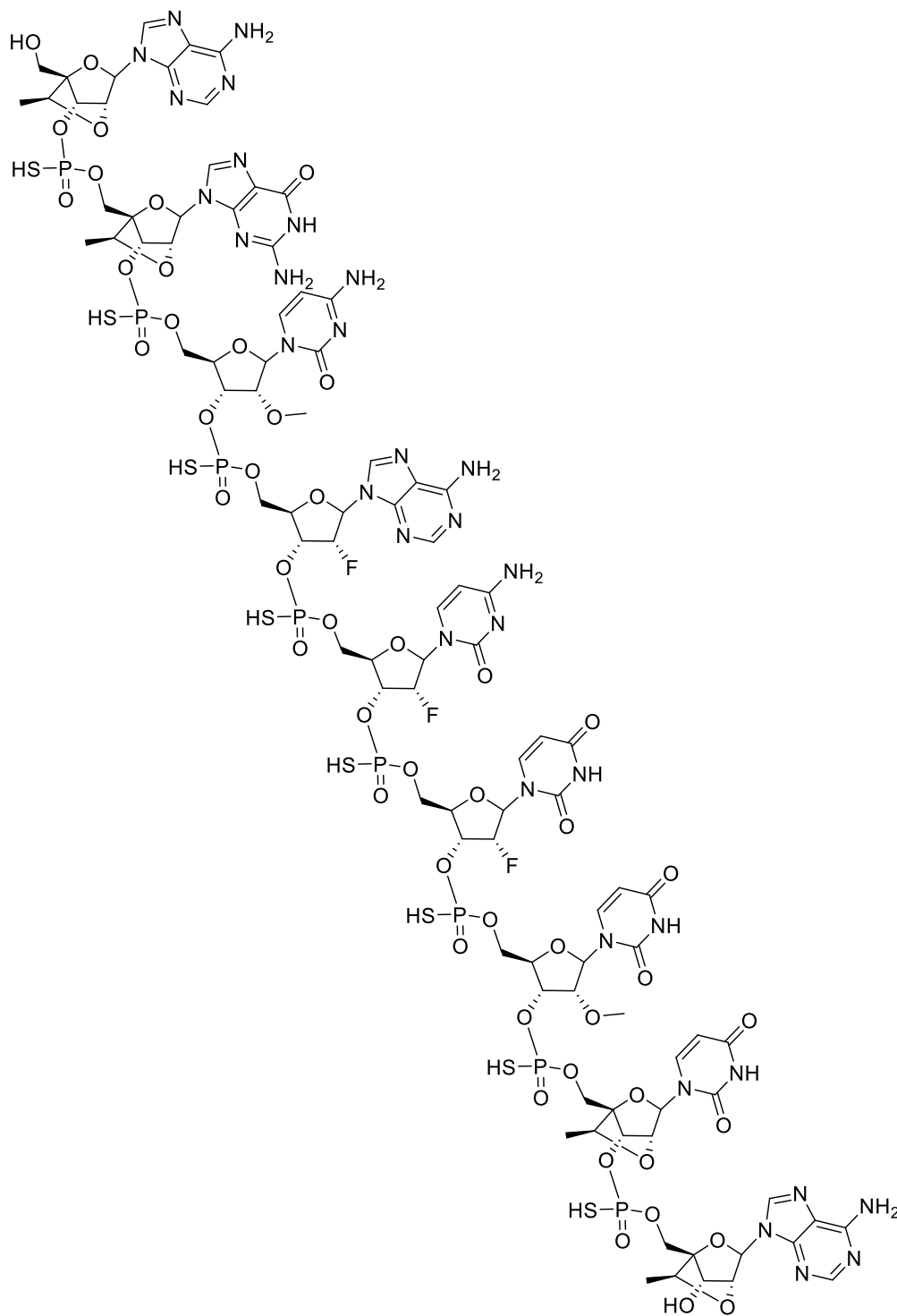
[000160] En el presente documento se proporciona un oligonucleótido modificado que tiene la estructura:



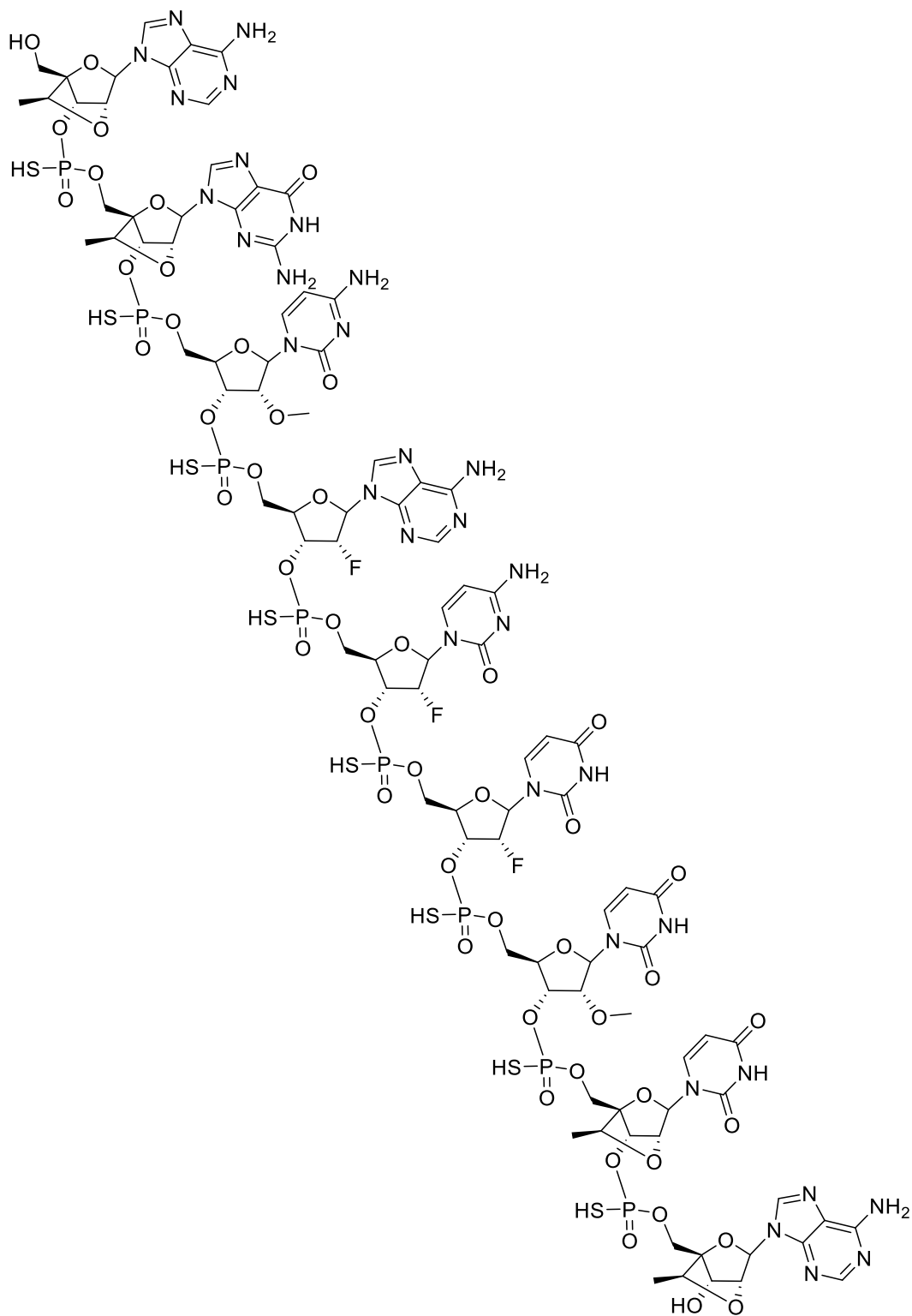
- 5 en donde B es una nucleobase de uridina, una nucleobase de citosina o una nucleobase de purina, siempre que la nucleobase de purina no tenga un aceptor de enlaces de hidrógeno en

la posición 6. En ciertas modalidades, B se selecciona de adenosina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina e isoguanosina.

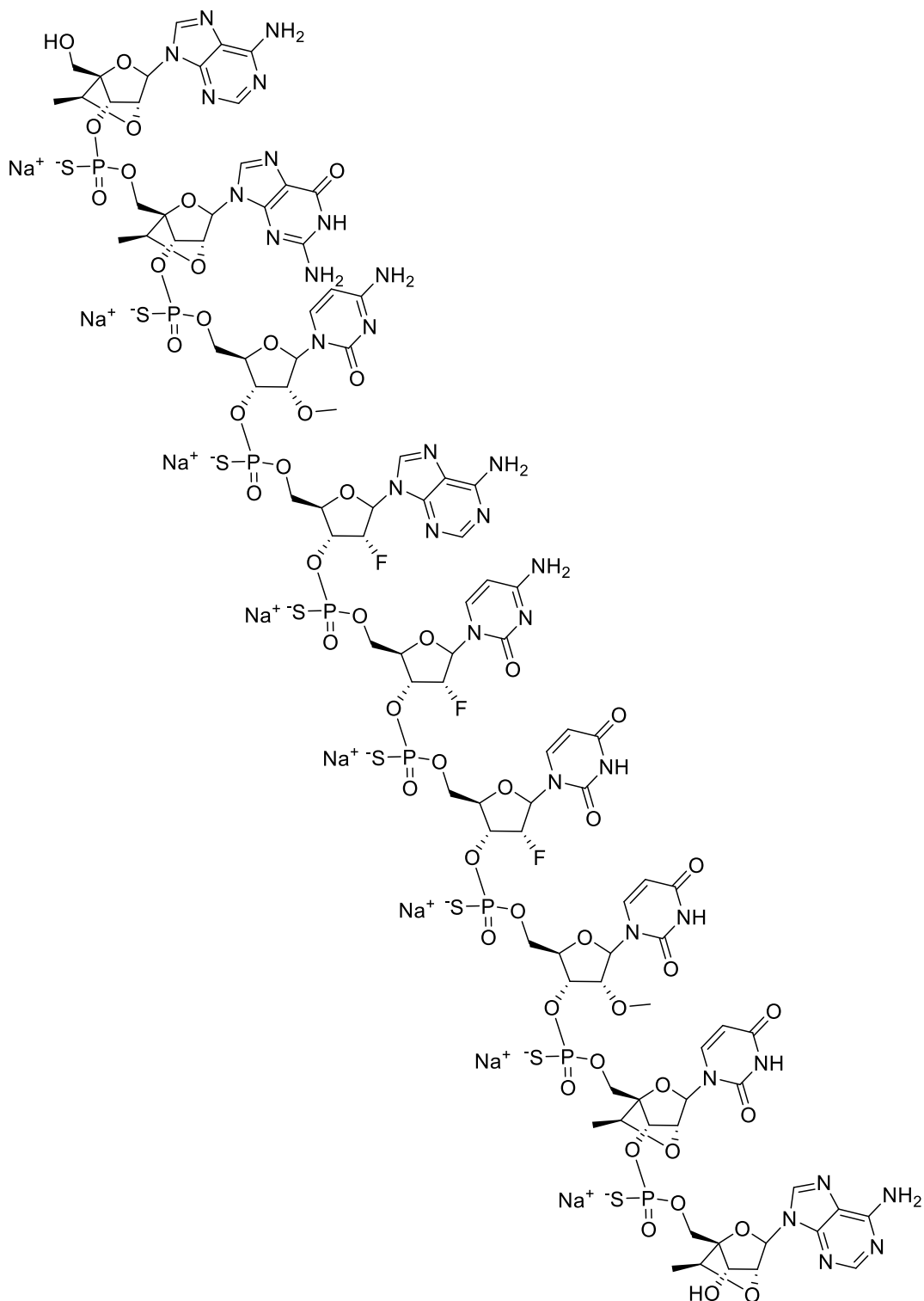
[000161] En el presente documento se proporciona un oligonucleótido modificado denominado RG-NG-1015, en donde la estructura del oligonucleótido modificado es:



[000162] En el presente documento también se proporcionan sales farmacéuticamente aceptables del oligonucleótido modificado RG-NG-1015. Por lo tanto, en algunas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este. Una sal farmacéuticamente aceptable ejemplar no limitante de RG-NG-1015 tiene la estructura:



[000163] En algunas modalidades, una sal farmacéuticamente aceptable de un

oligonucleótido modificado comprende menos contraiones catiónicos (como Na⁺) que enlaces fosforotioato y/o fosfodiéster por molécula (es decir, algunos enlaces fosforotioato y/o fosfodiéster están protonados). En algunas modalidades, una sal farmacéuticamente aceptable de RG-NG-1015 comprende menos de 8 contraiones catiónicos (como Na⁺) por molécula de RG-NG-1015. Es decir, en algunas modalidades, una sal farmacéuticamente aceptable de RG-NG-1015 puede comprender, en promedio, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 contraiones catiónicos por molécula de RG-NG-1015, con los grupos fosforotioato restantes protonados.

Ciertos usos

10 **[000164]** En este documento se proporcionan métodos para inhibir la actividad de uno o más miembros de la familia miR-17 en una célula, que comprenden poner en contacto una célula con un compuesto proporcionado en este documento, que comprende una secuencia de nucleobases complementaria a la secuencia semilla de miR-17.

15 **[000165]** En el presente documento se proporcionan métodos para inhibir la actividad de uno o más miembros de la familia miR-17 en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento. En ciertas modalidades, el sujeto tiene una enfermedad asociada con uno o más miembros de la familia miR-17.

20 **[000166]** En el presente documento se proporcionan métodos para el tratamiento de la enfermedad renal poliquística (PKD), que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite un compuesto proporcionado en el presente documento, que comprende una secuencia de nucleobases complementaria a la secuencia semilla de miR-17. En ciertas modalidades, el sujeto tiene una enfermedad renal poliquística. En ciertas modalidades, la enfermedad renal poliquística se selecciona de enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ADPKD),
25 enfermedad renal poliquística autosómica recesiva (ARPKD) y nefronoftisis (NPHP). En ciertas modalidades, la enfermedad renal poliquística se selecciona de enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ADPKD) y enfermedad renal poliquística autosómica recesiva (ARPKD).

30 **[000167]** En ciertas modalidades, el sujeto tiene un trastorno que se caracteriza por múltiples indicadores no renales y también por enfermedad renal poliquística. Dichos trastornos incluyen, por ejemplo, el síndrome de Joubert y trastornos relacionados (JSRD), el síndrome de

Meckel (MKS) o el síndrome de Bardet-Biedl (BBS). Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan métodos para el tratamiento de la enfermedad renal poliquística (PKD), que comprenden administrar a un sujeto un compuesto proporcionado en el presente documento, que comprende una secuencia de nucleobases complementaria a la secuencia semilla de miR-17, en donde el sujeto tiene el síndrome de Joubert y trastornos relacionados (JSRD), síndrome de Meckel (MKS) o síndrome de Bardet-Biedl (BBS). En el presente documento se proporcionan métodos para el tratamiento de la enfermedad renal poliquística (PKD), que comprenden administrar un compuesto proporcionado en el presente documento, que comprende una secuencia de nucleobases complementaria a la secuencia semilla de miR-17, en donde se sospecha que el sujeto tiene el síndrome de Joubert y trastornos relacionados (JSRD), síndrome de Meckel (MKS) o síndrome de Bardet-Biedl (BBS).

[000168] En ciertas modalidades, la enfermedad renal poliquística es enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ADPKD). La ADPKD es causada por mutaciones en el gen *PKD1* o *PKD2*. La ADPKD es una enfermedad progresiva en la que la formación de quistes y el agrandamiento renal conducen a insuficiencia renal y, finalmente, a enfermedad renal en etapa terminal en el 50 % de los pacientes a los 60 años. Los pacientes con ADPKD pueden requerir diálisis de por vida y/o trasplante de riñón. La ADPKD es la causa genética más frecuente de insuficiencia renal. La proliferación excesiva de quistes es una característica patológica distintiva de la ADPKD. En el manejo de la PKD, el objetivo principal del tratamiento es mantener la función renal y prevenir el inicio de enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), que a su vez mejora la esperanza de vida de los sujetos con PKD. El volumen renal total generalmente aumenta de manera constante en pacientes con ADPKD, y los aumentos se correlacionan con una disminución de la función renal. En este documento se proporcionan métodos para el tratamiento de ADPKD, que comprenden administrar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene ADPKD un compuesto proporcionado en este documento, que comprende una secuencia de nucleobases complementaria a la secuencia semilla de miR-17.

[000169] En ciertas modalidades, la enfermedad renal poliquística es enfermedad renal poliquística autosómica recesiva (ARPKD). La ARPKD es causada por mutaciones en el gen *PKHD1* y es una causa de enfermedad renal crónica en niños. Un fenotipo renal típico de ARPKD son los riñones agrandados; sin embargo, ARPKD tiene efectos notables en otros órganos, particularmente en el hígado. Los pacientes con ARPKD progresan a la enfermedad

renal en etapa terminal y requieren un trasplante de riñón tan pronto como a los 15 años de edad. En este documento se proporcionan métodos para el tratamiento de ARPKD, que comprenden administrar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene ARPKD un compuesto proporcionado en este documento, que comprende una secuencia de nucleobases complementaria a la secuencia semilla de miR-17.

[000170] En ciertas modalidades, la enfermedad renal poliquística es nefronoptosis (NPHP). La nefronoptosis es una enfermedad renal quística autosómica recesiva que es una causa frecuente de ESRD en niños. La NPHP se caracteriza por riñones de tamaño normal o reducido, quistes concentrados en la unión corticomedular y fibrosis tubulointersticial. Se han identificado mutaciones en uno de varios genes NPHP, por ejemplo, *NPHP1*, en pacientes con NPHP. En este documento se proporcionan métodos para el tratamiento de NPHP, que comprenden administrar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene NPHP un compuesto proporcionado en este documento, que comprende una secuencia de nucleobases complementaria a la secuencia semilla de miR-17.

[000171] En ciertas modalidades, un sujeto que tiene enfermedad renal poliquística tiene el síndrome de Joubert y trastornos relacionados (JSRD). JSRD incluye una amplia gama de características distintivas, que incluyen anomalías cerebrales, retinales y esqueléticas. Ciertos sujetos con JSRD tienen enfermedad renal poliquística, además de las características distintivas de JSRD. Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan métodos para el tratamiento de la enfermedad renal poliquística en un sujeto que tiene JSRD, que comprenden administrar a un sujeto que tiene JSRD un compuesto proporcionado en el presente documento, que comprende una secuencia de nucleobases complementaria a la secuencia semilla de miR-17. En ciertas modalidades, se sospecha que un sujeto tiene JSRD.

[000172] En ciertas modalidades, un sujeto que tiene enfermedad renal poliquística tiene el síndrome de Meckel (MKS). MKS es un trastorno con signos y síntomas graves en muchas partes del cuerpo, incluidos el sistema nervioso central, el sistema esquelético, el hígado, los riñones y el corazón. Las características comunes de MKS son la presencia de numerosos quistes llenos de líquido en el riñón y agrandamiento del riñón. Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan métodos para el tratamiento de MKS, que comprenden administrar a un sujeto que tiene MKS un compuesto proporcionado en el presente documento, que comprende una secuencia de nucleobases complementaria a la secuencia semilla de miR-17.

En ciertas modalidades, se sospecha que el sujeto tiene MKS.

[000173] En ciertas modalidades, un sujeto que tiene enfermedad renal poliquística tiene el síndrome de Bardet-Biedl (BBS). BBS es un trastorno que afecta muchas partes del cuerpo, incluidos los ojos, el corazón, los riñones, el hígado y el sistema digestivo. Una característica distintiva del BBS es la presencia de quistes renales. Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan métodos para el tratamiento de la enfermedad renal poliquística en un sujeto que tiene BBS, que comprenden administrar a un sujeto que tiene BBS un compuesto proporcionado en el presente documento, que comprende una secuencia de nucleobases complementaria a la secuencia semilla de miR-17. En ciertas modalidades, se sospecha que el sujeto tiene BBS.

[000174] En ciertas modalidades, se ha diagnosticado que el sujeto tiene PKD antes de la administración del compuesto que comprende el oligonucleótido modificado. El diagnóstico de PKD se puede lograr a través de la evaluación de parámetros que incluyen, entre otros, los antecedentes familiares de un sujeto, características clínicas (que incluyen, entre otros, hipertensión, albuminuria, hematuria y TFG alterado), estudios de imágenes renales (que incluyen, entre otros, IRM, ultrasonido y escaneo TC), y/o análisis histológico.

[000175] En ciertas modalidades, el diagnóstico de PKD incluye la detección de mutaciones en uno o más de los genes *PKD1* o *PKD2*. En ciertas modalidades, el diagnóstico de ARPKD incluye la detección de mutaciones en el gen *PKHP1*. En ciertas modalidades, el diagnóstico de NPHP incluye la detección de una o más mutaciones en uno o más de los genes *NPHP1*, *NPHP2*, *NPHP3*, *NPHP4*, *NPHP5*, *NPHP6*, *NPHP7*, *NPHP8* o *NPHP9*. En ciertas modalidades, el diagnóstico de JSRD incluye la detección de mutaciones en los genes *NPHP1*, *NPHP6*, *AHI1*, *MKS3* o *RPGRIP1L*. En ciertas modalidades, el diagnóstico de MKS incluye la detección de mutaciones en los genes *NPHP6*, *MKS3*, *RPGRIP1L*, *NPHP3*, *CC2D2A*, *BBS2*, *BBS4*, *BBS6* o *MKS1*. En ciertas modalidades, el diagnóstico de BBS incluye la detección de mutaciones en los genes *BBS2*, *BBS4*, *BBS6*, *MKS1*, *BBS1*, *BBS3*, *BBS5*, *BBS7*, *BBS7*, *BBS8*, *BBS9*, *BBS10*, *BBS11* o *BBS12*.

[000176] En ciertas modalidades, el sujeto tiene un volumen renal total aumentado. En ciertas modalidades, el volumen renal total es el volumen renal total ajustado a la altura (HtTKV). En ciertas modalidades, el sujeto tiene hipertensión. En ciertas modalidades, el sujeto tiene una función renal deteriorada. En ciertas modalidades, el sujeto necesita una función renal

mejorada. En ciertas modalidades, se identifica que el sujeto tiene función renal deteriorada.

[000177] En ciertas modalidades, los niveles de uno o más miembros de la familia miR-17 aumentan en el riñón de un sujeto que tiene PKD. En ciertas modalidades, antes de la administración, se determina que un sujeto tiene un nivel elevado de uno o más miembros de la familia miR-17 en el riñón. El nivel de un miembro de la familia miR-17 se puede medir a partir de material de biopsia renal. En ciertas modalidades, antes de la administración, se determina que un sujeto tiene un nivel elevado de uno o más miembros de la familia miR-17 en la orina o la sangre del sujeto. En ciertas modalidades, antes de la administración, se determina que un sujeto tiene un nivel reducido de policistina 1 (PC1) o policistina 2 (PC2) en la orina del sujeto. En ciertas modalidades, antes de la administración, se determina que un sujeto tiene un nivel reducido de policistina 1 (PC1) o policistina 2 (PC2) en la orina del sujeto. En ciertas modalidades, antes de la administración, se determina que un sujeto tiene un nivel reducido de policistina 1 (PC1) y/o policistina 2 (PC2) en la orina del sujeto.

[000178] En cualquiera de las modalidades proporcionadas en el presente documento, un sujeto puede someterse a ciertas pruebas para diagnosticar la enfermedad renal poliquística en el sujeto, por ejemplo, para determinar la causa de la enfermedad renal poliquística, para evaluar la extensión de la enfermedad renal poliquística en el sujeto, y/o para determinar la respuesta del sujeto al tratamiento. Estas pruebas pueden evaluar los marcadores de enfermedad renal poliquística. Algunas de estas pruebas, como la tasa de filtración glomerular y el nivel de nitrógeno ureico en sangre, también son indicadores de la función renal. Los marcadores de enfermedad poliquística incluyen, sin limitación: medición del volumen renal total en el sujeto; medición de la hipertensión en el sujeto; evaluación del dolor renal en el sujeto; medición de la fibrosis en el sujeto; medición de policistina 1 (PC1) en la orina del sujeto; medición de policistina 2 (PC2) en la orina del sujeto; medición del nivel de nitrógeno ureico en sangre en el sujeto; medición del nivel de creatinina en suero en el sujeto; medición del aclaramiento de creatinina en el sujeto; medición de la albuminuria en el sujeto; medición de la proporción albúmina:creatinina en el sujeto; medición de la tasa de filtración glomerular en el sujeto; medición de la hematuria en el sujeto; medición de la proteína NGAL en la orina del sujeto; y/o medición de la proteína KIM-1 en la orina del sujeto. A menos que se indique lo contrario en este documento, el nivel de nitrógeno ureico en sangre, el nivel de creatinina sérica, el aclaramiento de creatinina, la albuminuria, la proporción albúmina:creatinina, la tasa de

filtración glomerular y la hematuria se refieren a una medición en la sangre (tal como sangre entera o suero) de un sujeto.

[000179] Los marcadores de enfermedad renal poliquística se determinan mediante pruebas de laboratorio. Los rangos de referencia para los marcadores individuales pueden variar de un laboratorio a otro. La variación puede deberse, por ejemplo, a diferencias en los ensayos específicos utilizados. Por lo tanto, los límites superior e inferior de la distribución normal del marcador dentro de una población, también conocidos como límite superior de la normalidad (LSN) y límite inferior de la normalidad (LIN), respectivamente, pueden variar de un laboratorio a otro. Para cualquier marcador en particular, un profesional de la salud puede determinar qué niveles fuera de la distribución normal son clínicamente relevantes y/o indicativos de enfermedad. Por ejemplo, un profesional de la salud puede determinar la tasa de filtración glomerular que puede ser indicativa de una disminución en la tasa de función renal en un sujeto con enfermedad renal poliquística.

[000180] En ciertas modalidades, la administración de un compuesto proporcionado en el presente documento da como resultado uno o más resultados clínicamente beneficiosos. En ciertas modalidades, la administración mejora la función renal en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración ralentiza la tasa de disminución de la función renal en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración reduce el volumen renal total en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración ralentiza la tasa de aumento del volumen renal total en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración reduce el volumen renal total ajustado por altura (HtTKV). En ciertas modalidades, la administración ralentiza la tasa de aumento de HtTKV.

[000181] En ciertas modalidades, la administración aumenta la policistina 1 (PC1) en la orina del sujeto. En ciertas modalidades, la administración aumenta la policistina 2 (PC2) en la orina del sujeto. En ciertas modalidades, la administración aumenta la policistina 1 (PC1) y la policistina 2 (PC2) en la orina del sujeto.

[000182] En ciertas modalidades, la administración inhibe el crecimiento de quistes en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración ralentiza la tasa de aumento del crecimiento de quistes en el sujeto. En algunas modalidades, un quiste está presente en el riñón de un sujeto. En algunas modalidades, un quiste está presente en un órgano distinto del riñón, por ejemplo, el hígado.

[000183] En ciertas modalidades, la administración alivia el dolor renal en el sujeto. En

ciertas modalidades, la administración ralentiza el aumento del dolor renal en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración retrasa el inicio del dolor renal en el sujeto.

[000184] En ciertas modalidades, la administración reduce la hipertensión en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración ralentiza el empeoramiento de la hipertensión en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración retrasa el inicio de la hipertensión en el sujeto.

[000185] En ciertas modalidades, la administración reduce la fibrosis en el riñón del sujeto. En ciertas modalidades, la administración ralentiza el empeoramiento de la fibrosis en el riñón del sujeto.

[000186] En ciertas modalidades, la administración retrasa el inicio de la enfermedad renal en etapa terminal en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración retrasa el tiempo hasta la diálisis para el sujeto. En ciertas modalidades, la administración retrasa el tiempo hasta el trasplante renal para el sujeto. En ciertas modalidades, la administración mejora la esperanza de vida del sujeto.

[000187] En ciertas modalidades, la administración reduce la albuminuria en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración ralentiza el empeoramiento de la albuminuria en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración retrasa el inicio de la albuminuria en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración reduce la hematuria en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración ralentiza el empeoramiento de la hematuria en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración retrasa el inicio de la hematuria en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración reduce el nivel de nitrógeno ureico en sangre en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración reduce el nivel de creatinina sérica en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración mejora el aclaramiento de creatinina en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración reduce la proporción albúmina:creatinina en el sujeto.

[000188] En ciertas modalidades, la administración mejora la tasa de filtración glomerular en el sujeto. En ciertas modalidades, la administración ralentiza la tasa de disminución de la tasa de filtración glomerular en el sujeto. En ciertas modalidades, la tasa de filtración glomerular es una tasa de filtración glomerular estimada (TFGe). En ciertas modalidades, la tasa de filtración glomerular es una tasa de filtración glomerular medida (TFGm).

[000189] En ciertas modalidades, la administración reduce la proteína lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) en la orina del sujeto. En ciertas modalidades, la administración reduce la proteína de la molécula de daño renal 1 (KIM-1) en la orina del sujeto.

[000190] En cualquiera de las modalidades proporcionadas en el presente documento, un sujeto puede someterse a ciertas pruebas para evaluar la extensión de la enfermedad en el sujeto. Tales pruebas incluyen, sin limitación, la medición del volumen renal total en el sujeto; medición de la hipertensión en el sujeto; medición del dolor renal en el sujeto; medición de fibrosis en el riñón del sujeto; medición del nivel de nitrógeno ureico en sangre en el sujeto; medición del nivel de creatinina en suero en el sujeto; medición del aclaramiento de creatinina en la sangre del sujeto; medición de la albuminuria en el sujeto; medición de la proporción albúmina:creatinina en el sujeto; medición de la tasa de filtración glomerular en el sujeto, en donde la tasa de filtración glomerular se estima o mide; medición de la proteína lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) en la orina del sujeto; y/o medición de la proteína de la molécula de daño renal 1 (KIM-1) en la orina del sujeto.

[000191] En ciertas modalidades, un sujeto que tiene enfermedad renal poliquística experimenta una calidad de vida reducida. Por ejemplo, un sujeto que tiene enfermedad renal poliquística puede experimentar dolor de riñón, lo que puede reducir la calidad de vida del sujeto. En ciertas modalidades, la administración mejora la calidad de vida del sujeto.

[000192] En cualquiera de las modalidades proporcionadas en el presente documento, el sujeto es un sujeto humano. En ciertas modalidades, el sujeto humano es un adulto. En ciertas modalidades, un adulto tiene al menos 21 años de edad. En ciertas modalidades, el sujeto humano es un sujeto pediátrico, es decir, el sujeto tiene menos de 21 años. Las poblaciones pediátricas pueden ser definidas por agencias reguladoras. En ciertas modalidades, el sujeto humano es un adolescente. En ciertas modalidades, un adolescente tiene al menos 12 años de edad y menos de 21 años de edad. En ciertas modalidades, el sujeto humano es un niño. En ciertas modalidades, un niño tiene al menos dos años de edad y menos de 12 años de edad. En ciertas modalidades, el sujeto humano es un bebé. En ciertas modalidades, el bebé tiene al menos un mes de edad y menos de dos años. En ciertas modalidades, el sujeto es un recién nacido. En ciertas modalidades, un recién nacido tiene menos de un mes de edad.

[000193] Cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento puede usarse en terapia. Cualquiera de los compuestos proporcionados en el presente documento puede usarse en el tratamiento de la enfermedad renal poliquística. En ciertas modalidades, la enfermedad renal poliquística es enfermedad renal poliquística autosómica dominante. En ciertas modalidades, la enfermedad renal poliquística es enfermedad renal poliquística

autosómica recesiva. En ciertas modalidades, la enfermedad renal poliquística es nefronoptosis. En ciertas modalidades, el sujeto tiene síndrome de Joubert y trastornos relacionados (JSRD), síndrome de Meckel (MKS) o síndrome de Bardet-Biedl (BBS).

[000194] Cualquiera de los oligonucleótidos modificados descritos en el presente documento puede usarse en terapia. Cualquiera de los oligonucleótidos modificados proporcionados en el presente documento puede usarse en el tratamiento de la enfermedad renal poliquística.

[000195] Cualquiera de los compuestos proporcionados en el presente documento puede usarse en la preparación de un medicamento. Cualquiera de los compuestos proporcionados en el presente documento puede usarse en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad renal poliquística.

[000196] Cualquiera de los oligonucleótidos modificados proporcionados en el presente documento puede usarse en la preparación de un medicamento. Cualquiera de los oligonucleótidos modificados proporcionados en el presente documento puede usarse en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal poliquística.

[000197] Cualquiera de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento puede usarse en el tratamiento de la enfermedad renal poliquística.

Ciertas terapias adicionales

[000198] Los tratamientos para la enfermedad renal poliquística o cualquiera de las afecciones enumeradas en el presente documento pueden comprender más de una terapia. Como tal, en ciertas modalidades, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene enfermedad renal poliquística que comprende administrar al menos una terapia además de administrar el compuesto proporcionado en el presente documento, que comprende una secuencia de nucleobases complementaria a la secuencia semilla de miR-17.

[000199] En ciertas modalidades, la al menos una terapia adicional comprende un agente farmacéutico. En ciertas modalidades, un agente farmacéutico es un agente antihipertensivo. Los agentes antihipertensivos se usan para controlar la presión sanguínea del sujeto.

[000200] En ciertas modalidades, un agente farmacéutico es un antagonista del receptor 2 de vasopresina. En ciertas modalidades, un antagonista del receptor 2 de vasopresina es

tolvaptán.

[000201] En ciertas modalidades, los agentes farmacéuticos incluyen bloqueadores de los receptores de angiotensina II (ARB). En ciertas modalidades, un bloqueador del receptor de angiotensina II es candesartán, irbesartán, olmesartán, losartán, valsartán, telmisartán o eprosartán.

[000202] En ciertas modalidades, los agentes farmacéuticos incluyen inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II (ACE). En ciertas modalidades, un inhibidor de ACE es captopril, enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril, fosinopril o ramipril.

[000203] En ciertas modalidades, un agente farmacéutico es un diurético. En ciertas modalidades, un agente farmacéutico es un bloqueador de los canales de calcio.

[000204] En ciertas modalidades, un agente farmacéutico es un inhibidor de la glucosilceramida sintasa. En ciertas modalidades, un inhibidor de la glucosilceramida sintasa es venglustat.

[000205] En ciertas modalidades, un agente farmacéutico es un agente antihiper glucémico.

En ciertas modalidades, un agente antihiper glucémico es una biguanida. En ciertas modalidades, una biguanida es metformina.

[000206] En ciertas modalidades, un agente farmacéutico es un inhibidor de quinasa. En ciertas modalidades, un inhibidor de quinasa es bosutinib o KD019.

[000207] En ciertas modalidades, un agente farmacéutico es un antagonista del receptor adrenérgico.

[000208] En ciertas modalidades, un agente farmacéutico es un antagonista del receptor de aldosterona. En ciertas modalidades, un antagonista del receptor de aldosterona es espironolactona. En ciertas modalidades, la espironolactona se administra a una dosis que oscila entre 10 y 35 mg al día. En ciertas modalidades, la espironolactona se administra a una dosis de 25 mg al día.

[000209] En ciertas modalidades, un agente farmacéutico es un inhibidor de la diana de rapamicina (mTOR) en mamíferos. En ciertas modalidades, un inhibidor de mTOR es everolimus, rapamicina o sirolimus.

[000210] En ciertas modalidades, un agente farmacéutico es un análogo hormonal. En ciertas modalidades, un análogo hormonal es la somatostatina o la hormona adrenocorticotrófica.

[000211] En ciertas modalidades, un agente farmacéutico es un agente antifibrótico. En ciertas modalidades, un agente antifibrótico es un oligonucleótido modificado complementario a miR-21.

[000212] En ciertas modalidades, una terapia adicional es la diálisis. En ciertas modalidades, una terapia adicional es el trasplante de riñón.

[000213] En ciertas modalidades, los agentes farmacéuticos incluyen agentes antiinflamatorios. En ciertas modalidades, un agente antiinflamatorio es un agente antiinflamatorio esteroideo. En ciertas modalidades, un agente antiinflamatorio esteroideo es un corticosteroide. En ciertas modalidades, un corticosteroide es prednisona. En ciertas modalidades, un agente antiinflamatorio es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo. En ciertas modalidades, un agente antiinflamatorio no esteroideo es ibuprofeno, un inhibidor de la COX-1 o un inhibidor de la COX-2.

[000214] En ciertas modalidades, un agente farmacéutico es un agente farmacéutico que bloquea una o más respuestas a señales fibrogénicas.

[000215] En ciertas modalidades, una terapia adicional puede ser un agente farmacéutico que mejore el sistema inmunitario del cuerpo, incluyendo dosis bajas de ciclofosfamida, timoestimulina, vitaminas y suplementos nutricionales (p. ej., antioxidantes, incluidas las vitaminas A, C, E, betacaroteno, zinc, selenio, glutatión, coenzima Q-10 y equinácea), y vacunas, por ejemplo, el complejo inmunoestimulante (ISCOM), que comprende una formulación de vacuna que combina una presentación multimérica de antígeno y un adyuvante.

[000216] En ciertas modalidades, la terapia adicional se selecciona para tratar o mejorar un efecto secundario de una o más composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente. Tales los efectos secundarios incluyen, entre otros, reacciones en el lugar de inyección, anomalías en pruebas de la función hepática, anomalías en la función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anomalías en el sistema nervioso central y miopatías. Por ejemplo, un aumento en los niveles de aminotransferasa en suero puede indicar una toxicidad hepática o una anomalía en la función hepática. Por ejemplo, un aumento de la bilirrubina puede indicar toxicidad hepática o una anomalía en la función hepática.

Ciertas secuencias de nucleobases de microARN

[000217] La familia miR-17 incluye miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-93, miR-106a y miR-

106b. Cada miembro de la familia miR-17 tiene una secuencia de nucleobases que comprende la secuencia de nucleobases 5'-AAAGUG-3,' o la secuencia semilla de miR-17, que es la secuencia de nucleobases en las posiciones 2 a 7 de SEQ ID NO: 1. Además, cada miembro de la familia miR-17 comparte alguna identidad de secuencia de nucleobase fuera de la región semilla. En consecuencia, un oligonucleótido modificado que comprende una secuencia de nucleobases complementaria a la secuencia semilla de miR-17 puede dirigirse a otros microARN de la familia miR-17, además de miR-17. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado se dirige a dos o más microARN de la familia miR-17. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado se dirige a tres o más microARN de la familia miR-17. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado se dirige a cuatro o más microARN de la familia miR-17. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado se dirige a cinco o más microARN de la familia miR-17. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado se dirige a seis microARN de la familia miR-17. Por ejemplo, un oligonucleótido modificado que tiene la secuencia de nucleobases 5'-AGCACUUU-3' se dirige a todos los miembros de la familia miR-17.

[000218] En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-CACUUU-3'. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-AGCACUUU-3'.

[000219] En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobase 5'-CACUUUX-3', en donde X es una nucleobase de uracilo, una nucleobase de citosina o una nucleobase de purina, siempre que la nucleobase de purina no tenga un aceptor de enlaces de hidrógeno en la posición 6. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobase 5'-GCACUUUX-3', en donde X es una nucleobase de uracilo, una nucleobase de citosina o una nucleobase de purina, siempre que la nucleobase de purina no tenga un aceptor de enlaces de hidrógeno en la posición 6. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobase 5'-AGCACUUUX-3', en donde X es una nucleobase de uracilo, una nucleobase de citosina o una nucleobase de purina, siempre que la nucleobase de purina no tenga un aceptor de enlaces de hidrógeno en posición 6. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado es la secuencia de nucleobase 5'-AGCACUUUX-3', en donde X es una nucleobase de uracilo, una nucleobase de citosina o una nucleobase de purina, siempre que la nucleobase de purina no tenga un aceptor de enlaces de

hidrógeno en la posición 6.

[000220] En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-AGCACUUUA-3'. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-AGCACUUU-3'. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-AGCACUU-3'. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-AGCACU-3'. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-AGCAC-3'. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-AGCA-3'. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-GCACUUUA-3'. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-CACUUUA-3'. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-ACUUUA-3'. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-CUUUA-3'. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-AAGCACUUUA-3'.

[000221] En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-CACTTT-3'. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-CACUTT-3'. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-CACUUT-3'. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-CACTUT-3'. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-CACUTT-3'. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende la secuencia de nucleobases 5'-CACTTU-3'.

[000222] En ciertas modalidades, cada citosina se selecciona independientemente de una citosina no metilada y una 5-metilcitosina. En ciertas modalidades, al menos una citosina es una citosina no metilada. En ciertas modalidades, cada citosina es una citosina no metilada. En ciertas modalidades, al menos una citosina es una 5-metilcitosina. En ciertas modalidades, cada citosina es una 5-metilcitosina.

[000223] En ciertas modalidades, el número de nucleósidos enlazados de un oligonucleótido modificado es menor que la longitud de su microARN diana. Un oligonucleótido modificado que tiene un número de nucleósidos enlazados menor que la longitud del microARN

diana, en donde cada nucleobase del oligonucleótido modificado es complementaria a una nucleobase en una posición correspondiente del microARN diana, se considera un oligonucleótido modificado que tiene una secuencia de nucleobases que es completamente complementaria (también denominada 100 % complementaria) a una región de la secuencia de microARN diana. Por ejemplo, un oligonucleótido modificado que consiste en 9 nucleósidos enlazados, donde cada nucleobase es complementaria a una posición correspondiente de miR-17, es completamente complementaria a miR-17.

[000224] En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que tiene un desajuste con respecto a la secuencia de nucleobases de un microARN diana. En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que tiene dos desajustes con respecto a la secuencia de nucleobases de un microARN diana. En ciertas modalidades de este tipo, un oligonucleótido modificado tiene una secuencia de nucleobases que no tiene más de dos desajustes con respecto a la secuencia de nucleobases de un microARN diana. En ciertas modalidades de este tipo, las nucleobases desajustadas son contiguas. En ciertas modalidades de este tipo, las nucleobases desajustadas no son contiguas.

[000225] Aunque la lista de secuencias que acompaña a esta presentación identifica cada secuencia de nucleobases como "ARN" o "ADN", según se requiera, en la práctica, esas secuencias pueden modificarse con una combinación de modificaciones químicas especificadas en este documento. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que en el listado de secuencias, tal designación como "ARN" o "ADN" para describir oligonucleótidos modificados es algo arbitraria. Por ejemplo, un oligonucleótido modificado que comprende un nucleósido que comprende un resto de azúcar 2'-O-metoxietilo y una base de timina pueden describirse como un residuo de ADN en el listado de secuencias, aunque el nucleósido esté modificado y no sea un nucleósido de ADN natural.

[000226] En consecuencia, las secuencias de ácidos nucleicos proporcionadas en el listado de secuencias pretenden abarcar ácidos nucleicos que contienen cualquier combinación de ARN y/o ADN natural o modificado, incluidos, entre otros, dichos ácidos nucleicos que tienen nucleobases modificadas. A modo de ejemplo adicional y sin limitación, un oligonucleótido modificado que tiene la secuencia de nucleobases "ATCGATCG" en el listado de secuencias abarca cualquier oligonucleótido que tenga dicha secuencia de nucleobases, ya sea modificado

o no modificado, incluidos, entre otros, compuestos que comprenden bases de ARN, tales como los que tienen la secuencia “AUCGAUCG” y los que tienen algunas bases de ADN y algunas bases de ARN como “AUCGATCG” y oligonucleótidos que tienen otras bases modificadas, como “AT^{me}CGAUCG”, en donde ^{me}C indica una 5-metilcitosina.

5

Ciertas modificaciones

[000227] En ciertas modalidades, los oligonucleótidos proporcionados en este documento pueden comprender una o más modificaciones a una nucleobase, azúcar, y/o enlace internucleósido, y como tal es un oligonucleótido modificado. Una nucleobase modificada, 10 azúcar, y/o enlace internucleósido se puede seleccionar sobre una forma no modificada debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad mejorada por otros oligonucleótidos o dianas de ácido nucleico y estabilidad incrementada en presencia de nucleasas.

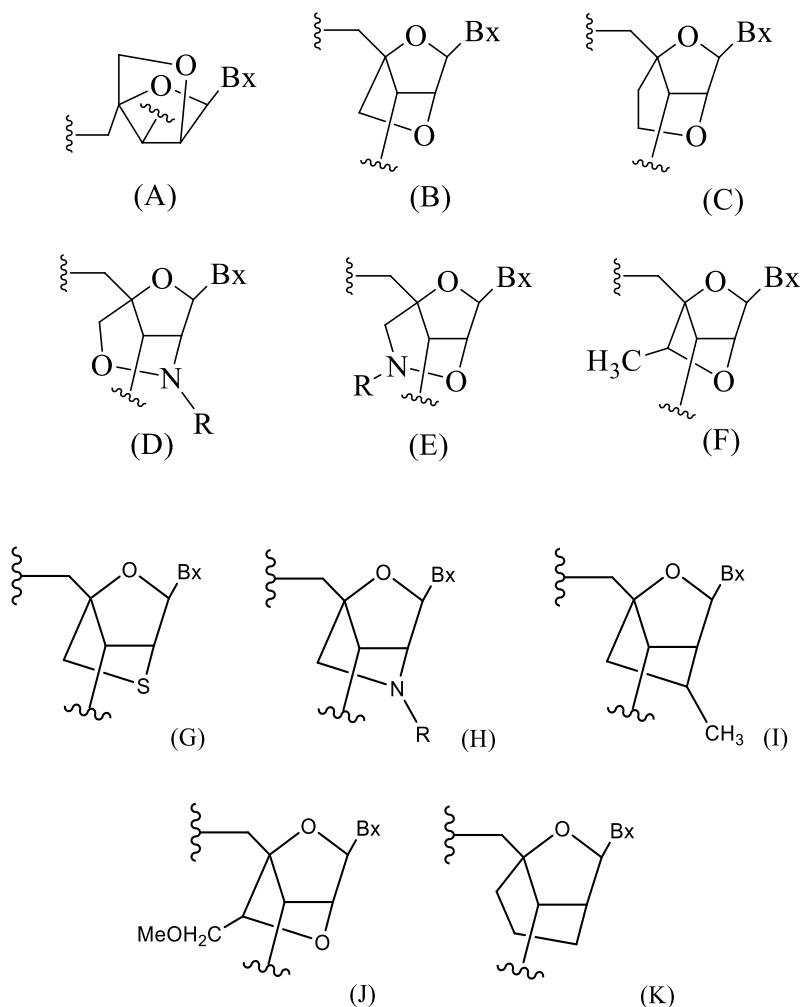
[000228] En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende uno o más 15 nucleósidos modificados.

[000229] En ciertas modalidades, un nucleósido modificado es un nucleósido modificado con azúcar. En ciertas modalidades de este tipo, los nucleósidos modificados con azúcar pueden comprender además un resto de base heterocíclica natural o modificada y/o pueden estar conectados a otro nucleósido a través de un enlace internucleósido natural o modificado 20 y/o pueden incluir otras modificaciones independientes de la modificación del azúcar. En ciertas modalidades, un nucleósido modificado con azúcar es un nucleósido modificado en 2', en donde el anillo de azúcar está modificado en el carbono 2' a partir de ribosa natural o 2'-desoxirribosa.

[000230] En ciertas modalidades, un nucleósido modificado en 2' tiene un resto de azúcar bicíclico. En modalidades de este tipo, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar D en la 25 configuración alfa. En modalidades de este tipo, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar D en la configuración beta. En modalidades de este tipo, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar L en la configuración alfa. En modalidades de este tipo, el resto de azúcar bicíclico es un azúcar L en la configuración beta.

[000231] Los nucleósidos que comprenden dichos restos de azúcar bicíclicos se denominan 30 nucleósidos bicíclicos o BNA. En ciertas modalidades, los nucleósidos bicíclicos incluyen, de modo no taxativo, (A) α -L-metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA; (B) β -D-metilenoxi (4'-CH₂-O-2') BNA;

- (C) etilenoxi (4'-(CH₂)₂-O-2') BNA; (D) aminooxi (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA; (E) oxiamino (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA; (F) metil(metilenoxi) (4'-CH(CH₃)-O-2') BNA (también denominado etilo restringido o cEt); (G) metileno-tio (4'-CH₂-S-2') BNA; (H) metilen-amino (4'-CH₂-N(R)-2') BNA; (I) metilcarbocíclico (4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA; (J) c-MOE (4'-CH(CH₂-OMe)-O-2') BNA y (K) propileno carbocíclico (4'-(CH₂)₃-2') BNA como se muestra a continuación.



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

- [000232]** En ciertas modalidades, un nucleósido modificado en 2' comprende un grupo sustituyente en 2' seleccionado de F, OCF₃, O-CH₃ (también denominado "2'-OMe"), OCH₂CH₂OCH₃ (también denominado como "2'-O-metoxietilo" o "2'-MOE"), 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-
15 (CH₂)₂-O-N(CH₃)₂, -O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂, y O-CH₂-C(=O)-N(H)CH₃.

- [000233]** En ciertas modalidades, un nucleósido modificado en 2' comprende un grupo

sustituyente en 2' seleccionado de F, O-CH₃ y OCH₂CH₂OCH₃.

[000234] En ciertas modalidades, un nucleósido modificado con azúcar es un nucleósido modificado con 4'-tio. En ciertas modalidades, un nucleósido modificado con azúcar es un nucleósido modificado con 4'-tio-2'. Un nucleósido modificado con 4'-tio tiene un ribonucleósido β-D donde el 4'-O se reemplazó con 4'-S. Un nucleósido modificado con 4'-tio-2' es un nucleósido modificado con 4'-tio que tiene el 2'-OH reemplazado con un grupo sustituyente en 2'. Los grupos sustituyentes en 2' adecuados incluyen 2'-OCH₃, 2'-OCH₂CH₂OCH₃, y 2'-F.

[000235] En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende una o más modificaciones de internucleósidos. En ciertas modalidades de este tipo, cada enlace internucleósido de un oligonucleótido modificado es un enlace internucleósido modificado. En ciertas modalidades, un enlace internucleósido modificado comprende un átomo de fósforo.

[000236] En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende al menos un enlace internucleósido de fosforotioato. En ciertas modalidades, cada enlace internucleósido de un oligonucleótido modificado es un enlace internucleósido fosforotioato.

[000237] En ciertas modalidades, un oligonucleótido modificado comprende una o más nucleobases modificadas. En ciertas modalidades, una nucleobase modificada se selecciona de 5-hidroximetilcitosina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina. En ciertas modalidades, una nucleobase modificada se selecciona de 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. En ciertas modalidades, una nucleobase modificada se selecciona de pirimidinas sustituidas en 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que incluyen 2 aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina.

[000238] En ciertas modalidades, una nucleobase modificada comprende un heterociclo policíclico. En ciertas modalidades, una nucleobase modificada comprende un heterociclo tricíclico. En ciertas modalidades, una nucleobase modificada comprende un derivado de fenoxazina. En ciertas modalidades, la fenoxazina se puede modificar adicionalmente para formar una nucleobase conocida en la técnica como abrazadera G.

[000239] En ciertas, un oligonucleótido modificado se conjuga con uno o más restos que mejoran la actividad, la distribución celular o la captación celular de los oligonucleótidos antisentido resultantes. En modalidades de este tipo, el resto es un resto de colesterol. En ciertas modalidades, el resto es un resto lipídico. Los restos adicionales para la conjugación incluyen carbohidratos, péptidos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, fosfolípidos, biotina,

fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. En ciertas modalidades, el resto carbohidrato es N-acetil-D-galactosamina (GalNac). En ciertas modalidades, un grupo conjugado se une directamente a un oligonucleótido. En ciertas modalidades, un grupo conjugado se une a un oligonucleótido modificado mediante un resto de unión seleccionado entre amino, azido, hidroxilo, ácido carboxílico, tiol, insaturaciones (p. ej., enlaces dobles o triples), ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), ácido 6-aminohexanoico (AHEX o AHA), alquilo C1-C10 sustituido, alquenilo C2-C10 sustituido o no sustituido y alquinilo C2-C10 sustituido o no sustituido. En ciertas modalidades de este tipo, un grupo sustituyente se selecciona de hidroxilo, amino, alcoxi, azido, carboxi, bencilo, fenilo, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alquenilo y alquinilo.

[000240] En ciertas modalidades de este tipo, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado que tiene uno o más grupos estabilizadores que están unidos a uno o ambos extremos de un oligonucleótido modificado para mejorar propiedades tales como, por ejemplo, la estabilidad de la nucleasa. En los grupos estabilizadores se incluyen estructuras de casquetes. Estas modificaciones de extremo protegen un oligonucleótido modificado de la degradación por exonucleasa y pueden ayudar en la entrega y/o localización dentro de una célula. El casquete puede encontrarse presente en el extremo 5' (casquete 5') o en el extremo 3' (casquete 3'), o puede encontrarse en ambos extremos. Las estructuras de casquetes incluyen, por ejemplo, casquetes abásicos desoxi invertidos.

Ciertas composiciones farmacéuticas

[000241] En el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto u oligonucleótido modificado proporcionado en el presente documento y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas modalidades, el diluyente farmacéuticamente aceptable es una solución acuosa. En ciertas modalidades, la solución acuosa es una solución salina. Como se usa en el presente documento, se entiende que los diluyentes farmacéuticamente aceptables son diluyentes estériles. Las vías de administración adecuadas incluyen, sin limitación, administración intravenosa y subcutánea. En ciertas modalidades, la administración es la administración intravenosa. En ciertas modalidades, la administración es la administración subcutánea. En ciertas modalidades, la administración es

la administración oral.

[000242] En ciertas modalidades, una composición farmacéutica se administra en forma de unidad de dosificación. Por ejemplo, en ciertas modalidades, una unidad de dosificación está en forma de tableta, cápsula o inyección en bolo.

5 **[000243]** En ciertas modalidades, un agente farmacéutico es un oligonucleótido modificado que ha sido preparado en un diluyente adecuado, ajustado a pH 7,0-9,0 con ácido o base durante la preparación y luego liofilizado en condiciones estériles. El oligonucleótido modificado liofilizado se reconstituye posteriormente con un diluyente adecuado, por ejemplo, solución acuosa, como agua o tampones fisiológicamente compatibles, como solución salina, solución de Hanks o solución de Ringer. El producto reconstituido se administra como inyección subcutánea o como infusión intravenosa. El medicamento liofilizado se puede envasar en un vial de vidrio transparente tipo I de 2 ml (tratado con sulfato de amonio), tapado con un cierre de caucho de bromobutilo y sellado con un sello de aluminio.

10 **[000244]** En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento pueden contener adicionalmente otros componentes adjuntos que se encuentran convencionalmente en las composiciones farmacéuticas, en sus niveles de uso establecidos en la técnica. Así, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos compatibles adicionales tales como, por ejemplo, antipruriginosos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios.

15 **[000245]** En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento pueden contener materiales adicionales útiles para formular físicamente varias formas de dosificación de las composiciones proporcionadas en la presente, tales como colorantes, agentes saborizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes; tales materiales adicionales también incluyen, pero no se limitan a, excipientes tales como alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilasa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona. En diversas modalidades, dichos materiales, cuando se añaden, no deberían interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones proporcionadas en la presente. Las formulaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes,

20

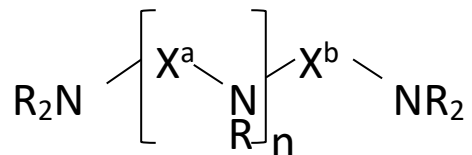
25

30

aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no interaccionan de forma perjudicial con el o los oligonucleótidos de la formulación. Ciertas composiciones farmacéuticas para inyección son suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Ciertos disolventes adecuados para su uso en composiciones farmacéuticas para inyección incluyen, entre otros, disolventes lipófilos y aceites grasos, como aceite de sésamo, ésteres de ácidos grasos sintéticos, como oleato de etilo o triglicéridos, y liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, tales suspensiones también pueden contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los agentes farmacéuticos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

[000246] Los restos lipídicos se han utilizado en terapias con ácidos nucleicos en una variedad de métodos. En un método, el ácido nucleico se introduce en liposomas o lipoplejos preformados hechos de mezclas de lípidos catiónicos y lípidos neutros. En otro método, los complejos de ADN con lípidos mono o policatiónicos se forman sin la presencia de un lípido neutro. En ciertas modalidades, se selecciona un resto lipídico para aumentar la distribución de un agente farmacéutico a una célula o tejido particular. En ciertas modalidades, se selecciona un resto lipídico para aumentar la distribución de un agente farmacéutico a tejido graso. En ciertas modalidades, se selecciona un resto lipídico para aumentar la distribución de un agente farmacéutico a tejido muscular.

[000247] En ciertas modalidades, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende un compuesto de poliamina o un resto lipídico complejado con un ácido nucleico. En ciertas modalidades, dichas preparaciones comprenden uno o más compuestos, cada uno de los cuales tiene individualmente una estructura definida por la fórmula (Z) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.



en donde cada X^a y X^b , para cada caso, es independientemente alquileo C_{1-6} ; n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; cada R es independientemente H, en donde al menos $n + 2$ de los restos R en al menos

aproximadamente el 80 % de las moléculas del compuesto de fórmula (Z) en la preparación no son H; m es 1, 2, 3 o 4; Y es O, NR², o S; R¹ es alquilo, alquenilo o alquinilo; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes; y R² es H, alquilo, alquenilo o alquinilo; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes; siempre que, si n = 0, entonces al menos n + 3 de los restos R no son H. Tales preparaciones se describen en la publicación PCT WO/2008/042973, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad para la descripción de preparaciones de lípidos. Ciertas preparaciones adicionales se describen en Akinc et al., *Nature Biotechnology* **26**, 561 - 569 (01 de mayo de 2008), que se incorpora aquí como referencia en su totalidad para la descripción de preparaciones de lípidos.

[000248] En ciertas modalidades, una composición farmacéutica proporcionada en este documento se prepara utilizando técnicas conocidas, que incluyen, entre otras, procesos de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o formación de tabletas.

[000249] En ciertas modalidades, una composición farmacéutica proporcionada en este documento es un sólido (p. ej., un polvo, tableta, y/o cápsula). En ciertas modalidades de este tipo, se prepara una composición farmacéutica sólida que comprende uno o más oligonucleótidos utilizando ingredientes conocidos en la técnica, incluidos, entre otros, almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes y agentes desintegrantes.

[000250] En ciertas modalidades, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento se formula como una preparación de depósito. Algunas de estas preparaciones de depósito suelen tener una acción más prolongada que las preparaciones que no son de depósito. En ciertas modalidades, dichas preparaciones se administran por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. En ciertas modalidades, las preparaciones de depósito se preparan utilizando materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo, una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

[000251] En ciertas modalidades, una composición farmacéutica proporcionada en este documento comprende un sistema de administración. Los ejemplos de sistemas de

administración incluyen, pero no se limitan a, liposomas y emulsiones. Ciertos sistemas de administración son útiles para preparar ciertas composiciones farmacéuticas, incluidas las que comprenden compuestos hidrofóbicos. En ciertas modalidades, se usan ciertos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido.

- 5 **[000252]** En ciertas modalidades, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende una o más moléculas de administración específicas de tejido diseñadas para administrar uno o más agentes farmacéuticos proporcionados en la presente a tejidos o tipos de células específicos. Por ejemplo, en ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas incluyen liposomas recubiertos con un anticuerpo específico de tejido.
- 10 **[000253]** En ciertas modalidades, una composición farmacéutica proporcionada en este documento comprende un sistema de liberación sostenida. Un ejemplo no limitativo de tal sistema de liberación sostenida es una matriz semipermeable de polímeros hidrofóbicos sólidos. En ciertas modalidades, los sistemas de liberación sostenida pueden, según su naturaleza química, liberar agentes farmacéuticos durante un período de horas, días, semanas o meses.
- 15 **[000254]** Ciertas composiciones farmacéuticas para inyección se presentan en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis.
- [000255]** En ciertas modalidades, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende un oligonucleótido modificado en una cantidad terapéuticamente eficaz. En ciertas modalidades, la cantidad terapéuticamente eficaz es
- 20 suficiente para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una enfermedad o para prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.
- [000256]** En ciertas modalidades, uno o más oligonucleótidos modificados proporcionados en el presente documento se formulan como un profármaco. En ciertas modalidades, tras la administración *in vivo*, un profármaco se convierte químicamente en la forma biológica,
- 25 farmacéutica o terapéuticamente más activa de un oligonucleótido. En ciertas modalidades, los profármacos son útiles porque son más fáciles de administrar que la forma activa correspondiente. Por ejemplo, en determinados casos, un profármaco puede estar más biodisponible (p. ej., a través de la administración oral) que la forma activa correspondiente. En ciertos casos, un profármaco puede tener una solubilidad mejorada en comparación con la
- 30 forma activa correspondiente. En ciertas modalidades, los profármacos son menos solubles en agua que la forma activa correspondiente. En ciertos casos, dichos profármacos poseen una

transmisión superior a través de las membranas celulares, donde la solubilidad en agua es perjudicial para la movilidad. En ciertas modalidades, un profármaco es un éster. En modalidades de este tipo, el éster se hidroliza metabólicamente a ácido carboxílico tras la administración. En ciertos casos, el compuesto que contiene ácido carboxílico es la forma activa correspondiente. En ciertas modalidades, un profármaco comprende un péptido corto (poliaminoácido) unido a un grupo ácido. En ciertas modalidades de ese tipo, el péptido se escinde tras la administración para formar la forma activa correspondiente.

[000257] En ciertas modalidades, se produce un profármaco modificando un compuesto farmacéuticamente activo de manera que el compuesto activo se regenere tras la administración *in vivo*. El profármaco se puede diseñar para alterar la estabilidad metabólica o las características de transporte de un fármaco, para enmascarar los efectos secundarios o la toxicidad, para mejorar el sabor de un fármaco o para alterar otras características o propiedades de un fármaco. En virtud del conocimiento de los procesos farmacodinámicos y el metabolismo de fármacos *in vivo*, los expertos en esta técnica, una vez que se conoce un compuesto farmacéuticamente activo, pueden diseñar profármacos del compuesto (véase, por ejemplo, Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, Nueva York, páginas 388-392).

[000258] Las rutas de administración adicionales incluyen, pero no se limitan a, administración oral, rectal, transmucosa, intestinal, enteral, tópica, en supositorios, por inhalación, intratecal, intracardíaca, intraventricular, intraperitoneal, intranasal, intraocular, intratumoral, intramuscular e intramedular. En ciertas modalidades, se administran fármacos intratecales para lograr exposiciones locales en lugar de sistémicas. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas se pueden inyectar directamente en el área del efecto deseado (p. ej., en el riñón).

Ciertos kits

[000259] También se proporcionan kits. En algunas modalidades, los kits comprenden uno o más compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado descrito en el presente documento. En algunas modalidades, los kits pueden usarse para la administración del compuesto a un sujeto.

[000260] En ciertas modalidades, el kit comprende una composición farmacéutica lista para

su administración. En ciertas modalidades, la composición farmacéutica está presente dentro de un vial. Una pluralidad de viales, tales como 10, pueden estar presentes, por ejemplo, en paquetes dispensadores. En algunas modalidades, el vial se fabrica para que sea accesible con una jeringa. El kit también puede contener instrucciones para usar los compuestos.

- 5 **[000261]** En algunas modalidades, el kit comprende una composición farmacéutica presente en una jeringa precargada (como jeringas de dosis única con, por ejemplo, una aguja de ½ pulgada de calibre 27 con un protector de aguja), en lugar de un vial. Una pluralidad de jeringas precargadas, como 10, pueden estar presentes, por ejemplo, en paquetes dispensadores. El kit también puede contener instrucciones para administrar los compuestos
- 10 que comprenden un oligonucleótido modificado descrito en este documento.
- [000262]** En algunas modalidades, el kit comprendía un oligonucleótido modificado proporcionado en el presente documento como un producto farmacéutico liofilizado y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En la preparación para la administración a un sujeto, el producto farmacéutico liofilizado se reconstituye en el diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 15 **[000263]** En algunas modalidades, además de los compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado descrito en el presente documento, el kit puede comprender además uno o más de los siguientes: jeringa, hisopo con alcohol, bola de algodón, y/o gasa.

Ciertos modelos experimentales

- 20 **[000264]** En ciertas modalidades, se proporcionan métodos para usar y/o probar oligonucleótidos modificados proporcionados en la presente en un modelo experimental. Los expertos en la técnica pueden seleccionar y modificar los protocolos de dichos modelos experimentales para evaluar un agente farmacéutico proporcionado en la presente.
- [000265]** Generalmente, los oligonucleótidos modificados se prueban primero en células
- 25 cultivadas. Los tipos de células adecuados incluyen aquellos que están relacionados con el tipo de célula al que se desea la administración *in vivo* de un oligonucleótido modificado. Por ejemplo, los tipos de células adecuados para el estudio de los métodos descritos en este documento incluyen células primarias o cultivadas.
- [000266]** En ciertas modalidades, la medida en que un oligonucleótido modificado interfiere
- 30 con la actividad de uno o más miembros de la familia miR-17 se evalúa en células cultivadas. En ciertas modalidades, la inhibición de la actividad del microARN puede evaluarse midiendo el

nivel de uno o más de un transcrito regulado por microARN previsto o validado. Una inhibición de la actividad del microARN puede resultar en el aumento de la transcripción regulada por miembros de la familia miR-17, y/o la proteína codificada por el transcrito regulado por miembros de la familia miR-17 (es decir, el transcrito regulado por miembros de la familia miR-17 está desreprimido). Además, en ciertas modalidades, se pueden medir ciertos resultados fenotípicos.

[000267] Varios modelos animales están disponibles para el experto en la técnica para el estudio de uno o más miembros de la familia miR-17 en modelos de enfermedades humanas. Los modelos de enfermedad renal poliquística incluyen, entre otros, modelos con mutaciones y/o eliminaciones en *Pkd1* y/o *Pkd2*; y modelos que comprenden mutaciones en otros genes. Modelos ejemplares no limitantes de PKD que comprenden mutaciones y/o eliminaciones en *Pkd1* y/o *Pkd2* incluyen modelos hipomórficos, como modelos que comprenden mutaciones sin sentido en *Pkd1* y modelos con expresión reducida o inestable de *Pkd2*; modelos de inactivación condicionales inducibles; y modelos de inactivación condicional. Los modelos de PKD ejemplares no limitativos que comprenden mutaciones en genes distintos de *Pkd1* y *Pkd2* incluyen modelos con mutaciones en *Pkhd1*, *Nek8*, *Kif3a*, y/o *Nphp3*. Los modelos de PKD se revisan, *por ejemplo*, en Shibazaki *et al.*, *Human Mol. Genet.*, 2008; 17(11): 1505-1516; Happe y Peters, *Nat Rev Nephrol.*, 2014; 10(10): 587-601; y Patel *et al.*, *PNAS*, 2013; 110(26): 10765-10770.

Ciertos ensayos de cuantificación

[000268] En ciertas modalidades, los niveles de microARN se cuantifican en células o tejidos *in vitro* o *in vivo*. En ciertas modalidades, los cambios en los niveles de microARN se miden mediante análisis de micromatrices. En ciertas modalidades, los cambios en los niveles de microARN se miden mediante uno de varios ensayos de PCR disponibles en el mercado, como el ensayo de microARN TaqMan[®] (Applied Biosystems).

[000269] La modulación de la actividad del microARN con un imitador de microARN o anti-miR puede evaluarse mediante el perfilado de micromatrices de ARNm. Las secuencias de los ARNm que son moduladas (aumentadas o disminuidas) por el mimético anti-miR o microARN se buscan en busca de secuencias semilla de microARN, para comparar la modulación de los ARNm que son dianas del microARN con la modulación de los ARNm que no son dianas del microARN. De esta manera, se puede evaluar la interacción del anti-miR con su microARN

diana, o un mimético de microARN con sus dianas. En el caso de un anti-miR, los ARNm cuyos niveles de expresión aumentan se seleccionan para las secuencias de ARNm que comprenden un emparejamiento de semilla con el microARN al que el anti-miR es complementario.

[000270] La modulación de la actividad del microARN con un compuesto anti-miR puede evaluarse midiendo el nivel de una diana de ARN mensajero del microARN, ya sea midiendo el nivel del propio ARN mensajero o la proteína transcrita a partir del mismo. La inhibición antisentido de un microARN generalmente da como resultado un aumento en el nivel de ARN mensajero y/o la proteína del ARN mensajero diana del microARN, *es decir*, el tratamiento anti-miR da como resultado la desrepresión de uno o más ARN mensajeros diana.

EJEMPLOS

[000271] Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente algunas modalidades de la invención. Sin embargo, de ninguna manera deben interpretarse como limitantes del amplio alcance de la invención.

[000272] Los expertos en la técnica adoptarán fácilmente los principios subyacentes de este descubrimiento para diseñar diversos compuestos sin apartarse del espíritu de la presente invención.

Ejemplo 1: La función de miR-17 en PKD

[000273] Miembros de la familia miR-17 del grupo miR-17~92 de microARN aumentan en modelos de ratón de PKD. Eliminación genética del grupo miR-17~92 en un modelo de ratón de PKD reduce el crecimiento de quistes renales, mejora la función renal y prolonga la supervivencia (Patel *et al.*, *PNAS*, 2013; 110(26): 10765-10770). El grupo miR-17~92 contiene 6 microARN diferentes, cada uno con una secuencia distinta: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19-b-1 y miR-92a-1.

[000274] El grupo miR-17~92 incluye dos microARN, miR-17 y miR-20a, que son miembros de la familia de microARN miR-17. Cada miembro de esta familia comparte identidad de secuencia de semilla y diversos grados de identidad de secuencia fuera de la región de semilla. Los otros miembros de la familia miR-17 son miR-20b, miR-93, miR-106a y miR-106b. miR-20b y miR-106a residen dentro del grupo miR-106a~363 en el cromosoma X humano, y miR-93 y miR-106b residen dentro del grupo miR-106b~25 en el cromosoma 7 humano. Las secuencias de los miembros de la familia miR-17 se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: familia miR-17 de microARN

microARN	SECUENCIA (5' A 3') región semilla en negrita	SEQ ID NO:
miR-17	CAAAGUG CUUACAGUGCAGGUAG	1
miR-20a	UAAAGUG CUUAUAGUGCAGGUAG	2
miR-20b	CAAAGUG CUCAUAGUGCAGGUAG	3
miR-93	CAAAGUG CUGUUCGUGCAGGUAG	4
miR-106a	AAAAGUG CUUACAGUGCAGGUAG	5
miR-106b	UAAAGUG CUGACAGUGCAGAU	6

[000275] El compuesto anti-miR-17 RGLS4326 se descubrió analizando una biblioteca químicamente diversa y racionalmente diseñada de oligonucleótidos anti-miR-17 para obtener propiedades farmacéuticas óptimas. RGLS4326 se distribuye preferentemente a los quistes derivados de los conductos colectores y los riñones, desplaza el miR-17 de los polisomas activos en la traducción y desreprime múltiples dianas de ARNm de miR-17, incluidos Pkd1 y Pkd2. Es importante destacar que RGLS4326 atenúa el crecimiento de quistes en modelos humanos de ADPKD *in vitro* y múltiples modelos de ratones con PKD después de la administración subcutánea. En diciembre de 2017 se inició un ensayo clínico de fase 1 de dosis ascendente única (SAD, por sus siglas en inglés) de RGLS4326 en voluntarios sanos, seguido de un ensayo clínico de fase 1 de dosis ascendente múltiple (MAD, por sus siglas en inglés) en voluntarios sanos que se inició en mayo de 2018. En octubre de 2020 se inició un ensayo clínico de fase 1b de RGLS4326 para el tratamiento de pacientes con enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ADPKD).

[000276] Después del inicio del ensayo clínico de fase 1 de MAD, los estudios toxicológicos no clínicos revelaron hallazgos relacionados con el sistema nervioso central (SNC), que incluyen marcha anormal, actividad motora reducida y/o postración, a altas dosis de RGLS4326. Para identificar candidatos potenciales para la farmacología fuera de la diana, se evaluó *in vitro* un panel de 174 dianas que incluyen receptores acoplados a proteína G, transportadores, canales iónicos, receptores nucleares y receptores de citocinas para detectar posibles interacciones con RGLS4326. Se descubrió que RGLS4326 es un antagonista del receptor de

glutamato AMPA, con una concentración inhibitoria del 50 % (IC50) de 4,6 uM (14,2 µg/mL) basado en la unión del ligando y una IC50 funcional de 300-600 nM (0,9-1,8 µg/mL) basado en la actividad de pinzamiento zonal. Los receptores AMPA son canales iónicos en las sinapsis excitatorias del SNC que median la neurotransmisión excitatoria rápida y, por lo tanto, son componentes clave de todas las redes neuronales. Tal interacción con el receptor AMPA podría explicar los hallazgos mediados por el SNC observados con dosis altas de RGLS4326 en modelos toxicológicos no clínicos.

Ejemplo 2: Análisis de compuestos anti-miR-17 con unión reducida al receptor AMPA

[000277] RGLS4326 tiene la siguiente secuencia y patrón de modificación química: AsGsC_MA_FC_FU_FU_MU_SG_S donde los nucleósidos seguidos del subíndice "M" son nucleósidos 2'-O-metil, los nucleósidos seguidos del subíndice "F" son nucleósidos 2'-fluoro, los nucleósidos seguidos del subíndice "S" son nucleósidos S-cEt, cada citosina es una citosina no metilada y todos los enlaces son enlaces fosforotioato. La modificación química y las variantes de longitud de RGLS4326 se diseñaron y analizaron para identificar un compuesto que conserva la potencia y el perfil farmacocinético de RGLS4326 y muestra una unión reducida al receptor AMPA (AMPA-R).

[000278] Se diseñó una biblioteca de compuestos con diversas modificaciones químicas, secuencia de nucleobases y longitud, en relación con RGLS4326.

Tabla 2: Biblioteca anti-miR-17

Compuesto #	Notación química	Secuencia de nucleobase	SEQ ID NO	Longitud
RG-NG-1001	AsGsCsAsCsUsUsUsGs	AGCACUUUG		9
RG-NG-1002	AsGsCsAsCsUsUsUs	AGCACUUU-		8
RG-NG-1003	AsGsC _M AsC _M U _M U _S G _S	AGCACUUUG		9
RG-NG-	UsAsAsGsCsAsCsUsUsUsGs	UAAGCACUUUG	12	11

1004				
RG-NG-1005	U _S A _S A _M <u>G</u> C _S A _S C _S U _M U _M U _S G _S	UAAGCACUUUG	13	11
RG-NG-1006	A _L G _L <u>C</u> _L A _L <u>C</u> _L T _L T _L T _L G _L	AGCACTTTG		9
RG-NG-1007	A _S G _S C _F A _F C _F U _F U _F U _S G _S	AGCACUUUG		9
RG-NG-1008	A _S G _E C _M A _F C _F U _F U _M T _E G _S	AGCACUUTG		9
RG-NG-1009	A _E G _E C _M A _F C _F U _F U _M T _E G _E	AGCACUUTG		9
RG-NG-1010	A _E G _E C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _S	AGCACUUUG		9
RG-NG-1011	A _L G _L C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _S	AGCACUUUG		9
RG-NG-1012	A _S G _L C _M A _F C _F U _F U _M T _L G _S	AGCACUUTG		9
RG-NG-1013	A _S A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S	AAGCACUUU-		9
RG-NG-1014	A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S	AGCACUUU-		8
RG-NG-1015	A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S A _S	AGCACUUUA		9
RG-NG-1016	A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S C _S	AGCACUUUC		9
RG-NG-1017	A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S U _S	AGCACUUUU		9
RG-NG-1018	A _E <u>C</u> _E T _E G _S T _E A _A S _G S _C M _A F _C F _U F _U M _U S C _S	ACTGTAAGCACUUU C	14	15
RG-NG-	A _S C _S TG _S U _S A _A S _G S _C M _A F _C F _U F _U M _U S _C	ACTGUAAGCACUUU	15	15

1019	S	C		
RG-NG-1020	TEG _S TEAA _S G _S CM _A FC _F UF _U M _U S _C S	TGTAAGCACUUUC	16	13
RG-NG-1021	TEAA _S G _S CM _A FC _F UF _U M _U S _C S	TAAGCACUUUC	17	11
RG-NG-1022	TEAE _A S _G CM _A FC _F UF _U M _U S _C S	TAAGCACUUUC	18	11
RG-NG-1023	AE _G S _C MA _F CF _U F _U M _U S _{GE}	AGCACUUUG		9
RG-NG-1024	AS _G S _C MA _F CF _U F _U M _{TE} GE	AGCACUUTG		9
RG-NG-1025	AS _G S _C MA _F CF _U F _U M _U S _{GE}	AGCACUUUG		9
RG-NG-1026	AS _G S _C MA _L CF _U F _U M _U S _C S	AGCACUUUC		9
RG-NG-1027	AS _G S _C S _A FC _F UF _U M _U S _C S	AGCACUUUC		9
RG-NG-1028	AS _G S _C S _A LC _F UF _U M _U S _C S	AGCACUUUC		9
RG-NG-1029	AM _G <u>LC</u> <u>L</u> AL <u>C</u> <u>L</u> UMTLU <u>C</u> <u>M</u>	AGCACUTUC		9
RG-NG-1030	AMAM _G <u>LC</u> <u>L</u> AL <u>C</u> <u>L</u> UMTLU <u>C</u> <u>M</u>	AAGCACUTUC	19	10
RG-NG-1031	AMAM _G <u>LC</u> <u>L</u> AL <u>C</u> <u>L</u> UMTLUM	AAGCACUTU-		9

Los nucleósidos seguidos del subíndice "M" son nucleósidos 2'-O-metil; los nucleósidos seguidos del subíndice "F" son nucleósidos 2'-fluoro; los nucleósidos seguidos del subíndice "S" son nucleósidos S-cEt; los nucleósidos seguidos del subíndice "E" son nucleósidos 2'-O-metoxietil (2'-MOE); y los nucleósidos seguidos del subíndice "L" son nucleósidos LNA.

[000279] La actividad de los compuestos anti-miR-17 se evaluó en un ensayo de unión de

radioligandos que midió la unión del ligando AMPA [³H] del AMPA-R presente en las membranas sinápticas del cerebro de rata, en presencia de concentraciones crecientes del compuesto anti-miR-17. Los compuestos anti-miR-17 con afinidad por el AMPA-R se unirán y competirán con la unión del ligando AMPA [³H].

- 5 **[000280]** El ensayo se realizó de acuerdo con métodos previamente publicados (Honore et al., *J Neurochem.*, 1982, 38(1):173-178; Olsen et al., *Brain Res.*, 1987, 402(2):243-254). 5,0 nM del ligando AMPA [³H], 1,0 mM del ligando no específico ácido L-glutámico y compuesto anti-miR en concentraciones uM se incubaron con membranas sinápticas preparadas a partir de corteza cerebral de rata Wistar durante 90 minutos. Los compuestos que se muestran en la
- 10 Tabla 2 se probaron en tres experimentos. Los anti-miR dirigidos a microARN distintos de miR-17 se usaron como compuestos de control (RG5124 dirigido a miR-33a; RG5365 dirigido a let-7a; RG8093 dirigido a miR-214). RGLS4326 y RG-NG-1001 también se probaron en cada experimento, ya que se demostró que se unen e inhiben la actividad de AMPA-R. La cantidad del ligando AMPA [³H] se cuantificó mediante la unión del radioligando y se muestra en las
- 15 Tablas 3, 4 y 5. Como ilustran los datos, los compuestos varían en su capacidad para inhibir la unión del ligando radiomarcado al AMPA-R.

Tabla 3: Inhibición de la unión del ligando al experimento AMPA-R #1

	SEQ ID NO		% de inhibición @ uM				
Compuesto #		Secuencia de nucleobases & Química (5' a 3')	100	10	1	0,1	IC ₅₀ (uM)
RG-NG-1001		AsGsCsAsCsUsUsUsGs	91,3	89,1	76,2	41,1	0,17
RGLS4326		AsGsCMAFCFUfUMUsGs	104,1	93	55,5	17,6	0,70
RG-NG-1002		AsGsCsAsCsUsUsUs	24,0	- 16,9	-2,0	0	>100
RG-NG-1003		AsGsCMAAsCmUsUmUsGs	77,8	56,9	13,9	5,7	9,26

RG-NG-1004	20	U _S A _S A _S G _S C _S A _S C _S U _S U _S U _S G _S	76,1	44,2	4,7	-4,7	17,28
RG-NG-1005	21	U _S A _S A _M G _C <u>S</u> A _S C _S U _M U _M U _S G _S	28,3	0,8	-1,3	10,8	>100
RG-NG-1006		A _L G _L <u>C</u> _L A _L <u>C</u> _L T _L T _L T _L G _L	93,9	68,9	35,3	6,7	2,77
RG5124		A _S C _S A _M A _F U _F G _F C _M A _S C _S (anti-miR-33a)	-5,1	-3,7	12,9	0,4	>100
RG5365		anti-let7a	-4	6,5	-6,3	2,4	>100
RG8093		anti-miR-214	-9,8	-2	-	11,5	-6,9 >100

Tabla 4: Inhibición de la unión del ligando al experimento AMPA-R #2

	SEQ ID NO		% de inhibición @ uM				
Compuesto #		Notación química	100	10	1	0,1	IC ₅₀ (uM)
RG-NG-1001		A _S G _S C _S A _S C _S U _S U _S U _S G _S	93,5	90,1	68,3	42,2	0,19
RGLS4326		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _S	96,8	93,6	73,1	31,5	0,27
RG-NG-1002		A _S G _S C _S A _S C _S U _S U _S U _S	24,6	-2,1	4,6	-5,5	>100
RG-NG-1007		A _S G _S C _F A _F C _F U _F U _F U _S G _S	94,3	83,2	39,7	3,1	1,69
RG-NG-1008		A _S G _E C _M A _F C _F U _F U _M T _E G _S	59,6	22,1	13,6	-	22,4 56,58
RG-NG-1009		A _E G _E C _M A _F C _F U _F U _M T _E G _E	32,6	13	2,7	-	11,8 >100
RG-NG-		A _E G _E C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _S	86,4	70,1	31,3	0,7	3,44

1010							
RG-NG-1011		ALGLCMAFCFU _F UMUSGS	94	78,5	30,6	-2,2	2,56
RG-NG-1012		ASGLCMAFCFU _F UMTLGS	88,3	69	38,5	9,9	2,56
RG-NG-1013		ASASGS _C MAFCFU _F UMUS	37,2	3,7	-5,6	-3,8	>100
RG-NG-1014		ASGS _C MAFCFU _F UMUS	20,4	8,6	-5,5	14,9	>100
RG-NG-1015		ASGS _C MAFCFU _F UMUSAS	19,9	6,5	11	2,3	>100
RG-NG-1016		ASGS _C MAFCFU _F UMUSCS	5,9	12,3	10,4	4,7	>100
RG-NG-1017		ASGS _C MAFCFU _F UMUSUS	8,1	4,3	-1,3	0,2	>100
RG-NG-1026		ASGS _C MA _L CFU _F UMUSCS	2,3	-3,5	-1,1	-3,3	>100
RG-NG-1027		ASGS _C SAFCFU _F UMUSCS	3	-2,2	2,3	-2,2	>100
RG-NG-1028		ASGS _C SA _L CFU _F UMUSCS	2,7	2	2,1	15,7	>100
RG-NG-1029		AMGL <u>C</u> _L AL <u>C</u> _L UMTLU <u>C</u> _M	38,4	7	15,9	0,9	>100
RG-NG-1030	19	AMAMGL <u>C</u> _L AL <u>C</u> _L UMTLU <u>C</u> _M	1,9	15	6,5	2,9	>100
RG-NG-1031		AMAMGL <u>C</u> _L AL <u>C</u> _L UMTLUM	16,7	2,7	1	-4,3	>100
RG5124		ASCsAMAFUFGFCMA _S CS (anti-miR-33a)	7,2	-4,2	1,6	-1,2	>100

Tabla 5: Inhibición de la unión del ligando al experimento AMPA-R #3

	SEQ ID NO		% de inhibición @ uM				
Compuesto #		Notación química	100	10	1	0,1	IC ₅₀ (uM)
RG-NG-1001		AsGsCsAsCsUsUsUsGs	96,6	94,6	84,8	59,4	0,10
RGLS4326		AsGsCMAFCFU _F UMUsGs	97,2	89	55,8	14,6	0,78
RG-NG-1018	22	Ae <u>C</u> E _E TEGsTEAAsGsCMAFCFU _F UMUsCs	12,3	1	8,1	3	>100
RG-NG-1019	23	AsCsTGsUsAAAsGsCMAFCFU _F UMUsCs	21	15,6	17,2	12,9	>100
RG-NG-1020	24	TEGsTEAAsGsCMAFCFU _F UMUsCs	-7,9	-	23,3	6,6	17
RG-NG-1021	25	TEAAsGsCMAFCFU _F UMUsCs	-1,5	-	11,5	10,9	-2
RG-NG-1022	26	TEAEAsGsCMAFCFU _F UMUsCs	-10,9	-7	-5,4	-	23,5
RG-NG-1023		AEGsCMAFCFU _F UMUsGE	95,3	75,2	25,6	3,1	3,12
RG-NG-1024		AsGsCMAFCFU _F UMTEGE	35,2	6,5	-4,7	-17	>100
RG-NG-1025		AsGsCMAFCFU _F UMUsGE	96,4	84,1	36,5	-3,8	1,85
RG5124		AsCsAMAFUFGFCMA _S Cs (anti-miR-33a)	23	16,1	9,3	5,1	>100

[000281] Para evaluar el antagonismo funcional de los oligonucleótidos anti-miR-17 frente a AMPA-R, se probaron determinados oligonucleótidos mediante la técnica manual de pinzamiento zonal de células enteras, que registra las corrientes de membrana como una medida de la actividad de AMPA-R.

[000282] Metrion Biosciences (Cambridge, Reino Unido) realizó estudios manuales de pinzamiento zonal de células completas. Los experimentos de pinza de voltaje de célula completa se realizaron a temperatura ambiente (18 - 21 °C) usando un amplificador de pinzamiento zonal EPC10 usando el software Patchmaster (HEKA Elektronik). Se fabricaron pipetas de parche de vidrio a partir de capilares de vidrio de borosilicato (Harvard Apparatus) con resistencias entre 1,4 y 2,5 MΩ. Las corrientes de membrana se registraron utilizando la técnica de pinzamiento zonal de células enteras. ChanTest® GluA1/GluA4 EZCells se pinzaron a un potencial de retención de -80 mV y las corrientes de membrana se generaron mediante (S)-AMPA 10 μM administrado mediante un sistema de perfusión VC38 (ALA Scientific Instruments). Los valores mínimos de amplitud de corriente se midieron con cada aplicación de 10 μM (S)-AMPA. El cambio fraccionario de amplitud de corriente producido por cada concentración de compuesto se calculó en relación con la corriente de control (precompuesto) y se expresó como cambio porcentual (% de inhibición) para cada célula. Los compuestos probados se muestran en la Tabla 6. RGLS4326 se probó en un estudio separado de todos los demás compuestos en la Tabla 6.

[000283] Como se muestra en la Tabla 6, en relación con RGLS4326, los compuestos RG-NG-1015, RG-NG-1016 y RG-NG-1017 exhibieron un antagonismo funcional reducido hacia AMPA-R según los estudios manuales de pinzamiento zonal de células enteras en humanos ChanTest® GluA1/GluA4 EZ-Cells.

Tabla 6: Antagonismo funcional de AMPA-R en estudios de pinzamiento zonal de células enteras

ID del compuesto	Secuencia & Química (5'-3')	Diana	% de Inhibición sobre corrientes de membrana evocadas con 10uM (s)-AMPA (Media ± DE)	
			0,3 uM	3 uM
RG-NG-1001	AsGsCsAsCsUsUsUsGs	miR-17	80,5 ± 6,3	88,8 ± 4,5
RGLS4326	AsGsC _M A _F C _F U _F U _M UsGs	miR-17	46,9 ± 9,8	87,4 ± 7,9
RG-NG-	AsGsC _M A _F C _F U _F U _M UsAs	miR-17	16,0 ± 5,0	39,5 ± 5,4

1015				
RG-NG-1016	AsGsCMAFCFUfUMUsCs	miR-17	16,0 ± 6,2	27,1 ± 9,8
RG-NG-1017	AsGsCMAFCFUfUMUsUs	miR-17	20,0 ± 6,3	28,2 ± 5,5
RG5124	AsCsAMAFUFGfCMAfCs	miR-33a	14,1 ± 7,2	42,1 ± 9,4

Ejemplo 3: Relación entre las propiedades de la nucleobase y la unión de AMPA-R

[000284] Como se ilustra en los estudios de unión de AMPA-R y pinzamiento zonal de células enteras, la presencia de guanosina en el extremo 3' de un oligonucleótido anti-miR-17, en la posición complementaria al primer nucleótido de miR-17, influye en el antagonismo funcional del AMPA-R. Al igual que la guanosina, la adenosina es una purina, sin embargo, la adenosina no inhibía el AMPA-R. La guanosina y la adenosina son similares en varias propiedades, excepto en los enlaces de hidrógeno, por lo que se evaluaron las diferencias en los enlaces de hidrógeno en las posiciones 1, 2 y 6 de la base de purina. Las nucleobases de purina analizadas se muestran en la Figura 1 y la Tabla 7. En la columna "Posición de la purina" de la Tabla 7, "A" indica una posición de la purina que es aceptora de hidrógeno y "D" indica una posición de la purina que es una donante de hidrógeno. En la columna "Posición de purina" de la Tabla 7, "N" indica una posición neutra que no es ni aceptor ni donante de hidrógeno. También se probaron restos de azúcar 2' variables en la nucleobase de purina, para evaluar la influencia de la química del resto de azúcar 2' en la capacidad de la nucleobase de purina para inhibir el AMPA-R.

Tabla 7: Compuestos anti-miR-17 con nucleobase variable y química del resto de azúcar

ID del compuesto	Nucleobase en el extremo 3' (notación de una sola letra)	Resto 2' de azúcar en el extremo 3'	SE Q ID NO	Secuencia Química (5'-3')	Posición de purina		
					# 6	# 1	# 2

RG-NG-1001	guanosina (G)	S-cEt		AsGsCsAsCsUsUsUsGs	A	D	D
RG-NG-1040	guanosina (G)	S-cEt	27	<u>C</u> _E T _E G _S <u>C</u> _E A _E <u>C</u> _E T _E G _S T _E A _D AsGsC _M A _F C _F U _F U _M U _S G _S	A	D	D
RG-NG-1032	guanosina (G)	S-cEt	28	G _S <u>C</u> _E A _E <u>C</u> _E T _E G _S T _E A _D AsGsC _M A _F C _F U _F U _M U _S G _S	A	D	D
RG4326	guanosina (G)	S-cEt		AsGsC _M A _F C _F U _F U _M U _S G _S	A	D	D
RG-NG-1033	guanosina (G)	ADN		AsGsC _M A _F C _F U _F U _M U _S G _D	A	D	D
RG-NG-1034	guanosina (G)	2'-O-metil		AsGsC _M A _F C _F U _F U _M U _S G _M	A	D	D
RG-NG-1035	inosina (I)	S-cEt		AsGsC _M A _F C _F U _F U _M U _S I _M	A	D	N
RG-NG-1036	2-aminopurina (N)	2'-O-metil		AsGsC _M A _F C _F U _F U _M U _S N _M	N	A	D
RG-NG-1037	2,6-diaminopurina (D)	2'-O-metil		AsGsC _M A _F C _F U _F U _M U _S D _M	D	A	D
RG-NG-1039	isoguanina (F)	ADN		AsGsC _M A _F C _F U _F U _M U _S F _D	D	D	A
RG-NG-1038	adenosina (A)	2'-O-metil		AsGsC _M A _F C _F U _F U _M U _S A _M	D	A	N
RG-NG-1015	adenosina (A)	S-cEt		AsGsC _M A _F C _F U _F U _M U _S A _S	D	A	N
RG5124	citidina (C)	S-cEt		AsCsA _M A _F U _F G _F C _M A _S C _S			

[000285] Los compuestos se probaron en el ensayo de unión de radioligandos descrito en este documento, para determinar la capacidad de los compuestos anti-miR-17 para competir con la unión del ligando AMPA [³H]. Como se muestra en la Tabla 8, se observó una correlación entre la inhibición de la unión del ligando al AMPA-R y la presencia de un aceptor de enlaces de hidrógeno en la posición de purina #6 de la nucleobase en el extremo 3' del oligonucleótido. Por ejemplo, los compuestos que tienen guanosina o inosina en el extremo 3' dan como resultado la inhibición de la unión del ligando al AMPA-R. Compuestos con una nucleobase de extremo 3' que tiene un aceptor de enlaces de hidrógeno en la posición de purina #6, por ejemplo, RG-NG-1037 y RG-NG-1039 tenían menos probabilidades de inhibir la unión del ligando al AMPA-R.

Tabla 8: Inhibición de la unión del ligando a AMPA-R

ID	Nucleobase en el extremo 3	Resto 2'- azúcar en el extremo 3'	Posición de purina			% Inhibición @ Concentración				IC50 (uM)
			# 6	#1	# 2	100 uM	10 uM	1 uM	0,1 uM	
RG-NG-1001	guanosina	S-cEt	A	D	D	102,9	99,3	81,3	41,9	0,15
RG-NG-1040	guanosina	S-cEt	A	D	D	64,1	38,9	14,4	10,4	28,61
RG-NG-1032	guanosina	S-cEt	A	D	D	92	78,3	43,8	24,3	1,17
RG-NG-4326	guanosina	S-cEt	A	D	D	99,7	83,5	40,8	-0,1	1,61
RG-NG-1033	guanosina	ADN	A	D	D	97,3	96,5	80,9	44,9	0,13
RG-NG-1034	guanosina	2'-O-metil	A	D	D	99,7	85,2	44,8	14,3	1,20
RG-NG-1035	inosina	S-cEt	A	D	N	98,5	91,3	46,3	27,2	0,76
RG-NG-1036	2-aminopurina	2'-O-metil	N	A	D	78,1	36,2	11,3	19,2	18,61
RG-NG-1037	2,6-diaminopurina	2'-O-metil	D	A	D	10,7	2,4	9,2	11,1	100,00
RG-NG-1039	isoguanina	ADN	D	D	A	30,2	35,8	27	27,3	100,00
RG-NG-1038	adenosina	2'-O-metil	D	A	N	81,3	47,4	25,4	17,9	8,23
RG-NG-	adenosina	S-cEt	D	A	N	5,6	-7	-	-0,8	100,

1015								10,3		00
RG5124	citidina	S-cEt				10,1	4,4	-0,6	-8,6	100,00

Ejemplo 4: Los compuestos anti-miR-17 con inhibición y unión reducidas de AMPA-R no mostraron toxicidad en el SNC en estudios con dosis alta

[000280] Se analizaron RG-NG-1015, RG-NG-1016 y RG-NG-1017 en estudios de toxicidad de ratones con dosis alta. Se analizó cada compuesto a una dosis individual a 2000 mg/kg y a dosis escalonadas (100, 450 y 2000 mg/kg). Como se muestra en la Tabla 9, mientras que las dosis escalonadas de RG-NG-1001 y RGLS4326 dieron como resultado ataxia, letargo, y en el caso de RGLS4326, pérdida del conocimiento en la dosis más alta, no se observó toxicidad en el SNC para RG-NG-1015, RG-NG-1016 ni RG-NG-1017.

10

Tabla 9: Compuestos anti-miR-17 y hallazgos relacionados al SNC

	Ratones/grupo	Dosis SC (mg/kg/dosis)	Cronograma	Hallazgos relacionados al SCN observados:
RG-NG-1001	8	100, 450, 2000	QDx3	Se observaron rascado del cuerpo y ataxia leves a 100 y en aumento a 450 mg/kg; se observó letargo a 2000 mg/kg
RGLS4326	10	100, 450, 2000	QDx4	Se observaron ataxia y/o letargo a 450 mg/kg; Se observaron ataxia, letargo y/o pérdida del conocimiento a 2000 mg/kg
RG-NG-1015	7	2000	Individual	No
	6	100, 450, 2000	QDx4	No

RG-NG-1016	10	2000	Individual	No
	6	100, 450, 2000	QDx4	No
RG-NG-1017	10	2000	Individual	No
	6	100, 450, 2000	QDx4	No
RG5124	7-10	100, 450, 2000	QDx3	Se observó ataxia leve a 2000 mg/kg

Ejemplo 5: Estudio de dosis máxima tolerada (MTD) y evaluación de la dosis comparativa de diferentes compuestos

[000286] Los datos de los estudios que figuran a continuación corroboran adicionalmente que el antagonismo de AMPA-R es responsable por la toxicidad del SNC y la mortalidad observadas en estudios de toxicidad previos de RGLS4326.

[000287] Estudio 1: Estudio de dosis máxima tolerada (MTD) y evaluación de la dosis comparativa de RG-NG-1017, RGLS4326 y RG-NG-1001

[000288] Se evaluaron los compuestos (RG-NG-1017, RGLS4326, RG-NG-1001) en un estudio de dosis máxima tolerada (MTD) piloto (se describe a continuación). RG-NG-1017, RGLS4326 y RG-NG-1001 se evaluaron inicialmente en 4 niveles de dosis cada uno. Se incluyó RG-NG-1017 para evaluación como un compuesto sin unión a AMPA-R, en comparación con RGLS4326 y RG-NG-1001, que se unen a AMPA-R. En este estudio se usaron ratones macho C57Bl/6J (Jackson Laboratories), de 6-7 semanas. Los ratones se asignaron de manera aleatoria a grupos de tratamiento y el estudio fue ciego. Se dejó que los animales se aclimataran durante no menos de 5 días y se alojaron en un ciclo de 12 h luz/oscuridad (luces encendidas a las 7:00 AM). No se alojaron más de 4 ratones en cada jaula en un sistema de estantería de jaulas ventilado. La dieta consistió en comida para ratones estándar y agua ad libitum.

[000289] Estudio piloto de MTD

[000290] Se utilizaron los siguientes parámetros para este estudio:

1. Vía/s de administración: dosificación intracerebroventricular (ICV) de RG-NG-1017, RG-NG-1001, RGLS4326
2. Volumen/es de dosis: 4 µL
3. Formulación/es: vehículo, dPBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+}
4. Frecuencia de dosis: Una vez
5. Duración del estudio: 8 días
6. Cantidad de grupos: 3
7. Cantidad de animales por grupo: (2-4 cada grupo)
8. Número total de animales: 54

[000291] Para la administración ICV, se suministró anestesia a los ratones y se colocaron para las inyecciones. La piel sobre el cráneo se cortó quirúrgicamente y se realizó un pequeño orificio en el cráneo por encima de la diana usando un micro taladro. Las coordenadas estereotácticas fueron anteroposteriores (AP), -0,4 mm; mediolaterales (ML), +/- 1,0-1,5 mm; dorsoventrales (DV), -3,0 mm del bregma para inyección en el ventrículo cerebral lateral tanto derecho como izquierdo (Hironaka et ál, 2015). Los animales se inyectaron de manera unilateral con 4 µl en el ventrículo cerebral lateral derecho. Los compuestos se inyectaron a lo largo de 1-2 min y la aguja se dejó en el lugar durante 0,5-1 min antes de extraerse. La incisión se cerró con suturas, grapas quirúrgicas o VetBond.

[000292] Luego del tratamiento ICV (día 0), los animales se monitorearon durante 7 días en los que se registraron las revisiones médicas, el peso corporal y la mortalidad. El día 7, se recolectaron el cerebro y el riñón y se fijaron (formalina al 10 %) y se almacenaron hasta la histología.

[000293] Los resultados del estudio de MTD se muestran en la Tabla 10 y la Figura 3. Se registró que todas las muertes animales ocurrieron en las primeras 5-8 horas después de la inyección ICV. Se registró que los ratones inyectados con 2,5 µg de RG4326 exhibieron algunos indicios inmediatos de dificultad respiratoria y se les proporcionaron almohadillas térmicas. RG-NG-1017 (compuesto que no se une a AMPA-R) se toleró bien a dosis altas sin MTD establecida para este compuesto (0 muertes a 600 µg, 100 µg o 50 µg; 1 muerte a 300 µg). Se observó un 100 % de mortalidad a dosis altas para RG4326 y RG-NG-1001 (p. ej., 600, 300, 100 µg), además de 100 % de mortalidad observada a 50 µg y 25 µg para ambos compuestos que se

unen a AMPA-R. No se obtuvo MTD de RG-NG-1001 en este estudio y se predijo que se encontraría por debajo de 2,5 µg. La MTD para RG4326 se previó a $\sim 2,5 < 5,0$ µg mediante ICV. Se registró que todos los animales se recuperaron por completo el día 2 de la observación.

Tabla 10: Resumen de los resultados del estudio de MTD de 7 días

	Mortalidad/Número total de ratones		
Dosis (µg)	RG-NG-1017	RGLS4326	RG-NG-1001
600	0/2	2/2	2/2
300	1/2	2/2	2/2
100	0/2	2/2	2/2
50	0/2	3/3	3/3
25		3/3	3/3
10		3/4	3/4
5		2/4	4/4
2,5		0/ 3	1/3

5

[000294] Estudio de dosis máxima tolerada (MTD) para RGLS4326

[000295] Se realizó un segundo estudio de MTD para RGL4326 mediante ICV para evaluar la selección de dosis para evaluar el compuesto en modelos de enfermedad (Tabla 11). En este estudio, se evaluó una cepa diferente de ratón (ratones macho suizos Rjorl, de 5 semanas, obtenidos de Janvier). Los ratones se colocaron bajo anestesia de isoflurano (5 % para inducción y 2 % para mantenimiento, en 100 % de O₂) y se les proporcionaron 5 mg/kg de carprofeno (Rimadyl®) s.c. Luego se colocaron en un marco estereotáxico. Se realizó una incisión sagital de línea media en el pericráneo y se perforó un orificio en el cráneo sobre el ventrículo lateral izquierdo. Se colocó una cánula de acero inoxidable (diámetro externo 0,51 mm) de manera estereotáxica en el ventrículo lateral izquierdo en las siguientes coordenadas. +0,5 posterior al Bregma, L ± 0,7 mm, V = -2,7 mm. Después de una espera de 2 minutos para dejar que el tejido cerebral se deslice sobre la cánula, se infundieron 4 µL de una solución que contenía 0,625 mg/mL de RG4326 lentamente a lo largo de 2 minutos. Después de la infusión, la cánula se dejó allí por otros 5 minutos para prevenir el contraflujo de la solución a lo largo del recorrido de la cánula. A los ratones se les proporcionaron 5 mg/kg de carprofeno (Rimadyl®)

10

15

20

s.c. 24 y 48 horas después de la cirugía. Los ratones se monitorearon durante 3-7 días después de la cirugía (comenzando 24 h después de la administración ICV) y se registró su peso corporal a diario para verificar su estado de salud. Para los ratones monitoreados a lo largo de 7 días, el peso corporal se registró el día 1 y el día 7 después de la cirugía para verificar su estado de salud.

Tabla 11: Diseño del estudio de MTD para RGLS4326

Grupo	Cantidad de animales	Tratamiento (RG4326)	Nivel de dosis	Concentración (mg/mL)	Volumen de administración
1	4 machos	RG4326 (i.c.v.)	3 mg/ratón	0,75 mg/mL	4 mL/ratón
2	4 machos	RG4326 (i.c.v.)	4 mg/ratón	1 mg/mL	4 mL/ratón
3	4 machos	RG4326 (i.c.v.)	5 mg/ratón	1,25 mg/mL	4 mL/ratón
4	4 machos	RG4326 (i.c.v.)	7,5 mg/ratón	1,875 mg/mL	4 mL/ratón

[000296] En el Estudio 1, 6 ratones se inyectaron con 4 µL de una solución a 0,625 mg/mL (2,5 µg en total por ICV; Tabla 10). Al final de la anestesia, se dejaron a los ratones recostados de lado. Se mantuvieron silenciosos con algunos períodos de rascado durante las primeras horas después de la cirugía. No se observaron efectos tóxicos a 24, 48 o 72 horas en los 6 ratones a los que se les administró. En el Estudio 2, se inyectaron cuatro ratones con 4 dosis diferentes de RGLS4326 (0,75, 1,0, 1,25 y 1,875 mg/mL, volumen de 4 µL). Se descubrió que había fallecido un ratón que recibió la dosis más alta (1,875 mg/mL, es decir, 7,5 µg/ratón) alrededor de 24 horas después de la inyección ICV. Todos los otros ratones tenían un buen estado de salud hasta el final del estudio piloto (7 días después de la administración).

[000297] Los resultados combinados de los Estudios 1 y 2 demostraron que RG4326 fue generalmente bien tolerado en los sujetos de prueba, pero solo a dosis considerablemente menores que RG-NG-1017 (ver la Figura 3).

[000298] La Tabla 12 resume los datos de MTD para RGLS4326 para los modelos de ratón

del Estudio 1 y 2. En función de estos resultados del Estudio 2, se predijo una MTD de ~ 4 µg para RGLS4326 en la cepa de ratón suizo Rjorl.

Tabla 12: Datos de supervivencia de 7 días para los Estudios 1 y 2 de MTD

	Ratones muertos/total	
Dosis (µg) RGLS4326	Estudio 1	Estudio 2
600	2/2	
300	2/2	
100	2/2	
50	3/3	
25	3/3	
10	3/4	
7,5	-	1/4
5	2/4	0/4
4		0/4
3		0/4
2,5	0/3	0/6

- 5 **[000299]** En resumen, se evaluaron los compuestos RG-NG-1017, RGLS4326 y RG-NG-1001 en dos estudios de MTD, lo que demostró diferencias significativas en la tolerabilidad entre compuestos sin unión a AMPA-R (RG-NG-1017) y con unión a AMPA-R (RGLS4326, RG-NG-1001) (ver la Figura 3). A pesar de la 1 muerte en la dosis ICV de 300 µg, no se estableció una MTD para RG-NG-1017, ya que no ocurrieron muertes en la dosis más alta analizada de 600 µg. Además, no se observó impacto sobre la mortalidad en las dosis de 100 y 50 µg para RG-NG-1017. En comparación, un impacto claro sobre la mortalidad fue evidente para los compuestos con unión a AMPA-R RGLS4326 y RG-NG-1001, sin animales sobrevivientes en el intervalo de dosificación analizado de 25 µg a 600 µg. Se exhibió una tendencia para la supervivencia mejorada a dosis menores de RGLS4326 (10 µg), con 50 % de supervivencia en animales tratados con RGLS4326 a 5 µg, y 100 % de supervivencia a 2,5 µg. De manera similar,

en el caso de RG-NG-1001 (que muestra unión a AMPA-R más fuerte en comparación con RGLS4326), el 100 % de mortalidad fue evidente en la dosis baja de 5 µg con una tendencia hacia una mejora en la supervivencia a 2,5 µg. Los resultados para RGLS43426 del Estudio 1 se confirmaron adicionalmente en un segundo estudio de MTD (Estudio 2), utilizando una cepa de ratón diferente. Este estudio descubrió que pueden existir diferencias modestas para la tolerabilidad de RGLS4326 entre cepas, observándose que la supervivencia solo impactó a ratones en la dosis superior de 7,5 µg en comparación con 5 µg en el Estudio 1 usando C57/Bl/6J. Sin embargo, estos resultados siguen corroborando que la MTD para el RGLS4326 con unión a AMPA-R ocurre entre ~2,5 µg y 5-7,5 µg (dependiendo de la cepa), en comparación con una MTD significativamente mayor para RG-NG-1017 sin unión a AMPA-R (al menos >40 veces, o más) (Figura 3).

Ejemplo 6: Potencia *in vitro* e *in vivo* de los compuestos anti-miR-17

[000300] La potencia *in vitro* de ciertos compuestos se evaluó usando un ensayo de detección de luciferasa miR-17 que usa un vector indicador de luciferasa para miR-17, con dos sitios de unión de miR-17 completamente complementarios en tándem en la 3'-UTR del gen de la luciferasa. Las células HeLa se cotransfectaron con el vector indicador de luciferasa y un vector de expresión de miR-17 exógeno que actuó para reprimir la señal de luciferasa. A continuación, las células HeLa se trataron individualmente con oligonucleótidos anti-miR-17 a concentraciones de 0,045, 0,137, 0,412, 1,23, 3,70, 11,1, 33,3, 100 y 300 nM. Al final del período de transfección de 18 a 24 horas, se midió la actividad de la luciferasa. Se incluyó RG5124 como compuesto de control. Como se muestra en la Tabla 13, estos compuestos inhibieron la función de miR-17 y desreprimieron la actividad indicadora de luciferasas de miR-17 con valores de EC₅₀ similares en comparación con RGLS4326 *in vitro*.

Tabla 13: Inhibición de miR-17 en el ensayo de luciferasa

ID del compuesto	EC ₅₀ (nM)	Log ₂ FC (37,5 nm)
RGLS4326	18,50	2,70
RG-NG-1032	< 1	3,85
RG-NG-1015	22,40	2,51
RG-NG-1016	20,30	2,32
RG-NG-1017	15,00	2,67

RG5124	n/a	0,40
--------	-----	------

[000301] Como se muestra en la Figura 4, RG-NG-1015 inhibió miR-17, así como miR-20a, miR-106a y miR-93 en un ensayo de luciferasa en células HeLa, con valores de EC₅₀ similares en comparación con RGLS4326 *in vitro*.

- 5 **[000302]** RG-NG-1015 también desreprimió sensores de luciferasa que contenían la región no traducida (UTR) 3' de longitud completa de los genes diana directos miR-17 PKD1 y PKD2, con valores de EC₅₀ similares en comparación con RGLS4326 *in vitro*.

- [000303]** La actividad de ciertos compuestos se evaluó usando una firma farmacodinámica de miR-17 de ratón (miR-17 PD-Sig), que consiste en la expresión de 18 genes diana de miR-17 únicos normalizados por seis genes de mantenimiento de referencia, para proporcionar una evaluación imparcial e integral de la actividad de miR-17. La puntuación PD-Sig de miR-17 de ratón fue el promedio calculado de los cambios log₂ individuales de los 18 genes (normalizados por seis genes de mantenimiento) en comparación con la transfección simulada (Lee et al., *Nat. Commun.*, 2019, 10, 4148).

- 15 **[000304]** Como se muestra en la Tabla 13, los oligonucleótidos probados inhibieron la función de miR-17 y desreprimieron la expresión de múltiples genes diana directos de miR-17 (según lo medido por la firma de miR-17 PD) en líneas celulares de riñón normales y con PKD (tanto de ratón como de humano) con valores EC₅₀ similares en comparación con RGLS4326 *in vitro*. El PD-Sig para RGLS4326 en células mIMCD3 (77,2, indicado por “**”) no se generó en este experimento; el valor en la Tabla 14 es el informado por Lee et al., *Nat. Comun.*, 2019, 10, 4148. Las celdas en blanco de la tabla indican que un compuesto no se probó en una línea celular particular.

Tabla 14: miR-17 PD-Sig en líneas celulares normales y PKD

Línea celular	Especies	Derivado de	Anti-miR				
			RGLS4326	RG-NG-1015	RG-NG-1016	RG-NG-1017	RG5124
mIMCD3	ratón	Normal	77,2*	168	146,3	134,5	n/a
D52B5	ratón	PKD	92,8	82,4		74,1	506,6

HK-2	humano	Normal	47,8	55,6		49,2	
WT9-7	humano	PKD	17,3	21,2		20,1	

[000305] La potencia *in vivo* se evaluó mediante el ensayo de desplazamiento de polisomas de microARN (miPSA). Este ensayo se utilizó para determinar la medida en que los compuestos interactúan directamente con la diana miR-17 en el riñón en ratones normales y PKD. El miPSA se basa en el principio de que los miARN activos se unen a sus dianas de ARNm en polisomas de alto peso molecular (HMW, por sus siglas en inglés) traduccionalmente activos, mientras que los miARN inhibidos residen en los polisomas de bajo peso molecular (LMW, por sus siglas en inglés). El tratamiento con anti-miR da como resultado un cambio del microARN de los polisomas HMW a los polisomas de LMW. Por lo tanto, el miPSA proporciona una medición directa del involucramiento de la diana del microARN mediante un anti-miR complementario (Androsavich et al., *Nucleic Acids Research*, 2015, 44: e13).

[000306] A los ratones de tipo salvaje se les administró una dosis única de 0,3mg/kg, 3 mg/kg, o 30 mg/kg. El tejido renal se recogió siete días después y se sometió a miPSA. La puntuación media de desplazamiento para cada tratamiento se muestra en la Tabla 15 (PBS, n = 17; RGLS4326 30 mg/kg, n = 10; todos los demás tratamientos, m = 4-5). Los oligonucleótidos probados desplazaron a miR-17 del polisoma activo en la traducción (medido por miPSA) en riñones de ratón normales.

Tabla 15: Puntuaciones de desplazamiento de miPSA

			Dosis anti-miR		
			0,3 m/kg	3 mg/kg	30 mg/kg
RG-NG-1015	Media		2,238	2,562	2,718
	SEM		0,1242	0,1303	0,118
RG-NG-1016	Media		1,892	2,263	1,134
	SEM		0,1088	0,1716	0,5324
RG-NG-	Media		2,077	2,292	2,793

1017					
	SEM		0,1513	0,08974	0,09685
RGLS4326	Media		1,846	2,247	2,362
	SEM		0,1234	0,0478	0,1439
Vehículo (PBS)	Media	0			
	SEM	0,06318			
RG5124	Media				0,5935
	SEM				0,1784

[000307] Además, como se muestra en la Tabla 16 y la Figura 5A-5D, RGLS4326 y RG-NG-1015 tienen perfiles de farmacocinética y acoplamiento a la diana similares (según se midió mediante miPSA) luego de una única administración subcutánea en ratones C57BL6.

Tabla 16: perfiles de farmacocinética y acoplamiento a la diana

Tejido	Artículo de prueba	Dosis	T _{máx}	C _{máx}	AUC _{última}	T _{1/2}	Relación riñón a hígado mediante AUC _{última}
Plasma	RGLS4326	26,0 mg/kg	1 h	32 mg/mL	95,3 (mg*h)/mL	2,9 h	-
	RG-NG-1015	26,9 mg/kg	1 h	26 mg/mL	86,9 (mg*h)/mL	2,6 h	-
Riñón	RGLS4326	26,0 mg/kg	8 h	54 mg/g	395 (mg*d)/g	9,4 d	23,9
	RG-NG-1015	26,9 mg/kg	8 h	53 mg/g	447 (mg*d)/g	9,9 d	22,6
Hígado	RGLS4326	26,0 mg/kg	1 h	4,8 mg/g	16,5 (mg*d)/g	4,7 d	-
	RG-NG-1015	26,9 mg/kg	1 h	5,2 mg/g	19,8 (mg*d)/g	6,2 d	-

Ejemplo 7: Eficacia de RG-NG-1015 en un modelo experimental de ADPKD

[000308] La eficacia de RG-NG-1015 se evaluó en el modelo de ratón KspCre/Pkd1F/RC (*Pkd1*-F/RC). *Pkd1*-F/RC es un modelo ortólogo de ADPKD que contiene una mutación *Pkd1* hipomórfica de línea germinal (el equivalente en ratón de la PKD1-R3277C humana (mutación RC) en un alelo y sitios loxP que flanquean los exones 2 y 4 de *Pkd1* en el otro alelo. Se usó la recombinación mediada por KspCre para eliminar los exones de *Pkd1* emparejados (floxing) y producir un ratón mutante compuesto con una mutación nula somática específica del túbulo renal en un alelo y una mutación hipomórfica de la línea germinal en el otro. Este es un modelo agresivo, pero de larga duración, de ADPKD (Hajarnis et al., *Nat. Commun.*, 2017, 8, 14395).

[000309] En cada uno de los días 8, 10, 12 y 15 de edad, se administró a ratones *Pkd1*-F/RC del mismo sexo una inyección subcutánea de RGLS4326 a una dosis de 20 mg/kg (n = 8; 4 machos y 4 hembras por grupo de tratamiento), RG5124 a una dosis de 20 mg/kg (n = 8), o RG-NG-1015 a una dosis de 20 mg/kg (n = 8), o PBS (n = 8). Los ratones se sacrificaron a los 18 días de edad y se midieron el peso de los riñones, el peso corporal, el índice de quistes, el nivel de creatinina sérica y el nivel de nitrógeno ureico en sangre (BUN). El nivel de BUN es un marcador de la función renal. Un nivel más alto de BUN se correlaciona con una función renal más deficiente, por lo que una reducción en el nivel de BUN es un indicador de una lesión y daño renal reducidos y una función mejorada. La significación estadística se calculó mediante ANOVA unidireccional con corrección múltiple de Dunnett.

[000310] Los resultados se muestran en la Tabla 17 y la Figura 2 (**** = $p < 0,0001$; *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; ns = insignificante). La eficacia de RG-NG-1015 fue similar a la de RGLS4326. La relación media entre el peso de los riñones y el peso corporal (proporción KW/BW) fue significativamente menor en ratones *Pkd1*-F/RC tratados con RGLS4326 y RG-NG-1015, respectivamente, que la proporción KW/BW media en ratones *Pkd1*-F/RC a los que se administró PBS (FIG. 2A). Los niveles medios de BUN se redujeron significativamente en los ratones *Pkd1*-F/RC tratados con RGLS4326 y RG-NG-1015, respectivamente, en comparación con los ratones tratados con PBS (FIG. 2B). Los niveles medios de creatinina sérica en ratones *Pkd1*-F/RC se redujeron en ratones tratados con RGLS4326 y RG-NG-1015, respectivamente, en relación con ratones tratados con PBS, sin embargo, la reducción no fue estadísticamente significativa (FIG. 2C). El tratamiento con el oligonucleótido de control, RG5124, no redujo la

relación entre el peso de los riñones y el peso corporal, la creatinina sérica o el BUN sérico, lo que demuestra que los resultados observados con RGLS4329 y RG-NG-1015 fueron específicos de la inhibición de miR-17.

Tabla 17: Eficacia de RG-NG-1015 en un modelo de ratón de ADPKD

	PBS	RGLS4326	RG-NG-1015	RG5124
Media Proporción BW/KW	65,61	16,81	16,83	91,75
Diferencia media frente a PBS		-48,8	-48,79	26,14
Valor P ajustado		<0,0001	<0,0001	0,0045
Media BUN en suero	42,48	22,41	22,26	50,61
Diferencia media frente a PBS		-20,06	-20,21	+8,138
Valor P ajustado		<0,0001	<0,0001	0,1142
Media Creatina sérica	0,1619	0,1273	0,1279	0,2403
Diferencia media frente		-0,03463	-0,03400	+0,07838

a PBS				
Valor P ajustado		0,1456	0,1557	0,0004

[000311] La eficacia de RG-NG-1015 también se evaluó en el modelo de ratón *Pcy*/DBA de PKD sola y junto con tolvaptán. Los ratones *Pcy*/DBA exhiben PKD de progreso lento ocasionada por una mutación sin sentido invertida en el gen *Nphp3*, que es responsable de la nefronoptosis del adolescente en seres humanos (Takahashi et ál., *J Am Soc Nephrol* 1991, 1:980–989; Olbrich et ál., *Nat Genet* 2003, 34:455–459). En ratones *Pcy*, los quistes derivan de túbulo distales y los segmentos de nefrona completa se tornan ocupados de manera difusa por quistes que acompañan la evolución de la enfermedad a las 30 semanas de edad, a menudo con la ocurrencia de ESRD (Nagao et ál., *Exp Anim* 2012, 61:477–488). En particular, los ratones *Pcy*/DBA macho se han usado para caracterizar los perfiles farmacológicos de muchos productos de investigación para el tratamiento de ADPKD, lo que incluye tolvaptán y RGLS4326, el anti-miR-17 de primera generación (Aihara et ál., *J Pharmacol Exp Ther* mayo de 2014;349(2):258-67 y Lee et ál., *Nat. Commun.*, 2019, 10, 4148). Los estudios en estos ratones típicamente involucran el inicio del tratamiento a ~5 semanas de edad y continúan hasta 15-30 semanas de edad.

[000312] Como se indica en la Figura 6A y 6B, se trataron cinco grupos de ratones *Pcy*/DBA macho (n=13 por grupo de tratamiento) por vía subcutánea con PBS o RG-NG-1015 a 25, 5, 1 o 0,2 mg/kg una vez cada dos semanas (Q2W). También se trataron dos grupos de ratones *Pcy*/DBA macho (n=13 por grupo) con RG-NG-1015 a 50 mg/kg una vez cada cuatro semanas (Q4W) o a 12,5 mg/kg una vez por semana (QW). Se trataron otros cuatro grupos de ratones *Pcy*/DBA macho (n=13 por grupo) por vía subcutánea con PBS o RG-NG-1015 a 25, 5 o 1 mg/kg Q2W junto con tolvaptán a 0,3 % (alimento p/p) *ad libitum*. Un grupo de ratones WT-BDA/2J macho que recibió inyecciones subcutáneas de PBS Q2W se incluyó en el estudio como una referencia de intervalo normal. Los ratones se colocaron de manera aleatoria en grupos de tratamiento a 5 semanas de edad y el tratamiento comenzó a 6 semanas de edad durante 17 semanas y se sacrificaron 7 días después del tratamiento final. Se midieron el peso del riñón, el peso corporal, el índice quístico de riñón, la relación Ngal a creatinina en orina (Ngal/Cr). Ngal/Cr en orina es un marcador de lesiones renales.

[000313] Como se ve en la Figura 6C-6E y las Tablas 18-20, RG-NG-1015 es eficaz en el

modelo de ratón Pcy/DBA de PKD en diversas dosificaciones y regímenes y también proporciona efectos aditivos o sinérgicos cuando se usa con tolvaptán. En particular, el tratamiento con RG-NG-1015 redujo significativamente el KW/BW medio, Ngal/Cr en orina e índice quístico de riñón en ratones Pcy/DBA en una manera dependiente de la dosis (Tabla 18 y Figura 6C-6E). Además, el tratamiento con RG-NG-1015 con dosificación total similar (total de 212,5-250 mg por ratón durante la duración del estudio), pero diferentes regímenes de dosificación (lo que incluye QW, Q2W y Q4W) redujo el KW/BW medio, Ngal/Cr en orina e índice quístico de riñón a niveles similares en ratones Pcy/DBA (Tabla 19; Figura 6C-6E). El tratamiento con tolvaptán solo redujo el KW/BW medio, Ngal/Cr orina y índice quístico de riñón en ratones Pcy/DBA, y la combinación de RG-NG-1015 más tolvaptán redujo adicionalmente el KW/BW medio, Ngal/Cr en orina e índice quístico en riñón (Tabla 20; Figura 6C-6E). Los efectos observados de la combinación de fármacos en el KW/BW, Ngal/Cr en orina e índice quístico de riñón fueron sinérgicos, en su mayoría aditivos y menos que aditivos, respectivamente, como se indicó mediante análisis de aditividad de Bliss (Tabla 20).

Tabla 18: Efectos de la dosis

Artículo de prueba 1 Dosificación SC	Artículo de prueba 2 Suplemento de alimento	Dosis	Régimen	KW/BW medio		Ngal/Cr media en orina		Área quística media	
				mg/kg	% de inhibición	mg/mg	% de inhibición	%	% de inhibición
Vehículo	-	-	Q2W	91,3	0	21,07	0	60,62	0
RG-NG-1015	-	25 mg/kg	Q2W	66,87	34,3	11,36	48,8	46,46	26,0
RG-NG-1015	-	5 mg/kg	Q2W	70,02	29,9	14,65	32,3	44,58	29,4
RG-NG-1015	-	1 mg/kg	Q2W	82,43	12,5	15,18	29,6	50,58	18,4
RG-NG-1015	-	0,2 mg/kg	Q2W	78,02	18,7	18,38	13,5	47,09	24,8

Tabla 19: Efectos del régimen

Artículo de prueba 1 Dosificación SC	Artículo de prueba 2 Suplemento de alimento	Dosis	Régimen	KW/BW medio		Ngal/Cr media en orina		Área quística media		Cantidad de dosis	Dosis totales (mg)
				mg/kg	% de inhibición	mg/mg	% de inhibición	%	% de inhibición		
Vehículo	-	-	Q2W	91,3	0	21,07	0	60,62	0	17	
RG-NG-1015	-	25 mg/kg	Q2W	66,87	34,3	11,36	48,8	46,46	26,0	9	225
RG-NG-1015	-	50 mg/kg	Q4W	67,09	34,0	9,32	59,1	47,35	24,3	5	250
RG-NG-1015	-	12,5 mg/kg	QW	74,52	23,6	8,82	61,6	44,99	28,7	17	212,5

Tabla 20: Efectos de la combinación

Artículo de prueba 1 Dosificación SC	Artículo de prueba 2 Suplemento de alimento	Dosis	Régimen	KW/BW medio			Ngal/Cr media en orina			Área quística media		
				mg/kg	% de inhibición	Análisis Bliss	mg/mg	% de inhibición	Análisis Bliss	%	% de inhibición	Análisis Bliss
Vehículo	-	-	Q2W	91,3	0	-	21,07	0	-	60,62	0	-
Vehículo	0,3 % de tolvaptán	-	-	59,26	44,9	-	8,73	62,1	-	44,68	29,2	-
RG-NG-1015	-	25 mg/kg	Q2W	66,87	34,3	-	11,36	48,8	-	46,46	26,0	-
RG-NG-1015	0,3 % de tolvaptán	25 mg/kg	Q2W	42,21	68,9	Sinérgico	5,04	80,6	Aditivo	38,61	40,4	<Aditivo
RG-NG-	-	5 mg/kg	Q2W	70,02	29,9	-	14,65	32,3	-	44,58	29,4	-

1015												
RG-NG-1015	0,3 % de tolvaptán	5 mg/kg	Q2W	45,62	64,1	Sinérgico	5,84	76,6	Aditivo	37,47	42,5	<Aditivo
RG-NG-1015	-	1 mg/kg	Q2W	82,43	12,5	-	15,18	29,6	-	50,58	18,4	-
RG-NG-1015	0,3 % de tolvaptán	1 mg/kg	Q2W	47,11	62,0	Sinérgico	11,16	49,8	<Aditivo	41,91	34,3	<Aditivo

Ejemplo 8: Metabolitos de RG-NG-1015

[000314] Se llevaron a cabo estudios *in vitro* e *in vivo* para investigar el metabolismo de RG-NG-1015. Para muestras tanto *in vitro* como *in vivo*, las muestras de tejido se homogeneizaron en amortiguador de lisis en hielo y se aislaron RG-NG-1015 y/o metabolitos de plasma, homogeneizados tisulares u orina mediante etapas de extracción líquido-líquido y extracción de fase sólida. Las muestras de calibración que contenían cantidades conocidas de RG-NG-1015 se extrajeron en paralelo con muestras de homogeneizados tisulares, plasma u orina de prueba. El peso molecular (MW) de RG-NG-1015 y los metabolitos potenciales se calculó a partir de la señal MS y se comparó con los valores teóricos.

[000315] La estabilidad metabólica *in vitro* de RG-NG-1015 se evaluó en tejidos de ratón, de mono y de ser humano (es decir, lisados de riñón y de hígado) así como suero. Se incubó RG-NG-1015 en estas matrices a una concentración de 5 µM como muestras de homogeneizados de riñón e hígado (que corresponden a 307 µg/g de tejido) o de suero (que corresponden a 15,3 µg/mL) durante 24 horas a 37 °C. Luego RG-NG-1015 y los metabolitos se extrajeron y analizaron mediante HPLC-TOF.

[000316] Se evaluó el metabolismo *in vivo* en hígado y riñón después de una dosis individual de RG-NG-1015 a ratones CD-1, y en plasma, tejidos y orina después de la administración individual y/o repetida a monos. Los ratones CD-1 recibieron una dosis individual SC de RG-NG-1015 a 2000 mg/kg y los monos recibieron hasta 5 dosis semanales SC de RG-NG-1015 a 15, 75 o 150 mg/kg. Luego RG-NG-1015 y los metabolitos se extrajeron y se analizaron mediante HPLC-TOF.

[000317] RG-NG-1015 se somete a hidrólisis secuencial de ambos extremos 3' y 5' para producir metabolitos con acortamiento de cadena (ver Tabla 21). Se identificaron nueve metabolitos potenciales: 5' N-1, 5' N-2, 5' N-3, 5' N-4, 3' N-1, 3' N-2, 3' N-3, 3' N-4 y 3' N-5 como se establece a continuación en la Tabla 21. Todos los metabolitos difirieron de RG-NG-1015 con respecto a la extracción de nucleótidos terminales y terminan en grupos hidroxilo en los extremos 3' y 5'. No se observaron cortómetros del extremo 5' (de N-5 a N-8) y cortómetros del extremo 3' (de N-6 a N-8).

Tabla 21: Secuencias, masa exacta de molécula neutral, m/z y estado de carga de RG-NG-1015 y sus metabolitos potenciales

Nombre del compuesto	SEQ ID NO	Secuencia del compuesto (5'->3')*	Masa exacta de molécula neutral	Relación masa-carga (m/z)	Estado de carga	Comentario
RG-NG-1015		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S A _S	3064,31	1531,15	-2	Molécula original
3'N-1		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S	2693,26	1345,63	-2	Metabolito
3'N-2		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M	2345,24	1171,62	-2	Metabolito
3'N-3		A _S G _S C _M A _F C _F U _F	2009,22	1003,61	-2	Metabolito
3'N-4		A _S G _S C _M A _F C _F	1685,23	841,61	-2	Metabolito
3'N-5		A _S G _S C _M A _F	1362,21	680,11	-2	Metabolito
3'N-6		A _S G _S C _M	1015,19	506,59	-2	No se observó
3'N-7		A _S G _S	680,15	339,08	-2	No se observó
3'N-8		A _S	293,11	145,56	-2	No se observó
5'N-1		G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S A _S	2693,26	1345,63	-2	Metabolito
5'N-2		C _M A _F C _F U _F U _M U _S A _S	2306,22	1152,11	-2	Metabolito
5'N-3		A _F C _F U _F U _M U _S A _S	1971,19	984,59	-2	Metabolito
5'N-4		C _F U _F U _M U _S A _S	1624,16	811,08	-2	Metabolito
5'N-5		U _F U _M U _S A _S	1301,15	649,57	-2	No se

						observó
5'N-6		U _M U _S A _S	977,15	487,57	-2	No se observó
5'N-7		U _S A _S	641,13	319,57	-2	No se observó
5'N-8		A _S	293,11	145,56	-2	No se observó
5'N+1	29	A _S A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S A _S	3435,35	1717,17	-2	Impureza sintética