



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

(21) BR 112017003529-4 A2



(22) Data do Depósito: 24/08/2015

(43) Data da Publicação Nacional: 25/02/2016

(54) Título: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAR DISTÚRBIOS VISUAIS.

(51) Int. Cl.: A61K 31/56.

(30) Prioridade Unionista: 17/07/2015 US 62/194,120; 22/08/2014 US 62/040,721.

(71) Depositante(es): GUANGZHOU KANGRUI BIOLOGICAL PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO., LTD.; THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA.

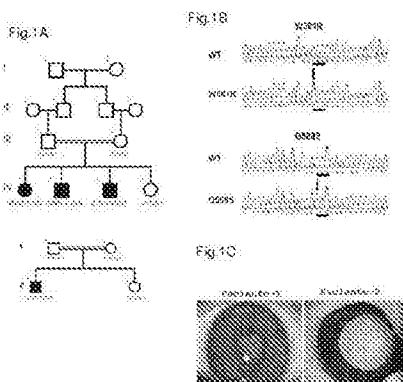
(72) Inventor(es): KANG ZHANG; RUI HOU; HUIMIN CAI.

(86) Pedido PCT: PCT US2015046453 de 24/08/2015

(87) Publicação PCT: WO 2016/029199 de 25/02/2016

(85) Data da Fase Nacional: 21/02/2017

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAR DISTÚRBIOS VISUAIS A presente invenção fornece esteróis e usos dos mesmos para o tratamento de distúrbios visuais. Em uma modalidade, a composição compreendendo quantidade farmaceuticamente eficaz de lanosterol é usada para o tratamento e/ou prevenção de distúrbios visuais em um indivíduo. Em uma outra modalidade, a composição compreendendo quantidade farmaceuticamente eficaz de lanosterol é usada para o tratamento de catarata ou cegueira/deficiência visual em um indivíduo. Ainda em uma outra modalidade, a composição compreendendo lanosterol é usada para dissolver fibrilas tipo amiloide de proteínas cristalinas.



## **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAR DISTÚRBIOS VISUAIS**

### **REFERÊNCIA REMISSIVA A PEDIDOS RELACIONADOS**

[001] Este pedido reivindica o benefício da prioridade do Pedido Provisório U.S. Número 62/040,721, depositado em 22 de agosto de 2014, e o Pedido Provisório U.S. Número 62/194,120, depositado em 17 de julho de 2015, o conteúdo dos quais são incorporados no presente documento por referência em sua totalidade.

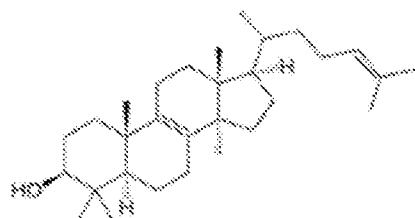
### **CAMPO DA INVENÇÃO**

[002] A divulgação se refere, em geral, a esteróis e usos dos mesmos para tratar distúrbios visuais que afetam a função normal das lentes no olho de um indivíduo apresentando ou em risco de desenvolver tais distúrbios visuais.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

[003] A invenção fornece um método de tratamento ou prevenção de distúrbios visuais, o método compreendendo a administração a um indivíduo em necessidade deste de uma quantidade eficaz de um lanosterol; e um pró-fármaco ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[004] A invenção também fornece uma composição farmacêutica oftalmica compreendendo um veículo oftalmico farmaceuticamente aceitável e lanosterol com a estrutura da fórmula I:



e um pró-fármaco ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[005] Em diversos aspectos do método, o distúrbio visual

é um distúrbio do olho que afeta a função, clareza e/ou estrutura das lentes do olho. Tais doenças visuais incluem, porém não se limitam a, cataratas do olho, presbiopia do olho e esclerose nuclear da lente do olho. Adicionalmente, os distúrbios visuais se referem à degeneração da retina, tais como doença de Refsum, síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS) e distrofia da córnea cristalina de Schnyder (SCCD), abetalipoproteinemia e hipobetalipoproteinemia familiar.

[006] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um método de melhoramento de pelo menos um sintoma associado ao distúrbio visual pela administração a um indivíduo de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um esterol de fórmula 1. Em diversos aspectos do método, a composição é administrada topicalmente, subconjuntivamente, retrobulbarmente, periocularmente, subretinamente, via supracoroidal ou intraocularmente. Indivíduos que recebem o esterol da invenção podem incluir, porém não se limitam a mamíferos, aves, anfíbios, répteis e outros vertebrados. Em uma modalidade, os indivíduos são cavalos, porcos, cachorros, gatos, roedores e/ou outros animais de estimação de companhia. Em uma outra modalidade, os indivíduos são humanos.

[007] Em uma modalidade, a presente invenção se refere a uma composição oftálmica farmacêutica compreendendo o esterol da invenção em um veículo oftálmico farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica compreende lanosterol ou derivados do mesmo em um veículo oftálmico farmaceuticamente aceitável. Em determinadas modalidades da invenção, o veículo farmaceuticamente aceitável é água, um tampão ou uma

solução de cloreto de sódio. Em algumas modalidades, o veículo farmaceuticamente aceitável é estéril. Em outras modalidades, o veículo farmacêutico é uma pomada. Ainda em outras modalidades, o veículo farmaceuticamente aceitável é um gel. Géis podem ser formulados usando materiais de formulação de géis que são bem conhecidos no estado da técnica, incluindo, porém não limitado a, carboximetilcelulose de alta viscosidade, hidroxipropilmetylcelulose, óxido de polietileno e carbômero. Em alguns aspectos da composição, o veículo oftálmico farmaceuticamente aceitável é uma ciclodextrina. Em uma modalidade, a ciclodextrina é (2-hidróxipropil)- $\beta$ -ciclodextrina.

[008] Determinadas modalidades da invenção também contemplam kits que compreendem componentes úteis para o tratamento e/ou prevenção de um sintoma associado a um distúrbio visual. Tais kits compreendem um recipiente compreendendo o esterol da invenção em um veículo farmaceuticamente aceitável e instruções para a administração do esterol da invenção de modo melhorar ou evitar pelo menos um sintoma associado ao distúrbio visual. Tal distúrbio visual inclui, porém não se limita a, cataratas, presbiopia e esclerose nuclear das lentes do olho. Adicionalmente, distúrbios visuais se referem a degeneração da retina, tais como doença de Refsum, síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS) e distrofia da córnea cristalina de Schnyder (SCCD), abetalipoproteinemia e hipobetalipoproteinemia familiar. Os recipientes incluídos em alguns dos kits contemplados no presente documento são conta-gotas para a administração de colírios. Em outras

modalidades, o recipiente é um tubo para a dispensação de pomada ou gel. Ainda em outras modalidades, o recipiente é qualquer recipiente apropriado para a distribuição do fármaco, incluindo, porém não limitado a, uma seringa ou outro recipiente para a distribuição de um fármaco via oftálmica ou aplicação tópica.

[009] Em outros aspectos, a invenção fornece um método para a inibição ou prevenção da agregação de proteínas. Em diversos aspectos do método, a proteína é uma proteína formadora de amiloide ou uma proteína subjacente a uma doença de perda de função. Em alguns aspectos, a proteína formadora de amiloide é selecionada do grupo que consiste em Hsp27,  $\alpha$ A-cristalina,  $\alpha$ B-cristalina,  $\beta$ B2-cristalina,  $\beta$ BI-cristalina,  $\gamma$ D-cristalina, Hsp22, Hsp20, tau, Alfa-sinucleína, IAPP, beta-amiloide, PrP, Huntingtina, Calcitonina, Fator natriurético atrial, Apolipoproteína AI, Amiloide A sérica, Medina, Prolactina, Transtirretina, Lisozima, Microglobulina beta 2, Gelsolina, Queratoepitelina, Cistatina, Imunoglobulina de cadeia leve AL e S-IBM. Em outros aspectos, a proteína subjacente a uma doença de perda de função é selecionada do grupo que consiste em  $\beta$ -glicosidase mutante, receptor transmembrana de fibrose cística, hexosaminidase A, hexosaminidase B,  $\beta$ -galactosidase e alfa-glicosidase.

[0010] Outras características e vantagens da presente divulgação se tornarão aparentes a partir da descrição detalhada que segue. Deve ser entendido, no entanto, que a descrição detalhada e os exemplos específicos, enquanto indicam modalidades específicas da descrição, são fornecidos apenas a título de ilustração, devido a diversas mudanças e

modificações dentro do espírito e escopo da divulgação tornarem-se aparentes para aqueles com habilidade na técnica a partir desta descrição detalhada. O documento completo tem a intenção de ser relacionado como uma divulgação unificada e deve ser entendido que todas as combinações de características descritas no presente documento estão contempladas, mesmo se a combinação de características não seja encontrada juntas na mesma sentença ou parágrafo ou seção deste documento. Adicionalmente ao acima, a invenção inclui, como um aspecto adicional, todas as modalidades da invenção de forma mais limitada em escopo de qualquer maneira que as variações especificamente mencionadas acima. Por exemplo, se os aspectos da invenção são descritos como "compreendendo" uma característica, modalidades também são contempladas "consistindo em" e "consistindo essencialmente em" da característica.

[0011] Em uma modalidade, esta invenção divulga o uso de uma composição para o preparo de um medicamento para tratar e/ou prevenir distúrbios visuais em um indivíduo, a referida composição compreendendo um veículo oftálmico farmaceuticamente aceitável e uma quantidade farmaceuticamente aceitável de lanosterol. Referido indivíduo apresentando ou em risco de desenvolver um distúrbio visual que afeta a estrutura normal das lentes no olho. O referido indivíduo pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em anfíbios, répteis, aves e mamíferos: em que o referido mamífero pode ser selecionado do grupo que consiste em roedores, gatos, cachorros, porcos, cavalos e humanos. Em uma outra modalidade, o referido distúrbio visual é selecionado a partir do grupo que consiste em catarata,

cataratas congênitas, opacidade cortical, catarata subcapsular posterior, presbiopia, esclerose nuclear, distúrbio degenerativo da retina, doença de Refsum, síndrome de Smith-Lemli-Opitz, distrofia da córnea cristalina de Schnyder, drusas, degeneração macular associada à idade, e retinopatia diabética, e lanosterol inibe a agregação das proteínas cristalinas.

[0012] Ainda em uma outra modalidade, esta invenção divulga o uso de uma composição para o preparo de um medicamento para o tratamento de catarata ou cegueira/deficiência visual em um indivíduo, a referida composição compreende um veículo oftálmico farmaceuticamente aceitável e uma quantidade farmaceuticamente aceitável de lanosterol, em que o referido lanosterol dissolve agregado(s) das proteínas cristalinas na lente no olho do referido indivíduo; em que a proteína cristalina da lente é qualquer uma de  $\alpha$ -cristalina,  $\beta$ -cristalina ou  $\gamma$ -cristalina. A composição acima mencionada pode ser formulada como uma solução oftálmica, uma pomada oftálmica, uma lavagem oftálmica, uma solução de infusão intraocular, uma lavagem para câmara anterior, um medicamento interno, uma injeção ou conservante para córnea extraída.

[0013] Ainda em uma outra modalidade, esta invenção divulga um método para dissolver fibrilas tipo amiloide de proteínas cristalinas, compreendendo a etapa de colocar em contato as fibrilas tipo amiloide com o lanosterol em uma quantidade e duração suficientes de modo a dissolver as fibrilas tipo amiloide de proteínas cristalinas, em que o método pode ser executado *in situ*, *in vitro* ou *in vivo*. O método pode ser executado em um indivíduo selecionado a

partir do grupo que consiste em anfíbios, répteis, aves e mamíferos; em que o referido mamífero pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em roedores, gatos, cachorros, porcos, cavalos e humanos.

[0014] Em uma outra modalidade, esta invenção divulga um kit para o tratamento e/ou prevenção de distúrbios visuais que afetam a estrutura normal do olho em um indivíduo, compreendendo uma formulação de uma quantidade farmaceuticamente aceitável de lanosterol, um veículo farmaceuticamente aceitável e instruções para a administração da referida formulação de modo que a referida administração trata e/ou previne o referido distúrbio visual. Ainda em uma outra modalidade, esta invenção divulga uma composição oftálmica farmacêutica aceitável para tratar e/ou prevenir distúrbios visuais em um indivíduo, a referida composição compreende um veículo oftálmico farmaceuticamente aceitável e uma quantidade farmaceuticamente eficaz de lanosterol; em que a referida composição pode ser formulada como uma solução oftálmica, uma pomada oftálmica, uma lavagem oftálmica, uma solução de infusão intraocular, uma lavagem para câmara anterior, um medicamento interno, uma injeção ou conservante para córnea extraída.

[0015] Em uma outra modalidade, esta invenção divulga um método para a identificação e/ou tratamento de um indivíduo em risco de desenvolver catarata ou cegueira/deficiência visual associada à formação de agregado(s) das proteínas cristalinas da lente em um olho, compreendendo: a) testar a quantidade de atividade de lanosterol sintase no indivíduo; b) determinar se a quantidade de atividade de lanosterol sintase é inferior àquela da população controle sem catarata

ou cegueira/deficiência visual, em que uma quantidade de atividade de lanosterol sintase inferior àquela da população controle é um indicativo de risco mais alto de desenvolver catarata ou cegueira/deficiência visual associada à formação de agregado(s) das proteínas cristalinas da lente; e c) tratar o indivíduo com lanosterol em uma quantidade e duração eficazes de modo a prevenir ou reverter a formação de agregado(s) das proteínas cristalinas da lente em um olho do indivíduo, assim identificando e tratando o indivíduo em risco de desenvolvimento de catarata ou cegueira/deficiência visual associada à formação de agregado(s) de proteína cristalina da lente no olho do indivíduo.

[0016] Em uma outra modalidade, esta invenção divulga um método de identificação e/ou tratamento de um indivíduo em risco de desenvolver catarata ou cegueira/deficiência visual associada à formação de agregado(s) das proteínas cristalinas da lente em um olho do indivíduo, compreendendo:  
a) determinar se ambos os alelos do gene do lanosterol sintase são afetados com uma mutação a qual diminui a expressão ou atividade da lanosterol sintase, em que a presença de uma mutação em ambos os alelos da lanosterol sintase aumentam o risco de desenvolver catarata ou cegueira/deficiência visual associada à formação de agregado(s) das proteínas cristalinas da lente em um olho de um indivíduo; e b) tratar o indivíduo com lanosterol em uma quantidade e duração eficazes de modo a prevenir ou reverter a formação de agregado(s) das proteínas cristalinas da lente em um olho do indivíduo, assim identificando e tratando o indivíduo em risco de desenvolver catarata ou cegueira/deficiência visual associada à formação de

agregado(s) das proteínas cristalinas da lente no olho do indivíduo. Em uma modalidade, a mutação no gene da lanosterol sintase está no códon 581 pela troca do triptofano (W) por arginina (R) ou no códon 588 pela troca da glicina (G) por serina (S).

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0017] A **Figura 1** mostra a identificação de mutações no LSS causando cataratas congênitas. Figura 1A, Pedigrees de famílias afetadas e fenótipo de catarata. Quadrados e círculos indicam machos e fêmeas, respectivamente. 1, alelo tipo selvagem; W581R e G588S são as duas mutações. Figura 1B, Painel superior, dados da sequência de DNA de um indivíduo não afetado e uma criança afetada (II-1) com uma mutação homozigota W581R; painel inferior, dados da sequência de DNA de um indivíduo não afetado e uma criança afetada (IV-1) com uma mutação homozigota G588S. A sequência sublinhada indica a modificação do ácido nucleico. Figura 1C, Esquerda, fotografia colorida do olho direito do paciente 1 no primeiro pedigree (IV-1) com uma catarata total; direita, fotografia colorida do olho direito do paciente 2 no mesmo pedigree (IV-3) com uma catarata.

[0018] A **Figura 2** mostra mutações de LSS suprimindo a função enzimática da ciclase. Figura 2A, Conservação de W581R e G588 em LSS sobre diversas espécies: *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Bos taurus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus* e *Danio rerio*. Figura 2B, modelagem computacional da estrutura de LSS e impacto das mutações LSS W581R e G588S. Uma análise de modelagem computacional identifica um giro que se origina de C584 e termina em E578 com a cadeia lateral chave do W581 na extremidade do giro,

estabilizando o esterol. O giro está fixado por uma ponte S-S e uma ponte no sal E578-R639. O nitrogênio N da amida de G588 interage com o C584 a partir do giro prévio da hélice e o hidrogênio do Ca do G588 está em proximidade perto ao E578 crítico, o qual, então, forma uma forte ponte de sal com R639 da mesma hélice suporte. A mutação G588S faz com que a cadeia lateral da serina se choque dentro do resíduo E578 do giro e é incompatível com a estrutura. A seta indica a localização da cadeia lateral do mutante. Figura 2C, Efeito da expressão modificada da proteína tipo selvagem (WT LSS) e mutantes LSS em teor de esterol. LSS do tipo selvagem aumentou marcadamente a produção de lanosterol, em que nem o mutante W581R nem o G588S exibiram qualquer atividade de ciclase. n = 3 em cada grupo; \*\*\* P < 0,001.

[0019] A **Figura 3** mostra a agregação intracelular reduzida do lanosterol de diversas proteínas cristalinas mutantes. Figura 3A, Imagens confocais de agregados de proteínas cristalinas em células progenitoras de lentes humanas. O mutante causador da catarata Y118D de  $\alpha$ A-cristalina formada por agressomas ou corpos de inclusão intracelular p62 positivo. Verde, proteínas cristalinas eGFP; vermelho, p62; azul, núcleos. Células transfectadas com peGFP-N1 foram usadas como um controle. Figura 3B, Imagens confocais do efeito inibitório do LSS em agregados cristalinos. Figura 3C, Inibição da agregação cristalina mutante pelo LSS do tipo selvagem (WT LSS) e lanosterol, porém não LSS mutante ou colesterol. Figura 3D, Aumento da proteína mutante solúvel  $\alpha$ A-cristalina (Y118D) pela co-expressão do LSS do tipo selvagem porém não mutantes LSS (Y118D co-expresso com pCDNA3.1-N-Flag foi usado como um

controle). A análise quantitativa foi executada usando densitometria de proteínas cristalinas por análise de western blot do sobrenadante ou fração insolúvel de lisados celulares.  $n = 3$  em cada grupo; análise de western blot representativa é mostrada na Figura 9C; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ . Figura 3E, Imagens confocais da redissolução dos agregados cristalinos pré-formados por lanosterol. Figura 3F, Lanosterol reduziu significativamente a agregação intracelular por diversas proteínas cristalinas mutantes que causam catarata de uma maneira dependente da concentração ( $n = 3$ ,  $P < 1 \times 10^{-4}$ ). O colesterol não reduziu a agregação intracelular ( $n = 3$ ,  $P > 0,1$ ). Figura 3G, Lanosterol aumentou as frações solúveis de diversos mutantes de cristalina em células progenitoras de lentes humanas.  $n = 3$ ;  $P < 0,001$ . Figura 3H, Efeitos do DMSO, colesterol ou lanosterol em agregados  $\alpha$ A-cristalina Y118D em células progenitoras de lentes humanas por imagens de células vivas em série. Figura 3I, Efeito do lanosterol na dissolução de agregados cristalinos intracelulares ao longo do tempo ( $n = 22$  a partir de 3 replicatas biológicas). Os valores de média  $\pm$  desvio padrão são mostradas como símbolos pretos. Os dados são mais bem encaixados pelo processo de decaimento exponencial único (linha vermelha).

[0020] A **Figura 4** mostra fibrilas tipo amiloide de proteínas cristalinas pré-formadas por lanosterol redissolvido. Figura 4A, fotografias negativamente coradas por TEM de agregados de proteínas mutantes  $\alpha$ A-cristalinas tratadas por um veículo lipossoma, colesterol ou lanosterol em lipossomos. Imagens na coluna direita do grupo do lanosterol mostram uma ampliação de 5X da imagem na sua

direita. Figura 4B, Efeito do lanosterol na re-dissolução de agregados cristalinos por fluorescência de ThT ( $n = 3$ ). Figura 4B (i), mutantes b/gama-cristalina; Figura 4B (ii), mutantes a-cristalina. Cada barra resulta de três amostras independentes.

[0021] A **Figura 5** mostra a severidade da catarata reduzida com lanosterol e aumento da clareza. Figura 5A, Fotografias de lentes de coelhos com catarata tratadas com lanosterol mostrando aumento da clareza das lentes. Figura 5A(i), esquerda, antes do tratamento; Figura 5A(ii), direita, após o tratamento. Figura 5B, Boxplot da quantificação do efeito do tratamento do lanosterol ( $n = 13$ ). Figura 5C, Fotografias de lentes de cachorros com catarata tratadas com lanosterol mostrando aumento da clareza das lentes. Figura 5C(i), esquerda, antes do tratamento; Figura 5C(ii), direita, após o tratamento, d, Boxplot da quantificação do efeito do tratamento do lanosterol ( $n = 7$ ). Faixa, mediana (linha horizontal) e media (círculo) são apresentados. Cruzes indicam os graus máximo e mínimo de catarata medidos. Capilares indicam o desvio padrão e a caixa abrange um intervalo de confiança de 40%.

[0022] A **Figura 6A** mostra plots do mapeador de homozigosidade da homozigosidade de todo o genoma como gráficos de barras. Para enfatizar as regiões de interesse, qualquer pontuação superior a 80% da pontuação máxima atingida neste projeto é colorida em vermelho. A **Figura 6B** mostra que as pontuações de homozigosidade foram plotadas contra a posição física no cromossomo 21, que contém o gene *LSS*. As barras vermelhas indicam regiões com pontuações mais altas. O lado direito do cromossomo contém uma longa região

homozigótica contínua, onde o gene *LSS* está localizado.

[0023] A **Figura 7** mostra imagens confocais representativas de células co-transfetadas com Flag-LSS e eGFP. As células progenitoras de lentes humanas foram co-transfetadas tanto com o gene *LSS* do tipo selvagem ou o mutado e o gene *eGFP* durante 4 h e cultivadas durante 16 h em meio de cultura fresco. A distribuição celular de LSS foi então visualizada utilizando um anticorpo anti-Flag (roxo). A distribuição de eGFP (verde) foi utilizada como um controle. Os núcleos foram corados e visualizados por Hoechst 33342 (azul).

[0024] A **Figura 8** mostra imagens confocais representativas de células co-transfetadas com LSS e vários mutantes de cristalina causadoras de catarata. Figura 8A, mutante R116C de  $\alpha$ A-cristalina. Figura 8B, mutante R120G de  $\alpha$ B-cristalina. Figura 8C, mutante V187E de  $\beta$ B2-cristalina. Figura 8D, mutante G129C de  $\gamma$ C-cristalina. Figura 8AE, mutante W43R de  $\gamma$ D-cristalina. Células progenitoras de lentes humanas foram co-transfetadas ou com o gene Flag-LSS do tipo selvagem ou o mutado e o gene mutante de GFP-cristalina durante 4 h e cultivadas durante 16 h em meio de cultura fresco. Todos os mutantes de cristalina formaram agregados p62-positivos, como indicado pela co-localização dos mutantes de cristalina e p62. As células co-transfetadas com GFP-cristalina e pcDNA3.1-N-Flag foram utilizadas como controles. A formação de agregados intracelulares de várias proteínas cristalinas foi visualizada por fluorescência de GFP (verde). Detectou-se LSS do tipo selvagem ou mutado com um anticorpo anti-Flag (vermelho), p62 foi corado utilizando um anticorpo anti-p62, enquanto os núcleos foram corados e

visualizados por coloração com Hoechst 33342 (azul). A análise quantitativa de células com agregados está resumida na Figura 3C.

[0025] A **Figura 9** mostra a inibição da agregação cristalina mutante por LSS do tipo selvagem e lanosterol em células HLEB-3 (Figura 9A) ou células HeLa (Figura 9B). As células co-transfetadas com constructos mutantes LSS e cristalina foram cultivadas durante 24 h antes do ensaio para agregados. As experiências de resgate foram realizadas pela adição de 40 $\mu$ M de esteróis (lanosterol ou colesterol) ao meio de cultura celular durante 2 h, o meio esterol foi então substituído por meio de cultura fresco e as células foram cultivadas por mais 12 h. A porcentagem de células com agregados cristalinos foi calculada a partir de dez campos de visualização selecionados aleatoriamente. Os valores do grupo LSS do tipo selvagem, grupo mutante ou grupo mutante mais lanosterol foram calculados. Os agregados foram significativamente menores nos grupos LSS do tipo selvagem e lanosterol comparados ao grupo controle ( $P < 1 \times 10^{-4}$ ), enquanto os agregados nos grupos mutantes LSS ou colesterol não apresentaram diferença para o grupo controle ( $P > 0,1$ ). Figura 9C, as células progenitoras de lentes humanas foram co-transfetadas com LSS do tipo selvagem ou mutante mais  $\alpha$ A-cristalina (Y118D). A  $\alpha$ A-cristalina (Y118D) co-expresa com pcDNA3.1-N-Flag foi utilizada como um controle. Após transfeção durante 4 h e incubação em meio de cultura fresco por mais 24 h, as células foram lisadas e centrifugadas para separar as frações insolúvel e sobrenadante. As proteínas de fusão LSS e cristalina foram detectadas por anticorpos contra Flag e GFP, respectivamente. As setas vermelhas indicam maior

teor de cristalina na fração solúvel versus na fração insolúvel em células contendo o WT-LSS. Os dados foram quantificados a partir de três experimentos independentes e resumidos na Figura 3D.

[0026] A **Figura 10** mostra que o lanosterol reduziu significativamente a agregação intracelular causada por várias proteínas cristalinas mutantes causadoras de catarata de uma maneira dependente da concentração quando testado em células HLEB-3 ou HeLa. Figura 10A, imagens confocais representativas de células HLEB-3 transfectadas com várias cristalinas mutantes causadoras de catarata. A Figura 10B, imagens confocais representativas de células HeLa transfectadas com várias cristalinas mutantes causadoras de catarata. As células foram transfectadas com vários constructos de cristalina durante 4 h e cultivadas por mais 24 h em meio de cultura fresco. Em seguida, as células foram tratadas com 10, 20 e 40  $\mu$ M de lanosterol em 1% (células HLEB-3) ou 2% (células HeLa) de DMSO durante 2 horas e cultivadas por mais 12 h. As células tratadas com 1% (células HLEB-3) ou 2% (células HeLa) de DMSO foram utilizadas como controles. A formação de agregados intracelulares de várias proteínas cristalinas foi visualizada por fluorescência de GFP (verde) e os núcleos foram corados com Hoechst 33342 (azul). Os agregados intracelulares típicos são indicados por setas. Figura 10C, Dependência de concentração dos efeitos de agregação-dissolução do lanosterol quando ensaiado em células HLEB-3. Figura 10D, Dependência de concentração dos efeitos de agregação-dissolução de lanosterol quando ensaiados em células HeLa.

[0027] A **Figura 11** mostra que o tratamento com

lanosterol, mas não de colesterol, aumentou as cristalinas mutantes causadoras de catarata em frações solúveis quando comparado a um grupo controle ou a um grupo LSS mutante. Figura 11A, Células progenitoras de lentes humanas foram transfectadas com genes de cristalina mutante durante 4 h e, depois, incubadas em meio de cultura fresco por mais 24 h. As células foram colhidas e lisadas. As frações insolúvel e sobrenadante foram separadas por centrifugação e analisadas por análise de western blot. As proteínas de fusão LSS e cristalina foram identificadas por anticorpos contra marcações Flag e GFP, respectivamente. O grupo tratado com lanosterol é destacado por caixas vermelhas. As células tratadas com 1% de DMSO foram utilizadas como um controle. A  $\beta$ -actina foi utilizada como um controle de carga de proteína interna de lisados celulares totais (TCL). S, sobrenadante; P, fração insolúvel. Figura 11B, Efeito do DMSO ( $n = 4$ ) e colesterol ( $n = 7$ ) sobre as alterações de tamanho de agregados de  $\alpha$ A-cristalina (Y118D) em células progenitoras de lentes humanas avaliadas pelo rastreamento de uma única partícula em imagens de células vivas. Figura 11C, Avaliação do efeito do lanosterol sobre a dissolução de agregados cristalininos por turbidez. Os agregados cristalininos foram formados por incubação de solução de proteína de  $5 \text{ mg ml}^{-1}$  a  $60^\circ\text{C}$  durante 2 h ( $\alpha$ -cristalinas) ou  $37^\circ\text{C}$  durante 48 h ( $\beta$ - e  $\gamma$ -cristalinas) na presença de 1 M cloreto de guanidina. Os agregados pré-formados foram ressuspensos em PBS em uma concentração final de proteína de  $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$  e foram tratados com  $500 \mu\text{M}$  de esteróis em  $500 \mu\text{M}$  de lipossoma DPPC e incubados a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Agregados tratados com  $500 \mu\text{M}$  de lipossoma DPPC foram utilizados apenas como controles.

Figura 11D, Efeito dependente da concentração de lanosterol sobre a re-dissolução de fibrilas tipo amiloide por  $\alpha$ A-cristalina mutantes avaliadas por fluorescência de ThT. Os agregados tratados com 500  $\mu$ M de lipossomas DPPC foram utilizados apenas como controles.

[0028] A **Figura 12** mostra o sistema de classificação de lentes com cataratas. Figura 12A, Lentes foram colocadas acima de uma grade e fotografadas. O grau de transparência foi pontuado como 0, uma lente clara e ausência de opacificação (linhas de grade claramente visíveis, a'); 1, uma lente embaçada e um ligeiro grau de opacificação (opacidade mínima das linhas de grade, com linhas de grade ainda visíveis, b'); 2, uma lente turva e presença de opacificação difusa envolvendo quase toda a lente (opacidade moderada das linhas de grade, com principais linhas de grade visíveis, c'); ou 3, uma lente opaca e presença de opacificação extensa espessa envolvendo toda a lente (opacidade total das linhas de grade, com linhas de grade não vistas de todo, d'). Figura 12B, Lanosterol reduziu a severidade da catarata e aumentou a clareza em lentes de coelho com catarata isoladas. As lentes de coelho ( $n = 13$ ) foram dissecadas e incubadas com lanosterol durante 6 dias e subsequentemente avaliadas quanto à clareza e transparência das lentes. São mostrados pares de fotografias de cada lente de coelho com catarata, mostrando antes e após tratamento com pontuações abaixo. Figura 12C, Lanosterol reduziu a severidade da catarata e aumentou a clareza da lente em cachorros. Os olhos do cachorro com cataratas ( $n = 7$ ) foram tratados com lanosterol durante 6 semanas e foram avaliados quanto à clareza e transparência da lente. Um par

de fotografias de cada olho de estudo antes e após tratamento é mostrado com pontuações abaixo. São também apresentados três olhos de controle tratados apenas com veículos.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA

[0029] Agora, faz-se referência em detalhes a modalidades específicas da invenção incluindo os melhores modos contemplados pelos inventores para a execução da invenção. Exemplos destas modalidades específicas estão ilustrados nos desenhos anexos. Enquanto a invenção é descrita em conjunto com estas modalidades específicas, deve ser entendido que não é intenção limitar a invenção às modalidades descritas. Pelo contrário, é pretendido a cobertura de alternativas, modificações e equivalentes, assim como pode ser incluído dentro do espírito e escopo da invenção como definido pelas reivindicações anexas. Na descrição que segue, detalhes específicos são definidos a fim de fornecer um entendimento completo da presente invenção. A presente invenção pode ser praticada sem alguns ou todos esses detalhes específicos. Adicionalmente, características bem conhecidas podem não ter sido descritas em detalhes para evitar obscurecimento desnecessário da invenção.

[0030] A presente invenção se refere a um método de, e composições para o tratamento ou prevenção de distúrbios visuais que afetam a estrutura normal do olho em um indivíduo apresentando ou em risco de desenvolver tais distúrbios visuais, compreendendo administrar a tal indivíduo, uma composição compreendendo um veículo farmaceuticamente aceitável e uma quantidade farmaceuticamente aceitável de um esterol tendo a fórmula I. Por exemplo, um composto exemplar da invenção compreende administrar a um paciente, uma

quantidade oftalmológica farmaceuticamente eficaz de lanosterol ( $3\beta$ -Hidroxi-8,24-lanostadieno; 8,24-Lanostadien- $3\beta$ -ol).

[0031] Em outras modalidades, a presente divulgação descreve esteróis e métodos de uso de esteróis. Por exemplo, os esteróis de fórmula I são formulados em composições oftálmicas farmacêuticas compreendendo um veículo oftálmico farmaceuticamente aceitável para inibir a agregação das proteínas cristalinas. Em determinadas outras modalidades, a presente divulgação descreve métodos de uso de esteróis da fórmula I para inibir a agregação das proteínas cristalinas. Ainda em outras modalidades, compostos da invenção são capazes de reverter a agregação de proteína cristalina e ainda inibir a agregação de proteína cristalina.

Métodos de Tratamento ou de Prevenção de Distúrbios visuais

[0032] A presente invenção fornece composições oftálmicas farmacêuticas e métodos de uso da presente invenção na prevenção e/ou tratamento de distúrbios visuais que afetam a estrutura normal das lentes no olho em um indivíduo apresentando ou em risco de desenvolver tais distúrbios visuais. Como descrito no presente documento, um distúrbio visual que afeta a estrutura normal das lentes no olho (referenciado no presente documento pela expressão "distúrbio visual") se refere às condições que afetam a estrutura das lentes de modo a causar disfunção da visão, tais como mudanças na clareza ou rigidez das lentes do olho. Tais condições incluem cataratas, presbiopia e esclerose nuclear. Adicionalmente, distúrbios visuais se referem à degeneração da retina, tais como doença de Refsum, síndrome

de Smith-Lemli-Opitz (SLOS) e distrofia da córnea cristalina de Schnyder (SCCD), abetalipoproteinemia e hipobetalipoproteinemia familiar. Em determinadas modalidades, a presente invenção fornece composições e métodos de uso dos mesmos para aliviar ou reverter agregação de proteína cristalina. Em modalidades alternativas, são fornecidas composições e métodos para inibição, prevenção e/ou tratamento da ruptura de interações intra- ou inter-proteínas que formam a macro-estrutura essencial para a transparência e índice de refração da lente.

[0033] O termo "catarata", como referido na presente invenção, significa uma doença ou condição que apresenta sintomas que causam turvação ou opacidade na superfície e/ou no interior da lente ou induz o inchaço da lente, e isso inclui tanto catarata congênita quanto catarata adquirida (cf. PDR Staff, "PDR of Ophthalmic Medicines 2013", PDR Network, 2012). Em algumas modalidades, a catarata é uma catarata associada à idade, uma catarata diabética, uma catarata associada à cirurgia, uma catarata resultante da exposição à radiação, uma catarata resultante de uma doença genética, uma catarata resultante de uma infecção ou uma catarata resultante de medicação. Em algumas modalidades, o indivíduo tem uma forma hereditária de catarata com início precoce. Exemplos concretos de tais são catarata congênita, tais como pseudo-catarata congênita, catarata de membrana congênita, catarata coronária congênita, catarata lamelar congênita, catarata pontuada congênita e catarata filamentar congênita; e catarata adquirida, tais como catarata geriátrica, catarata secundária, catarata de escurecimento, catarata complicada, catarata diabética, catarata traumática

e outras induzidas por choque elétrico, radiação, ultrassom, fármacos, doenças sistêmicas e distúrbios nutricionais. A catarata adquirida inclui ainda catarata pós-operatória com sintomas que causam turvação na encapsulação posterior de uma lente inserida para tratamento de catarata.

[0034] A esclerose nuclear refere-se a uma condição, geralmente em animais mais velhos, que resulta, de forma semelhante, em opacidade da lente. É uma alteração associada à idade na densidade do núcleo da lente cristalina que é causada pela compressão de fibras mais antigas da lente no núcleo pela formação de novas fibras.

[0035] A presbiopia refere-se a uma condição de visão em que a lente cristalina do olho perde sua flexibilidade, o que torna difícil a focalização de objetos próximos.

[0036] Em algumas modalidades, a invenção fornece um método de tratamento ou prevenção de um distúrbio visual, o método compreendendo a administração a um indivíduo em necessidade desta de uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo um composto apresentando uma fórmula estrutural I. Em algumas modalidades, o composto é um esterol tendo uma fórmula estrutural I.

[0037] Um indivíduo "com necessidade de" tratamento, de acordo com a invenção, é um indivíduo que está sofrendo de um distúrbio visual que afeta a função normal das lentes no olho. Por exemplo, o indivíduo pode apresentar ou estar em risco de desenvolver uma catarata associada à idade ou uma catarata. Indivíduos em risco de desenvolver uma catarata incluem, porém não estão limitados a, indivíduos com um histórico familiar de desenvolver cataratas, indivíduos com uma mutação ligada a uma catarata, indivíduos expostos à

radiação, diabéticos e semelhantes. Por exemplo, em um aspecto, o indivíduo foi diagnosticado com catarata em um olho, e o composto é administrado para prevenir ou retardar a formação de catarata no olho contralateral. De forma similar, um indivíduo "com necessidade de" tratamento, de acordo com a invenção, é um indivíduo que pode apresentar ou estar em risco de desenvolver presbiopia. De modo similar, um indivíduo "com necessidade de" tratamento, de acordo com a invenção, é um indivíduo que tem ou está em risco de desenvolver esclerose nuclear. De preferência, o indivíduo é humano, no entanto, os animais que sofrem de, ou que estão em risco de uma doença dos olhos (animais em necessidade de tratamento) podem ser também identificados por um especialista na técnica. Mamíferos com necessidade de tratamento, tais como gatos, cachorros, porcos, cavalos, vacas e roedores podem ser identificados. Adicionalmente, animais tais como aves, répteis, anfíbios e peixes que necessitam de tratamento podem ser identificados.

[0038] O "tratamento" de um distúrbio visual não requer uma abolição ou reversão de 100% de um distúrbio visual. Em algumas modalidades, o "tratamento" dos distúrbios visuais de acordo com o método da invenção alivia, inibe, previne e/ou reverte a disfunção da lente, por exemplo, opacidade ou inflexibilidade da lente por, por exemplo, pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10% ou pelo menos cerca de 20% em comparação com os níveis observados na ausência da composição ou do método inventivo (por exemplo, em um indivíduo ou espécime de controle biologicamente correspondente que não está exposto à composição ou composto inventivo do método inventivo). Em algumas modalidades, a disfunção (tais como

formação de catarata, opacidade ou agregação cristalina sobre ou na lente) é tratada por pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, ou pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90% ou mais (cerca de 100%) em comparação com a disfunção da lente na ausência do composto do método inventivo. A disfunção da lente, tais como opacidade ou turvação ou cataratas, é geralmente detectada utilizando qualquer um de vários testes ópticos incluindo, porém não limitado a, testes de acuidade visual, oftalmoscopia, exame de lâmpada de fenda, ceratometria, tonometria, teste de contraste, sensibilidade à luminosidade e mapeamento de frente de onda.

[0039] De forma similar, a "prevenção" não requer 100% de inibição ou dissuasão de um distúrbio visual. Por exemplo, qualquer redução na turvação ou opacidade, ou desaceleração da progressão da catarata constitui um efeito biológico benéfico em um indivíduo. Também exemplar, qualquer diminuição na agregação cristalina na lente de um olho constitui um efeito biológico benéfico. A este respeito, a invenção reduz o distúrbio visual, por exemplo, pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10% ou pelo menos cerca de 20% em comparação com os níveis observados na ausência do método inventivo (por exemplo, em um indivíduo ou espécime controle biologicamente correspondente que não está exposto ao composto do método inventivo). Em algumas modalidades, o distúrbio visual é reduzido em pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, ou pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, ou mais (cerca de 100%).

[0040] A inibição, prevenção ou reversão da disfunção não requer uma inibição, prevenção, abolição ou reversão de 100%. Por exemplo, qualquer inibição de agregação constitui um efeito biológico benéfico em um indivíduo. Neste sentido, a invenção inibe um distúrbio visual que afeta a função normal da lente do olho em um indivíduo, por exemplo, pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10% ou pelo menos cerca de 20% em comparação aos níveis observados na ausência do método inventivo (por exemplo, em um indivíduo ou espécime de controle biologicamente correspondente que não está exposto ao composto do método inventivo). Em algumas modalidades, o distúrbio visual é inibido, prevenido e/ou revertido em pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%. Em algumas modalidades, o método inventivo inibe a formação de amiloide em pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90% ou mais (cerca de 100%) em comparação à formação de amiloide na ausência do composto do método inventivo.

[0041] Uma “quantidade eficaz” de uma composição oftálmica farmacêutica compreendendo um composto de fórmula I é uma quantidade que inibe, impede ou reverte a disfunção da lente em um indivíduo. Uma composição oftálmica farmacêutica da presente invenção está sendo administrada a um indivíduo com necessidade da mesma em uma quantidade eficaz para tratar o distúrbio visual. Como utilizado no presente documento, “quantidade terapeuticamente eficaz” significa uma dose que alivia pelo menos um dos sinais, sintomas ou causas de um distúrbio visual, ou qualquer outra alteração desejada de um sistema biológico. Em aplicações preventivas, o termo “quantidade profilaticamente eficaz”

significa uma dose administrada a um paciente suscetível a ou, de outro modo, em risco de uma doença particular, que pode ser a mesma ou diferente dosagem de uma quantidade terapeuticamente eficaz. A quantidade efetiva da composição para um indivíduo particular pode depender do indivíduo, da gravidade da condição do indivíduo, do tipo de formulação sendo aplicada, da frequência da administração e da duração do tratamento. De acordo com a presente invenção, a administração de uma formulação farmacêutica oftálmica farmacêutica da presente invenção, tal como, por exemplo, lanosterol, mesmo em concentrações relativamente baixas em gotas líquidas, por exemplo, pelo menos  $10^{-9}$  M, pelo menos 0,5 a  $1 \times 10^{-8}$  M, pelo menos 0,5 a  $1 \times 10^{-7}$  M, pelo menos 0,5 a  $1 \times 10^{-6}$  M, pelo menos 0,5 a  $1 \times 10^{-5}$  M, pelo menos 0,5 a  $1 \times 10^{-4}$  M, pelo menos 0,5 a  $1 \times 10^{-3}$  M, ou qualquer concentração dentro de um intervalo entre estes valores (por exemplo,  $10^{-9}$  M a  $10^{-3}$  M), pode reverter tais distúrbios visuais com apenas uma, duas, três ou múltiplas aplicações diárias e fazê-lo rapidamente.

#### Via de Administração

[0042] Como será entendido por aqueles especialistas na técnica, o método mais apropriado de administrar um composto a um indivíduo é dependente de vários fatores. Em várias modalidades, o composto de acordo com a invenção é administrado localmente ao olho, por exemplo, topicalmente, subconjuntivamente, retrobulbarmente, periocularmente, subretinamente, via supracoroidal ou intraocularmente.

[0043] As composições farmacêuticas que são particularmente úteis para administração diretamente ao olho incluem soluções e/ou suspensões aquosas formuladas como

colírios e soluções e/ou suspensões espessadas formuladas como géis oftálmicos (incluindo soluções formadoras de gel) ou pomadas, que é uma solução oftálmica, pomada oftálmica, lavagem oftálmica, solução de infusão intraocular, lavagem para câmara anterior, medicamento interno, injeção ou conservante para córnea extraída. Outras formas de dosagem para distribuição de fármacos oftálmicos incluem inserções oculares, injeções intravítreas e implantes. As soluções injetáveis podem ser injetadas diretamente na córnea, lente cristalina e vítreo, ou seus tecidos adjacentes, usando uma agulha fina. A composição também pode ser administrada como um perfusato intraocular.

[0044] Vias de administração adicionais contempladas incluem, mas não estão limitadas a, uma ou mais de: oral (por exemplo, como um comprimido, cápsula ou como uma solução ingerível), mucosa (por exemplo, como um pulverizador nasal ou aerossol para inalação), nasal, parenteral (por exemplo, por uma forma injetável), gastrointestinal, intraespinhal, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intrauterina, intradérmica, intracraniana, intratraqueal, intravaginal, intracerebroventricular, intracerebral, subcutânea, transdérmica, retal, bucal, epidural e sublingual.

[0045] Em algumas modalidades, o modo para distribuição de uma composição da invenção ao olho é através de uma lente de contato. A lente pode ser fornecida pré-tratada com o composto desejado. Alternativamente, a lente é fornecida em um kit com componentes para preparar uma lente revestida, que são fornecidos como pós liofilizados para reconstituição ou como soluções concentradas ou prontas-para-o-uso. As composições podem ser fornecidas como kits para uso único ou

multiuso.

[0046] Em algumas modalidades, o modo para distribuição de uma composição da invenção ao olho é através de uma haste oftálmica (Gwon et al., Ophthalmology. Setembro de 1986; 93(9 Suppl):82-5). Em algumas modalidades, o modo para distribuição de uma composição da invenção ao olho é por meio de um conjunto de lentes intraoculares de hidrogel (Garty et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, Agosto de 2011. 3; 52(9):6109-16).

#### Dosagem

[0047] A composição compreendendo o composto é fornecida em uma quantidade terapeuticamente eficaz que alcança um efeito biológico desejado a um nível de toxicidade medicamente aceitável. A dosagem das composições pode variar dependendo da via de administração e da gravidade da doença. A dosagem também pode ser ajustada dependendo do peso corporal, idade, sexo e/ou grau de sintomas de cada paciente a ser tratado. A dose e via de administração precisa será, em última instância, a critério do médico ou veterinário assistente. Será apreciado que pode ser necessário fazer variações de rotina à dosagem, dependendo da idade e do peso do doente, bem como da gravidade da condição a ser tratada. A frequência de administração depende da formulação e dos parâmetros acima mencionados. Por exemplo, pode ser desejável aplicar colírios pelo menos uma vez por dia, incluindo 2, 3, 4 ou 5 vezes por dia.

[0048] As pessoas com habilidade podem determinar facilmente doses óptimas, metodologias de dosagem e taxas de repetição. As dosagens ótimas podem variar dependendo da potência relativa da composição farmacêutica particular e do

método de administração. As dosagens aceitáveis podem, geralmente, ser estimadas com base na EC50 (concentração efetiva para 50% do grupo de teste) que se verificou ser eficaz em modelos de animais in vitro e in vivo. Em geral, a dosagem é de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal e pode ser dada uma ou mais vezes diariamente, semanalmente, mensalmente ou anualmente, ou mesmo uma vez a cada 2 a 20 anos. As pessoas com habilidade na técnica podem facilmente estimar taxas de repetição para dosagem com base nos tempos de residência medidos e concentrações do fármaco em fluidos ou tecidos corporais. Seguidamente do tratamento bem-sucedidos, pode ser desejável que o paciente seja submetido a terapia de manutenção para prevenir a recorrência do estado de doença, em que as composições terapêuticas descritas no presente documento são administradas em doses de manutenção, variando de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, uma ou mais vezes diariamente, a uma vez a cada 20 anos. Doses exemplares dos compostos para administração a um humano (de aproximadamente 70 kg de peso corporal) por meio da via sistêmica são de 0,1 mg a 5 g, por exemplo, 1 mg a 2,5 g do composto por dose unitária.

[0049] Concentrações preferidas do composto de fórmula I variam de cerca de 1 µg/ml a 500 µg/ml, por exemplo, cerca de 1 µg/ml, cerca de 2 µg/ml, cerca de 3 µg/ml, cerca de 4 µg/ml, cerca de 5 µg/ml, cerca de 10 µg/ml, cerca de 20 µg/ml, cerca de 30 µg/ml, cerca de 40 µg/ml, cerca de 50 µg/ml, cerca de 60 µg/ml, cerca de 70 µg/ml, cerca de 80 µg/ml, cerca de 90 µg/ml, cerca de 100 µg/ml, cerca de 120 µg/ml, cerca de 140 µg/ml, cerca de 160 µg/ml, cerca de 180 µg/ml, cerca de 200 µg/ml, cerca de 250 µg/ml, cerca de 300

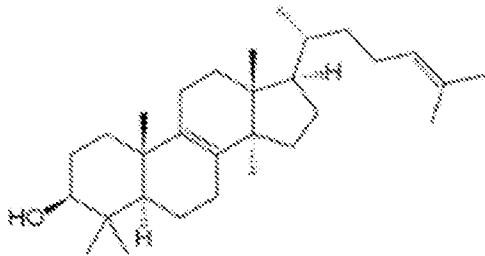
µg/ml, cerca de 350 µg/ml, cerca de 400 µg/ml, cerca de 450 µg/ml, ou cerca de 500 µg/ml. O inibidor pode ser fornecido em combinação com outros agentes farmaceuticamente ativos.

[0050] A composição farmacêutica como descrita no presente documento pode ser administrada como uma dose única ou em doses múltiplas; administradas tanto como agentes terapêuticos individuais ou em combinação com outros agentes terapêuticos; e combinado com terapias convencionais, as quais podem ser administradas sequencialmente ou simultaneamente. Em uma modalidade da invenção, as dosagens diárias na terapia humana e/ou animal das presentes formulações oftálmicas são cerca de 1 gota por olho, cerca de 2 gotas por olho, cerca de 3 gotas por olho, cerca de 4 gotas por olho, cerca de 5 gotas por olho, cerca de 6 gotas por olho, cerca de 7 gotas por olho, cerca de 8 gotas por olho, cerca de 9 gotas por olho, cerca de 10 gotas por olho, cerca de 11 gotas por olho, cerca de 12 gotas por olho ou mais de cerca de 12 gotas por olho. Em uma outra modalidade da invenção, a programação diária de administração para as presentes formulações oftálmicas na terapia humana e/ou animal é cerca de 1 vez por dia, cerca de 2 vezes por dia, cerca de 3 vezes por dia, cerca de 4 vezes por dia, cerca de 5 vezes por dia, cerca de 6 vezes por dia, cerca de 7 vezes por dia, cerca de 8 vezes por dia, cerca de 9 vezes por dia, cerca de 10 vezes por dia, cerca de 11 vezes por dia, cerca de 12 vezes por dia ou mais de cerca de 12 vezes por dia. As dosagens podem ser padronizadas, por exemplo, por meio de um conta-gotas medicinal padrão farmacopéia de 3 mm de diâmetro externo que, quando mantido verticalmente, fornece 20 gotas de água de peso total de 0,9 a 1,1 gramas a 25°C.

[0051] Quando administrado de acordo com a programação de dosagem descrita acima, o regime de tratamento em humanos e/ou animais pode continuar indefinidamente ou até que nenhuma melhoria adicional seja observada. Alternativamente, o regime de tratamento pode durar por 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias, 15 dias, 16 dias, 17 dias, 18 dias, 19 dias, 20 dias, 21 dias, 22 dias, 23 dias, 24 dias, 25 dias, 26 dias, 27 dias, 28 dias, 29 dias, 30 dias, 31 dias, 32 dias, 33 dias, 34 dias, 35 dias, 36 dias, 37 dias, 38 dias, 39 dias, 40 dias, 41 dias, 42 dias, 43 dias, 44 dias, 45 dias, 46 dias, 47 dias, 48 dias, 49 dias, 50 dias, 60 dias, 70 dias, 80 dias, 90 dias, 100 dias, 150 dias, 200 dias, 250 dias, 300 dias, 400 dias, 500 dias, 750 dias, 1000 dias ou mais do que 1000 dias.

Compostos Eficazes no Tratamento ou Prevenção da Catarata

[0052] Em diversas modalidades, o composto do método ou composição inventiva é lanosterol tendo um composto de fórmula I:



ou um pró-fármaco ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[0053] Por exemplo, o composto do método ou composição inventiva é lanosterol; um pró-fármaco ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. Em uma modalidade, o composto é lanosterol. Em uma outra modalidade, qualquer

pró-fármaco ou sal farmaceuticamente aceitável dos compostos acima são contemplados para estar dentro do escopo da invenção.

#### Composições farmacêuticas

[0054] Em algumas modalidades da invenção, as composições farmacêuticas de um ou mais compostos terapêuticos podem ser preparadas pela formulação de um ou mais destes compostos terapêuticos em um veículo farmaceuticamente aceitável. Como utilizado no presente documento, "veículo farmaceuticamente ou terapeuticamente aceitável" refere-se a um meio veicular que não interfere com a eficácia da atividade biológica dos ingredientes ativos e que não é tóxico ao hospedeiro ou paciente. O tipo de veículo que é utilizado na preparação farmacêutica dependerá do método pelo qual os compostos terapêuticos devem ser administrados. Muitos métodos de preparação de composições farmacêuticas para várias vias de administração são bem conhecidos na técnica.

[0055] Como utilizado no presente documento, "veículo oftálmico farmaceuticamente aceitável" refere-se a um excipiente, veículo, aglutinante e/ou diluente farmaceuticamente aceitável para distribuição do composto da fórmula estrutural I diretamente ou indiretamente ao, sobre ou próximo do olho. De acordo, a invenção compreende, ainda, uma composição compreendendo o composto da fórmula estrutural I e um veículo oftálmico farmaceuticamente aceitável.

[0056] Opcionalmente, a composição inclui um ácido livre, base livre, sal (por exemplo, um sal de adição de ácido ou de base), hidrato ou pró-fármaco do composto de fórmula estrutural I. A expressão "sal farmaceuticamente aceitável"

ou "ácido farmaceuticamente aceitável", como utilizado no presente documento, refere-se a ácidos ou sais orgânicos ou inorgânicos farmaceuticamente aceitáveis, respectivamente, de um composto de fórmula I. O contra-íon pode ser qualquer porção orgânica ou inorgânica que estabiliza a carga no composto original. Além disso, um sal (ou ácido) farmaceuticamente aceitável pode ter mais de um átomo carregado em sua estrutura. Nos casos em que múltiplos átomos carregados fazem parte do sal (ou ácido) farmaceuticamente aceitável, podem ter múltiplos contra-íons. Assim, um sal (ácido) farmaceuticamente aceitável pode ter um ou mais átomos carregados e/ou um ou mais contra-íons.

[0057] Exemplos de sais incluem, porém não estão limitados a, sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloreto, brometo, iodeto, nitrato, bissulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartarato, oleato, tanato, pantotenato, bitartarato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanossulfonato, etanossulfonato, benzenossulfonato, p-toluenossulfonato e pamoato (isto é, 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Um sal farmaceuticamente aceitável pode envolver a inclusão de uma outra molécula tal como um íon acetato, um íon succinato ou outro contra-íon.

[0058] O pró-fármaco é um material que inclui o composto de fórmula estrutural I covalentemente ligado a uma porção veiculadora. A porção veiculadora pode ser liberada a partir do composto de fórmula estrutural I, in vitro ou in vivo, para produzir o composto de fórmula estrutural I. As formas

de pró-fármaco são bem conhecidas no estado da técnica, como exemplificado em Sloan, K. B., Prodrugs, M. Dekker, Nova Iorque, 1992; e Testa, B. e Mayer, J. M., *Hydrolysis in drug and prodrug metabolism: chemistry, biochemistry, and enzymology*, Wiley- VCH, Zurich, 2003.

[0059] Em algumas modalidades da invenção, as composições farmacêuticas são preparadas pela dissolução da composição inventiva em um solvente apropriado. Os solventes apropriados incluem, mas não estão limitados a, água, solução salina (por exemplo, NaCl), soluções tamponadas, pomadas, géis ou outros solventes. Em determinadas modalidades, os solventes são estéreis.

[0060] Soluções aquosas e diluentes para suspensões que são utilizados no preparo de colírios podem incluir água destilada, solução salina fisiológica e similares. Estas composições farmacêuticas podem ser formuladas misturando, diluindo ou dissolvendo o composto, opcionalmente, com aditivos farmacêuticos apropriados, tais como excipientes, desintegrantes, aglutinantes, lubrificantes, diluentes, tampões, antissépticos, agentes umidificantes, emulsionantes, agentes dispersantes, agentes estabilizantes e auxiliares de dissolução, de acordo com métodos convencionais e formulação de uma maneira convencional, dependendo da forma de dosagem. Soluções não aquosas e diluentes para suspensões podem incluir óleo comestível (por exemplo, vegetal), parafina líquida, óleo mineral, propilenoglicol, p-octildodecanol, polissorbato, macrogóis, monoestearato de alumínio, bem como solventes similares.

[0061] Vários aditivos podem estar contidos em colírios, géis oftálmicos e/ou pomadas oftálmicas, conforme

necessário. Estes podem incluir ingredientes, aditivos ou veículos adicionais adequados para utilização em contato sobre ou em volta do olho sem toxicidade, incompatibilidade, instabilidade, irritação, resposta alérgica indevida e semelhantes. Aditivos tais como solventes, bases, adjuvantes de solução, agentes de suspensão, agentes espessantes, agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes tamponantes, agentes de ajuste de isotonicidade, agentes de ajuste de pH, agentes quelantes, agentes calmantes, conservantes, corretores, agentes aromatizantes, agentes de coloração, excipientes, agentes aglutinantes, lubrificantes, surfactantes, agentes promotores de absorção, agentes dispersantes, conservantes, agentes solubilizantes, e semelhantes, podem ser adicionados a uma formulação quando apropriado.

[0062] Por exemplo, colírios podem ser formulados pela dissolução do composto em água esterilizada na qual um agente surfactante ativo é dissolvido, e opcionalmente adicionar aditivos farmacêuticos apropriados, tais como um conservante, um agente estabilizante, um tampão, um antioxidante e um melhorador de viscosidade.

[0063] Por exemplo, agentes tamponantes são adicionados para manter constante o pH e podem incluir agentes tamponantes farmaceuticamente aceitáveis, tais como tampão borato, tampão citrato, tampão tartarato, tampão fosfato, tampão acetato ou tampão Tris-HCl (compreendendo tris (hidroximetil) aminometano e HCl). Por exemplo, um tampão Tris-HCl tendo um pH de 7,4 compreende 3 g/l de tris-(hidroximetil)-aminometano e 0,76 g/l de HCl. Ainda em um outro aspecto, o tampão é 10x tampão fosfato salino ("PBS")

ou 5x solução de PBS. Os agentes tamponantes são incluídos em uma quantidade que fornece capacidade tamponante suficiente para as condições fisiológicas esperadas.

[0064] Outros tampões incluem, mas não estão limitados a, tampões a base de HEPES (ácido N-{2-hidroxietil}peperazina-N'-{2-etanossulfônico}) tendo pK<sub>a</sub> de 7,5 a 25°C e pH na faixa de cerca de 6,8-8,2; BES (ácido N,N-bis{2-hidroxietil}2-aminoetanossulfônico) tendo pK<sub>a</sub> de 7,1 a 25°C e pH na faixa de cerca de 6,4-7,8; MOPS (ácido 3-{N-morfolino}propanossulfônico) tendo pK<sub>a</sub> de 7,2 a 25°C e pH na faixa de cerca de 6,5-7,9; TES (ácido N-tris{hidroximetil}-metil-2-aminoetanossulfônico) tendo pK<sub>a</sub> de 7,4 a 25°C e pH na faixa de cerca de 6,8-8,2; MOBS (ácido 4-{N-morfolino}butanossulfônico) tendo pK<sub>a</sub> de 7,6 a 25°C e pH na faixa de cerca de 6,9-8,3; DIPSO (3-(N,N-bis{2-hidroxietil}amino)-2-hidroxipropano)) tendo pK<sub>a</sub> de 7,52 a 25°C e pH na faixa de cerca de 7-8,2; TAPS (ácido {(2-hidroxi-3{tris(hidroximetil)metilamino}-1propanosulfônico)) tendo pK<sub>a</sub> de 7,61 a 25°C e pH na faixa de cerca de 7-8,2; TAPS (ácido {(2-hidroxi-1, 1-bis(hidroximetil)etil)amino}-1-propanosulfônico) tendo pK<sub>a</sub> de 8,4 a 25°C e pH na faixa de cerca de 7,7-9,1; TABS (ácido N-tris(hidroximetil)metil-4-aminobutanossulfônico) tendo pK<sub>a</sub> de 8,9 a 25°C e pH na faixa de cerca de 8,2-9,6; AMPSO (ácido N-(1,1-dimetil-2-hidroxietil)-3-amino-2-hidroxipropanossulfônico) tendo pK<sub>a</sub> de 9,0 a 25 °C e pH na faixa de cerca de 8,3-9,7; CHES (2-ciclohexilamino)etanosulfônico) tendo pK<sub>a</sub> de 9,5 a 25°C e pH na faixa de cerca de 8,6-10,0; CAPSO (ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propanossulfônico) tendo pK<sub>a</sub> de 9,6 a 25°C e pH na faixa de cerca de 8,9-10,3; e CAPS

(ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propano sulfônico) tendo  $pK_a$  de 10,4 a 25°C e pH na faixa de cerca de 9,7-11,1.

[0065] Adicionalmente a um tampão, os isotonizantes podem ser adicionados a colírios para fazer a preparação isotônica com a lágrima. Os isotonizantes incluem, porém não estão limitados a, açúcares tais como dextrose, glicose, sacarose e frutose; álcoois de açúcar, tais como manitol e sorbitol; álcoois poli-hídricos, tais como glicerol, polietilenoglicol e propileno glicol e sais, tais como cloreto de sódio, citrato de sódio, cloreto de benzalcônio, cloreto de fedrina, cloreto de potássio, cloreto de procaina, cloranfenicol e succinato de sódio. Os isotonizantes são adicionados em uma quantidade que faz com que a pressão osmótica do colírio seja igual à da lágrima.

[0066] Podem ser adicionados conservantes para manter a integridade do colírio e/ou da pomada oftálmica. Exemplos de conservantes incluem, porém não estão limitados a, ácido sórbico, cloreto de benzalcônio, brometo de benzododecínio, parabenos, clorobutanol, álcool benzílico, álcool feniletil, edentato dissódico, ácido sórbico, poliquaternio-1 ou outros agentes conhecidos por aqueles com habilidade na técnica.

[0067] Em algumas modalidades, os espessantes são utilizados para aumentar a viscosidade de preparações oftálmicas tais como colírios, géis oftálmicos e/ou pomadas oftálmicas. Os espessantes que podem ser utilizados incluem, porém não estão limitados a, glicerol, polietilenoglicol, carboximetilcelulose e polímeros de carboxivinil.

[0068] Adicionalmente ao acima, em algumas modalidades, é desejável utilizar agentes adicionais que incluem, porém não estão limitados a, estabilizantes tais como sulfito de

sódio, carbonato de sódio e propileno glicol; antioxidantes, tais como ácido ascórbico, ascorbato de sódio, hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), tocoferol, tiossulfato de sódio; e/ou agentes quelantes, tais como ácido etileno-diamina-tetra-acético (EDTA), etileno glicol-bis-(2-aminoetil)-N,N,N,N-tetraacético (EGTA) e citrato de sódio.

[0069] Os colírios, géis oftálmicos e/ou pomadas oftálmicas podem ser preparados por manipulação asséptica ou, alternativamente, esterilização é realizada em um estágio de preparação adequado. Por exemplo, uma composição farmacêutica estéril pode ser preparada misturando ingredientes estéreis assepticamente. Alternativamente, a composição farmacêutica estéril pode ser preparada misturando primeiro os ingredientes, depois esterilizando a preparação final. Os métodos de esterilização podem incluir, porém não estão limitados a, esterilização por calor, irradiação e filtração.

[0070] As pomadas oftálmicas (pomadas para os olhos) podem ser preparadas assepticamente misturando o ingrediente ativo em uma base que é utilizada para a preparação de pomadas para os olhos seguida por formulação em preparações farmacêuticas por qualquer método conhecido na técnica. As bases típicas para pomadas para os olhos são exemplificadas por vaselina, jelene 50, plastibase e macrogol. Adicionalmente, podem ser adicionados surfactantes para aumentar a hidrofilia.

[0071] Uma série de métodos eficazes para a liberação controlada de um agente ativo está disponível. Ver, por exemplo, Wagh V. D., Inamdar B., Samanta M. K., *Polymers*

*used in ocular dosage form and drug delivery systems.* Asian J Pharm 2, 2008, 12-17 e as referências da literatura nele citadas, o conteúdo dos quais são incorporados no presente documento por referência. O uso dos polímeros (por exemplo, derivados de celulose tais como hidroxipropilmetylcelulose (HPMC) e hidroxipropilcelulose (HPC), poli (ácido acrílico) (PAA), poliacrilatos, ciclodextrinas e gomas naturais, poliortoésteres (POEs) e polímeros mucoadesivos); semissólidos tais como géis, filmes e outras inserções; resinas tais como resinas trocadora de íons, distribuição iontoforética e partículas coloidais, tais como microesferas e nanopartículas, são especificamente contempladas.

[0072] Os compostos da invenção podem também ser fornecidos em combinação com outros agentes terapêuticos. Em algumas modalidades, os compostos da invenção podem ser co-formulados com outros agentes ativos, incluindo, porém não se limitando a, agentes anti-infecciosos, antibióticos, agentes antivirais, anti-fúngicos, agente anti-protozoário, fármacos anti-inflamatórios, agentes antialérgicos incluindo agentes anti-histamínicos, lágrimas artificiais vasoconstritores, vasodilatadores, anestésicos locais, analgésicos, agentes de redução da pressão intraocular, imunorreguladores, antioxidantes, vitaminas e minerais, um inibidor de enzima ou, alternativamente, proteases e peptidases, um inibidor de citosina e semelhantes.

[0073] Em várias modalidades, os compostos da invenção também podem ser fornecidos em combinação com um terapêutico ocular selecionado do grupo que consiste em Acular (solução oftálmica de trometamina de cеторолако) 0,5%, Acuvail (trometamina de cеторолако), AK-Con-A (nafazolina

oftálmica), Akten (cloridrato de lidocaína), Alamast, Alphagan (brimonidina), Alrex, Astepro (spray nasal de cloridrato de azelastina), AzaSite (azitromicina), Bepreve (solução oftálmica de besilato de betopastina), Besivance (suspenção oftálmica de besifloxacina), Betaxon, Solução de Irrigação Estéril BSS, Cosopt, Durezol (difluprednato), Eylea (afibercept), Lotemax, Lucentis (ranibizumabe), Lumigan (solução oftálmica de bimatoprost), Macugen (pegaptanibe), 0,3% de Ocuflax (solução oftálmica de ofloxacina), OcuHist, Ozurdex (dexametasona), Quixin (levofloxacina), 0,15% de Rescula (solução oftálmica de unoprostone isopropil), Restasis (emulsão oftálmica de ciclosporina), Comprimidos de Salagen, Travatan (solução oftálmica de travoprost), Valcyte (valganciclovir HCl), Viroptic, Vistide (cidofovir), Visudyne (verteporfina para injeção), Implante de Vitraser, Injeção de Vitravene, ZADITOR, Zioptan (solução oftálmica de tafluprost), Zirgan (gel oftálmico de ganciclovir), Zymaxid (solução oftálmica de gatifloxacina), Atropina, Flurbiprofeno, Fisostimina, Azopt, Gentamicina, Pilocarpina, Bacitracina, Goniosol, Polimixina B, Betadina, Gramicidina, Prednisolona, Betaxolol, Humorsol, Proparacaina, Beto optic, Hylartin, Propina, Brinzolamida, NaCl Hipertônico, Puralube, BSS, Verde de Indocianina, Bengala Rosa, Carbachol, Itraconazol, Hialuronato de Sódio, Cefazolina, Latanoprost, Suprofeno, Celluvisc, Manitol, Terramicina, Cloranfenicol, Metazolamida, Timolol, Ciloxan, Miconazol, Tobramicina, Ciprofloxacina, Miostat, Triamcinolona, Cosopt, Muro 128, Trifluridina, Demecário, Neomicina, Tropicamida, Dexametasona, Neptazane, Trusopt, Dipivefrina, Ocuflax,

Vidarabina, Dorzolamida, Ofloxacina, Vira-A, Epinefrina, Oxitetraciclina, Viroptic, Fluoresceína, Fenilefrina e Xalatan.

#### Kits

[0074] Algumas modalidades da invenção se referem a kits para prevenir e/ou melhorar um ou mais sintomas associados a uma doença ocular. Os kits podem compreender um ou mais recipientes que contêm um ou mais dos compostos terapêuticos descritos no presente documento. Os compostos podem estar presentes no recipiente como uma composição farmacêutica preparada, ou alternativamente, os compostos podem ser não formulados. Em tais modalidades, o kit pode incluir os compostos não formulados em um recipiente que está separado do veículo farmaceuticamente aceitável. Antes do uso, o composto é diluído ou de outra forma misturado ao veículo farmaceuticamente aceitável.

[0075] Algumas modalidades dos kits aqui fornecidos também compreendem instruções que descrevem o método para administração da composição farmacêutica de modo que um ou mais sintomas associados a uma doença ocular que inclui, porém não está limitada a, degeneração da retina, presbiopia, cataratas e/ou esclerose nuclear da lente do olho. Em algumas modalidades, as instruções também descrevem o procedimento para misturar os compostos terapêuticos contidos no kit com veículos oftálmicos farmaceuticamente aceitáveis.

[0076] Em algumas modalidades da invenção, o recipiente que compreende os compostos terapêuticos descritos no presente documento, é um recipiente que é utilizado para a administração oftálmica. Em determinadas modalidades, o recipiente é um conta-gotas para administração de colírios.

Em outras modalidades, o recipiente é um tubo para administrar um gel oftálmico ou uma pomada oftálmica.

[0077] Algumas modalidades desta invenção são ainda ilustradas pelos exemplos que seguem, que não devem ser interpretados como limitativos. Será apreciado por aqueles especialistas na técnica que as técnicas divulgadas no exemplo que se segue representam técnicas descobertas pelo inventor por funcionarem bem na prática das modalidades da invenção descritas nesse relatório descritivo, e assim, podem ser consideradas a constituir modos preferidos para a prática dessas modalidades. Aqueles com habilidade na técnica irão, no entanto, em vista da presente descrição, apreciar que podem ser feitas muitas alterações nas modalidades específicas que são divulgadas no presente documento, e ainda obter um resultado semelhante ou similar sem se afastar do espírito e escopo da invenção.

#### Dispositivos

[0078] Algumas modalidades da invenção se referem a dispositivos para administrar o esterol da invenção a um indivíduo. Em algumas modalidades, os dispositivos incluem uma porção interior, cavidade ou reservatório que contém o esterol da invenção formulado em um veículo farmaceuticamente aceitável. Em tais modalidades, os veículos farmacêuticos incluem, porém não estão limitados a, soluções, géis e pomadas. Em determinadas modalidades, a porção interior, cavidade ou reservatório contém uma ou mais das preparações farmacêuticas contendo o esterol da invenção descritas no presente documento.

[0079] Em algumas modalidades, os dispositivos aqui contemplados também compreendem um aplicador que está

acoplado à porção interior, cavidade ou reservatório do dispositivo. O aplicador pode ser cilíndrico, cônicoo de qualquer outra forma que permita que a preparação farmacêutica contendo o esterol da invenção seja distribuída a partir da porção interior, cavidade ou reservatório para o olho. Em uma modalidade preferida, o aplicador é um cilindro afunilado em que a extremidade larga é acoplada à porção interior, cavidade ou reservatório e a extremidade afunilada forma a abertura de saída para a passagem da preparação farmacêutica contendo o esterol da invenção para o olho.

[0080] A menos que de outra forma definido, todos os termos técnicos e científicos utilizados no presente documento têm o mesmo significado como comumente entendido por um especialista na técnica a qual esta invenção pertence. Embora quaisquer métodos, dispositivos e materiais similares ou equivalentes aos aqui descritos possam ser utilizados na prática ou no teste da invenção, os métodos, dispositivos e materiais preferidos são agora descritos.

[0081] Todas as publicações mencionadas no presente documento são aqui incorporadas por referência por completo, com a finalidade de descrever e divulgar as metodologias que são descritas nas publicações que podem ser utilizadas em conexão com a invenção presentemente descrita. As publicações discutidas acima e ao longo de todo o texto são providas apenas para a sua divulgação antes da data de depósito do presente pedido. Nada aqui deve ser interpretado como uma admissão de que os inventores não têm o direito de antecipar tal divulgação em virtude da invenção anterior.

[0082] Os exemplos que seguem destinam-se a ilustrar,

porém não a limitar, a invenção de qualquer maneira, formato ou forma, explicitamente ou implicitamente. Embora eles sejam típicos daqueles que podem ser utilizados, outros procedimentos, metodologias ou técnicas conhecidos pelos especialistas na técnica podem ser alternativamente utilizados.

#### EXEMPLO 1

[0083] A lente humana é composta, em grande parte, por proteínas cristalinas montadas em uma macro-estrutura altamente ordenada e interativa, essencial para a transparência e o índice de refração da lente. Qualquer ruptura das interações intra ou inter-proteínas alterará esta delicada estrutura, expondo as superfícies hidrofóbicas, com consequente formação de agregação de proteína e catarata. Cataratas são a causa mais comum de cegueira em todo o mundo, afetando dezenas de milhões de pessoas e, atualmente, o único tratamento é a remoção cirúrgica das lentes com cataratas. Os mecanismos precisos pelos quais as proteínas da lente tanto impedem a agregação quanto mantêm a transparência da lente são, em grande parte, desconhecidos. O lanosterol é uma molécula anfipática enriquecida na lente. É sintetizado pela lanosterol sintase (LSS) em uma reação de ciclização chave de uma via da síntese do colesterol. Foi identificado no presente relatório descritivo, duas distintas mutações homozigotas LSS de troca de sentido (W581R e G588S), em duas famílias com cataratas congênitas extensas. Ambas essas mutações afetam resíduos de aminoácidos altamente conservados e prejudicam as funções catalíticas fundamentais da LSS. A expressão modificada da LSS do tipo selvagem, porém não mutante, impede a agregação

de proteínas intracelulares de várias cristalinas mutantes causadoras de catarata. O tratamento por lanosterol, porém não colesterol, diminuiu significativamente os agregados de proteína pré-formados, tanto *in vitro* quanto em experiências de transfecção celular. Foi mostrado ainda, que o tratamento com lanosterol poderia reduzir a severidade da catarata e aumentar a transparência em lentes dissecadas de coelho com cataratas *in vitro* e a severidade da catarata em cachorros *in vivo*. O presente estudo identifica o lanosterol como uma molécula chave na prevenção da agregação de proteínas de lentes e aponta para uma nova estratégia para prevenção e tratamento da catarata.

[0084] As cataratas são responsáveis por mais da metade dos casos de cegueira no mundo, com o único tratamento estabelecido envolvendo a remoção cirúrgica da lente opacificada. Em nações desenvolvidas, as cirurgias de catarata representam uma parcela significativa dos custos de saúde devido à grande prevalência da doença entre as populações em envelhecimento. Adicionalmente, há importante morbidade associada às cataratas em países em desenvolvimento, onde há acesso limitado a cuidados cirúrgicos.

[0085] Altas concentrações de proteínas cristalinas nas fibras da lente contribuem para a transparência e propriedades refrativas<sup>2</sup> da lente. A superfamília cristalina é composta de a-, b- e c-cristalinas, que são algumas das proteínas intracelulares mais altamente concentradas no corpo humano. A agregação de proteínas é o fator mais importante na formação de catarata<sup>3</sup>. Fatores que levam à agregação de proteínas incluem mutações em proteínas

cristalinas, que são conhecidas por causar cataratas congênitas ou estresse oxidativo, o que, por sua vez, contribui para cataratas associadas à idade. No entanto, os mecanismos precisos pelos quais as proteínas da lente mantêm a transparência ou causam opacificação não são completamente compreendidos.

[0086] A lanosterol sintase (2,3-oxidosqualeno-lanosterol ciclase, LSS; EC 5.4.99.7) é codificada pelo gene LSS. A proteína LSS catalisa a conversão de (S)-2,3-oxidosqualeno em lanosterol, que é uma etapa limitante da taxa inicial na biossíntese de colesterol, hormônios esteroides e vitamina D (referência 4). Verificou-se que a LSS era expressa na lente<sup>5</sup>. Foi relatado anteriormente que a combinação específica de mutações hipomórficas em LSS e FDFT1 (farnesil difosfato farnesil transferase 1) poderia diminuir os níveis de colesterol na lente e resultar em cataratas em ratos Shumiya com catarata (SCR)<sup>6</sup>. Foram identificados no presente documento novas mutações homozigóticas no gene LSS em duas famílias consanguíneas e investigado a capacidade do lanosterol para aliviar a agregação de proteínas e formação de catarata.

[0087] Três crianças com catarata congênita grave de uma família consanguínea de descendência Caucásiana (Figura 1a) foram identificadas. O sequenciamento de exoma completo foi realizado em uma média de não menos do que 55 vezes a cobertura profunda na região alvo (Tabela 1a) a fim de identificar a mutação causadora. Em média, 60.800 - 80.800 SNPs foram detectadas em cada exoma (Tabela 1b). Usando um modelo consanguíneo recessivo e filtrando contra variantes comuns (,0,5% de frequência de alelos menores) em bancos de

dados públicos incluindo dbSNP e o 1000 Genomes Project, bem como previsões de função de mutação (preditas por SIFT<sup>7</sup>, Polyphen2<sup>8</sup>, Phylop<sup>9</sup> e Mutationtaster<sup>10</sup>), foram reduzidos os candidatos potenciais de variantes de genes e identificados uma variante (G588S) em LSS no cromossomo 21 como o candidato mais provável (Tabela 1c). Três crianças afetadas foram homozigotas para a transição de GRA (G588S) em LSS, (GRCh37/hg19: chr21:47615645; NM\_001001438.2:c.1762G.A, NM\_001001438.1: p.G588S), enquanto o pai não afetado, mãe e restante das crianças foram heterozigotas para a mudança (Figura 1a, b). A genotipagem de SNP do genoma inteiro identificou três regiões homozigotas contínuas longas nesta família por HomozygosityMapper<sup>11</sup> (chr2: q22.1-q24.1, chr2: q31.1-q32.1 e chr21: q22.3; - Figura 6a e Tabela 1d). O gene LSS foi localizado em uma das regiões homozigotas no cromossomo 21 (Figura 6B). Além disso, foram avaliadas mutações no gene LSS em 154 famílias com cataratas congênitas e identificada uma outra mutação homozigótica, W581R (GRCh37/hg19: chr21:47615666; NM\_001001438.2:c.1741T.C, NM\_001001438.1: p.W581R), em uma segunda família consanguínea (Figura 1A, B, C). Essas duas mutações estavam ausentes em 11.000 cromossomos de controle.

[0088] Os resíduos de aminoácidos W581 e G588 em LSS são altamente conservados (Figura 2A). Foi realizada análise de modelagem computacional para investigar os efeitos das mutações W581R e G588S na função e estrutura 3D do LSS. O aminoácido triptofano na posição 581 foi relatado por contribuir ao sítio catalítico da atividade de ciclase<sup>12</sup>. O mutante G588S foi modelado por substituição no local seguido por refinamento da cadeia lateral. O refinamento da cadeia

lateral S588 não conseguiu resolver o choque de van der Waals entre a cadeia lateral de serina e o carbonil da estrutura de E578, que forma uma ponte de sal principal com R639. A orientação do giro E579:C584 precisava ser distorcida para acomodar a mutação. A cadeia lateral do mutante S588 entrou em choque em um giro adjacente, indicando que a mutação era incompatível com a estrutura e função enzimática normal da LSS (Figura 2B). Suportando os resultados *in silico*, a expressão da LSS do tipo selvagem em um experimento de transfecção celular apresentou atividade de ciclase e aumentou dramaticamente a quantidade de produção de lanosterol na fração de lipídio em células HeLa, enquanto nem a proteína mutante W581R nem a proteína mutante G588S demonstraram qualquer atividade de ciclase (Figura 2C). Em contraste, o nível de colesterol não foi afetado pela expressão de LSS do tipo selvagem ou mutante, sugerindo que pode haver uma via alternativa para a homeostase do colesterol. As mutações W581R e do G588S não alteraram a localização subcelular nem causaram agregados de proteína LSS quando comparadas às do LSS do tipo selvagem, sugerindo que o fenótipo da catarata não foi devido à formação de partículas de dispersão de luz pelas próprias proteínas LSS mutantes (Figura 7). A agregação de cristalinas, as principais proteínas estruturais da lente, é uma causa predominante de vários tipos de cataratas<sup>3</sup>. Para imitar a agregação de proteínas na lente com catarata, seis proteínas cristalinas causadoras de catarata conhecidas foram expressas em células progenitoras de lentes humanas, linhagem epitelial B-3 (HLEB-3) ou lentes humanas, ou células HeLa. Estas cristalinas mutantes formaram corpos de

inclusão p62-positivos/agressomas em todas as três linhagens celulares transfectadas, sugerindo que a agregação é uma propriedade intrínseca de cristalinas mutantes (Figura 3A e Figuras 8 e 9)<sup>13</sup>. A co-expressão de LSS do tipo selvagem e uma proteína cristalina mutante causadora de catarata reduziu significativamente o número e tamanho dos agregados cristalinos intracelulares, enquanto que os mutantes LSS não conseguiram fazê-lo sozinhos (Figura 3B, C e Figuras 8 e 9). A análise de western blot indicou que o mutante Y118D de aA-cristalina foi liberado a partir de agregados intracelulares e tornou-se mais solúvel com LSS do tipo selvagem (Figura 3D e Figura 9C). Além disso, a adição de lanosterol, porém não de colesterol, no meio de cultura das células co-expressando um mutante LSS e uma cristalina mutante reduziu, com sucesso, a agregação cristalina (Figura 3C e Figuras 8 e 9). Este resultado indicou que o lanosterol, porém não o colesterol, poderia ser um agente eficaz para libertar as proteínas cristalinas mutantes da agregação.

[0089] Apoiando esta hipótese, o lanosterol inibiu significativamente a formação de aggressoma de ambas as proteínas cristalinas mutadas e do tipo selvagem de uma forma dependente da concentração, enquanto o colesterol não teve efeito (Figura 3E, F e Figura 10). O lanosterol, porém não o colesterol, aumentou as quantidades de cristalinas mutantes nas frações solúveis de células lisadas (Figura 3G e Figura 11A). Utilizando imagens de células vivas em série de células que expressam a fusão do GFP com o mutante Y118D de aA-crystallina, foi mostrado que a adição de lanosterol poderia diminuir efetivamente os agregados cristalinos com uma semivida de 22268 minutos (Figura 3H), enquanto que a

adição de DMSO ou colesterol não reduz a formação de agressomas (Figura 11B). O rastreamento de partículas únicas em células vivas mostrou claramente que o lanosterol tem um importante papel na dissociação de agregados de proteína intracelular pré-formados.

[0090] Para investigar se o lanosterol tem um efeito direto na dissolução das proteínas agregadas, obtiveram-se os agregados de cinco cristalinas mutantes do tipo selvagem e nove cristalinas mutantes por aquecimento de cristalinas mutadas e do tipo selvagem na presença de 1M cloreto de guanidina. Sob esta condição, todas as proteínas cristalinas formaram fibrilas tipo amiloide, como revelado pelo aumento da fluorescência da tioflavina T (ThT), as estruturas fibrilares sob microscopia eletrônica de transmissão (TEM) com manchas negativas e o baixo valor de turbidez (Figura 4 e Figura 11C). A morfologia das fibrilas tipo amiloide aqui obtidas foi semelhante àquelas proteínas cristalinas relatadas anteriormente<sup>14</sup>. O PBS contendo lipossomas formados por dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) foi utilizado para aumentar a solubilidade dos compostos esteróis e imitar a condição de esteróis em membranas celulares. O lanosterol, porém não o colesterol, redissolveu com sucesso as proteínas cristalinas agregadas das fibrilas tipo amiloide de uma maneira dependente da concentração, como indicado pelo desaparecimento de estruturas fibrilares nas fotografias TEM com coloração negativa e a diminuição da intensidade de fluorescência de ThT (Figura 4 e Figura 11D). Como um exemplo, as  $\alpha$ -cristalinas redissolvidas podiam ser identificadas em imagens TEM com coloração negativa e eram em torno de 15 nm em tamanho (Figura 4A)<sup>15</sup>.

[0091] Para avaliar o efeito do lanosterol sobre a redução da catarata em tecidos de lentes, isolaram-se lentes de coelhos com cataratas de ocorrência natural e incubaram-nas em uma solução de 25 mM lanosterol durante 6 dias e compararam a clareza da lente antes e após o tratamento com lanosterol. Foi observada uma forte tendência de redução da severidade da catarata, como demonstrado pelo aumento da clareza da lente ( $P < 0,003$ , Teste de Wilcoxon, Figura 5A, B, Tabela 2A e Figura 12A, B). Foi ainda investigado o efeito do lanosterol na reversão de cataratas em cachorros *in vivo*. O tratamento com lanosterol reduziu significativamente a severidade da catarata e aumentou a clareza da lente ( $P < 0,009$ , Teste de Wilcoxon, Figura 5C, D, Tabela 2B e Figura 12C).

[0092] Mutações homozigótica que afetam a função catalítica da LSS causam cataratas congênitas extensas com perda de visão severa. O papel crítico do lanosterol na prevenção da catarata é corroborado pela observação de que uma cepa de rato contendo composto com mutações LSS recapitula o fenótipo da doença de catarata humana<sup>6</sup>. Consistente com esta noção, a inibição de LSS por U18666A, um inibidor de LSS (também conhecido como um inibidor de oxidoesqualeno ciclase), foi constatado por causar cataratas<sup>16</sup>. Além disto, o tratamento com lanosterol diminuiu acentuadamente a agregação de proteínas causada por proteínas cristalinas mutantes em cultura de células, enquanto reduzia a severidade da catarata pré-formada, aumentando a clareza da lente em modelos animais. É concebível que a natureza anfipática do lanosterol lhe permita intercalar em áreas de núcleo hidrofóbico de

revestimento de grandes agregados de proteína, permitindo efetivamente que estes agregados se tornem gradualmente solúveis em água novamente.

[0093] Em suma, o lanosterol desempenha um papel chave na inibição da agregação de proteínas de lentes e na redução da formação de cataratas, sugerindo uma nova estratégia para a prevenção e tratamento das cataratas. As cataratas são a principal causa da cegueira e milhões de pacientes, todos os anos, são submetidos a cirurgia de catarata para remover as lentes opacificadas. A cirurgia, apesar de muito bem-sucedida, no entanto está associada a complicações e morbidades. Portanto, o tratamento farmacológico para reverter cataratas poderia ter grandes impactos econômicos e na saúde. Adicionalmente, os presentes resultados podem ter implicações mais amplas no tratamento de doenças de agregação de proteínas, incluindo doenças neurodegenerativas e diabetes, que coletivamente são uma causa significativa de morbidade e mortalidade na população idosa, incentivando a investigação de abordagens de moléculas, tal como aqui demonstrado.

#### Métodos

[0094] Participantes do estudo. Todos os participantes tiveram exames oftalmológicos padrão completos e estudos de imagem. Dados demográficos, fatores de risco e uma amostra de sangue foram coletadas na visita inicial. Foi recrutado uma família consanguínea composta de dois adultos e quatro crianças. Os pais eram primos de primeiro grau, e três de seus quatro filhos foram diagnosticados com degeneração da retina e catarata (Figura 1A). Foram avaliadas mutações LSS em adicionais 154 pedigrees com catarata congênita e

identificada uma outra família com uma mutação W581R homozigótica.

[0095] Captura e sequenciamento do exoma. A captura do exoma foi realizada usando o kit Agilent SureSelect Human All Exon (em solução) de acordo com os protocolos do fabricante. Resumidamente, as amostras de DNA genômico foram aleatoriamente fragmentadas por Covaris com um pico de pares de bases de 150–200 pb para os fragmentos resultantes e adaptadores foram ligados a ambas as extremidades dos fragmentos. Os moldes ligados ao adaptador foram purificados utilizando grânulos de Agencourt AMPure SPRI, e fragmentos com tamanho de inserto ~250 pb foram excisados. O DNA extraído foi amplificado por PCR mediada por ligação, purificado e hibridizado à SureSelect Biotinylated RNA Library (BAITS) para enriquecimento. Os fragmentos hibridados ligados às esferas de estrepavidina, enquanto que os fragmentos não hibridizados foram lavados após 24h. Os produtos de PCR mediados por ligação capturada foram submetidos ao Agilent 2100 Bioanalyzer para estimar a magnitude do enriquecimento. Cada biblioteca capturada foi, então, carregada na plataforma Illumina Genome Analyzer II, e foi realizado o sequenciamento em pares de extremidade com comprimentos de leituras de 90 pb, o que proporcionou uma média de profundidade de cobertura de pelo menos 50x para cada amostra. Os arquivos de imagem crua foram processados pelo software de chamada base Illumina com parâmetros padrão.

[0096] Leitura do mapeamento e detecção de variantes. As leituras das sequências em cada indivíduo foram alinhadas ao genoma de referência humano (NCBI build 37, hg19) utilizando BWA<sup>17</sup> (versão 0.5.9-r16). Arquivos BAM criados pelo BWA foram

então processados usando a conduta GATK<sup>18</sup> de melhores práticas usando o Genome Analysis ToolKit (versão GATK 2.8) para o realinhamento e detecção de variação (SNV e indel). As variações que passaram critérios de filtragem de VQSR foram extraídas para as análises subsequentes.

[0097] Os genótipos de consenso nas regiões-alvo foram chamados por SOAPsnp (vl.03) e BWA (versão 0.5.9-r16) com os parâmetros recomendados. Um genótipo de consenso com qualidade como Phred de pelo menos 20 e pelo menos 4x de profundidade de cobertura foi considerado como sendo um genótipo de alta confiança. Os genótipos que foram diferentes da referência foram extraídos como SNPs candidatos, e os resultados do SNP foram filtrados como se segue: qualidade como Phred de SNP  $\geq 20$ , profundidade total de 4x a 200x, estimativa do número de cópias  $< 2$  e distância entre dois SNP adjacentes não inferior a 5 pb.

[0098] Anotações funcionais de variantes genéticas. Variantes foram funcionalmente anotadas usando ANNOVAR e categorizadas em mutações de *missense* (troca de sentido), *nonsense* (sem sentido), *read-through* e *splice-site*, que são susceptíveis de serem prejudiciais em comparação com mutações sinônimas e não codificantes. Com base nessas anotações, as variantes foram filtradas primeiro para o sítio acceptor de splice não-sinônimo e sítio doador e, então, filtradas contra bancos de dados públicos disponíveis (bancos de dados de variantes do genoma dbSNP129 e 1000). As variantes que se verificaram ser mutações homozigotas nos três indivíduos afetados e mutações heterozigotas nos veículos (pais), mas estavam ausentes nas bases de dados públicas, foram consideradas variantes causais candidatas.

[0099] Avaliação da mutação de LSS e gene. O sequenciamento do DNA de Sanger foi realizado para validar a mutação G588S em LSS. Os 22 éxons do gene LSS foram amplificados por PCR e sequenciados no Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems). Os iniciadores utilizados para amplificar os éxons em LSS são apresentados na Tabela 3A. Foram avaliadas mutações no gene LSS em 154 famílias com cataratas congênitas e identificada uma outra mutação homozigótica, W581R, em uma segunda família consanguínea. Essas duas mutações estavam ausentes em 11.000 cromossomos de controle, incluindo 2.000 cromossomos de uma população de controle não afetada em San Diego e no 1000 Genomes Project, e 8.000 cromossomos de um banco de dados de sequenciamento de exoma na Universidade de Washington. Devido a um relatório prévio de que uma mutação FDFT1 modifica os fenótipos da catarata, foram selecionadas variantes no gene FDFT1, identificamos apenas uma variante não sinônima comum rs4731 (GRch37/hg19: chr8:11666337; NM\_001287742.1: C.134A. G, NM\_001274671.1:p.K45R). A variante foi excluída como a mutação causal, uma vez que uma filha não afetada abrigou a mesma alteração homozigótica e uma frequência relativamente alta da população geral possui essa variante (frequência de alelo inferior ,4 % em dados do 1000 Genomes Project) (Tabela 1E) .

[00100] Modelagem 3D da mutação G588S. O modelo do mutante G588S foi construído a partir de duas estruturas, como determinado por Ruf et al.<sup>20</sup> e depositado no Protein Data Bank como as entradas 1W6K e 1W6J<sup>12</sup>. As coordenadas de raio X foram utilizadas para construir um modelo de átomo completo da enzima e foi refinada utilizando o programa

Internal Coordinate Mechanics (ICM) (Mecânica de Coordenadas Internas) e seu protocolo de conversão PDB<sup>21</sup>. Para analisar o efeito do choque induzido pela mutação do G588S na ligação de lanosterol, foram analisadas todas as cadeias laterais envolvidas no bolso da enzima interagindo com o lanosterol utilizando a estrutura 1W6K. As áreas de contato foram calculadas como as diferenças entre a área acessível por solvente de cada resíduo com e sem lanosterol e foram classificadas por tamanho utilizando o programa ICM<sup>22</sup>.

[00101] Constructos de plasmídeos e mutagêneses sítio-dirigida. O clone contendo cDNA de LSS foi adquirido de Thermo Scientific Inc. A sequência de codificação do LSS do tipo selvagem foi clonada e inserida no plasmídeo pCDNA3.1-N-Flag (Invitrogen). Os mutantes foram construídos através da mutagênese sítio-dirigida através da extensão sobreposta com o uso de PCR. Os iniciadores comuns de PCR foram: NdeI forward, 59-CATATGACGG AGGGCACGTGTCT-39 e Xhol reverse, 59-CTCGAGTCAGGGTGGCCA GCAAG-39. Os iniciadores para construção dos mutantes W581R e G588S foram: W581R forward, 59-TGGGAAGGCTCCGGGAGTTGCT-39 reverse, 59-GTGAAGCAAATCCCCGGGAGCCTTC-39; G588S forward, 59-GCTTCACCTACAGCACCTGGTTG-39; G588S reverse, 59-CCAAACCAGGTGCTGTAGGTGAAG-39. Os plasmídeos pCDNA3.1-N-Flag recombinantes contendo os genes LSS do tipo selvagem ou mutado genes foram transformados em células DH5a de *E. coli*. Os cDNA de aA-, aB-, bB2-, cC- e cD-crystalina foram clonados a partir do cDNA total de lentes humanas como descrito previamente<sup>23-26</sup>. Os mutantes foram construídos por mutagênese sítio-dirigida utilizando os iniciadores listados na Tabela 3B. Os fragmentos amplificados foram digeridos por Xhol e

BamHI e, então, inseridos no vetor de expressão eucariótica peGFP-N1 ou no vetor de expressão procariótica pET28a. Os plasmídeos foram obtidos utilizando o kit Plasmid Maxiprep (Vigorous) e verificado por sequenciamento de DNA. Constructos do gene cristalina foram feitos com uma proteína de fusão eGFP C-terminal, enquanto o LSS foi feito como uma proteína marcada com Flag N-terminal.

[00102] Cultura e transfecção de células. As células HeLa e células epiteliais das lentes humanas B-3 (HLEB-3) foram obtidas a partir do ATCC. As células progenitoras de lentes humanas foram isoladas a partir de um olho humano fetal<sup>27</sup>. As células HeLa foram cultivadas em meio DMEM contendo FBS a 10 % (Gibco). As células HLEB-3 foram cultivadas em meios F12 com FBS a 20 %, enquanto as células progenitoras de lentes humanas foram cultivadas em meio MEM contendo FBS a 20 % e 10 mg ml<sup>-1</sup> de FGF (Gibco). Todas as células foram cultivadas a 37 uC em incubadora de CO<sub>2</sub> a 5%. As células rotineiramente testaram negativo para contaminação do micoplasma.

[00103] Para verificar o efeito da expressão do LSS em teor de esterol, células HeLa foram transfectadas com LSS do tipo selvagem ou LSS mutantes fundidos com um marcador Flag no N-terminal da região de codificação. As células foram colhidas após 24 h da transfecção e a fração de lipídio foi extraída por análise LC-MS. As células transfectadas com os plasmídeos vetor pcDNA3.1-N-Flag foram usadas como controle. Os níveis de expressão do LSS do tipo selvagem e mutante foram normalizados pela análise de western blot usando anticorpos de camundongo anti-Flag (F1804; Sigma-Aldrich) e anticorpos de camundongo anti-actina (BS6007M; Bioworld Technology).

[00104] Para verificar o efeito do lanosterol na agregação cristalina, as células progenitoras de lentes humanas foram co-transfetadas com LSS e diversos constructos de cristalina por 4 h. As células co-transfetadas com cristalinas mutantes e pcDNA3.1-N-Flag foram usadas como um controle. As células progenitoras de lentes humanas co-transfetadas com LSS e constructos de mutantes de cristalina foram cultivados por 12h antes do ensaio para agregados. Os experimentos de resgate foram realizados após 16h por adição de 40 mM de esteróis (lanosterol ou colesterol, Sigma-Aldrich) ao meio de cultura de células por 2h, o qual foi, então, substituído por meio de cultura fresco e células cultivadas por 24h. A porcentagem de células com agregados cristalinos foi calculada a partir de dez campos de visão selecionados randomicamente. Os valores do grupo LSS do tipo selvagem, grupo mutante e grupo mutante mais lanosterol foram calculados. As células tratadas com 1% de DMSO foram usadas como os controles.

[00105] O impacto do LSS e lanosterol na agregação cristalina intracelular foi avaliado em estudos de observação simples-cego. Os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes. Os valores de P foram calculados usando testes t de Student. Microscopia por fluorescência. Quantidades iguais de células progenitoras de lentes humanas, células HLEB-3 ou células HeLa foram semeadas em lâminas de vidro pré-tratadas com TC (Solarbio). Após cultura por 24h para alcançar 90% de confluência, as células foram transfetadas com plasmídeos contendo diversos genes LSS ou cristalina ou co-transfetadas com plasmídeos contendo um determinado gene cristalina e aqueles contendo o gene LSS do

tipo selvagem ou mutado. Os controles foram células transfetadas com os plasmídeos contendo peGFP-N1 e/ou peDNA3.1-N-Flag. Ambas a transfecção e co-transfecção foram realizadas usando Lipofectamine 3000 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

[00106] O efeito do LSS do tipo selvagem ou mutado na agregação intracelular de diversos mutantes de cristalina causadores de catarata foi avaliado pela co-expressão de Flag-LSS e cristalina-GFP nas células progenitoras de lentes humanas, células HLEB-3 ou células HeLa. As distribuições intracelulares das proteínas foram visualizadas usando GFP ou anticorpo contra Flag. Após a co-transfecção por 4 h, as células foram cultivadas em meio fresco por 24 h e, então, analisadas por microscopia.

[00107] O efeito do lanosterol ou colesterol na formação de agressoma de diversas cristalinias foi estudado pela transfecção das células com plasmídeos contendo diversos genes cristalina. As células foram incubadas por 24h para permitir a expressão eficiente das proteínas e formação de agressoma. As células foram, então, tratadas com 0 - 40 mM de esteróis em 1% (para células progenitoras de lentes humanas) ou 2% (para células HeLa) de DMSO. As células tratadas com 1% ou 2% de DMSO foram usadas como os controles. Após o tratamento por 2 h, o meio foi substituído por meio fresco. Após 12 h, as células foram usadas para análise microscópica.

[00108] As amostras para microscopia foram preparadas lavando as lâminas por três vezes com tampão fosfato salino (PBS). As células foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 40 min, seguida por outras três lavagens com PBS. As

células foram permeabilizadas com Triton X-100 (Sigma) a 0,1% em PBS por 10 min e bloqueadas com soro de cabra normal a 5 % em PBS por 1h a 37°C. A imunocoloração foi realizada pela adição de anticorpo de camundongo anti-Flag (1:500) ou anticorpo de camundongo anti-p62 (1:200, ab56416; Abcam) em tampão PBS contendo soro de cabra normal a 5 % e incubadas por 1h a 37°C. Então, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS e, adicionalmente, incubadas com IgG de cabra anti-camundongo conjugado com Alexa 649 (1:250) por 1h em temperatura ambiente. Os núcleos foram contra-corados com Hoechst 33342 (Invitrogen). As células montadas foram analisadas usando um microscópio confocal Carl Zeiss LSM 710.

[00109] Imagens de células vivas. As células progenitoras de lentes humanas foram transfetadas com plasmídeos contendo mutantes de aA-cristalina (Y118D). Após um período de transfecção de 24h, as células com expressão estável de mutantes de aA-cristalina (Y118D) foram selecionadas por incubação em meio de cultura contendo 0,8 mg ml<sup>-1</sup> de G418 por 7 dias. Então, as células obtidas foram semeadas em discos de cultura de células de fundo de vidro (In Vitro Scientific) e tratadas com 1% de DMSO, 40 mM de colesterol em 1% de DMSO ou 40 mM de lanosterol em 1% de DMSO por 4 h. O meio de cultura fresco foi adicionado e as células foram analisadas por imagens de células vivas em série. As imagens de células foram visualizadas com um microscópio Olympus IX81 e capturadas com o software CellsSens Dimension (Olympus). A análise quantitativa do tamanho dos agregados foi realizada medindo-se a intensidade da fluorescência dos agregados p62-positivos usando rastreamento de única partícula nas imagens

de células vivas. As imagens de células vivas foram conduzidas usando três replicatas biológicas com 1-8 repetições cada.

[00110] Extração de lipídio das células. A extração de lipídios foi realizada usando o método de Bligh e Dyer<sup>28</sup>. Em resumo, ~1 x 10<sup>6</sup> - 10<sup>7</sup> de células HeLa foram lavadas de 3-5 vezes com PBS e, então, raspadas em 400 mL de metanol gelado e transferidas para um tubo Eppendorf de 1.5 mL com a adição de 200 mL de clorofórmio. As amostras foram agitadas por vórtext por 1 min e, então, misturadas com 300 mL de 1 M KCl. As fases orgânica e aquosa foram separadas por microcentrifugação a 20.817 x g por 5 min a 4°C. Após a separação, a fase orgânica inferior foi coletada. Então, a fase aquosa residual foi re-extraída duas vezes usando 300 mL de clorofórmio. As fases orgânicas coletadas foram secas usando um concentrador de amostras sob vácuo SpeedVac. As amostras secas foram armazenadas a 280°C para posterior análise LC-MS.

[00111] Análise LC-MS. Os extratos de lipídio secos foram ressuspensos em 100 mL de metanol. As amostras foram agitadas por vórtext por 10 min, tratadas por sonicação ultrassônica 80 W por 30 min, micro centrifugadas a 20.817 g por 10 min e, então, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo Eppendorf. O tratamento por microcentrifugação foi repetido três vezes. As amostras derivadas foram analisadas por um LC/MS quadrupolo Agilent 1290/6460 triplo usando uma fonte de Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) alternativa. Os lipídios foram separados usando uma coluna Agilent SB-C18. O monitoramento de íon seletivo foi realizado usando o modo de ionização eletrônica. O lanosterol e

colesterol altamente puros foram usados como controles. A determinação por MS foi realizada usando uma temperatura de gás de 350°C, uma taxa de fluxo de gás de 4 L min<sup>-1</sup>, um nebulizador de 60 p.s.i (413,69 kPa), um vaporizador de 350°C, uma capilaridade de 3.500 V e uma corrente de corona de 4 mA. Para otimizar a sensibilidade e especificidade, dois íons qualificadores foram selecionados para a análise de MS de cada composto (369,3/161,1 e 369,3/147 para colesterol e 409,2/191,3 e 409,2/109 para lanosterol). Western blotting. Os lisados celulares foram preparados em tampão RIPA contendo 50 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, Triton X-100 a 1%, 1 mM EDTA, deoxicolato de sódio a 0,5% e SDS a 0,1%. As frações de sobrenadante e de precipitação foram separados por centrifugação. As proteínas foram separadas por um SDS-PAGE a 12,5% e transferidas para uma membrana PVDF (GE Healthcare). Os anticorpos de camundongo contra Flag (F1804; Sigma-Aldrich) ou GFP (MB2005; Bioworld Technology) foram usados para identificar o LSS e proteínas cristalinas superexpressas, respectivamente. A quantificação das bandas de western blot foi alcançada usando o software GELPRO (Media Cybernetics). Os dados quantitativos apresentados foram calculados a partir de três experimentos independentes.

[00112] Expressão e purificação de proteínas. As proteínas b- e c-cristalinas recombinantes do tipo selvagem e mutadas marcadas com His foram superexpressas em *Escherichia coli* e purificadas utilizando uma coluna de afinidade de Ni-NTA seguida de cromatografia de filtração em gel utilizando o mesmo protocolo conforme descrito em outro lugar<sup>23,24,26,29</sup>. A superexpressão e purificação das αA- e αB-

cristalinas não marcadas foram realizadas conforme descrito anteriormente<sup>30</sup>. A pureza das proteínas foi estimada como sendo acima de 95%, como avaliado por uma banda homogênea em SDS-PAGE a 12,5%, native-PAGE a 10% e um único pico no perfil de cromatografia de exclusão de tamanho. A concentração da proteína foi determinada de acordo com o método de Bradford utilizando BSA como o padrão<sup>31</sup>. Todas as amostras de proteína foram preparadas em 20 mM tampão PBS contendo 150 mM NaCl, 1 mM EDTA e 1 mM DTT.

[00113] Agregação de proteínas e dissociação dos agregados. Os agregados de proteínas  $\alpha$ A- e  $\alpha$ B-cristalinas do tipo selvagem e mutadas foram obtidos por aquecimento das soluções de proteína contendo 1 M cloreto de guanidina (ultrapure, Sigma-Aldrich) a uma concentração de 5 mg/mL a 60°C por 2h. Os agregados das b- e c-cristalinas do tipo selvagem e mutadas foram preparados pelo aquecimento das soluções de proteína contendo 1 M cloreto de guanidina a 37°C durante 48 h. A formação de agregados foi confirmada por observações de fluorescência de ThT, turbidez (absorbância a 400 nm) e de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Os agregados pré-formados foram ressuspensos em 20 mM PBS com uma concentração final de 0,2 mg/mL (aproximadamente 10 mM). Os agregados ressuspensos foram tratados com 500 mM lanosterol ou colesterol em lipossomas formados por 500 mM DPPC (Sigma-Aldrich) a 37°C. Os agregados tratados com 500 mM lipossoma de DPPC foram utilizados como um controle negativo. Após 24h de tratamento, as soluções de proteína foram utilizadas para observações de fluorescência de ThT, turbidez e TEM coradas negativamente. As amostras de TEM foram preparadas por deposição das

soluções de proteína em uma grade de cobre revestida por carbono recentemente descarregada-luminescente. As amostras de coloração negativa foram obtidas por coramento da grade com acetato de uranilo a 1,25% durante 30s. As imagens de TEM coradas negativamente foram obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão Hitachi H-7650B com uma tensão de 120 kV e uma ampliação de 48.000.

[00114] Tratamento de lentes de coelho com catarata. Os coelhos foram eutanizados por inalação de CO<sub>2</sub> e as lentes foram imediatamente dissecadas e tratadas com veículo ou lanosterol dissolvido em veículo para fazer soluções de 25 mM. Os tecidos de lente foram incubados nestas soluções durante 6 dias no escuro à temperatura ambiente. As cataratas foram examinadas sob um microscópio e fotografadas. O grau de catarata foi avaliado por um examinador cego, utilizando um sistema de classificação de opacificação previamente descrito, ilustrado abaixo<sup>32,33</sup>. Melhorias na clareza e transparência da lente foram quantificadas através de inspeção visual e classificação. A claridade da lente foi pontuada pela transmissão de luz, clareza de uma imagem de grade debaixo da lente (Figura 12), e melhoria na claridade global de uma lente ou melhoria na clareza de áreas localizadas de catarata cortical. O teste de Wilcoxon foi utilizado para avaliar o efeito do tratamento.

[00115] Sistema de classificação de cataratas. Grau 0: ausência de opacificação (linhas de grade claramente visíveis); N Grau 1: um leve grau de opacificação (opacidade mínima das linhas de grade, com linhas de grade ainda visíveis); N Grau 2: presença de opacificação difusa envolvendo quase toda a lente (opacidade moderada das linhas

de grade, com principais linhas de grade visíveis); N Grau 3: presença de opacificação extensa e espessa envolvendo a lente inteira (opacidade total das linhas de grade, com linhas de grade não vistas de nenhuma maneira).

[00116] Preparo de nanopartículas carregadas com fármaco. O lanosterol foi carregado em uma nanopartícula híbrida de lipídio-polímero por meio de um método de nanoprecipitação adaptada. Em resumo, a concentração desejada de lanosterol foi misturada com polímero de policaprolactona (PCL) dissolvido em acetonitrila. Foram dissolvidos lecitina e 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-carboxi (polietilenoglicol) 2000 (DSPE-PEG-COOH) em uma solução aquosa de etanol a 4% a 20% do peso do polímero PLC e aquecido acima de 60uC. A solução de lanosterol/PCL foi, então, adicionada à solução de lipídio pré-aquecida sob agitação suave seguida por rigorosa agitação em vórtex durante 3 min. A solução da mistura foi, então, agitada durante 2h para permitir a formação das nanopartículas e a evaporação da acetonitrila. Em seguida, a solução de nanopartícula foi lavada três vezes utilizando um filtro centrífuga Amicon Ultra-4 (Millipore) com um corte de peso molecular de 10 kDa para remover o resto de solvente orgânico e moléculas livres. As nanopartículas resultantes foram, então, ressuspensas em tampão PBS para subsequente utilização. O tamanho, distribuição de tamanho e o potencial zeta superficial das nanopartículas carregadas com fármaco foram caracterizados por espalhamento dinâmico de luz. O rendimento da carga de lanosterol foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência.

[00117] Tratamento de lentes com cataratas em cachorros.

Para avaliar o efeito do tratamento com lanosterol em cataratas em animais vivos, cachorros foram pré-medicados com injeções intramusculares de acepromaxina e butorfanol. Após 20 min, a indução da anestesia foi realizada por aplicação de propofol intravenoso. Os cachorros foram então imediatamente intubados e mantidos em oxigênio e isoflurano a 2% em 21 min<sup>-1</sup>. Inicialmente, as nanopartículas carregadas com lanosterol (100 mg) foram injetadas na cavidade vítreia no olho de teste usando uma agulha de calibre 28 e, então, foram fornecidas a cada 3 dias ao longo da duração do experimento. Os olhos ou olhos de simulação de tratamento foram randomizados. O olho controle recebeu uma injeção com veículos sem nanopartículas como um controle negativo. Os olhos do tratamento foram tratados com lanosterol em colírio tópico (ver abaixo para a formulação de colírio). Uma gota de 50 ml de lanosterol foi administrada três vezes ao dia ao olho teste ao longo de 6 semanas. O grau de severidade da catarata foi examinado pela lâmpada de fenda e fotografado no início e no final do período de tratamento de 6 semanas. Antes dos exames, as pupilas estavam dilatadas com tropicamida a 1% e fenilefrina a 10%. O grau de severidade da catarata foi avaliado por um examinador cego e pontuado com base no estágio da catarata canina, mostrado abaixo<sup>35</sup>. Foram quantificadas melhorias na clareza e na transparência da lente. O teste de Wilcoxon foi utilizado para avaliar o efeito do tratamento.

[00118] Sistema de classificação de cataratas caninas.  
Grau 0: ausência de opacificação (sem catarata); N Grau 1: um leve grau de opacificação (fase incipiente); N Grau 2: presença de opacificação difusa envolvendo quase toda a lente

(estágio imaturo); N Grau 3: presença de opacificação extensa e espessa envolvendo toda a lente (fase madura). Solução de veículo tópica. Adicionou-se H<sub>2</sub>O destilada duas vezes a 1,1 g de (EDTA)<sub>2</sub>Na combinado com 0,055 g de cloreto de alquildimetilbenzilamônio até alcançar um volume final de 1,1 l (pH 5,66). 25 mM lanosterol na solução de veículo tópica. Adicionou-se H<sub>2</sub>O destilada duas vezes a uma mistura de 12,5 g de lanosterol, 1,1 g (EDTA)<sub>2</sub>Na, 0,055 g de cloreto de alquildimetil-benzilamônio e 200 mL de EtOH até um volume final de 1,1 l.

[00119] Em uma modalidade, uma formulação de solução de colírio de lanosterol é:

### **Receita**

Uma Solução apenas para veículo:

Hidroxipropil-β-Ciclodextrina	165 g
Polissorbato 80	1 g
EDTA2NA	1,1 g
Cloreto de Alquildimetilbenzilamônio	0,055 g
EtOH	200 mL

Então adicionar ddH<sub>2</sub>O até que o volume final seja 1,1 L (pH 5,66)

5 mM Lanosterol em uma solução veículo:

Lanosterol	2,5 g
Hidroxipropil-β-Ciclodextrina	165 g
Polissorbato 80	1 g
EDTA2NA	1,1 g
Cloreto de alquildimetilbenzilamônio	0,055 g
EtOH	200 mL

Então adicionar ddH<sub>2</sub>O até que o volume final seja 1,1 L (pH 5,66)

**Tabela 1: Sequenciamento do exoma e variantes****Tabela 1a. Sumário da produção de dados do sequenciamento do exoma**

Amostra	Rendimento	Profundidade	Taxa de desajustamento	Cobertura da região alvo	Fração do alvo coberto ≥ 4x	Fração do alvo coberto ≥ 10x
	efetivo total (Mb)	média de sequenciamento				
IV-1	3.409,20	60,16	0,20%	99,60%	99,10%	97,60%
IV-2	3.314,58	58,62	0,20%	99,60%	99,20%	97,80%
IV-3	3.327,63	57,24	0,20%	99,80%	99,20%	97,40%
III-2	3.029,40	51,89	0,21%	99,80%	99,30%	97,70%
III-1	6.877,08	54,24	0,29%	96,30%	89,40%	81,80%
IV-4	6.311,78	44,12	0,29%	96,50%	88,80%	79,80%

**Tabela 1b. Sumário das variantes detectadas**

Amostra	Tion Total	Hetero-zigoto	Homozi-goto	Troca de sentido	Sem sentido	Read-through	Sinônimo	Splitting	Intergênico	Intrô-nico
IV-1	61.189	35.571	25.618	6.105	69	39	7.296	32	5.371	36.598
IV-2	60.829	34.698	26.131	6.074	62	41	7.211	38	5.178	36.572
IV-3	61.078	35.238	25.840	6.221	78	43	7.265	38	5.099	36.544

III-2	62.753	39.001	23.752	6.393	64	38	7.588	34	5.764	36.924
III-1	80.067	49.694	30.373	7.247	93	49	8.166	47	15.063	41.391
IV-4	80.893	48.211	32.682	7.252	85	50	8.184	50	14.547	42.414

**Tabela 1c. Conduta de priorização de variantes após sequenciamento do exoma**

Filtros	III-1 (pai portador)	III-2 (mãe portadora)	IV-1 (filha afetada)	IV-2 (filho afetado)	IV-3 (filho afetado)	IV-4 (filha não afetada)	Combinação
Variações totais	80.067	62.753	61.189	60.829	61.078	80.893	-
Troca de sentido,							
Sem sentido,	7.389	6.495	6.213	6.177	6.342	7.387	-
Splicing							
Afetado:							
1/1;							
portador:	5.792	4.661	3.127	3.123	3.085	5.638	9
0/1; não							
afetado:							

0/1 ou							
0/0*							
Não em dbSNP	3.724	2.969	1.954	1.929	1.928	3.589	5
Não em 1000 Genomes	1.032	767	227	264	245	1.059	1
Project							
Dano previsto	267	269	31	45	41	264	1

Homozigose na criança afetada, heterozigose no portador, sem mutantes homozigotos na  
criança não afetada.

**Tabela 1d. Sumário dos dados genotípicos do genoma completo**

Amostra	Loci total	Capturado	SNP
IV-1	4.641.218	4.440.318	559.832
IV-2	4.641.218	4.446.992	605.499
IV-3	4.641.218	4.445.267	526.794
III-2	4.641.218	4.448.054	537.925
III-1	4.641.218	4.446.581	574.880

IV-4	4.641.218			4.450.657			584.347			
Posição (GRch37/hg19)	refSNP	REF	ALT	Fun- ção	III-1 (pai portador)	III-2 (mãe portadora)	IV-1 (filha afetada)	IV-2 (filho afetado)	IV-3 (filho afetado)	IV-4 (filha não afetada)
chr8:11666337	rs4731	A	G	Não sinônimo	A/G	A/G	G/G	A/G	G/G	G/G
chr8:11683653	rs904011	T	C	Sinônimo	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C

**Tabela 2: Efeito do tratamento com lanosterol em lentes de catarata de coelho e em catarata em cachorro**

**Tabela 2a. Efeito do tratamento com lanosterol em lentes de catarata de coelho**

Número da amostra	Antes do tratamento	Após o tratamento
1	3	1
2	2	0
3	2	1
4	2	0
5	3	1
6	2	1
7	2	1

8	2	0
9	1	1
10	1	0
11	2	1
12	1	1
13	2	1

**Tabela 2b. Efeito do tratamento com lanosterol em catarata de cachorro**

Olho de estudo	Grupo de tratamento		Grupo de controle	
	Antes	Depois	Antes	Depois
1	2	1	1	1
2	1	0	2	2
3	2	1	1	1
4	3	1		
5	1	0		
6	2	0		
7	2	1		

**Tabela 3: Iniciadores usados para sequenciamento de cada éxon no gene LSS humano e construção de mutantes de cristalina**

**Tabela 3a. Iniciadores usados para amplificação por PCR e sequenciamento de cada éxon no gene LSS humano**

Amplificado	Sequência (5'-3')
LSS-Exon 1-F	GCCTGAGCGCCTGCCGAGGCCT
LSS-Exon1-R	GACACCTGAGGACCACCGGCCAT
LSS-Exon2-F	GTGGTCCTAGGTGCTGAGGAGA
LSS-Exon2-R	CGTGCTCCTCACGGCTCACCCCT
LSS-Exon3-F	CTTGGGCTGTATGTGAAGAGGGT
LSS-Exon3-R	CCTAGACCAAGGCTGGGCCAGGAT
LSS-Exon4-F	GTTGGAGTGAGGTGCTCAGGAGGA
LSS-Exon4-R	GCAGCTGCCTGGAAACCCAAGCAT
LSS-Exon5-F	GCATTCTTAGTTCTGAGGAAACTC
LSS-Exon5-R	CCACTGTTCACTG CAAGTG CAT
LSS-Exon6-F	CAGAGGGTGAAGCTTCCCAGCT
LSS-Exon6-R	GCTGTCACAGCCTGCACCTGAC
LSS-Exon7-F	GAAAGGGCCAAGGTATGGATGCT
LSS-Exon7-R	GTGAGTGGACAGGTGTGGTTAGAT
LSS-Exon8-F	GAGCCAGGCCTACCAGGTGCT
LSS-Exon8-R	GCAGGGATGAGTGCCTGAAT
LSS-Exon9-F	GCAGTGCATGGAGCTCCAGGCT
LSS-Exon9-R	CCAGGAAACCCCCTCCAGCT
LSS-Exon10-F	GTGGATCTGGACGAGACCTTGT
LSS-Exon 10-R	CACTGGGATGCAGCTGGGCT
LSS-Exon11-F	GTGCAGGGTCTGGGTAGCAGCT
LSS-Exon 11-R	GACATGATTGCAAAGGAAGCAT
LSS-Exon12-F	CTGGAGGCAGTGGCTGGGAGT
LSS-Exon 12-R	GCAAGTGTGTGGCCAGCAGTGCT
LSS-Exon13-F	GGCAGGATGTGCCAGGACCAT
LSS-Exon 13-R	GCACCTCTGCCTGCAGGAGCT
LSS-Exon14-F	CCAGTCTGTCTCAGCGATGT
LSS-Exon 14-R	CCAAAAACGCCAAGGGAGGAGT
LSS-Exon15-F	CTGGCTGCACCCACACCTTGGT
LSS-Exon 15-R	GCTCATCTGCAGGACACGAGGT
LSS-Exon16-F	GTTGTCAGCCCTAGTGTGCCT
LSS-Exon 16-R	CAGTTTGTGTACCAAGTGCT
LSS-Exon17-F	GAGCTGCAGAGCCTGGCAGCCA
LSS-Exon 17-R	CCGTGTCACAGAATGATGCGT
LSS-Exon18-F	GAATTGGGATAGGTAAACTGCT
LSS-Exon 18-R	CGCAGTGTGTGAGAGCAGAACCT
LSS-Exon19-F	CTTAATGCCTGAGGCAGTGGAGT
LSS-Exon 19-R	CACTCATGACAGAGCATTGGGTT
LSS-Exon20-F	CAAGGCAGCCTGCTGGGGTGA
LSS-Exon 20-R	CACCGGCTCACAGCTGAGTGT
LSS-Exon21-F	CTCACTGCAGCATTCCAGGGTT

LSS-Exon21-R	GTGGAAACAGCCATGCACGCT
LSS-Exon22-F	GCCAACAGCCAGGGCTCCAGTT
LSS-Exon 22-R	GGTTGGAGGCCAAGACAGGGT

**Tabela 3b. Iniciadores usados na construção de mutantes de cristalina**

Gene	Iniciador (5'-3')
$\alpha A$ -R116C-For	TTCCCCGTGAGTTCCACTGCCGCTACCGCCTGCCGTCGCTGC
$\alpha A$ -R116C-Rev	CGGCAGGGCGTAGCGGCAGTGGAACCTCACGGG
$\alpha A$ -R116H-For	TTCCCCGTGAGTTCCACCACCGCTACCGCCTGCCGTCGCCAC
$\alpha A$ -R116H-Rev	CGGCAGGGCGTAGCGGTGGTGGAACTCACGGG
$\alpha A$ -Y118D-For	GAGTTCCACCGCCGCGACCCGCTGCGTCCAACCTACGAC
$\alpha A$ -Y118D-Rev	CGTTGGACGGCAGGGGGTCGCGGGTGGAACT
$\alpha B$ -R120G-For	CAGGGAGTTCCACGGGAAATACCGGATAAGGGGG
$\alpha B$ -R120G-Rev	GGATCCGGTATTTCGGTGGAACTCCCT
$\beta B2$ -V187E-For	AGGTGCAGTCCAGCGCCGTATGTGGAG
$\beta B2$ -V187E-Rev	ATACGGCGCTCGGACTGCACCT
$\beta B2$ -V187M-For	AGGTGCAGTCCATGCCGCGTATGTGATG
$\beta B2$ -V187M-Rev	ATACGGCGCTCGGACTGCACCT
$\beta B2$ -R188H-For	TGCAGTCCGTCGACCGTATCCCGCCAC
$\beta B2$ -R188H-Rev	GGATACTGGTGCACGGACTGCA
$\gamma C$ -G129C-For	CACGTCTGGAGTGTGCTGGGCTG
$\gamma C$ -G129C-Rev	CAGCAGCACTCCAGCACGTG
$\gamma D$ -W43R-For	GTGAGACAGGGCTGCCGATGCTCTATGAGCTGGCGG
$\gamma D$ -W43R-Rev	GCTCATAGAGCATCGGCAGCCGCTGTCCAC

Referências:

- [00120] 1 Pascolini, D. & Mariotti, S. P. Global estimates of visual impairment: 2010. Br J Ophthalmol 96, 614-618, doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-300539 (2012).
- [00121] 2 Bloemendaal, H. et al. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. Prog. Biophys. Mol. Biol. 86, 407-485 (2004).
- [00122] 3 Moreau, K. L. & King, J. A. Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. Trends Mol Med 18, 273-282, doi: S1471-4914(12)00039-1 [pii] 10.1016/j.molmed.2012.03.005 (2012).
- [00123] 4 Huff, M. W. & Telford, D. E. Lord of the rings-the mechanism for oxidosqualene:lanosterol cyclase becomes crystal clear. Trends Pharmacol Sci 26, 335-340, doi:S0165-6147(05)00127-6 [pii] 10.1016/j.tips.2005.05.004 (2005).
- [00124] 5 Diehn, J. J., Diehn, M., Marmor, M. F. & Brown,

P. O. Differential gene expression in anatomical compartments of the human eye. *Genome Biol* 6, R74, doi:gb-2005-6-9-r74 [pii] 10.1186/gb-2005-6-9-r74 (2005).

[00125] 6. Mori, M. et al. Lanosterol synthase mutations cause cholesterol deficiency-associated cataracts in the Shumiya cataract rat. *J. Clin. Invest.* 116, 395 – 404 (2006).

[00126] 7 Ng, P. C. & Henikoff, S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 11, 863–874, doi: 10.1101/gr.176601 (2001).

[00127] 8. Adzhubei, I. A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods* 7, 248 – 249 (2010).

[00128] 9. Pollard, K. S., Hubisz, M. J., Rosenbloom, K. R. & Siepel, A. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res.* 20, 110 – 121 (2010).

[00129] 10. Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M. & Seelow, D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep- sequencing age. *Nature Methods* 11, 361 – 362 (2014).

[00130] 11. Seelow, D., Schuelke, M., Hildebrandt, F. & Nurnberg, P. Homozygosity Mapper – an interactive approach to homozygosity mapping. *Nucleic Acids Res.* 37, W593 – W599 (2009)

[00131] 12 Thoma, R. et al. Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualene cyclase. *Nature* 432, 118–122, doi:10.1038/nature02993 (2004).

[00132] 13. Dobson, C. M. Protein folding and misfolding. *Nature* 426, 884–890 (2003).

[00133] 14. Ecroyd, H. & Carver, J. A. Crystallin proteins and amyloid fibrils. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 62 – 81 (2009).

[00134] 15. Braun, N. et al. Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone aBcrystallin elucidated by a triple hybrid approach. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108, 20491 – 20496 (2011)

[00135] 16. Cenedella, R. J. et al. Direct perturbation of lens membrane structure may contribute to cataracts caused by U18666A, an oxidosqualene cyclase inhibitor. *J Lipid Res* 45, 1232–1241, doi:10.1194/jlr.M300469-JLR200 M300469–JLR200 [pii] (2004).

[00136] 17. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 26, 589–595 (2010).

[00137] 18. DePristo, M. A. et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genet.* 43, 491–498 (2011).

[00138] 19. Ruf, A. et al. The mono topic membrane protein human oxidosqualene cyclase is active as monomer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 247–254 (2004).

[00139] 20. Cardozo, T., Totrov, M. & Abagyan, R. Homology modeling by the ICM method. *Proteins* 23, 403–414 (1995).

[00140] 21. Abagyan, R. & Argos, P. Optimal protocol and trajectory visualization for conformational searches of peptides and proteins. *J. Mol. Biol.* 225, 519–532 (1992).

[00141] 22. Xu, J. et al. The congenital cataract-linked A2V mutation impairs tetramer formation and promotes aggregation of bB2-crystallin. *PLoS ONE* 7, e51200 (2012).

[00142] 23. Wang, B. et al. A novel CRYGD mutation (p.Trp43Arg) causing autosomal dominant congenital cataract in a Chinese family. *Hum. Mutat.* 32, E1939–E1947 (2011).

[00143] 24. Gu, F. et al. A novel mutation in Alpha A-crystallin (CRYAA) caused autosomal dominant congenital cataract in a large Chinese family. *Hum. Mutat.* 29, 769 (2008).

[00144] 25. Li, X.-Q. et al. A novel mutation impairing the tertiary structure and stability of cC-crystallin (CRYGC) leads to cataract formation in humans and zebrafish lens. *Hum. Mutat.* 33, 391-401 (2012).

[00145] 26. Nagineni, C. N. & Bhat, S. P. Human fetal lens epithelial cells in culture: an in vitro model for the study of crystallin expression and lens differentiation. *Curr. Eye Res.* 8, 285-291 (1989).

[00146] 27. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917 (1959).

[00147] 28. Wang, S., Leng, X.-Y. & Yan, Y.-B. The benefits of being b-crystallin heteromers: bBl-crystallin protects bA3-crystallin against aggregation during co-refolding. *Biochemistry* 50, 10451-10461 (2011).

[00148] 29. Sun, T. -X., Das, B. K. & Liang, J. J. N. Conformational and functional differences between recombinant human lens  $\alpha$ A- and  $\alpha$ B-crystallin. *J. Biol. Chem.* 272, 6220-6225 (1997).

[00149] 30. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976).

[00150] 31. Geraldine, P. et al. Prevention of selenite-induced cataractogenesis by acetyl-L-carnitine: an experimental study. *Exp. Eye Res.* 83, 1340-1349 (2006).

[00151] 32. Makri, O. E., Ferlemi, A. V., Lamari, F. N. & Georgakopoulos, C.D. Saffron administration prevents selenite-induced cataractogenesis. Mol. Vis. 19, 1188-1197 (2013).

[00152] 33. Zhang, L. et al. Self-assembled lipid-polymer hybrid nanoparticles: a robust drug delivery platform. ACS Nano 2, 1696-1702 (2008). La Croix, N. Cataracts: When to refer. Top. Companion Anim. Med. 23, 46-50 (2008).

[00153] 34. La Croix, N. Cataracts: When to refer. Top. Companion Anim. Med. 23, 46-50 (2008).

**REIVINDICAÇÕES**

1. Uso de uma composição caracterizado por ser para o preparo de medicamento para tratar e/ou prevenir distúrbios visuais em um indivíduo, a referida composição compreende um veículo oftálmico farmaceuticamente aceitável e uma quantidade farmaceuticamente eficaz de lanosterol.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido indivíduo apresenta ou está em risco de desenvolver um distúrbio visual que afeta a estrutura normal das lentes no olho.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido distúrbio visual é selecionado do grupo que consiste em catarata, cataratas congênitas, opacidade cortical, catarata subcapsular posterior, presbiopia, esclerose nuclear, distúrbio degenerativo da retina, doença de Refsum, síndrome de Smith-Lemli-Opitz, distrofia da córnea cristalina de Schnyder, drusas, degeneração macular associada à idade e retinopatia diabética.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que de o referido lanosterol inibe a agregação das proteínas cristalinas.

5. Uso de uma composição caracterizado por ser no preparo de medicamento para tratar catarata ou cegueira/deficiência visual em um indivíduo, a referida composição compreende um veículo oftálmico farmaceuticamente aceitável e uma quantidade farmaceuticamente eficaz de lanosterol, em que o referido lanosterol dissolve o(s) agregado(s) das proteínas cristalinas da lente no olho do referido indivíduo.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado

pelo fato de que a proteína cristalina da lente é qualquer uma dentre α-cristalina, β-cristalina ou γ-cristalina.

7. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que a referida composição é formulada como uma solução oftálmica, uma pomada oftálmica, uma lavagem oftálmica, uma solução de infusão intraocular, uma lavagem para câmara anterior, um medicamento interno, uma injeção ou um conservante para córnea extraída.

8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que o referido indivíduo é selecionado do grupo que consiste em anfíbios, répteis, aves e mamíferos.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o referido mamífero é selecionado do grupo que consiste em roedores, gatos, cachorros, porcos, cavalos e humanos.

10. Método para dissolver fibrilas tipo amiloide de proteínas cristalinas, **caracterizado** por compreender a etapa de colocar em contato as fibrilas tipo amiloide com o lanosterol em uma quantidade e duração suficientes de modo a dissolver as fibrilas tipo amiloide das proteínas cristalinas.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que o método é realizado *in situ*, *in vitro* ou *in vivo*.

12. Método, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que o método é executado em um indivíduo.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo é humano.

14. Kit para tratamento e/ou prevenção de distúrbios visuais que afetam a estrutura normal do olho em um indivíduo, **caracterizado** por compreender uma formulação de uma quantidade farmaceuticamente eficaz de lanosterol, um veículo farmaceuticamente aceitável e instruções para a administração da referida formulação de modo que a referida administração trata e/ou previne o referido distúrbio visual.

15. Composição oftálmica farmacêutica para o tratamento e/ou prevenção de distúrbios visuais em um indivíduo, **caracterizada** pelo fato de que a referida composição compreende um veículo oftálmico farmaceuticamente aceitável e uma quantidade farmaceuticamente eficaz de lanosterol.

16. Composição oftálmica farmacêutica, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizada** pelo fato de que a referida composição é formulada como uma solução oftálmica, uma pomada oftálmica, uma lavagem oftálmica, uma solução de infusão intraocular, uma lavagem para câmara anterior, um medicamento interno, uma injeção ou um conservante para córnea extraída.

Fig.1A

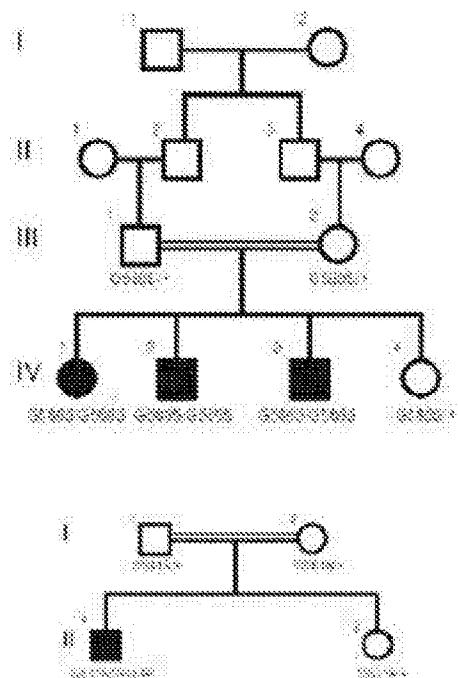


Fig.1B

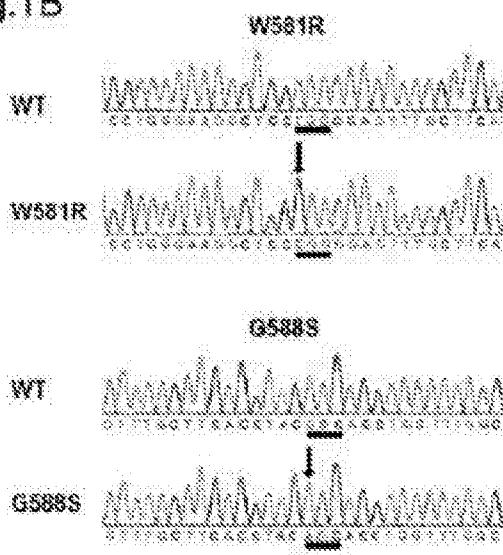


Fig.1C

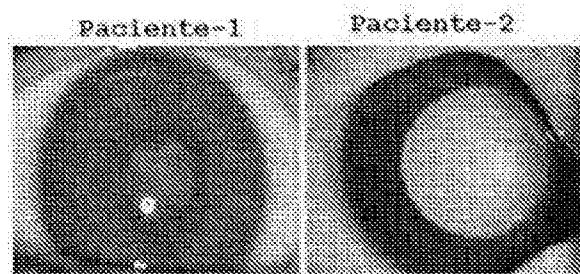


Fig.2A

WHR      GSH

```

LSS_H. sapiens      DGSWEQSWCVQFTYGTWFOLEAFACM
LSS_P. troglodytes DGSWEQSWCVQFTYGTWFOLEAFACM
LSS_B. taurus       DGSWEQSWCVQFTYGAWFOLAEFACM
LSS_M. musculus     DGSWEQSWCVQFTYGTWFOLEAFACM
LSS_R. norvegicus   DGSWEQSWCVQFTYGTWFOLEAFACM
LSS_G. gallus       DGSWEQSWCVQFTYGTWFOLEAFASM
LSS_D. rerio         DGSWEQSWCVQFTYGAWFOLAEFACM

```

Fig.2C

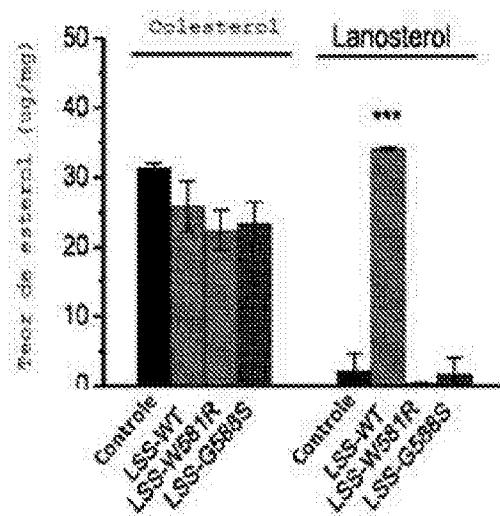


Fig.2B

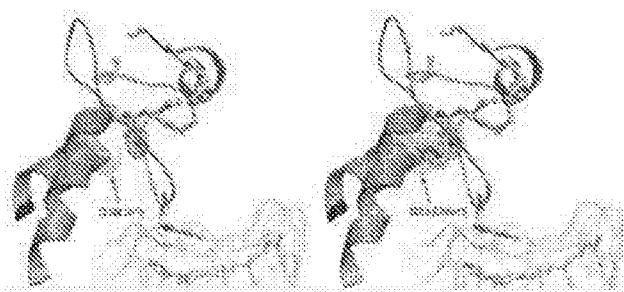


Fig.3A

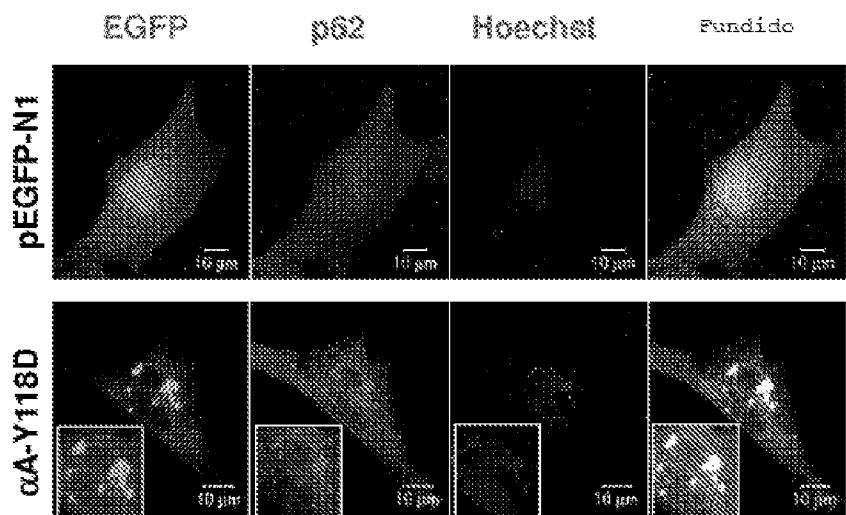


Fig.3B

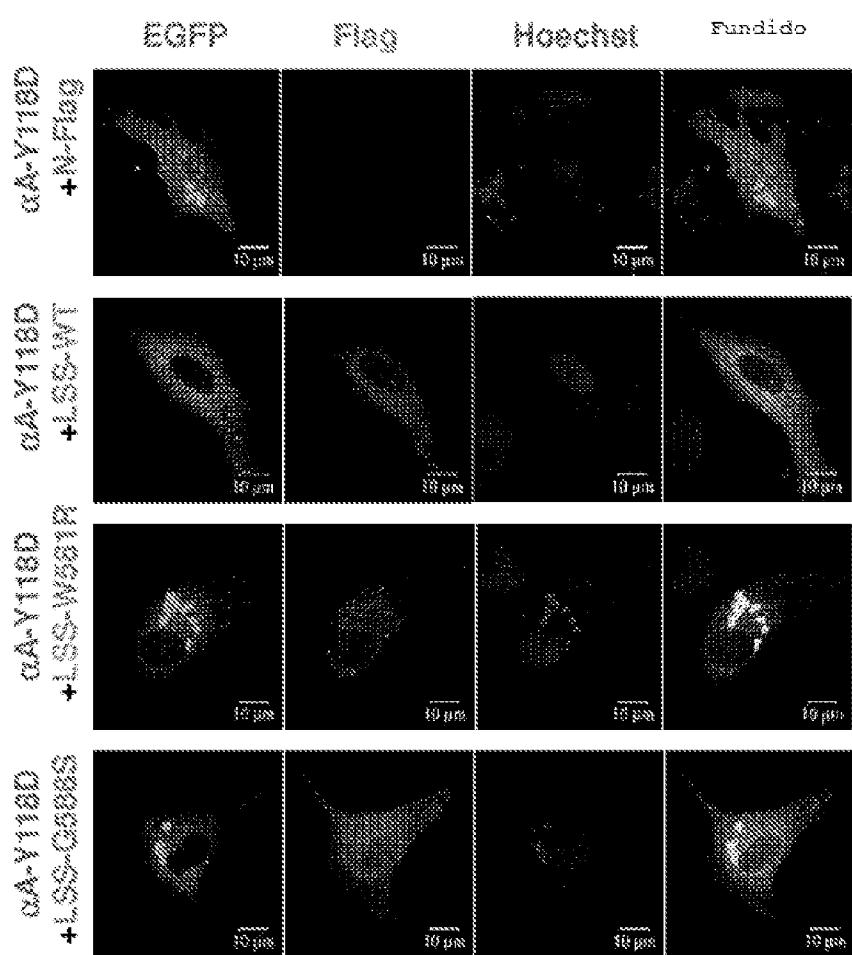


Fig.3C

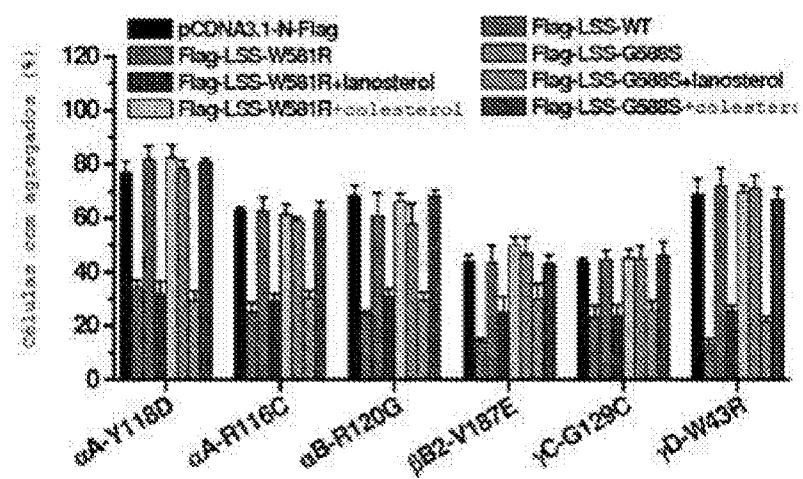


Fig.3D

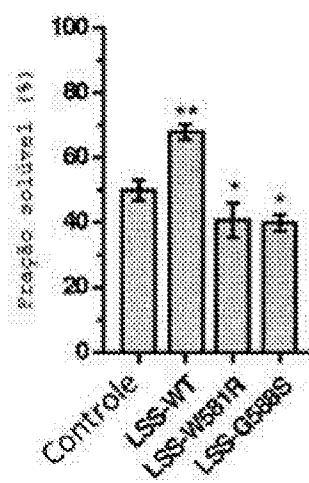


Fig.3E

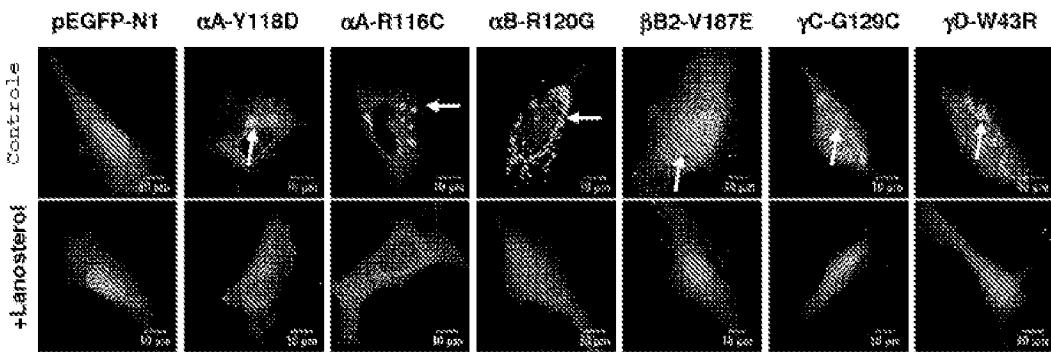


Fig.3F

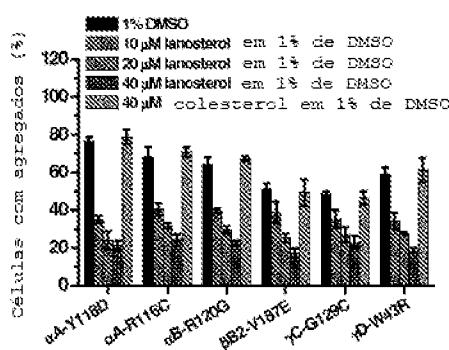


Fig.3G

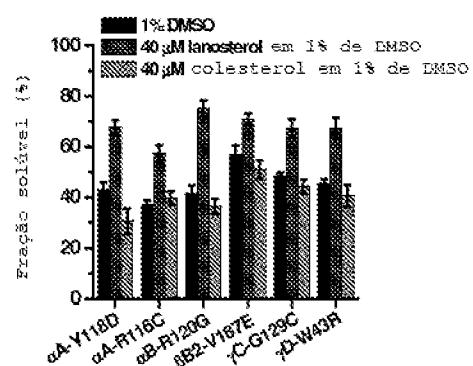


Fig.3H

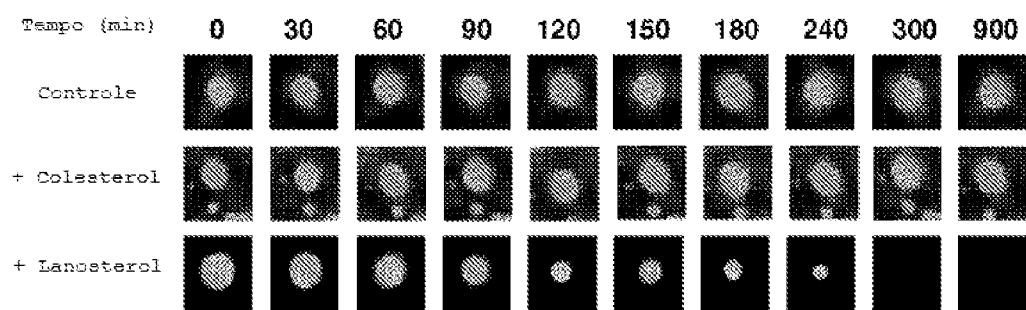


Fig.3I

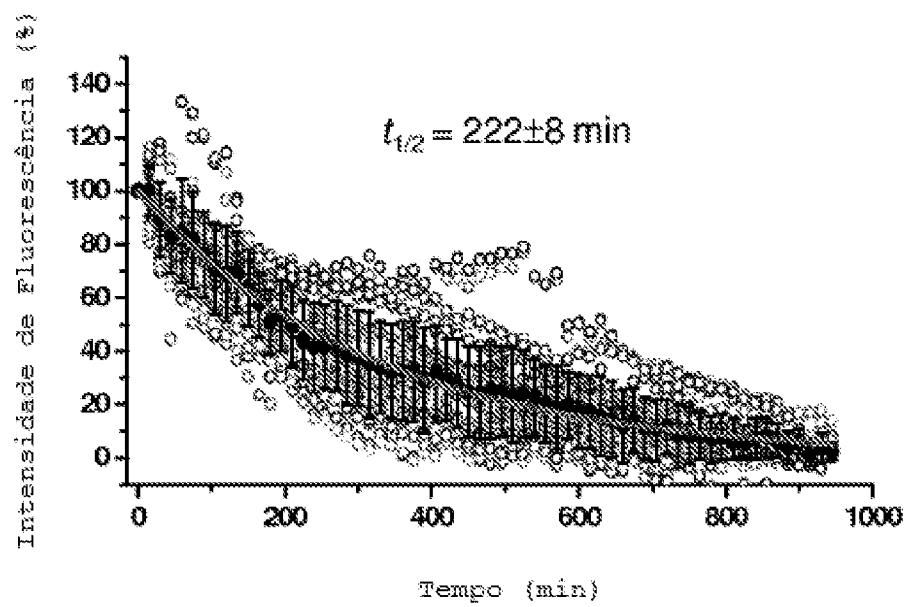


Fig.4A

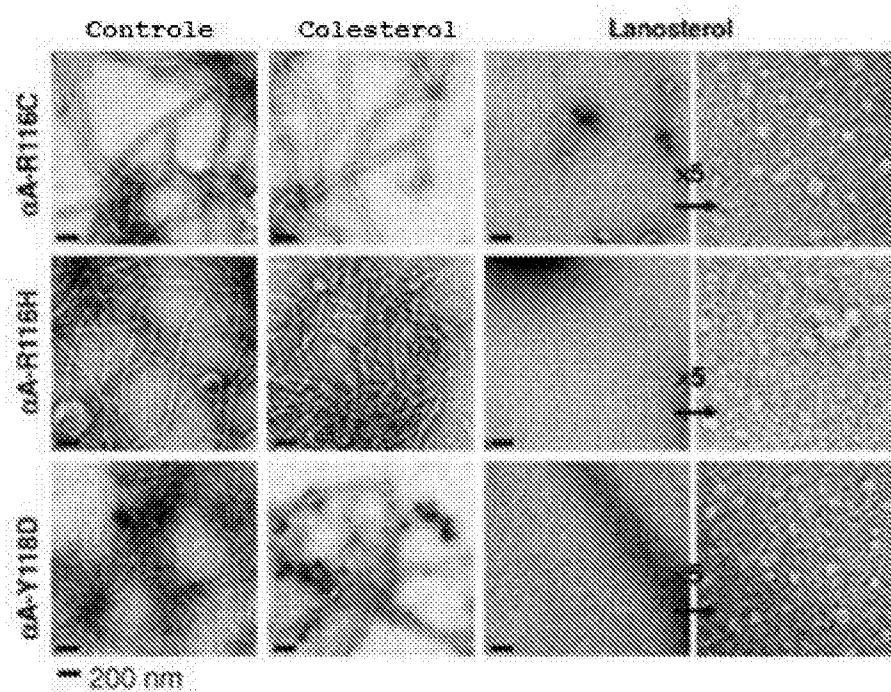


Fig.4B(i)

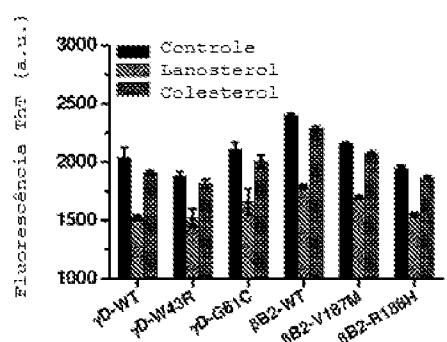


Fig.4B(ii)

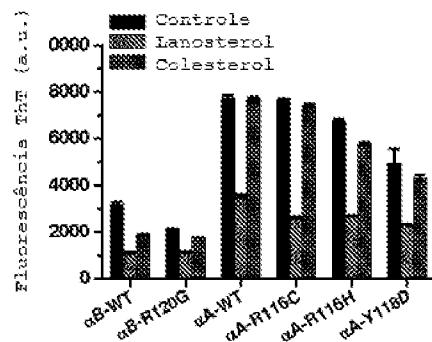


Fig.5A

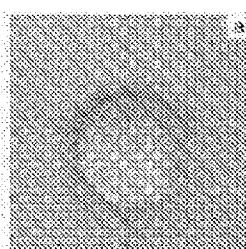


Fig.5A(i)

Fig.5A(ii)

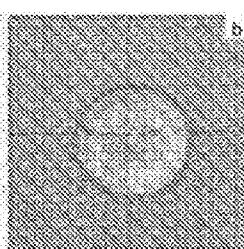


Fig.5B

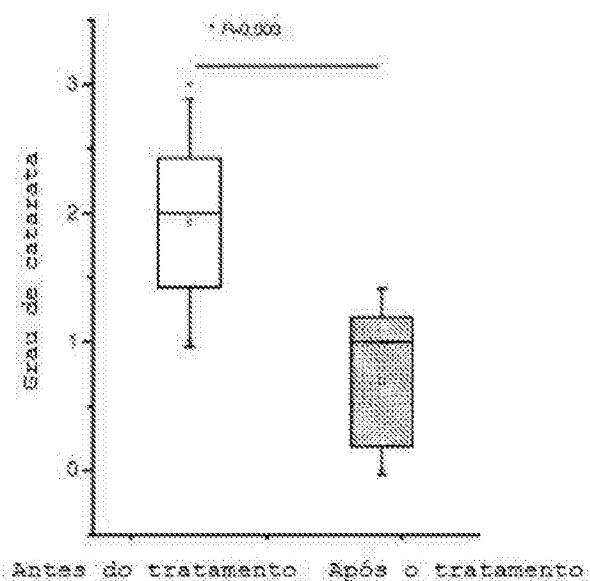


Fig. 5C

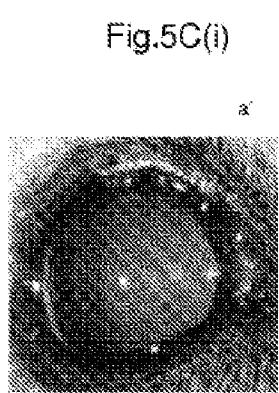


Fig. 5C(ii)

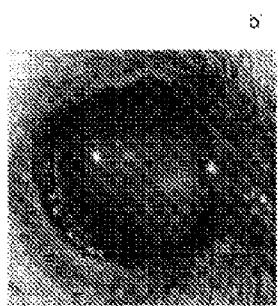
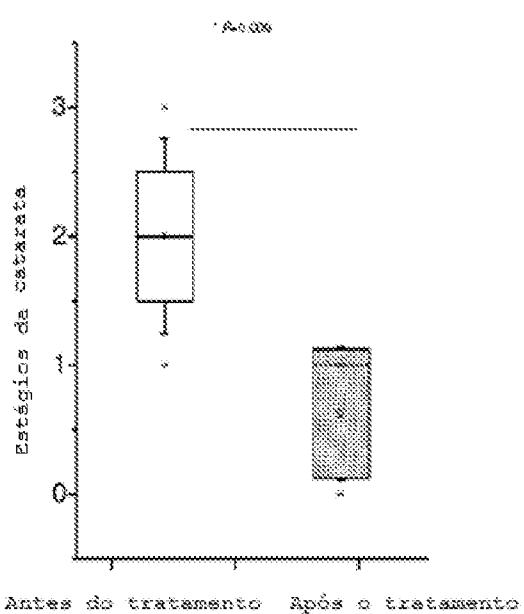


Fig. 5D



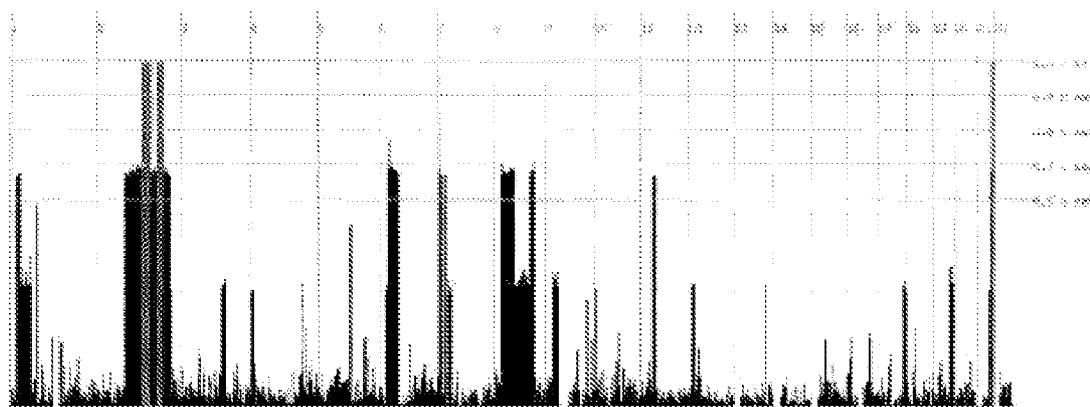
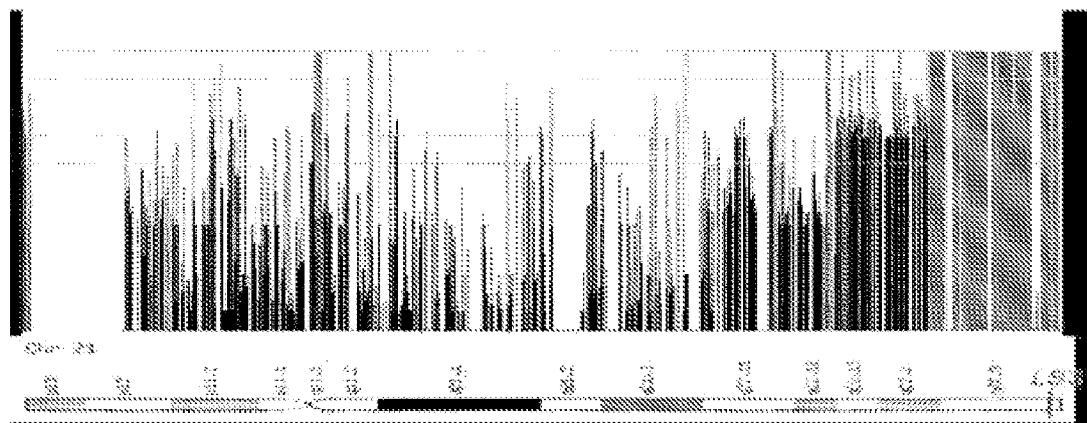
**Fig. 6A****Fig. 6B**

Fig. 7

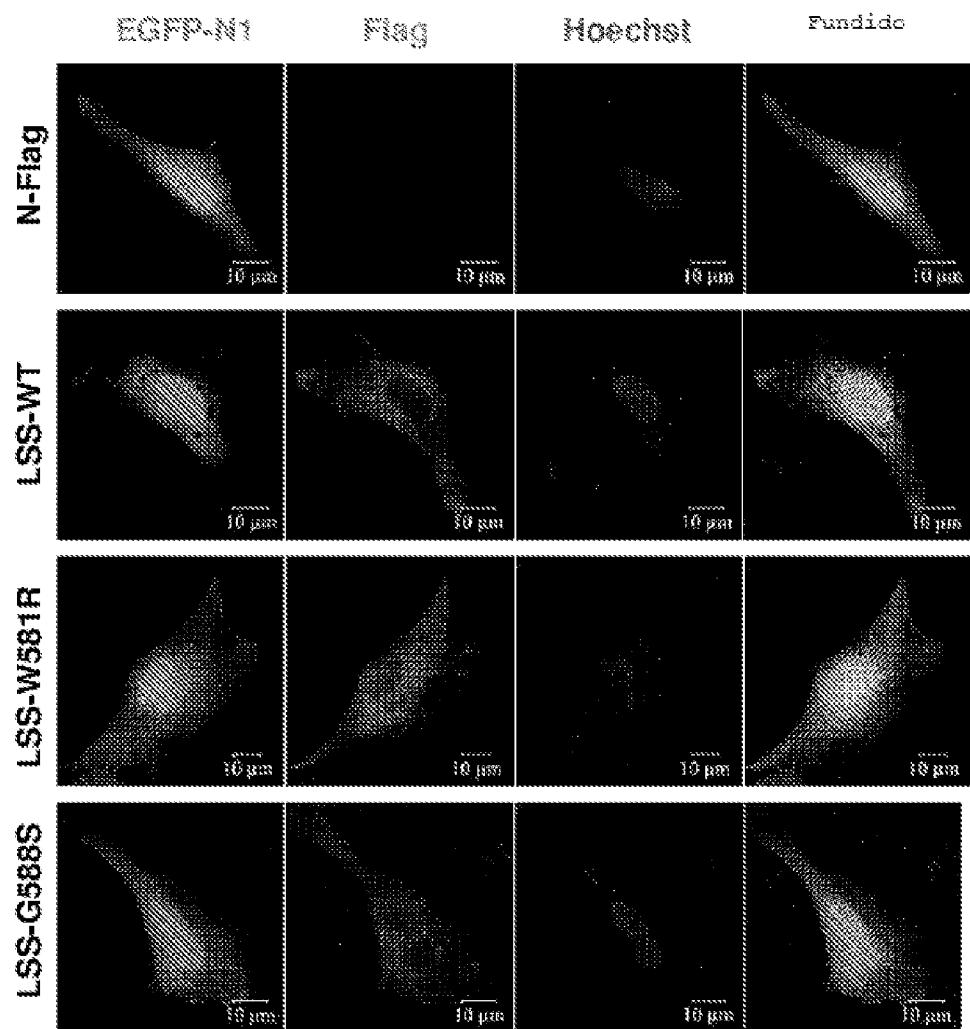


Fig. 8A

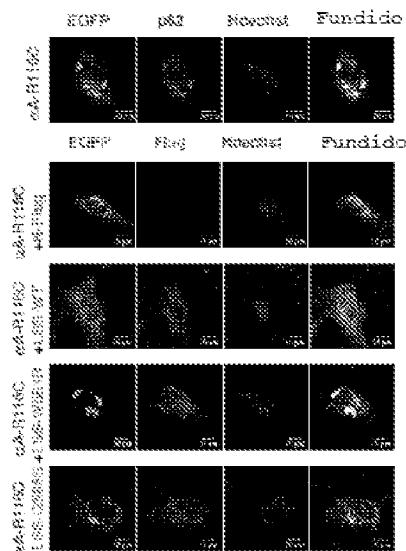


Fig. 8B

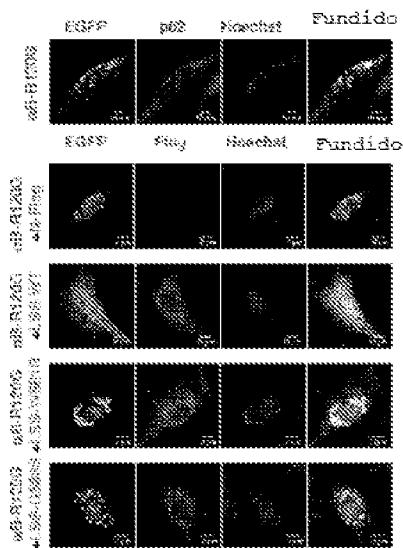


Fig. 8C

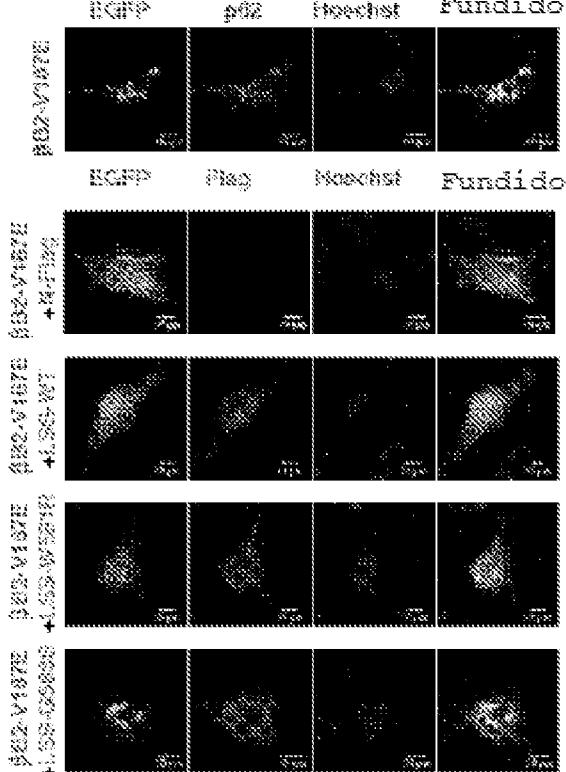


Fig. 8D

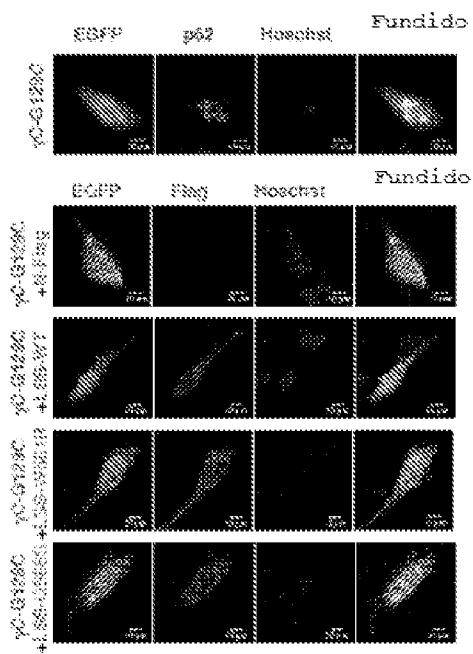
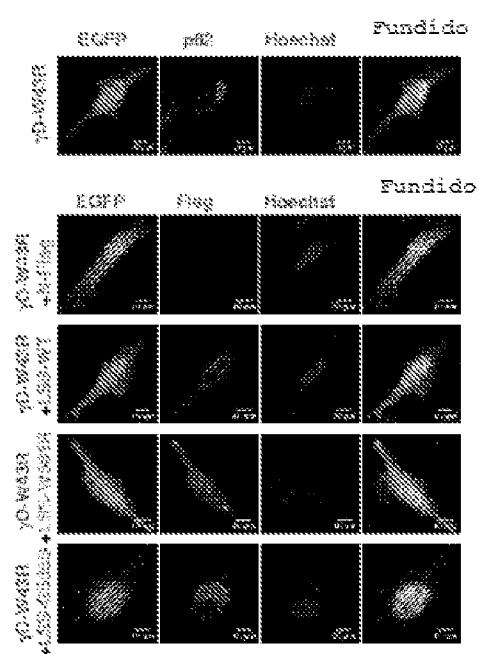


Fig. 8E



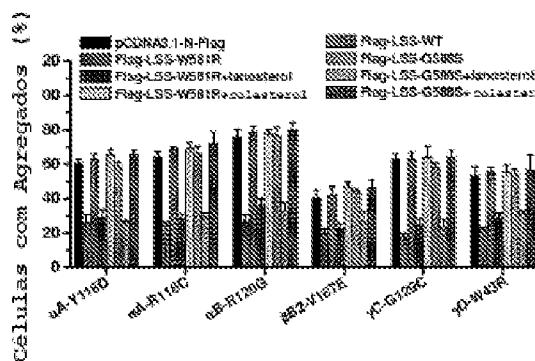
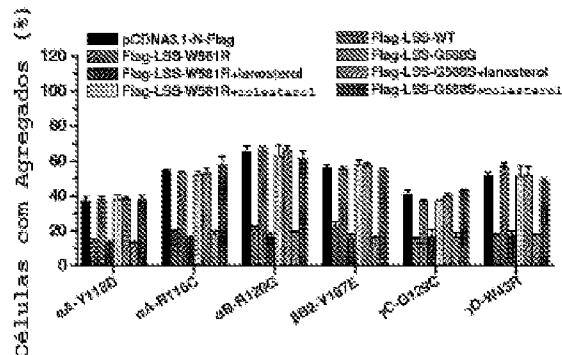
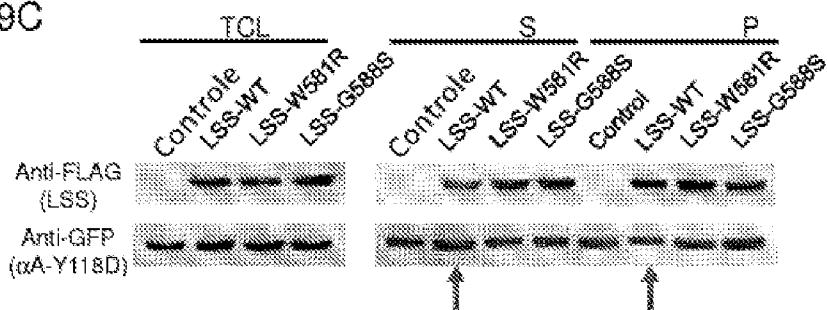
**Fig. 9A****Fig. 9B****Fig. 9C**

Fig. 10A

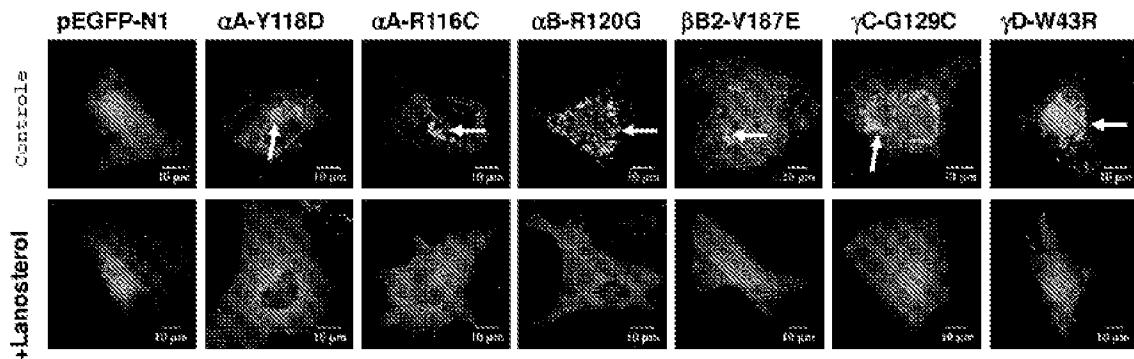


Fig. 10B

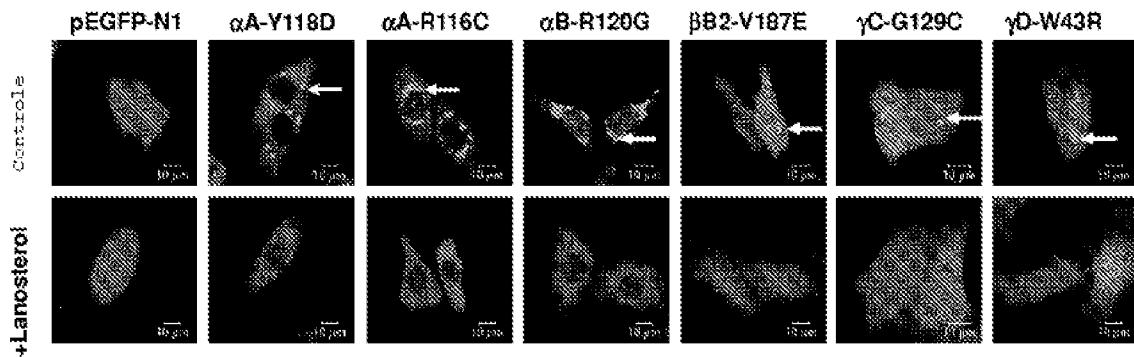


Fig. 10C

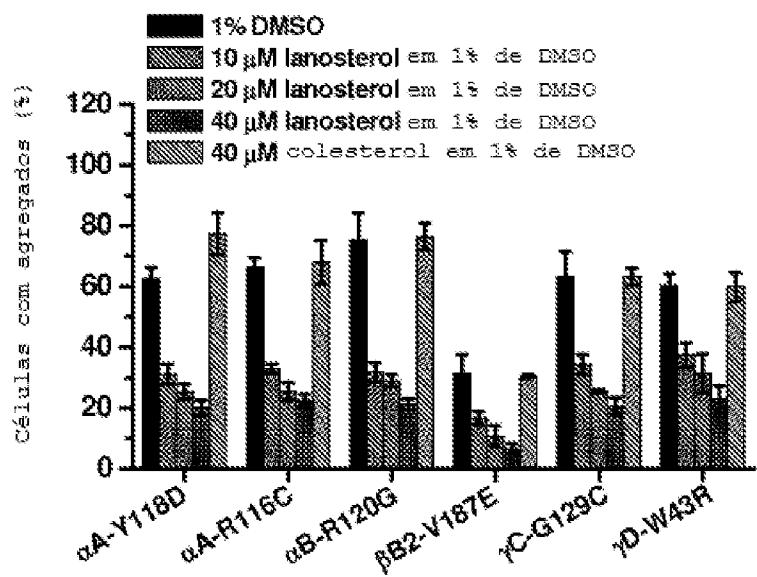


Fig. 10D

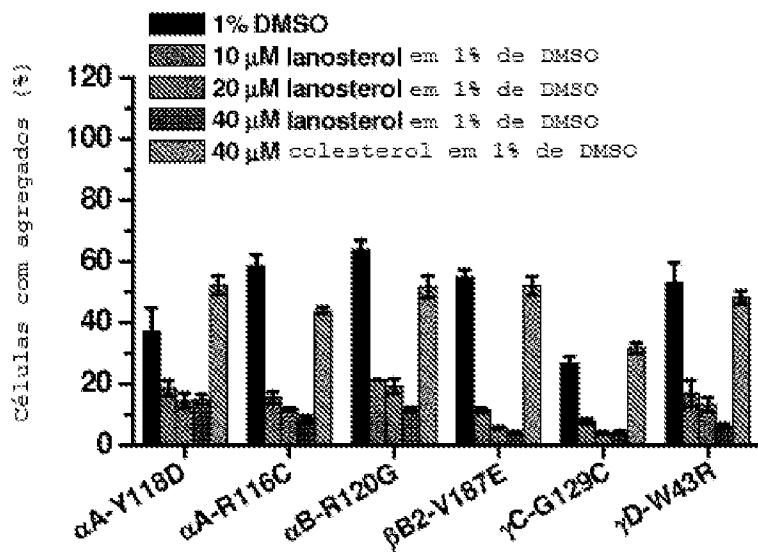


Fig.11A



Fig. 11B

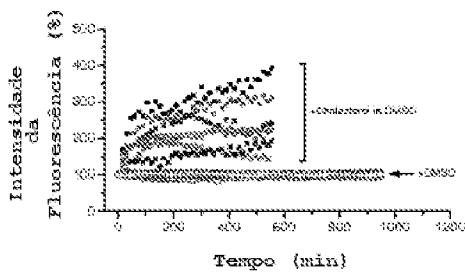


Fig. 11D

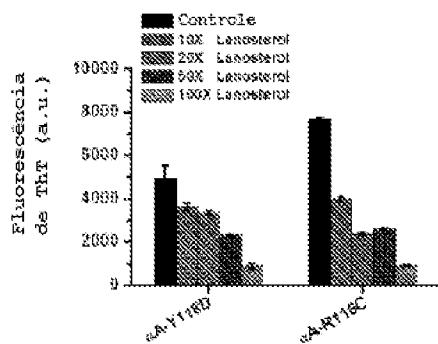


Fig. 11C (i)

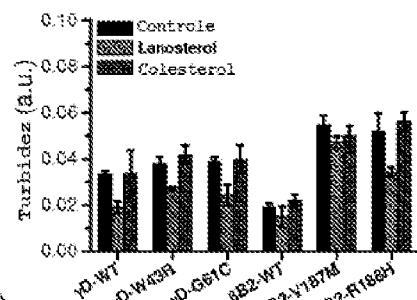


Fig. 11C (ii)

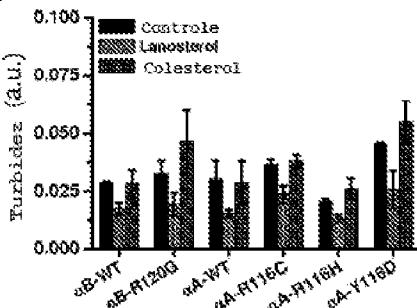


Fig. 12B

Fig. 12A

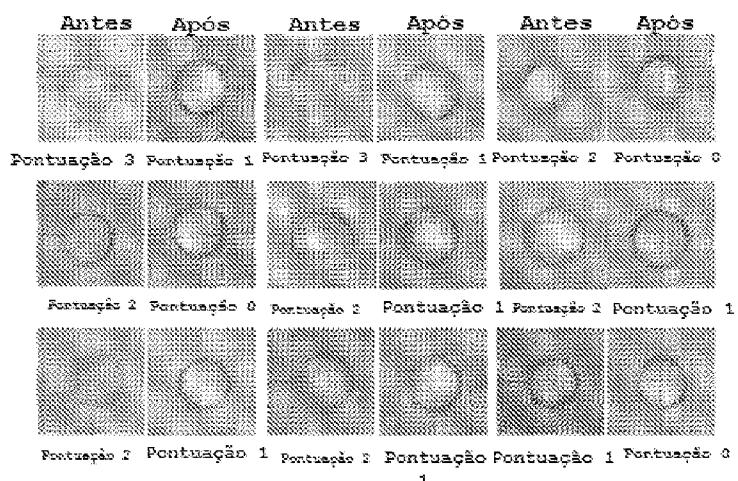
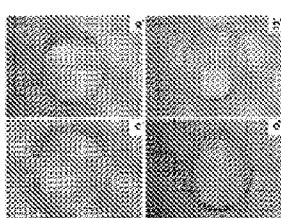
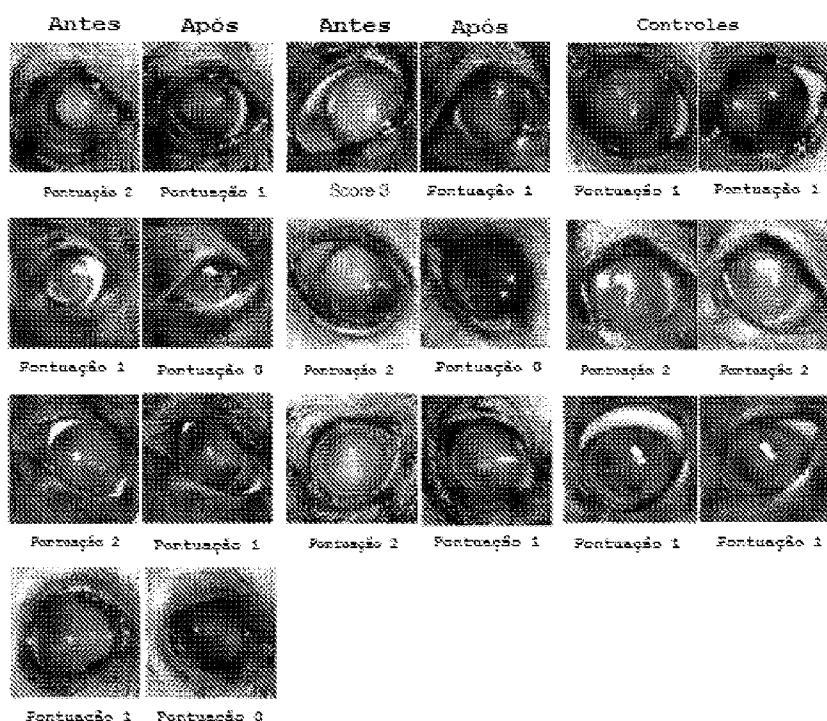


Fig. 12C



**RESUMO****COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA TRATAR DISTÚRBIOS VISUAIS**

A presente invenção fornece esteróis e usos dos mesmos para o tratamento de distúrbios visuais. Em uma modalidade, a composição compreendendo quantidade farmaceuticamente eficaz de lanosterol é usada para o tratamento e/ou prevenção de distúrbios visuais em um indivíduo. Em uma outra modalidade, a composição compreendendo quantidade farmaceuticamente eficaz de lanosterol é usada para o tratamento de catarata ou cegueira/deficiência visual em um indivíduo. Ainda em uma outra modalidade, a composição compreendendo lanosterol é usada para dissolver fibrilas tipo amiloide de proteínas cristalinas.