



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

(21) BR 112020001367-6 A2



(22) Data do Depósito: 26/07/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 11/08/2020

(54) **Título:** MÉTODOS DE PROTEÇÃO DA INTEGRIDADE VASCULAR INDUZIDA POR TERAPIA DE RADIAÇÃO DIRECIONADA

(51) **Int. Cl.:** A61K 47/60; A61K 38/00; A61P 35/00.

(30) **Prioridade Unionista:** 26/07/2017 US 62/537,049.

(71) **Depositante(es):** JANSSEN PHARMACEUTICA N.V..

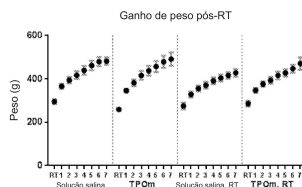
(72) **Inventor(es):** GARY EICHENBAUM; ALFRED TONELLI.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018043821 de 26/07/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/023418 de 31/01/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 22/01/2020

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se a métodos de proteção da integridade vascular em um indivíduo exposto a uma terapia de radiação direcionada. Em particular, uma quantidade eficaz de um mimético de trombopoietina (TPO), tal como TPOM, é usada para proteger a integridade vascular após a terapia de radiação.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"MÉTODOS DE PROTEÇÃO DA INTEGRIDADE VASCULAR
INDUZIDA POR TERAPIA DE RADIAÇÃO DIRECIONADA".**

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS APRESENTADA
ELETRONICAMENTE

[0001] O presente pedido contém uma listagem de sequências, que é enviada eletronicamente via EFS-Web como uma listagem de sequências formatada em ASCII com o nome de arquivo "Listagem de sequências", data de criação em 24 de julho de 2018 e tamanho aproximado de 3,7 kb. A listagem de sequências enviada via EFS-Web faz parte da especificação e é aqui incorporada por referência na sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A presente invenção refere-se a métodos para proteger a integridade vascular, mais especificamente, métodos para proteger a integridade vascular em um indivíduo exposto a uma terapia de radiação direcionada. Os métodos compreendem administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um mimético de trombopoietina (TPO).

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0003] A síndrome aguda da radiação (SAR), também conhecida como toxicidade da radiação ou doença de radiação, é uma doença aguda causada pela irradiação de todo o corpo (ou da maior parte do corpo) por uma alta dose de radiação penetrante em um período muito curto de tempo. É um processo multifásico que pode levar a mortalidade (Waselenko e outros, Ann. Intern Med. 140 (12): 1037-51 (2004)). Os efeitos imediatos da irradiação são observados dentro da vasculatura, seguidos por efeitos hematopoiéticos pronunciados (Krigsfeld e outros, Radiat. Res. 180 (3): 231-4 (2013)). Dentro de 24 horas após a irradiação, as células endoteliais vasculares expressam moléculas de adesão (por exemplo, L-seletina), que promovem adesão e

extravasamento de leucócitos, e podem levar a uma resposta inflamatória (Hallahan e outros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217 (3): 784-95 (1995); Hallahan e outros, *Radiat. Res.* 152 (1): 6 a 13 (1999)). Esses efeitos vasculares precoces podem ser acompanhados pela exposição da membrana basal e hemorragia, o que leva à formação de micro coágulos. Dependendo da extensão da formação dos micro coágulos, isso pode levar à depleção de plaquetas e fatores fibrinolíticos. Como a população de plaquetas não pode ser reabastecida com eficiência devido à depleção por irradiação de células-tronco hematopoiéticas, ocorre trombocitopenia, levando a um afinamento vascular adicional e à progressão da coagulopatia intravascular disseminada. Portanto, a proteção do endotélio vascular pode atenuar lesões induzidas por radiação e mortalidade (Rotolo e outros, *J. Clin. Invest.* 122 (5): 1786-90 (2012)).

[0004] A patogênese que leva a lesões no tecido normal circundante após a exposição à radiação é complexa. A radiação ionizante causa morte celular, tanto parenquimatosa quanto vascular, através de citotoxicidade direta (geração excessiva de espécies reativas do oxigênio), inflamação e resposta imune inata (Kim e outros, *Radiat. Oncol. J.* 32 (3): 103-15 (2014)). Algumas alterações ocorrem agudamente (isto é, inflamação, lesão endotelial vascular, micro-hemorragia) enquanto outras se manifestam semanas a meses após a exposição à radiação (isto é, inflamação crônica, disfunção nervosa, cicatrizes e fibrose). A proliferação de fibroblastos é um componente chave da lesão de terapia de radiação (RT) em estágio tardio (Brush e outros, *Semin. Radiat. Oncol.* 17 (2): 121-30 (2007)).

[0005] Dado que múltiplas facetas da morbidade induzida por radiação decorrem da depleção de plaquetas, vários pesquisadores avaliaram se as terapias baseadas em trombopoietina (TPO) são eficazes na prevenção da síndrome aguda da radiação (Mouthon e

outros, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80 (7): 717-21 (2002); Neelis e outros, *Blood* 90 (7): 2565-73 (1997)). Os potenciais mecanismos para a sobrevida aumentada incluem seus efeitos mieloprotetores e estimuladores de plaquetas, bem como efeitos diretos de proteção e/ou reparação no endotélio vascular. A trombopoietina (TPO) é um fator de crescimento que é sintetizado e secretado pelo fígado. A TPO regula os níveis de plaquetas ligando-se a c-mpl nos megacariócitos (para estimular a maturação plaquetária) e nas plaquetas existentes (fornecendo retorno negativo) (Mitchell e Bussell, *Semin. Hematol.* 52 (1): 46 a 52 (2015)). A TPO também pode atuar diretamente na vasculatura pela ligação a receptores de c-mpl localizados nas células endoteliais vasculares (Langer e outros, *J. Mol. Cell Cardiol.* 47 (2): 315-25 (2009)). Houve vários estudos demonstrando efeitos de proteção vascular diretos da trombopoietina em modelos animais de lesão cardiovascular mediada por doxorubicina (Chan e outros, *Eur. J. Heart Fail.* 13 (4): 366-76 (2011)), lesão de isquemia - reperfusão cardiovascular (Baker e outros, *Cardiovasc. Res.* 77 (1): 44 a 53 (2008)) e acidente vascular cerebral (Zhou e outros, *J. Cereb Blood Flow Metab.* 31 (3): 924-33 (2011)). A TPO humana recombinante não é uma terapia viável em humanos, no entanto, devido à indução de anticorpos reativos cruzados à TPO endógena que podem levar à trombocitopenia crônica (Li e outros, *Blood* 98 (12): 3241-8 (2001)).

[0006] Danos vasculares consideráveis podem ser induzidos por radiação direcionada, tal como radioterapia corporal estereotóxica em altas doses (SBRT) ou radiocirurgia estereotóxica (SRS) (Park e outros, *Radiation Research*: March 2012, Vol. 177, No. 3, 311 a 327). Sugere-se que o dano vascular induzido por radiação possa desempenhar um papel importante na resposta de tumores humanos à radiação direcionada em altas doses, por exemplo, danos ao microambiente intratumoral podem levar à morte indireta das células tumorais. No

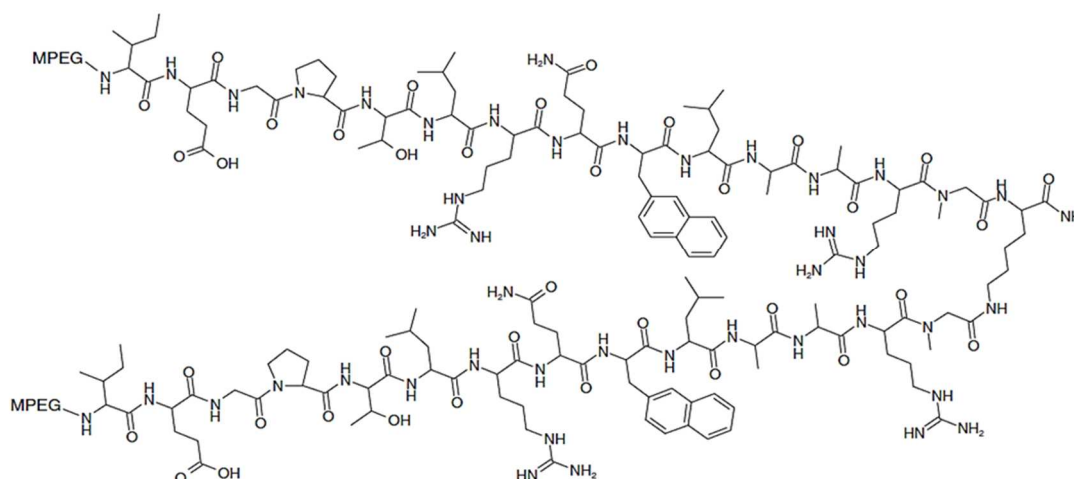
entanto, muitos pacientes tratados com radiação direcionada desenvolvem efeitos colaterais como resultado de seu tratamento. Por exemplo, 90% dos pacientes que sofrem de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) tratados com radioterapia direcionada com intenção curativa desenvolvem efeitos colaterais, incluindo dermatite, xerostomia (perda de produção de saliva) e mucosite oral (inflamação e ulceração da ou mucosa orofaríngea e/esofágica) (Birrer e outros, Radiation Research, 188 (1): 94 a 104 (2017)). Outro exemplo em que supõe-se que a lesão vascular desempenha um papel após a radiação direcionada é no contexto de disfunção erétil após irradiação da próstata para o tratamento do câncer de próstata. (Gaither e outros, The Journal of Sexual Medicine, 2017, 14 (9): 1071-8 e Nolan e outros, Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2015, 91 (4): 796 a 806). O efeito de TPO ou miméticos de TPO nas alterações vasculares induzidas pela terapia de radiação direcionada não foi relatado.

[0007] Existe uma necessidade importante e não atendida de métodos e composições que forneçam proteção aos tecidos normais após a terapia de radiação.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0008] É surpreendentemente descoberto na presente invenção que um mimético de trombopoietina (TPO) mimetiza a vasculatura e preserva a integridade vascular nos tecidos normais após a terapia de radiação direcionada. Por conseguinte, são aqui fornecidos métodos para proteger a integridade vascular em um indivíduo exposto a uma terapia de radiação direcionada. Os métodos compreendem administrar ao indivíduo exposto a uma terapia de radiação direcionada uma quantidade eficaz de um mimético de trombopoietina (TPO), preferencialmente, o mimético de TPO compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, mais preferencialmente o mimético de

TPO é RWJ-800088 ou romiplostim. De acordo com modalidades do pedido, o mimético de TPO é administrado pelo menos cerca de 10 minutos a pelo menos 420 minutos após o indivíduo ser exposto à terapia de radiação direcionada, mais preferencialmente, o mimético de TPO é TPOm tendo a seguinte estrutura de fórmula (I), ou um sal ou éster farmacologicamente aceitável do mesmo:



Fórmula (I)

[0009] em que MPEG representa metoxi polietileno glicol ou metoxipoli (etileno glicol); e em que a administração de uma quantidade eficaz do mimético de TPO ao indivíduo protege a integridade vascular do indivíduo.

[0010] Em certas modalidades, o indivíduo exposto à terapia de radiação direcionada está sendo tratado para câncer. O câncer pode, por exemplo, ser selecionado a partir do grupo que consiste em câncer de próstata, câncer de cabeça e pescoço, carcinoma hepatocelular, câncer de cólon, câncer de pulmão, melanoma, e câncer de mama.

[0011] Em certas modalidades, o mimético de TPO é administrado ao indivíduo pelo menos cerca de 20 minutos a pelo menos cerca de 360 minutos, pelo menos cerca de 40 minutos a pelo menos cerca de 240 minutos, pelo menos cerca de 60 minutos a pelo menos cerca de 180 minutos, ou qualquer quantidade intermediária depois que o indivíduo é exposto à terapia de radiação direcionada.

[0012] Em certas modalidades, o indivíduo é administrado com uma dose da quantidade eficaz do mimético de TPO.

[0013] Em certas modalidades, a quantidade eficaz do mimético de TPO é administrada ao indivíduo por injeção intravenosa, intramuscular, intracutânea ou subcutânea. Em modalidades preferenciais, o mimético de TPO é administrado por injeção subcutânea.

[0014] Em outro aspecto geral, o pedido refere-se a um kit para preservar a integridade vascular em um indivíduo em necessidade do mesmo. O kit compreende uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz de um mimético de TPO e um carreador farmacêuticamente aceitável, e pelo menos um agente ou dispositivo terapêutico adicional para preservar a integridade vascular. Opcionalmente, o kit compreende ainda uma ferramenta para administrar o mimético de TPO ao indivíduo. De preferência, o kit compreende um mimético de TPO com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, mais preferencialmente o mimético de TPO de RWJ-800088 ou romiplostim.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0015] O resumo anterior, bem como a descrição detalhada a seguir de modalidades preferenciais do presente pedido, será compreendido melhor quando lido em conjunto com os desenhos em anexo. Dever-se-ia entender, no entanto, que o pedido não está limitado às modalidades precisas mostradas nos desenhos. Conforme usado nas Figuras 1 a 10, "TPOm" refere-se a RWJ-800088.

[0016] A Figura 1 mostra os pesos médios de ratos após tratamento com radiação direcionada (RT) de 20 Gy para a próstata. A Figura 1A mostra um gráfico demonstrando que todos os ratos continuaram a ganhar peso após a radiação, independentemente do tratamento. A Figura 1B mostra um gráfico demonstrando que a taxa de ganho de peso (média g/semana/rato) foi significativamente diferente entre os

grupos, com uma diferença significativa entre pares apenas entre ratos protegidos com TPOM/placebo e solução salina/RT * indica $p < 0,01$. $N = 8$ a 9 ratos/grupo.

[0017] A Figura 2 mostra um gráfico demonstrando que TPOM protegeu os ratos a partir de vasodilatação prejudicada da artéria pudenda após RT da próstata. Nove semanas após a RT, a artéria pudenda foi visualizada por ecocardiografia e o diâmetro foi medido antes (Pré) e após (Pós) 0,4 mg/kg de infusão intravenosa de hidralazina. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diâmetros pré-arterial e pós-arterial (teste t pareado). $N = 5$ a 8 ratos/grupo.

[0018] A Figura 3 mostra que o TPOM protege a vasculatura fora do campo de radiação. A Figura 3A mostra imagens imunofluorescentes de células endoteliais vasculares coradas para CD31 nove semanas após a RT. Para criar as imagens imunofluorescentes, o tecido do pênis foi excisado, separado por crio-seção, e as células endoteliais vasculares foram visualizadas com imunofluorescência CD31. A Figura 3B mostra um gráfico demonstrando a área transversal das artérias penianas. A Figura 3C mostra um gráfico demonstrando a quantificação da densidade de CD31 (expressão de CD31/perímetro da artéria) como pixels/mícron de perímetro. $N = 4$ a 6/grupo.

[0019] A Figura 4 mostra um gráfico demonstrando que a disfunção erétil (DE) induzida por RT de próstata (20 Gy) em ratos não foi impedida por uma dose única de TPOM administrada 10 minutos após a RT. A pressão intracavernosa (PIC) após estimulação do nervo cavernoso foi testada 9 semanas após a RT (20 Gy) e normalizada para pressão arterial média (PAM). Os nervos foram estimulados com 4V, 6V ou 8V, e a melhor resposta a partir de cada rato foi usada para a análise. O asterisco * indica efeito significativo de radiação ($p = 0,004$, ANOVA bidirecional). $N = 6$ a 7 ratos/grupo.

[0020] A Figura 5 mostra o esquema para extração de curvas de

atividade no tempo (TAC), demonstrado usando um camundongo no braço RT + TPOm. A Figura 5A mostra uma imagem de uma região de interesse retangular (ROI) selecionada em torno da vasculatura mostrando a expressão do dextrano em um ponto inicial do estudo. A Figura 5B mostra uma imagem de uma sub-região da vasculatura identificada por limite no 80º percentil da intensidade dentro da ROI na Figura 5A. A Figura 5C mostra uma imagem do mesmo campo da Figura 5A, vista no último ponto no tempo do estudo. Observa-se a expressão extravascular aprimorada em relação à Figura 5A. A Figura 5D mostra um gráfico demonstrando as TACs para todo o campo de visão ou TAC geral e a TAC ou ROI vascular na Figura 5B, medida em 150 pontos no tempo, espaçados 10 segundos. Cada observação é a expressão média de todos os pixels da região relevante naquele ponto no tempo. Existem três linhas para cada tipo de ROI, representando 3 fatias sucessivas de tecido. Observa-se que a TAC vascular (em vermelho) tem maior intensidade de pixel que a TAC geral (em preto) em todos os tempos.

[0021] A Figura 6 mostra gráficos demonstrando a estimativa por fatias da taxa de permeabilidade usando a análise de Patlak com base nas curvas de atividade no tempo (TAC)s extraídas para o estudo mostrado na Figura 5. Os pontos mostram o gráfico de Patlak observado das quantidades $x(t)$ vs $y(t)$, conforme indicado na equação (1.5). A linha mostra os mínimos quadrados ajustados aos dados. A equação da linha ajustada é dada. A taxa de permeabilidade é estimada a partir dos coeficientes da linha ajustada. Observa-se a baixa variabilidade dos coeficientes estimados através das fatias.

[0022] A Figura 7 mostra um gráfico demonstrando as taxas de permeabilidade ao dextrano no pré-tratamento, 3 dias e 7 dias após a irradiação; solução salina e TPOm (300 ug/kg) foram administrados 6 horas após a irradiação.

[0023] A Figura 8 mostra um gráfico demonstrando que não houve

correlação entre as taxas de permeabilidade nos dias 3 e 7 após a RT para animais individuais no grupo de Solução Salina/RT. Cada ponto da figura é o valor médio estimado da permeabilidade de todas as fatias em um dado animal.

[0024] A Figura 9 mostra as interações leucócitos/células endoteliais, avaliadas por microscopia intravital com laranja de acridina. A Figura 9A mostra uma série de imagens representativas mostrando três leucócitos marginais viajando ao longo de 1 segundo. Os leucócitos que rolaram ao longo do endotélio vascular foram facilmente distinguidos devido à sua velocidade reduzida em comparação com o fluxo sanguíneo circundante. A Figura 9B mostra um gráfico demonstrando taxas de cisalhamento plotadas vs. interações L/E para cada camundongo e a inclinação foi calculada. A Figura 9C mostra um gráfico demonstrando que a RT alterou significativamente a relação entre a taxa de cisalhamento e as interações L/E, enquanto o TPOM impediu a interação L/E em taxas de cisalhamento mais altas.

[0025] A Figura 10 mostra as características dos vasos a partir da análise por laranja de acridina. Até quatro vasos foram selecionados por camundongo, e a velocidade do fluxo sanguíneo e o diâmetro do vaso foram determinados para cada um. As taxas de cisalhamento foram calculadas usando a equação $((\text{velocidade}) \times (8))/\text{diâmetro}$. Cada marcador representa o valor médio por camundongo, e as barras de erros representam a média $\pm$ SEM. Não houve diferenças significativas entre os grupos de tratamento.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0026] Esta descrição é baseada, pelo menos em parte, na identificação de um mimético de trombopoietina (TPO) como um terapêutico para proteger a integridade vascular em indivíduos expostos a uma terapia de radiação direcionada. O mimético de TPO pode ser formulado e administrado a indivíduos expostos a uma terapia de

radiação direcionada para proteger contra os efeitos negativos da radiação na vasculatura, particularmente a vasculatura de tecidos saudáveis, do indivíduo.

[0027] Diversas publicações, artigos e patentes são citados ou descritos em segundo plano e em toda a especificação; cada uma dessas referências é aqui incorporada por referência em sua totalidade. A discussão de documentos, atos, materiais, dispositivos, artigos ou similares que foram incluídos na presente especificação é com o objetivo de fornecer contexto para a invenção. Tal discussão não é uma admissão de que algum ou todos esses assuntos façam parte da técnica anterior com relação a quaisquer invenções descritas ou reivindicadas.

[0028] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que é comumente entendido por um versado na técnica a que esta invenção se refere. Caso contrário, certos termos usados neste documento têm os significados estabelecidos na especificação.

[0029] Dever-se-ia notar que, conforme usado aqui e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma" e "o", "a" incluem referência plural, a menos que o contexto indique claramente o contrário.

[0030] A menos que indicado ao contrário, quaisquer valores numéricos, tal como uma concentração ou um intervalo de concentrações aqui descritos, devem ser entendidos como modificados em todas as ocorrências pelo termo "cerca de". Assim, um valor numérico inclui tipicamente $\pm 10\%$ de o valor citado. Por exemplo, uma concentração de 1 mg/mL inclui 0,9 mg/mL a 1,1 mg/mL. Da mesma forma, uma faixa de concentrações de 1% a 10% (peso/volume) inclui 0,9% (peso/volume) a 11% (peso/volume). Como usado aqui, o uso de uma faixa numérico inclui expressamente todas as subfaixas possíveis, todos os valores numéricos individuais dentro dessa faixa, incluindo

números inteiros dentro dessas faixas e frações dos valores, a menos que o contexto indique claramente o contrário.

[0031] A menos que indicado ao contrário, o termo "pelo menos" que precede uma série de elementos deve ser entendido como se referindo a todos os elementos da série. Os versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de verificar, usando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção aqui descritas. Tais equivalentes são destinados a ser abrangidos pela invenção.

[0032] Como usado aqui, os termos "compreende", "compreendendo", "inclui", "incluindo", "tem", "tendo", "contém" ou "contendo", ou qualquer outra variação dos mesmos, serão entendidos para implicar a inclusão de um número inteiro declarado ou grupo de números inteiros, mas não a exclusão de qualquer outro número inteiro ou grupo de números inteiros e são destinados a não ser exclusivos ou abertos. Por exemplo, uma composição, uma mistura, um processo, um método, um artigo ou um aparelho que compreende uma lista de elementos não é necessariamente limitada apenas a esses elementos, mas pode incluir outros elementos não listados expressamente ou inerentes a essa composição, mistura, processo, método, artigo ou aparelho. Além disso, a menos que indicado expressamente ao contrário, "ou" refere-se a um ou inclusivo e não um ou exclusivo. Por exemplo, uma condição A ou B é satisfeita por qualquer um dos seguintes itens: A é verdadeiro (ou presente) e B é falso (ou não presente), A é falso (ou não presente) e B é verdadeiro (ou presente), e A e B são verdadeiros (ou presentes).

[0033] Como aqui utilizado, o termo conjuntivo "e/ou" entre vários elementos citados é entendido como abrangendo tanto opções individuais quanto opções combinadas. Por exemplo, quando dois elementos são combinados por "e/ou", uma primeira opção refere-se à

aplicabilidade do primeiro elemento sem o segundo. Uma segunda opção refere-se à aplicabilidade do segundo elemento sem o primeiro. Uma terceira opção refere-se à aplicabilidade do primeiro e do segundo elemento juntos. Entende-se que qualquer uma dessas opções se enquadra no significado e, portanto, satisfaz ao requisito do termo "e/ou" conforme aqui utilizado. Também se entende que a aplicabilidade simultânea de mais de uma das opções se enquadra no significado e, portanto, satisfaz ao requisito do termo "e/ou".

[0034] Conforme usado aqui, o termo "consiste em" ou variações tais como "consiste em" ou "consistindo em", conforme usado em toda a especificação e nas reivindicações, indicam a inclusão de qualquer número inteiro ou grupo de números inteiros citados, mas que nenhum número inteiro ou grupo de números inteiros adicionais pode ser adicionado ao método, estrutura ou composição especificada.

[0035] Conforme usado neste documento, o termo "consiste essencialmente em" ou variações como "consiste essencialmente em" ou "consistindo essencialmente em", conforme usado em toda a especificação e nas reivindicações, indicam a inclusão de qualquer número inteiro ou grupo de números inteiros citados, e a inclusão opcional de qualquer número inteiro ou grupo de números inteiros citados que não alteram materialmente as propriedades básicas ou novas do método, estrutura ou composição especificada. Ver M.P.E.P. § 2111.03.

[0036] Como aqui utilizado, "indivíduo" significa qualquer animal, preferencialmente um mamífero, mais preferencialmente um humano, quem será vacinado ou foi vacinado por um método de acordo com uma modalidade da invenção. O termo "mamífero", conforme usado aqui, abrange qualquer mamífero. Exemplos de mamíferos incluem, mas não estão limitados a, vacas, cavalos, ovelhas, porcos, gatos, cães, camundongos, ratos, coelhos, porquinhos-da-índia, macacos, seres

humanos, etc., mais preferencialmente um ser humano.

[0037] As palavras "direita", "esquerda", "inferior" e "superior" designam direções nos desenhos aos quais é feita referência.

[0038] Como usado aqui, o termo "em combinação", no contexto da administração de duas ou mais terapias a um indivíduo, refere-se ao uso de mais de uma terapia. O uso do termo "em combinação" não restringe a ordem na qual as terapias são administradas a um indivíduo. Por exemplo, uma primeira terapia (por exemplo, uma composição aqui descrita) pode ser administrada antes de (por exemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas ou 12 semanas antes), concomitantemente com, ou após (por exemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas ou 12 semanas após) a administração de uma segunda terapia a um indivíduo.

[0039] Também dever-se-ia entender que os termos "cerca de", "aproximadamente", "geralmente", "substancialmente" e termos semelhantes, usados aqui quando se referem a uma dimensão ou característica de um componente da invenção preferencial, indicam que a dimensão/característica descrita não é um limite ou parâmetro restrito e não exclui pequenas variações que sejam funcionalmente iguais ou semelhantes, como seria entendido por um versado na técnica. No mínimo, tais referências que incluem um parâmetro numérico incluiriam variações que, usando princípios matemáticos e industriais aceitos na técnica (por exemplo, arredondamento, medição ou outros erros sistemáticos, tolerâncias de fabricação, etc.), não variariam o dígito menos significativo.

[0040] O termo "proteger a integridade vascular", como aqui utilizado, refere-se a preservar e manter pelo menos uma das funções e estruturas do sistema vascular em um indivíduo após a RT. A principal função do sistema vascular é transportar sangue e linfa por todo o corpo do indivíduo, fornecendo oxigênio e nutrientes e eliminando resíduos de tecido. O termo "proteger a integridade vascular" pode se referir a preservar ou manter a função do sistema vascular, de modo que a circulação de sangue e linfa por todo o corpo não seja afetada ou alterada significativamente após a exposição à radioterapia direcionada. O termo "proteger a integridade vascular" também pode se referir a preservar ou manter uma ou mais outras funções do sistema vascular, tal como proteger o indivíduo da vasodilatação da artéria pudenda comprometida após a RT, ou reduzir a vasoconstrição após a RT. O sistema vascular é composto de vasos sanguíneos (por exemplo, artérias, veias e capilares) e vasos linfáticos que circulam o sangue e a linfa, respectivamente, por todo o corpo. Estruturalmente, os vasos sanguíneos são compostos por uma camada externa de endotélio e três camadas de tecido; a túnica externa, a túnica média e a túnica íntima. O termo "proteger a integridade vascular" pode ainda se referir a preservar ou manter a estrutura do sistema vascular, de modo que a estrutura do sistema vascular não seja alterada ou afetada significativamente após a terapia de radiação, por exemplo, não há vazamento vascular substancial ou aumento substancial na interação de leucócitos endoteliais vasculares após a RT.

Terapia de Radiação Direcionada

[0041] O termo "RT", "TRT" ou "terapia de radiação direcionada", como aqui utilizado, refere-se a uma terapia usando radiação ionizante que é preferencialmente direcionada ou localizada em um órgão ou parte específica do corpo. Ela é geralmente usada como parte do tratamento de câncer. Às vezes, a terapia de radiação direcionada

(TRT) também é chamada de tratamento de radiação, radioterapia, irradiação ou terapia de raios x. Existem três divisões principais da terapia de radiação direcionada: terapia de radiação por feixe externo (EBRT ou XRT), terapia de radiação interna, e terapia com radioisótopos sistêmica. Em algum momento, a radiação pode ser administrada em vários tratamentos para fornecer a mesma dose ou uma dose ligeiramente mais alta, chamada de terapia de radiação fracionada.

[0042] A terapia de radiação por feixe externo (EBRT) usa uma máquina que direciona os raios de alta energia de fora do corpo para o tumor. Exemplos de EBRT incluem, mas não estão limitados a, terapia de radiação estereotáxica, terapia de radiação guiada por imagem (IGRT), terapia de radiação de intensidade modulada (IMRT), tomoterapia helicoidal, terapia de radiação por feixe de prótons, e terapia de radiação intraoperatória (IORT).

[0043] A radiação interna também é chamada braquiterapia, na qual um implante radioativo é colocado dentro do corpo no tumor ou próximo a ele. Ela permite uma dose mais alta de radiação em uma área menor do que seria possível com o tratamento com radiação externa. Ela usa uma fonte de radiação que geralmente é selada em um pequeno suporte chamado implante. Diferentes tipos de implantes podem ser chamados de peletes, sementes, fitas, fios, agulhas, cápsulas, balões ou tubos. Um exemplo de radiação interna é a quimioembolização transarterial (TACE).

[0044] A terapia com radioisótopos sistêmica (SRT) também é chamada de radioterapia de fonte não selada. Os fármacos radioativos direcionados são usados em SRT para tratar sistematicamente certos tipos de câncer, tal como câncer de tireoide, osso e próstata. Esses fármacos, que normalmente estão ligados a uma entidade alvo – tal como um anticorpo monoclonal ou um ligante célula-específico – podem ser administrados por via oral ou colocados na veia; eles então viajam

pelo corpo até atingir o alvo desejado, onde o fármaco se acumula em uma concentração relativamente alta.

[0045] Em uma modalidade, a invenção refere-se a uma terapia de radiação direcionada para o tratamento de um câncer de cabeça e pescoço. Um período típico de radiação para câncer de cabeça e pescoço dura 3 a 5 semanas com tratamentos diários. No entanto, os cânceres de crescimento rápido são pouco controlados se a radiação é administrada em doses diárias durante um longo período de tempo. Portanto, a entrega de radiação pode ser acelerada e administrada em dois ou mais tratamentos por dia (hiperfracionamento) para certos tipos de câncer de cabeça e pescoço que crescem rapidamente, tal como os cânceres nasofaríngeos. Em algumas modalidades, um indivíduo com câncer de cabeça e pescoço é tratado com doses mais altas de terapia de radiação que são administradas duas vezes por dia em comparação com a terapia padrão que consiste em doses mais baixas administradas uma vez ao dia.

[0046] EBRT e/ou braquiterapia são comumente usadas para tratamento de radiação na cabeça e pescoço. Por exemplo, os implantes removíveis podem ser usados no tratamento de cânceres de boca, língua, garganta e nasofaringe, onde são administrados como reforços intracavitários após a radioterapia externa. Os implantes são colocados na área do câncer e removidos quando a dose apropriada é administrada. A substância radioativa mais comumente usada em implantes removíveis é o irídio 192. Em algumas modalidades, a colocação permanente de fontes radioativas pode ser necessária, por exemplo, no tratamento de malignidades nasofaríngeas recorrentes, para palição de recorrências acessíveis de sítios primários na boca e garganta, ou para metástases de linfonodos cervicais. O iodo 125 e o paládio 103 podem ser as substâncias radioativas usadas para implantes permanentes.

[0047] Os efeitos colaterais da radiação direcionada para cânceres de cabeça e pescoço incluem, por exemplo, mucosite, inflamação das membranas mucosas da boca ou garganta, ou boca seca (xerostomia). Outra complicação frequentemente encontrada da terapia de radiação para o câncer de cabeça e pescoço são os níveis anormalmente baixos de hormônio da tireoide, chamados de hipotireoidismo.

[0048] Em outra modalidade, a invenção refere-se a uma terapia de radiação direcionada para o tratamento de um câncer de próstata. A EBRT e a braquiterapia com alta taxa de dose (HDR) são os dois principais tipos de terapia de radiação para o tratamento de câncer de próstata. Os efeitos colaterais da radiação direcionada para o câncer de próstata incluem, por exemplo, micção frequente, micção difícil ou dolorosa, sangue na urina, vazamento urinário, movimentos intestinais dolorosos, sangramento retal, e disfunção sexual, tal como disfunção erétil.

Mimético de TPO

[0049] Como aqui utilizado, um "TPOm", "mimético de TPO" ou "mimético de trombopoietina" refere-se a um composto compreendendo um peptídeo capaz de se ligar e ativar um receptor de trombopoietina. De preferência, em um mimético de TPO útil para a invenção, o peptídeo capaz de se ligar e ativar um receptor de trombopoietina não tem homologia significativa com trombopoietina (TPO). A falta de homologia com TPO reduz o potencial de geração de anticorpos TPO. Exemplos desse peptídeo útil em um mimético de TPO incluem, mas não estão limitados aos descritos nas Publicações U.S. Nos. 2003/0158116; 2005/0137133; 2006/0040866; 2006/0210542; 2007/0148091; 2008/0119384; Patentes U.S. Nos. 5.869.451; 7.091.311; 7.615.533; 8.227.422; Publicações de Patentes Internacionais WO2007/021572; WO2007/094781; e WO2009/148954, cujo conteúdo completo é aqui incorporado por referência. Mais preferencialmente, em um mimético de

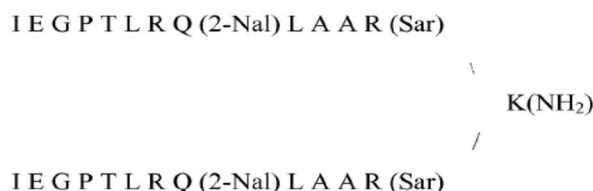
TPO útil para a invenção, o peptídeo capaz de se ligar e ativar um receptor de trombopoietina é covalentemente ligado a uma porção que melhora uma ou mais propriedades do peptídeo. A título de exemplo não limitante, a porção pode ser um polímero hidrofílico, incluindo, entre outros, polietileno glicol (PEG), polipropileno glicol, ácido polilático e ácido poliglicólico. A porção também pode ser um polipeptídeo, tal como uma região Fc ou uma albumina.

[0050] Em uma modalidade preferencial, um mimético de TPO útil para a invenção compreende um peptídeo tendo a sequência de aminoácidos de: IEGPTLRQXaaLAARYaa (SEQ ID NO: 1), em que Xaa é triptofano (W) ou β -(2-naftil) alanina (chamada aqui de "2-Nal"), e Yaa é alanina (A) ou sarcosina (chamada aqui de "Sar"). De preferência, o peptídeo da SEQ ID NO: 1 é covalentemente ligado a um PEG ou fundido a um domínio Fc.

[0051] Em algumas modalidades, um mimético de TPO útil para a invenção compreende um peptídeo de SEQ ID NO: 1 ligado covalentemente a um PEG, preferencialmente um PEG com um peso molecular médio entre cerca de 5.000 e cerca de 30.000 daltons. De preferência, o PEG é selecionado a partir do grupo que consiste em monometoxi polietileno glicol (MePEG-OH), monometoxi polietileno glicol - succinato (MePEG-S), monometoxi polietilenoglicol - succinimidil succinato (MePEG-S-NHS), monometoxi polietileno glicol - amina (MEPEG-S-NH₂), monometoxi polietileno glicol - tresilato (MePEG-TRES), e monometoxi polietileno glicol – imidazolil - carbonil (MePEG-IM). A PEGuilação do peptídeo leva a uma depuração reduzida do composto sem perda de potência. Ver, por exemplo, Patente U.S. No. 7.576.056, cujo conteúdo inteiro é aqui incorporado por referência.

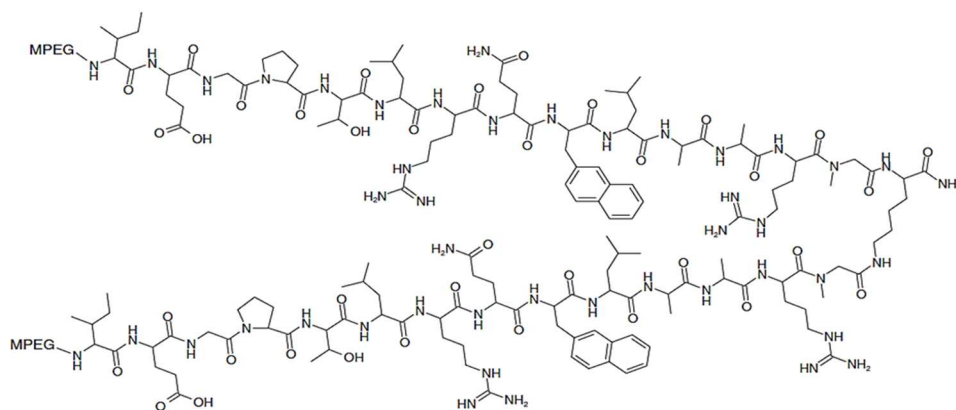
[0052] Em uma modalidade preferencial, um mimético de TPO útil para a invenção é RWJ-800088 ou um derivado do mesmo. Como usado aqui, "RWJ-800088" refere-se a um peptídeo de 29-mer tendo

dois 14-mers idênticos ligados por um resíduo de lisinamida da seguinte forma:



[0053] e tendo um metoxipoli (etileno glicol) (MPEG) ligado covalentemente a cada isoleucina N-terminal, ou um sal ou éster farmaceuticamente aceitável do mesmo. O 14-mers é idêntico à SEQ ID NO: 1, em que Xaa é 2-Nal e Yaa é Sar, o RWJ-800088 é assim composto de duas cadeias peptídicas de 14 aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar)) ligadas por resíduo de lisinamida, e cada isoleucina N-terminal está ligada a uma cadeia de metoxi polietileno glicol (MPEG). Por conseguinte, RWJ-800088 tem uma estrutura molecular abreviada de (MPEG-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-(2-Nal)-Leu-Ala-Ala-Arg- (Sar))₂-Lys-NH₂; em que (2-Nal) é β-(2-naftil) alanina, (Sar) é sarcosina e MPEG é metoxipoli (etileno glicol), ou um sal ou éster farmaceuticamente aceitável do mesmo. De preferência, MPEG tem um peso molecular de aproximadamente 20.000 Dalton ou representa metoxipolietileno glicol 20000.

[0054] Em uma modalidade, RWJ-800088 tem uma estrutura molecular de fórmula (I), ou um sal ou éster farmaceuticamente aceitável do mesmo:



Fórmula (I)

[0055] Em uma modalidade preferida, MPEG em RWJ-800088 é metoxipolietileno glicol20000, e o RWJ-800088 tem o nome químico completo de: metoxipolietilenoglicol20000-Propionil-L-Isoleucil-L-Glutamil-Glicol-L-Prolil-L-Treonil-L-Leucil-L-Arginil-L-Glutaminil-L-2-Naftilalanil-L-leucil-L-Alanil-L-Alanil-L-Arginil-Sarcosil-Ne-(metoxipolietilenoglicol20000-propionil-L-Isoleucil-L- Glutamil-Glicil-L-Prolil-L-Treonil-L-Leucil-L-Arginil-L-Glutaminil-L-2-naftilalanil-L-Leucil-L-Alanil-L-Alanil-L-Arginil-Sarcosil -) - Lisinamida, ou um sal ou éster farmaceuticamente aceitável do mesmo. O peso molecular do peptídeo sem PEG é de 3.295 Dalton e com duas cadeias MPEG de 20.000 Dalton é de aproximadamente 43.295 Dalton.

[0056] Em algumas modalidades, um mimético de TPO útil para a invenção compreende um peptídeo de SEQ ID NO: 1 fundido a um domínio Fc. A fusão do peptídeo a um domínio Fc pode estabilizar o peptídeo in vivo. Ver, por exemplo, Patente U.S. No. 6.660.843, cujo conteúdo inteiro é aqui incorporado por referência.

[0057] Em outra modalidade preferencial, um mimético de TPO útil para a invenção é o romiplostim. Como usado aqui, "romiplostim" refere-se a proteína de fusão com um domínio Fc ligado à isoleucina N-terminal do peptídeo de SEQ ID NO: 1, em que Xaa é W e Yaa é A. Em particular, romiplostim tem a seguinte sequência de aminoácidos:

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGG
GIEGPTLRQWLAARAGGGGGGGGIEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO:
4).

[0058] Ele tem a sequência de aminoácidos do domínio de ligação ao receptor de trombopoietina de IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 3).

Dosagem e Administração

[0059] O mimético de TPO pode, por exemplo, ser administrado como um ingrediente ativo de uma composição farmacêutica em associação com um carreador ou diluente farmacêutico. Os miméticos de TPO podem ser administrados por injeção oral, pulmonar, parentérica (injeção intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (IV) ou subcutânea), inalação (por meio de uma formulação em pó fino), vias de administração transdérmica, nasal, vaginal, retal ou sublingual e podem ser formulados em formas de dosagem apropriadas para cada via de administração. Ver, por exemplo, as Publicações Internacionais Nos. WO1993/25221 (Bernstein e outros) e WO1994/17784 (Pitt e outros), cujo conteúdo relevante é aqui incorporado por referência.

[0060] As formas de dosagem sólidas para administração oral incluem cápsulas, comprimidos, pílulas, pós e grânulos. Em tais formas de dosagem sólidas, o composto peptídico ativo é misturado com pelo menos um carreador farmacêuticamente aceitável tal como sacarose, lactose ou amido. Tais formas de dosagem também podem compreender, como é prática habitual, outras substâncias que não os diluentes inertes, por exemplo, agentes lubrificantes tal como estearato de magnésio. No caso de cápsulas, comprimidos e pílulas, as formas de dosagem também podem compreender agentes tamponantes. Os comprimidos e pílulas também podem ser preparados com revestimentos entéricos.

[0061] As formas de dosagem líquidas para administração oral incluem emulsões, soluções, suspensões, xaropes farmacêuticamente aceitáveis, com os elixires contendo diluentes inertes comumente usados na técnica, tal como água. Além desses diluentes inertes, as composições também podem incluir adjuvantes, tal como agentes umectantes, agentes emulsificantes e de suspensão, e agentes adoçantes, flavorizantes e perfumantes.

[0062] As preparações para administração parentérica incluem soluções, suspensões ou emulsões aquosas ou não aquosas estéreis. Exemplos de solventes ou veículos não aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleos vegetais tal como óleo de oliva e óleo de milho, gelatina e ésteres orgânicos injetáveis, tal como etil oleato. Tais formas de dosagem também podem conter adjuvantes, tal como agentes de conservação, umedecimento, emulsificação e dispersão. Eles podem ser esterilizados, por exemplo, por filtração através de filtro de retenção de bactérias, incorporando agentes esterilizantes nas composições, irradiando as composições ou aquecendo as composições. Eles também podem ser fabricados com água estéril ou outro meio injetável estéril imediatamente antes do uso.

[0063] A administração do mimético de TPO é tipicamente intramuscular, subcutânea ou intravenosa. Contudo, também podem ser considerados outros modos de administração, tal como cutâneo, intradérmico ou nasal. A administração intramuscular do mimético de TPO pode ser alcançada usando uma agulha para injetar uma suspensão da composição de mimético de TPO. Uma alternativa é o uso de um dispositivo de injeção sem agulha para administrar a composição (usando, por exemplo, Biojector™) ou um pó liofilizado da composição de mimético de TPO.

[0064] Para injeção intravenosa, cutânea ou subcutânea ou injeção no sítio da aflição, a composição de mimético de TPO pode estar na forma de uma solução aquosa parentericamente aceitável que é livre de pirogênio e tem pH, isotonicidade e estabilidade adequados. Os versados na técnica são capazes de preparar soluções adequadas usando, por exemplo, veículos isotônicos tal como injeção de cloreto de sódio, injeção de Ringer, injeção de Ringer lactada. Conservantes, estabilizadores, tampões, antioxidantes e/ou outros aditivos podem ser incluídos, conforme necessário. Uma formulação de liberação lenta

também pode ser empregada.

[0065] As composições para administração retal ou vaginal são preferencialmente supositórios que podem conter, além do mimético de TPO ativo, excipientes tais como manteiga de cacau ou cera de supositório. As composições para administração nasal ou sublingual também são preparadas com excipientes padrão bem conhecidos na técnica.

[0066] Tipicamente, a administração terá como objetivo manter e proteger a integridade vascular contra uma terapia de radiação direcionada administrada ao indivíduo. As composições de mimético de TPO são administradas a um indivíduo durante ou após o tratamento de radiação direcionada, e as composições de mimético de TPO são administradas em uma quantidade suficiente para proteger a integridade vascular em tecidos saudáveis do indivíduo, de preferência sem diminuir a eficácia da RT.

[0067] As composições farmacologicamente aceitáveis que contêm o mimético de TPO são administradas a um indivíduo, dando origem a um efeito de proteção na vasculatura do indivíduo. Uma quantidade de uma composição suficiente para produzir um efeito de proteção na vasculatura do indivíduo é definida como uma "dose eficaz" ou uma "quantidade eficaz" da composição. A quantidade eficaz das composições de mimético de TPO dependerá, por exemplo, do estado do indivíduo (por exemplo, da gravidade da integridade da vasculatura, duração da exposição à terapia de radiação direcionada), das características físicas do indivíduo (por exemplo, altura, peso, etc.) e da natureza da RT (por exemplo, tipo e dose de radiação, frequência etc.). A quantidade real administrada e a taxa e o tempo de administração podem ser determinados por um versado na técnica face à presente descrição.

[0068] A prescrição de tratamento, por exemplo, decisões de

dosagem etc., é de responsabilidade de clínicos gerais e outros médicos, ou em um contexto veterinário de um veterinário, e normalmente leva em consideração o distúrbio a ser tratado, a condição do paciente individual, o sítio de entrega, o método de administração e outros fatores conhecidos pelos clínicos. Exemplos das técnicas e protocolos mencionados acima podem ser encontrados em Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edição, Osol, A. ed., 1980.

[0069] Em certas modalidades, o mimético de TPO é administrado ao indivíduo pelo menos cerca de 10 minutos a pelo menos cerca de 420 minutos, pelo menos cerca de 10 minutos a pelo menos cerca de 300 minutos, pelo menos cerca de 10 minutos a pelo menos cerca de 180 minutos, pelo menos cerca de 10 minutos a pelo menos cerca de 60 minutos, pelo menos cerca de 20 minutos a pelo menos cerca de 420 minutos, pelo menos cerca de 20 minutos a pelo menos cerca de 300 minutos, pelo menos cerca de 20 minutos a pelo menos cerca de 180 minutos, em pelo menos cerca de 20 minutos a pelo menos cerca de 60 minutos, pelo menos cerca de 40 minutos a pelo menos cerca de 420 minutos, pelo menos cerca de 40 minutos a pelo menos cerca de 300 minutos, pelo menos cerca de 40 minutos a pelo menos cerca de 180 minutos, pelo menos cerca de 40 minutos a pelo menos cerca de 60 minutos, pelo menos cerca de 60 minutos a pelo menos 420 minutos, pelo menos cerca de 60 minutos a pelo menos cerca de 300 minutos, pelo menos cerca de 60 minutos a pelo menos cerca de 180 minutos, pelo menos cerca de 60 minutos a pelo menos cerca de 120 minutos, pelo menos cerca de 60 minutos a pelo menos cerca de 90 minutos, pelo menos cerca de 80 minutos a pelo menos cerca de 420 minutos, pelo menos cerca de 80 minutos a pelo menos cerca de 300 minutos, pelo menos cerca de 80 minutos a pelo menos cerca de 180 minutos, pelo menos cerca de 80 minutos a pelo menos cerca de 120 minutos, pelo menos cerca de 100 minutos a pelo menos cerca de 420 minutos,

pelo menos cerca de 100 minutos a pelo menos cerca de 300 minutos, pelo menos cerca de 100 minutos a pelo menos cerca de 180 minutos, pelo menos cerca de 100 minutos a pelo menos cerca de 150 minutos, pelo menos cerca de 120 minutos a pelo menos cerca de 420 minutos, pelo menos cerca de 120 minutos a pelo menos cerca de 300 minutos, pelo menos cerca de 120 minutos a pelo menos cerca de 180 minutos, pelo menos cerca de 140 minutos a pelo menos cerca de 420 minutos, pelo menos cerca de 140 minutos a pelo menos cerca de 300 minutos, pelo menos cerca de 140 minutos a pelo menos cerca de 180 minutos, pelo menos cerca de 160 min demora pelo menos cerca de 420 minutos, pelo menos cerca de 160 minutos a pelo menos 300 minutos, pelo menos cerca de 160 minutos a pelo menos cerca de 180 minutos, pelo menos cerca de 180 minutos a pelo menos cerca de 420 minutos, pelo menos cerca de 180 minutos a pelo menos cerca de 300 ou qualquer quantidade intermediária após o indivíduo ser exposto à terapia de radiação direcionada. Em certas modalidades, o mimético de TPO é administrado pelo menos cerca de 10, pelo menos cerca de 20, pelo menos cerca de 40, pelo menos cerca de 60, pelo menos cerca de 80, pelo menos cerca de 100, pelo menos cerca de 100, pelo menos cerca de 120, pelo menos cerca de 140, pelo menos pelo menos cerca de 160, pelo menos cerca de 180, pelo menos cerca de 200, pelo menos cerca de 220, pelo menos cerca de 240, pelo menos cerca de 260, pelo menos cerca de 280, pelo menos cerca de 300, pelo menos cerca de 320 ou pelo menos cerca de 340 minutos após o indivíduo ser exposto à terapia de radiação direcionada. Em certas modalidades, o mimético de TPO é administrado pelo menos cerca de 8, pelo menos cerca de 10, pelo menos cerca de 12, pelo menos cerca de 14, pelo menos cerca de 16, pelo menos cerca de 18, pelo menos cerca de 18, pelo menos cerca de 20, pelo menos cerca de 22, pelo menos pelo menos 24 horas após o indivíduo ser exposto à terapia de radiação direcionada. Em certas

modalidades, o mimético de TPO é administrado o mais tardar em cerca de 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 120, 140, 160, 160, 180, 200, 220, 220 e 240, cerca de 260, cerca de 280, cerca de 300, cerca de 320, cerca de 340, cerca de 360, cerca de 420 minutos após o indivíduo ser exposto à terapia de radiação direcionada. Em certas modalidades, o mimético de TPO é administrado o mais tardar em cerca de 8, cerca de 10, cerca de 12, cerca de 14, cerca de 16, cerca de 18, cerca de 20, cerca de 22, cerca de 24 horas após o indivíduo ser exposto à terapia de radiação direcionada.

[0070] Após a produção do mimético de TPO e formulação opcional do mimético de TPO em composições, as composições podem ser administradas a um indivíduo, particularmente um ser humano ou outro primata. A administração pode ser em humanos ou em outro mamífero, por exemplo, camundongo, rato, hamster, porquinho-da-índia, coelho, ovelha, cabra, porco, cavalo, vaca, burro, macaco, cachorro ou gato. A entrega a um mamífero não humano não precisa ter um propósito terapêutico, mas pode ser usada em um contexto experimental, por exemplo, na investigação de mecanismos de proteção da integridade vascular devido à administração do mimético de TPO.

[0071] As composições de mimético de TPO da invenção podem ser administradas sozinhas ou em combinação com outros tratamentos, ou simultaneamente ou sequencialmente da condição a ser tratada.

[0072] As composições de mimético de TPO podem, se desejado, ser apresentadas em um kit, embalagem ou dispensador, que pode conter uma ou mais formas de dosagem unitárias contendo o ingrediente ativo. O kit, por exemplo, pode compreender papel metálico ou plástico, tal como um blister. O kit, embalagem ou dispensador pode ser acompanhado de instruções para administração. O dispositivo incluído no kit pode ser, por exemplo, um recipiente, um veículo de entrega, ou um dispositivo de administração.

[0073] O kit pode ainda compreender pelo menos um agente terapêutico adicional ou um dispositivo para proteger a integridade vascular. O agente terapêutico adicional incluído no kit refere-se a qualquer composto ou agente terapêutico conhecido ou que demonstre propriedades vantajosas quando administrado com TPO ou um mimético de TPO. Exemplos de tais agentes podem ser, mas não estão limitados a: outros miméticos de TPO, outros agentes que podem ser usados para proteger a integridade vascular (tal como protetores de radiação, por exemplo, Ethylol® ou amifostina), radiossensibilizadores (tal como IUdR, BUdR, misonidazol, nimorazol, etanidazol, Fluosol, RSR-13, e motexafina gadolínio (MGd)), hormônios (tal como tireoide para câncer de cabeça e pescoço) ou agonistas do hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH) (também chamados de análogos de LHRH ou agonistas de GnRH) . Exemplos de LHRH incluem, mas não estão limitados a, Leuprolida (Lupron, Eligard), Goserelina (Zoladex), Triptorelina (Trelstar) ou Histrelina (Vantas).

MODALIDADES

[0074] A invenção também fornece as seguintes modalidades não limitantes.

[0075] A Modalidade 1 é um método para proteger a integridade vascular em um indivíduo exposto a uma terapia de radiação direcionada, o método compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um mimético de trombopoietina (TPO).

[0076] A Modalidade 1 (a) é o método da modalidade 1, em que o mimético de TPO compreende um peptídeo com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

[0077] A Modalidade 1 (b) é o método da modalidade 1 (a), em que o peptídeo tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[0078] A Modalidade 1 (c) é o método da modalidade 1 (a) ou 1 (b), em que o mimético de TPO compreende ainda um polímero hidrofílico

covalentemente ligado ao peptídeo.

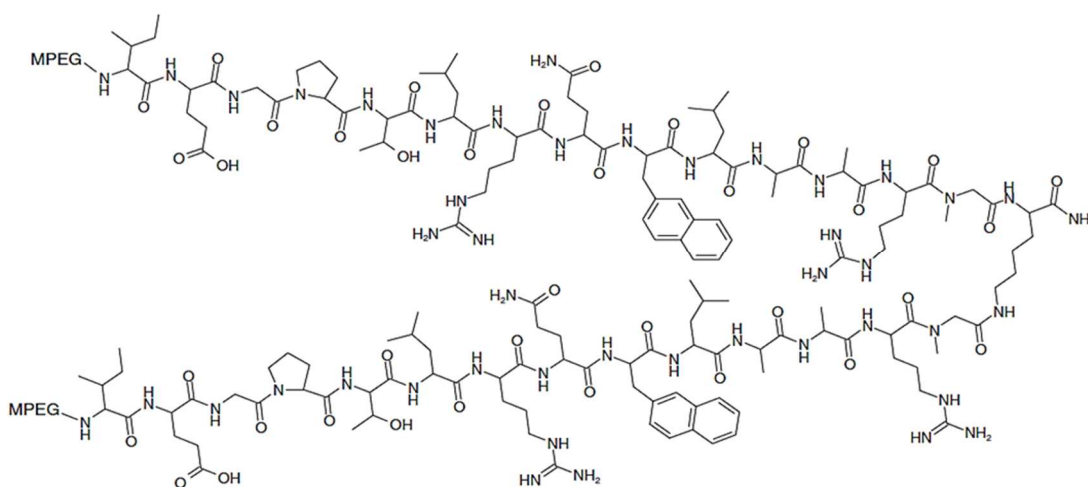
[0079] A Modalidade 1 (d) é o método da modalidade 1 (c), em que o polímero hidrofílico é qualquer um dos seguintes: i) polietileno glicol (PEG), ii) polipropileno glicol, iii) ácido polilático, ou iv) ácido poliglicólico.

[0080] A Modalidade 1 (e) é o método da modalidade 1 (d), em que o polímero hidrofílico é PEG.

[0081] A Modalidade 1 (f) é o método da modalidade 1 (e), em que o PEG é qualquer um de monometoxi polietileno glicol (MePEG-OH), monometoxi polietileno glicol - succinato (MePEG-S), monometoxi polietilenoglicol - succinimidil succinato (MePEG-S-NHS), monometoxi polietileno glicol - amina (MEPEG-S-NH₂), monometoxi polietileno glicol - tresilato (MePEG-TRES), e monometoxi polietileno glicol – imidazolil - carbonil (MePEG-IM).

[0082] A Modalidade 1 (g) é o método da modalidade 1 (e), em que o PEG é metoxipol (etileno glicol) (MPEG).

[0083] A Modalidade 1 (h) é o método da modalidade 1 (g), em que o mimético de TPO é RWJ-800088 tendo uma estrutura molecular de fórmula (I), ou um sal ou éster farmaceuticamente aceitável do mesmo:



[0084] A Modalidade 1 (i) é o método da modalidade 1 (h), em que o MPEG no RWJ-800088 é metoxipolietilenoglicol20000.

[0085] A Modalidade 1 (j) é o método da modalidade 1 (a), em que

o peptídeo tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

[0086] A Modalidade 1 (k) é o método da modalidade 1 (j), em que o peptídeo é fundido a um polipeptídeo.

[0087] A Modalidade 1 (l) é o método da modalidade 1 (k), em que o polipeptídeo é um domínio Fc.

[0088] A Modalidade 1 (m) é o método da modalidade 1 (l), em que o mimético de TPO é o romiplostim.

[0089] A Modalidade 1 (n) é o método da modalidade 1 (m), em que o romiplostim compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

[0090] A Modalidade 2 é o método de qualquer modalidade 1 a 1 (n), em que o indivíduo exposto à terapia de radiação alvo está sendo tratado para câncer.

[0091] A Modalidade 2 (a) é o método da modalidade 2, em que o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer de próstata, câncer de cabeça e pescoço, carcinoma hepatocelular, câncer de cólon, câncer de pulmão, melanoma, câncer de pâncreas e câncer de mama.

[0092] A Modalidade 2 (b) é o método da modalidade 2, em que o câncer é câncer de próstata.

[0093] A Modalidade 2 (c) é o método da modalidade 2, em que o câncer é câncer de cabeça e pescoço.

[0094] A Modalidade 3 é o método de qualquer uma das modalidades 1 a 2 (c), em que a composição farmacêutica é administrada ao indivíduo pelo menos cerca de 10 minutos a pelo menos cerca de 420 minutos após o indivíduo ser administrado com a terapia de radiação direcionada.

[0095] A Modalidade 3a é o método da modalidade 3, em que o mimético de TPO é administrado ao indivíduo pelo menos cerca de 20 minutos a pelo menos cerca de 360 minutos após o indivíduo ser

exposto à terapia de radiação direcionada.

[0096] A Modalidade 4 é o método da modalidade 3, em que o mimético de TPO é administrado ao indivíduo pelo menos cerca de 40 minutos a pelo menos cerca de 240 minutos após o indivíduo ser exposto à terapia de radiação direcionada.

[0097] A Modalidade 5 é o método da modalidade 3, em que o mimético de TPO é administrado ao indivíduo pelo menos cerca de 60 minutos a pelo menos cerca de 180 minutos após o indivíduo ser exposto à terapia de radiação direcionada.

[0098] A Modalidade 6 é o método da modalidade 3, em que o mimético de TPO é administrado ao indivíduo cerca de 10 minutos após o indivíduo ser exposto à terapia de radiação direcionada.

[0099] A Modalidade 7 é o método de qualquer uma das modalidades 1 a 6, em que o indivíduo é administrado mais de uma dose da quantidade eficaz do mimético de TPO.

[0100] A Modalidade 8 é um método para proteger um indivíduo da vasodilatação prejudicada da artéria pudenda após uma terapia de radiação direcionada, o método compreendendo administrar ao indivíduo em necessidade de uma quantidade eficaz de um mimético de trombopoietina (TPO).

[0101] A Modalidade 9 é um método para reduzir a vasoconstrição em um indivíduo após uma terapia de radiação direcionada, o método compreendendo administrar ao indivíduo em necessidade de uma quantidade eficaz de um mimético de trombopoietina (TPO).

[0102] A Modalidade 10 é um método para reduzir o vazamento vascular em um indivíduo após uma terapia de radiação direcionada, o método compreendendo administrar ao indivíduo em necessidade de uma quantidade eficaz de um mimético de trombopoietina (TPO).

[0103] A Modalidade 11 é um método para reduzir a interação de leucócitos endoteliais vasculares em um indivíduo após uma terapia de

radiação direcionada, o método compreendendo administrar ao indivíduo em necessidade de tratamento uma quantidade eficaz de um mimético de trombopoietina (TPO).

[0104] A Modalidade 11 (a) é o método de qualquer uma das modalidades 8 a 11, em que o mimético de TPO compreende um peptídeo tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

[0105] A Modalidade 11 (b) é o método da modalidade 11 (a), em que o peptídeo tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[0106] A Modalidade 11 (c) é o método da modalidade 11 (a) ou 11 (b), em que o mimético de TPO compreende ainda um polímero hidrofílico covalentemente ligado ao peptídeo.

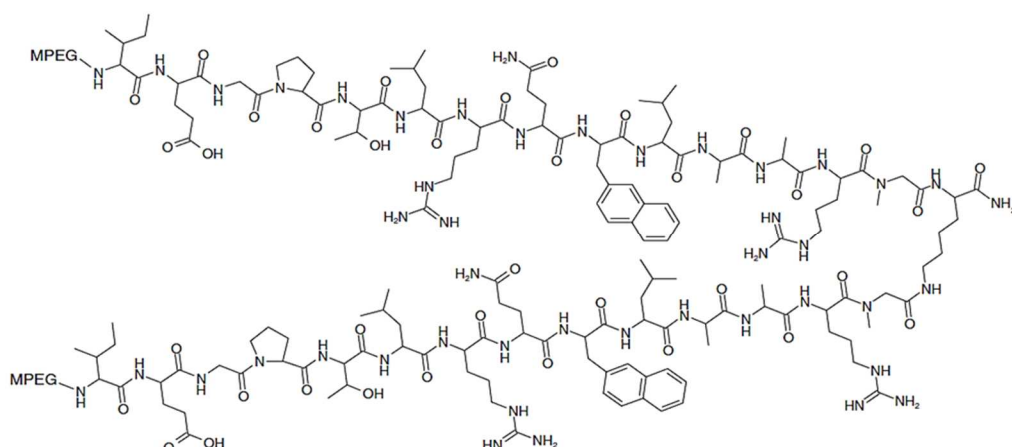
[0107] A Modalidade 11 (d) é o método da modalidade 11 (c), em que o polímero hidrofílico é qualquer um dos seguintes: i) polietileno glicol (PEG), ii) polipropileno glicol, iii) ácido polilático, ou iv) ácido poliglicólico.

[0108] A Modalidade 11 (e) é o método da modalidade 11 (d), em que o polímero hidrofílico é PEG.

[0109] A Modalidade 11 (f) é o método da modalidade 11 (e), em que o PEG é qualquer um de monometoxi polietileno glicol (MePEG-OH), monometoxi polietileno glicol - succinato (MePEG-S), monometoxi polietilenoglicol - succinimidil succinato (MePEG-S-NHS), monometoxi polietileno glicol - amina (MEPEG-S-NH₂), monometoxi polietileno glicol - tresilato (MePEG-TRES), e monometoxi polietileno glicol – imidazolil - carbonil (MePEG-IM).

[0110] A Modalidade 11 (g) é o método da modalidade 11 (e), em que o PEG é metoxipoli (etileno glicol) (MPEG).

[0111] A Modalidade 11 (h) é o método da modalidade 11 (g), em que o mimético de TPO é RWJ-800088 tendo uma estrutura molecular de fórmula (I), ou um sal ou éster farmaceuticamente aceitável do mesmo:



[0112] A Modalidade 11 (i) é o método da modalidade 11 (h), em que o MPEG no RWJ-800088 é metoxipolietilenoglicol20000.

[0113] A Modalidade 11 (j) é o método da modalidade 11 (a), em que o peptídeo tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

[0114] A Modalidade 11 (k) é o método da modalidade 11 (j), em que o peptídeo é fundido a um polipeptídeo.

[0115] A Modalidade 11 (l) é o método da modalidade 11 (k), em que o polipeptídeo é um domínio Fc.

[0116] A Modalidade 11 (m) é o método da modalidade 11 (l), em que o mimético de TPO é romiplostim.

[0117] A Modalidade 11 (n) é o método da modalidade 11 (m), em que o romiplostim compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

[0118] A Modalidade 12 é o método de qualquer uma das modalidades 8 a 11 (n), em que a terapia de radiação direcionada é administrada ao indivíduo para tratar um câncer ou tumor.

[0119] A Modalidade 13 é o método da modalidade 12, em que o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer de próstata, câncer de cabeça e pescoço, carcinoma hepatocelular, câncer de cólon, câncer de pulmão, melanoma, câncer de pâncreas, e câncer de mama.

[0120] A Modalidade 13 (a) é o método da modalidade 13, em que o câncer é câncer de próstata.

[0121] A Modalidade 13 (b) é o método da modalidade 13, em que o câncer é câncer de cabeça e pescoço.

[0122] A Modalidade 14 é um método de tratamento de um câncer em um indivíduo em necessidade de tratamento, compreendendo administrar ao indivíduo uma terapia de radiação direcionada, e uma quantidade eficaz de um mimético de trombopoietina (TPO).

[0123] A Modalidade 14 (a) é o método da modalidade 14, em que o mimético de TPO compreende um peptídeo tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

[0124] A Modalidade 14 (b) é o método da modalidade 14 (a), em que o peptídeo tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[0125] A Modalidade 14 (c) é o método da modalidade 14 (a) ou 14 (b), em que o mimético de TPO compreende ainda um polímero hidrofílico covalentemente ligado ao peptídeo.

[0126] A Modalidade 14 (d) é o método da modalidade 14 (c), em que o polímero hidrofílico é qualquer um dos seguintes: i) polietileno glicol (PEG), ii) polipropileno glicol, iii) ácido polilático, ou iv) ácido poliglicólico.

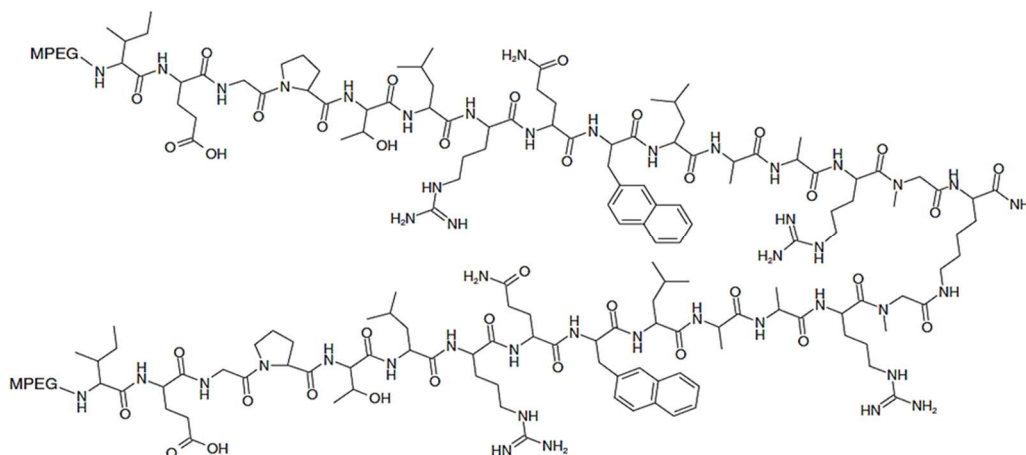
[0127] A Modalidade 14 (e) é o método da modalidade 14 (d), em que o polímero hidrofílico é PEG.

[0128] A Modalidade 14 (f) é o método da modalidade 14 (e), em que o PEG é qualquer um de monometoxi polietileno glicol (MePEG-OH), monometoxi polietileno glicol - succinato (MePEG-S), monometoxi polietilenoglicol - succinimidil succinato (MePEG-S-NHS), monometoxi polietileno glicol - amina (MEPEG-S-NH₂), monometoxi polietileno glicol - tresilato (MePEG-TRES), e monometoxi polietileno glicol – imidazolil - carbonil (MePEG-IM).

[0129] A Modalidade 14 (g) é o método da modalidade 14 (e), em que o PEG é metoxipoli (etileno glicol) (MPEG).

[0130] A Modalidade 14 (h) é o método da modalidade 14 (g), em

que o mimético de TPO é RWJ-800088 tendo uma estrutura molecular de fórmula (I), ou um sal ou éster farmacologicamente aceitável do mesmo:



[0131] A Modalidade 14 (i) é o método da modalidade 14 (h), em que o MPEG no RWJ-800088 é metoxipolietilenoglicol20000.

[0132] A Modalidade 14 (j) é o método da modalidade 14 (a), em que o peptídeo tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

[0133] A Modalidade 14 (k) é o método da modalidade 14 (j), em que o peptídeo é fundido a um polipeptídeo.

[0134] A Modalidade 14 (l) é o método da modalidade 14 (k), em que o polipeptídeo é um domínio Fc.

[0135] A Modalidade 14 (m) é o método da modalidade 14 (l), em que o mimético de TPO é romiplostim.

[0136] A Modalidade 14 (n) é o método da modalidade 14 (m), em que o romiplostim compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

[0137] A Modalidade 15 é o método de qualquer uma das modalidades 14 a 14 (n), em que o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer de próstata, câncer de cabeça e pescoço, carcinoma hepatocelular, câncer de cólon, câncer de pulmão, melanoma, câncer pancreático, e câncer de mama.

[0138] A Modalidade 15 (a) é o método da modalidade 15, em que o câncer é câncer de próstata.

[0139] A Modalidade 15 (b) é o método da modalidade 15, em que o câncer é câncer de cabeça e pescoço.

[0140] A Modalidade 16 é o método de qualquer uma das modalidades 14 a 15 (b), em que o mimético de TPO é administrado pelo menos cerca de 10 minutos a pelo menos cerca de 420 minutos após o indivíduo ser administrado com a radiação direcionada.

[0141] A Modalidade 17 é o método de qualquer uma das modalidades 14 a 16, em que o indivíduo é protegido da vasodilatação prejudicada da artéria pudenda após a administração da terapia de radiação direcionada e a quantidade eficaz do mimético de TPO.

[0142] A Modalidade 18 é o método de qualquer uma das modalidades 14 a 16, em que o indivíduo tem uma vasoconstrição reduzida após a administração da terapia de radiação direcionada e a quantidade eficaz do mimético de TPO.

[0143] A Modalidade 19 é o método de qualquer uma das modalidades 14 a 16, em que o indivíduo tem um vazamento vascular reduzido após a terapia de radiação direcionada e a administração da quantidade eficaz do mimético de TPO.

[0144] A Modalidade 20 é o método de qualquer uma das modalidades 14 a 16, em que o indivíduo tem uma interação reduzida de leucócitos endoteliais vasculares após a terapia de radiação direcionada e a administração da quantidade eficaz do mimético de TPO.

[0145] A Modalidade 21 é uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz de um mimético de trombopoietina (TPO) e um dispositivo e/ou outro agente para proteger a integridade vascular em um indivíduo exposto a uma terapia de radiação direcionada, em que o mimético de TPO compreende um peptídeo tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

[0146] A Modalidade 22 é uma composição farmacêutica da

modalidade 21, em que o outro agente é selecionado a partir do grupo que consiste em outros miméticos de TPO, protetores de radiação, radiossensibilizadores, hormônios, ou agonistas do hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH) (também chamados de análogos de LHRH ou agonistas de GnRH).

[0147] A Modalidade 22a é a composição farmacêutica da modalidade 22, em que o protetor de radiação compreende Ethyol® (amifostina).

[0148] A Modalidade 22b é a composição farmacêutica da modalidade 22 ou 22a, em que o radiossensibilizador compreende IUdR, BUdR, misonidazol, nimorazol, etanidazol, Fluosol, RSR-13, ou de galodínio motexafin (MGd)).

[0149] A Modalidade 22c é a composição farmacêutica de qualquer uma das modalidades 22 a 22b, em que o hormônio é tireoide para tratamento de câncer de cabeça e pescoço.

[0150] A Modalidade 22d é a composição farmacêutica de qualquer uma das modalidades 22 a 22c, em que o agonista (LHRH) compreende Leuprolida (Lupron, Eligard), Goserelina (Zoladex), Triptorelina (Trelstar) ou Histrelina (Vantas).

[0151] A Modalidade 23 é o método de qualquer uma das modalidades 1 a 20, em que a radiação direcionada é administrada na dose de 10 a 70 Gray (Gy).

[0152] A Modalidade 23 (a) é o método da modalidade 23, em que a dose da radiação é 10 Grey (Gy).

[0153] A Modalidade 23 (b) é o método da modalidade 23, em que a dose da radiação é 20 Grey (Gy).

[0154] A Modalidade 23 (c) é o método da modalidade 23, em que a dose da radiação é 30 Grey (Gy).

[0155] A Modalidade 23 (d) é o método da modalidade 23, em que a dose da radiação é 40 Grey (Gy).

[0156] A Modalidade 23 (e) é o método da modalidade 23, em que a dose da radiação é 50 Grey (Gy).

[0157] A Modalidade 23 (f) é o método da modalidade 23, em que a dose da radiação é 60 Grey (Gy).

[0158] A Modalidade 23 (g) é o método da modalidade 23, em que a dose da radiação é 70 Grey (Gy).

[0159] A Modalidade 23 (h) é o método de qualquer uma das modalidades 23 a 23 (g), em que a dose da radiação é administrada ao indivíduo em 1 a 10 frações.

[0160] A Modalidade 23 (i) é o método de qualquer uma das modalidades 23 a 23 (h), em que o indivíduo é tratado com a terapia de radiação direcionada uma vez ao dia.

[0161] A Modalidade 23 (j) é o método de qualquer uma das modalidades 23 a 23 (i), em que o indivíduo é tratado com a terapia de radiação direcionada duas vezes ao dia.

[0162] A Modalidade 24 é o método de qualquer uma das modalidades 1 a 20 e 23 a 23 (j), em que a radiação direcionada é selecionada a partir do grupo que consiste em terapia de radiação por feixe externo, terapia de radiação interna, e terapia com radioisótopos sistêmica.

[0163] A Modalidade 25 é o método da modalidade 24, em que a radiação direcionada é uma terapia de radiação fracionada.

EXEMPLOS

Exemplo 1: A administração de um mimético de trombopoietina preserva a função vascular em um modelo de irradiação da próstata de rato para disfunção erétil

Materiais e Métodos

[0164] **Animais:** Trinta e cinco ratos Sprague Dawley, machos, com oito semanas de idade foram obtidos a partir de Charles River Laboratories (Malvern, PA) e alojados em pares em condições padrão

de alojamento. Os animais foram divididos em 4 grupos: Solução salina/Placebo, Solução salina RT, TPOm/Placebo, TPOm/RT. Todo o trabalho com animais foi aprovado pelo Duke University School of Medicine Institutional Animal Care and Use Committee.

[0165] **Síntese e tratamentos com TPOm:** O TPOm foi sintetizado por Janssen Pharmaceuticals como descrito anteriormente (Knight e outros, Int. J. Toxicol. 30 (4): 385 a 404 (2011)) e enviado em gelo seco para Duke University como um pó liofilizado. O TPOm foi reconstituído em solução salina estéril, filtrado estéril, aliquotado e armazenado a -20° C até o uso. O TPOm foi administrado em dose única por injeção subcutânea (3.000 µg/kg) 10 minutos após a RT. Esta dose foi selecionada com base em sua eficácia em estudos de radiação no corpo inteiro de ratos, onde produziu um benefício substancial de sobrevivência em comparação com o placebo quando administrado em vários momentos.

[0166] **Irradiação da próstata:** a RT de fração única de próstata estereotáxica guiada por imagem foi realizada como publicado anteriormente (Kimura e outros, J. Sex Med. 9 (6): 1535-49 (2012)). Em resumo, os ratos foram anestesiados e imobilizados em um bloco de poliestireno. Uma tomografia computadorizada foi realizada para imagear a pelve inteira usando um GE Discovery RT590 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Planos de tratamento individualizados foram preparados para cada rato usando o sistema de planejamento de tratamento Eclipse (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA). A próstata e o reto foram contornados, com o volume de tratamento primário gerado pela expansão da próstata em 1 mm, seguido pela subtração do reto expandida em 1 mm. Um único plano dinâmico de arco conformal, usando uma energia de feixe de 6 MV, foi normalizado para fornecer 20 Gy a 95% do volume do tratamento primário em uma única fração com economia parcial do reto. A maioria da bexiga, pênis

e testículos foram excluídos do campo. O rato foi então tratado em um linac de radiocirurgia NovalisTx (Brainlab AG, Munique, DE e Varian Medical Systems) usando tomografia computadorizada de feixe cônico antes do tratamento com orientação da imagem óssea na mesma janela de anestesia do planejamento. Ratos irradiados com placebo foram anestesiados e imobilizados em um bloco de poliestireno sem irradiação.

[0167] ***Medições de pressão intracavernosa (ICP):*** Para medições de pressão intracavernosa (ICP), foi seguido um protocolo publicado anteriormente (Kimura e outros, J. Sex Med. 8 (8): 2215-26 (2011)). Em resumo, os ratos foram anestesiados com cetamina/xilazina. Foi feita uma incisão na pele cervical ventral para visualizar a artéria carótida, e foi inserido um tubo de polietileno (PE)-50 contendo solução salina heparinizada para monitoramento contínuo da pressão arterial média (PAM). O peritônio foi então aberto e os testículos foram retraídos. O nervo cavernoso ao longo da próstata póstero-lateral foi visualizado e uma agulha 23G conectada ao tubo PE-60 preenchido com solução salina foi inserida no tubo ipsilateral próximo à base peniana. Ambos os tubos foram conectados a um transdutor de pressão (World Precision Instruments, Sarasota, FL). O nervo cavernoso foi isolado e estimulado usando um eletrodo bipolar conectado a um estimulador S48 (Grass Technologies, West Warwick, RI) com 4, 6 ou 8V, por um minuto, com um minuto de descanso entre os estímulos. O MAP e o ICP foram registrados usando o software LabChart 7 (ADInstruments, Colorado Spring, CO) e expressos como uma razão para minimizar as diferenças entre ratos na pressão de base e nos efeitos da anestesia.

[0168] ***Medições ultrassonográficas da vasodilatação induzida por hidralazina:*** Após as medições da ICP, gel acústico foi aplicado na área da próstata e um transdutor de eco de alta frequência (MS5505)

de camundongo foi aplicado à artéria pudenda interna. As imagens foram obtidas usando a máquina Vevo 2100 (Visual Sonics; Toronto, ON) no modo B para avaliar o diâmetro arterial por ecocardiografia 2-D. A colocação reproduzível do US foi verificada usando a mesma distância do US ao osso púbico em todos os animais. A hidralazina (Sigma, St. Louis, MO) (0,4 mg/kg) foi então infundida através do cateter de carótida ao longo de um minuto, e a ecocardiografia foi repetida. O diâmetro arterial foi medido usando o pacote vascular para o software Vevo 2100.

[0169] **Coloração e quantificação de CD31:** Os pênis foram congelados rapidamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o uso. As crio-seções (10 µm) foram preparadas usando um criostato Crytome FSE (ThermoFisher Scientific, Kalamazoo, MI). As seções foram fixadas por 20 minutos em acetona, secas ao ar e bloqueadas com soro de burro a 10% (Sigma). Anticorpo primário (CD31 de camundongo anti-rato, clone TLD-3A12, BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) e anticorpo secundário (IgG de burro anti-camundongo conjugado a Alexa Fluor 488; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) foram aplicados por uma hora, e as seções foram contrastadas com Hoechst 33342 (Sigma) a 2,5 µg/ml por cinco minutos antes da fixação em formalina e seladas usando Cytoseal60 (ThermoScientific). As lâminas foram imageadas usando um microscópio Zeiss Axio Imager equipado com o software ZEN 2. As amostras foram imageadas dentro de 24 horas após a coloração, usando os mesmos tempos de exposição entre as amostras. A expressão de CD31 normalizada para o perímetro do vaso foi realizada usando o software ImageJ. Primeiro, as medições foram globalmente calibradas para uma barra de escala de comprimento conhecido (100 microns). Usando a ferramenta de contorno ImageJ, as medidas foram obtidas para perímetro (em microns) e área (em microns²). A expressão de CD31 foi então quantificada destacando

apenas a porção corada de CD31 em torno de cada vaso, e obtendo uma contagem de pixels da região corada, usando um limite uniforme através de todas as imagens. Para explicar a variação do tamanho do vaso, para cada vaso, a contagem bruta da expressão de CD31 foi então normalizada para o perímetro para esse vaso. Toda a análise foi concluída de forma cega.

[0170] **Estatísticas:** A análise estatística foi concluída usando Prism 6 (GraphPad, LaJolla, CA). ANOVAs bidirecional foram usadas para taxa de ganho de peso e ICP e testes t não pareados foram usados para comparar alterações histológicas. Um teste t-pareado de Wilcoxon foi usado para comparar os diâmetros arteriais em cada rato antes e após a administração de hidralazina. O peso do rato foi avaliado usando uma ANOVA de medidas repetidas bidirecional.

Resultados

TPOm protege contra redução na taxa de ganho de peso após terapia de radiação (TR).

[0171] Todos os ratos continuaram a ganhar peso após a RT, o que fala da precisão do tratamento com radiação e da capacidade de minimizar a exposição ao tecido gastrointestinal. No entanto, os gráficos de peso corporal versus tempo de ratos irradiados com solução salina mostraram uma taxa e magnitude reduzidas de peso corporal em comparação com todos os outros grupos de tratamento (Figura 1A). Foi realizada uma ANOVA de medidas repetidas bidirecional que demonstrou uma interação significativa ($p = 0,0054$) de ganho de peso, tempo pós-RT e modalidade de tratamento. Foi observada diferença na taxa média de ganho de peso corporal entre Solução Salina/Placebo ($27,5 \pm 2,8$ g/semana), TPOm/Placebo ($37,7 \pm 3,3$ g/semana), Solução Salina/RT ($21,6 \pm 1,6$ g/semana) e TPOm/RT ($28,6 \pm 3,9$ g/semana) (Figura 1B); no entanto, uma ANOVA bidirecional seguida pelo teste post-hoc de Tukey, identificou apenas uma diferença pareada

significativa ($p < 0,05$) entre apenas os grupos TPOM/Placebo e Solução Salina/RT.

TPOM preserva a função arterial após a RT.

[0172] Para avaliar se o TPOM foi capaz de preservar a função vascular, a ecocardiografia por ultrassom foi usada para medir a dilatação da artéria pudenda em resposta à administração de hidralazina (Figura 2). Não houve diferenças significativas nos diâmetros arteriais basais entre os grupos em relação à radiação ($p = 0,86$), TPOM, ($p = 0,47$) ou interação ($p = 0,46$). Após a infusão de hidralazina, as artérias de ratos com Solução Salina/Placebo aumentaram significativamente em diâmetro em uma média de $28,8\% \pm 14,6\%$. Os ratos não irradiados que foram tratados apenas com TPOM apresentaram um aumento de $10,4\% \pm 10\%$ no diâmetro. As artérias de ratos com Solução Salina/RT não foram capazes de dilatar após a hidralazina, mostrando uma alteração não significativa de $-7,4\% \pm 9,9\%$ no diâmetro a partir da linha de base, indicando que a RT prejudicou a função arterial, por exemplo, vasodilatação da artéria pudenda nos ratos. No entanto, o tratamento com TPOM após a RT preservou a função arterial, por exemplo, protegeu os ratos da vasodilatação prejudicada da artéria pudenda, com as artérias mostrando uma variação de $24,1\% \pm 7,2\%$ no diâmetro em resposta à hidralazina, não significativamente diferente dos controles não irradiados.

[0173] **TPOM protege contra constrição vascular.**

[0174] Para avaliar os efeitos da interação de RT e TPOM na artéria peniana, os pênis criopreservados foram avaliados histologicamente quanto à expressão de CD31 para identificar a vasculatura (Figura 3A). Não houve diferenças no perímetro da artéria peniana em ratos não irradiados que foram tratados com solução salina ou TPOM, no entanto, a radiação diminuiu significativamente a área transversal das artérias em comparação aos Controles com Placebo/Solução Salina ($p < 0,01$).

Essa diminuição na área da seção transversal da artéria peniana não foi observada nos ratos com TPOm/RT (Figura 3B), sugerindo um efeito de proteção da vasoconstrição induzida por RT. A coloração de CD31 (número de pixels CD31⁺) foi avaliada como um marcador da espessura endotelial vascular, e esse valor foi normalizado para o perímetro arterial, para explicar as diferenças no tamanho arterial. Quando expressa como CD31⁺ pixels/μm, um ANOVA bidirecional mostrou um efeito significativo de RT, mas não houve diferenças aos pares na densidade de CD31 entre os grupos de tratamento (Figura 3C).

[0175] **A proteção vascular por TPOm não foi suficiente para preservar a função erétil em 9 semanas nas condições testadas.**

[0176] Foi observado anteriormente que o modelo de rato para ED induzida por radiação exibe uma relação sigmoide entre a dose de radiação e a incidência de ED (Koontz e outros, "Dose dependence of radiation-induced erectile dysfunction in an animal model", J Sex. Med. 9 (Proceedings from the 17th Annual Fall Scientific Meeting of Sexual Medicine Society of North America, Las Vegas, NV, 10 a 13 de novembro (2011) (2012)). Doses de 14, 20 e 25 Gy resultarão em ED em 50%, 80% e 100% dos ratos, respectivamente (dados não mostrados). Para testar os efeitos atenuantes do TPOm, uma dose de 20 Gy foi aplicada para detectar alterações ao longo da porção sigmoide da curva de dose - resposta. Os ratos que foram tratados apenas com TPOm apresentaram variabilidade aumentada de ICP:MAP, mas a média não foi significativamente diferente dos ratos não irradiados tratados com solução salina (Figura 4). Dos seis ratos tratados apenas com RT, cinco não conseguiram produzir uma razão ICP:MAP maior do que 0,6, mostrando uma penetrância de ED de 83% neste estudo. O tratamento com TPOm após radiação não impediu a ED, com uma penetrância de 67%. Um ANOVA bidirecional mostrou um efeito significativo de RT ($p = 0,0043$) com a análise post-hoc de Tukey,

identificando diferenças significativas entre os controles com placebo não irradiados e os ratos com Solução Salina/RT e TPOM/RT.

Exemplo 2: Aplicação de um novo modelo de veia da orelha de murino para avaliar os efeitos de um mimético de trombopoietina na permeabilidade vascular induzida por radiação e adesão de leucócitos.

Materiais e Métodos

[0177] **Animais.** Camundongos Flk1-mCherry (Larina e outros, Anat. Rec. 292 (3): 333-41 (2009)) foram criados dentro da instalação Duke University Breeding Core. Camundongos machos e fêmeas com pelo menos 8 semanas de idade foram transferidos para uma instalação não-barreira e grupo alojado ao longo dos experimentos. As células endoteliais vasculares nos camundongos Flk1-mCherry expressam constitutivamente mCherry, o que facilita imagiologia e análises microscópicas intravitalis. Todo o trabalho com animais foi aprovado pelo Duke University School of Medicine Institutional Animal Care and Use Committee.

[0178] **Irradiação da orelha.** Os ratos foram anestesiados com 80/8 mg/kg de injeção i.p de cetamina/xilazina. Os camundongos foram colocados em gabaritos cilíndricos de chumbo que protegiam o corpo inteiro, com exceção da pina de orelha esquerda e foram irradiados usando um irradiador de raios x Orthovoltage 320 (Precision X-ray Inc.; North Branford, CT) a uma taxa de dose de 203 cGy/minuto (320 kVp/10mA com um filtro Al de 2 mm). Toda a dosimetria foi confirmada por Duke Radiation Physics antes do início dos experimentos.

[0179] **Síntese e administração de TPOM.** O TPOM foi sintetizado por Janssen Pharmaceuticals como descrito anteriormente (Knight e outros, Int. J. Toxicol. 30 (4): 385 a 404 (2011)) e enviado à Duke University na forma seca. O TPOM foi reconstituído em solução salina estéril, filtrado estéril, distribuído em alíquotas e armazenado a -20° C

até o uso. Imediatamente antes da injeção, as alíquotas foram descongeladas e diluídas. Os camundongos receberam 300 µg/kg de TPOM, por via subcutânea, seis horas após a radiação.

[0180] **Microscopia Intravital.** Os camundongos foram anestesiados via isoflurano (2%, misturado com oxigênio) e a orelha foi depilada quimicamente (Nair™) e limpa com etanol a 70%. O camundongo foi colocado em um estágio aquecido sob um microscópio invertido Zeiss Observer.Z1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha). A orelha irradiada foi afixada a uma lâmina de vidro plexi usando fita dupla face. As imagens foram adquiridas usando o software Zen Imaging (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha). As células endoteliais vasculares nos camundongos Flk1-mCherry expressam mCherry, que foi visualizado usando um filtro Zeiss Texas Red (Ex. 560/40; Em. 630/75). A laranja de acridina e o FITC-dextrano foram visualizados usando um filtro Zeiss eGFP/FITC/Alexa488 (Ex. 470/40; Em. 525/50).

[0181] **Interações de Leucócitos - Células Endoteliais (L/E).** Após a orientação do camundongo no microscópio, 0,5 mg de laranja de acridina (Sigma, St. Louis, MO; dissolvido em solução salina estéril) foram injetados por via intravenosa. A laranja de acridina marca todas as células nucleadas no sangue (isto é, leucócitos). A vasculatura foi imageada por 60 segundos, com imagens tiradas a cada 200 ms. Os leucócitos rolantes foram definidos como células que margeavam ao longo da parede do vaso e foram claramente dissociadas a partir do fluxo sanguíneo. Foram identificadas quatro vênulas por camundongo, com base em seu diâmetro, e o número de leucócitos que passaram por três pontos pré-selecionados em cada vênula foi contado. O diâmetro do vaso (D) e as velocidades de leucócitos de fluxo livre (V) também foram medidos, e utilizados para calcular a taxa de cisalhamento, definida como $(8 \times V)/D$. Todos os vídeos foram analisados por pesquisadores cegos para os grupos de tratamento.

[0182] ***Medição e Avaliação de Permeabilidade Vascular.*** Depois de orientar o camundongo no microscópio, uma agulha 30G acoplada a uma seringa com cateter de tubo Tygon Microbore (Harvard Apparatus) foi inserida na veia cauda. Imagens de pilha Z de ambos os canais FITC e mCherry foram adquiridas a cada 10 segundos, e 0,5 mg de dextrano de 70 kDa conjugado com FITC injetado através do cateter após a terceira imagem ser coletada. A aquisição da imagem foi realizada a cada 10 segundos por 25 minutos.

[0183] Um modelo de permeabilidade de um compartimento foi assumido usando a equação para $C_T(t)$. A concentração tecidual de dextrano no tecido extravascular no tempo t (conhecida como uma curva de atividade no tempo [TAC]) é dada por:

$$\frac{dC_T(t)}{dt} = k_1 C_B(t - \Delta) \quad (1.1)$$

[0184] O modelo (1.1) postula que a alteração na concentração de tecido no tempo t é proporcional a $C_B(t - \Delta)$, concentração de dextrano na vasculatura com um atraso Δ . Por uma questão de simplicidade, foi excluída a possibilidade de retorno de dextrano a partir do tecido extravascular de volta para o compartimento vascular. Nesse cenário, a quantidade de juro é k_1 , a taxa de permeabilidade. Assumindo a condição inicial de que $C_B(0) = 0$ (não há dextrano no tecido no tempo 0), a equação diferencial (1.1) pode ser resolvida como:

$$C_T(t) = k_1 \int_0^t C_B(s - \Delta) ds \quad (1.2)$$

A estimativa de k_1 a partir da equação (1.2) requer conhecimento tanto da concentração intravascular quanto da concentração extravascular de dextrano no tempo t , $C_B(t)$ e $C_T(t)$. Devido à falta de um marcador vascular confiável, era difícil separar com precisão os componentes vasculares e extravasculares nas imagens. No entanto, parte da vasculatura pode ser identificada porque os primeiros sinais de dextrano são vistos apenas na vasculatura. Traçando um ROI sobre essa região

(Figura 5), o TAC $C_B(t)$ vascular pode ser estimado. Foi feita a suposição de que o TAC é uniforme através de outras partes da vasculatura. Em vez de tentar identificar a região vascular extra, foi calculada a atividade média em todo o campo de visão $C_F(t)$, que é composto pelos componentes vascular e tecidual. Sem perda de generalidade, essa atividade geral pode ser expressa da seguinte maneira:

$$C_F(t) = v_b C_B(t) + (1 - v_b) C_T(t) \quad (1.3)$$

[0185] onde v_b é a fração (desconhecida) da área no campo de visão composta pela vasculatura. O tecido desconhecido TAC $C_T(t)$ na equação (1.3) pode então ser substituído usando a equação (1.2), da seguinte maneira:

$$C_F(t) = v_b C_B(t) + (1 - v_b) k_1 \int_0^t C_B(s - \Delta) ds \quad (1.4)$$

[0186] Assumindo que o TAC vascular, $C_B(t)$ seja estritamente positivo (> 0), ambos os lados de (0.4) poderiam ser divididos por ele para obter uma equação transformada:

$$\frac{C_F(t)}{C_B(t)} = v_b + (1 - v_b) k_1 \frac{\int_0^t C_B(s - \Delta) ds}{C_B(t)} \quad (1.5)$$

i.e. $y(t) = v_b + mx(t)$

[0187] onde $y(t) = \frac{C_F(t)}{C_B(t)}$, $x(t) = \frac{\int_0^t C_B(s - \Delta) ds}{C_B(t)}$ e $m = (1 - v_b) k_1$. A

equação (1.5) pode ser vista na forma de uma linha reta, que pode ser ajustada usando regressão linear. As constantes desconhecidas v_b e m são estimadas como a inclinação e a interseção da linha de regressão ajustada. Essa técnica de estimativa, geralmente conhecida como análise gráfica de Patlak, é usada para estimar as taxas de transporte de tecidos do radiotraçador em estudos dinâmicos de PET (Patlak e outros, J. Cereb Blood Flow Metab. 3 (1): 1 a 7 (1983)). Na prática, leva tempo para que o equilíbrio seja alcançado antes que a relação linear

descrita em (1.5) resulte nas inclinações mostradas na Figura 6. Por esse motivo, a relação linear foi ajustada excluindo os primeiros 10 minutos do estudo. Para esse efeito, a constante de permeabilidade pode ser estimada como: $\hat{k}_1 = \hat{m}/(1 - \hat{v}_b)$.

[0188] **Análise de Células Sanguíneas em Circulação.** Os camundongos foram sacrificados com 50 µL de Euthasol (Virbac, Fort Worth, TX) injetados intraperitonealmente. Depois que os camundongos não responderam à pitada dos dedos dos pés, mas antes da interrupção dos batimentos cardíacos, 500 µL de sangue foram coletados por punção cardíaca por meio de seringa heparinizada, e imediatamente submetidos a vórtice com 20 µL de heparina. A análise de CBC foi conduzida usando um analisador de hematologia IDEXX ProCyte Dx por Duke University Veterinary Diagnostic Laboratory.

Resultados

Efeitos de TPOM na Permeabilidade Vascular

[0189] Uma das consequências da apoptose das células endoteliais vasculares mediada por radiação é a integridade vascular reduzida, resultando em vazamento vascular (Weintraub e outros, Am. Coll. Cardiol. 55 (12): 1237-9 (2010)). A integridade vascular foi avaliada quantificando o extravasamento de dextrano a partir da vasculatura após uma injeção intravenosa de 70 kDa de FITC-dextrano. Esse tamanho de dextrano foi selecionado porque é próximo ao tamanho da albumina; portanto, seu extravasamento é fisiologicamente relevante (Dreher e outros, J. Natl. Cancer Inst. 98 (5): 335-44 (2006)). Dextrano foi injetado 30 segundos após o início da imagiologia, para estabelecer o sinal de fundo. Após a injeção, um forte sinal fluorescente foi visto dentro da vasculatura, que se espalhou por toda a rede vascular. O vazamento foi observado como "espalhamento" do sinal FITC que se originou dentro dos vasos.

[0190] Embora um modelo que incluísse transporte reverso a partir

do tecido para a vasculatura tenha sido considerado, o modelo padrão com transporte em ambas as direções assume que o TAC do sangue tem uma forma exponencial negativa, implicando que o TAC do sangue diminui monotonicamente ao longo do tempo. Com base no TAC de sangue observado aqui apresentado, isso é violado em vários casos, com alguns indivíduos aumentando, depois diminuindo, mais tarde durante a imagiologia. Isso sugere que o modelo padrão seria um ajuste inadequado para alguns dados. O modelo que era adequado é mais forte porque usa os dados empiricamente observados sem pressupor qualquer forma particular para o TAC no sangue.

[0191] **A terapia com TPOM preservou a integridade vascular, reduzindo o vazamento.**

[0192] Os camundongos de controle não irradiados mostraram forte integridade vascular, e o sinal permaneceu dentro dos vasos e não mudou significativamente durante a sessão de imagiologia de 25 minutos. Em camundongos em que a integridade vascular foi comprometida por RT, o sinal FITC claramente se estendeu além da máscara vascular. As taxas de permeabilidade foram calculadas para cada camundongo e são mostradas na Figura 7. A radiação aumentou significativamente as taxas de permeabilidade nos dias 3 e 7 após a irradiação ($p < 0,05$, em comparação com os controles (Tabela 1)). No entanto, as taxas de permeabilidade de camundongos tratados com TPOM após a radiação não foram significativamente diferentes dos controles não irradiados em qualquer momento. No entanto, houve alguns animais que apresentaram permeabilidade elevada no grupo de controle, enquanto nenhum animal no grupo TPOM apresentou no dia 7. Não houve correlação entre as taxas de permeabilidade nos dias 3 e 7, sugerindo que a lesão pode não atingir o pico ao mesmo tempo entre os animais (Figura 8).

[0193] Tabela 1: Resultados de ANOVA da comparação revisada da

taxa de permeabilidade de dextrano

Termo	Efeito	Erro Padrão	Valor t	Valor p
Linha de Base	0,0012	0,0003	3,7025	0,0003
RT D3	0,0013	0,0006	2,0089	0,0483*
RT D7	0,0015	0,0006	2,2727	0,0260*
RT + TPO D3	0,0009	0,0007	1,2689	0,2086
RT + TPO D7	-0,0002	0,0007	-0,2346	0,8152

[0194] Efeitos de TPOM nas Interações entre Leucócitos - Células Endoteliais.

[0195] Estudos anteriores utilizaram microscopia intravital para quantificar respostas inflamatórias mediadas por irradiação, resultando em aumento de leucócitos rolantes nas vênulas terminais do intestino delgado irradiado (Johnson e outros, BMC Surgery 4:10 (2004)), pele (Kimura e outros, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 33 (3): 627-33 (1995)), e mucosa sublingual (Birrer e outros, "Inhibition of the continuum of radiation-induced normal tissue injury by a redox-active mu porphyrin", Radiation Research, 188 (1): 94 a 104 (2017)). Para avaliar as interações leucócitos – células endoteliais, foram obtidas imagens em tempo real da vasculatura da orelha 24 horas após a irradiação (6 Gy). Os núcleos de leucócitos foram marcados após injeção intravascular com laranja de acridina, o que permitiu a visualização por microscopia de fluorescência. Os leucócitos rolantes podiam ser vistos claramente à margem das paredes dos vasos, a uma taxa que era distintamente separada do fluxo livre (A) em camundongos com placebo e RT.

[0196] As vênulas pós-capilares foram usadas para análise, que foram distinguidas de outros vasos com base em diâmetros (aproximadamente 15 a 60 µm de diâmetro) e evidência de fluxo sanguíneo convergente. Os tratamentos não tiveram efeito significativo na velocidade média do fluxo sanguíneo, diâmetro ou taxas de

cisalhamento entre os vasos selecionados (Figura 10).

[0197] A taxa de cisalhamento, a força do fluxo sanguíneo paralela às paredes dos vasos, tem um efeito direto nas interações L/E. Taxas de cisalhamento mais altas reduzem as interações dos leucócitos com as moléculas de adesão. Isso se traduz em menos interações L/E em altas taxas de cisalhamento e uma inclinação negativa ao traçar a taxa de cisalhamento vs. interações L/E. Para investigar o papel da RT nessa relação, as taxas de cisalhamento e as interações L/E foram determinadas para pelo menos quatro vasos por camundongo, os valores de cada vaso foram representados graficamente como gráficos de espalhamento (B), e as inclinações foram calculadas para cada camundongo individual usando o GraphPad Prism. Como esperado, as interações L/E diminuíram com o aumento das taxas de cisalhamento, produzindo uma inclinação de $-14,4 \pm 5,1$ (C). No entanto, 24 horas após a irradiação, ocorreu ativação endotelial suficiente para que as interações L/E persistissem, mesmo em taxas de cisalhamento mais altas, resultando em uma inclinação média de $5,6 \pm 3,6$.

[0198] Para descartar a possibilidade de as observações terem resultado de alterações sistêmicas na contagem de leucócitos, foram realizadas hemogramas completos (Tabela 2). 24 horas após a irradiação, houve uma ligeira diminuição das plaquetas nos camundongos RT, mas isso não foi significativo. Não houve diferenças significativas no total de leucócitos, neutrófilos ou linfócitos entre os grupos, ou como efeito da RT, TPOm ou da interação. Portanto, o aumento observado nas interações L/E não foi apenas um subproduto de componentes sanguíneos elevados.

[0199] Tabela 2: Hemogramas completos foram obtidos 24 horas após a RT. N = 5/grupo; os dados são apresentados como médias $\pm$ SEM.

	Solução Salina, 0 Gy	TPOm, 0 Gy	Solução Salina, 6 Gy	TPOm, 6 Gy	Efeito de TPOm (valor p)	Efeito de RT (valor p)	Efeito de interação (valor p)
Plaquetas (K/ μ L)	582 $\pm$ 80	531 $\pm$ 68	370 $\pm$ 70	548 $\pm$ 105	0,4523	0,2543	0,1815
Leucócitos (K/ μ L)	2,5 $\pm$ 0,5	2,55 $\pm$ 0,48	3,64 $\pm$ 0,7	2,11 $\pm$ 0,33	0,2603	0,9926	0,1073
Neutrófilos (K/ μ L)	0,368 $\pm$ 0,05	0,68 $\pm$ 0,31	0,456 $\pm$ 0,09	0,232 $\pm$ 0,05	0,7929	0,291	0,1235
Linfócitos (K/ μ L)	1,79 $\pm$ 0,44	1,77 $\pm$ 0,23	1,52 $\pm$ 0,12	1,33 $\pm$ 0,24	0,7046	0,2292	0,7779

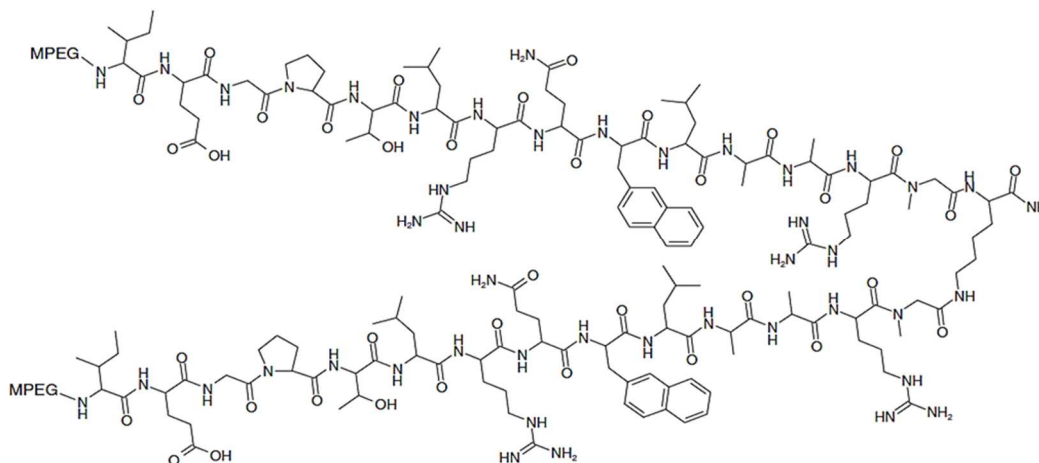
[0200] Em camundongos tratados com 6 Gy no ouvido e administrados solução salina ou 300 μ g/kg de TPOm por via subcutânea seis horas depois, houve um efeito estatisticamente significativo na relação entre as interações L/E e a taxa de cisalhamento, com uma inclinação média de - 14,4 $\pm$ 10,9 no grupo de solução salina, enquanto não houve diferença entre o grupo tratado com TPOm e os controles não irradiados (inclinação média de -8,7 $\pm$ 6,4). Esses achados sustentam a hipótese de que o TPOm reduz as interações vasculares dos leucócitos endoteliais após a radiação e, portanto, pode promover a manutenção da integridade vascular após a irradiação.

[0201] Será apreciado pelos versados na técnica que alterações podem ser feitas nas modalidades descritas acima sem abandonar o amplo conceito da invenção. Entende-se, portanto, que esta invenção não está limitada às modalidades particulares descritas, mas é destinada a cobrir modificações dentro do espírito e escopo da presente invenção, conforme definido pela presente descrição.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para proteger a integridade vascular em um indivíduo exposto a uma terapia de radiação direcionada, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um mimético de trombopoietina (TPO), compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o mimético de TPO é RWJ-800088 tendo a seguinte estrutura de fórmula (I), ou um sal ou éster farmacologicamente aceitável do mesmo:



Fórmula (I)

em que MPEG representa metoxipolietilenoglicol20000.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o mimético de TPO é romiplostim compreendendo SEQ ID NO: 4.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o indivíduo exposto à terapia de radiação direcionada está sendo tratado para câncer.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer de próstata, câncer de cabeça e pescoço, carcinoma hepatocelular, câncer de cólon, câncer de pulmão, melanoma, câncer

de pâncreas, e câncer de mama.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o mimético de TPO é administrado ao indivíduo pelo menos cerca de 10 minutos a pelo menos cerca de 420 minutos após o indivíduo ser exposto à radiação.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o mimético de TPO é administrado ao indivíduo pelo menos cerca de 20 minutos a pelo menos cerca de 360 minutos após o indivíduo ser exposto à radiação.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o mimético de TPO é administrado ao indivíduo pelo menos cerca de 40 minutos a pelo menos cerca de 240 minutos após o indivíduo ser exposto à radiação.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o mimético de TPO é administrado ao indivíduo pelo menos cerca de 60 minutos a pelo menos cerca de 180 minutos após o indivíduo ser exposto à radiação.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é protegido de vasodilatação prejudicada da artéria pudenda após a terapia de radiação direcionada e a administração da quantidade eficaz do mimético de TPO.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem uma vasoconstrição reduzida após a terapia de radiação direcionada e a administração da quantidade eficaz do mimético de TPO.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem um vazamento vascular reduzido após a terapia de radiação direcionada e a administração da quantidade eficaz do mimético de TPO.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem uma interação reduzida de leucócitos endoteliais vasculares após a terapia de radiação direcionada e a administração da quantidade eficaz do mimético de TPO.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que a terapia de radiação direcionada é selecionada a partir do grupo que consiste em terapia de radiação por feixe externo, terapia de radiação interna, e terapia com radioisótopos sistêmica.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que a radiação direcionada é administrada na dose de 10 a 70 Gray (Gy).

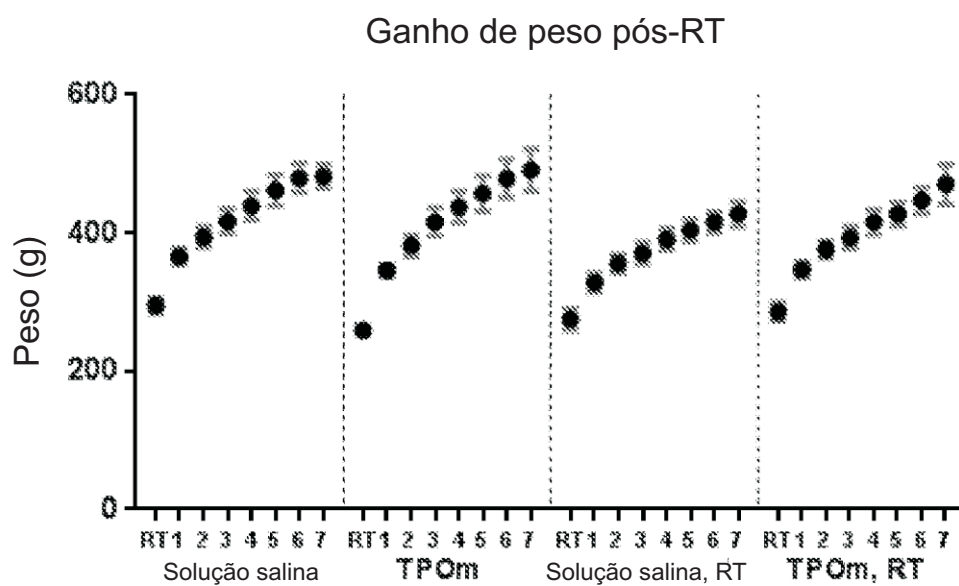


FIG. 1A

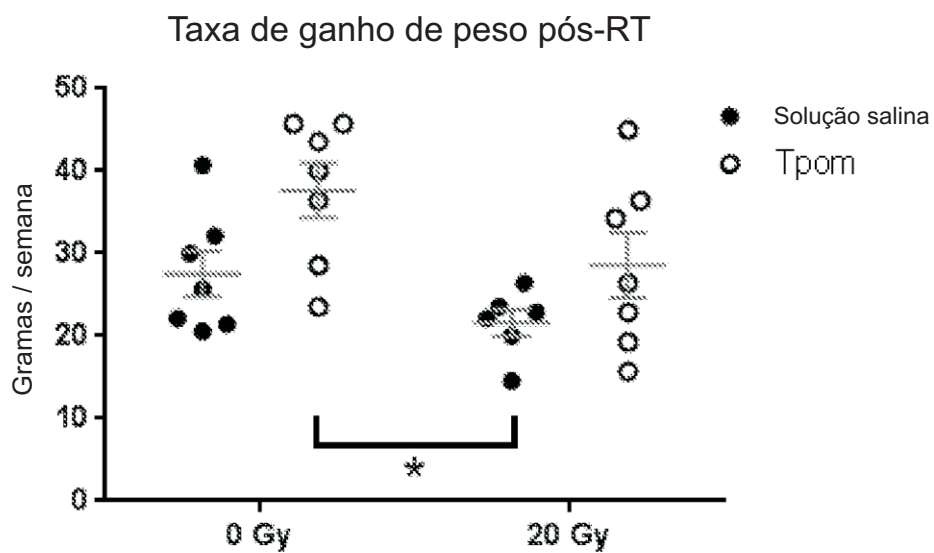


FIG. 1B

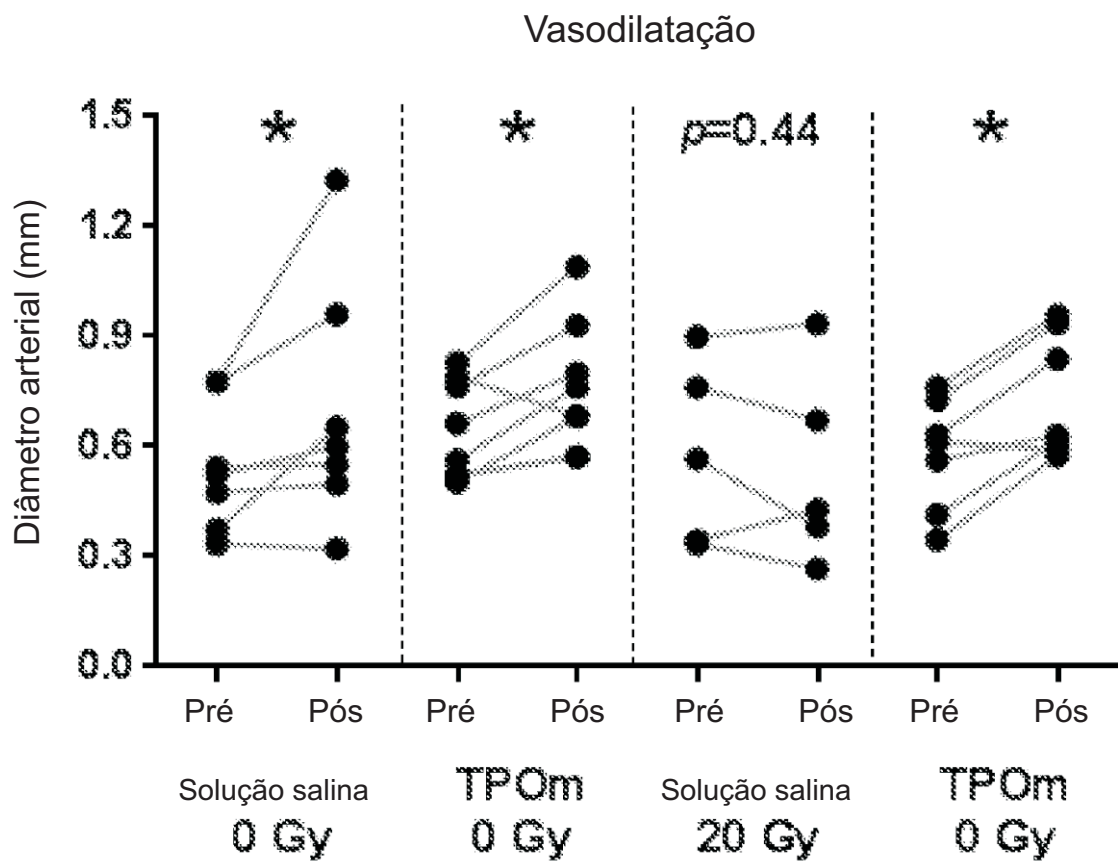


FIG. 2

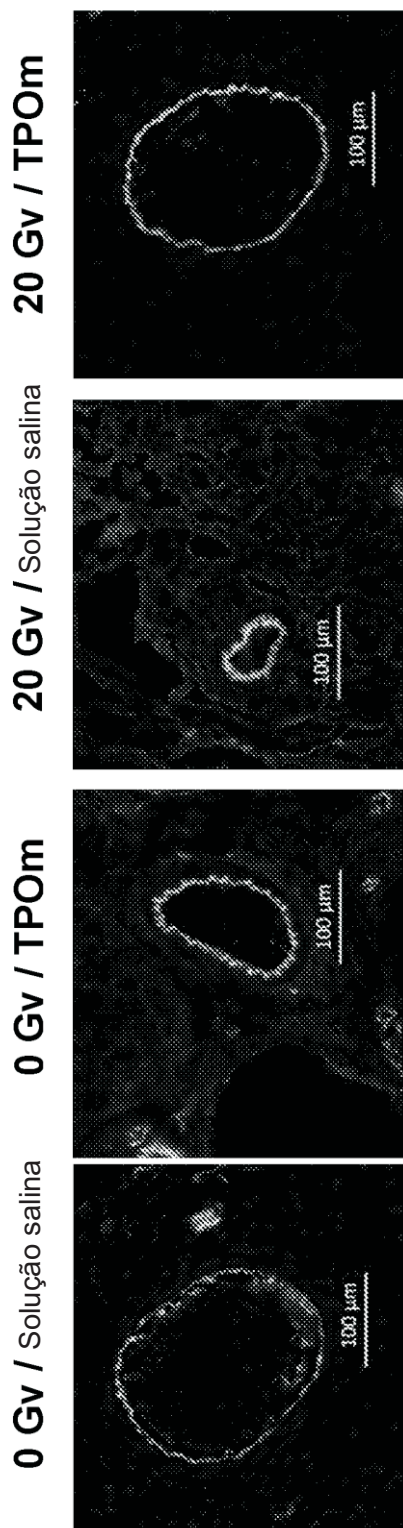


FIG. 3A

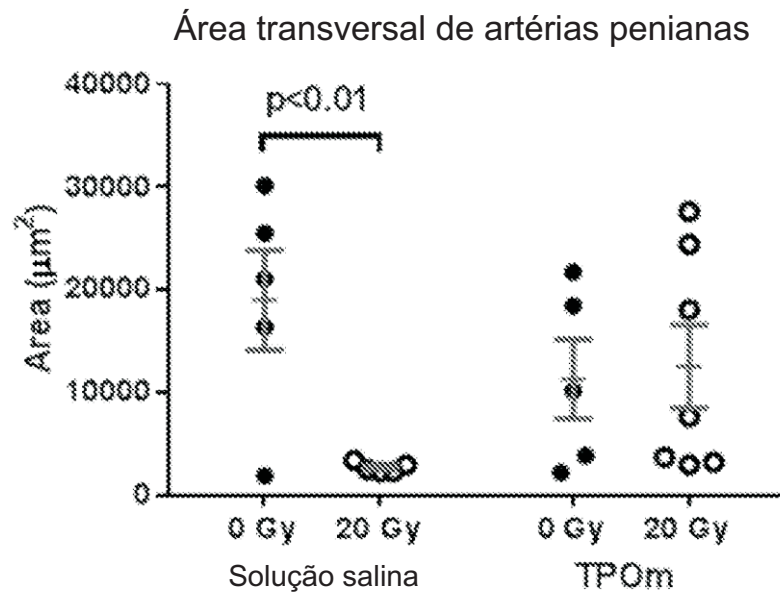


FIG. 3B

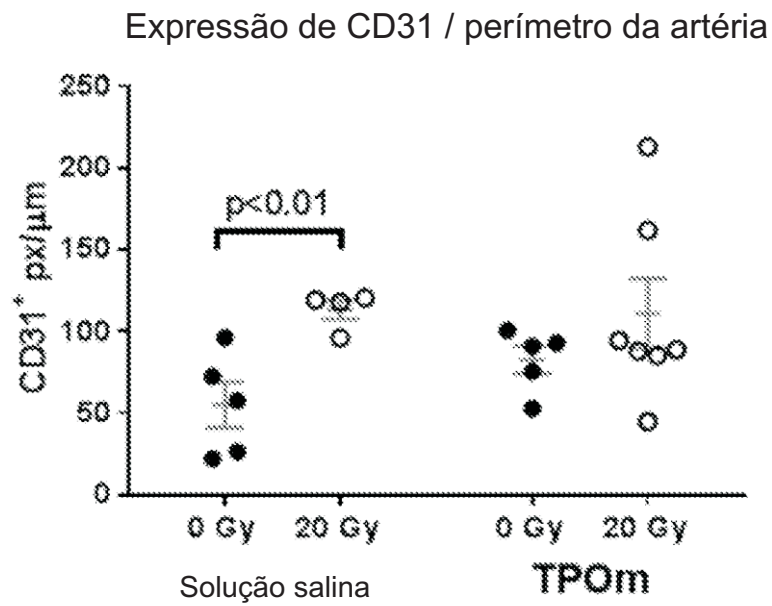


FIG. 3C

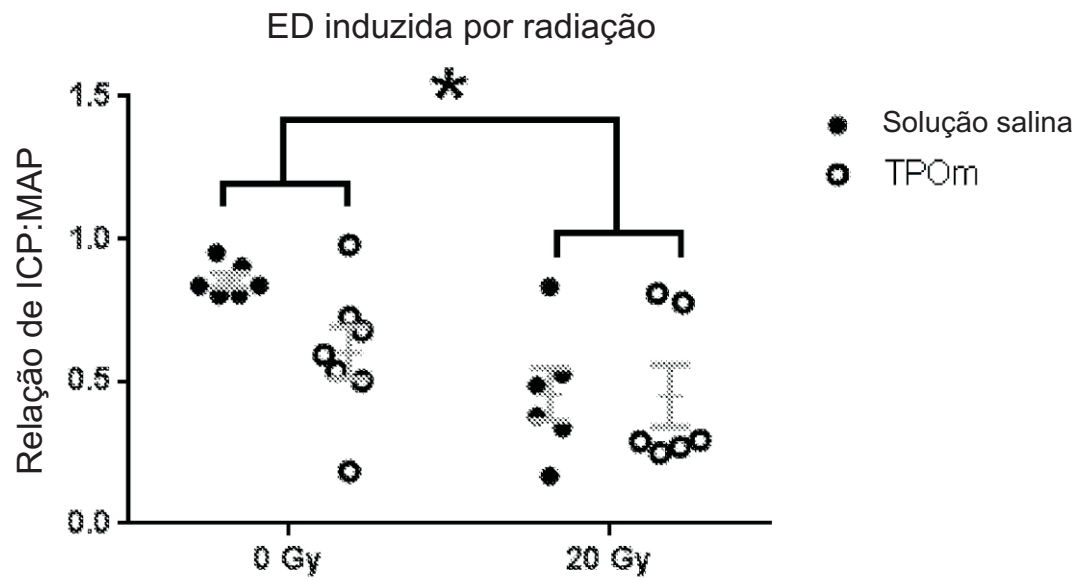


FIG. 4

t = 150 segundos

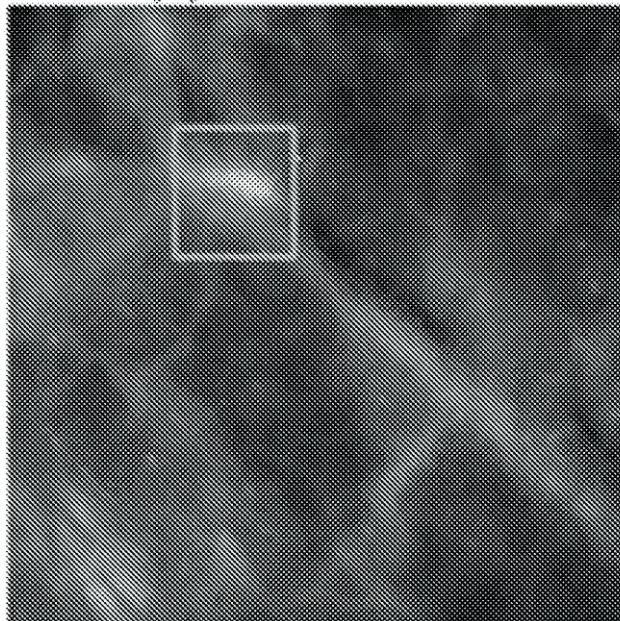


FIG. 5A

ROI vascular



FIG. 5B

t = 1500 segundos

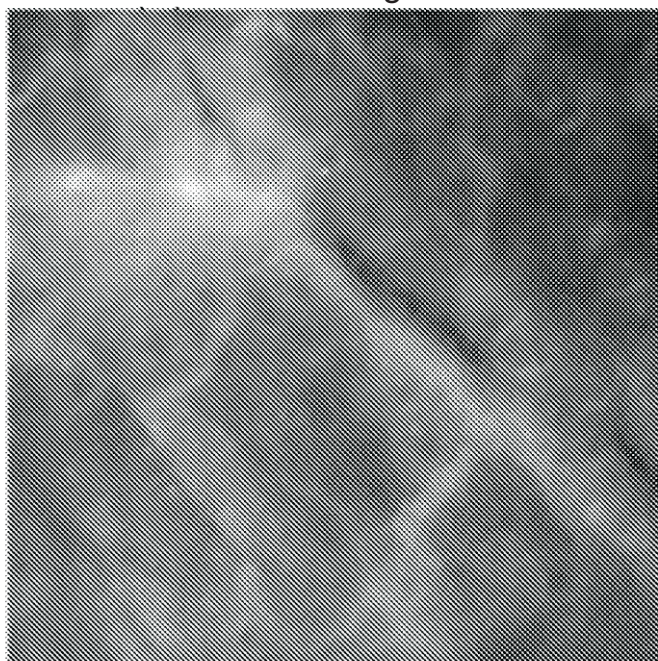


FIG. 5C

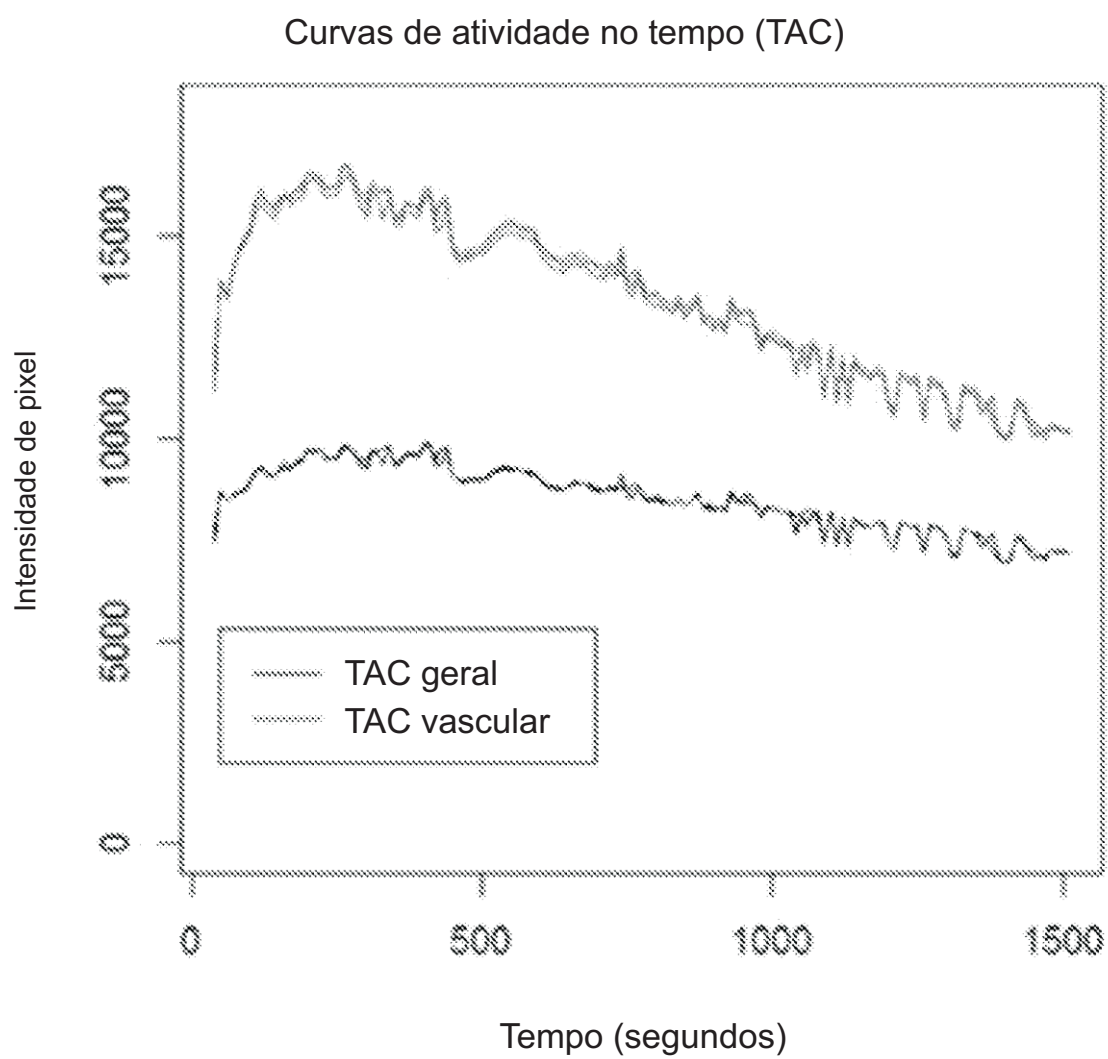
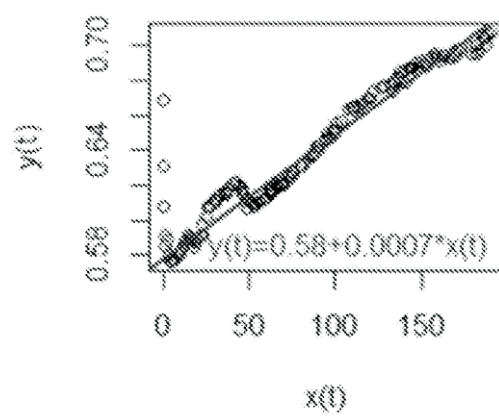
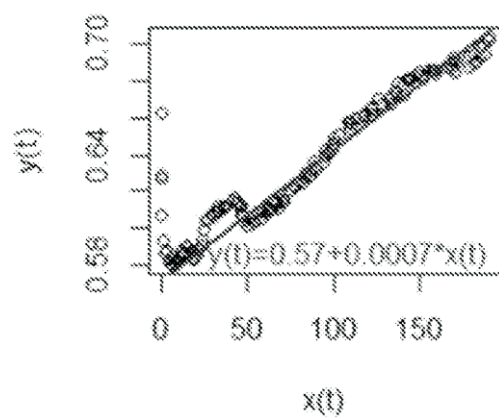


FIG. 5D

Fatia 1



Fatia 2



Fatia 3

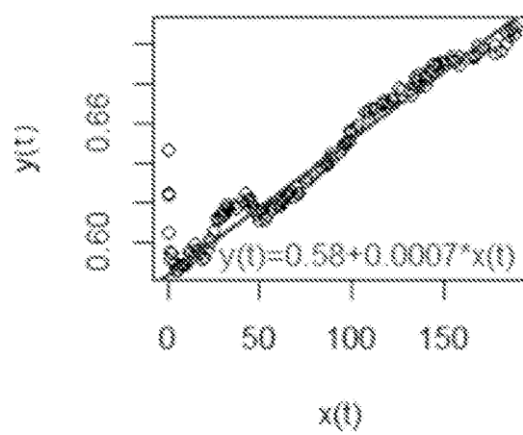


FIG. 6

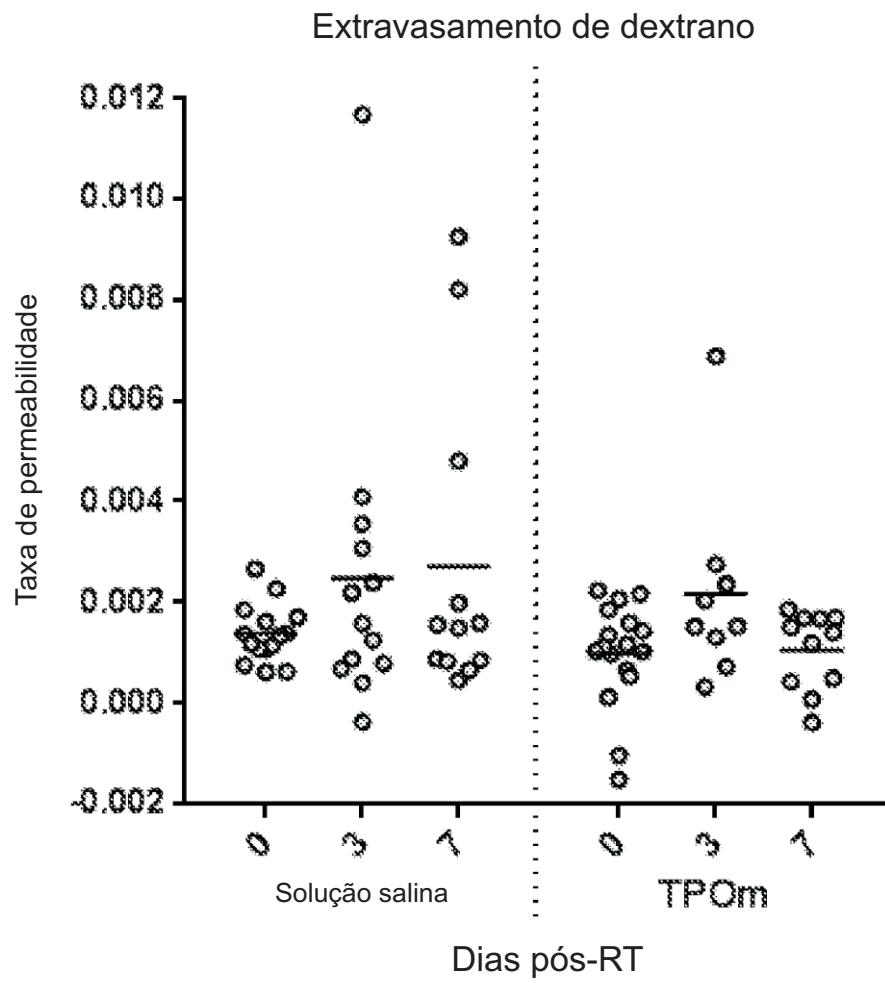
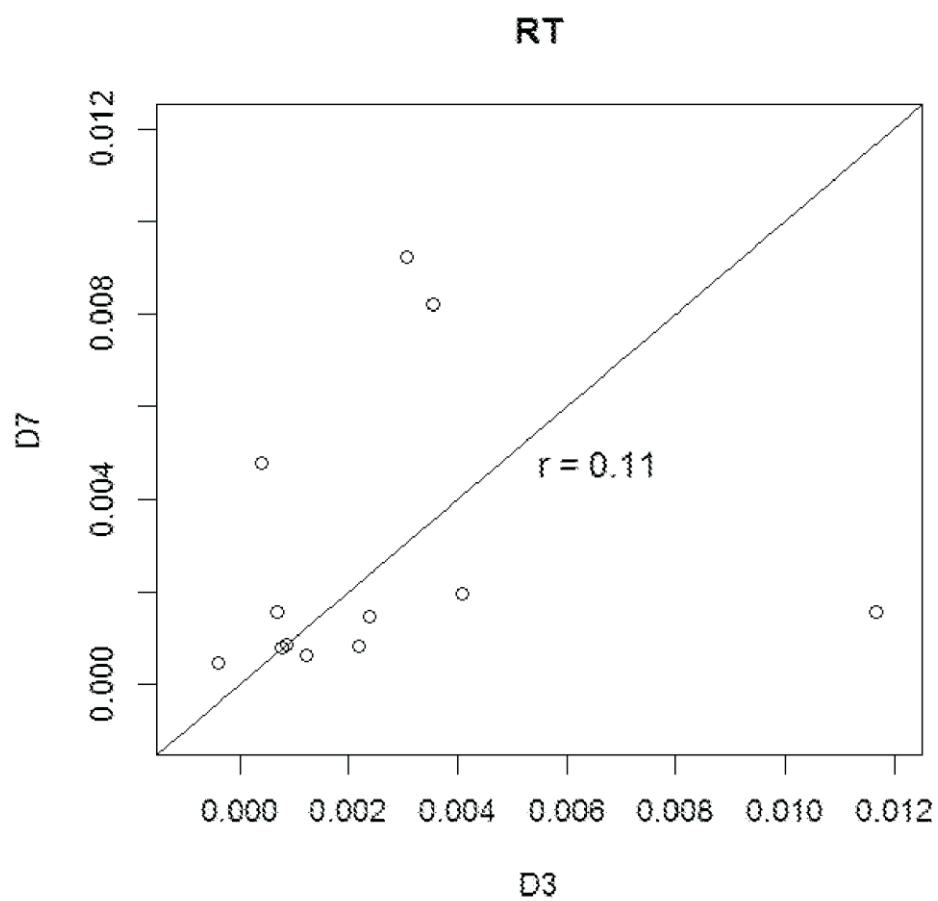


FIG. 7

**FIG. 8**

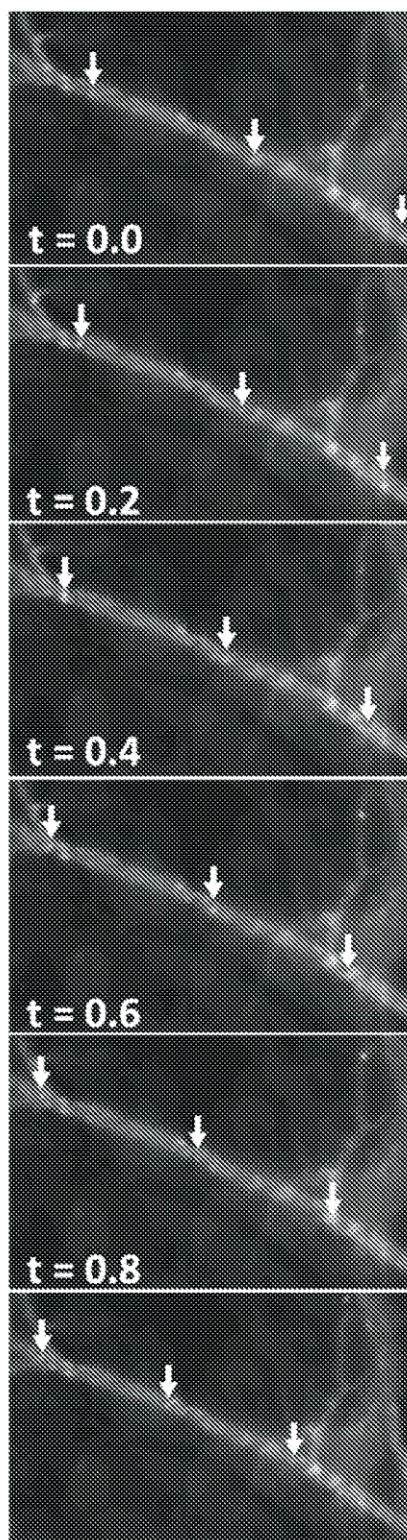


FIG. 9A

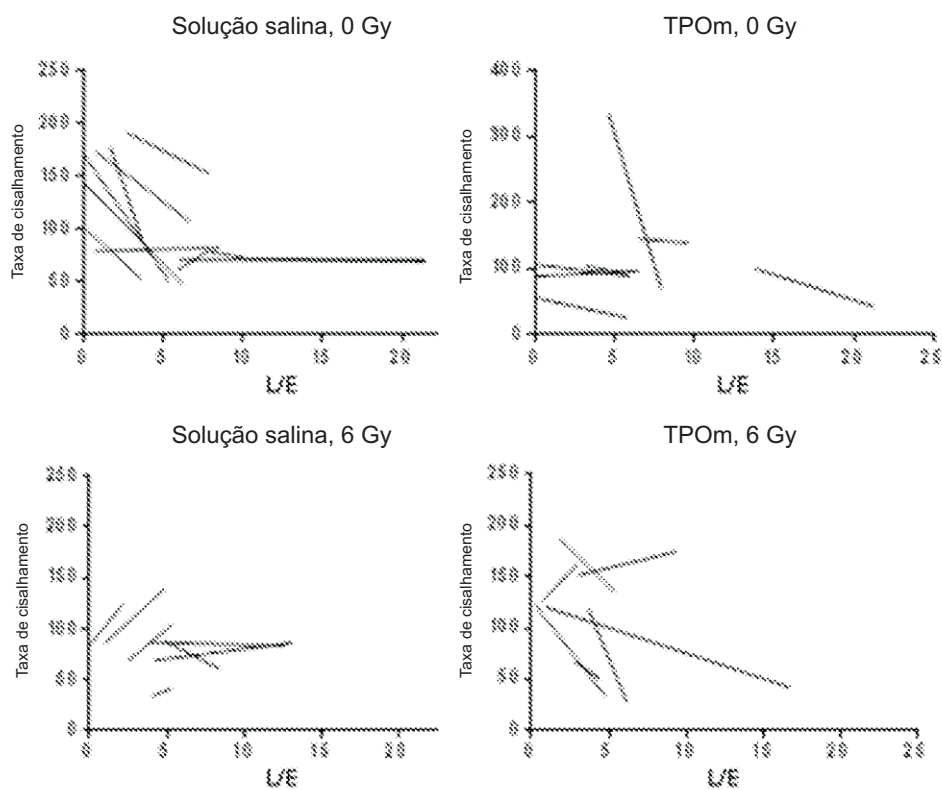


FIG. 9B

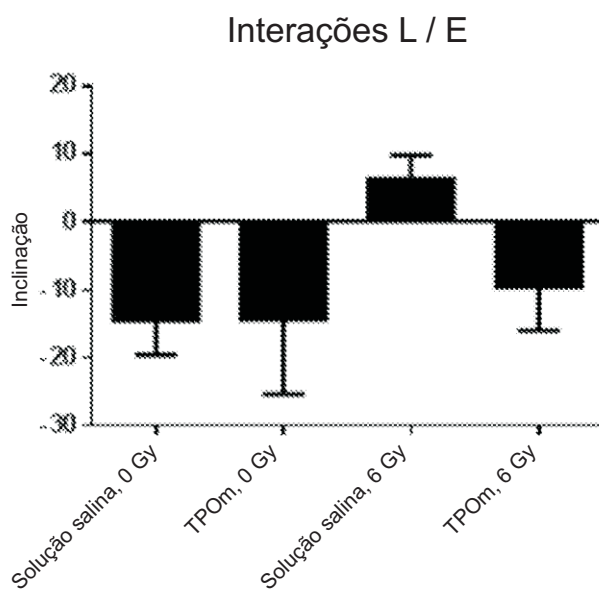


FIG. 9C

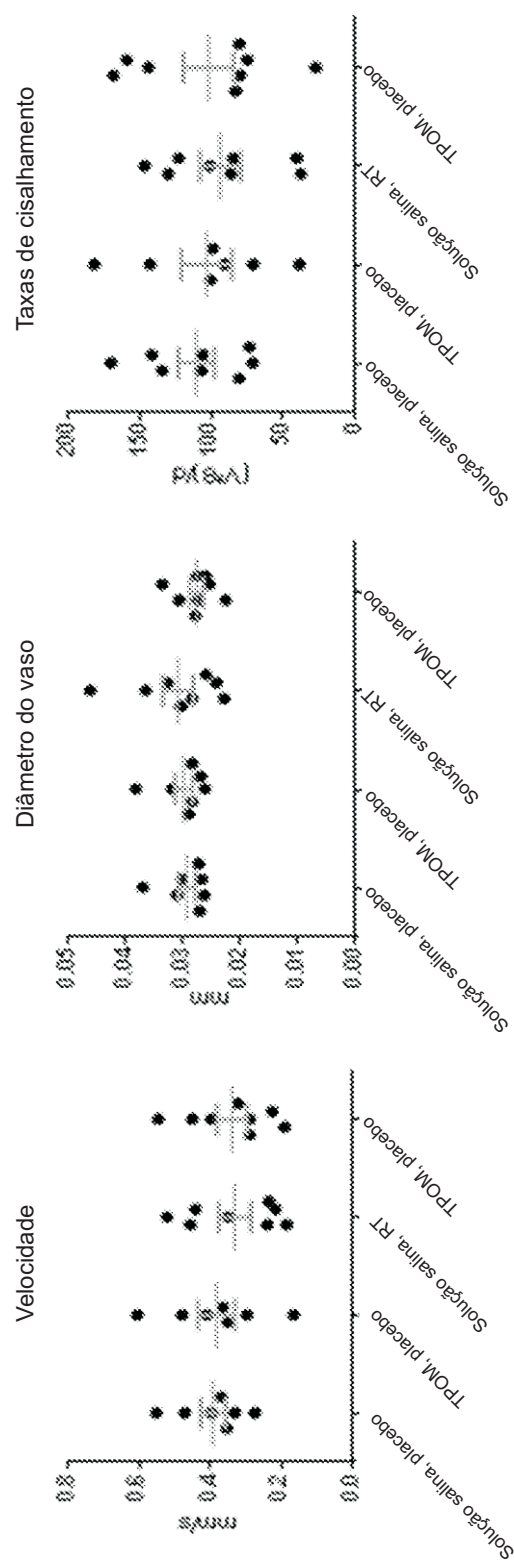


FIG. 10

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS DE PROTEÇÃO DA INTEGRIDADE VASCULAR INDUZIDA POR TERAPIA DE RADIAÇÃO DIRECIONADA"**.

A presente invenção refere-se a métodos de proteção da integridade vascular em um indivíduo exposto a uma terapia de radiação direcionada. Em particular, uma quantidade eficaz de um mimético de trombopoietina (TPO), tal como TPOm, é usada para proteger a integridade vascular após a terapia de radiação.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA P245070.TXT
- Data de Geração do Código: 22/01/2020
- Hora de Geração do Código: 14:23:37
- Código de Controle:
 - Campo 1: 43D2EB2DF74FD2FE
 - Campo 2: 399F99128855EC75