

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 961**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

A61P 9/14 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.12.2016 PCT/EP2016/082925**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.09.2017 WO17153023**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2016 E 16826369 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2023 EP 3427061**

54 Título: **Uso de inhibidores selectivos de INOS para el tratamiento de aneurismas de la aorta torácica (TAA) en un sujeto**

30 Prioridad:

07.03.2016 EP 16382103

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2024

73 Titular/es:

**CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
CARDIOVASCULARES CARLOS III (F.S.P.)
(33.3%)**

**C/ Melchor Fernández Almagro, 3
28029 Madrid, ES;**

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (33.3%) y
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (33.3%)**

72 Inventor/es:

**REDONDO MOYA, JUAN MIGUEL;
MÉNDEZ-BARBERO, NEREA;
OLLER PEDROSA, JORGE y
CAMPANERO GARCÍA, MIGUEL RAMÓN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 965 961 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de inhibidores selectivos de INOS para el tratamiento de aneurismas de la aorta torácica (TAA) en un sujeto

5

Campo de la invención

La presente invención se puede incluir en el campo de la medicina personalizada, en donde se utilizan inhibidores selectivos de la Óxido Nítrico Sintasa Inducible (INOS) para el tratamiento de aneurismas de la aorta torácica (TAA) en un sujeto.

10

Antecedentes de la invención

El aneurisma de la aorta (AA) se caracteriza por disfunción de las células del músculo liso vascular (VSMC) y remodelación adversa de la matriz extracelular que en conjunto predisponen la pared del vaso a la dilatación, disección y ruptura. El AA suele ser asintomático hasta que se rompe, lo que provoca una morbilidad y mortalidad significativas. No se ha identificado ningún gen o locus individual como causa suficiente de AA abdominal (AAA), al menos en ausencia de una aortopatía más sistémica. Por el contrario, el AA torácico (TAA) está fuertemente asociado con la predisposición genética familiar e implica variantes de genes que muestran una alta penetrancia. Los TAA y las disecciones familiares (FTAAD) aparecen de forma aislada o junto con características de un trastorno sistémico del tejido conectivo (FTAAD sintomático). Los pacientes con síndrome de Marfan (SMF) y los modelos de ratón muestran anomalías esqueléticas, pulmonares, musculares y oculares.

15

20

El FTAAD sintomático y no sintomático se asocia con un aumento de la señalización de TGFβ. Se propone que la activación de TGFβ causa degeneración medial aórtica, una característica histopatológica típica de TAA caracterizada por una capa medial agrandada y debilitada, fibrosis, acumulación de proteoglicanos y desorganización y fragmentación de las fibras elásticas. Sin embargo, no está claro si la activación de TGFβ es causa o consecuencia de FTAAD.

25

Dado que el riesgo de disección o rotura aórtica aumenta con el aumento del tamaño de la aorta, los objetivos principales del tratamiento son limitar los cambios estructurales en la pared aórtica y retardar el crecimiento del aneurisma. De acuerdo con el papel patogénico de TGFβ en TAA, los anticuerpos neutralizantes anti-TGFβ previenen la dilatación aórtica e inhiben la fragmentación de las laminillas elásticas en un modelo murino de SMF leve. En el mismo modelo, estos procesos también son inhibidos por losartán, un antagonista del receptor tipo I de angiotensina II (Ang-II) (AT1R) que inhibe la señalización de TGFβ. Sin embargo, losartán es menos eficaz en un modelo de SMF grave, y en ensayos clínicos aleatorios losartán no fue más eficaz para reducir la tasa de agrandamiento de la raíz aórtica que el betabloqueante atenolol, y la terapia dual con atenolol no produjo ningún beneficio adicional.

30

35

A pesar del comportamiento decepcionante de losartán en los ensayos clínicos, parece claro que Ang-II y AT1R están implicados en el desarrollo y progresión de TAA y AAA en modelos de ratón. Se sabe poco sobre los mecanismos por los cuales Ang-II promueve el aneurisma. Sin embargo, los autores de la presente invención, demostraron recientemente que Ang-II y otros estímulos asociados con la remodelación vascular actúan a través de AT1R para inducir la expresión aórtica de ADAMTS1 ("A Disintegrin And Metalloproteinas with Thrombospondin Motifs 1" - Una Desintegrina y Metaloproteinasas con Motivos de Tromboespondina 1). ADAMTS1, un miembro de la familia de metaloproteinasas ADAMTS que degradan proteoglicanos, participa en la remodelación de tejidos, la ovulación, la cicatrización de heridas y la angiogénesis. Se expresa en las células endoteliales aórticas y del músculo liso vascular (VSMC) durante el desarrollo y en la edad adulta y en las lesiones ateroscleróticas. Adamts1 también se expresa en tejido de TAA y es activo en tejido aórtico normal, donde escinde versicano y agregano. Los ratones Adamts1^{-/-} tienen malformaciones renales congénitas y una alta mortalidad perinatal, pero no se ha informado de ningún fenotipo vascular.

40

45

50

Para investigar el posible papel de Adamts1 como mediador del AA inducido por Ang-II, los autores de la presente invención utilizaron ratones Adamts1^{+/-} y un modelo de deficiencia aórtica de Adamts1 basado en una disminución de la expresión génica dirigida. Sus datos muestran inesperadamente que la deficiencia de Adamts1 no inhibe el aneurisma inducido por Ang-II y, por el contrario, induce una aortopatía grave similar al SMF que afecta a todos los segmentos aórticos. ADAMTS1 se expresa débilmente en SMF, lo que indica un papel de la deficiencia de Adamts1 en el fenotipo aórtico de SMF. Los resultados del modelo de disminución de la expresión génica mostrados en el presente documento han descubierto un papel crítico para el óxido nítrico (NO) en la patogénesis de la formación de aneurismas y en relación con el SMF proporcionando así nuevos métodos de tratamiento para TAA y enfermedades relacionadas con TAA. Además, la presente invención proporciona una solución para obtener datos útiles para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con TAA como el síndrome de Marfan o FTAAD.

55

60

65

Breve descripción de la invención

- La presente invención se refiere a una composición que comprende un inhibidor de iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de un aneurisma de aorta torácica (TAA) en un paciente humano, en donde el inhibidor de iNOS se selecciona del grupo que consiste en 1400W (N'-[[3-(aminometil)fenil]metil]etanimidamida), GW274150 (ácido (2S)-2-amino-4-[2-(1-aminoetilidenamino)-etilsulfanil]butanoico), GW273629 (ácido (2R)-2-amino-3-[2-(1-aminoetilidenamino)etilsulfonil]propanoico), Aminoguanidina (AG) (2-aminoguanidina), L-NIL (ácido (2S)-2-amino-6-(1-aminoetilidenamino)hexanoico), clotrimazol y L-NAME ((2S)-2-amino-5-[[amino(nitramido)metiliden]amino]pentanoato de metilo), o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables.
- En una realización preferida, el inhibidor de iNOS se selecciona del grupo que consiste en GW274150 (ácido (2S)-2-amino-4-[2-(1-aminoetilidenamino)etilsulfanil]butanoico), GW273629 (ácido (2R)-2-amino-3-[2-(1-aminoetilidenamino)etilsulfonil]propanoico), Aminoguanidina (AG) (2-aminoguanidina) y clotrimazol, o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables.
- En una realización preferida, el inhibidor de iNOS es GW274150, o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables. En una realización preferida adicional, el paciente sufre una enfermedad seleccionadas de la lista que consiste en: válvula aórtica bicúspide; un aneurisma de la aorta torácica (TAA) sintromico tal como el Síndrome de Marfan, Ehlers Danlos vascular, Síndrome de Loeys Dietz (Tipos 1 y 2) y Aneurisma y disección de la aorta torácica familiar (TAAD familiar), un TAA no sintromico. Lo más preferible es que el paciente padezca el síndrome de Marfan (SMF).
- En una realización preferida adicional, la composición se utiliza en una terapia médica dirigida a prevenir, limitar y revertir la expansión progresiva de TAA en presentaciones sintromicas y no sintromicas de la enfermedad. Preferiblemente, la composición se utiliza en una terapia médica dirigida a prevenir, limitar o revertir la progresión del aneurisma de la aorta torácica (TAA). Preferiblemente, la progresión del aneurisma de la aorta torácica (TAA) se limita o se revierte. En una realización preferida, la presentación sintromica de la enfermedad es el síndrome de Marfan.

Breve descripción de las figuras

- Figura 1. Inducción de TAA sintromica por deficiencia de *Adamts1*.** (a) Imágenes representativas de la inmunotinción de *Adamts1* en secciones aórticas de los ratones indicados (n = 3). Barra de escala, 20 μ m. (b) Imágenes de ultrasonido representativas de AR, AsAo y AbAo tratados con control o tratados con Ang-II durante 28 días. Las líneas de color rojo marcan el límite del lumen y las de color amarillo el diámetro del lumen. Barras de escala, 1 mm. (c) Diámetro máximo (media \pm ETM) de las secciones aórticas indicadas de ratones *Adamts1*^{+/+} (n=13) y *Adamts1*^{+/-} (n=15) tratados con control y de ratones *Adamts1*^{+/+} (n=11) y *Adamts1*^{+/-} (n=14) tratados con AngII. ANOVA unidireccional, ****p<0.0001 *Adamts1*^{+/+} frente a *Adamts1*^{+/-}; #####p<0.0001, ###p>0.001, ##p<0.01, #p<0.05 Control frente a Ang-II. (d) Curva de supervivencia de la cohorte de ratones *Adamts1*^{+/+} y *Adamts1*^{+/-} tratada con Ang-II mostrada en (c). Prueba de rango logarítmico (Mantel Cox), *p<0.05. (e) Incidencia de aneurisma en la misma cohorte. (f) PA sistólica y diastólica al final del tratamiento. ANOVA unidireccional, ****p<0.001 *Adamts1*^{+/+} frente a *Adamts1*^{+/-}; #####p<0.0001 Control frente a Ang-II. (g) Tinción H y E representativa de secciones de 10 pulmones insuflados *Adamts1*^{+/+} y 7 *Adamts1*^{+/-}. *indica un agrandamiento progresivo del espacio aéreo distal. Barras de escala, 500 μ m (izquierda) y 50 μ m (derecha). (h) Imágenes representativas de PET CT esquelética de ratones *Adamts1*^{+/+} (n = 10) y *Adamts1*^{+/-} (n = 9) de 16 a 20 semanas de edad. Líneas punteadas de color rojo, 1.67 cm. Se indica incidencia de cifosis. (i) Diámetros torácicos anteroposterior y transversal (media \pm ETM) y cuantificación de la longitud de (j) cráneo y (k) húmero, fémur y tibia (media \pm ETM) de 20 ratones *Adamts1*^{+/+} y 17 *Adamts1*^{+/-}. Prueba t de Student, ns, no significativa; *p<0.01 y ***p<0.001.
- Figura 2. La disminución de la expresión génica de *Adamts1* en la aorta de ratones adultos causa una enfermedad aórtica similar a la inducida por la deficiencia genética de *Adamts1*.** A ratones C57BL/6 de ocho semanas de edad se les inocularon a través de la vena yugular lentivirus que expresaban GFP y siCtl o siAdamts1. (a) Cronograma experimental. Triángulo de color blanco, Eco-PA: ultrasonido y análisis de PA; LVi, inoculación de lentivirus; Ang II, implantación de minibomba de Ang-II. (b) Inmunotinción representativa de GFP y *Adamts1* en secciones de AsAo. Barra de escala, 50 μ m. (c) Análisis de inmunotransferencia de *Adamts1* en muestras aórticas de ratones transducidos y tratadas como se indica. La expresión *Gapdh* se utilizó como control de carga. Al final del tratamiento (d) PA sistólica y diastólica (media \pm ETM) y diámetro aórtico máximo (media \pm ETM) en 12 ratones siCtl de control, 16 siAdamts1 de control, 13 siCtl con Ang-II y 16 siAdamts1 con Ang-II. ANOVA unidireccional, ****p<0.001 siCtl frente a siAdamts1; #p<0.05, ###p<0.001 y #####p<0.0001, control frente a Ang-II. Los resultados en D-E son datos agrupados de dos experimentos independientes. (f) Las imágenes muestran tinción tricrómica de Masson (Masson T), de van Gieson para fibras elásticas (EVG) y con azul alcian. Barra de escala, 50 μ m. (g,h) Cuantificación de roturas de elastina y contenido de colágeno en secciones de AsAo de las cohortes de ratones que se muestran en las Figuras 1 y 2d-2e. ANOVA unidireccional, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 siCtl frente a siAdamts1 o *Adamts1*^{+/+} frente a *Adamts1*^{+/-}; #p<0.05, ##p<0.01, #####p<0.0001 Control frente a Ang-II. (i) Inmunohistoquímica para TGF β 1, pSMAD2 y SMAD2/3 total representativa de secciones de AsAo de ratones *Adamts1*^{+/+} y *Adamts1*^{+/-} (n=3)

tratados con control o Ang-II.

Figura 3. La disminución de la expresión génica de *Adamts1* induce rápidamente dilatación aórtica, hipotensión y degeneración medial independientemente de la activación de TGF β . (a) Cronograma experimental. A ratones C57BL/6 de ocho semanas de edad se les inocularon a través de la vena yugular lentivirus con siCtl o siAdamts1 y se controló la dilatación aórtica y la PA en los puntos de tiempo indicados. Se analizó la expresión de Adamts1 en extractos aórticos mediante (b) RT-qPCR y (c) inmunohistoquímica. Se muestran imágenes representativas de Adamts1 y GFP en las secciones de AsAo. Las cantidades de ARNm se normalizaron según la expresión de *Gapdh* (medias \pm ETM). ANOVA unidireccional, **p<0.001, ***p<0.001, ****p<0.0001 frente a siCtl. Barra de escala, 50 μ m. (d) PA sistólica; (e) roturas de elastina; diámetro máximo de (f) AsAo y (g) Abao; y (h) contenido de colágeno (media \pm ETM; n = 5-12) en los tiempos indicados en ratones transducidos con lentivirus con siCtl o siAdamts1. (e,h) ANOVA unidireccional y (d,e,g) ANOVA bidireccional, **p<0.001, ****p<0.0001 frente a siCtl en el mismo momento. (i) Análisis de zimograma representativo de la actividad de Mmp2 y Mmp9 en extractos aórticos preparados 4 días después de la transducción de ratones con siCtl o siAdamts1 (n=3). (j) Esquema experimental. Un grupo de animales recibió una inyección intraperitoneal de un anticuerpo neutralizante anti-TGF β 3 días antes de la inoculación del lentivirus, y las inyecciones se repitieron 3 veces por semana. Otro grupo fue tratado con losartán mediante suministro con minibomba osmótica comenzando inmediatamente antes de la inoculación de lentivirus. (k) Cambios en el diámetro máximo de AsAo y cuantificación al final del experimento de (l) roturas de elastina y (m) contenido de colágeno en secciones aórticas en los grupos experimentales indicados (media \pm ETM). El número de ratones por grupo fue 8 siCtl, 4 siCtl losartán, 5 siAdamts1, 7 siAdamts1 losartán y 6 siAdamts1 anti-TGF β . (k) ANOVA bidireccional de medias grupales y (l,m) ANOVA unidireccional, **p<0.001, ***p<0.001, ****p<0.0001 frente a si-Ctl; n.s., no significativo. (b,e,h) Los resultados de siCtl fueron estables durante todo el período experimental, y los datos son medias de lecturas en 2, 4, 7, 14, 21 y 49 días. (n) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de Mmp9 (color rojo), SMA (color blanco) y F4/80 (color verde), autofluorescencia de elastina (color verde) y núcleos teñidos con DAPI (color azul) en secciones aórticas de ratones 4 días después de la inoculación con lentivirus que expresa siCtl o que expresa siAdamts1. Se utilizaron placas de ateroma en ratones Apoe $^{-/-}$ que fueron alimentados con una dieta rica en grasas como control positivo para la tinción con F4/80. Barra de escala, 50 μ m.

Figura 4. La aortopatía inducida por la deficiencia de *Adamts1* está mediada por NO. (a) Diseño experimental. A ratones C57BL/6 de ocho semanas de edad se les administró el inhibidor de NOS (L-NAME) en el agua potable, comenzando 3 días antes de la inoculación de lentivirus con siCtl o siAdamts1 y continuando durante los siguientes 14 días. (b) Diámetro máximo de AsAo y AbAo en los tiempos indicados y cuantificación al final del experimento de (c) roturas de elastina y (d) contenido de colágeno en secciones aórticas (media \pm ETM; n=5 para cada grupo). (e) Cuantificación de la actividad de Mmp2 y Mmp9 en extractos aórticos de ratones transducidos con siAdamts1 tratados con L-NAME. (b) ANOVA bidireccional de medias grupales y (c-e) ANOVA unidireccional; *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001 frente a siCtl; ###p<0.01, ####p<0.0001 L-NAME frente a Control; ns, no significativo. (f-h) Se trataron ratones Adamts1 $^{+/+}$ y Adamts1 $^{-/-}$ de ocho semanas de edad con L-NAME durante 21 días. (f) Diámetro máximo de AsAo y AbAo (media \pm ETM) en los puntos de tiempo indicados y al final del experimento (g) PA sistólica, (h) roturas de elastina e (i) contenido de colágeno en 12 ratones Adamts1 $^{+/+}$, 13 Adamts1 $^{+/+}$ L NAME, 14 Adamts1 $^{-/-}$ y 12 Adamts1 $^{-/-}$ L-NAME. (f) ANOVA bidireccional, ***p<0.001, ****p<0.0001 frente a Adamts1 $^{+/+}$ L-NAME en cada punto de tiempo. (g-i) ANOVA unidireccional, ***p<0.001, ****p<0.0001, Adamts1 $^{+/+}$ frente a Adamts1 $^{-/-}$; #p<0.05, ###p<0.001 L-NAME frente a Control.

Figura 5. Nos2 es un mediador crítico de la aortopatía inducida por la deficiencia de *Adamts1*. (a) Análisis por RT-qPCR del ARNm de *Nos2* en extractos aórticos de ratones transducidos con siCtl y siAdamts1 en los puntos de tiempo indicados. ANOVA unidireccional (n=4), **p<0.01, frente a siCtl. Los niveles de siCtl se determinaron como en la Figura 4. (b) Tinción de inmunofluorescencia representativa (n = 3) de Nos2 (color rojo), autofluorescencia de elastina (color verde) y núcleos teñidos con DAPI (color azul) en secciones aórticas de ratones siCtl y siAdamts1 (14 días después de la inoculación) y de ratones Adamts1 $^{+/+}$ y Adamts1 $^{-/-}$ de 12 semanas de edad. Se utilizó IgG como control negativo. Barra de escala, 50 μ m. (c) Diseño experimental. A ratones Nos2 $^{-/-}$ y wt de ocho semanas de edad se les inocularon lentivirus con siCtl y siAdamts1 y se controlaron la dilatación aórtica y la PA. (d) Diámetro máximo de AsAo y AbAo (media \pm ETM) en 6 ratones wt siCtl, 9 wt siAdamts1, 4 Nos2 $^{-/-}$ siCtl y 7 Nos2 $^{-/-}$ siAdamts1 en los puntos de tiempo indicados. ANOVA bidireccional de medias grupales; ****p<0.0001 frente a Nos2 $^{-/-}$ siAdamts1; ns, no significativo. Cuantificación al final de experimento de (e) roturas de elastina en AsAo y AbAo y (f) contenido de colágeno en AbAo en la misma cohorte de animales. (g) PA sistólica (media \pm ETM) en los puntos de tiempo indicados en la misma cohorte de ratones. ANOVA bidireccional de medias grupales; ****p<0.0001 frente a Nos2 $^{-/-}$ siAdamts1; ns, no significativo. (h) Imágenes representativas (n = 3) de la producción de NO (color rojo), autofluorescencia de elastina (color verde) y núcleos teñidos con DAPI (color azul) en secciones de tejido aórtico no fijado de ratones siCtl, siAdamts1 y Nos2 $^{-/-}$ siAdamts1 (14 días después de la inoculación) y de ratones Adamts1 $^{+/+}$ y Adamts1 $^{-/-}$ de 10 semanas de edad. Barra de escala, 50 μ m. (i) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de Nos2 (color rojo) y SMA (color blanco), autofluorescencia de elastina (color verde) y núcleos teñidos con DAPI (color azul) en secciones aórticas de ratones Nos2 $^{-/-}$, Adamts1 $^{+/+}$ y Adamts1 $^{-/-}$ de

16 semanas de edad y de ratones WT a los que se habían inoculado lentivirus que expresan siCtl o siAdamts1 (4 d después de la inoculación) (n = 4 ratones por grupo). Barra de escala, 50 μ m. (j) Análisis de inmunotransferencia representativo de Akt y p65 totales y fosforiladas en extractos aórticos de ratones WT tratados con lentivirus que expresan siCtl o siAdamts1 (n = 5 ratones por grupo). Cada calle representa un ratón. (i-l) Diámetros máximos de AsAo (izquierda) y AbAo (derecha) en los puntos de tiempo indicados.

Figura 6. Adamts1 y NO juegan un papel crítico en el síndrome de Marfan. (a) Esquema experimental. A ratones wt y *Fbn1C1039G/+* de doce semanas de edad se les administró L-NAME en el agua potable durante 21 días. La dilatación aórtica y la PA se determinaron en los puntos de tiempo indicados y antes de la eutanasia. (b) Diámetro máximo de AsAo (media \pm ETM) en los puntos de tiempo indicados y (c) Cuantificación de la PA sistólica al final del experimento en 9 ratones wt, 7 wt L-NAME, 8 *Fbn1C1039G/+* y 8 *Fbn1C1039G/+* L-NAME. (b) ANOVA bidireccional, **** $p < 0.0001$ frente a *Fbn1C1039G/+* L-NAME. (c) ANOVA unidireccional, ** $p < 0.01$ frente a wt de control; # $p < 0.05$, #### $p < 0.0001$ control frente a L-NAME. (d) Cuantificación al final del experimento de las roturas de elastina en AsAo en 6 ratones wt, 3 wt L-NAME, 3 *Fbn1C1039G/+* y 5 *Fbn1C1039G/+* L-NAME. ANOVA unidireccional; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, frente a wt del control; ## $p < 0.01$ control frente a L-NAME. (e) Análisis RT-qPCR de ARNm de *Nos2* y *Nos3* en extractos aórticos de 6 ratones wt y 3 *Fbn1C1039G/+*. Prueba t de Student, *** $p < 0.001$. (f) Imágenes representativas (n = 3) de producción de NO (color rojo), inmunofluorescencia de *Nos2* (color rojo), autofluorescencia de elastina (color verde) y núcleos teñidos con DAPI (color azul) en secciones transversales aórticas de ratones wt y *Fbn1C1039G/+*. (g) Inmunohistoquímica representativa de Adamts1 en secciones aórticas de ratones wt y *Fbn1C1039G/+* y análisis de inmunotransferencia de Adamts1 en extractos aórticos. La tinción con IgG sirve como control negativo. Barra de escala, 20 μ m. (h) Imágenes representativas de la capa medial de inmunofluorescencia de ADAMTS1 (color rojo; n = 9) e (i) cuantificación del área positiva de ADAMTS1 en secciones teñidas con inmunohistoquímica de 5 donantes de control y 9 pacientes con SMF. (j) Imágenes representativas de la capa medial de inmunofluorescencia de NOS2 (color rojo; n = 6) y (k) Cuantificación del área positiva de NOS2 en secciones de 5 donantes control y 8 pacientes de SMF. Barra, 25 μ m. (h,j) También se muestran la autofluorescencia de elastina (color verde) y los núcleos teñidos con DAPI (color azul). (i,k) Los datos se presentan como media \pm ETM. Prueba t de Student; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. (l) Modelo que representa la contribución de NO y NOS2 al fenotipo aórtico en el síndrome de Marfan y la aortopatía relacionada inducida por la deficiencia de Adamts1. (m) Diámetro máximo de AsAo en los puntos de tiempo indicados en los grupos de ratones indicados (n = 4 ratones por grupo), PA sistólica al final del experimento (n = 4 ratones por grupo). (n) Imágenes representativas de tinción con EVG en secciones aórticas (mismas cohortes de ratones como en 1). (o) de ratones Adamts1+/- y Fbn1+/C1039G de 12 semanas de edad y sus correspondientes compañeros de camada WT después del tratamiento con 1400W (en el agua potable) durante 16 semanas. Los datos son medias \pm etm. (p,q) Diámetro máximo de AsAo en los puntos de tiempo indicados (p) y PA sistólica al final del experimento (q) en ratones Fbn1+/C1039G de 36 semanas y sus compañeros de camada WT tratados con 1400W en el agua potable durante 21 días (n = 5 ratones WT de control o tratados con 1400W; n = 7 ratones Fbn1+/C1039G de control; n = 6 ratones Fbn1+/C1039G tratados con 1400W). Los datos son medias \pm etm. (p) o diagramas de caja y bigotes, con percentiles 75 y 25; las barras representan valores máximos y mínimos (q). *** $P < 0.001$ (frente a ratones Fbn1+/C1039G tratados con 1400W); * $P < 0.05$ (frente a WT de control); # $P < 0.05$ (frente a WT tratados); mediante ANOVA bidireccional con mediciones repetidas de medias grupales (o) o ANOVA bidireccional (q).

Figura 7. (a) Análisis por RT-qPCR de la expresión del ARNm de Adamts1 en Adamts1+/- y Adamts1+/- tratados durante 28 días como se indica. ANOVA unidireccional, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ Adamts1+/- frente a Adamts1+/-; #### $p < 0.001$ Adamts1+/- de Control frente a Adamts1+/- con Ang-II. (b) Porcentaje de ratones Adamts1+/-, Adamts1+/- y Adamts1+/- vivos al destete frente a su razón Mendeliana esperada (n=151). (c) Tinción representativa con hematoxilina-eosina (H y E) de secciones transversales de riñón de 10 ratones Adamts1+/- y 7 Adamts1+/- de 3-4 meses de edad; *indica espacio hidronefrótico. Barra de escala, 500 μ m. (d) Niveles de urea plasmática y (e) creatinina plasmática en ratones Adamts1+/- (n=5) y Adamts1+/- (n=6) de 9 semanas de edad (media \pm ETM).

Figura 8. (a-b) Se transdujeron células de músculo liso vascular con lentivirus que codifican ARNip específico de Adamts1 (#si27, #si57, #si69) o un ARNip de control (siCtl). Los niveles de Adamts1 se analizaron mediante (a) RT-qPCR y (b) inmunotransferencia en extractos de estas células. Las cantidades de ARNm se normalizaron según la expresión de *Gapdh* (media \pm ETM; n = 3). ANOVA unidireccional, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ frente a siCtl no tratado. La expresión de tubulina se utilizó como control de carga. (c) Inmunotinción representativa de GFP y Adamts1 en secciones de AbAo. La tinción con IgG sirve como control negativo. Barra de escala, 50 μ m. (d) Niveles de ARNm de Adamts1 en muestras aórticas de ratones transducidos con siCtl o siAdamts1 tratados como se indica durante 28 días. El número de ratones por grupo fue 12 siCtl de control, 16 siAdamts1 de control, 13 siCtl con Ang-II y 16 siAdamts1 con Ang-II. Las cantidades de ARNm se normalizaron para la expresión de *Gapdh* (media \pm ETM). ANOVA unidireccional, *** $p < 0.001$ frente a siCtl; #### $p < 0.001$ frente al control. (e) Niveles de ARNm de Adamts1 en muestras aórticas de los ratones y tratamientos indicados (n>6). Las cantidades de ARNm se normalizaron según la expresión de *Gapdh* (media \pm ETM). ANOVA unidireccional, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ frente a Adamts1+/- de control; #### $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ frente a siCtl de control; &&&& $p < 0.001$ Adamts1+/- frente a siAdamts1. (f) Diámetro aórtico

máximo (media±ETM) al final del experimento analizado en la misma cohorte de ratones que (d). ANOVA unidireccional, ****p<0.001 siCtl frente a siAdamts1; #p<0.05 y ###p<0.001 control frente a Ang-II.

Figura 9. (a) Tinción representativa tricrómica de Masson (Masson T), van Gieson para elastina (EVG) y azul alcian y **(b)** cuantificación de roturas de elastina y contenido de colágeno en secciones de AbAo de las cohortes de ratones que se muestran en la Figura 2g. **(c-e)** Tinción representativa tricrómica de Masson (Masson T), van Gieson para elastina (EVG) y azul alcian en (c) secciones de AbAo y (e) AsAo y (d) cuantificación de roturas de elastina y contenido de colágeno en secciones de AbAo de las cohortes de ratones que se muestran en la Figura 2h. (a,c,e) Barras de escala, 50 µm. (b,d) ANOVA unidireccional, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 siCtl frente a siAdamts1 o Adamts1+/+ frente a Adamts1+/-; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.0001 Control frente a Ang-II.

Figura 10. (a) Inmunotinción representativa de pSMAD2 y SMAD2/3 (n = 3) en secciones transversales de AbAo de ratones transducidos con siCtl y siAdamts1 tratados como se indica. Barra de escala, 50 µm. Análisis RT qPCR de la expresión de ARNm de *Tgfb1*, *Ctgf*, *Col1a1* y *Pai-1* en extractos de control y tratados con Ang-II **(b)** Ratones transducidos con siCtl y siAdamts1 y **(c)** Ratones Adamts1+/+ y Adamts1+/- ANOVA unidireccional, *p<0.05, ***p<0.001, siCtl frente a siAdamts1; #p<0.05, ###p<0.001 Control frente a Ang-II. **(d)** ratones Adamts1+/+ y Adamts1+/- ANOVA bidireccional, *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001, siCtl frente a siAdamts1; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, ####p<0.0001, Control frente a Ang-II.

Figura 11. (a) PA diastólica (media ± ETM) medida en los puntos de tiempo indicados en ratones transducidos con siCtl y siAdamts1. ANOVA bidireccional (n=5-12); *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 frente a siCtl en cada punto de tiempo. **(b)** Roturas de elastina en secciones transversales de AbAo de los mismos ratones. **(c)** Análisis RT qPCR de la expresión de *Tgfb1*, *Ctgf*, *Col1a1* y *Pai-1* en los mismos ratones en los momentos indicados. Las cantidades de ARNm se normalizaron según la expresión de *Gapdh*. ANOVA unidireccional; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 frente a siCtl. Los resultados de siCtl en (b,c) fueron estables durante todo el período experimental, y los datos son medias de lecturas a los 2, 4, 7, 14, 21 y 49 días. **(d)** Diámetro máximo de AbAo (media ± ETM) y **(e)** PA sistólica (media ± ETM) en los tiempos indicados en 8 ratones siCtl, 4 siCtl losartán, 5 siAdamts1, 7 siAdamts1 losartán y 6 siAdamts1 anti-TGF. ANOVA bidireccional de medias grupales, ****p<0.0001 frente a siCtl; n.s., no significativo. **(f)** Análisis RT-qPCR de ARNm de *Tgfb1*, *Pai-1*, *Ctgf*, *Col1a1* y *Adamts1*. Las cantidades de ARNm se normalizaron según la expresión de *Gapdh*. ANOVA unidireccional; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 frente a siCtl; ##p<0.05, ###p<0.001.

Figura 12. (a) PA sistólica y diastólica en los puntos de tiempo indicados en ratones transducidos con siCtl y siAdamts1 tratados con L-NAME como se indica (media ± ETM; n = 5 para cada grupo). ANOVA bidireccional de medias grupales, ****p<0.0001; #####p<0.0001 control frente a L-NAME. **(b)** Cuantificación al final del experimento de roturas de elastina en secciones transversales de AbAo en el mismo grupo de ratones. **(c)** PA diastólica al final del experimento en la misma cohorte de ratones que se muestra en la Fig. 4g. (b,c) ANOVA unidireccional, **p<0.01, ****p<0.0001 frente a siCtl no tratado o Adamts1+/+ frente a Adamts1+/-; #p<0.05, ###p<0.001, L-NAME frente a no tratado.

Figura 13. Análisis por RT-qPCR de la expresión de ARNm de **(a)** *Nos3* y **(b)** *End1* en los puntos de tiempo indicados en extractos aórticos de ratones transducidos con siCtl y siAdamts1. Las cantidades de ARNm se normalizaron a la expresión de *Gapdh*. ANOVA unidireccional (n=4), ***p<0.001 frente a siCtl. **(c)** PA diastólica (media ± ETM) en las mismas cohortes de ratones que se muestran en la Fig. 5g. ANOVA bidireccional de medias grupales, ****p<0.0001 frente a Nos2-/- siAdamts1; ns, no significativo. **(d)** Cuantificación al final del experimento de las roturas de elastina (media ± ETM) en AbAo de 6 ratones WT tratados con siCtl, 8 ratones WT tratados con siAdamts1, 5 ratones Nos2-/- tratados con siCtl y 5 ratones Nos2-/- tratados con siAdamts1. **(e)** Análisis RT-qPCR del ARNm de *Nos2* en extractos de VSMC transducidas con siCtl o siAdamts1 (media ± ETM, n = 3 ratones por grupo). Prueba t de Student, **p<0.01. **(f)** Análisis de inmunotransferencia representativo de Nos2 (n = 4 por grupo), p-Akt-S473 (n = 3 por grupo), Akt (n = 3 por grupo), p-p65-S536 (n = 3 por grupo) y p65 (n = 3 por grupo) en extractos de VSMC transducidas con siCtl o siAdamts1. Se utilizó tubulina (n = 4 por grupo) como control de carga. **(g)** Análisis de inmunotransferencia representativo (n = 3 por grupo) de Nos2, pAkt-S473 y Akt en extractos de VSMC transducidas con siCtl o siAdamts1 y tratadas con el inhibidor de mTOR AZD8055 como se indica. **(h)** Cuantificación de Nitritos y Nitratos (NOx totales) en medios acondicionados de VSMC transducidas con siCtl o siAdamts1 y tratadas con el inhibidor de Nos2 1400w como se indica. Ocho ratones no tratados y 6 tratados con siCtl y 8 ratones no tratados y 6 tratados siAdamts1. **(i)** Imágenes representativas (n = 3 por grupo) de producción de NO (color rojo) y fluorescencia de GFP (color verde) en VSMC no fijadas transducidas con siCtl o siAdamts1 y tratadas con el inhibidor de Nos2 1400w como se indica. Barra, 50 µm.

Figura 14. (a) Diámetro máximo de AbAo (media ± ETM) en los tiempos indicados en 9 ratones wt, 7 wt L-NAME, 8 *Fbn1C1039G/+* y 8 *Fbn1C1039G/+* L-NAME. ANOVA bidireccional, ****p<0.0001 frente a *Fbn1C1039G/+* L-NAME. **(b)** Cuantificación de la PA diastólica al final del experimento en los mismos ratones. ANOVA unidireccional, **p<0.01 frente a wt no tratados; ##p<0.01 control frente a L-NAME. Cuantificación al final del experimento de **(c)** roturas de elastina en AbAo y **(d)** contenido de colágeno en AsAo y AbAo en 6

ratones wt, 3 wt L-NAME, 3 *Fbn1C1039G/+* y 5 *Fbn1C1039G/+* L-NAME. ANOVA unidireccional; *** $p < 0.001$, frente a wt no tratados; ### $p < 0.01$, no tratados frente a L-NAME. (e) Análisis por RTqPCR del ARNm de *Adamts1* en extractos aórticos de 6 ratones wt y 3 *Fbn1C1039G/+*. (f) Imágenes representativas de la capa medial de inmunohistoquímica de ADAMTS1 en secciones transversales aórticas de muestras humanas de 5 donantes sanos y 9 pacientes con SMF. Barra, 25 μm . (g) Imágenes representativas de la capa medial de inmunofluorescencia de NOS2 (color rojo; $n = 6$) y núcleos teñidos con DAPI (color azul) en secciones de 5 donantes de control y 8 pacientes con SMF. Barra, 25 μm . (h) El eje ADAMTS1-NOS2 está desregulado en muestras aórticas de SMF humano. Diámetro máximo de AsAo y AbAo (media \pm ETM) de 8 *Fbn1C1039G/+* y 14 *Fbn1C1039G/+*; Nos2-/- a las 12 semanas de edad. Prueba t de Student, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (i) El eje ADAMTS1-NOS2 está desregulado en muestras aórticas de SMF humano. Imágenes representativas de la capa medial de inmunofluorescencia de NOS2 (color rojo) y SMA (color blanco), autofluorescencia de elastina (color verde) y núcleos teñidos con DAPI (color azul) en secciones de 5 donantes de control y 8 pacientes con SMF. Barra, 25 μm .

Figura 15. (a) El inhibidor de Nos2 α Aminoguanidina (AG), reduce el diámetro aórtico en ratones *Adamts1+/-*. Diámetro de la aorta ascendente y abdominal (media \pm ETM) de *Adamts1+/+* ($n=4$) y *Adamts1+/-* ($n=5$) tratados con o sin AG (1.5 gr/l en agua potable). ANOVA bidireccional de mediciones repetidas *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.001$. (b) El inhibidor de Nos2 α Aminoguanidina (AG), reduce el diámetro aórtico en ratones *Adamts1+/-*. La presión arterial sistólica (media \pm ETM) de ratones se muestra en (a). ANOVA unidireccional, *** $p < 0.001$ control *Adamts1+/+* frente a *Adamts1+/-*; ### $p < 0.01$ *Adamts1+/+* tratados con AG frente a *Adamts1*. (c) Cuantificación de la PA diastólica al final del experimento en los mismos ratones. ANOVA bidireccional, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ frente a wt no tratados; # $p < 0.05$ ### $p < 0.001$ y (d) cuantificación de las roturas de elastina (media \pm ETM) en la misma cohorte de animales. Barra de escala, 50 μm . ANOVA bidireccional, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ frente a wt no tratados; ### $p < 0.001$.

Figura 16. Cuantificación de Nitritos y Nitratos (NOx totales) en medios acondicionados de VSMC transducidas con lentivirus con siCtl o si*Adamts1* y tratadas con los inhibidores de Nos2: 1400W (2 μM), Aminoguanidina (AG) (100 μM), GW273629 (20 μM), 1-NIL (3 mM), Clotrimazol (20 μM) como se indica. Los datos son las medias \pm etm; $n=4$ por grupo; **** $P < 0.0001$ (frente a Control-siCTL), ##### $P < 0.0001$ (frente a Control-si*Adamts1*).

Figura 17. Imágenes representativas ($n = 4$) de producción de NO (color rojo) y fluorescencia de GFP (color verde) en VSMC no fijadas transducidas con siCtl o si*Adamts1* y tratadas con los inhibidores de Nos2 como se indica. Bar, 50 μm .

Figura 18. Vista 3D de la estructura de NOS2, ligandos y sitios de unión de inhibidores. (a) Estructura de NOS2 humano y ligandos nativos y (b), zoom de la interfaz del dímero y la región de ligandos, que muestra las cadenas A (color verde) y B (color cian) de NOS2 humana en forma de viñeta y los ligandos nativos (Hemo y H4B en color rojo y L-Arginina en color amarillo) en forma de barras. Todos los modelos de inhibidores se unen en el sitio de guanidina de la región del ligando (en color amarillo en forma de barras). Se muestran el sitio de unión para L-NAME en (c), 1400w en (d), Aminoguanidina en (e), GW273629 en (f), L-NIL en (g) y Clotrimazol en (h). En el caso del Clotrimazol, como se informó anteriormente, inhibe la dimerización de NOS2 modificando la interfaz del dímero.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los términos "óxido nítrico sintasa" y "NOS", utilizados indistintamente en el presente documento, se refieren a cualquiera de las isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa, incluidas eNOS, nNOS e iNOS.

Los términos "óxido nítrico sintasa inducible", "NOS-2" e "iNOS" utilizados indistintamente en el presente documento se refieren a la isoforma inducible independiente de Ca^{+2} de la enzima óxido nítrico sintasa.

Los términos "inhibidor de óxido nítrico sintasa" e "inhibidor de NOS", utilizados indistintamente en el presente documento, denotan un compuesto que reduce el efecto fisiológico de una enzima óxido nítrico sintasa. Tal inhibidor puede ser selectivo para una isoforma particular de óxido nítrico sintasa, o puede ser sustancialmente no selectivo, es decir, eficaz en gran medida sobre dos o más isoformas de óxido nítrico sintasa.

Los términos "inhibidor selectivo de óxido nítrico sintasa" e "inhibidor selectivo de NOS" denotan un compuesto capaz de reducir el efecto fisiológico de una isoforma particular de óxido nítrico sintasa preferentemente sobre otras isoformas de óxido nítrico sintasa.

Los términos "inhibidor selectivo de óxido nítrico sintasa inducible", "inhibidor selectivo de NOS-2" e "inhibidor selectivo de iNOS" denotan un compuesto capaz de reducir el efecto fisiológico de la isoforma independiente del ion calcio de óxido nítrico sintasa preferentemente sobre otras isoformas de óxido nítrico sintasa. En una

realización, un inhibidor selectivo de iNOS produce la inhibición selectiva de iNOS en comparación con NOS endotelial o NOS neuronal de modo que la administración in vivo da como resultado una eficacia (DE₅₀) de menos de 100 mg/kg. En otra realización, un inhibidor selectivo de iNOS produce la inhibición selectiva de iNOS en comparación con NOS endotelial o NOS neuronal de modo que la administración in vivo da como resultado una eficacia (DE₅₀) de menos de 10 mg/kg en un modelo de endotoxina de roedor). En una realización adicional, un inhibidor de iNOS muestra una selectividad de aproximadamente 20 veces con respecto a eNOS medida por la elevación de la presión arterial media. En otra realización más, un inhibidor de iNOS muestra una selectividad 100 veces o mayor con respecto a eNOS medida por la elevación de la presión arterial media. En otra realización más, un inhibidor de iNOS muestra una selectividad de aproximadamente 20 veces con respecto a nNOS medida por reducciones en el tránsito gastrointestinal o la erección del pene. En otra realización, un inhibidor de iNOS muestra una selectividad de aproximadamente 100 veces o mayor con respecto a nNOS medida por reducciones en el tránsito gastrointestinal o la erección del pene.

Se entiende por "escrutinio" el examen o prueba de un grupo de individuos pertenecientes a la población general, con riesgo de padecer un aneurisma de aorta torácica (TAA), como se define a continuación, con el objetivo de discriminar individuos sanos de aquellos que padecen un aneurisma de aorta torácica (TAA) no diagnosticado o que tienen un alto riesgo de padecer dichas indicaciones.

El término "aneurisma de la aorta torácica (TAA)" incluye la definición médica bien aceptada que define el TAA como una dilatación patológica localizada del segmento torácico de la pared aórtica al menos 50% > lo normal, el aneurisma verdadero contiene todas las capas de la pared del vaso. La presente invención incluye enfermedades que dan como resultado un TAA tal como el aneurisma de la aorta torácica sintromico (TAA) tal como Síndrome de Marfan, Ehlers Danlos vascular, síndrome de Loeys Dietz (Tipos 1 y 2) y Aneurisma y disección de la aorta torácica familiar (TAAD familiar); TAA no sintromicos; o cualquier otra enfermedad asociada con una aortopatía provocada por la deficiencia de Adamts1. El aneurisma de aorta torácica (TAA) no sintromico incluye aquellas enfermedades no entendidas como síndromes que dan como resultado un aneurisma de aorta torácica (TAA). La presente invención también abarca enfermedades que dan como resultado un TAA tal como la válvula aórtica bicúspide, en donde los ratones nulos para Adamts1 desarrollan una válvula aórtica bicúspide en la mayoría de los casos.

La expresión "muestra biológica mínimamente invasiva" se refiere a cualquier muestra que se toma del cuerpo del paciente sin necesidad de utilizar aparatos dañinos, excepto agujas finas utilizadas para extraer la sangre del paciente, y en consecuencia sin ser perjudicial para el paciente. Específicamente, muestra biológica mínimamente invasiva se refiere en la presente invención a: muestras de sangre, suero o plasma.

Los términos "regulado por incremento" o "expresado en exceso" de cualquiera de los biomarcadores o combinaciones de los mismos descritos en la presente invención, se refieren a un aumento en su nivel de expresión con respecto a un "valor umbral" o "valor de corte" dados en al menos 5%, en al menos 10%, en al menos 15%, en al menos 20%, en al menos 25%, en al menos 30%, en al menos 35%, en al menos 40%, en al menos 45%, en al menos 50%, en al menos 55%, en al menos 60%>, en al menos 65%>, en al menos 70%, en al menos 75%, en al menos 80%, en al menos 85%, en al menos 90%, en al menos 95%, en al menos 100%, en al menos 110%, en al menos 120%, en al menos 130%, en al menos 140%, en al menos 150%, o más. Además, los términos "regulado por incremento" o "expresado en exceso" de cualquiera de los biomarcadores o combinaciones de los mismos descritos en la presente invención, también se refieren a un aumento en su nivel de expresión con respecto a un "valor umbral" o "valor de corte" dados en al menos aproximadamente 1.5 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 15 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 50 veces o aproximadamente 100 veces.

El término "Adamts1" se refiere a la desintegrina A y la metaloproteínasa con motivos de trombospondina 1, en particular una enzima que en seres humanos está codificada por el gen ADAMTS1.

El término "expresión reducida" de cualquiera de los biomarcadores o combinaciones de los mismos descritos en la presente invención, se refiere a una reducción en su nivel de expresión con respecto a un "valor umbral" o "valor de corte" dados en al menos 5%, en al menos 10%, en al menos 15%, en al menos 20%, en al menos 25%, en al menos 30%, en al menos 35%, en al menos 40%, en al menos 45%, en al menos 50%, en al menos 55%, en al menos 60%>, en al menos 65%>, en al menos 70%, en al menos 75%, en al menos 80%, en al menos 85%, en al menos 90%, en al menos 95%, en al menos 100%, en al menos 110%, en al menos 120%, en al menos 130%, en al menos 140%, en al menos 150%, o más. Además, el término "expresión reducida" de cualquiera de los biomarcadores o combinaciones de los mismos descritos en la presente invención, también se refiere a una disminución en su nivel de expresión con respecto a un "valor umbral" o "valor de corte" dados en al menos aproximadamente 1.5 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 15 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 50 veces, o aproximadamente 100 veces.

Los términos "valor umbral" o "valor de corte", cuando se refieren a los niveles de expresión de Adamts1 o

INOS descritos en la presente invención, se refieren a un nivel de expresión de referencia indicativo de que es probable que un sujeto padezca un aneurisma de aorta torácica (TAA) sindrómico o no sindrómico con una sensibilidad y especificidad dadas si los niveles de expresión del paciente están por encima o por debajo de dichos niveles umbral o de corte o de referencia. En el contexto de la presente invención, dichos "valor umbral" o "valor de corte" son un nivel de expresión de referencia tomado de un sujeto sano.

En la técnica anterior se conocen una variedad de métodos estadísticos y matemáticos para establecer el nivel umbral o de corte de la expresión. Se puede seleccionar un nivel expresión umbral o de corte para un biomarcador particular. Un experto en la técnica apreciará que estos niveles de expresión umbral o de corte se pueden variar, por ejemplo, moviéndose a lo largo del gráfico ROC para un biomarcador particular o combinaciones de los mismos: para obtener diferentes valores de sensibilidad o especificidad afectando de ese modo el rendimiento general del ensayo. Por ejemplo, si el objetivo es tener un método diagnóstico robusto desde el punto de vista clínico, los autores de la presente invención deberían intentar que tenga una sensibilidad alta. Sin embargo, si el objetivo es tener un método rentable, los autores de la presente invención deberían intentar conseguir una alta especificidad. El mejor corte se refiere al valor obtenido del gráfico ROC para un biomarcador particular que produce la mejor sensibilidad y especificidad. Los valores de sensibilidad y especificidad se calculan en el rango de los umbrales (cortes). Así, los valores umbral o de corte se pueden seleccionar de manera que la sensibilidad y/o especificidad sean al menos aproximadamente 70%, y pueden ser, por ejemplo, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o al menos 100% en al menos 60% de la población de pacientes analizada, o en al menos 65%, 70%, 75% u 80% de la población de pacientes analizada.

Como se emplea en el presente documento, la expresión "alquilo C1-C6" incluye grupos metilo y etilo, y grupos propilo, butilo, pentilo y hexilo de cadena lineal o ramificada. Los grupos alquilo particulares son metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y terc-butilo. Se debe interpretar que expresiones derivadas tales como "alcoxi C1-6", "alcoxi(C1-6)alquilo C1-6", "hidroxialquilo C1-6", "alquil(C1-6)carbonilo", "alcoxi(C1-6)carbonilalquilo C1-6", "alcoxi(C1-6)carbonilo", "aminoalquilo C1-6", "alquil(C1-6)carbamoilalquilo C1-6", "dialquil(C1-6)carbamoilalquilo C1-6", "mono- o di-alquil(C1-6)aminoalquilo C1-6", aminoalquil(C1-6)carbonilo", "difenilalquilo C1-6", "arilalquilo C1-6", "arilcarbonilalquilo C1-6" y "ariloxialquilo C1-6".

Como se emplea en el presente documento, la expresión "alquenilo C2-6" incluye etenilo y grupos propenilo, butenilo, pentenilo y hexenilo de cadena lineal o ramificada. De manera similar, la expresión "alquinilo C2-6" incluye etinilo y propinilo, y grupos butinilo, pentinilo y hexinilo de cadena lineal o ramificada.

Como se emplea en el presente documento "arilo" representa un sistema anular aromático carbocíclico tal como fenilo, bifenilo, naftilo, antracenilo, fenantrenilo, fluorenilo, indenilo, pentalenilo, azuleno, bifenilenilo y similares. También se pretende que arilo incluya los derivados parcialmente hidrogenados de los sistemas aromáticos carbocíclicos enumerados anteriormente. Los ejemplos no limitantes de tales derivados parcialmente hidrogenados son 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, 1,4-dihidronaftilo y similares.

Como se emplea en el presente documento "ariloxi" representa un grupo -O-arilo en donde arilo se define como antes.

Como se emplea en el presente documento "heteroarilo" (solo o en cualquier combinación, tal como "heteroariloxi" o "heteroarilalquilo"): es un sistema anular aromático de 5-10 miembros en el que uno o más anillos contienen uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, O o S, tal como, pero sin limitarse a, pirrol, pirazol, furano, tiofeno, quinolina, isoquinolina, quinazolinilo, piridina, pirimidina, oxazol, tiazol, tiadiazol, tetrazol, triazol, imidazol o benzimidazol.

Como se emplea en el presente documento "heterocíclico o heterocíclico" (solo o en cualquier combinación, tal como "heterocíclicilalquilo") – es un sistema anular de 4-10 miembros saturado o parcialmente insaturado en el que uno o más anillos contienen uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, O o S; tal como, pero sin limitarse a, pirrolidina, piperidina, piperazina, morfina, tetrahidropirano o imidazolidina.

Como se emplea en el presente documento, la expresión "perfluoroalquilo C1-6" significa que todos los átomos de hidrógeno en dicho grupo alquilo se reemplazan por átomos de flúor. Los ejemplos ilustrativos incluyen trifluorometilo y pentafluoroetilo, y grupos heptafluoropropilo, nonafluorobutilo, undecafluoropentilo y tridecafluorohexilo de cadena lineal o ramificada. Por consiguiente, se debe considerar la expresión derivada, "perfluoroalcoxi C1-6".

Como se emplea en el presente documento, la expresión "cicloalquilo C3-C8" significa ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

Como se emplea en el presente documento, la expresión "cicloalquil(C3-8)alquilo C1-6" significa que el cicloalquilo C3-8 como se define en el presente documento está anclado adicionalmente a alquilo C1-6 como se define en el presente documento. Los ejemplos representativos incluyen ciclopropilmetilo, 1-ciclobutiletilo,

2-ciclopentilpropilo, ciclohexilmetilo, 2-cicloheptiletilo y 2-ciclooctilbutilo y similares.

Como se emplea en el presente documento "halógeno" o "halo" significan cloro, flúor, bromo y yodo.

5 Como se emplea en el presente documento "alquil(C1-6)sulfonilo" en el presente contexto designa un grupo -S(=O)₂alquilo C1-6 en donde alquilo C1-6 se define como antes. Los ejemplos representativos incluyen, pero sin limitarse a, metilsulfonilo, etilsulfonilo, n-propilsulfonilo, isopropilsulfonilo, butilsulfonilo, isobutilsulfonilo, sec-butilsulfonilo, terc-butilsulfonilo, n-pentilsulfonilo, isopentilsulfonilo, neopentilsulfonilo, terc-pentilsulfonilo, n-hexilsulfonilo, isohexilsulfonilo y similares.

10 Como se emplea en el presente documento "arilsulfonilo" representa un grupo -S(=O)₂arilo en el que arilo se define como antes.

15 Como se emplea en el presente documento "heteroarilsulfonilo" representa un grupo -S(=O)₂heteroarilo en donde heteroarilo se define como antes.

Como se emplea en el presente documento, "paciente" significa un animal de sangre caliente, tal como por ejemplo ratas, ratones, perros, gatos, cobayas y primates como seres humanos.

20 Como se emplea en el presente documento, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" significa un disolvente, dispersante, excipiente, adyuvante u otro material no tóxico que se mezcla con el compuesto de la presente invención para permitir la formación de una composición farmacéutica, es decir, una forma de dosificación susceptible de administrarse al paciente. Un ejemplo de tal portador es un aceite farmacéuticamente aceptable utilizado típicamente para administración parenteral.

25 El término "sales farmacéuticamente aceptables", como se emplea en el presente documento, significa que las sales de los compuestos de la presente invención se pueden utilizar en preparaciones medicinales. Sin embargo, otras sales pueden ser útiles en la preparación de los compuestos según la invención o de sus sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de los compuestos de esta invención incluyen sales de adición de ácido que pueden formarse, por ejemplo, mezclando una solución del compuesto según la invención con una solución de un ácido farmacéuticamente aceptable tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido acético, ácido salicílico, ácido cinámico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido hidroxibenzoico, ácido fenilacético, ácido benzoico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido malónico, ácido carbónico o ácido fosfórico. También se pueden formar sales metálicas ácidas tales como monohidrogeno-ortofosfato de sodio e hidrógeno-sulfato de potasio. Además, las sales así formadas pueden presentarse como sales de monoácidos o diácidos y pueden existir hidratadas o sustancialmente anhidras. Además, cuando los compuestos de la invención portan un radical

30 del compuesto según la invención con una solución de un ácido farmacéuticamente aceptable tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido acético, ácido salicílico, ácido cinámico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido hidroxibenzoico, ácido fenilacético, ácido benzoico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido malónico, ácido carbónico o ácido fosfórico. También se pueden formar sales metálicas ácidas tales como monohidrogeno-ortofosfato de sodio e hidrógeno-sulfato de potasio. Además, las sales así formadas pueden presentarse como sales de monoácidos o diácidos y pueden existir hidratadas o sustancialmente anhidras. Además, cuando los compuestos de la invención portan un radical

35 ácido, sus sales farmacéuticamente aceptables adecuadas pueden incluir sales de metales alcalinos, p. ej., sales de sodio o potasio; sales de metales alcalinotérreos, p. ej., sales de calcio o magnesio; y sales formadas con ligandos orgánicos adecuados, p. ej., sales de amonio cuaternario.

45 "Sustituido" significa sustituido con 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo C1-6, perfluoroalquilo C1-6, hidroxilo, -CO₂H, un éster, una amida, alcoxi C1-C6, perfluoroalcoxi C1-C6, -NH₂, Cl, Br, I, F, -NH-alquilo inferior y -N(alquilo inferior)₂.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad del compuesto que es eficaz en el tratamiento del trastorno o condición mencionados.

50 Se pretende que el término "que comprende" incluya, pero sin limitarse a, todo lo que sigue a la palabra "que comprende". Por tanto, el uso del término "que comprende" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar presentes o no.

55 Por "que consiste en" se entiende que incluye y se limita a todo lo que sigue a la frase "que consiste en". Por lo tanto, la frase "que consiste en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios y que no puede haber otros elementos presentes.

60 También cabe señalar que el término "kit", como se emplea en el presente documento, no se limita a ningún dispositivo específico e incluye cualquier dispositivo adecuado para poner en práctica la invención, tal como, pero sin limitarse a, micromatrices, biomatrices, biochips o matrices de biochips.

65 Las invenciones descritas ilustrativamente en el presente documento pueden ponerse en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no divulgados específicamente en el presente documento. Así, por ejemplo, los términos "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc. se leerán de forma amplia y sin limitación. Además, los términos y expresiones empleados

en el presente documento se han utilizado como términos de descripción y no de limitación, y no existe ninguna intención, en el uso de tales términos y expresiones, de excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, pero se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, debe entenderse que, aunque la presente invención se ha divulgado específicamente mediante realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a modificaciones y variaciones de las invenciones allí plasmadas divulgadas en el presente documento, y que tales modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de esta invención.

10 Descripción

La presente invención identifica la vía del NO, en particular iNOS, como un mediador esencial de la enfermedad aórtica en modelos de ratón y sugiere tal vía como una posible diana para la intervención en aortopatías torácicas, en particular en TAA humanos. Además, los autores de la presente invención muestran que Adamts1 es un mediador importante de la homeostasis de la pared vascular cuya expresión está disminuida en los aneurismas de la aorta torácica, en particular en los aneurismas de la aorta torácica (TAA) sindrómicos, más particularmente en SMF. De hecho, la semejanza de la aortopatía en ratones con deficiencia de Adamts1 con el FTAAD sindrómico humano sugiere que la regulación por disminución de ADAMTS1 en SMF puede ser la base del fenotipo aórtico de los pacientes con SMF.

Los autores de la presente invención informaron previamente de que el tropismo de los lentivirus depende de la vía de administración y que la inyección en la vena yugular produce una transducción estable y eficiente de la pared aórtica. Este enfoque consigue el silenciamiento a largo plazo de Adamts1 en toda la aorta y proporciona una alternativa al uso de ratones genómicamente modificados para el análisis de genes expresados en la pared vascular. El modelo de silenciamiento da como resultado cambios fenotípicos aórticos y síntomas indistinguibles de los de los ratones Adamts1+/- . Un beneficio experimental clave del silenciamiento lentiviral es el momento controlado del direccionamiento génico. Lograr esto en la pared aórtica con un enfoque de bloqueo génico dirigido condicional requeriría el uso simultáneo de controladores específicos para los 3 tipos principales de células y no sería viable. Por el contrario, un solo tipo de lentivirus bloquea la expresión génica en todas las células de la pared vascular. Por otra parte, la disminución de la expresión génica cronometrada proporciona un modelo único para estudiar los trastornos aórticos, permitiendo a los autores de la presente invención definir la secuencia patológica que conduce a la enfermedad: la transducción de siAdamts1 desencadenó hipotensión y elastólisis inmediatas, seguidas rápidamente de dilatación aórtica, mientras que la vía TGFβ-Smad no se activó hasta 1-2 semanas después de la infección lentiviral.

Aunque la degeneración y dilatación mediales de la aorta están asociadas con la activación de las vías de TGFβ y AngII en la enfermedad aórtica sindrómica y no sindrómica, el bloqueo de estas vías no tuvo ningún efecto significativo sobre la dilatación aórtica mediada por siAdamts1, la degeneración medial o la hipotensión, al menos en las primeras 2 semanas de la enfermedad. Sin embargo, los datos de los autores de la presente invención son compatibles con el papel de estas vías en fases posteriores. En este sentido, la neutralización de TGFβ tampoco logró inhibir la progresión del aneurisma en las primeras fases de una forma progresivamente grave de SMF (ratones Fbn1mgR/mgR), pero fue protectora en fases posteriores.

La hipertensión se considera un factor de riesgo en AA; sin embargo, los resultados de los autores de la presente invención muestran que los efectos hipertensivos de L-NAME son compatibles con la reversión de la dilatación aórtica en ratones Adamts1+/- y SMF. La reversión de la dilatación fue notablemente rápida y se completó en una semana. El depósito de fibra elástica y colágeno en estos ratones volvió a niveles normales 3 semanas después de la inhibición de NOS, lo que sugiere la activación de mecanismos para el aclaramiento de colágeno de la pared aórtica y la inducción de la síntesis de elastina. Los autores de la presente invención utilizaron inhibidores de NOS en ratones de 3 a 4 meses de edad y aún no se ha determinado su efecto terapéutico en ratones mayores. Sin embargo, los resultados de los autores de la presente invención indican claramente que el NO es el principal desencadenante de las enfermedades aórticas y también es necesario para mantener sus síntomas.

Informes anteriores que implican al NO en modelos murinos de AA cerebral y abdominal proporcionan datos contradictorios, a menudo relacionados con enfoques farmacológicos frente a enfoques de delección genética dirigida. Por ejemplo, se ha informado sobre roles inhibidores o estimuladores de Nos2 en modelos de AAA. En aneurismas cerebrales, los resultados con inhibidores farmacológicos indican que Nos2 es fundamental para el desarrollo de la enfermedad; sin embargo, los ratones Nos2-/- y wt tienen una incidencia similar de aneurisma cerebral. En el análisis de los autores de la presente invención, los estudios genéticos respaldan los resultados obtenidos con L-NAME: los ratones Nos2-/- eran resistentes a la aortopatía desencadenada por siAdamts1. Por tanto, el papel patológico del NO en este modelo está mediado por Nos2, que se induce ya 2 días después del silenciamiento de Adamts1. Es importante señalar que, aunque Nos2 normalmente no se expresa en células en reposo, una vez inducida, sigue siendo muy activa. Los autores de la presente invención mostraron un alto nivel de proteína Nos2 en 2 modelos de ratón con deficiencia de Adamts1 en ratones SMF y, lo que es más importante, en secciones aórticas de pacientes con SMF. En conjunto, los resultados de los

autores de la presente invención indican que la producción de NO mediada por NOS2 juega un papel esencial en la patogénesis de TAA, en particular en la patogénesis de los aneurismas de la aorta torácica (TAA) síndromicos, en particular en SMF y la aortopatía desencadenada por la deficiencia de Adams1.

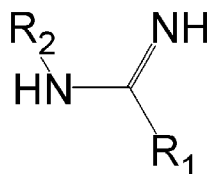
- 5 Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición útil en un método para el tratamiento, prevención o inhibición de un aneurisma de la aorta torácica (TAA) en un sujeto que necesita tal tratamiento, prevención o inhibición, que comprende administrar a dicho sujeto un bloqueador/inhibidor de iNOS o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el inhibidor de iNOS se selecciona del grupo que consiste en 1400W (N'-[[3-(aminometil)fenil]metil]etanimidamida), GW274150 (ácido (2S)-2-amino-4-[2-(1-aminoetilidenamino)etilsulfanil]butanoico), GW273629 (ácido (2R)-2-amino-3-[2-(1-aminoetilidenamino)etilsulfonil]-propanoico), Aminoguanidina (AG) (2-aminoguanidina), L-NIL (ácido (2S)-2-amino-6-(1-aminoetilidenamino)hexanoico), clotrimazol y L-NAME ((2S)-2-amino-5-[[amino(nitramido)metiliden]amino]pentanoato de metilo), o cualquier sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Es importante señalar que el método del primer aspecto de la invención es útil sin importar si el sujeto ha sido diagnosticado de TAA o tiene riesgo de desarrollar TAA según la metodología descrita más adelante en la presente invención o si el sujeto ha sido diagnosticado de TAA o tiene riesgo de desarrollar TAA con cualquier otra metodología clínicamente eficaz conocida.

- Cabe señalar además que los TAA se pueden subdividir en presentaciones síndromicas que muestran características prominentes de enfermedad sistémica del tejido conectivo (tal como el síndrome de Marfan, ADESAD (enfermedad aórtica síndromica provocada por deficiencia de Adams1 (ADESAD)) y síndrome de Loays-Dietz (LDS)) y presentaciones no síndromicas, tales como válvula aórtica bicúspide con TAA y TAA familiar aislado. Los autores de la presente invención han ilustrado claramente a lo largo de la presente memoria descriptiva, en particular en las figuras 6m y 6o, que los inhibidores de iNOS son útiles como terapia médica dirigida a prevenir, limitar y revertir la expansión progresiva de TAA en dos presentaciones síndromicas, en particular en Marfan y ADESAD. Además, téngase en cuenta que es bien sabido que las presentaciones síndromicas en general presentan atributos similares en términos de desarrollo de la enfermedad y progresión posterior, en particular todas se desarrollan con degeneración medial, que se caracteriza por la fragmentación de las fibras elásticas, entre otras características; por lo tanto, parece más plausible que un tratamiento médico que funciona bien en dos presentaciones síndromicas que revierten atributos comunes tales como la degeneración medial también funcionen en otras presentaciones síndromicas tales como el síndrome de Loays-Dietz (LDS) (véanse la figuras 4h, 4i (roturas de elastina y fibrosis, respectivamente, en ADESAD) (remitirse también a la figura 6o, 6h y 6j)). En cuanto a las presentaciones no síndromicas, tales como la válvula aórtica bicúspide con TAA y TAA familiar aislado, los autores de la presente invención han creado un modelo animal para presentaciones no síndromicas de la enfermedad (remitirse a las figuras 2e, 2f y 2g en donde la degeneración medial y la dilatación aórtica se muestran en este modelo). Además, las figuras 4b, 4c, 4d, 5d, 5e y 5f ilustran que el tratamiento con inhibidores de iNOS previene la dilatación aórtica y la degeneración medial en tal modelo de presentación no síndromica y que los ratones con el gen para iNOS bloqueado en dicha presentación no síndromica de la enfermedad no desarrollan degeneración medial ni dilatación aórtica.

- Por lo tanto, los autores de la presente invención creen honestamente que la evidencia proporcionada en la presente memoria descriptiva demuestra la utilidad de los inhibidores de iNOS como terapia médica dirigida a prevenir, limitar y revertir la expansión progresiva de TAA en presentaciones síndromicas y no síndromicas de la enfermedad. En consecuencia, la presente memoria descriptiva demuestra la utilidad de los inhibidores de iNOS en el tratamiento del TAA.

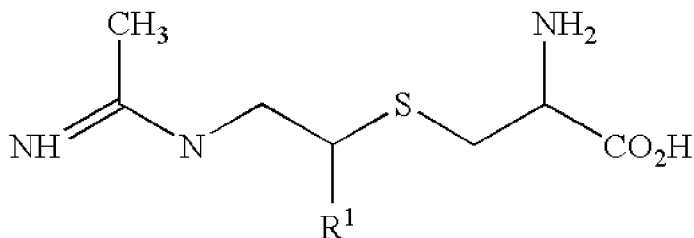
- En un aspecto preferido de la invención, el inhibidor de iNOS es capaz de unirse al sitio guanidina de la región del ligando de L-arginina de la estructura de NOS2 humana e inhibir la isoforma de NOS2 humana en presencia de L-arginina. En este sentido, los autores de la presente invención han representado adicionalmente la expresión "inhibidores de iNOS" caracterizándolos por su capacidad para unirse al sitio de guanidina de la región del ligando de L-arginina de la estructura de NOS2 humana e inhibir la isoforma de NOS2 humana en presencia de L-arginina. Obsérvese que desde los primeros días del descubrimiento del fármaco se ha sabido que moléculas de diferentes tipos estructurales pueden provocar la misma acción biológica. En el presente caso y como se ilustra a lo largo de la memoria descriptiva, compuestos estructuralmente diversos se unen a la diana común de la misma manera que se ilustra en la figura 18, todos inhiben la isoforma NOS2 humana en presencia de L-arginina y reducen la expresión de NO como se ilustra en la figura 17 o figura 61 para 1400W, aminoguanidina (figura 15a y 15b), L-Name (figura 4b), GW273629, L-NIL y Clotrimazol (figura 16).

- En el presente documento se divulga que un inhibidor de iNOS puede comprender el siguiente radical químico unido covalentemente a través de R2 al resto del compuesto químico:



en donde R1 es un grupo metilo, metiamina o amino y en donde R2 es un grupo amino o un grupo metileno.

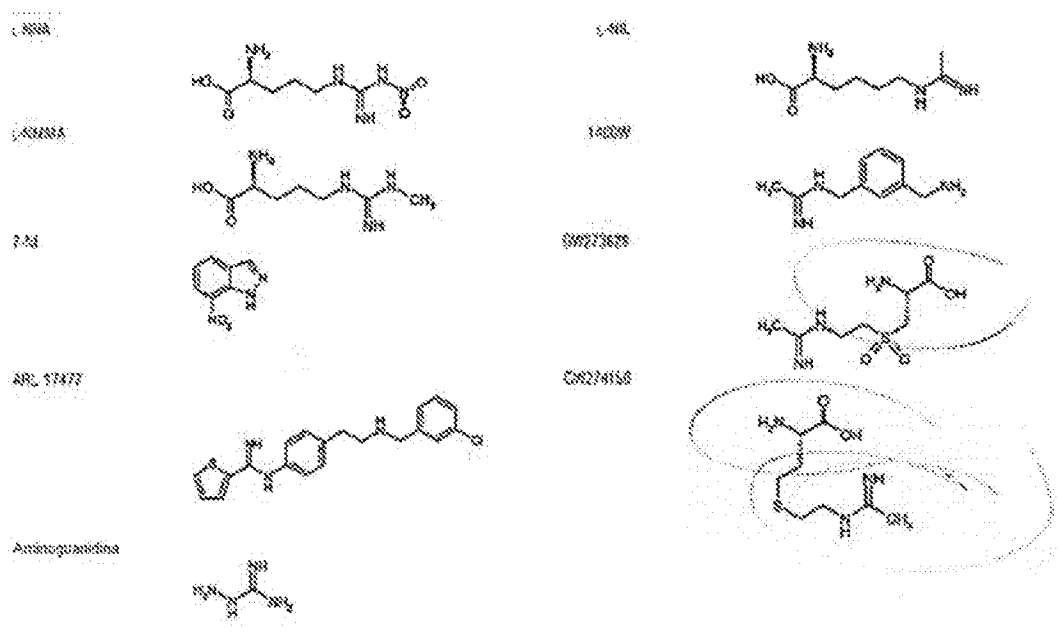
- 5 Preferiblemente, el bloqueador de iNOS/bloqueador es un inhibidor selectivo de iNOS. Más preferiblemente, el inhibidor de iNOS se selecciona del grupo que consiste en 1400W, L-NAME, BYK191023, GW274150, GW273629, MEG (succinato de sodio), Hidrocloruro de aminoguanidina (AG), L-Canavanina, Dihidrobromuro de S-(2-aminoetil)- ITU, Hidrocloruro de 2-iminopiperidina, 1-Amino-2-hidroxiguanidina, p-Toluenosulfonato, Dihidrobromuro de 1,3-BP-ITU, 2-Amino-4-metilpiridina, Sulfato de S-metilisotiourea, Sulfato de canavanina, MEG(sulfato), Hidrocloruro de AMT, Dihidrocloreuro de L-NIL, 1,3-PBITU, Dihidrobromuro, Dihidrobromuro de S-(3-aminopropil)-ITU, Hidrobromuro de S-isopropilisotiourea, Propenil-L-NIO (hidrocloruro), Acetato de 2-imino-4-metilpiperidina, Hidrobromuro de N-Bencilacetamida, 2-Imino-4,6-dimetilpiperidina, una cumarina o está representado por la fórmula:



15

en donde R1 se selecciona entre alquilo C1-4, cicloalquilo C3-4, hidroxialquilo C1-4 y haloalquilo C1-4 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 20 Algunos de los compuestos mencionados anteriormente, se representan en el presente documento a continuación:



- 25 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, dicho inhibidor de iNOS se selecciona del grupo que consiste en:

S-((R)-2-(1-iminoetilamino)propil)-L-cisteína;

- 30 S-((S)-2-(1-iminoetilamino)propil)-L-cisteína;

S-((R/S)-2-(1-iminoetilamino)propil)-L-cisteína;

S-((R)-2-(1-iminoetilamino)propil)-D-cisteína;

5 S-((S)-2-(1-iminoetilamino)propil)-D-cisteína;

S-((R/S)-2-(1-iminoetilamino)propil)-D-cisteína;

S-((R/S)-2-(1-iminoetilamino)butil)-L-cisteína;

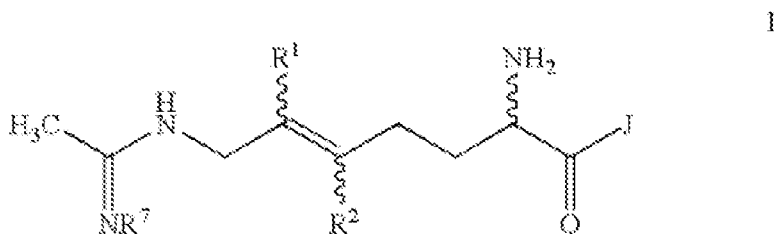
10 S-((R/S)-2-(1-iminoetilamino,2-ciclopropil)etil)-L-cisteína; y

S-((R/S)-2-(1-iminoetilamino,3-hidroxi)propil)-L-cisteína,

15 o una de sus sales, solvatos o derivados fisiológicamente funcionales farmacéuticamente aceptables.

Otros inhibidores de iNOS divulgados en la presente memoria descriptiva se pueden seleccionar del grupo que consiste en:

20 un compuesto que tiene la Fórmula I



en donde:

25

- R1 se selecciona del grupo que consiste en H, halo y alquilo que puede estar opcionalmente sustituido con uno o más halo;

30

- R2 se selecciona del grupo que consiste en H, halo y alquilo que puede estar opcionalmente sustituido con uno o más halo;

- con la condición de que al menos uno de R1 o R2 contenga un halo;

35

- R7 se selecciona del grupo que consiste en H e hidroxi;

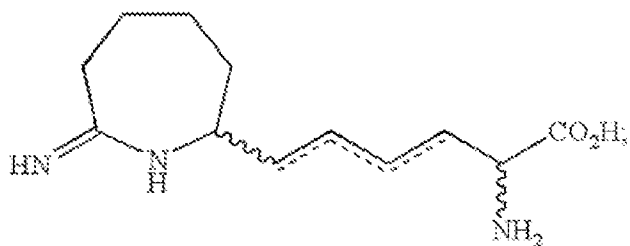
- J se selecciona del grupo que consiste en hidroxi, alcoxi y NR3R4 en donde;

- R3 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo inferior, alquilenilo inferior y alquinilo inferior;

40

- R4 se selecciona del grupo que consiste en H, y un anillo heterocíclico en el que al menos un miembro del anillo es carbono y en el que de 1 a aproximadamente 4 heteroátomos se seleccionan independientemente entre oxígeno, nitrógeno y azufre y dicho anillo heterocíclico puede estar opcionalmente sustituido con heteroarilamino, N-aril-N-alquilamino, N-heteroarilamino-N-alquilamino, haloalquiltio, alcanoiloxi, alcoxi, heteroaralcoxi, cicloalcoxi, cicloalqueniloxi, hidroxi, amino, tio, nitro, alquil(inferior)amino, alquiltio, alquiltioalquilo, arilamino, aralquilamino, ariltio, alquilsulfino, alquilsulfonilo, alquilsulfonamido, alquilaminosulfonilo, amidosulfonilo, monoalquilamidossulfonilo, dialquilamidossulfonilo, monoarilamidossulfonilo, arilsulfonamido, diarilamidossulfonilo, monoalquilmonoarilamidossulfonilo, arilsulfino, arilsulfonilo, heteroariltio, heteroarilsulfino, heteroarilsulfonilo, alcanilo, alquenoilo, aroilo, heteroarilo, aralcanilo, heteroaralcanilo, haloalcanilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilendioxo, haloalquilendioxo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloalquilalquilo inferior, cicloalquenilalquilo inferior, halo, haloalquilo, haloalcoxi, hidroxi, hidroxi, hidroxiaralquilo, hidroxiaralquilo, hidroxiaralquilo, haloalcoxiaralquilo, arilo, aralquilo, ariloxi, aralcoxi, ariloxialquilo, heterociclilo saturado, heterociclilo parcialmente saturado, heteroarilo, heteroariloxi, heteroariloxialquilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, arilalquenilo, heteroarilalquenilo, cianoalquilo, dicianoalquilo, carboxamidoalquilo, dicarboxamidoalquilo, cianocarboxialquilo, carboxialquilo, dicarboxialquilo, cianocicloalquilo, dicianocicloalquilo, carboxamidocicloalquilo, dicarboxamidocicloalquilo, carboxialcioxianocicloalquilo, carboxialcioxialquilo, dicarboxialcioxialquilo, formilalquilo, acilalquilo, dialcoxifosfonoalquilo, diaralcoxifosfonoalquilo, fosfonoalquilo, dialcoxifosfonoalcoxi, diaralcoxifosfonoalcoxi, fosfonoalcoxi, dialcoxifosfonoalquilamino, diaralcoxifosfonoalquilamino, fosfonoalquilamino,

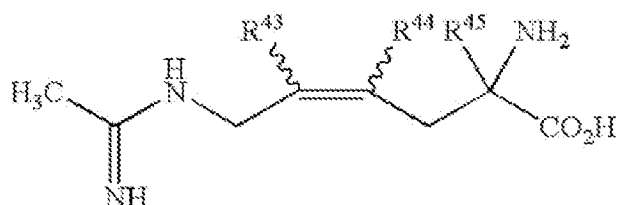
un compuesto de Fórmula IV



IV

un compuesto de Fórmula V:

5



V

en donde:

- R43 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquilo C1-C5 y alquilo C1-C5 sustituido con alcoxi o uno o más halo;

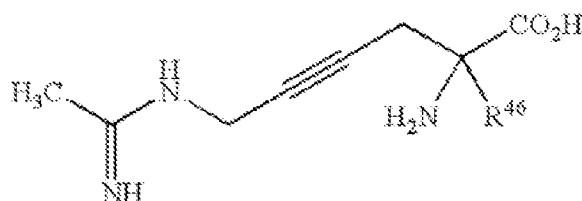
10

- R44 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquilo C1-C5 y alquilo C1-C5 sustituido con alcoxi o uno o más halo;

- R45 es alquilo C1-C5 o alquilo C1-C5 sustituido con alcoxi o uno o más halo;

15

un compuesto de Fórmula VI:



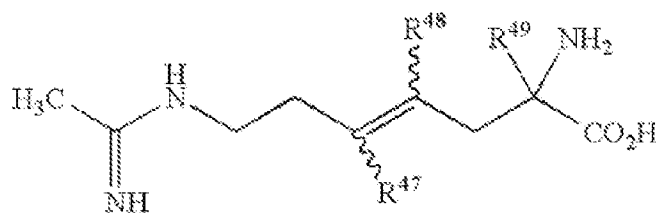
VI

en donde:

R46 es alquilo C1-C5, dicho alquilo C1-C5 opcionalmente sustituido con halo o alcoxi, dicho alcoxi opcionalmente sustituido con uno o más halo;

un compuesto de Fórmula VII

25



en donde:

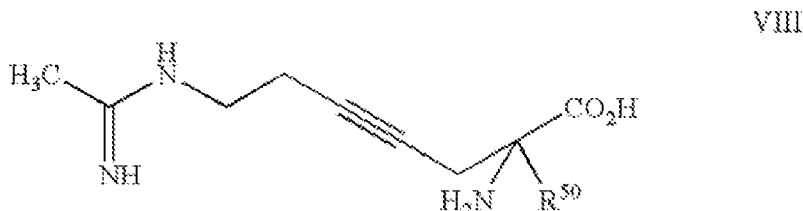
- R47 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquilo C1-C5 y alquilo C1-C5 sustituido con alcoxi o uno o más halo;

30

- R48 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo, alquilo C1-C5 y alquilo C1-C5 sustituido con alcoxi o uno o más halo;

5 - R49 es alquilo C1-C5 o alquilo C1-C5 sustituido con alcoxi o uno o más halo;

un compuesto de Fórmula VIII



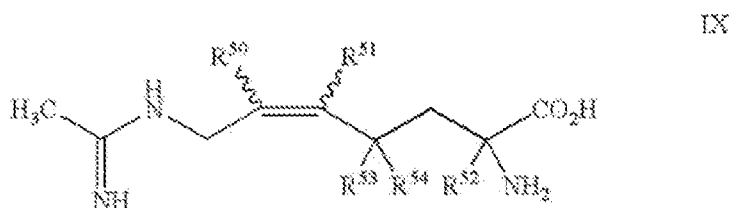
10

en donde:

- R50 es alquilo C1-C5, dicho alquilo C1-C5 opcionalmente sustituido con halo o alcoxi, dicho alcoxi opcionalmente sustituido con uno o más halo;

15

un compuesto de Fórmula IX



20

en donde:

- R50 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo y alquilo C1-C5, dicho alquilo C1-C5 opcionalmente sustituido con halo o alcoxi, dicho alcoxi opcionalmente sustituido con uno o más halo;

25

- R51 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo y alquilo C1-C5, dicho alquilo C1-C5 opcionalmente sustituido con halo o alcoxi, dicho alcoxi opcionalmente sustituido con uno o más halo;

- R52 es alquilo C1-C5, dicho alquilo C1-C5 opcionalmente sustituido con halo o alcoxi, dicho alcoxi opcionalmente sustituido con uno o más halo;

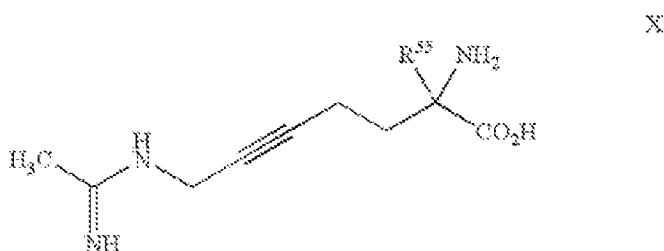
30

- R53 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo y alquilo C1-C5, dicho alquilo C1-C5 opcionalmente sustituido con halo o alcoxi, dicho alcoxi opcionalmente sustituido con uno o más halo; y

- R54 se selecciona del grupo que consiste en halo y alquilo C1-C5, dicho alquilo C1-C5 opcionalmente sustituido con halo o alcoxi, dicho alcoxi opcionalmente sustituido con uno o más halo;

35

un compuesto de Fórmula X



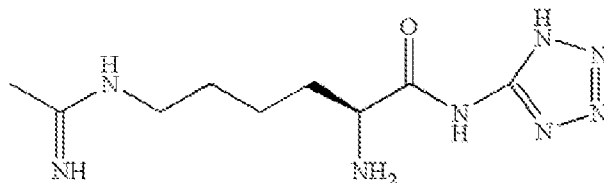
40

en donde:

- R55 es alquilo C1-C5, dicho alquilo C1-C5 opcionalmente sustituido con halo o alcoxi, dicho alcoxi opcionalmente sustituido con uno o más halo.

un compuesto que tiene la Fórmula XI

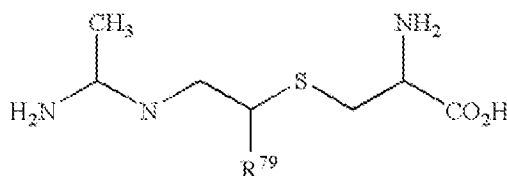
5



- 2S-amino-6-[(1-iminoetil)amino]-N-(1H-tetrazol-5-il)hexanamidas, hidratos, dihidrocloruro XI

10 Un compuesto de Fórmula XII:

XII

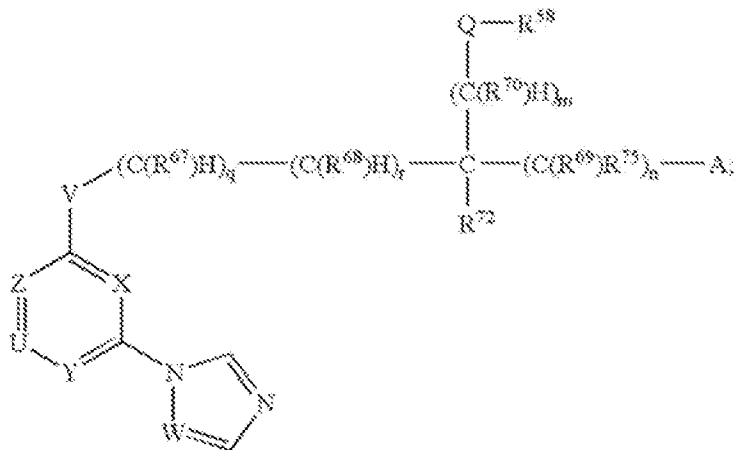


- en donde R79 se selecciona entre alquilo C1-4, cicloalquilo C3-4, hidroxialquilo C1-4 y haloalquilo C1-4;

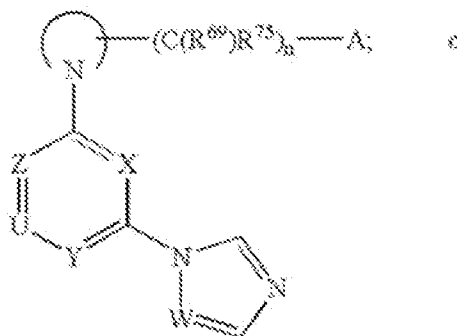
15

un compuesto de Fórmula XIII, Fórmula XIV o Fórmula XV:

Fórmula XIII

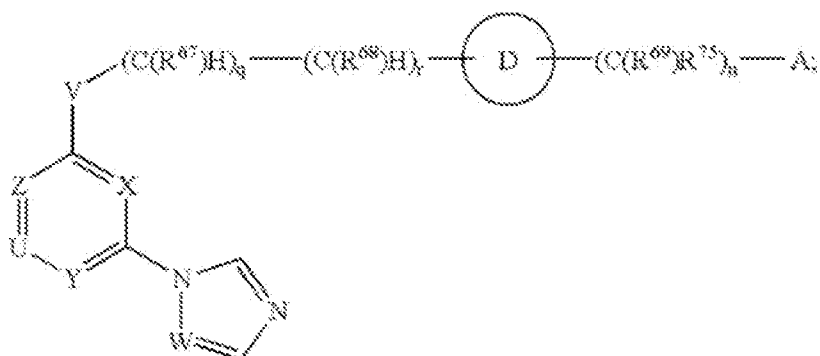


Fórmula XIV



20

Formula XV



en donde:

5

- A es -R56, -OR56, C(O)N(R56)R57, P(O)[N(R56)R57]2, -N(R56)C(O)R57, -N(R76)C(O)OR56, -N(R56)R76, -N(R71)C(O)N(R56)R71, -S(O)tR56, -SO2NHC(O)R56, -NHSO2R77, -SO2NH(R56)H, -C(O)NHSO2R77 y -CH=NOR56;

10

- cada X, Y y Z es independientemente N o C(R19);

- cada U es N o C(R60), siempre que U sea N sólo cuando X es N y Z e Y son CR74;

- V es N(R59), S, O o C(R59)H;

15

- cada W es N o CH;

- Q se elige del grupo que consiste en un enlace directo, -C(O)-, -O-, -C(=N-R56)-, S(O)t y -N(R61)-;

20

- m es cero o un número entero de 1 a 4;

- n es cero o un número entero de 1 a 3;

- q es cero o uno;

25

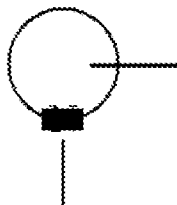
- r es cero o uno, siempre que cuando Q y V sean heteroátomos, m, q y r no puedan ser todos cero;

cuando A es -OR56, N(R56)C(O)R57, -N(R71)C(O)OR57, -N(R56)R76, -N(R71)C(O)N(R56)R71, -S(O)tR56 (donde t es cero) o -NHSO2R77, n, q y r no pueden ser todos cero; y cuando Q es un heteroátomo y A es -OR56, N(R56)C(O)R57, -N(R71)C(O)OR57, -N(R56)R76, N(R71)C(O)N(R56)R71, -S(O)tR56 (cuando t es

30

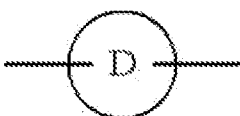
cero), o -NHSO2R77, m y n no puede ser ambos cero;

t es cero, uno o dos;



35

es un N-heterociclilo opcionalmente sustituido;



es un carbociclilo opcionalmente sustituido o N-heterociclilo opcionalmente sustituido;

5 cada R56 y R57 se elige independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C1-C20 opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido,

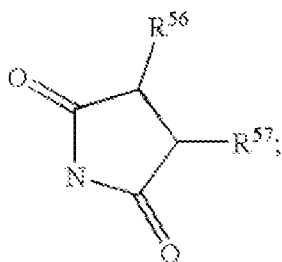
-[alquil C0-C8]-R64, -[alquenil C2-C8]-R64, -[alquinil C2-C8]-R64, -[alquil C2-C8]-R65 (opcionalmente sustituido con hidroxilo), -[C1-C8]-R66 (opcionalmente sustituido con hidroxilo), heterociclilo opcionalmente sustituido;

10 o R56 y R57 junto con el átomo de nitrógeno al que están anclados son un N-heterociclilo opcionalmente sustituido;

15 R58 se elige del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo opcionalmente sustituido, haloalquilo, -[alquil C1-C8]-C(O)N(R56)R57, -[alquil C1-C8]-N(R56) R57, -[alquil C1-C8]-R63, -[alquil C2-C8]-R65, -[alquil C1-C8]-R66 y heterociclilo (opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, alquilo, alcoxi e imidazolilo);

20 o cuando Q es -N(R58)- o un enlace directo a R58, R58 también puede ser aminocarbonilo, alcoxicarbonilo, alquilsulfonilo, monoalquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo y -C(=NR73)-NH2;

o -Q-R58 tomados juntos representan -C(O)OH, -C(O)N(R56)R57 o



25 R59 se elige del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, arilo, aralquilo y cicloalquilo;

Siempre que cuando A sea -R56 o -OR56, R59 no puede ser hidrógeno, y cuando V sea CH, R59 también puede ser hidroxilo;

30 R60 se elige del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, arilo, aralquilo, haloalquilo, aralquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, -OR71, -S(O)t-R71, N(R71)R76, N(R71)C(O)N(R56)R71, N(R71)C(O)OR71, N(R71)C(O)R71, -[alquil C0-C8]-C(H)[C(O)R71]2 y -[alquil C0-C8]-C(O)N(R56)R71;

35 R61 se elige del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, -[alquil C1-C8]-R63, -[alquil C2-C8]-R65, -[alquil C1-C8]-R66, acilo, -C(O)R63,

40 -C(O)- [alquil C1-C8]-R63, alcoxicarbonilo, ariloxycarbonilo opcionalmente sustituido, aralcoxicarbonilo opcionalmente sustituido, alquilsulfonilo, arilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilalquilo, carboxialquilo, arilsulfonilo opcionalmente sustituido, aminocarbonilo, monoalquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo opcionalmente sustituido, aminosulfonilo, monoalquilaminosulfonilo, dialquilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, arilsulfonilaminocarbonilo, N-heterociclilo opcionalmente sustituido, -C(=NH)-N(CN)R56, -C(O)R78-N(R56)R57, -C(O)-N(R56)R78-C(O)OR56;

45 cada R63 y R64 se elige independientemente del grupo que consiste en haloalquilo, cicloalquilo (opcionalmente sustituido con halo, ciano, alquilo o alcoxi), carbociclilo (opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, alquilo y alcoxi) y heterociclilo (opcionalmente sustituido con alquilo, aralquilo o alcoxi);

50 cada R65 se elige independientemente del grupo que consiste en halo, alcoxi, ariloxi opcionalmente sustituido, aralcoxi opcionalmente sustituido, -S(O)t-R77 opcionalmente sustituido, acilamino, amino, monoalquilamino, dialquilamino, (trifenilmetil)amino, hidroxilo, mercapto, alquilsulfonamido;

55 cada R66 se elige independientemente del grupo que consiste en ciano, di(alcoxi)alquilo, carboxi, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, monoalquilaminocarbonilo y dialquilaminocarbonilo;

cada uno de R67, R68, R69, R70, R72 y R75 son independientemente hidrógeno o alquilo;

5 cada R71 es independientemente hidrógeno, alquilo, arilo opcionalmente sustituido, aralquilo opcionalmente sustituido o cicloalquilo;

R73 es hidrógeno, NO₂ o toluenosulfonilo;

10 cada R74 es independientemente hidrógeno, alquilo (opcionalmente sustituido con hidroxilo), ciclopropilo, halo o haloalquilo;

cada R76 es independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo opcionalmente sustituido, aralquilo opcionalmente sustituido, -C(O)R77 o -SO₂R77;

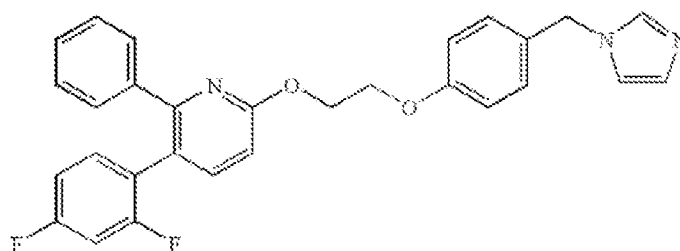
15 o R76 tomado junto con R56 y el nitrógeno al que están anclados es un N-heterociclilo opcionalmente sustituido;

20 o R76 tomado junto con R71 y el nitrógeno al que están anclados es un N-heterociclilo opcionalmente sustituido;

cada R77 es independientemente alquilo, cicloalquilo, arilo opcionalmente sustituido o aralquilo opcionalmente sustituido; y

25 R78 es un resto de aminoácido; y

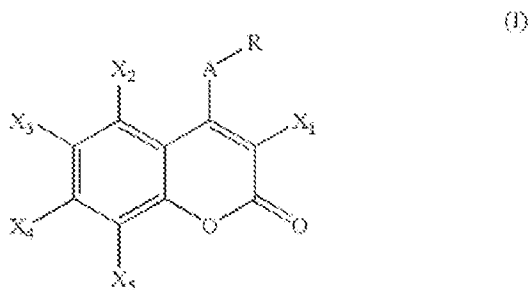
PPA250



PPA250

30 o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable de cualquiera de dichos inhibidores inducibles de la óxido nítrico sintasa.

Otro inhibidor más de iNOS divulgado en el presente documento es una cumarina y se selecciona del grupo que consiste en un compuesto de fórmula (XVI):



35 en donde:

-A es O,

40 - R se selecciona del grupo que consiste en (CH₂)_nNR₁R₂, en donde R₁ y R₂ son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, C(=NH)NH₂ y alquilo C₁-C₆,

- n es un número entero de 2 a 5;

- X₁ es hidrógeno

5 -X₂ es hidrógeno;

-X₃ es halógeno,

-X₄ es hidrógeno; y

10

-X₅ es hidrógeno

con la condición de que cuando n es 2, R₁ y R₂ no son ambos hidrógeno o ambos etilo y X₃ cloro, y sus sales e isómeros ópticos farmacéuticamente aceptables.

15

Una divulgación adicional de la memoria descriptiva se refiere al compuesto de fórmula XVI en donde:

-A es O;

20

-R es (CH₂)_nNR₁R₂, y

-X₃ es halógeno.

Preferiblemente, R₁R₂ se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₆ y C(=NH)NH₂.

25

Más preferiblemente, X₃ se selecciona del grupo que consiste en bromo y cloro.

Más preferentemente, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

30

- 6-Cloro-4-(3-aminopropoxi)-1-benzopiran-2-ona,

- 6-Cloro-4-(3-metilamino-propoxi)-1-benzopiran-2-ona,

35

- 4-(2-Amino-etoxi)-6-cloro-1-benzopiran-2-ona,

- 4-(3-Amino-propoxi)-6-bromo-1-benzopiran-2-ona,

- 4-(3-Amino-propoxi)-6-fluoro-1-benzopiran-2-ona,

40

- 6-Cloro-4-(3-dimetilamino-propoxi)-1-benzopiran-2-ona,

- N-[3-(6-Cloro-2-oxo-2H-1-benzopiran-4-iloxi)-propil]-guanidina,

45

- N-[3-(6-Cloro-2-oxo-2H-1-benzopiran-4-iloxi)-propil]-acetamida,

- 4-(5-Amino-pentiloxi)-6-cloro-1-benzopiran-2-ona,

o una de sus sales, solvatos o derivados fisiológicamente funcionales farmacéuticamente aceptables.

50

El método según el primer aspecto de la invención o cualquiera de sus realizaciones preferidas, en donde el sujeto tiene o padece válvula aórtica bicúspide; un aneurisma de aorta torácica (TAA) sintromico tal como síndrome de Marfan, Ehlers Danlos vascular, síndrome de Loeys Dietz (tipos 1 y 2) y aneurisma y disección de aorta torácica familiar (TAAD familiar); y TAA no sintromico.

55

El método según el primer aspecto de la invención o cualquiera de sus realizaciones preferidas, en donde la administración de un inhibidor selectivo de iNOS o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo comprende administrar al sujeto por vía oral, por inhalación, por vía enteral o parenteral al menos una dosis por día.

60

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición para su uso en el tratamiento, prevención o inhibición de TAA, o una válvula aórtica bicúspide; o un aneurisma de la aorta torácica (TAA) sintromico tal como Síndrome de Marfan, Ehlers Danlos vascular, Síndrome de Loeys Dietz (Tipos 1 y 2) y aneurisma y disección de la aorta torácica familiar (TAAD familiar); o TAA no sintromico, en un sujeto que necesita tal tratamiento, prevención o inhibición que comprende una cantidad de un inhibidor selectivo de iNOS o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el inhibidor de iNOS se selecciona del grupo que consiste en 1400W (N'-[[3-(aminometil)fenil]metil]etanimidamida), GW274150 (ácido (2S)-2-amino-4-[2-(1-

65

aminoetilidenamino)etilsulfanil]-butanoico), GW273629 (ácido (2R)-2-amino-3-[2-(1-aminoetilidenamino)etilsulfonil]propanoico), Aminoguanidina (AG) (2-aminoguanidina), L-NIL (ácido (2S)-2-amino-6-(1-aminoetilidenamino)hexanoico), clotrimazol y L-NAME ((2S)-2-amino-5-[[amino(nitramido)metiliden]amino]pentanoato de metilo), o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, tal inhibidor selectivo de iNOS se define como en el primer aspecto de la invención o como se define como en cualquiera de sus realizaciones preferidas. En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, dicha composición se administra al sujeto por vía oral, por inhalación, por vía enteral o parenteral en al menos una dosis por día.

10 En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención, el sujeto tiene o sufre síndrome de Marfan.

Por otro lado, y además del método de tratamiento mencionado anteriormente, los autores de la presente invención también han encontrado que la deficiencia de Adamts1 en ratones o seres humanos tiene una clara correlación con el fenotipo de la aorta torácica, particularmente el aneurisma de la aorta torácica (TAA) 15 síndrómico, más particularmente el aneurisma de la aorta torácica (TAA) síndrómico de sujetos o pacientes que tienen o padecen SMF (véanse los ejemplos).

Así, un tercer aspecto no cubierto por la invención reivindicada se refiere a un método *in vitro* para escrutar sujetos en riesgo de desarrollar TAA que comprende: (a) medir el patrón o el nivel de expresión de al menos A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 1" - Una Desintegrina y Metaloproteínasa con 20 Motivos de Tromboespondina 1) (ADAMTS1) que se obtiene de una muestra biológica aislada de los sujetos a que se van a escrutar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos ADAMTS1 de los sujetos que se van a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecidos, en donde la expresión reducida de al menos ADAMTS1 es indicativa de aneurisma de aorta torácica (TAA).

25 Cabe señalar que los sustratos de ADAMTS1 también se pueden utilizar para el propósito del tercer aspecto. En este sentido, como alternativa o además del método descrito en el tercer aspecto, un cuarto aspecto no cubierto por la invención reivindicada se refiere así a un método *in vitro* para escrutar sujetos con riesgo de desarrollar TAA que comprende:

30 (a) medir el patrón o nivel de expresión en una muestra biológica aislada de los sujetos que se van a escrutar de al menos ADAMTS 1 y/o al menos la forma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS) y/o al menos el patrón de expresión de cualquiera de los siguientes sustratos de ADAMTS1: Agrecano, versicano, inhibidor-2 de la vía del factor tisular (TFPI-2), semaforina 3C, nidógeno-1, nidógeno-2, desmocolina-3, distroglicano, mac-2, Colágeno tipo I, anfirregulina, TGF- α , EGF de unión a heparina, Sindecano 4, neoepítomos de versicano o 35 neoepítomos de agrecano; y

b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos ADAMTS1 y/o al menos la forma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS) y/o al menos el patrón de expresión de cualquiera de los siguientes sustratos de 40 ADAMTS1: Agrecano, versicano, inhibidor-2 de la vía del factor tisular (TFPI-2), semaforina 3C, nidógeno-1, nidógeno-2, desmocolina-3, distroglicano, mac-2, Colágeno tipo I, anfirregulina, TGF- α , EGF de unión a heparina, Sindecano 4, neoepítomos de versicano o neoepítomos de agrecano, de los sujetos que se van a escrutar con un patrón o nivel de expresión ya establecidos,

45 en donde la expresión reducida de al menos ADAMTS 1, Sindecano 4, *neoepítomos de versicano* y/o *neoepítomos de agrecano* y la expresión en exceso de al menos iNOS, Agrecano, versicano, inhibidor-2 de la vía del factor tisular (TFPI-2), semaforina 3C, nidógeno-1, nidógeno-2, desmocolina-3, distroglicano, mac-2, Colágeno tipo I, anfirregulina, TGF- α y/o EGF de unión a heparina, son indicativas de aneurisma de aorta torácica (TAA). Preferiblemente, el método del tercer o cuarto aspecto escruta sujetos en riesgo de desarrollar 50 enfermedades que causan TAA tales como válvula aórtica bicúspide; o un aneurisma de aorta torácica (TAA) síndrómico tal como Síndrome de Marfan, Ehlers Danlos vascular, Síndrome de Loeys Dietz (Tipos 1 y 2) y aneurisma y disección de la aorta torácica familiar (TAAD familiar); o TAA no síndrómico; o cualquier otra enfermedad asociada con la aortopatía provocada por la deficiencia de Adamts1 (después de TAA y cualquier otra enfermedad incluida en la lista de enfermedades mencionadas en este párrafo, se denominarán 55 "enfermedades relacionadas con TAA" o "enfermedad relacionada con TAA").

Un quinto aspecto no cubierto por la invención reivindicada se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de un sujeto sospechoso de padecer una enfermedad relacionada con TAA, que comprende las etapas a) y b) de cualquiera del tercer o cuarto aspectos, y opcionalmente (c) confirmar la presencia de la enfermedad 60 mediante un examen clínico.

Un sexto aspecto no cubierto por la invención reivindicada se refiere a un método para obtener datos útiles para el diagnóstico *in vitro* de una enfermedad relacionada con TAA, que comprende las etapas a) y b) de cualquiera del tercer o cuarto aspectos.

65 Un séptimo aspecto no cubierto por la invención reivindicada se refiere a un método *in vitro* para clasificar a

los sujetos como sujetos sanos o como sujetos que padecen una enfermedad relacionada con TAA, que comprende las etapas a) y b) de cualquiera del tercer o cuarto aspectos.

- 5 Un octavo aspecto no cubierto por la invención reivindicada se refiere a un método *in vitro* para controlar la respuesta a una terapia o para controlar la progresión de una enfermedad relacionada con TAA, en un sujeto que padece una enfermedad relacionada con TAA que comprende las etapas a) y b) de cualquiera del tercer o cuarto aspectos.

- 10 Un noveno aspecto no cubierto por la invención reivindicada se refiere a un método para tratar sujetos que padecen una enfermedad relacionada con TAA, que comprende las etapas a) y b) de cualquiera del tercer o cuarto aspectos, y (c) tratar al paciente diagnosticado de dicha enfermedad. Preferiblemente dicho tratamiento es con inhibidores de iNOS, más preferiblemente con un inhibidor de iNOS como se define en el primer aspecto de la invención o como se define en cualquiera de sus realizaciones preferidas. Alternativamente, otro aspecto no cubierto por la invención reivindicada se refiere a una composición que comprende un inhibidor de iNOS para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con TAA en un paciente diagnosticado de dicha enfermedad mediante un método que comprende las etapas a) y b) de cualquiera del tercer o cuarto aspectos. Preferiblemente dicho tratamiento es con inhibidores selectivos de iNOS, más preferiblemente con un inhibidor de iNOS como se define en el primer aspecto de la invención o como se define en cualquiera de sus realizaciones preferidas.

- 20 En una realización preferida, los métodos o composiciones de cualquiera de los aspectos tercero al noveno, la enfermedad relacionada con TAA se selecciona del grupo que consiste en Síndrome de Marfan, Ehlers Danlos vascular, Síndrome de Loeys Dietz (Tipos 1 y 2), aortopatía desencadenada por deficiencia de Adams1 y aneurisma y disección de la aorta torácica familiar (TAAD familiar); preferiblemente, síndrome de Marfan.

- 25 En otra realización preferida, de los métodos o composiciones de cualquiera de los aspectos precedentes, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una muestra de biopsia (tal como una biopsia aórtica) o de una muestra biológica mínimamente invasiva de los sujetos que se van a escrutar tal como una muestra de plasma, una muestra de sangre, una muestra de Líquido cefalorraquídeo (LCR) o una muestra de suero.

- 30 Un décimo aspecto no cubierto por la invención reivindicada se refiere al uso *in vitro* de un kit que comprende reactivos de detección de biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial (de proteínas, péptidos o nucleótidos) en una muestra biológica aislada de al menos ADAMTS1 y/o al menos la forma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS) y/o al menos el patrón de expresión de cualquiera de los siguientes sustratos de ADAMTS1: Agrecano, versicano, inhibidor-2 de la vía del factor tisular (TFPI-2), semaforina 3C, nidógeno-1, nidógeno-2, desmocolina-3, distroglicano, mac-2, Colágeno tipo I, anfirregulina, TGF- α , EGF de unión a heparina, Sindecano 4, *neoepítomos de versicano o neoepítomos de agrecano*, para el diagnóstico *in vitro* del riesgo de que un sujeto sufra o tenga una enfermedad relacionada con TAA. Más preferiblemente, dicho kit se utiliza para identificar un riesgo de padecer una enfermedad relacionada con TAA tal como aneurisma y disección de la aorta torácica familiar (TAAD familiar) o síndrome de Marfan (SMF).

- 45 Preferiblemente, el décimo aspecto no cubierto por la invención reivindicada se refiere al uso *in vitro* de un kit que comprende reactivos de detección de biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial en una muestra biológica aislada de al menos ADAMTS1, en donde una expresión reducida de al menos ADAMTS1 es indicativa de una enfermedad relacionada con TAA, para diagnosticar *in vitro* el riesgo de que un sujeto sufra o tenga una enfermedad relacionada con TAA.

- 50 En otra realización preferida del décimo aspecto, el kit comprende al menos los siguientes nucleótidos para la detección de al menos Adams1 y opcionalmente la óxido nítrico sintasa 2:

- Adams1 (ACACTGGCGGTTGGCATCGT, GCCAGCCCTGGTCACCTTGC),

- Nos2 (CAGCTGGGCTGTACAAACCTT, CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG).

- 55 Preferiblemente, el kit anterior es especialmente adecuado y comprende reactivos adicionales para realizar reacciones de qPCR. Preferiblemente, estas reacciones se realizan por triplicado con mezcla maestra SYBR (Applied Biosystems) de acuerdo con las pautas del fabricante.

- 60 En otra realización preferida más del décimo aspecto, el kit comprende los reactivos adecuados, tales como anticuerpos o fragmentos de los mismos, para detectar cualquiera de los péptidos o proteínas definidos en los kits del décimo aspecto.

- 65 En una realización preferida más del décimo aspecto, la muestra biológica aislada se selecciona del grupo que consiste en una muestra de biopsia (tal como una biopsia aórtica) o de una muestra biológica mínimamente invasiva de los sujetos que se van a escrutar tal como una muestra de plasma, muestra de sangre, muestra de

líquido cefalorraquídeo (LCR) o una muestra de suero.

Cabe señalar que la presente divulgación se refiere adicionalmente a procedimientos implementados por ordenador de cualquiera de los métodos descritos en cualquiera de los aspectos tercero a noveno así como a los dispositivos utilizados para la implementación de tales procedimientos.

Por último, en virtud del hecho de que la presente invención identifica la vía del NO, en particular iNOS, como mediador esencial de la enfermedad aórtica en modelos de ratón y sugiere tal vía como posible diana de intervención en aortopatías torácicas, los autores de la presente invención han configurado un nuevo método de escrutinio no cubierto por la invención reivindicada para identificar compuestos útiles para el tratamiento, prevención o inhibición de un aneurisma de aorta torácica (TAA). Dicho método de escrutinio para identificar compuestos útiles para el tratamiento, prevención o inhibición de un aneurisma de la aorta torácica (TAA), comprende las siguientes etapas:

1. Identificar un compuesto o un grupo de compuestos capaces de actuar como inhibidores de NOS, en particular inhibidores de iNOS. Para este fin, aunque sin limitar la invención, normalmente se necesita un método fiable para medir los metabolitos del óxido nítrico. El NO se puede determinar mediante el uso directo *in vivo* de sondas electroquímicas (aunque éstas están sujetas a muchas limitaciones), espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica y generación de imágenes de fluorescencia. El nitrito se puede determinar mediante el uso de la reacción de Griess y sus derivados, cromatografía y quimioluminiscencia. Los S-nitrosotiosoles también se pueden cuantificar mediante quimioluminiscencia; la determinación de su ubicación en las proteínas requiere etiquetar los sitios de S-nitrosación, por ejemplo, mediante la técnica de cambio de biotina o un derivado de la misma. Otras formas, que no limitan la presente invención, de identificar un compuesto o un grupo de compuestos capaces de actuar como inhibidores de la NOS consisten en determinar si el óxido nítrico estimula la guanilil ciclasa soluble para aumentar los niveles celulares de cGMP. En este sentido, la actividad quinasa puede analizarse con 35 ng de proteína PKG1 recombinante en reacciones que contienen 8 µg de kemptida. Las reacciones se realizan durante 5 min a 30°C en HEPES 40 mM (pH 7.0), 8 µg de kemptida (Sigma-Aldrich), MgCl₂ 10 mM, ATP 60 µM, 32P-g-ATP 0.6 µCi y cantidades variables de cGMP (0 - 3000 nM). Las reacciones se detienen mediante aplicación sobre papel de fosfocelulosa P81 y la actividad se mide mediante recuento de centelleo líquido. Por último, también forma parte de la presente invención el diseño computacional de inhibidores de iNOS;

2. Determinar la utilidad de los compuestos seleccionados identificados en el apartado 1) anterior para el tratamiento, prevención o inhibición de un aneurisma de aorta torácica (TAA), mediante los correspondientes métodos *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, determinando los niveles de RLC fosforilada (pRLC) mediante inmunotransferencia de extractos de proteínas derivados de fibroblastos normales expuestos a cantidades variables de los inhibidores seleccionados. Estos niveles están normalizados a los niveles totales de RLC. Aquellos compuestos que aumentan la razón pRLC/RLC son seleccionados para su validación en modelos de ratón, incluidos los ratones *Adams1^{+/-}* y el modelo de ratón *Fbn1^{C1039G/+}* del síndrome de Marfan. Aquellos compuestos que disminuyen el diámetro de la aorta torácica ascendente sin aumentar la presión arterial son candidatos a ensayos clínicos.

La invención ha sido descrita de forma amplia y genérica en el presente documento. Cada una de las especies y grupos subgenéricos más limitados que caen dentro de la divulgación genérica también forman parte de la invención. Esto incluye la descripción genérica de la invención con la condición o limitación negativa de la eliminación de cualquier materia del género, independientemente de si el material suprimido se menciona específicamente en el presente documento o no.

Otras realizaciones están dentro de las siguientes reivindicaciones y ejemplos no limitantes. Además, cuando las características o aspectos de la invención se describen en términos de grupos, los expertos en la técnica reconocerán que la invención también se describe en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo.

Ejemplos

Ejemplo 1. Procedimientos experimentales

- Procedimientos con animales

Los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité de Ética del CNIC y se ajustaron a las directrices de la Unión Europea para el cuidado y uso experimental de animales. Los ratones *Adams1^{+/-}* se obtuvieron del European Mouse Mutant Archive [(EM:02291) B6;129P2-*Adams1*<tm1Dgen>/H] y portaban un casete LacZ-Neo para reemplazar una secuencia genómica (c7784) entre el exon1 y 2 en los alelos diana de *Adams1*. Los ratones *Fbn1C1039G/+* (Judge et al., 2004), que albergan una mutación en el gen *Fbn1*, y los ratones *Nos2^{-/-}* (Laubach et al., 1995) se obtuvieron de Jackson Laboratories (provisión de ratones JAX Núm. 012885 y 007072, respectivamente). Estas 3 cepas habían sido retrocruzadas previamente con C57BL/6

durante más de nueve generaciones. Todos los ratones fueron genotipificados mediante PCR de muestras de la cola utilizando los siguientes cebadores: ratones Adamts1 (5'-GCCATCGGGGTCAGCTTTTCAAATG-3', 5'-GGGCCAGCTCATTCTCCCACTCAT/GGTTGT AGTTTCGCGCTGAGTTTG-3'); Ratones Nos2-/- (5'-ACATGCAGAATGAGTACCGG 3'; 5' TCAACATCTCCTGGTGGAAC 3', 5' AATATGCGAAGTGGACCTCG 3'); Ratones Fbn1C1039G/+ (5'CTC ATC ATT TTT GGC CAG TTG 3', 5'GCA CTT GAT GCA CAT TCA CA 3'). Se utilizaron compañeros de camada de tipo salvaje como controles a menos que se especifique lo contrario. Los ratones fueron tratados con Ang-II (Sigma-Aldrich) a 1 µg/kg/min o losartán (Sigma Aldrich) a 10 mg/kg/día utilizando minibombas osmóticas subcutáneas (Alzet Corp). El pananticuerpo monoclonal contra TGFβ1, 2, 3 clon 1D11 (BioXcell) se inyectó por vía intraperitoneal 3 veces por semana a 10 mg/kg. Se administró hidrocóloro de éster metílico de N^ω-nitro-L-arginina (L-NAME, Sigma-Aldrich) a ratones durante 21 días (y 3 días adicionales antes de la inoculación LVi en ratones infectados) a 0.5 mg/ml en agua potable.

- Mediciones de presión arterial y generación de imágenes *in vivo*

La presión arterial (PA) se midió en colas de ratones utilizando el Sistema Automatizado de Análisis de Presión Arterial BP-2000 (Visitech Systems, Apex, NC, EE. UU.). En resumen, se entrenó a ratones para mediciones de PA todos los días durante una semana. Después del entrenamiento, se midió la PA un día antes del tratamiento o antes de la infección lentiviral para determinar los valores iniciales de PA en cada cohorte de ratones. Las mediciones se repitieron varias veces durante los experimentos. Las mediciones de PA se registraron en ratones ubicados en un dispositivo de sujeción con manguito en la cola, sobre una superficie calentada (37°C). Se realizaron quince mediciones consecutivas de la PA sistólica y diastólica, y las últimas diez lecturas por ratón fueron registradas y promediadas.

Para las imágenes de ultrasonido *in vivo*, el diámetro aórtico se controló en ratones anestesiados con isoflurano (2% de isoflurano) mediante ultrasonido de alta frecuencia con un dispositivo de ecografía VEVO 2100 (VisualSonics, Toronto, Canadá). Se midieron los diámetros internos máximos de las imágenes aórticas utilizando el soporte lógico VEVO 2100, versión 1.5.0. Todos los registros fueron realizados por un cardiólogo y un técnico que estaban cegados al genotipo animal y al tratamiento. Se tomaron mediciones antes de la administración de lentivirus o de los tratamientos correspondientes para determinar los diámetros iniciales, y las mediciones se repitieron varias veces durante el experimento.

Se tomaron imágenes del esqueleto de todo el cuerpo en ratones anestesiados (1.5-2% de isoflurano) utilizando un sistema CT de rayos X integrado en un escáner nano PET-CT (Mediso Medical Imaging Systems, Budapest). Las imágenes se adquirieron a 55 Kv, 500 mA/s, 360 fotogramas por rotación de Rx y paso = 1. La reconstrucción esquelética 3D se realizó con el soporte lógico Medis (Medis, Países Bajos).

- Procedimientos celulares

Se aislaron y cultivaron células de músculo liso vascular (VSMC) de ratón como se describe (Esteban et al., 2011). Todos los experimentos se realizaron durante los pases 3-7. Las VSMC se infectaron a una multiplicidad de infección (MOI) = 3 a lo largo de 5 h. A continuación, el medio se reemplazó por DMEM de nueva aportación complementado con FBS al 10% y las células se cultivaron durante 3 días más, se privaron de suero durante 48 h y después se estimularon con Ang-II durante 6 h para ensayos de proteínas o 4 h para análisis de expresión de ARNm.

- Producción e infección de lentivirus que codifican ARNip.

Los lentivirus que expresan GFP y ARNip dirigidos al ARNm de Adamts1 de ratón se adquirieron de ABM-GOOD. Las secuencias de ARNip fueron las siguientes: #ARNip27 (GGAAAGAATCCGCGAGCTTTAGTCCACTCA); #ARNip57 (ACGCCAGTGTGAGTTTACATTCCGAGAG); #ARNip69 (CTTCCGAATGTGCAAAGGAAGTGAAGCCA). Como control se utilizó siCtl (GGGTGAACTCACGTCAGAA). La producción lentiviral pseudotipificada se obtuvo mediante transfección transitoria con fosfato cálcico de células HEK-293T. El sobrenadante que contenía las partículas lentivirales se recogió 48 h después de la eliminación del precipitado de fosfato cálcico y se ultracentrifugó durante 2 h a 26.000 rpm (Ultraclear Tubes, rotor SW28 y Ultracentrífuga Optima L-100 XP; Beckman). Los virus se suspendieron en solución fría de PBS estéril y se titularon mediante transducción de células Jurkat durante 48 h. La eficiencia de transducción (células que expresan GFP) y la muerte celular (tinción con yoduro de propidio) se cuantificaron mediante citometría de flujo.

Para los experimentos de transducción *in vivo*, los animales fueron anestesiados (ketamina/xilacina) y se realizó una pequeña incisión para exponer la vena yugular derecha (Esteban et al., 2011). Se inoculó solución de virus (100 µl, 10⁹ partículas/ml en PBS) directamente en la vena yugular derecha 3 semanas antes de la implantación de la minibomba de Ang-II o un día antes del control de la dilatación aórtica. La eficiencia de la transducción se analizó en muestras aórticas mediante inmunohistoquímica para GFP y Adamts1.

- Histología aórtica

Después de la eutanasia inducida por CO₂, se perfundieron aortas de ratón con solución salina, se aislaron y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante la noche a 4°C. Se tiñeron secciones transversales de parafina de 5 µm de aortas fijadas con tinción tricrómica de Masson (Masson), azul alcian o Verhoeff-van Gieson para fibras elásticas (EVG) o se utilizaron para inmunohistoquímica o inmunofluorescencia. Las secciones desparafinadas se rehidrataron, se hirvieron para recuperar antígenos (tampón citrato 10 mM, pH 6) y se bloquearon durante 45 minutos con suero de cabra al 10% más BSA al 2% en PBS. Las muestras se incubaron con los siguientes anticuerpos para inmunohistoquímica o inmunofluorescencia: anti-Adamts1 (1/100; Santa Cruz), anti-GFP (1/100; Invitrogen), anti-pSMAD2 (1/50 Cell Signaling) anti-pSMAD2,3 (1/100 Santa Cruz), anti-TGFβ1 (1/100; Abcam ab92486), NOS2 (1/100 Santa Cruz para ratones y Millipore para seres humanos). La especificidad se determinó mediante la sustitución del anticuerpo primario por IgG no relacionada (Santa Cruz). Para la inmunohistoquímica, el color se desarrolló con DAB (Vector Laboratories) y las secciones se contratiñeron con hematoxilina y se montaron en DPX (Fluka). Las imágenes se adquirieron con un microscopio Leica DM2500 con lentes de objetivo Fluotar 20x, 40x o 63xHCX PL, y soporte lógico de adquisición Leica Application Suite V3.5.0. Para la inmunofluorescencia, los anticuerpos secundarios fueron anti-conejo de cabra conjugado con AlexaFluor546 y anti-conejo de cabra conjugado con AlexaFluor647 (BD Pharmingen). Las secciones se montaron en medio de montaje Citifluor AF4 (Aname) con DAPI. Las imágenes se adquirieron a 1024x1024 píxeles, 8 bits, utilizando un microscopio confocal Leica SP5 con objetivos de inmersión en aceite de 20x o 40x.

Se analizaron imágenes de tinción con tricrómica de Masson y EVG para determinar el contenido de colágeno con ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) y con MetaMorph (Molecular Devices; Sunnyvale, California) para cuantificar las roturas de elastina. Para cada animal, se contaron las roturas de elastina en 3 secciones y se calculó el número medio de roturas. Las imágenes fueron procesadas para presentaciones con Photoshop e Illustrator (Adobe).

- Análisis de inmunotransferencia

Se aislaron muestras de aorta de ratón, se congelaron en nitrógeno líquido y después se homogeneizaron (MagNA lyzer, Roche). Los extractos de proteínas se obtuvieron mediante lisis en tampón RIPA enfriado con hielo (NaCl 50 mM, Tris HCl 50 mM, pH 8, NP40 al 1%, SDS al 0.1%, desoxicolato de sodio al 0.5%) completado con inhibidores de proteasa, fosfatasa y quinasa. Para las VSMC, las células se infectaron y después se estimularon con AngII, se lavaron con PBS enfriado con hielo y se lisaron en tampón RIPA.

Las proteínas se separaron en condiciones reductoras en geles de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La detección de proteínas se realizó con los siguientes anticuerpos primarios: anti-Adamts1 (1/1000; Santa Cruz), anti-GFP (1/1000; Invitrogen), anti-pSMAD2 (1/500; Cell Signaling), Anti-alfa Tubulina (1/40.000; Sigma-Aldrich), anti-GAPDH (1/10.000; Abcam). Los anticuerpos unidos se detectaron con reactivo de detección de quimioluminiscencia mejorada (ECL) (Millipore).

- RT y PCR Cuantitativa

Las aortas se extrajeron después de la perfusión con 5 ml de solución salina y se descartó la capa adventicia. El tejido congelado se homogeneizó utilizando un mortero y un homogeneizador de cuentas automático (MagNA Lyzer, Roche). El ARN total se aisló con TRIZOL (Life Technologies). El ARN total (2 µg) se transcribió de forma inversa a 37°C durante 50 minutos en una mezcla de reacción de 20 µl que contenía 200 U de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV) (Life Technologies), 100 ng de cebadores aleatorios y 40 U de inhibidor de ARNasa (Life Technologies). Se realizó RT-PCR cuantitativa en tiempo real con los siguientes cebadores de PCR: Adamts1 (ACACTGGCGGTTGGCATCGT, GCCAGCCCTGGTCACCTTGC), Tgfβ1 (CGCCATCTATGAGAAAACC, GTAACGCCAGGAATTGT), Ctgf (GTGCCAGAACGCACACTG, CCCCGTTACTACTCCAAA), Col1a1 (GCTCCTCTTAGGGGCCACT, CCACGTCTCACCATTGGGG), Pai-1 (GCCAGATTTATCATCAATGACTGGG, GGAGAGGTGCACATCTTTCTC AAAG), Nos3 (GTTTGTCTGCGGCGATGTC, CATGCCGCCCTCTGTTG), Nos2 (CAGCTGGGCTGTACAAACCTT, CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG). Las reacciones de qPCR fueron realizadas por triplicado con mezcla maestra SYBR-master (Applied Biosystems) de acuerdo con las pautas del fabricante. Para examinar la especificidad de la sonda, los autores de la presente invención realizaron un análisis de curva de fusión posterior a la amplificación. Para cada reacción, sólo se produjo un pico de Tm. La cantidad de ARNm diana en las muestras se estimó mediante el método de cuantificación relativa 2-ΔCT, utilizando GAPDH para la normalización. Las razones de multiplicidad se calcularon con respecto a los animales de control.

- Tinción con óxido nítrico

La tinción con NO se realizó en secciones aórticas frescas no fijadas de ratones con reactivo diacetato DAF-FM (Molecular Probes) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron incubadas con 10 µmol/L de reactivo diacetato DAF-FM durante 1 hora a RT y se montaron en glicerol/PBS a 10%. Las imágenes

fueron adquiridas en un microscopio Leica SP5.

- Ensayos de zimografía

- 5 Se prepararon extractos aórticos a partir de aortas completas como se describe para los ensayos de inmunotransferencia, pero en ausencia de DTT. Los extractos (15 µg) se fraccionaron en condiciones no reductoras en geles de SDS-poliacrilamida que contenían 1% de gelatina. Los geles se lavaron tres veces en Triton x-100 al 2.5% durante 30 minutos a RT, se incubaron en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, CaCl₂ 10 mM y NaCl 200 mM durante la noche a 37°C y se tiñeron con Azul de Coomassie. Las zonas de actividad gelatinolítica o
10 MMP se visualizaron como bandas transparentes. Las imágenes se analizaron con el soporte lógico Quantity One (Bio-Rad).

- ELISA para Adamts1

- 15 Se midió Adamts1 sérico en 50 µl de suero de ratón con un kit ELISA (BioNova).

- Muestras humanas

- 20 El estudio fue aprobado por el Comité Ético y de Investigación Clínica de Cantabria. La aorta ascendente se obtuvo de forma anónima de donantes de trasplantes de órganos múltiples después del consentimiento informado por escrito de sus familias. Durante la preparación del corazón para el trasplante, se recogió el exceso de tejido aórtico ascendente para el estudio. Los datos clínicos de los pacientes se recuperaron mientras se mantenía el anonimato. El tejido se fijó inmediatamente, se mantuvo a temperatura ambiente durante 48 horas y se incluyó en parafina.

25

- Análisis estadístico

- 30 Para el análisis se utilizó el soporte lógico Graphpad Prism 6.01. Los datos del diámetro aórtico fueron presentados como diagramas de caja y bigotes, con percentiles 75 y 25; las barras representan datos máximos y mínimos. Las diferencias se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) unidireccional o bidireccional y la prueba post-hoc de Bonferroni o la prueba post-hoc de Newman (experimentos con ≥ 3 grupos). Para las curvas de supervivencia, las diferencias se analizaron con la prueba de rangos logarítmicos (Mantel-Cox). Se asignó significación estadística a * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

35 Ejemplo 2. La deficiencia constitutiva de Adamts1 induce una forma sindrómica de TAA.

- Para investigar la contribución de Adamts1 a la dilatación y al aneurisma aórticos provocados por Ang-II, los autores de la presente invención utilizaron ratones con deficiencia de Adamts1 del European Mouse Mutant Archive (EM: 02291). Los ratones Adamts1^{+/-} expresaron niveles más bajos de Adamts1 aórtico que los compañeros de camada de tipo salvaje (wt) (Figuras 1A y 7A). No se utilizaron ratones Adamts1^{-/-} debido a su muy baja supervivencia al destete (Figura 7B). Por el contrario, la supervivencia de Adamts1^{+/-} fue similar a la de los compañeros de camada wt, y estos ratones parecían sanos en esta fase. El tratamiento de ratones wt de 8 semanas de edad con Ang-II durante 28 días promovió una dilatación aórtica generalizada, confirmada por ecografía del anillo aórtico (AR), aorta ascendente (AsAo) y aorta abdominal (AbAo) (Figuras 1B-1C). Inesperadamente, la inactivación del alelo 1 de Adamts1 indujo dilatación aórtica en ratones no tratados, y este efecto fue exacerbado por Ang-II (Figuras 1B-1C). Además, mientras que Ang-II apenas indujo AA o disecciones aórticas letales en ratones wt, desencadenó fácilmente su formación en ratones Adamts1^{+/-} (Figuras 1D-1E). No se detectaron aneurismas ni disecciones letales en ratones Adamts1^{+/-} en ausencia de Ang-II a esta edad. Dado que Ang-II induce hipertensión, los autores de la presente invención investigaron si la inactivación de Adamts1 tenía un efecto similar. Estos descubrieron que, a diferencia de Ang-II, la reducción de la dosis del gen Adamts1 disminuyó la presión arterial (PA) sistólica y diastólica (Figura 1F), lo que sugiere que la haploinsuficiencia de Ang-II y Adamts1 podría inducir dilatación aórtica a través de mecanismos separados.

- De acuerdo con las anomalías del desarrollo renal en otros ratones elegidos como diana de Adamts1, los riñones de diez de los ratones Adamts1^{+/-} de los autores de la presente invención tenían un espacio caliceal agrandado, lo que indica hidronefrosis (Figura 7C). Sin embargo, la urea y la creatinina plasmáticas fueron similares en ratones wt y heterocigotos (Figuras 7D-7E), lo que sugiere que la función renal no estaba comprometida.

- La presencia de anomalías renales sugirió que la patología aórtica inducida por deficiencia de Adamts1 podría ser sindrómica. Las afecciones aórticas sindrómicas en seres humanos y ratones, incluido SMF, implican alteraciones en los pulmones y el esqueleto. El examen de ratones Adamts1^{+/-} de 3 meses de edad reveló un marcado aumento en el calibre del espacio aéreo distal, característico del enfisema (Figura 1G). Se detectó cifosis significativa en 44,4% de los ratones Adamts1^{+/-} de 3-4 meses de edad (Figura 1H). Esto se asoció con un aumento de los diámetros anteroposterior y transversal del tórax debido a un crecimiento excesivo de las costillas (Figura 1I). Otros huesos largos (húmero, tibia y fémur) también eran más largos en ratones

Adamts1 +/- del mismo sexo, mientras que el tamaño y la morfología del cráneo no mostraron diferencias entre genotipos (Figuras 1J-1K).

Ejemplo 3. La disminución de la expresión génica de Adamts1 aórtico promueve TAA.

Para investigar los efectos directos del agotamiento de Adamts1 en la dilatación aórtica, los autores de la presente invención indujeron la disminución de la expresión aórtica en ratones adultos transduciendo la pared aórtica con lentivirus que codifican ARNip específico de Adamts1. Un escrutinio de los ARNip de Adamts1 en VSMC cultivadas identificó la alta capacidad de silenciamiento del ARNip-27 (Figuras 8A-8B). La expresión conjunta de la proteína verde fluorescente (GFP) impulsada por lentivirus facilitó la evaluación de la eficiencia de la transducción. La inoculación intrayugular de lentivirus en ratones C57BL/6 produjo una transducción eficiente y estable de todas las capas de la pared aórtica, determinada mediante inmunotinción con GFP de la aorta AsAo y AbAo 7 semanas después (Figuras 2A-2B). La expresión de Adamts1 fue casi indetectable en muestras aórticas de ratones a los que se había inoculado lentivirus que codificaba ARNip-27 (siAdamts1) (Figuras 2B-2C), incluso en ratones tratados con Ang-II durante las últimas 4 semanas (Figuras 2C y 8C). De hecho, los niveles de ARNm de Adamts1 en muestras de aorta de ratones transducidos estaban por debajo de las de aorta de Adamts1 +/- (Figura 8D). El silenciamiento de Adamts1 se confirmó en todas las capas de AsAo y AbAo (Figura 2B). De acuerdo con los datos de ratones Adamts1 +/-, el silenciamiento aórtico de Adamts1 en la aorta adulta disminuyó la PA sistólica y diastólica (Figura 2D) e indujo una fuerte dilatación de AR, AsAo y AbAo que aumentó aún más con el tratamiento con Ang-II (Figura 2E).

Ejemplo 4. Degeneración medial y activación de la vía del TGFβ en la pared aórtica de ratones con deficiencia de Adamts1.

El análisis histológico de AsAo y AbAo reveló que la reducción de los niveles de Adamts1, por transducción lentiviral o inactivación genética, causó los rasgos característicos de la degeneración medial: engrosamiento de la pared aórtica, fragmentación y desorden de las fibras elásticas, depósito excesivo de colágeno y acumulación de proteoglicanos (Figuras 2F-2H y 9A-9E). Estas características fueron exacerbadas por Ang-II (Figuras 2F-2H y 9A-9E).

La degeneración medial aórtica en los síndromes de Marfan y Loeys-Dietz está relacionada con la activación de la vía TGFβ. La inmunohistoquímica de secciones aórticas de ratones Adamts1 +/- reveló un aumento de la expresión de TGFβ1 y Smad2/3 (Figura 2I) y aumentó la activación de Smad2, determinada por una elevada fosforilación y localización nuclear (Figura 2I). Se encontraron resultados similares en ratones con disminución de la expresión de Adamts1 (Figura 10A). Consecuentemente, las aortas de ratones a los que se había inoculado Adamts1 +/- y siAdamts1 tenían niveles elevados de ARNm de los dianas transcripcionales de TGFβ Ctgf, Col1a1 y Pai-1 (Figura 10B y Figura 10C).

Ejemplo 5. La dilatación aórtica inducida por la deficiencia de Adamts1 es rápida e independiente de TGFβ

Para evaluar la patogénesis de la aortopatía dependiente de la deficiencia de Adamts1, los autores de la presente invención controlaron el diámetro de AsAo y AbAo y la PA después de la inoculación intrayugular de lentivirus con siCtl o siAdamts1 (Figura 3A). Se detectaron niveles reducidos de ARNm y proteína de Adamts1 desde 1-2 días después de la inoculación (Figuras 3B-3C), coincidiendo con la primera caída de la PA sistólica y diastólica y la inducción de la elastólisis (Figuras 3D-3E y 11A-11B). Sin embargo, el diámetro de AsAo y AbAo no aumentó significativamente hasta 2-3 días después de la inoculación (Figuras 3F-3G). Estos eventos precedieron al depósito de colágeno en la pared aórtica (Figura 3H) y a la activación transcripcional de la vía TGFβ, que comenzó 1 a 2 semanas después de la inoculación (Figura 11C). La inducción temprana de elastólisis impulsó a los autores de la presente invención a evaluar la actividad de Mmp2 y Mmp9, las principales proteínas elastolíticas de la pared aórtica. La actividad de Mmp9, pero no de Mmp2, se indujo rápida y marcadamente después del silenciamiento de Adamts1 (Figura 3I).

Las vías canónicas y no canónicas de activación de TGFβ desempeñan funciones críticas en un modelo de ratón de SMF, y un anticuerpo neutralizante de TGFβ y el antagonista de AT1R losartán pueden prevenir la formación de aneurisma en este modelo. Aunque el momento de la activación de TGFβ después del silenciamiento de Adamts1 sugirió un papel secundario en la aparición de la aortopatía, los autores de la presente invención utilizaron losartán y un anticuerpo neutralizante de TGFβ para evaluar la contribución de la vía TGFβ (Figura 3J). Sorprendentemente, ninguno de los tratamientos inhibió la dilatación aórtica inducida por siAdamts1 (Figuras 3K y 11D). Por otra parte, estos tratamientos no previnieron la hipotensión (Figura 11E) y no redujeron la fragmentación de las fibras elásticas ni la fibrosis (Figuras 3L-3M). La detección de niveles de ARNm de dianas transcripcionales de TGFβ, como lecturas moleculares sustitutas de la eficacia del tratamiento, mostró que el anticuerpo contra TGFβ inhibió eficientemente la inducción de Tgfb1, Pai-I, Ctgf y Col1a1 (Figura 11F). Estos resultados indican que el anticuerpo neutralizante funcionó eficientemente y que la fibrosis es independiente de la activación de TGFβ durante el inicio de la enfermedad. Losartán, como se esperaba, redujo la PA en ratones de control (Figura 11E). Estos resultados respaldan la conclusión de que la activación de la vía TGFβ es secundaria a la dilatación y elastólisis aórtica en la aortopatía relacionada con

Adamts1.

Ejemplo 6. El óxido nítrico derivado de Nos2 media la aortopatía inducida por la deficiencia de Adamts1

5 Para investigar más a fondo el mecanismo de la aortopatía relacionada con Adamts1, los autores de la presente invención se centraron en los mediadores potenciales de la hipotensión, el efecto más temprano detectado tras el silenciamiento de Adamts1. Un factor candidato es el óxido nítrico (NO), un vasorelajante endógeno que relaja el músculo liso y reduce la PA. El NO puede ser producido por la NO sintasa (NOS) expresada constitutivamente del endotelio (eNOS, NOS3) o de origen neuronal (nNOS, NOS1) o por NOS inducible (iNOS, NOS2). Para probar la contribución de NO a la inducción de la dilatación aórtica, los autores de la presente invención trataron ratones C57BL/6 con N^ω-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME), un inhibidor de todas las enzimas NOS (Figura 4A). A pesar del efecto hipertensivo de L-NAME (Figura 12A), evitó la dilatación inducida por siAdamts1 de AsAo y AbAo (Figura 4B), bloqueó la elastólisis (Figuras 4C y 12B), disminuyó la fibrosis (Figura 4D) e impidió la activación de Mmp9 (Figura 4E).

15 Para determinar el potencial terapéutico de la inhibición de la actividad NOS, los autores de la presente invención utilizaron L-NAME para tratar ratones Adamts1+/- . L-NAME disminuyó rápidamente el diámetro de AsAo y AbAo a niveles normales (Figura 4F), revirtió la hipotensión sistólica y diastólica (Figuras 4G y 12C), disminuyó la fragmentación de fibras elásticas (Figura 4H), y disminuyó la fibrosis (Figura 4I).

20 En condiciones fisiológicas, NOS3 vascular produce niveles bajos de NO para mantener la homeostasis vascular, mientras que en condiciones patológicas NOS2 puede activarse transcripcionalmente y producir 1000 veces más NO que sus contrapartes constitutivas. Por lo tanto, los autores de la presente invención plantearon la hipótesis de que los niveles de Nos2 podrían aumentar en ratones con deficiencia de Adamts1 y mediar la dilatación aórtica y la degeneración medial. La expresión de Nos2 se indujo significativamente ya 2 días después de la inoculación de siAdamts1 (Figura 5A), mientras que Nos3 no se vio afectada (Figura 13A). La endotelina-1, otro regulador de la PA, no se vio afectada por el silenciamiento de Adamts1 (Figura 13B). La inmunotinción de secciones transversales aórticas de ratones siAdamts1 y Adamts1+/- confirmó un aumento de los niveles de Nos2 (Figura 5B).

30 Para investigar si el NO derivado de Nos2 media la aortopatía inducida por la deficiencia de Adamts1, los autores de la presente invención inocularon lentivirus con siAdamts1 a ratones Nos2-/- y wt (Figura 5C). La deficiencia de Nos2 bloqueó la dilatación de AsAo y AbAo inducida por siAdamts1 (Figuras 5D), la fragmentación de las fibras elásticas (Figura 5E) y la fibrosis (Figura 5F). Los ratones Nos2-/- eran normotensos y el silenciamiento de Adamts1 no logró disminuir su PA sistólica y diastólica (Figuras 5G y 13D). De acuerdo con el papel crítico del NO derivado de Nos2 en la aortopatía inducida por deficiencia de Adamts1, las secciones no fijadas de aorta transducida con siAdamts1 contenían niveles de NO más altos que las secciones de ratones de control (Figura 5H). De manera similar, los niveles de NO fueron mayores en las secciones no fijadas de aorta Adamts1+/- que en las de ratones wt (Figura 5H). No se acumuló NO en las secciones aórticas de ratones Nos2-/- a los que se había inoculado siAdamts1 (Figura 5H).

Ejemplo 7. El óxido nítrico y Adamts1 desempeñan un papel fundamental en el síndrome de Marfan.

45 Los autores de la presente invención plantearon la hipótesis de que el NO podría mediar la degeneración medial en otras formas sindrómicas de TAA. Para determinar el papel del NO en SMF, los autores de la presente invención administraron L-NAME a ratones heterocigotos para un alelo de Fbn1 incluida una sustitución de cisteína (C1039G), equivalente a una mutación frecuente en pacientes con SMF (Figura 6A). El fenotipo Fbn1C1039G/+ se parece al SMF humano, incluida la dilatación, el aneurisma y la disección de la aorta torácica, y las características histológicas de la degeneración aórtica medial. Al igual que los ratones con deficiencia de Adamts1, los ratones Fbn1C1039G/+ de 12 semanas de edad mostraron dilatación de AsAo y AbAo (Figuras 6B y 14A). L-NAME disminuyó rápidamente los diámetros de AsAo y AbAo a niveles normales (Figuras 6B y 14A), aumentaron la PA sistólica y diastólica (Figuras 6C y 14b) y disminuyeron la fragmentación de las fibras elásticas (Figuras 6C y 14C). Los ratones Fbn1C1039G/+ no mostraron una acumulación significativa de colágeno y el contenido de colágeno no se vio afectado por L-NAME (Figura 14D). Los ratones Fbn1C1039G/+ también exhibieron niveles notablemente elevados de producción de Nos2 y NO con respecto a los compañeros de camada de control, mientras que Nos3 no se vio afectada (Figura 6E).

60 Estas similitudes sugirieron un vínculo entre Adamts1 y la patología aórtica de los ratones Fbn1C1039G/+. La inmunotinción de secciones aórticas Fbn1C1039G/+ reveló niveles reducidos de Adamts1, confirmado mediante análisis de inmunotransferencia de extractos de proteínas aórticas (Figura 6G). Sin embargo, los niveles de ARNm de Adamts1 fueron similares en ratones Fbn1C1039G/+ y compañeros de camada de control (Figura 14E), lo que sugiere una regulación por disminución postranscripcional de la expresión de Adamts1 en el síndrome de Marfan.

65 La evaluación de la contribución de ADAMTS1 y NOS2 al SMF humano reveló un debilitamiento de la expresión de ADAMTS1 en la capa medial de secciones aórticas de pacientes con SMF en comparación con aortas de

donantes de trasplantes de órganos, independientemente del sexo y la edad (Figuras 6H y 14F). La cuantificación del área positiva para ADAMTS1 en secciones teñidas con inmunohistoquímica confirmó una fuerte disminución de la expresión en muestras de SMF (Figura 6I). La autofluorescencia de elastina apenas se detectó en secciones aórticas de SMF y mostró un patrón desorganizado. La inmunofluorescencia de NOS2

5 reveló una mayor expresión en la capa medial de 6 de 8 secciones aórticas de SMF (Figuras 6J y 14G) y la cuantificación del área positiva para NOS2 en estas secciones mostró un marcado aumento en las muestras de SMF (Figura 6K). En conjunto, estos datos respaldan la idea de que ADAMTS1 y NOS2 podrían ser mediadores importantes de la patología aórtica en el SMF humano (Figura 6L).

10 Ejemplo 8. Acoplamiento de NOS2 humana e interacción con inhibidores

Las secuencias Fasta del dominio oxigenasa de la proteína NOS2 humana (Uniprot Id: P35228, restos 511-1153) y el dominio reductasa (Uniprot Id: P35228, restos 1-535) se sometieron a una implementación local del paquete de soporte lógico I-Tasser v5.0 (1) para modelado con homología. Para cada una, se seleccionó como

15 molde final el mejor modelo con mínima energía y correcto plegamiento (mejor alineamiento estructural con el molde: PDB ID 4nos y 3hr4 respectivamente). La región solapante de ambos moldes (restos 511-535) se alineó estructuralmente utilizando el programa pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Versión 1.8, www.pymol.org) para producir un molde de monómero completo final para cerrar el bucle utilizando la herramienta de modelo de bucle de la versión del paquete Rosetta v3.6 (www.rosettacommons.org). El modelo

20 con menor puntuación, pero aún con mayor energía, se seleccionó como molde final para el refinamiento utilizando la herramienta relax del paquete Rosetta v3.6 (www.rosettacommons.org) para obtener el modelo monomérico final.

Se alinearon estructuralmente dos formas truncadas (restos 83-1153) del modelo anterior con la estructura PDB ID 4cx7 para crear un molde para acoplar el dímero de NOS2 utilizando la herramienta de acoplamiento del paquete Rosetta v3.6 (www.rosettacommons.org). Se seleccionó el mejor modelo (energía mínima con

25 alineamiento estructural correcto con 4cx7) como modelo homodimérico final con los ligandos hemo, H4B y Arg fijados desde la estructura 4cx7 (Fig. 18 a-b).

Para el acoplamiento in-silico del dímero de NOS2 con los inhibidores, la estructura 3D predeterminada para cada ligando L-NAME, 1400W, Aminoguanidina, GW273629, L-NIL y Clotrimazol se obtuvo de PubChem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) y produjeron 100 conformadores para cada uno utilizando la herramienta de la red Frog2. Las coordenadas centroides del conformador predeterminado para cada inhibidor fueron ubicadas en las coordenadas centroides del sitio de guanidina en ambas cadenas para preparar un molde inicial para

35 acoplar el modelo final de NOS2 con inhibidores utilizando la herramienta de acoplamiento de ligandos de la versión del paquete Rosetta v3.6 (www.rosettacommons.org). Como antes, el modelo con menor puntuación, pero aún con mayor energía, se seleccionó como molde final para el refinamiento utilizando la herramienta relax del paquete Rosetta v3.6 (www.rosettacommons.org) para obtener el modelo final.

$\Delta\Delta G$ de Interfase	Inhibidor
-8.431	L-NAME
-5.880	1400W
-8.238	Aminoguanidina
-7.296	GW273629
-7.833	L-NIL
-8.497	Clotrimazol

40 Tabla: Energía prevista de la interfase del ligando para el complejo de NOS2-inhibidor. Todos los modelos de inhibidores se unen en el sitio de guanidina de la región del ligando y tienen menor energía en la región de la interfase de ligando que el complejo canónico NOS2/L-Arginina, lo que sugiere un complejo inhibidor de NOS2 más estable que el complejo normal con ligando de L-Arginina. Esto sugiere que los inhibidores podrían desplazar y reemplazar el ligando normal de Arg. Valores mostrados como unidades internas del paquete Rosetta.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un inhibidor de iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de un aneurisma de la aorta torácica (TAA) en un paciente humano,
5 en donde el inhibidor de iNOS se selecciona del grupo que consiste en 1400W (N'-[[3-(aminometil)fenil]metil]etanimidamida), GW274150 (ácido (2S)-2-amino-4-[2-(1-aminoetilidenamino)etilsulfanil]-butanoico), GW273629 (ácido (2R)-2-amino-3-[2-(1-aminoetilidenamino)etilsulfonil]propanoico), Aminoguanidina (AG) (2-aminoguanidina), L-NIL (ácido (2S)-2-amino-6-(1-aminoetilidenamino)hexanoico), clotrimazol y L-NAME ((2S)-2-amino-5-
10 [[amino(nitramido)metiliden]amino]pentanoato de metilo), o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables.
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de iNOS se selecciona del grupo que consiste en GW274150 (ácido (2S)-2-amino-4-[2-(1-aminoetilidenamino)etilsulfanil]butanoico), GW273629 (ácido (2R)-2-amino-3-[2-(1-aminoetilidenamino)etilsulfonil]propanoico), Aminoguanidina (AG) (2-aminoguanidina) y clotrimazol, o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables.
15
3. La composición para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el inhibidor de iNOS es GW274150, o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables.
20
4. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el paciente padece una enfermedad seleccionada de la lista que consiste en: válvula aórtica bicúspide; un aneurisma de la aorta torácica (TAA) sintromico tal como el Síndrome de Marfan, Ehlers Danlos vascular, Síndrome de Loeys Dietz (Tipos 1 y 2) y aneurisma y disección de la aorta torácica familiar (TAAD familiar), un TAA no sintromico.
25
5. La composición para su uso según la reivindicación 4, en donde el paciente padece síndrome de Marfan (SMF).
6. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde tal uso es en una terapia médica dirigida a prevenir, limitar y revertir la expansión progresiva de TAA en presentaciones sintromicas y no sintromicas de la enfermedad.
30
7. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde tal uso es en una terapia médica dirigida a prevenir, limitar o revertir la progresión del aneurisma de la aorta torácica (TAA).
35
8. La composición para su uso según la reivindicación 7, en donde la progresión del aneurisma de la aorta torácica (TAA) está limitada o revertida.
9. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la presentación sintromica de la enfermedad es el síndrome de Marfan.
40

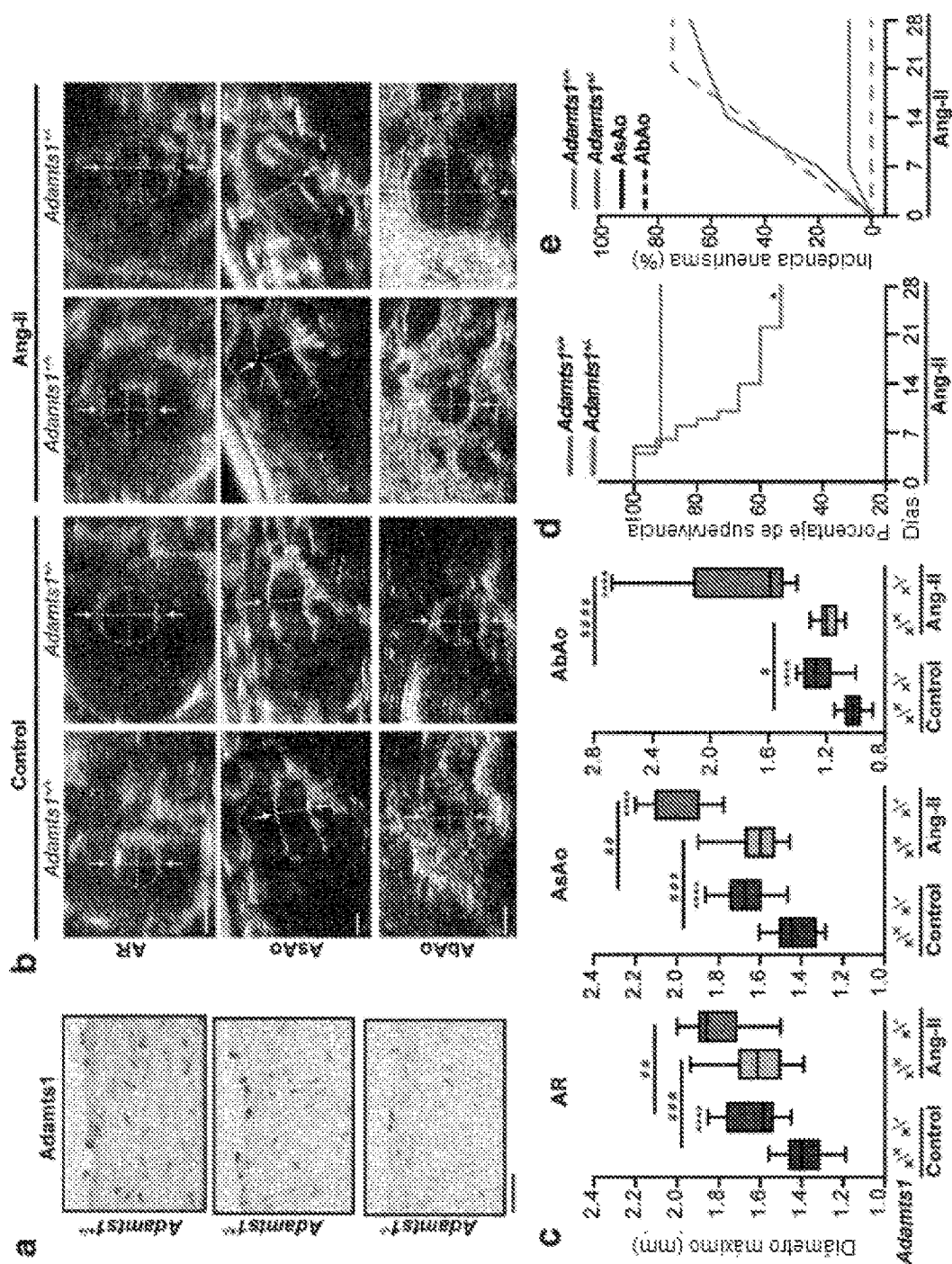


Fig. 1

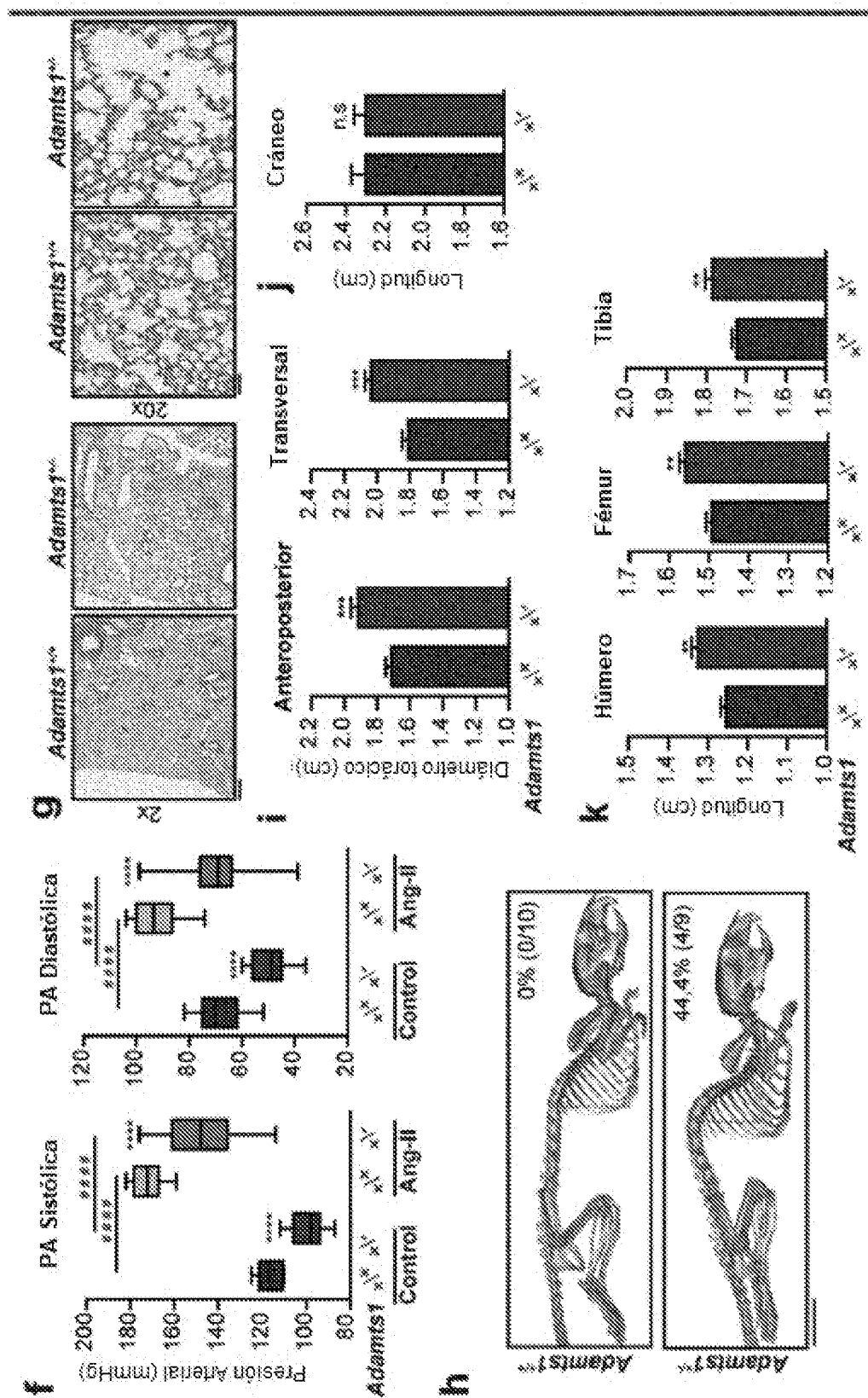


Fig. 1 (cont.)



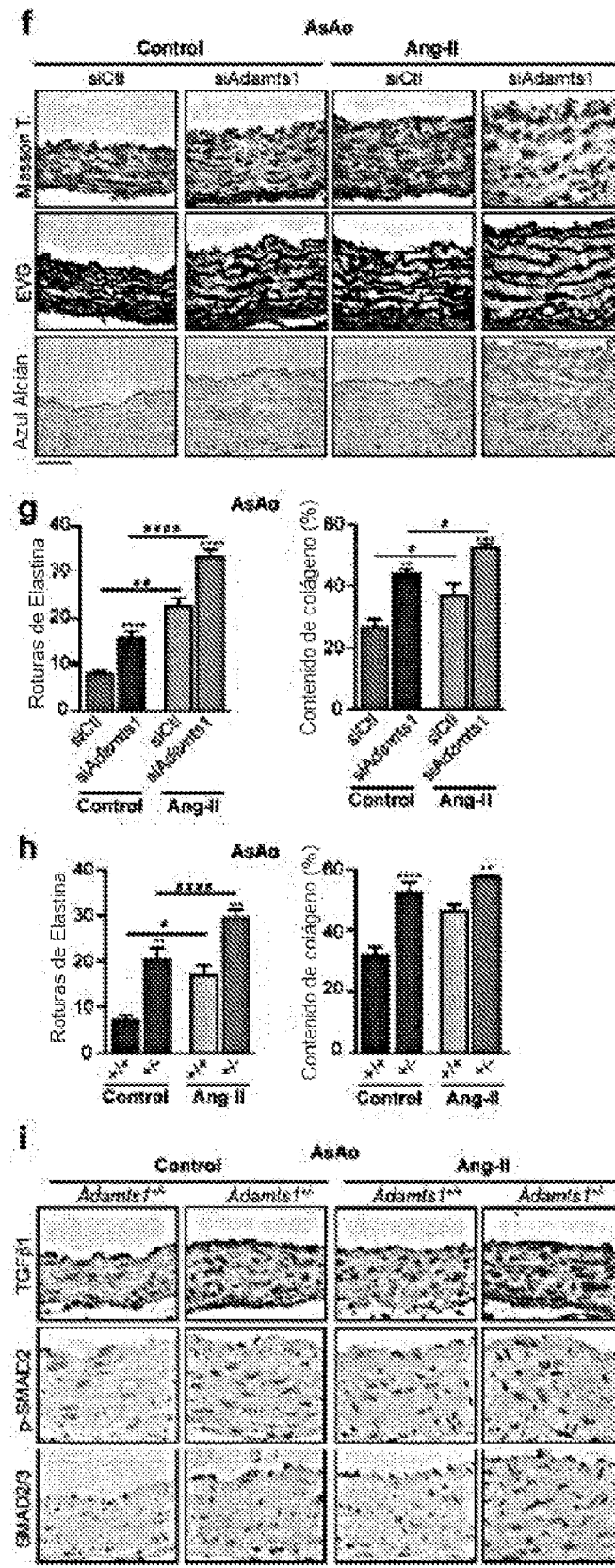


Fig. 2 (cont.)

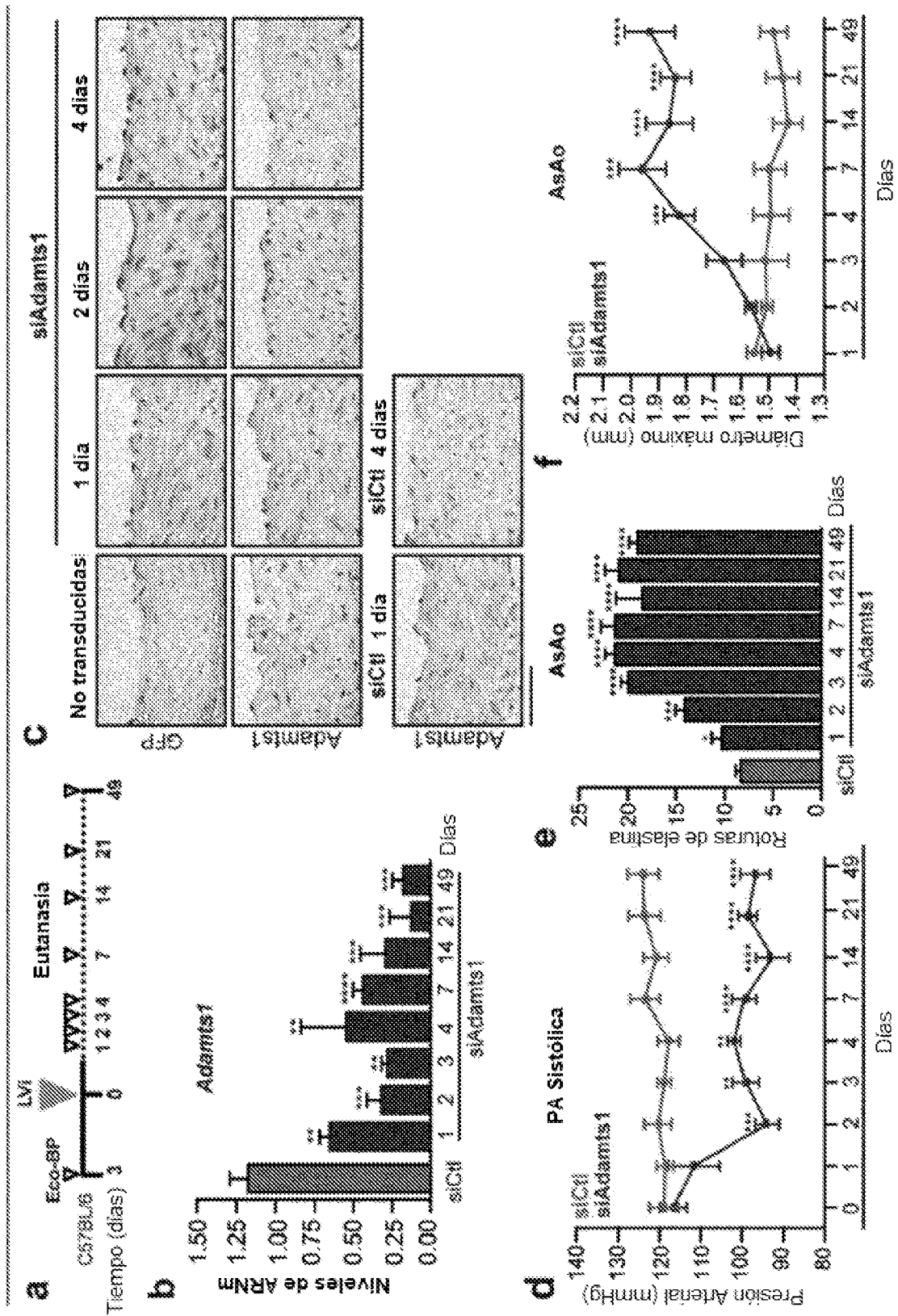


Fig. 3

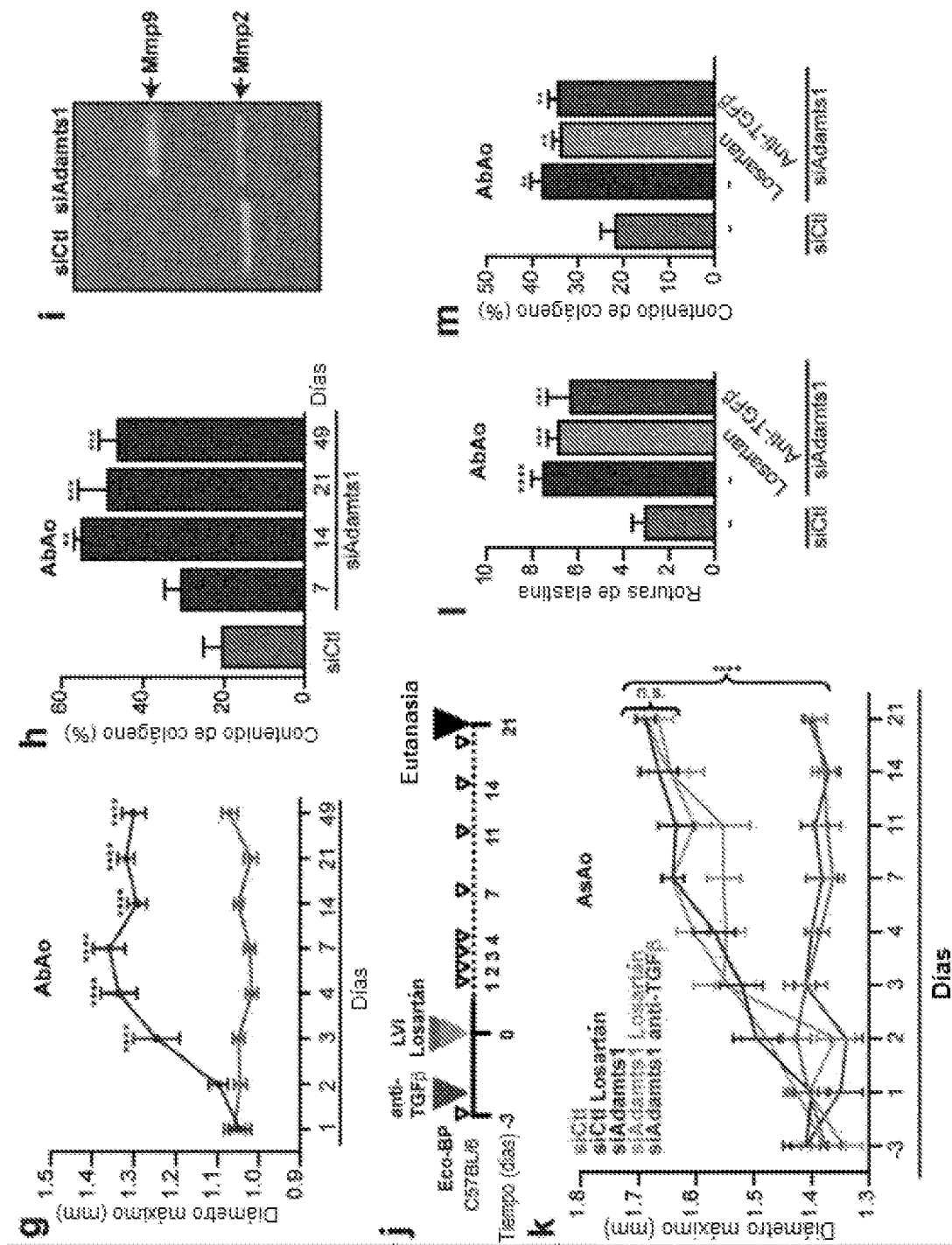


Fig. 3 (cont.)

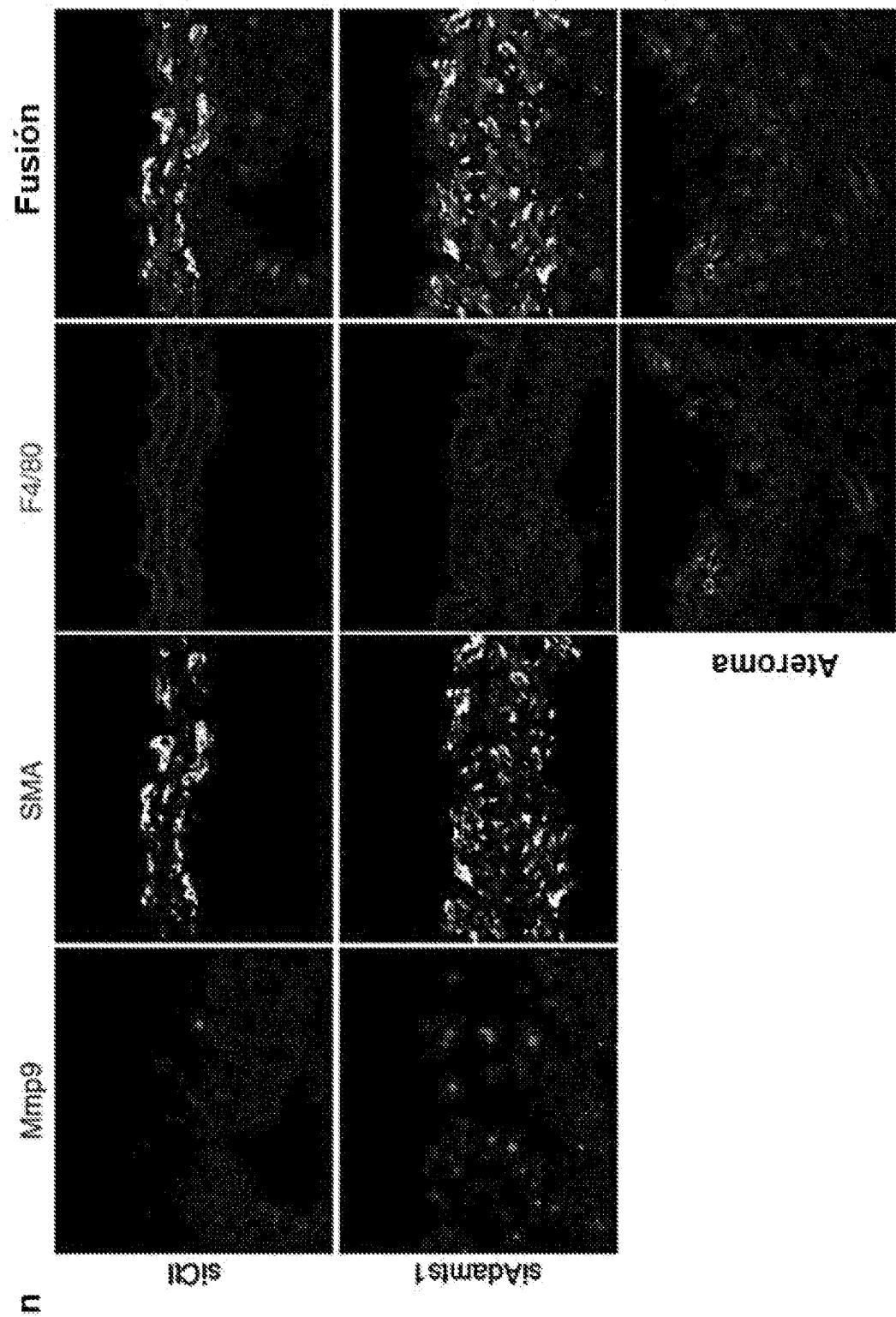


Fig. 3 (cont.)

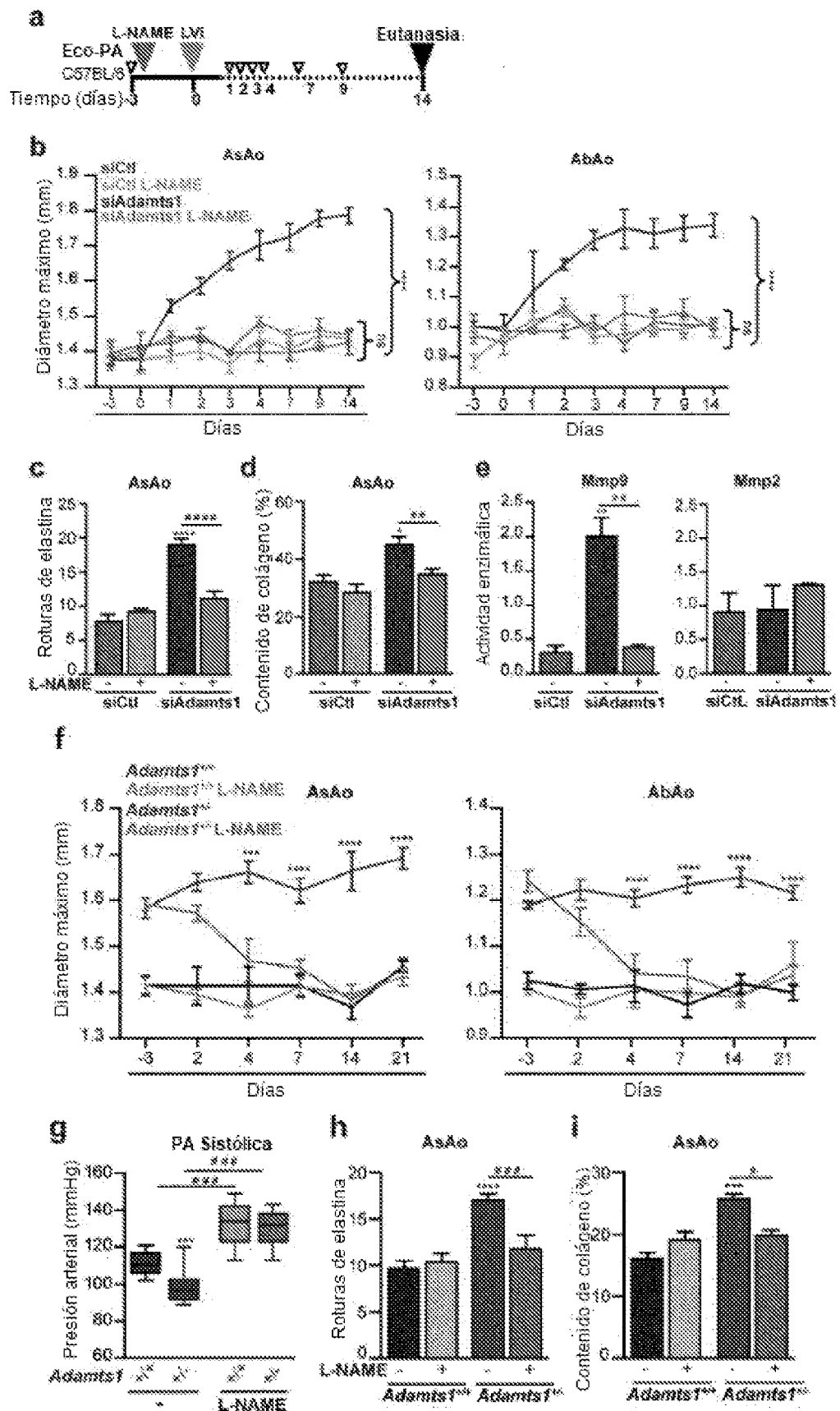


Fig. 4

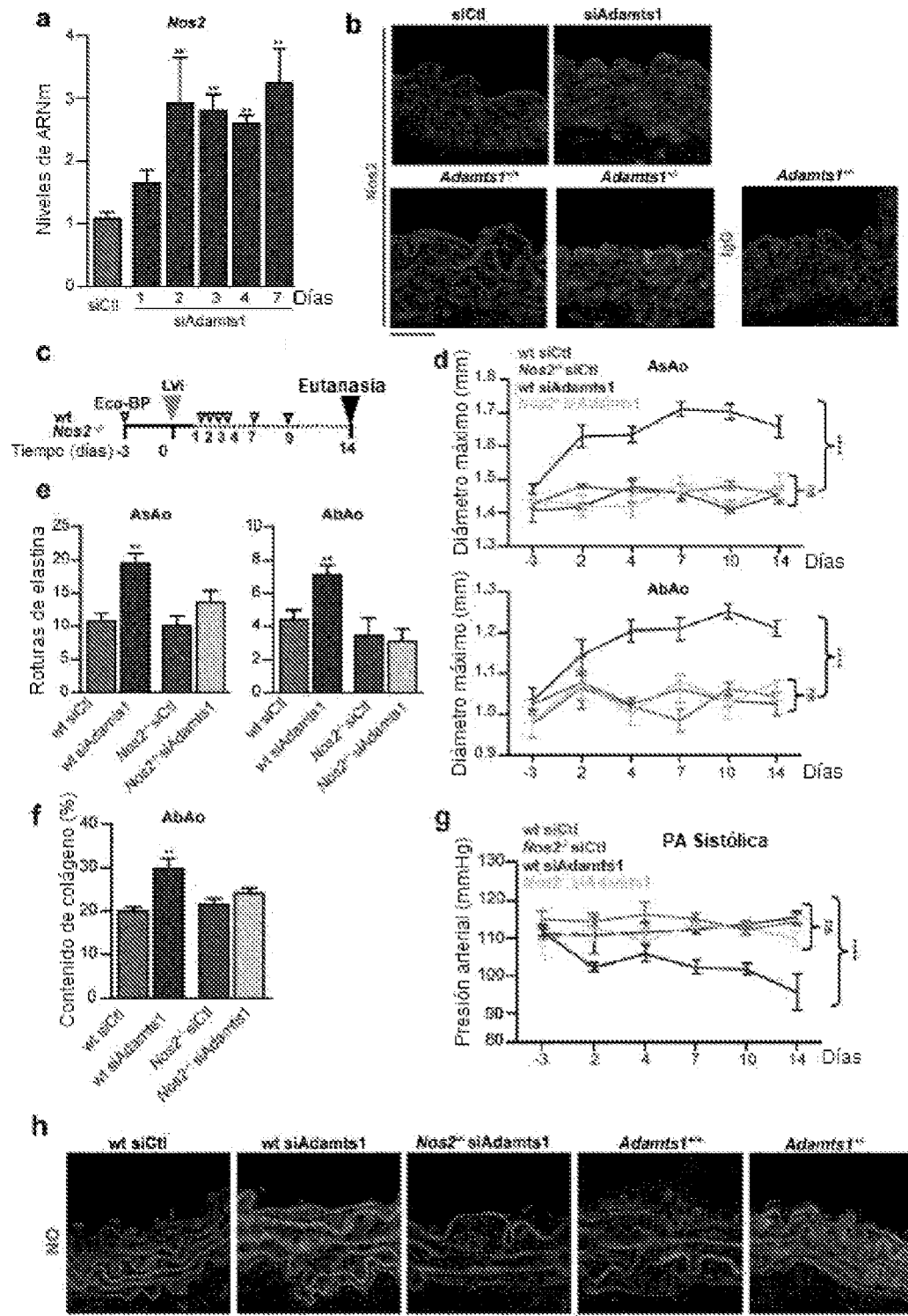


Fig. 5

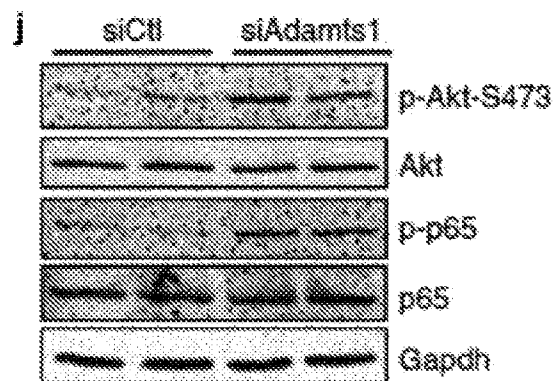
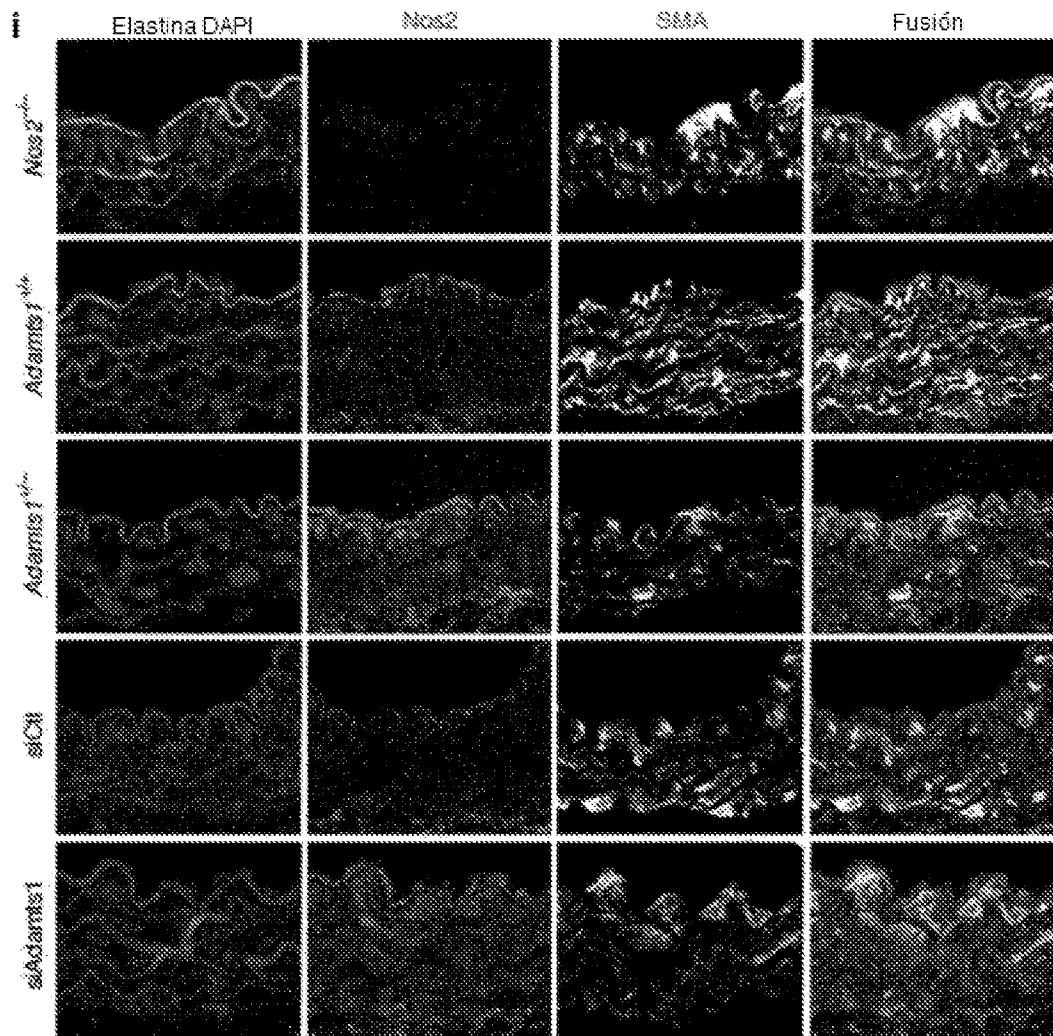


Fig. 5 (cont.)

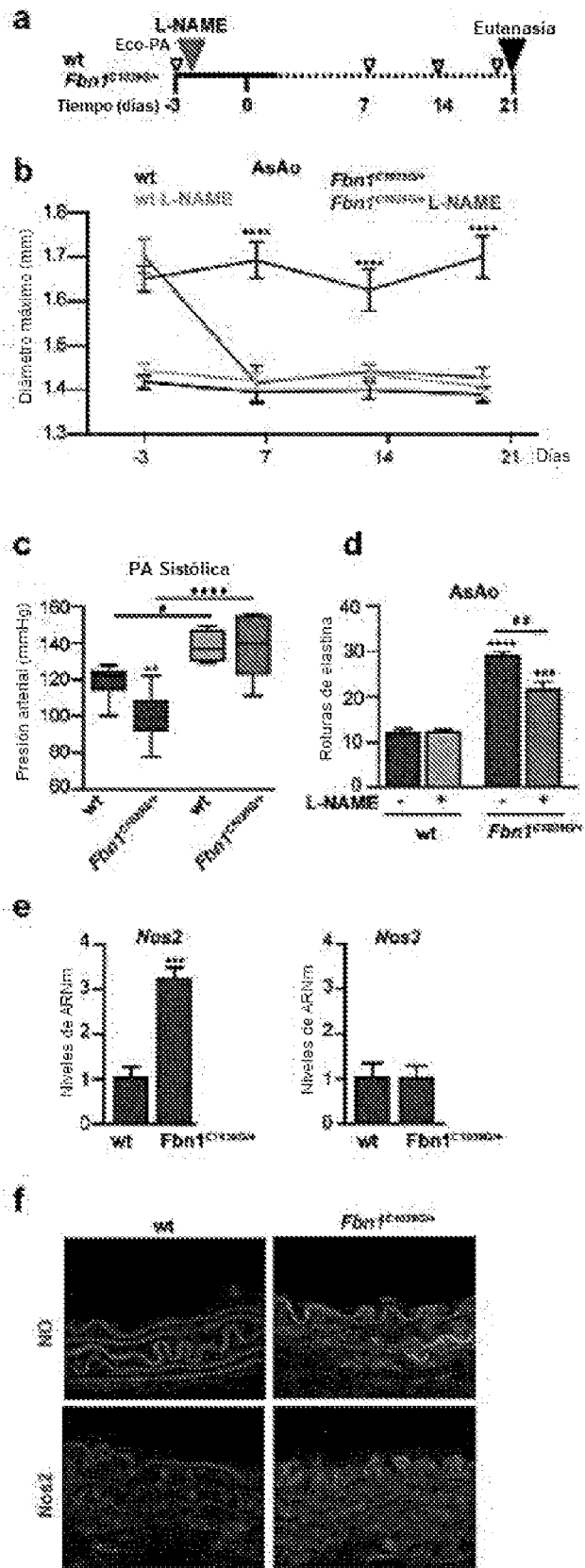


Fig. 6

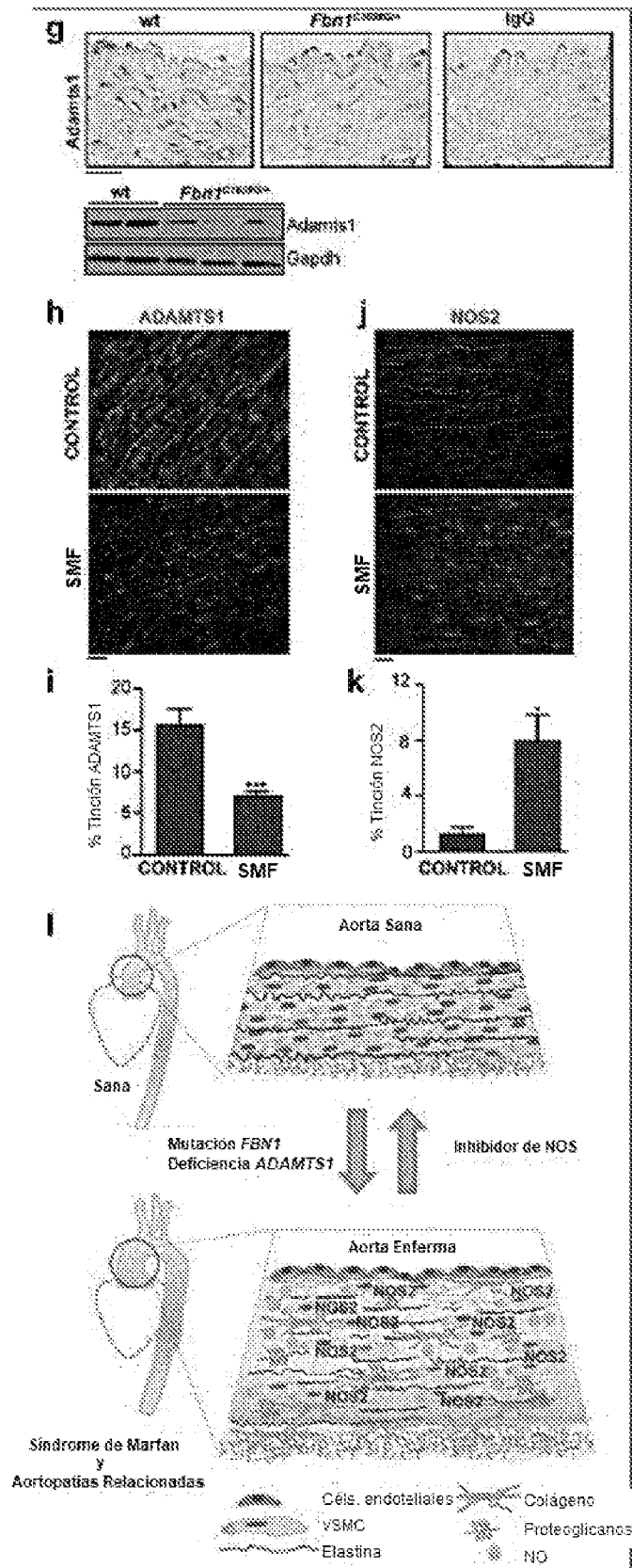


Fig. 6 (cont.)

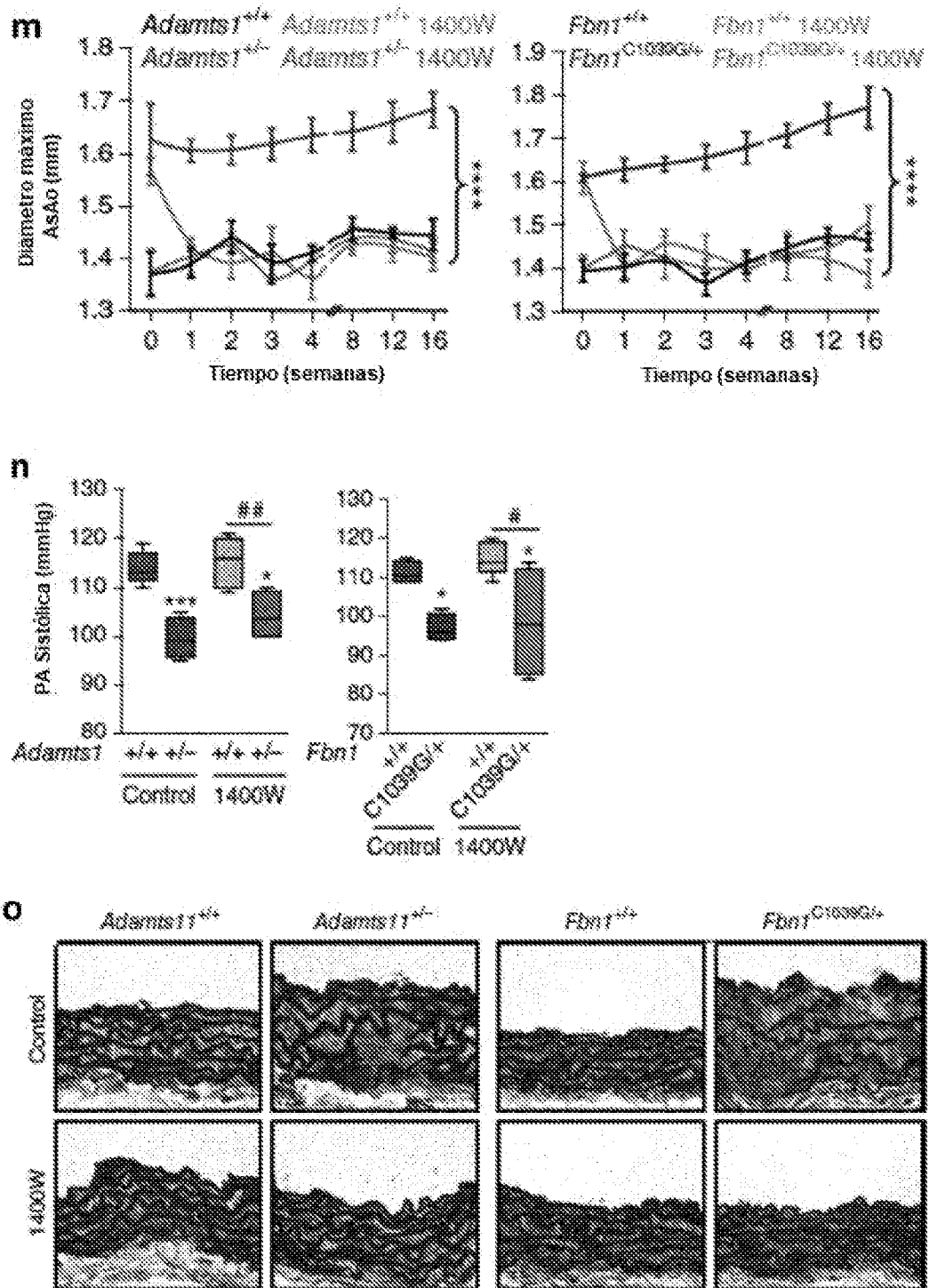


Fig. 6 (cont.)

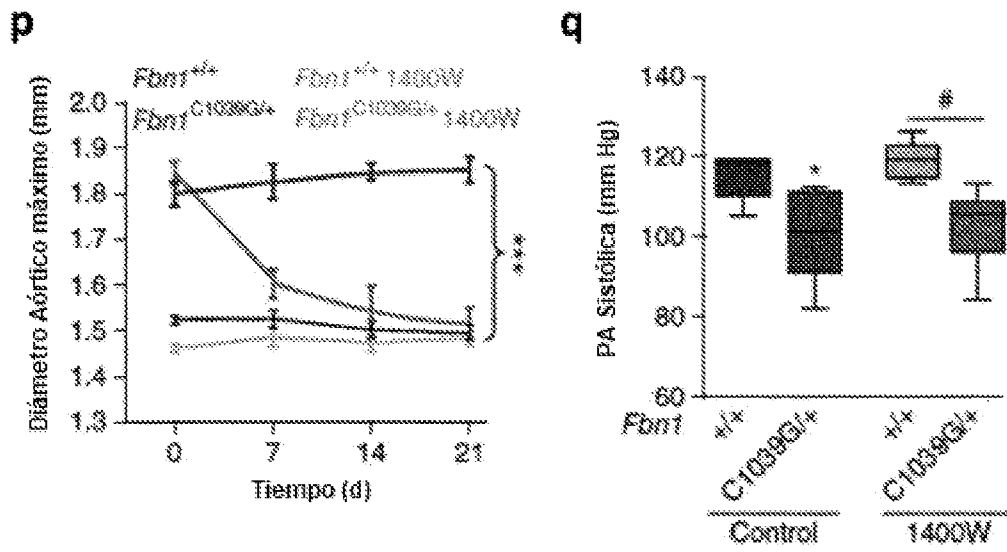


Fig. 6 (cont.)

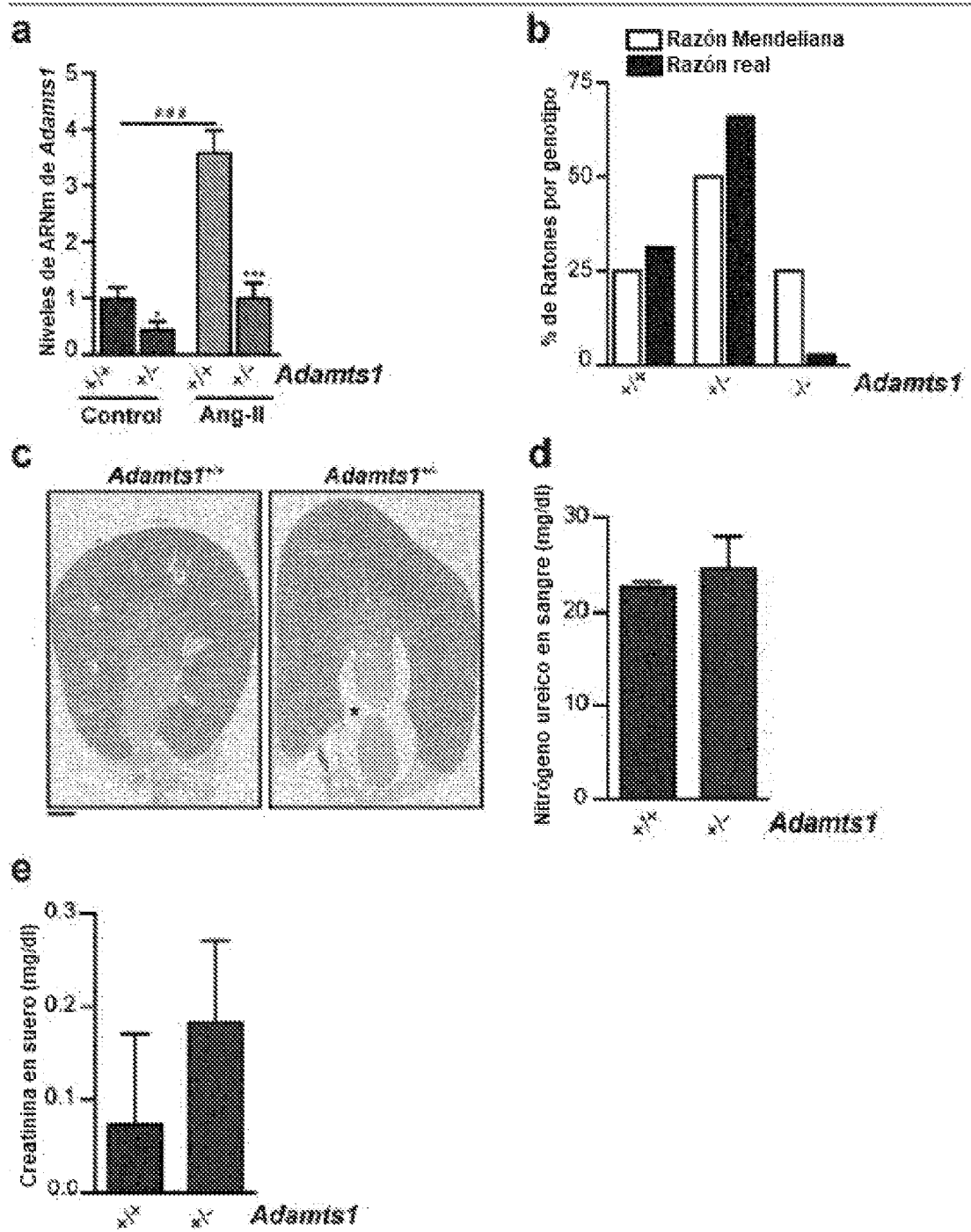


Fig. 7

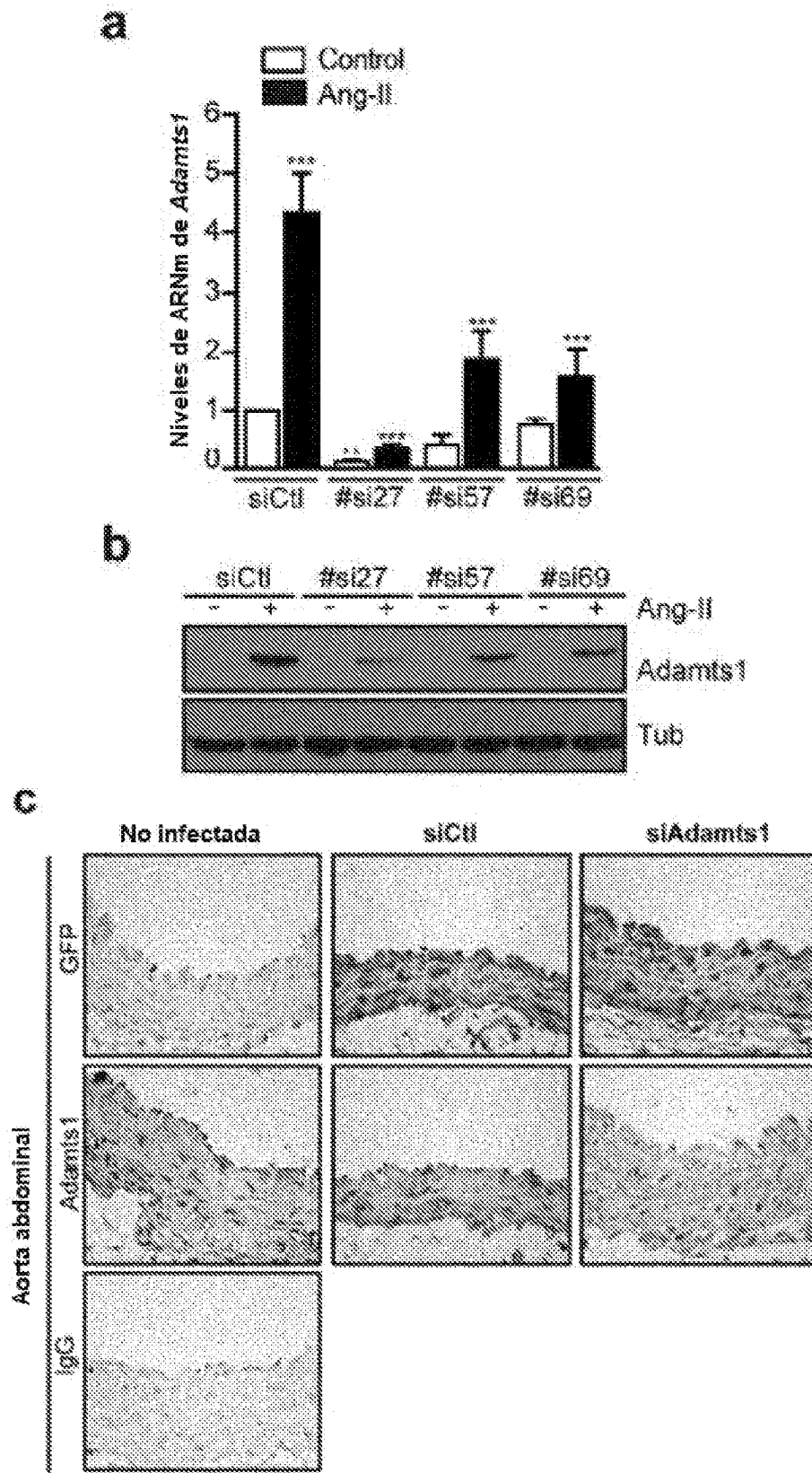


Fig. 8

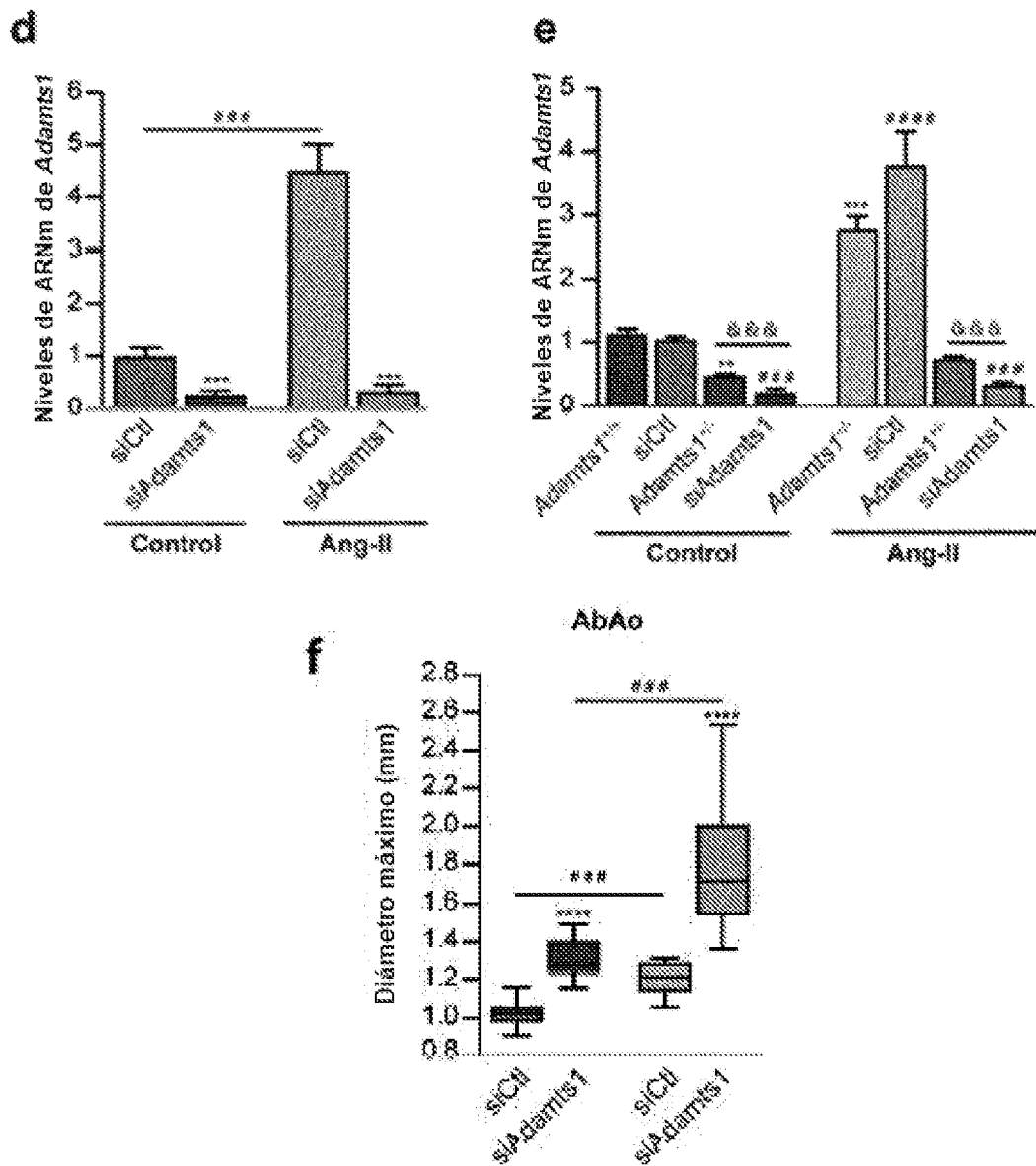


Fig. 8 (cont.)

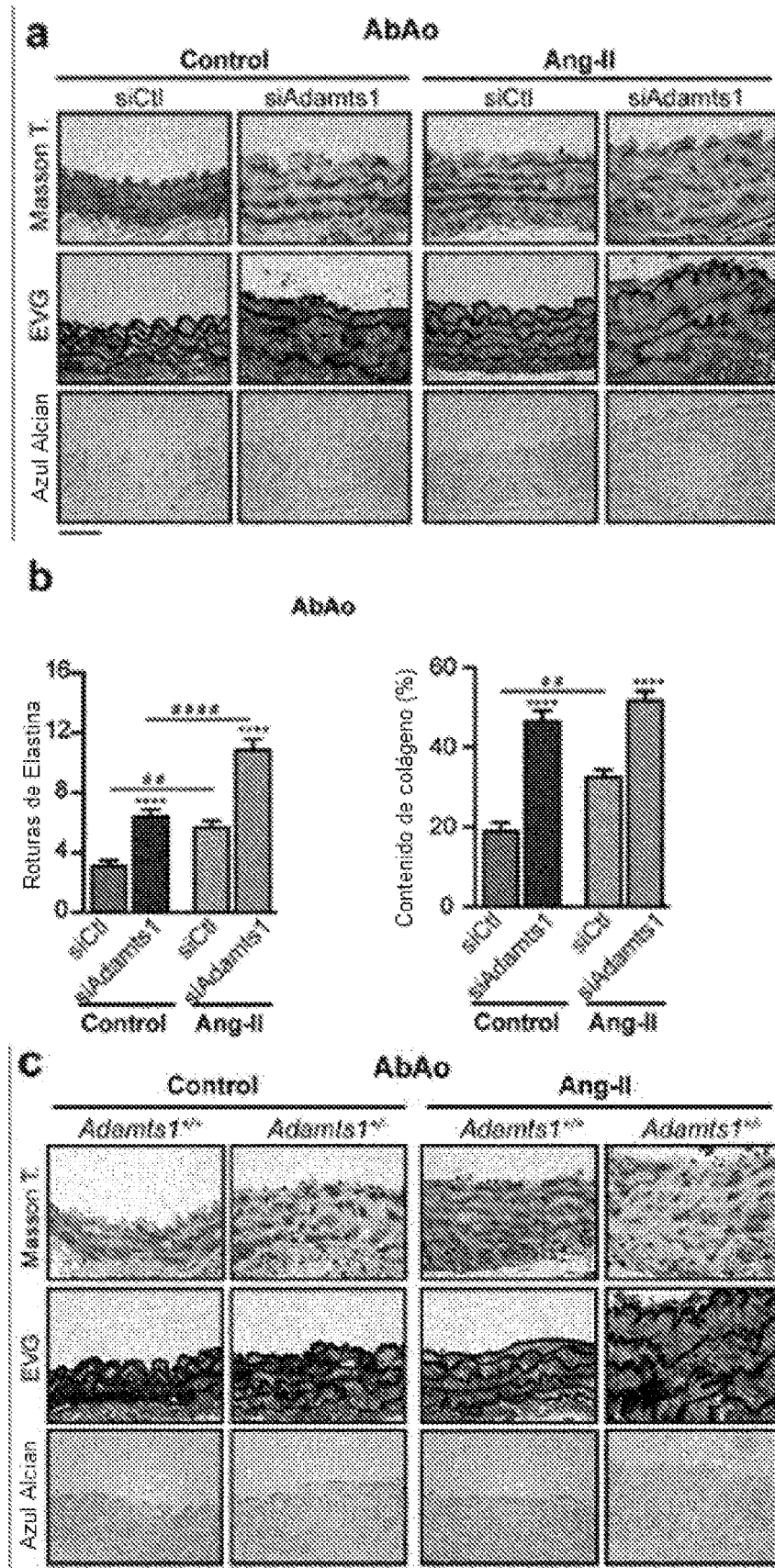


Fig. 9

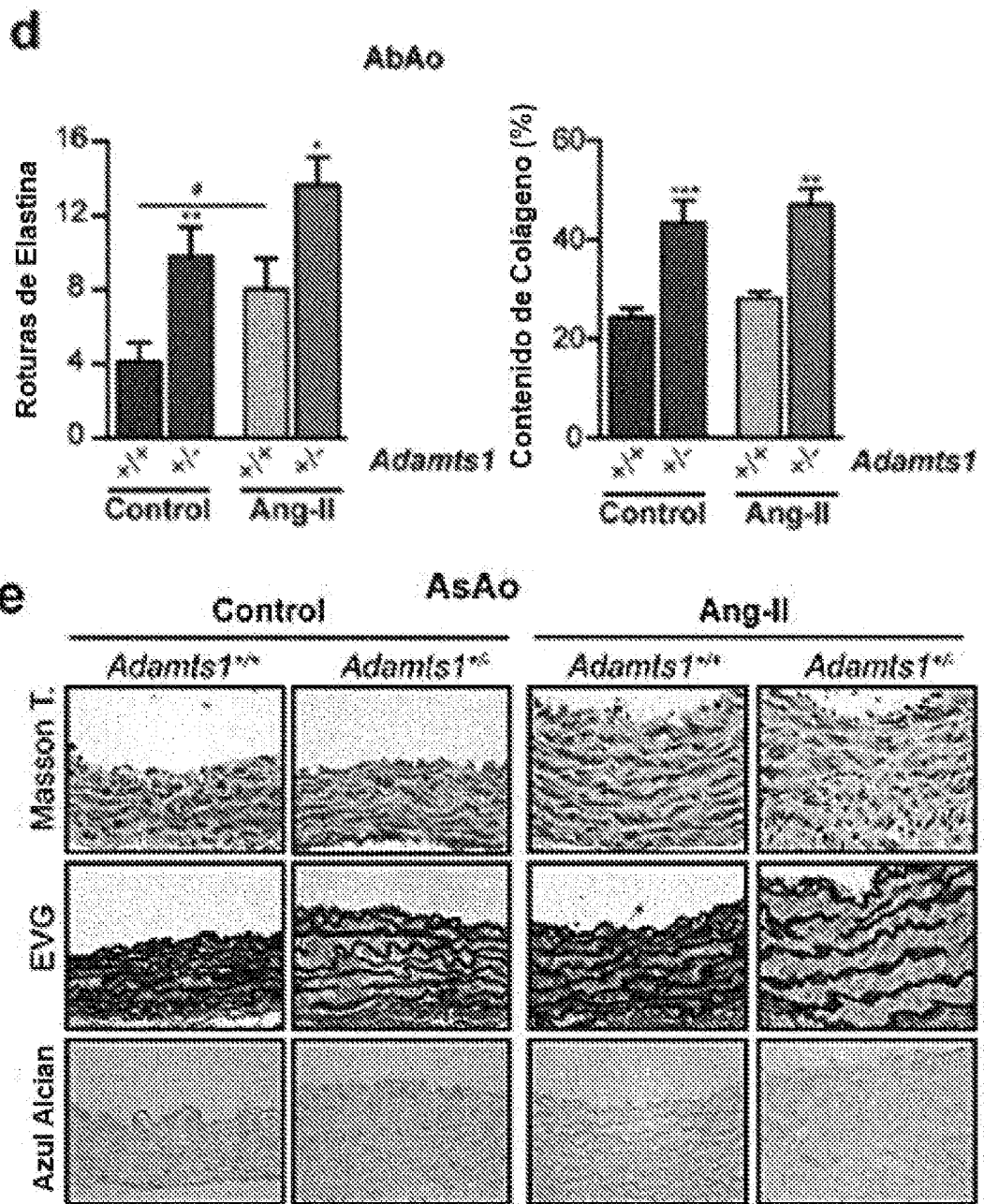


Fig. 9 (cont.)

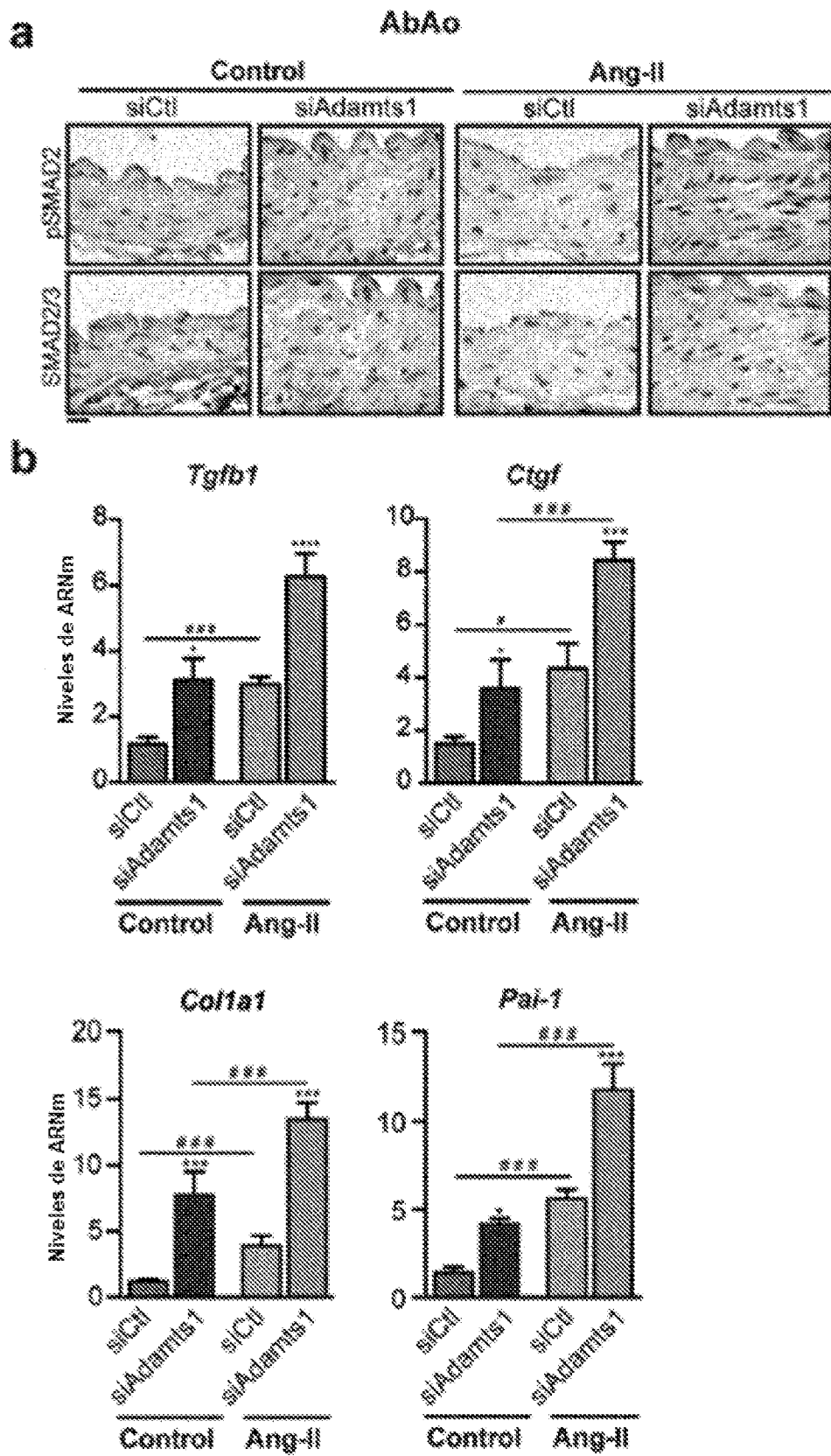


Fig. 10

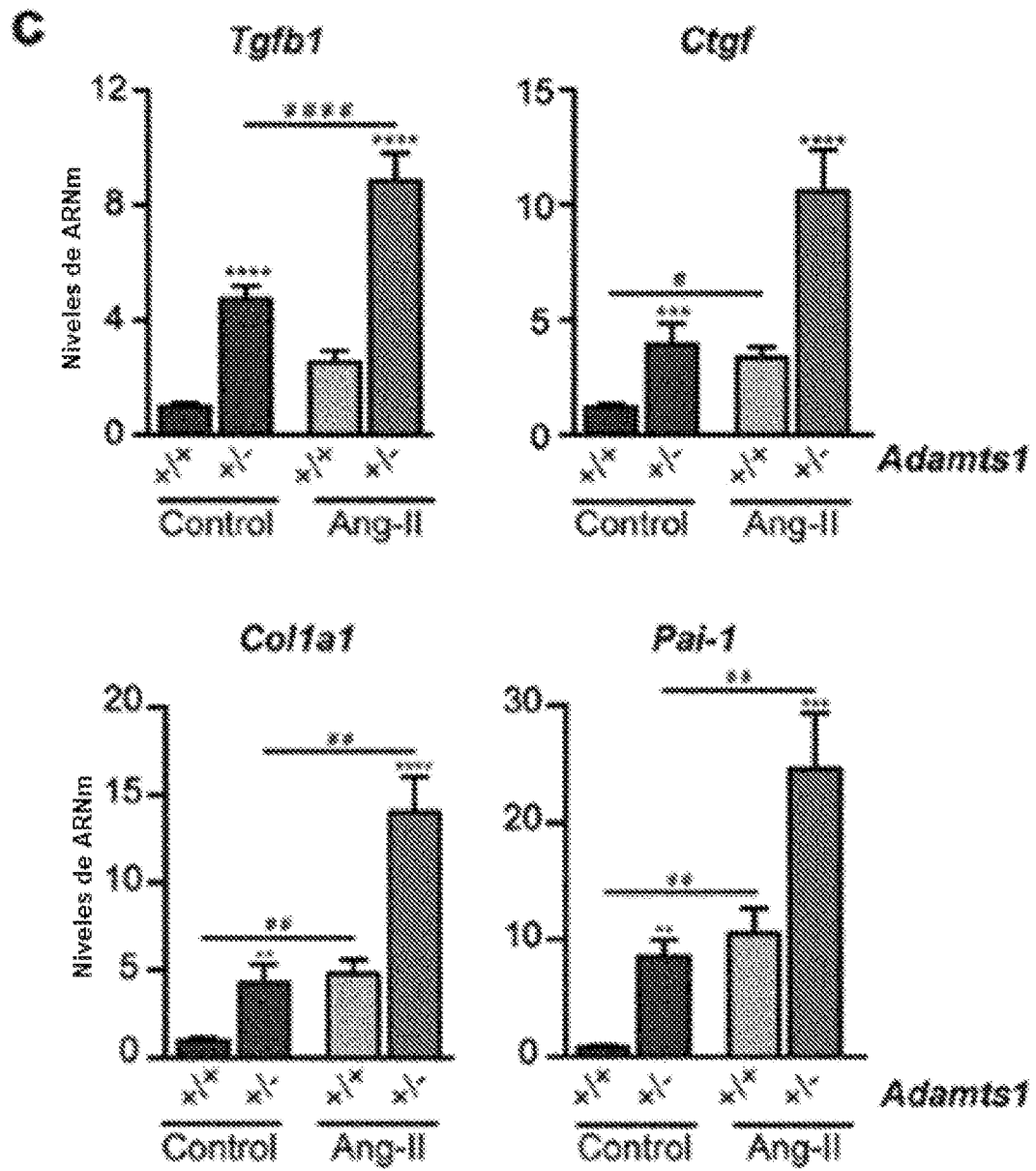


Fig. 10 (cont.)

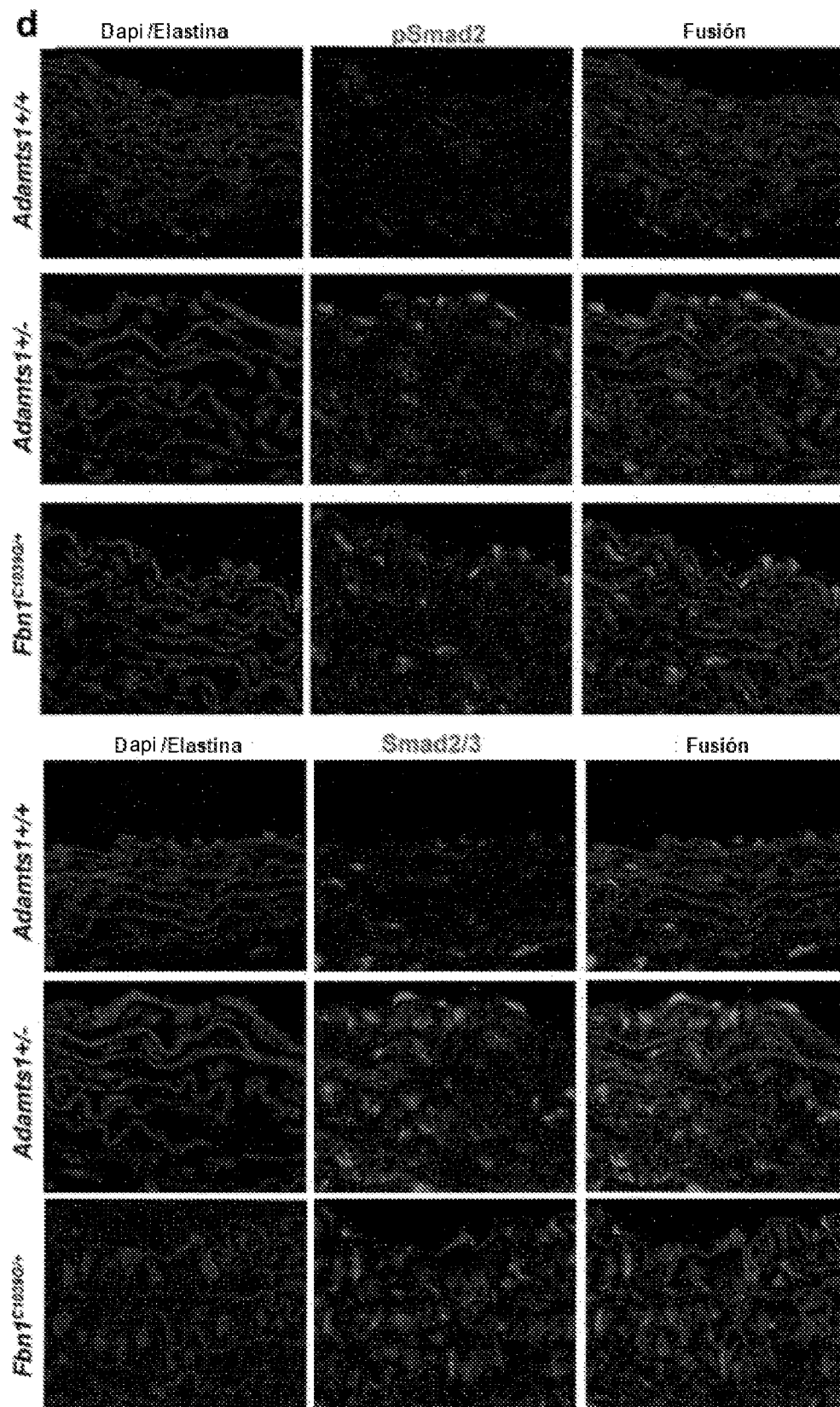


Fig. 10 (cont.)

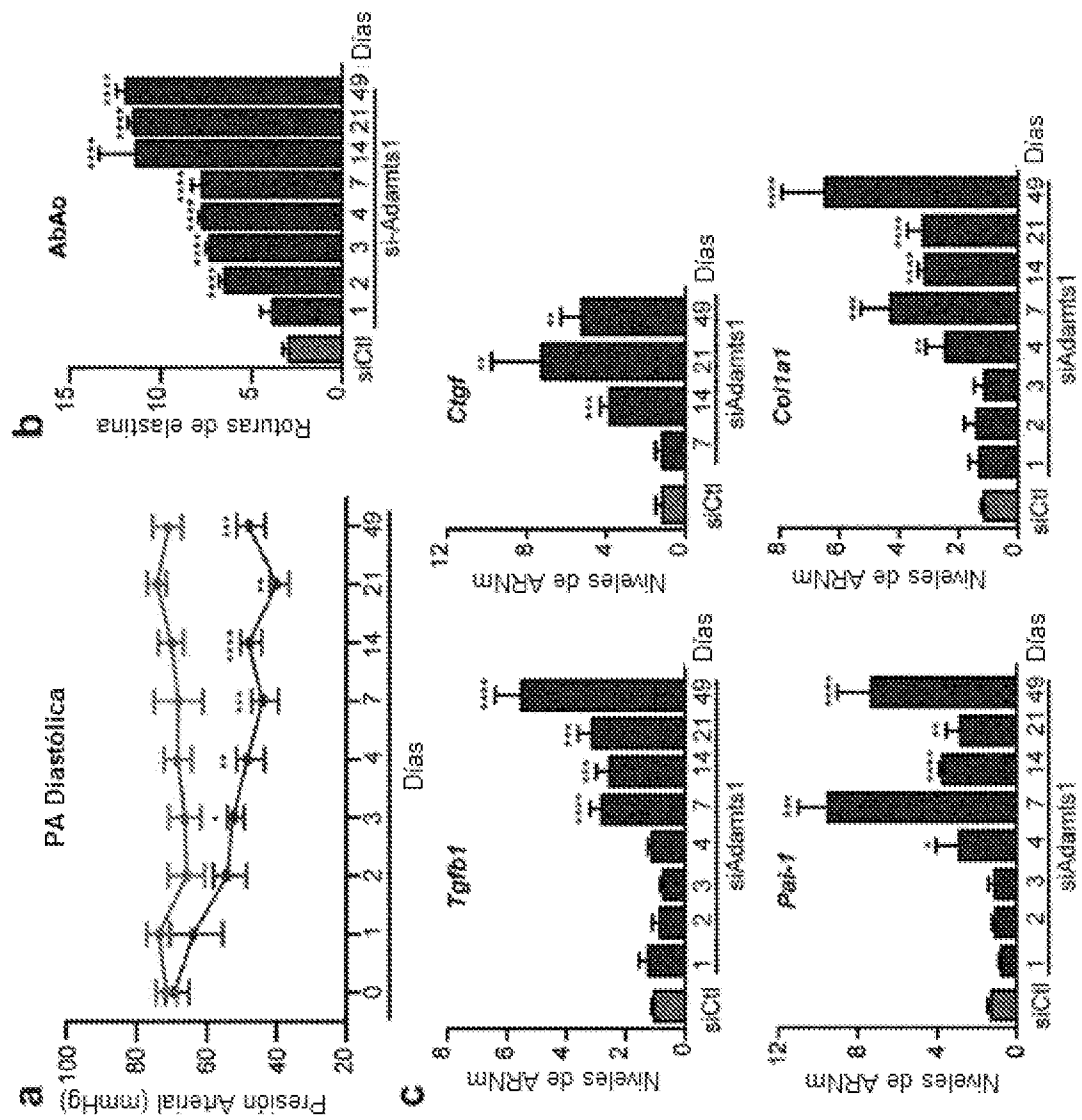
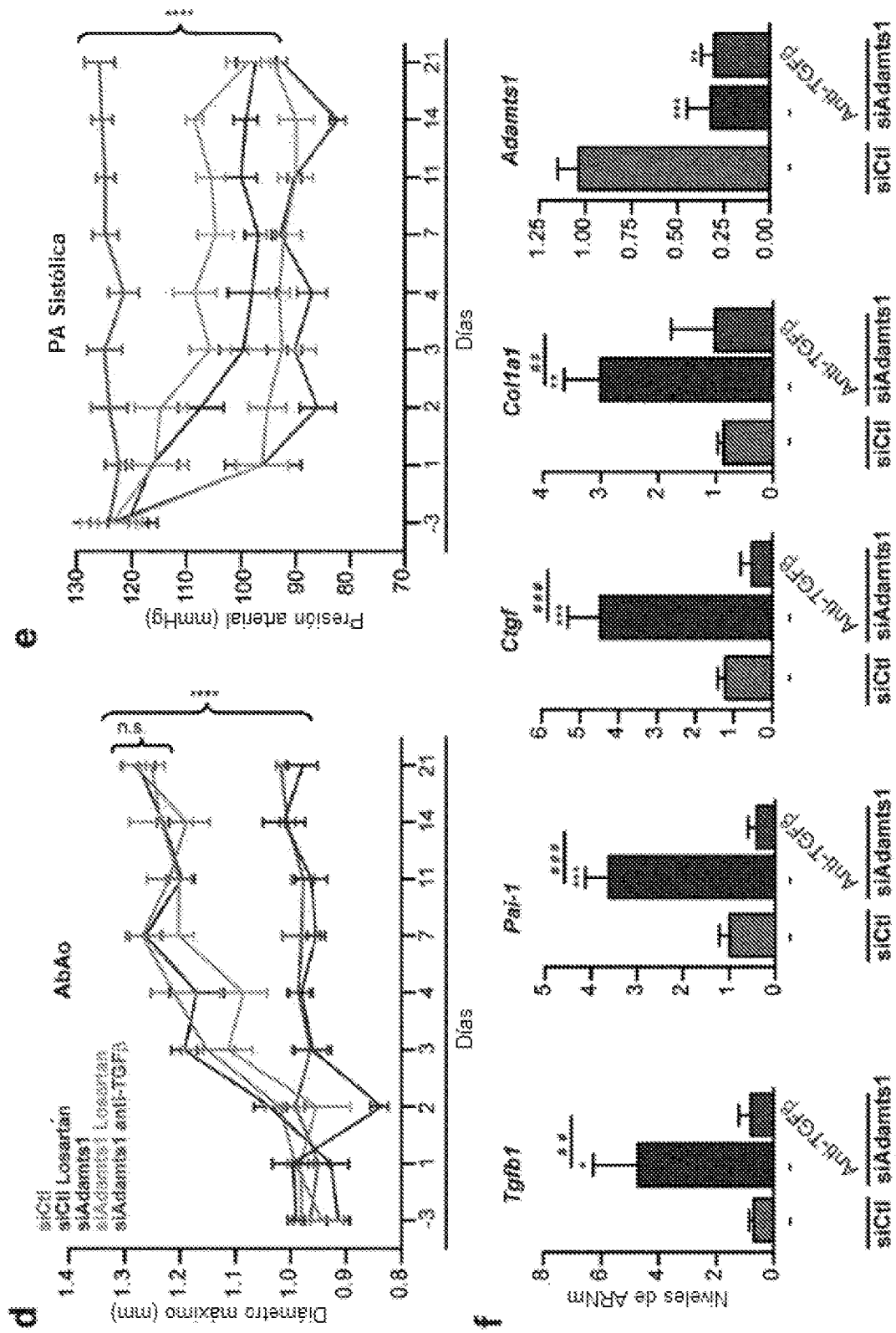


Fig. 11



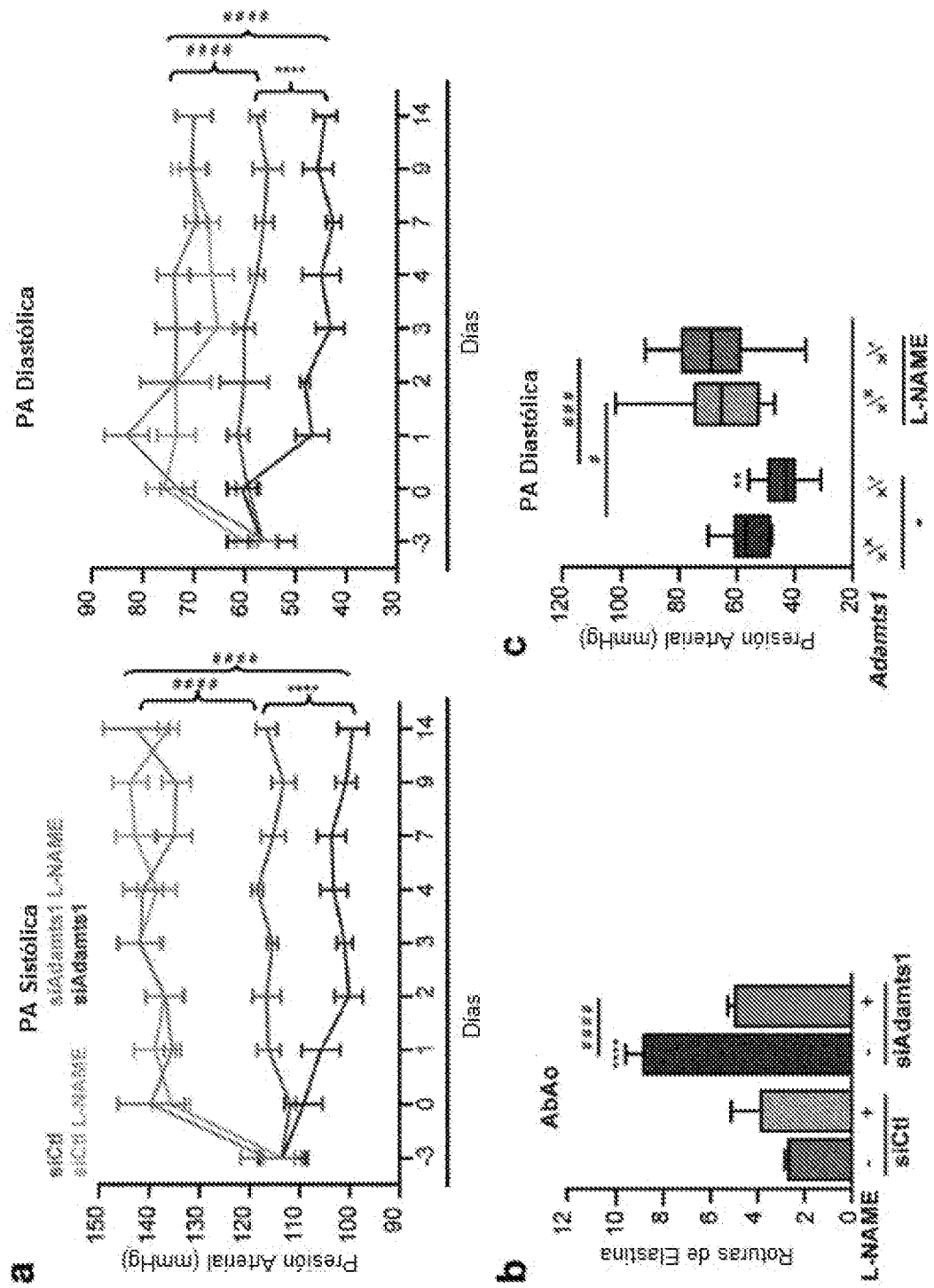


Fig. 12

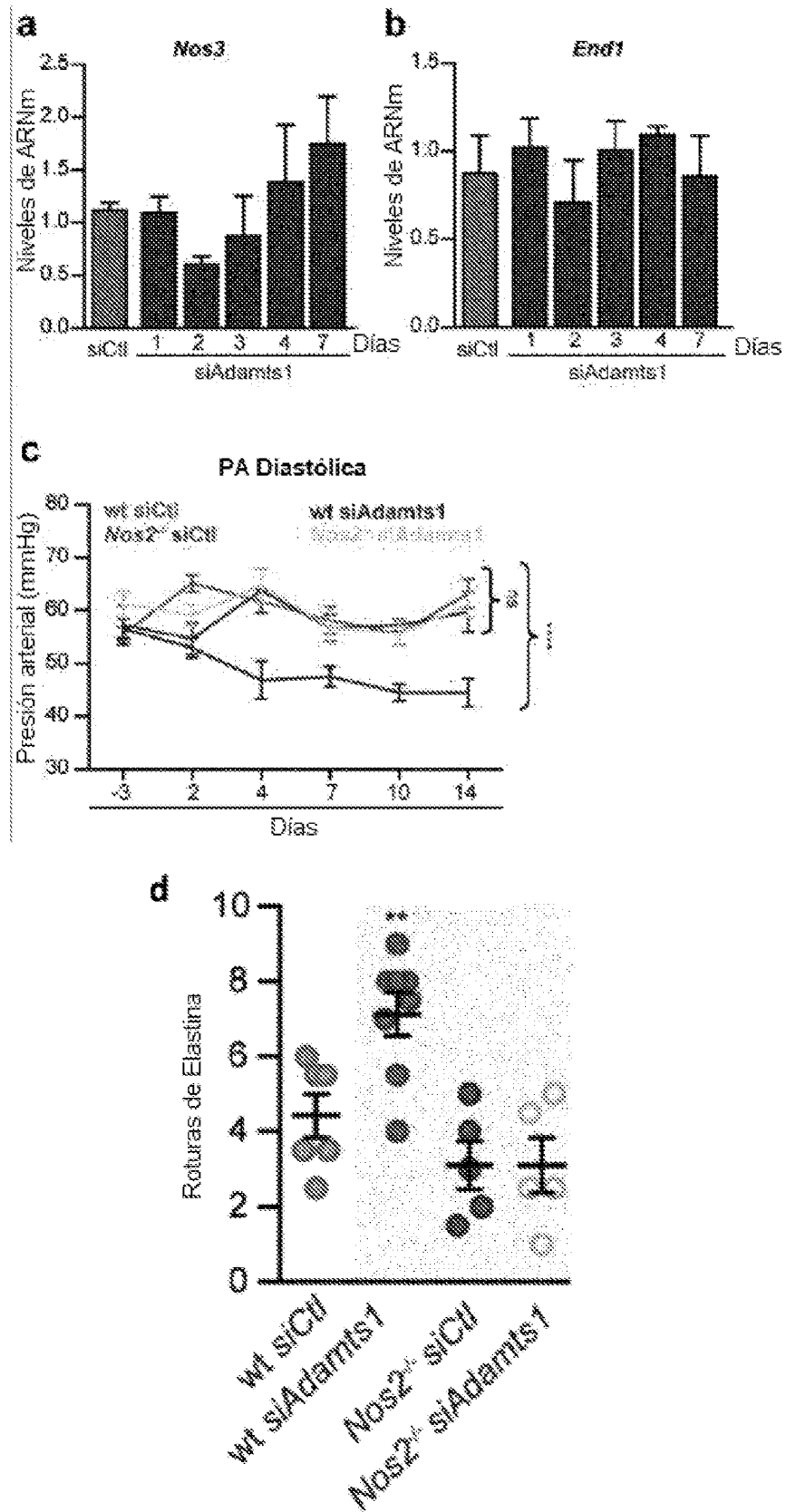


Fig. 13

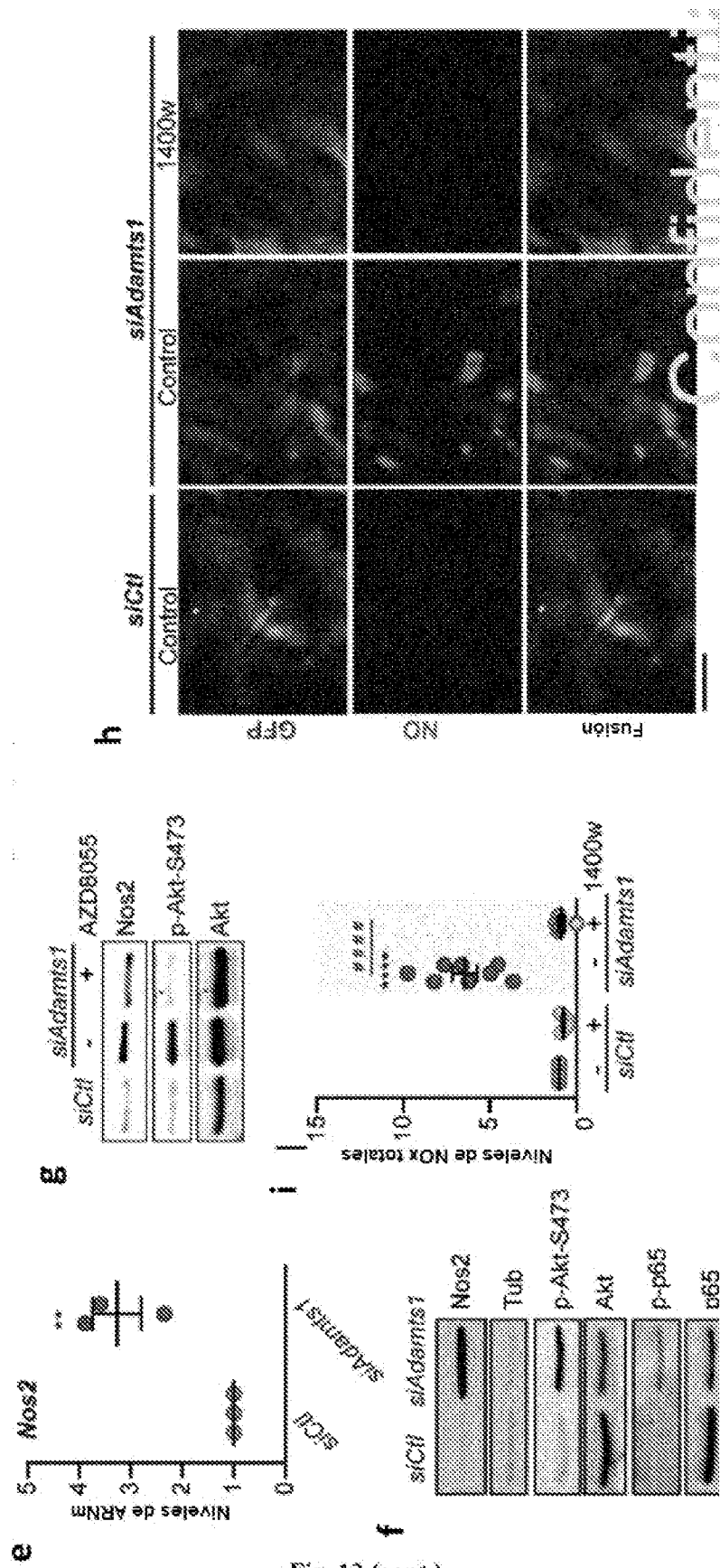


Fig. 13 (cont.)

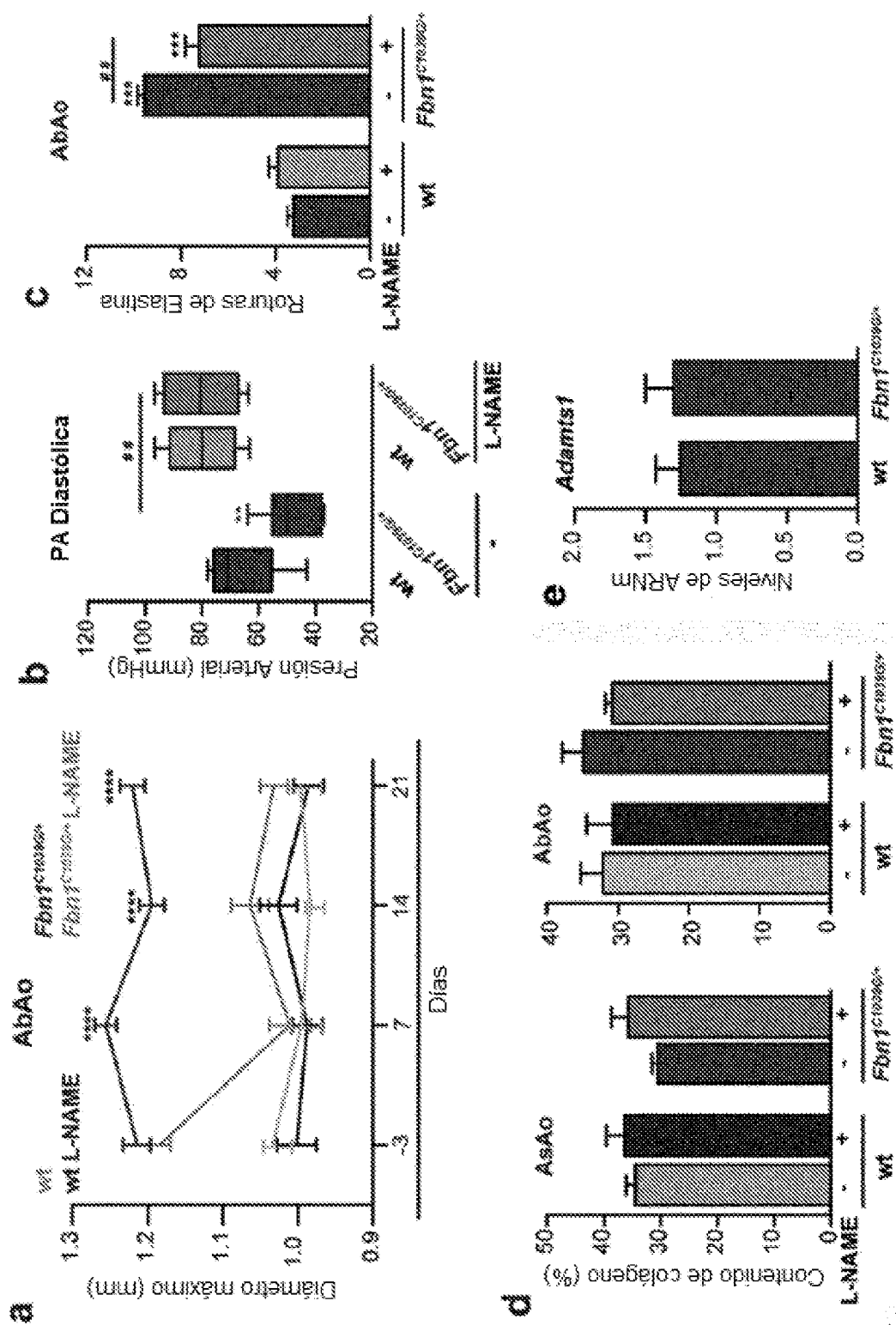


Fig. 14

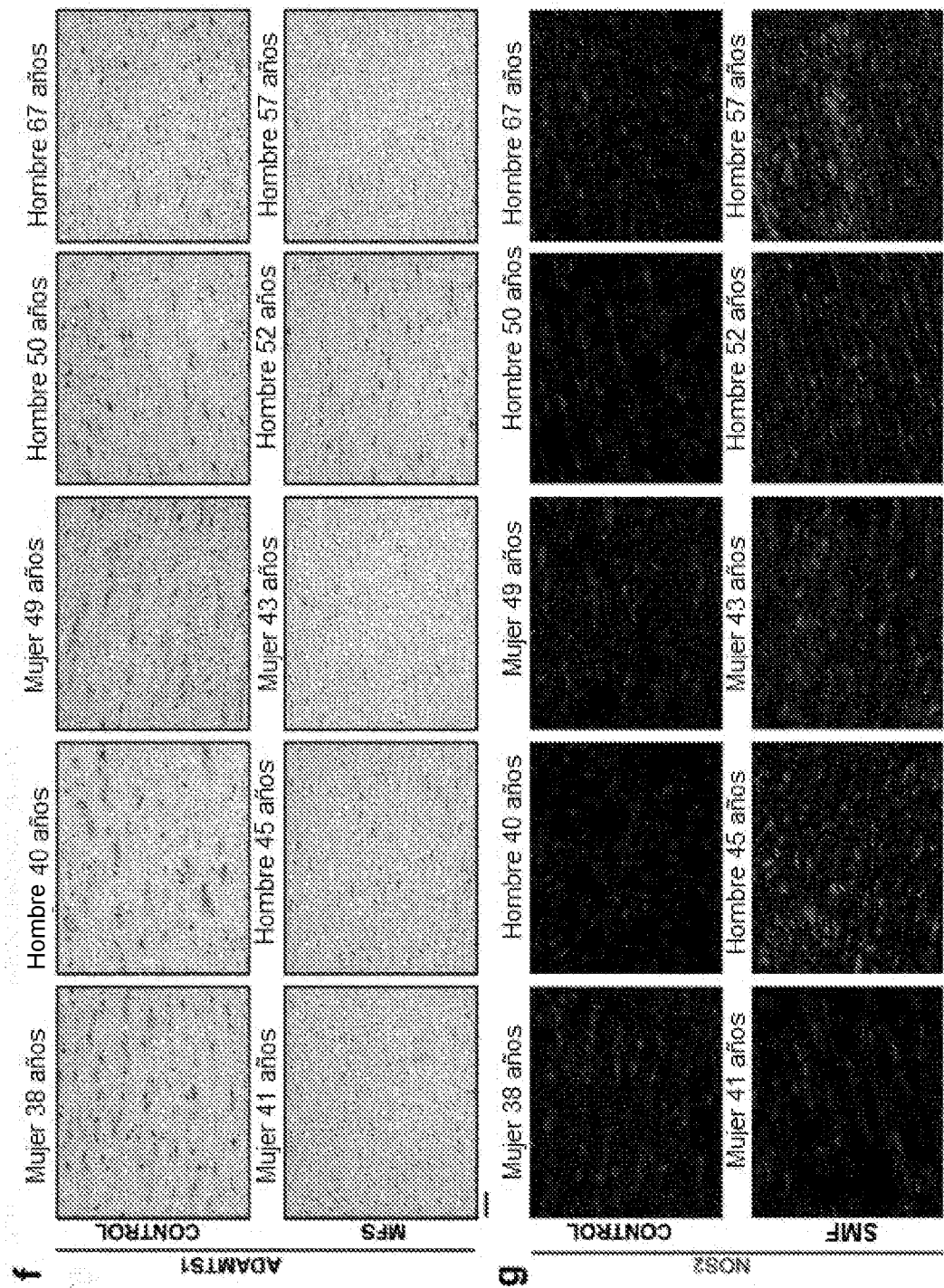


Fig. 14 (cont.)

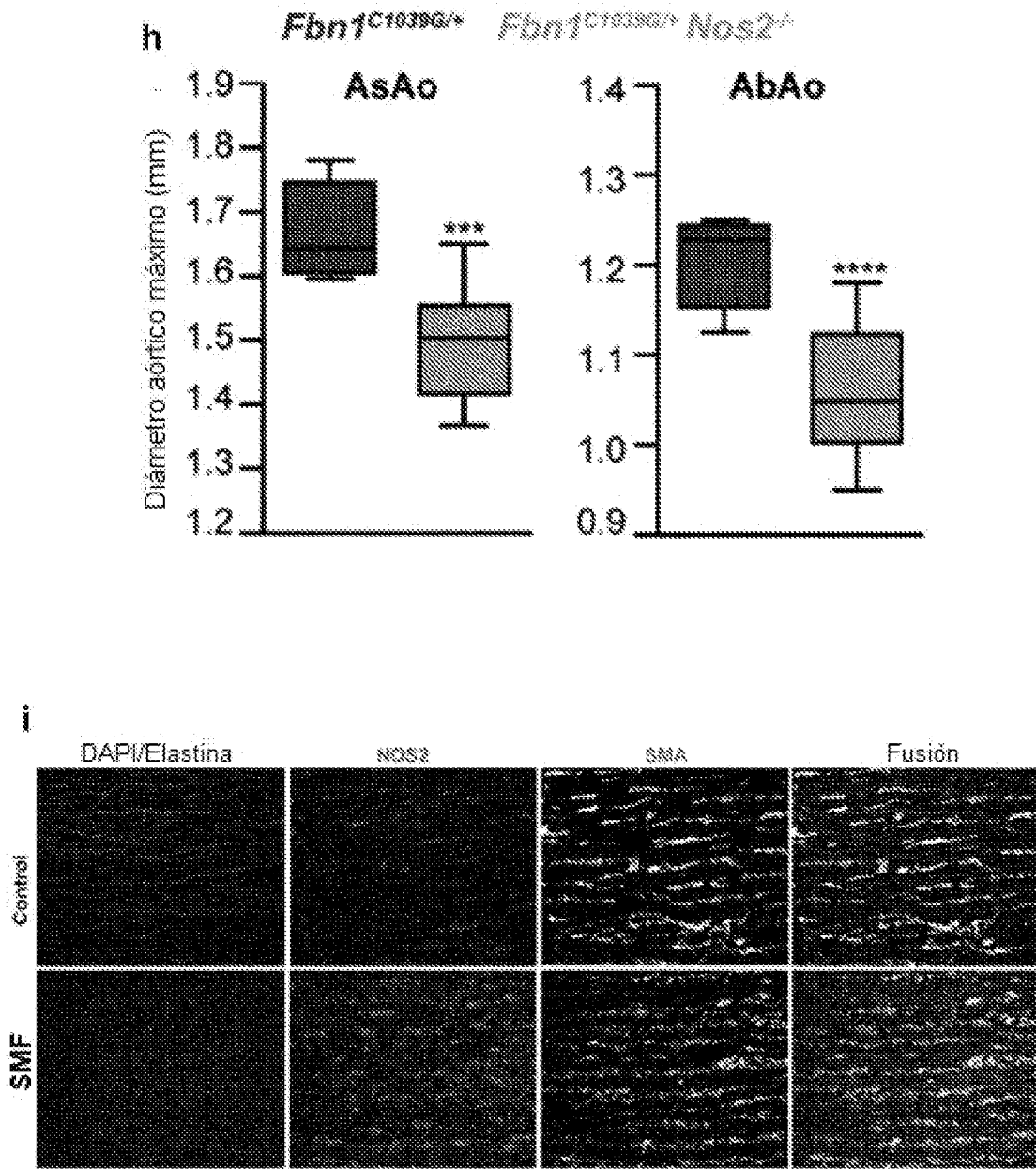


Fig. 14 (cont.)

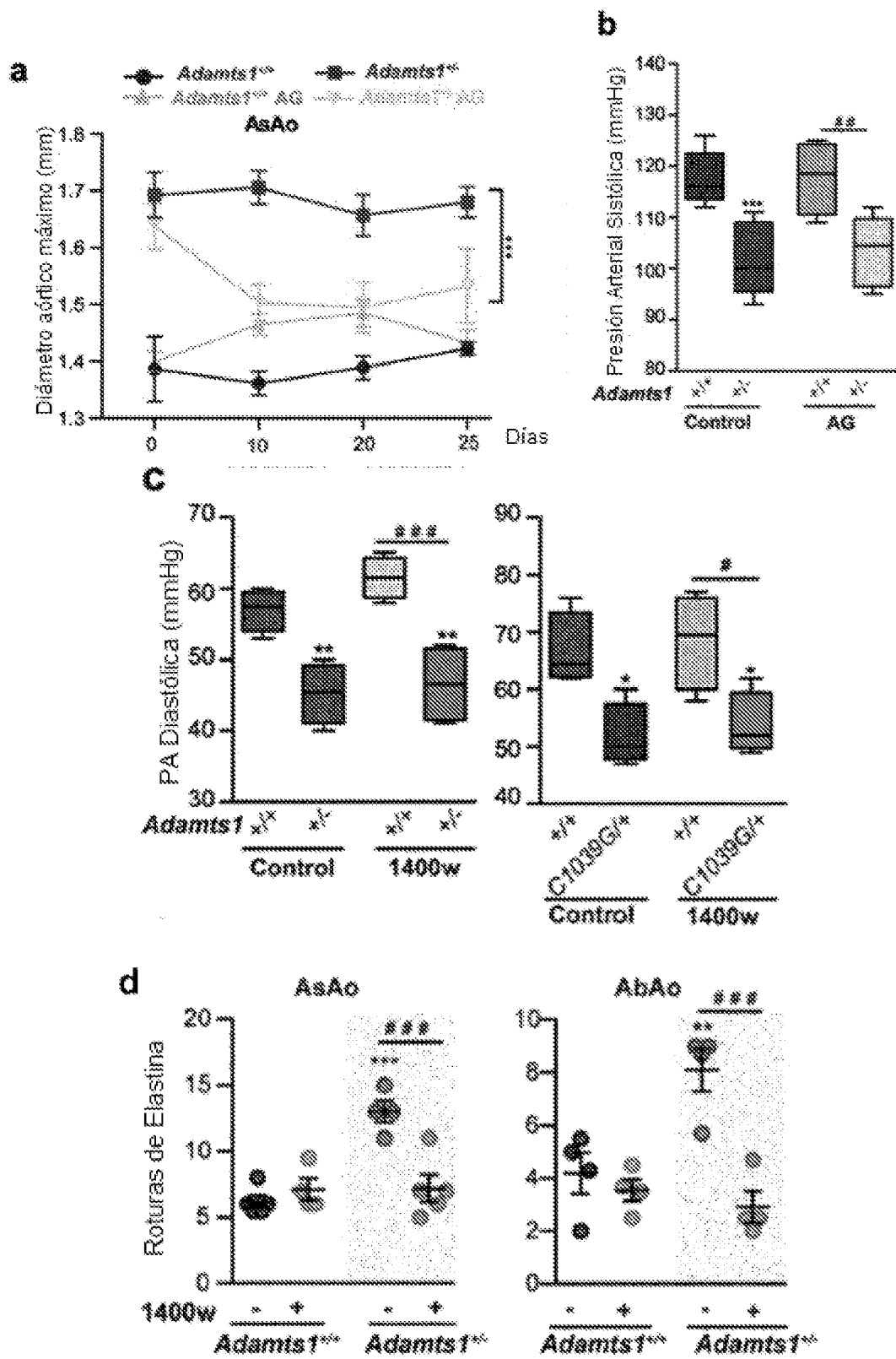


Fig. 15

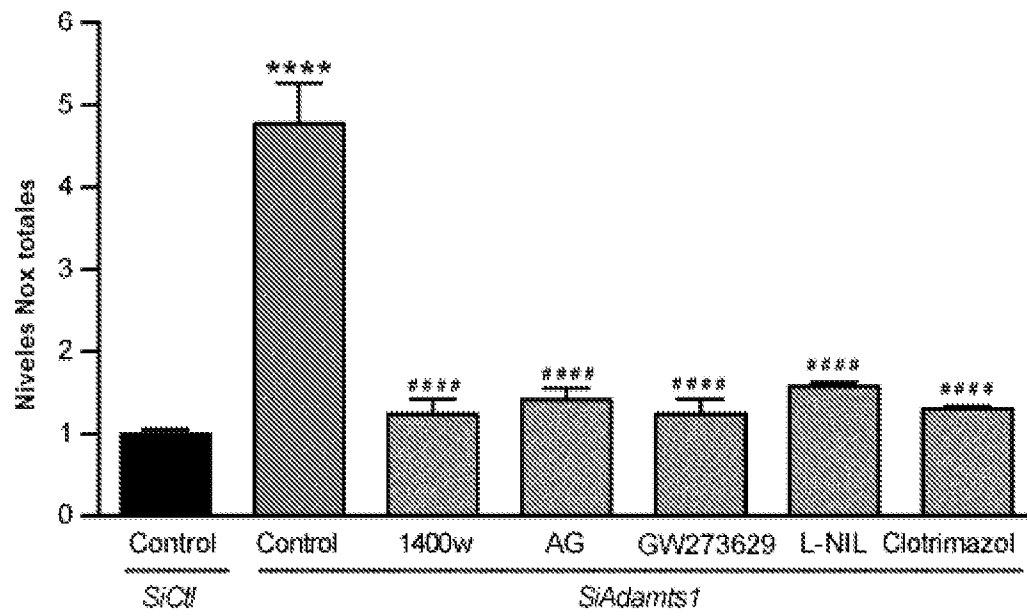


Figura 16

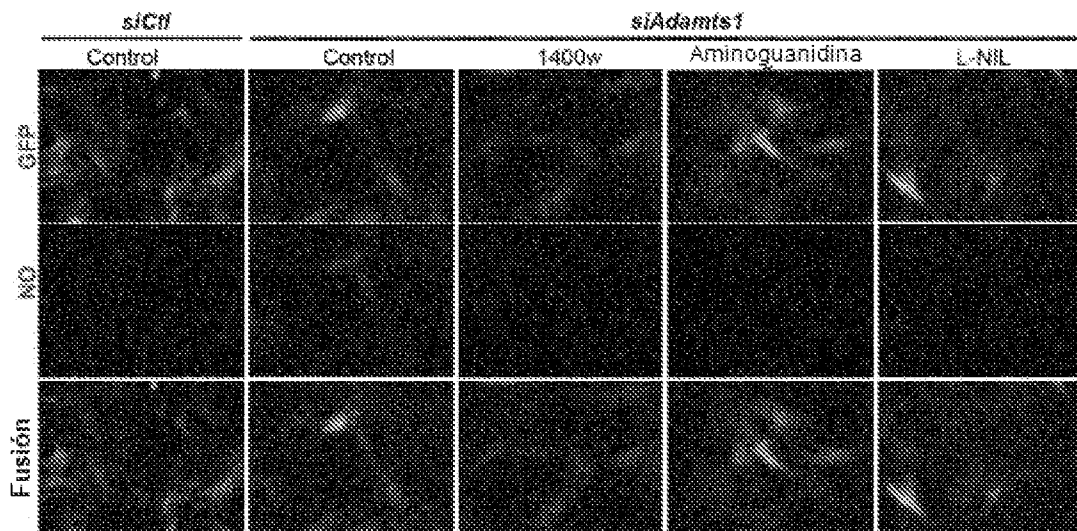


Figura 17

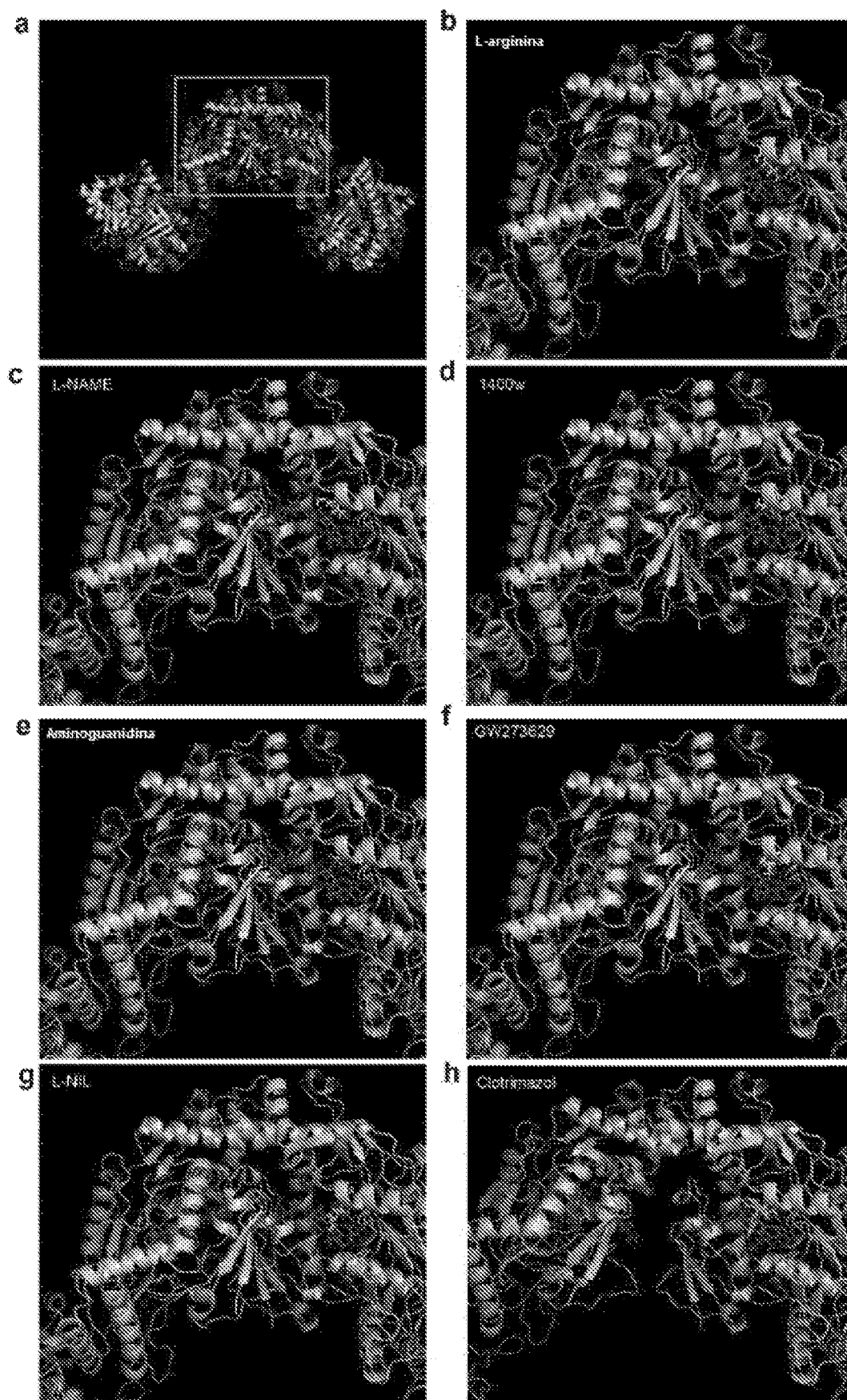


Figura 18