

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 130**

51 Int. Cl.:

A61K 31/407	(2006.01)	A61K 31/506	(2006.01)
A61K 31/4523	(2006.01)		
A61K 31/4468	(2006.01)		
A61K 45/06	(2006.01)		
A61K 31/517	(2006.01)		
A61K 31/502	(2006.01)		
A61P 19/04	(2006.01)		
A61K 31/445	(2006.01)		
A61P 9/14	(2006.01)		
C12N 9/12	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2019 PCT/US2019/056616**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2020 WO20081741**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2019 E 19872573 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2023 EP 3866799**

54 Título: **Composiciones para el tratamiento del síndrome de Ehlers Danlos vascular**

30 Prioridad:

16.10.2018 US 201862746524 P
18.10.2018 US 201862747587 P
24.04.2019 US 201962838049 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.06.2024

73 Titular/es:

THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)
3400 N. Charles Street
Baltimore, MD 21218, US

72 Inventor/es:

DIETZ, HARRY C.;
BOWEN, CAITLIN J. y
CALDERON GIADROSIC, JUAN FRANCISCO

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 973 130 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

Composiciones para el tratamiento del síndrome de Ehlers Danlos vascular

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos 62/838,049 presentada el 24 de abril de 2019, la solicitud provisional de los Estados Unidos 62/747,587 presentada el 18 de octubre de 2018 y la solicitud provisional de los Estados Unidos 62/746,524 presentada el 16 de octubre de 2018.

Declaración relativa a la investigación patrocinada por el gobierno federal

Esta invención se ha realizado con apoyo gubernamental en virtud de la subvención número 5T32GM007309-44 concedida por El Instituto Nacional de Salud. El gobierno tiene determinados derechos sobre esta invención.

10 **Campo**

La presente invención se refiere a los trastornos del tejido conjuntivo, concretamente al síndrome de Ehlers-Danlos vascular (vEDS).

Antecedentes

15 El síndrome vascular de Ehlers-Danlos (vEDS) es un trastorno hereditario del tejido conjuntivo causado por mutaciones heterocigotas en el gen *COL3A1*. Los pacientes con EDS vascular tienen la piel fina y translúcida, fácil aparición de hematomas, un aspecto facial característico y desarrollan disección espontánea en vasos sanguíneos de tamaño medio-grande y rotura de órganos (útero, colon), lo que provoca una muerte prematura y una supervivencia media de aproximadamente 45 años.

20 Muchas características del vEDS son claramente diferentes de otras vasculopatías hereditarias, tales como el síndrome de Marfan (MFS) y el síndrome de Loeys-Dietz (LDS), que se han asociado a una actividad excesiva del TGF-β. Estas características incluyen la disección aórtica sin aneurisma previo y la rotura en cualquier vaso mediano o grande, así como en órganos huecos. Estas características hacen que la predicción y el seguimiento de la enfermedad sean difíciles o imposibles, y los signos de presentación en la mayoría de los adultos diagnosticados con vEDS son la disección vascular o la rotura de órganos, con un 25 % de los pacientes que experimentan una complicación grave antes de los 20 años^{1,2}. Por tanto, existe una necesidad insatisfecha para tratar el vEDS y los trastornos del tejido conectivo relacionados. Se ha informado de que el betabloqueante celiprolol demostró una reducción de las complicaciones vasculares del vEDS. (Beridze, Natalia, and William H. Frishman. "Vascular Ehlers-Danlos syndrome: pathophysiology, diagnosis, and prevention and treatment of its complications". *Cardiology in review* 20.1 (2012): 004 - 007

30 **Sumario**

La invención se define en el conjunto de las reivindicaciones adjunto. La descripción puede contener información técnica adicional que, aunque no forma parte de la invención reivindicada, se proporciona para situar la invención en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados.

35 Los procedimientos de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia, a los que se hace referencia en esta descripción, no forman parte de la presente invención como tal, sino que se describen en la presente memoria en relación con compuestos y composiciones farmacéuticas para su uso en dichos procedimientos de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia, según la presente invención.

40 La invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de tratamiento del síndrome de Ehlers-Danlos vascular (vEDS), la composición comprende una cantidad eficaz de un agente, en la que el agente disminuye la actividad o expresión de la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) o la proteína cinasa C (PKC) y en la que el agente se selecciona entre ruboxistaurina, enzastaurina, sotrastaurina o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas.

En algunas realizaciones de la invención, el agente comprende una cantidad eficaz de enzastaurina.

45 La divulgación de cualquier compuesto que no sea ruboxistaurina, enzastaurina, sotrastaurina o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas como agente, y el tratamiento de cualquier enfermedad que no sea el síndrome de Ehlers-Danlos vascular (vEDS) no forman parte de la presente invención.

50 También se divulgan en la presente memoria, *entre otros*, composiciones, formulaciones y procedimientos para inhibir, tratar, prevenir y/o reducir los síntomas de gravedad de trastornos del tejido conectivo, por ejemplo, vasculopatías. Aspectos de esta materia se refieren al uso de agentes para el tratamiento de una amplia variedad de trastornos del tejido conectivo. En determinadas realizaciones, el trastorno del tejido conjuntivo comprende una vasculopatía, y en determinadas realizaciones, la vasculopatía comprende el síndrome de Ehlers-Danlos vascular (vEDS).

En la presente memoria se divulga un procedimiento para tratar una vasculopatía (por ejemplo, vEDS) en un sujeto. El procedimiento comprende administrar al sujeto, una cantidad eficaz de un agente, de tal manera que el agente disminuya la actividad o expresión de la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) o de la proteína cinasa C (PKC).

- 5 En determinadas realizaciones, un agente inhibe la expresión de la proteína cinasa activada por mitógenos / cinasa regulada por señal extracelular (MEK), cinasa regulada por señal extracelular (ERK), fosfolipasa C (PLC), inositol trifosfato (IP3) o proteína cinasa C (pKC), y de ese modo inhibe la actividad de ERK, PLC, IP3 o PKC.

10 En determinadas realizaciones, un agente inhibe la actividad o expresión de una o más moléculas asociadas con la ruta de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), por ejemplo, las proteínas cinasas RAS-RAF/MEK/proteína cinasa regulada por señales extracelulares (ERK).

En algunas realizaciones, el agente comprende un anticuerpo o fragmento del mismo, un polipéptido, una molécula pequeña, una molécula de ácido nucleico o cualquier combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, el agente comprende una molécula pequeña.

- 15 En algunos casos, el agente comprende una molécula pequeña. Una molécula pequeña es un compuesto cuya masa es inferior a 2000 Dalton. La masa molecular de la molécula pequeña es preferentemente inferior a 1000 Dalton, más preferentemente inferior a 600 Dalton, por ejemplo, el compuesto es inferior a 500 Dalton, inferior a 400 Dalton, inferior a 300 Dalton, inferior a 200 Dalton, o inferior a 100 Dalton.

20 Las moléculas pequeñas son orgánicas o inorgánicas. Las pequeñas moléculas orgánicas ejemplares incluyen, entre otras, hidrocarburos alifáticos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, ésteres, mono- y disacáridos, hidrocarburos aromáticos, aminoácidos y lípidos. Las pequeñas moléculas inorgánicas ejemplares comprenden oligoelementos, iones, radicales libres y metabolitos. Alternativamente, las moléculas pequeñas pueden diseñarse sintéticamente para que consistan en un fragmento, o pequeña porción, o una cadena de aminoácidos más larga para llenar un bolsillo de unión de una enzima. Las moléculas pequeñas por lo general tienen menos de un kilodalton.

- 25 En algunos casos, el agente comprende una molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, el ácido ribonucleico (ARN) o el ácido desoxirribonucleico (ADN) inhiben la expresión de la proteína cinasa activada por mitógenos / cinasa regulada por señales extracelulares (MEK), la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), la fosfolipasa C (PLC), el inositol trifosfato (IP3) o la proteína cinasa C (pKC), inhibiendo así la actividad de ERK, PLC, IP3 o PKC.
- 30 En algunos casos, el ácido nucleico comprende ARN interferente pequeño (ARNsi), ARN de interferencia (ARNi), ARN mensajero (ARNm), ARN de horquilla pequeña o ARN de horquilla corta (ARNhc), ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc), ARN antisentido o microARN, o cualquier porción de los mismos. Sin embargo, el experto podría identificar fácilmente ácidos nucleicos adicionales que inhiban/antagonicen o activen/agonicen ERK o PKC, o IP3 o PLC.

35 Los polinucleótidos, polipéptidos u otros agentes utilizados en la presente memoria se purifican y/o aíslan. Específicamente, como se utiliza en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico, polinucleótido, polipéptido o proteína "aislada" o "purificada" está sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. Los compuestos purificados son al menos el 60 % en peso (peso seco) del compuesto de interés. Preferentemente, el preparado contiene al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 90 %, y lo más preferentemente al menos un 99 %, en peso, del compuesto de interés. Por ejemplo, un compuesto purificado es aquel que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % (p/p) del compuesto deseado en peso. La pureza se mide por cualquier procedimiento estándar apropiado, por ejemplo, mediante cromatografía en columna, cromatografía en capa fina o análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Un polinucleótido purificado o aislado (ácido ribonucleico [ARN] o ácido desoxirribonucleico [ADN]) está libre de los genes o secuencias que lo flanquean en su estado natural. Un polipéptido purificado o aislado está libre de los aminoácidos o secuencias que lo flanquean en su estado natural. Purificado también define un grado de esterilidad que es seguro para la administración a un sujeto humano, por ejemplo, carente de agentes infecciosos o tóxicos.

- 45 En algunas realizaciones, el agente comprende cobimetinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otras realizaciones, el agente comprende ruboxistaurina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En otras realizaciones, el agente comprende enzastaurina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En otras realizaciones contempladas, el agente comprende sotrastaurina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. Según la invención, el agente se selecciona entre ruboxistaurina, enzastaurina, sotrastaurina o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas. En las realizaciones elegidas de la invención, el agente comprende una cantidad eficaz de enzastaurina.

En las realizaciones alternativas de la divulgación, el procedimiento comprende además administrar un agente que disminuye la actividad o expresión de fosfolipasa C (PLC) o inositol trifosfato (IP3).

En las realizaciones, el procedimiento comprende la administración de una cantidad eficaz del agente. La cantidad eficaz del agente es de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, aproximadamente 0,001 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 125 mg/kg, aproximadamente 150 mg/kg, aproximadamente 175 mg/kg, aproximadamente 200 mg/kg, aproximadamente 225 mg/kg o aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal. En última instancia, el médico o veterinario responsable decide la cantidad y la pauta de dosificación adecuadas.

En algunos casos, el agente se administra al menos una vez al día, al menos una vez a la semana o al menos una vez al mes. El agente puede administrarse adecuadamente durante un día, una semana, un mes, dos meses, tres meses, seis meses, nueve meses o un año. En algunos casos, el agente se administra diariamente, por ejemplo, cada 24 horas. O el agente se administra de forma continua o varias veces al día, por ejemplo, cada 1 hora, cada 2 horas, cada 3 horas, cada 4 horas, cada 5 horas, cada 6 horas, cada 7 horas, cada 8 horas, cada 9 horas, cada 10 horas, cada 11 horas o cada 12 horas.

Por otra parte, los procedimientos descritos en la presente memoria previenen o reducen la gravedad de una vasculopatía (vEDS) en al menos aproximadamente un 1%, por ejemplo, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, o al menos aproximadamente 99 %.

Existen una variedad de vías de administración disponibles. Por ejemplo, el agente se administra por vía tópica, oral, inhalatoria o inyectable.

Preferentemente, el sujeto es un mamífero que necesita dicho tratamiento o profilaxis, por ejemplo, un sujeto al que se le ha diagnosticado una vasculopatía o una predisposición a la misma. El mamífero es cualquier mamífero, por ejemplo, un humano, un primate, un ratón, una rata, un perro, un gato, un caballo, así como ganado o animales criados para el consumo alimentario, por ejemplo, ganado vacuno, ovejas, cerdos, pollos y cabras. En una realización preferida, el mamífero es un ser humano.

En algunos aspectos, un sujeto que padece o está en riesgo de padecer un trastorno del tejido conectivo, por ejemplo, una vasculopatía (y en determinadas realizaciones vEDS), tiene un nivel de proteína ERK o PKC o ARNm que es diferente de un control normal. En algunas realizaciones, una muestra de prueba obtenida del sujeto comprende un nivel de proteína ERK o PKC o ARNm que es diferente de un control normal. Por ejemplo, la muestra de prueba puede comprender un nivel de proteína ERK o PKC o ARNm que sea al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 100 %, 5-50 %, 50-75 %, 75-100 %, 1-veces, 2-veces, 3-veces, 4-veces, o 5-veces mayor en comparación con un control normal.

En determinadas realizaciones, la muestra de prueba puede comprender un nivel de actividad ERK o PKC que es al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 100 %, aproximadamente 5 a aproximadamente 50 %, aproximadamente 50 a aproximadamente 75 %, aproximadamente 75 a aproximadamente 100 %, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces mayor en comparación con un control normal.

Una muestra o valor de "control" se refiere a una muestra que sirve como referencia, normalmente una referencia conocida, para compararla con una muestra de prueba. Por ejemplo, una muestra de prueba puede tomarse de un sujeto de prueba, por ejemplo, un sujeto con un trastorno del tejido conectivo tal como una vasculopatía (por ejemplo, vEDS) o que necesita diagnóstico, y compararse con muestras de condiciones conocidas, por ejemplo, un sujeto (o sujetos) que no tiene la enfermedad (un control negativo o normal), o un sujeto (o sujetos) que sí tiene la enfermedad (control positivo). Un control también puede representar un valor promedio obtenido a partir de un número de pruebas o resultados. Un experto en la técnica reconocerá que los controles pueden diseñarse para evaluar cualquier número de parámetros. Un experto en la técnica comprenderá qué controles son valiosos en una situación determinada y podrá analizar los datos basándose en comparaciones con los valores de control. Los controles también son valiosos para determinar la importancia de los datos. Por ejemplo, si los valores de un parámetro determinado son variables en los controles, la variación en las muestras de prueba no se considerará significativa.

El término "cantidad normal" con respecto a un compuesto (por ejemplo, una proteína o ARNm) se refiere a una cantidad normal del compuesto en un individuo que no padece un trastorno del tejido conjuntivo tal como una vasculopatía (por ejemplo, vEDS) o en una población sana o general. La cantidad de un compuesto puede medirse en una muestra de prueba y compararse con el nivel de "control normal", utilizando técnicas tales como límites de

referencia, límites de discriminación o umbrales de definición de riesgo para definir puntos de corte y valores anormales (por ejemplo, para un vEDS concreto o un síntoma del mismo). Por nivel de control normal se entiende el nivel de uno o más compuestos o compuestos combinados que se encuentra por lo general en un sujeto que se sabe que no padece un vEDS. Tales niveles normales de control y puntos de corte pueden variar en función de si un compuesto se utiliza solo o en una fórmula que se combina con otros compuestos en un índice. Alternativamente, el nivel de control normal puede ser una base de datos de patrones de compuestos de sujetos previamente analizados que no desarrollaron un vEDS o un síntoma particular del mismo (por ejemplo, en el caso de que se desarrolle el vEDS o se analice a un sujeto que ya tenga el vEDS) durante un horizonte temporal clínicamente relevante.

5 El nivel que se determina puede ser el mismo que un nivel de control o un nivel de corte o un nivel umbral, o puede aumentar o disminuir en relación con un nivel de control o un nivel de corte o un nivel umbral. En algunos aspectos, el sujeto de control es un control emparejado de la misma especie, sexo, etnia, grupo de edad, hábito de fumar, índice de masa corporal (BMI), estado actual del régimen terapéutico, historial médico o una combinación de los mismos, pero difiere del sujeto diagnosticado en que el control no padece la enfermedad (o un síntoma de la misma) en cuestión o no está en riesgo de padecer la enfermedad.

10 En relación con un nivel de control, el nivel determinado puede ser un nivel aumentado. Como se utiliza en la presente memoria, el término "aumentado" con respecto al nivel (por ejemplo, nivel de proteína o ARNm) se refiere a cualquier % de aumento por encima de un nivel de control. En diversas realizaciones, el nivel aumentado puede ser de al menos o aproximadamente un 5 % de aumento, al menos o aproximadamente un 10 % de aumento, al menos o aproximadamente un 15 % de aumento, al menos o aproximadamente un 20 % de aumento, al menos o aproximadamente un 25 % de aumento, al menos o aproximadamente un 30 % de aumento, al menos o aproximadamente un 35 % de aumento, al menos o aproximadamente un 40 % de aumento, al menos o aproximadamente un 45 % de aumento, al menos o aproximadamente un 50 % de aumento, al menos o aproximadamente un 55 % de aumento, al menos o aproximadamente un 60 % de aumento, al menos o aproximadamente un 65 % de aumento, al menos o aproximadamente un 70 % de aumento, al menos o aproximadamente un 75 % de aumento, al menos o aproximadamente un 80 % de aumento, al menos o aproximadamente un 85 % de aumento, al menos o aproximadamente un 90 % de aumento, al menos o aproximadamente un 95 % de aumento, en relación con un nivel de control

20 En relación con un nivel de control, el nivel que se determina puede ser un nivel disminuido. Como se utiliza en la presente memoria, el término "disminuido" con respecto al nivel (por ejemplo, nivel de proteína o ARNm) se refiere a cualquier % de disminución por debajo de un nivel de control. En diversas realizaciones, el nivel disminuido puede ser de al menos o aproximadamente un 5 % de disminución, al menos o aproximadamente un 10 % de disminución, al menos o aproximadamente un 15 % de disminución, al menos o aproximadamente un 20 % de disminución, al menos o aproximadamente un 25 % de disminución, al menos o aproximadamente un 30 % de disminución, al menos o aproximadamente un 35 % de disminución, al menos o aproximadamente un 40 % de disminución, al menos o aproximadamente un 45 % de disminución, al menos o aproximadamente un 50 % de disminución, al menos o aproximadamente un 55 % de disminución, al menos o aproximadamente un 60 % de disminución, al menos o aproximadamente un 65 % de disminución, al menos o aproximadamente un 70 % de disminución, al menos o aproximadamente un 75 % de disminución, al menos o aproximadamente un 80 % de disminución, al menos o aproximadamente un 85 % de disminución, al menos o aproximadamente un 90 % de disminución, al menos o aproximadamente un 95 % de disminución, en relación con un nivel de control.

30 En los aspectos, la muestra de prueba obtenida del sujeto comprende sangre, suero, plasma, saliva, lágrimas, vítreo, líquido cefalorraquídeo, sudor, líquido cefalorraquídeo u orina.

35 También se divulgan en la presente memoria procedimientos para tratar un trastorno del tejido conectivo en un sujeto. El procedimiento comprende administrar una cantidad eficaz de un agente, en el que el agente disminuye la actividad o expresión de la cinasa relacionada con la señal extracelular (ERK) o la proteína cinasa C (PKC). En las realizaciones de dicha divulgación, el trastorno del tejido conectivo se selecciona del grupo que consiste en una vasculopatía (por ejemplo, vEDS), el síndrome de Marfan, el síndrome de Loey-Dietz y el aneurisma aórtico torácico familiar. Otros ejemplos incluyen, sin limitación, dermatomiositis amiopática; proliferación osteocondromatosa parosteal rara; síndrome de Ehlers-Danlos clásico; síndrome de Ehlers-Danlos dermatosparaxis; síndromes de Ehlers-Danlos; fascitis eosinofílica; epidermolísis bullosa (EB) enfermedad de Legg-Calve-Perthes; síndrome de Marfan; melorreostosis; melorreostosis con osteopoiquilosis; enfermedad mixta del tejido conjuntivo; poliartritis con factor reumatoide negativo; osteosclerosis con ictiosis e insuficiencia ovárica prematura; displasia de Pacman; enfermedad ósea de Paget; enfermedad ósea de Paget; familiar; polimiositis; sordera progresiva con fijación del estribo; enfermedad de las costillas; esclerodermia; anquilosis temporomandibular; distrofia de las veinte uñas; síndrome de Ehlers-Danlos vascular; síndrome de Weill-Marchesani; osteosclerosis autosómica dominante de tipo Worth. En determinadas realizaciones, el trastorno del tejido conjuntivo comprende vasculopatía.

40 Además del tratamiento del propio Síndrome de Marfan, la presente divulgación también proporciona procedimientos para tratar una variedad de trastornos relacionados con Marfan. En algunas realizaciones, el trastorno relacionado con Marfan se selecciona del grupo que consiste en: Síndrome de Loey-Dietz, aneurisma

aórtico familiar, válvula aórtica bicúspide con dilatación aórtica, ectopia lentis familiar (cristalino luxado), síndrome de prolapso de la válvula mitral, hábito de Marfan, aracnodactilia contractural congénita (síndrome de Beals), síndrome de Stickler, síndrome de Shprintzen-Goldberg, síndrome de Weill-Marchesani y síndrome de Ehlers-Danlos.

5 En las realizaciones, el procedimiento para tratar un trastorno del tejido conjuntivo comprende administrar un agente, en el que el agente comprende un anticuerpo o fragmento del mismo, un polipéptido, una molécula pequeña, una molécula de ácido nucleico o cualquier combinación de los mismos. En las realizaciones preferidas, el comprende una molécula pequeña.

10 En algunas realizaciones, el agente comprende cobimetinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otras realizaciones, el agente comprende ruboxistaurina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En otras realizaciones, el agente comprende enzastaurina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En otras realizaciones contempladas, el agente comprende sotrastaurina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

15 En las realizaciones alternativas, el procedimiento comprende además la administración de un agente que disminuye la actividad o expresión de la fosfolipasa C (PLC) o del inositol trifosfato (IP3).

20 También se proporcionan en la presente memoria composiciones farmacéuticas para el tratamiento de una vasculopatía. En las realizaciones, la composición comprende una cantidad eficaz de un agente que disminuye la actividad o la expresión de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) o de la proteína cinasa C (PKC). La composición farmacéutica comprende un agente, en el que el agente comprende un anticuerpo o fragmento del mismo, un polipéptido, una molécula pequeña, una molécula de ácido nucleico o cualquier combinación de los mismos. Según la invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de tratamiento del síndrome de Ehlers-Danlos vascular (vEDS), la composición que comprende una cantidad eficaz de un agente, en la que el agente disminuye la actividad o expresión de la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) o proteína cinasa C (PKC) y en la que el agente se selecciona de ruboxistaurina, enzastaurina, sotrastaurina, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

25 La composición descrita en la presente memoria se administra por vía oral, intravenosa, tópica, parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intratecal, intralesional, intracraneal, intranasal, intraocular, intracardíaca, intravítrea, administración intraósea, administración intracerebral, administración intraarterial, administración intraarticular, administración intradérmica, administración transdérmica, administración transmucosa, administración sublingual, administración enteral, administración sublabial, administración por insuflación, administración por supositorio, administración inhalada o administración subcutánea.

30 También se divulgan en la presente memoria kits para tratar la vasculopatía. En las realizaciones, los kits comprenden 1) una composición farmacéutica de cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria y 2) instrucciones escritas para tratar la vasculopatía.

35 En otros aspectos de la divulgación, se contemplan procedimientos para tratar un trastorno del tejido conectivo (por ejemplo, el síndrome de Marfan). En las realizaciones, el procedimiento comprende administrar una cantidad eficaz de un agente, en el que el agente comprende un anticuerpo o fragmento del mismo, un polipéptido, una molécula pequeña, una molécula de ácido nucleico, o cualquier combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, se coadministran al sujeto cantidades terapéuticamente eficaces de uno o más agentes.

40 En determinadas realizaciones de la divulgación, el procedimiento para tratar un trastorno del tejido conectivo (por ejemplo, el síndrome de Marfan) comprende administrar un agente que disminuye la actividad o expresión de la proteína cinasa C (PKC). En determinadas realizaciones, el procedimiento para tratar un trastorno del tejido conjuntivo (por ejemplo, el síndrome de Marfan) comprende administrar un agente que disminuye la actividad o expresión de la cinasa regulada por señal extracelular (ERK). En determinadas realizaciones, el procedimiento para tratar un trastorno del tejido conjuntivo (por ejemplo, el síndrome de Marfan) comprende administrar un agente que disminuye la actividad o expresión de la proteína cinasa C (PKC), una cinasa regulada por señal extracelular (ERK) o una combinación de las mismas.

45 En determinadas realizaciones de la divulgación, el procedimiento para tratar un trastorno del tejido conectivo (por ejemplo, síndrome de Marfan) comprende la administración de un agente que disminuye o inhibe la expresión de proteína cinasa activada por mitógenos / cinasa regulada por señal extracelular (MEK), cinasa regulada por señal extracelular (ERK), fosfolipasa C (PLC), inositol trifosfato (IP3) o proteína cinasa C (pKC), y así inhibe la actividad de ERK, PLC, IP3 o PKC.

50 En determinadas realizaciones de la divulgación, el procedimiento para tratar un trastorno del tejido conectivo (por ejemplo, el síndrome de Marfan) comprende administrar un agente que disminuye o inhibe la actividad o expresión de una o más moléculas asociadas con la ruta de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), por ejemplo, las proteínas cinasas RAS-RAF/MEK/regulada por señales extracelulares (ERK).

En algunas realizaciones, el paciente es un paciente humano. En algunas realizaciones, el paciente tiene 15 años o más. En algunas realizaciones, el paciente es un paciente adulto. En algunas realizaciones, el paciente es un paciente pediátrico.

5 En algunas realizaciones, el procedimiento se inicia tan pronto como (o poco después) se diagnostica el vEDS. En algunas realizaciones, el procedimiento se inicia cuando el paciente tiene 15 años, o cuando se le diagnostica por primera vez.

10 En algunas realizaciones, el paciente es diagnosticado basándose en un fenotipo de vEDS, o basándose en una prueba molecular vEDS (por ejemplo, se determina que el paciente tiene vEDS basándose en una o más pruebas genéticas tales como una prueba que determina que el paciente tiene una sustitución de glicina dentro de la triple hélice o una variante de sitio de empalme).

15 En algunas realizaciones, el paciente tiene una mutación COL3A1. En algunas realizaciones, el paciente tiene una sustitución de glicina dentro de la triple hélice o una variante del sitio de empalme. En algunas realizaciones, el paciente tiene una sustitución sin sentido de la glicina en la secuencia repetitiva (Gly-X-Y)_n de la triple hélice del colágeno, o variantes del sitio de empalme que conducen a la omisión de exón en fase. En algunas realizaciones, el paciente tiene una sustitución de glicina dentro de la triple hélice (Grupo I). En algunos casos, el paciente tiene una variante de empalme, una inserción-delección en el marco o una duplicación (Grupo II). En algunas realizaciones, el paciente tiene una variante que conduce a la haplo-insuficiencia (Grupo III).

20 En algunas realizaciones, el paciente ha tenido previamente un evento agudo relacionado con vEDS (por ejemplo, un evento arterial tal como una ruptura o disección, una ruptura intestinal o uterina) antes de la dosis inicial de uno o más agentes incorporados en la presente memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

25 En determinadas realizaciones, el agente disminuye la proteína PKC o el nivel de ARNm en al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 100 %, 5-50 %, 50-75 %, 75-100 %, 1-veces, 2-veces, 3-veces, 4-veces, o 5-veces en comparación con un control normal. En otras realizaciones, el agente disminuye el nivel de actividad de PKC en al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 100 %, 5-50 %, 5 veces, en comparación con un control normal.

30 En algunas realizaciones, el agente disminuye el nivel de proteína o ARNm de la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) en al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 100 %, 5-50 %, 50-75 %, 75-100 %, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces en comparación con un control normal. En otras realizaciones, el agente disminuye el nivel de actividad de ERK en al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 100 %, 5-50 %, 5 veces, en comparación con un control normal.

35 En las realizaciones de la divulgación, el agente para tratar un trastorno del tejido conectivo (por ejemplo, el síndrome de Marfan) comprende enzastaurina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En otras realizaciones, el agente para tratar un trastorno del tejido conjuntivo (por ejemplo, el síndrome de Marfan) comprende sotrastaurina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En otros ejemplos contemplados, el agente para tratar un trastorno del tejido conjuntivo (por ejemplo, el síndrome de Marfan) comprende ruboxistaurina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Definiciones

40 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el significado comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Las siguientes referencias proporcionan a los expertos una definición general de muchos de los términos utilizados en la presente divulgación: The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5ª ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Los siguientes términos tienen el significado que se les atribuye a continuación, salvo que se especifique lo contrario.

50 El término "composición farmacéutica" significa cualquier composición que contiene al menos un agente terapéutico o biológicamente activo y sea adecuada para su administración al paciente. Cualquiera de estas formulaciones puede prepararse mediante procedimientos conocidos y aceptados en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, (ed. A. R. Gennaro), Mack Publishing Co., Easton, Pa., 2000.

55 Por "receptores acoplados a proteínas G (GPCR)" se entiende un receptor proteico que detecta moléculas fuera de una célula y activa, dentro de la célula, rutas de transducción de señales y, en última instancia, respuestas celulares. Los GPCR se denominan receptores de siete transmembranas porque atraviesan la membrana celular siete veces.

- 5 Por "agonista" se entiende una sustancia química que se une a un receptor y activa el receptor para producir una respuesta biológica. Mientras que un agonista provoca una acción, un "antagonista" bloquea la acción del agonista y un agonista inverso provoca una acción opuesta a la del agonista. Como se utiliza en la presente memoria, los términos "antagonista" e "inhibidor" se utilizan indistintamente para referirse a cualquier molécula que contrarreste o inhiba, disminuya o suprima la actividad biológica de su molécula diana. En algunas realizaciones, un agonista es un "superagonista" cuando induce o aumenta la actividad biológica de su molécula diana. En algunas realizaciones, un antagonista es un "superantagonista" cuando contrarresta o inhibe, disminuye o suprime la actividad biológica de su molécula diana. Los inhibidores, antagonistas y agonistas adecuados incluyen receptores solubles, inhibidores peptídicos, inhibidores de moléculas pequeñas, fusiones de ligandos y anticuerpos.
- 10 Como se utiliza en la presente memoria, el término "sal" se refiere a sales ácidas o básicas de los agentes usados en la presente memoria. Ejemplos ilustrativos pero no limitativos de sales aceptables son sales de ácidos minerales (ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y similares), sales de ácidos orgánicos (ácido acético, ácido propiónico, ácido glutámico, ácido cítrico y similares) y sales de amonio cuaternario (yoduro de metilo, yoduro de etilo y similares).
- 15 Como se utiliza en la presente memoria, un "antagonista" puede referirse a un anticuerpo o fragmento del mismo, péptidos, polipéptidos o fragmentos de los mismos, moléculas pequeñas y ácidos nucleicos inhibidores o fragmentos de los mismos que interfiere con la actividad o unión de otro, por ejemplo, compitiendo por uno o más sitios de unión de un agonista, pero no induce una respuesta activa.
- 20 Por "tipo salvaje" o "WT" se entiende el fenotipo de la forma típica de una especie tal y como se da en la naturaleza. Alternativamente, el tipo salvaje se conceptualiza como un producto del alelo estándar, "normal", en un locus, en contraste con el producido por un alelo no estándar, "mutante".
- 25 El término "administrar", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier modo de transferir, entregar, introducir o transportar un agente, por ejemplo, a un sujeto que necesita tratamiento para una enfermedad o afección. Tales modos incluyen, pero no se limitan a, la administración oral, tópica, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, intranasal y subcutánea.
- 30 Por "coadministrar" se entiende que una composición descrita en la presente memoria se administra al mismo tiempo, justo antes o justo después de la administración de terapias adicionales. El agente o la composición de la divulgación pueden administrarse solos o pueden coadministrarse al paciente. Por coadministración se entiende la administración simultánea o secuencial del compuesto individualmente o en combinación (más de un compuesto o agente). Los preparados también pueden combinarse, si se desea, con otras sustancias activas.
- 35 Como se utiliza en la presente memoria, "administración secuencial" incluye que la administración de dos agentes (por ejemplo, los agentes o composiciones descritos en la presente memoria) ocurren separadamente en el mismo día o no ocurren en un mismo día (por ejemplo, ocurren en días consecutivos).
- 40 Como se utiliza en la presente memoria, la "administración concurrente" incluye el solapamiento en la duración, al menos en parte. Por ejemplo, cuando dos agentes (por ejemplo, cualquiera de los agentes descritos en la presente memoria que tiene bioactividad) se administran simultáneamente, su administración se produce dentro de un cierto tiempo deseado. La administración de los agentes puede comenzar y terminar el mismo día. La administración de un agente también puede preceder en días a la administración de un segundo agente, siempre que ambos agentes se tomen el mismo día al menos una vez. Del mismo modo, la administración de un agente puede prolongarse más allá de la administración de un segundo agente siempre que ambos agentes se tomen el mismo día al menos una vez. No es necesario que los agentes bioactivos se tomen a la misma hora cada día para incluir la administración simultánea.
- 45 Como se utiliza en la presente memoria, la "administración intermitente incluye la administración de un agente durante un periodo de tiempo (que puede considerarse un "primer periodo de administración"), seguido de un tiempo durante el cual el agente no se toma o se toma a una dosis de mantenimiento más baja (que puede considerarse un "periodo de reposo") seguido de un periodo durante el cual el agente se administra de nuevo (que puede considerarse un "segundo periodo de administración"). Generalmente, durante la segunda fase de administración, el nivel de dosificación del agente coincidirá con el administrado durante el primer periodo de administración, pero puede aumentarse o disminuirse según sea médicamente necesario.
- 50 Como se utiliza en la presente memoria, una "alteración" también incluye un cambio de 2 veces o más en los niveles de expresión o actividad de un gen o polipéptido, por ejemplo, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más.
- 55 Como se define en la presente memoria, el término "inhibición", "inhibir", "que inhibe" y similares en referencia a una interacción proteína-inhibidor (por ejemplo, un inhibidor de ERK o PKC, o un inhibidor de PLC o IP3) significa afectar negativamente (por ejemplo, disminuir) la actividad o función de la proteína (por ejemplo, disminución de la actividad o cantidad de ERK o PKC, o PLC o IP3, disminución de la capacidad de ERK o PKC, o PLC o IP3 para unirse a un receptor, disminución de la capacidad de un receptor para unirse a ERK o PKC, o disminución de la señalización de ERK o PKC tras la unión de ERK o PKC, o PLC o IP3 a un receptor) en relación con la actividad o

función de la proteína en ausencia del inhibidor. En algunas realizaciones, la inhibición se refiere a la reducción de una enfermedad o de los síntomas de una enfermedad (por ejemplo, un trastorno del tejido conjuntivo). Del mismo modo, un "inhibidor" es un compuesto o proteína que inhibe una diana uniéndose, bloqueando parcial o totalmente, disminuyendo, impidiendo, retrasando, inactivando, desensibilizando o regulando a la baja la actividad.

5 Por "mejorar" se entiende disminuir, suprimir, atenuar, disminuir, detener o estabilizar el desarrollo o la progresión de una enfermedad tal como, por ejemplo, una reacción de tipo pseudoalérgico.

Por "amplificar" se entiende aumentar el número de copias de una molécula. En un ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza para amplificar ácidos nucleicos.

10 Por "unión" se entiende tener una afinidad fisicoquímica por una molécula. La unión se mide mediante cualquiera de los procedimientos de la divulgación, por ejemplo, un fármaco/compuesto con un receptor expresado en una célula.

15 En la presente divulgación, los términos "comprende", "que comprende", "que contiene", "que tiene" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la legislación sobre Patentes de los Estados Unidos y pueden significar "incluye", "incluyendo" y similares; los términos "que consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente en" también tienen el significado que se les atribuye en la legislación sobre Patentes de los Estados Unidos y estos términos son abiertos, permitiendo la presencia de más de lo que se recita siempre que las características básicas o novedosas de lo que se recita no cambien por la presencia de más de lo que se recita. Los términos "consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente en" también tienen el significado que se les atribuye en la legislación sobre Patentes de los Estados Unidos y estos términos son abiertos, permitiendo la presencia de más de lo que se recita siempre que las características básicas o novedosas de lo que se recita no cambien por la presencia de más de lo que se recita, pero excluye las realizaciones de la técnica anterior.

20 Por "cantidad eficaz" se entiende la cantidad necesaria para mejorar los síntomas de una enfermedad en relación con un paciente no tratado. La cantidad eficaz de compuesto(s) activo(s) utilizado(s) en la práctica de la presente invención para el tratamiento terapéutico de una enfermedad varía en función de la forma de administración, la edad, el peso corporal y el estado general de salud del sujeto. En última instancia, el médico o veterinario que le atiende decidirá la cantidad y la pauta de dosificación adecuadas. Tal cantidad se denomina cantidad "eficaz".

25 La dosificación y frecuencia (dosis única o múltiple) administrada a un mamífero puede variar dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo, si el mamífero padece otra enfermedad, y su vía de administración; tamaño, edad, sexo, salud, peso corporal, índice de masa corporal y dieta del receptor; naturaleza y extensión de los síntomas de la enfermedad que se va a tratar, tipo de tratamiento concurrente, complicaciones de la enfermedad que se va a tratar u otros problemas relacionados con la salud. Pueden utilizarse otros regímenes o agentes terapéuticos junto con los procedimientos y agentes de la presente divulgación. El ajuste y la manipulación de las dosificaciones establecidas (por ejemplo, la frecuencia y la duración) están al alcance de los expertos en la técnica.

35 Para cualquier agente descrito en la presente memoria, la cantidad terapéuticamente eficaz (por ejemplo, dosis eficaz o cantidad eficaz) puede determinarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Las concentraciones diana serán aquellas concentraciones de fármaco(s) terapéutico(s) que sean capaces de alcanzar los procedimientos descritos en la presente memoria, medidas mediante los procedimientos descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica.

40 Como es bien sabido en la técnica, las cantidades terapéuticamente eficaces para su uso en seres humanos también pueden determinarse a partir de modelos animales. Por ejemplo, una dosis para humanos puede formularse para alcanzar una concentración que haya resultado eficaz en animales. La dosificación en humanos puede ajustarse controlando la eficacia del agente y ajustando la dosificación al alza o a la baja, como se ha descrito anteriormente. El ajuste de la dosis para lograr la máxima eficacia en seres humanos basado en los procedimientos descritos anteriormente y otros procedimientos está dentro de las capacidades del artesano normalmente experto.

45 Las dosificaciones pueden variar en función de las necesidades del paciente y del fármaco terapéutico empleado. La dosis administrada a un paciente debe ser suficiente para producir una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente a lo largo del tiempo. El tamaño de la dosis también vendrá determinado por la existencia, la naturaleza y el alcance de cualquier efecto secundario adverso. La determinación de la dosificación adecuada para una situación concreta depende de la habilidad del profesional. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosificaciones menores que la dosis óptima del agente. En lo sucesivo, la dosificación se aumenta en pequeños incrementos hasta alcanzar el efecto óptimo según las circunstancias. Las cantidades y los intervalos de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles del agente administrado eficaces para la indicación clínica concreta que se esté tratando. Esto proporcionará un régimen terapéutico acorde con la gravedad del estado de la enfermedad del individuo.

55 La dosis eficaz del agente (por ejemplo, inhibidor farmacológico) de la presente divulgación para tratar el vEDS, tratar el síndrome de Marfan, y/o alterar la expresión o actividad de la ruta de señalización PLC/IP3/PKC/ERK puede ser desde aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 0,01 mg/kg del agente, desde

aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,1 mg/kg del agente, desde aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1,0 mg/kg del agente, desde aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 5,0 mg/kg del agente, desde aproximadamente 5,0 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg del agente, desde aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg del agente, desde aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg del agente, desde aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg del agente, desde aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg del agente, desde aproximadamente 30 mg/kg a aproximadamente 35 mg/kg del agente, desde aproximadamente 35 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg del agente, desde aproximadamente 40 mg/kg a aproximadamente 45 mg/kg del agente, desde aproximadamente 45 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg del agente, desde aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 55 mg/kg del agente, desde aproximadamente 55 mg/kg a aproximadamente 60 mg/kg del agente, desde aproximadamente 60 mg/kg a aproximadamente 65 mg/kg del agente, desde aproximadamente 65 mg/kg a aproximadamente 70 mg/kg del agente, desde aproximadamente 70 mg/kg a aproximadamente 75 mg/kg del agente, desde aproximadamente 75 mg/kg a aproximadamente 80 mg/kg del agente, desde aproximadamente 80 mg/kg a aproximadamente 85 mg/kg del agente, desde aproximadamente 85 mg/kg a aproximadamente 90 mg/kg del agente, desde aproximadamente 90 mg/kg a aproximadamente 95 mg/kg del agente, o desde aproximadamente 95 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg del agente.

En algunos aspectos, la presente divulgación incluye composiciones con una dosis eficaz de un(os) agente(s) de la presente divulgación en la que el agente puede ser desde aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 20 % p/v de la composición. Un porcentaje en peso de un componente, a menos que se indique específicamente lo contrario, se basa en el peso total de la formulación o composición en la que se incluye el componente.

Por ejemplo, la dosis eficaz de un agente divulgado en la presente memoria puede ser desde aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,01 %, desde aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 0,1 %, desde aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1,0 %, desde aproximadamente 1,0 % a aproximadamente 2,0 %, desde aproximadamente 2,0 % a aproximadamente 3,0 %, desde aproximadamente 3,0 % a aproximadamente 4,0 %, desde aproximadamente 4,0 % a aproximadamente 5,0 %, desde aproximadamente 5,0 % a aproximadamente 6,0 %, desde aproximadamente 6,0 % a aproximadamente 7,0 %, desde aproximadamente 7,0 % a aproximadamente 8,0 %, desde aproximadamente 8,0 % a aproximadamente 9,0 %, desde aproximadamente 9,0 % a aproximadamente 10 %, desde aproximadamente 10 % a aproximadamente 11 %, desde aproximadamente 11 % a aproximadamente 12 %, desde aproximadamente 12 % a aproximadamente 13 %, desde aproximadamente 13 % a aproximadamente 14 %, desde aproximadamente 14 % a aproximadamente 15 %, desde aproximadamente 15 % a aproximadamente 16 %, desde aproximadamente 16 % a aproximadamente 17 %, desde aproximadamente 17 % a aproximadamente 18 %, desde aproximadamente 18 % a aproximadamente 19 %, o desde aproximadamente 19 % a aproximadamente 20 % p/v de la composición.

Los términos "tratar" y "tratamiento", como se utilizan en la presente memoria, se refieren a la administración de un agente o formulación a un individuo clínicamente sintomático aquejado de una afección, trastorno o enfermedad adversos, con el fin de lograr una reducción de la gravedad y/o frecuencia de los síntomas, eliminar los síntomas y/o su causa subyacente, y/o facilitar la mejora o reparación del daño.

Los términos "sujeto", "paciente", "individuo" y similares utilizados en la presente memoria no pretenden ser limitativos y pueden intercambiarse de forma general. Una persona descrita como "sujeto", "paciente", "individuo" y similares no tiene necesariamente una enfermedad determinada, sino que puede estar simplemente buscando consejo médico. Los términos "sujeto", "paciente", "individuo" y similares utilizados en la presente memoria incluyen a todos los miembros del reino animal que puedan padecer el trastorno indicado. En algunos aspectos, el sujeto es un mamífero, y en algunos aspectos, el sujeto es un ser humano.

El término "muestra", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una muestra biológica obtenida con fines de evaluación *in vitro*. En algunas realizaciones, la muestra puede comprender un fluido corporal. En algunas realizaciones, el fluido corporal incluye, pero no se limita a, sangre total, plasma, suero, linfa, leche materna, saliva, mucosa, semen, extractos celulares, fluidos inflamatorios, líquido cefalorraquídeo, humor vítreo, lágrimas, vítreo, humor acuoso u orina obtenidos del sujeto. En algunos aspectos, la muestra es un panel compuesto de dos o más fluidos corporales. En aspectos ejemplares, la muestra comprende sangre o una fracción de la misma (por ejemplo, plasma, suero o una fracción obtenida mediante leucaféresis).

Los intervalos que se proporcionan en este documento se entienden como una abreviatura de todos los valores dentro del intervalo. Por ejemplo, se entiende que un intervalo de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números o subintervalo del grupo formado por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50, así como todos los valores decimales intermedios entre los números enteros antes mencionados tales como, por ejemplo, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 y 1,9. Con respecto a los subintervalos, se contemplan específicamente los "subintervalos anidados" que se extienden desde cualquier punto final del intervalo. Por ejemplo, un subintervalo anidado de un intervalo ejemplar de 1 a 50 puede comprender de 1 a 10, de 1 a 20, de 1 a 30 y de 1 a 40 en una dirección, o de 50 a 40, de 50 a 30, de 50 a 20 y de 50 a 10 en la otra dirección.

Por "recombinante" se entienden moléculas de ácido nucleico formadas por procedimientos de laboratorio de recombinación genética (tales como la clonación molecular) para reunir material genético de múltiples fuentes, creando secuencias que de otro modo no se encontrarían en los organismos biológicos.

5 La palabra "expresión" o "expresado", como se utiliza en la presente memoria en referencia a una secuencia de ácido nucleico de ADN (por ejemplo, un gen), significa el producto transcripcional y/o traslacional de esa secuencia. El nivel de expresión de una molécula de ADN en una célula puede determinarse en función de la cantidad de ARNm correspondiente presente en la célula o de la cantidad de proteína codificada por ese ADN producida por la célula (Sambrook et al., 1989 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 18.7-18.88). Cuando se utiliza en referencia a polipéptidos, la expresión incluye cualquier etapa implicada en la producción de un polipéptido, incluyendo, pero sin limitarse a, la transcripción, la modificación postranscripcional, la traducción, la modificación postraduccional y la secreción. La expresión puede detectarse mediante técnicas convencionales de detección de proteínas (por ejemplo, ELISA, Western blot, citometría de flujo, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, etc.).

Por "reduce" se entiende una alteración negativa de al menos el 10 %, el 25 %, el 50 %, el 75 % o el 100 %.

Por "referencia" se entiende una afección estándar o de control.

15 A menos que se indique específicamente o resulte obvio por el contexto, tal y como se utilizan en la presente memoria, los términos "un", "una" y "el" se entienden en singular o plural. A menos que se indique específicamente o resulte obvio por el contexto, como se utiliza en la presente memoria, el término "o" se entiende inclusivo.

20 A menos que se indique específicamente o resulte obvio por el contexto, como se utiliza en la presente memoria, el término "aproximadamente" se entiende dentro de un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Aproximadamente puede entenderse dentro del 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 % o 0,01 % del valor indicado. Salvo que el contexto indique claramente lo contrario, todos los valores numéricos aquí indicados se modifican con el término "aproximadamente"

25 Como se utiliza en la presente memoria, el término "derivado" se refiere a un compuesto que tiene una estructura derivada de la estructura de un compuesto original (por ejemplo, un compuesto divulgado en la presente memoria) y cuya estructura es suficientemente similar a los divulgados en la presente memoria y, basándose en esa similitud, un experto en la técnica esperaría que presentara las mismas o similares actividades y utilidades que los compuestos reivindicados, o que indujera, como precursor, las mismas o similares actividades y utilidades que los compuestos reivindicados. Los derivados ejemplares incluyen sales, ésteres, amidas, sales de ésteres o amidas y N-óxidos de un compuesto original.

30 Cada realización divulgada adjunto se contempla como siendo aplicable a cada una de las otras realizaciones divulgadas. Por tanto, todas las combinaciones de los diversos elementos de la invención descritos en este documento están dentro del alcance de la invención.

35 Otras características y ventajas de la invención se desprenderán de la siguiente descripción de las realizaciones preferidas de la misma, y de las reivindicaciones. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o prueba de la presente invención pueden utilizarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluidas las definiciones. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

40 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1A es un gráfico que demuestra que el modelo de ratón G209S/+ recapitulaba los fenotipos del síndrome de Ehlers-Danlos vascular (vEDS). Se muestra el porcentaje de supervivencia en función de la edad. La mediana de supervivencia fue de 400 días, $p < 0,0001$.

45 La figura 1B es un gráfico que demuestra que el modelo de ratón G938D/+ recapitulaba los fenotipos del vEDS. Se muestra el porcentaje de supervivencia en función de la edad. La mediana de supervivencia fue de 45 días, $p < 0,0001$.

50 La figura 1C es una imagen que muestra el corazón y la aorta de un ratón vEDS. La punta de flecha (lado izquierdo) indica la aorta ascendente y la flecha roja (lado derecho) indica el lugar de la disección aórtica en la aorta descendente.

La figura 1D es un gráfico que demuestra que las muestras vEDS se agruparon por separado de los controles, lo que indica una diferencia significativa en el transcriptoma de las aortas vEDS.

La figura 1E es una ilustración que muestra un análisis de red que indica que las aortas vEDS exhiben firmas de expresión génica para elevaciones en la actividad de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) (P38, JNK, AKT, ERK, ERK1/2).

5 La figura 1F es una tabla que ilustra que el análisis corriente arriba predijo que las diferencias transcripcionales en las aortas vEDS estaban impulsadas por la activación del receptor acoplado a proteína G (GPCR), que señalaba a través del eje PLC/IP3/PKC/ERK relacionado.

La figura 1G es un inmunoblot y un gráfico que demostró la firma de elevaciones en la señalización GPCR y MAPK por inmunotransferencia para marcadores de señalización activa a través de esta ruta. Se observó que la fosforilación de ERK1/2 y de PKC era significativamente mayor en las aortas vEDS.

10 La figura 2A es un gráfico que representa la supervivencia de los ratones tratados con cobimetinib, un inhibidor de MEK aprobado por la FDA. Se observó una supervivencia del 94 % tras 45 días de tratamiento, frente a una supervivencia de sólo el 55 % sin tratamiento.

15 La figura 2B es un gráfico que representa la supervivencia de ratones tratados con ruboxistaurina, un agente farmacológico bien tolerado administrado por vía oral que inhibe específicamente la PKC beta. Se observó una supervivencia del 100 % tras 39 días de tratamiento, frente a una supervivencia de sólo el 55 % sin tratamiento.

La figura 2C es un gráfico que representa la supervivencia de los ratones tratados con hidralazina, que bloquea el eje PLC/IP3/PKC/ERK. Se observó una protección del 98 % de supervivencia a los 45 días de edad, la mediana de supervivencia de un ratón vEDS no tratado.

20 La figura 3A es un gráfico que representa que en el modelo de ratón vEDS descrito en la presente memoria, la preñez y la lactancia se asocian con un 60 % de letalidad debido a la disección arterial en los primeros 30 días postparto en ratones vEDS.

25 La figura 3B es un gráfico que muestra que la prevención de la lactancia mediante la retirada de la cría tras el nacimiento pudo evitar la disección y la muerte en ratones vEDS, observándose una supervivencia del 100 %.

La figura 3C es un gráfico que muestra que se consiguió una supervivencia casi completa (95 %) con el tratamiento con hidralazina (16 mg/kg/día), que bloquea el eje PLC/IP3/PKC/ERK activado por la oxitocina.

30 La figura 3D es un gráfico que muestra que se observó protección (supervivencia del 95 %) con el tratamiento con trametinib (GSK-1120212) a 1 mg/kg/día, un inhibidor de MEK, la cinasa que activa ERK, aprobado por la FDA.

La figura 3E es un gráfico de barras que muestra que un mayor riesgo de muerte se correlacionó con un aumento de la activación de ERK, mientras que la protección frente a la disección aórtica se correlacionó con una disminución de la activación de ERK, medida mediante inmunotransferencia.

35 La figura 3F es un gráfico de barras que muestra que un mayor riesgo de muerte se correlacionó con un aumento de la activación de ERK, mientras que la protección frente a la disección aórtica se correlacionó con una disminución de la activación de ERK, medida por la expresión de genes diana de ERK.

40 La figura 4A es una imagen de un inmunoblot que indica que la inhibición farmacológica de PKC β impidió la autofosforilación de PKC, así como la fosforilación de ERK en la pared aórtica, según lo evaluado por inmunoblot de lisados aórticos e indica que esa inhibición farmacológica de MEK se correlacionó con la reducción esperada en la fosforilación de ERK, el sustrato corriente abajo de MEK, pero también, curiosamente, redujo la fosforilación de PKC, lo que sugiere la presencia de un bucle de retroalimentación positiva.

45 Las figuras 4B y 4C son gráficos que muestran la cuantificación de la imagen de inmunotransferencia que muestra que la inhibición farmacológica de PKC β impidió la autofosforilación de PKC, así como la fosforilación de ERK en la pared aórtica y la inhibición farmacológica de MEK se correlacionó con la reducción esperada en la fosforilación de ERK, el sustrato corriente abajo de MEK, pero también, curiosamente, redujo la fosforilación de PKC, lo que sugiere la presencia de un bucle de retroalimentación positiva (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001). Ni el cobimetinib ni la ruboxistaurina tuvieron efecto sobre la presión arterial.

50 Las figuras 5A y 5B son gráficos que muestran que los ratones con hidralazina (32 mg/kg/día), que bloquea el eje PLC/IP3/PKC/ERK, proporcionan una protección notable: 98 % de supervivencia a los 45 días de edad, la mediana de supervivencia para un ratón vEDS no tratado y que la supervivencia se veía afectada en la pubertad, y el riesgo se observaba casi exclusivamente en ratones macho (Figura 5A ratones macho y Figura 5B ratones hembra).

La figura 6 es un gráfico que muestra que la combinación de hidralazina (32 mg/kg/día) con bicalutamida (50 mg/kg/día) condujo a una supervivencia del 90 % en ratones macho, frente a una supervivencia de sólo el 24 % en ratones macho tratados únicamente con hidralazina. Los ratones macho siguieron sobreviviendo tras la retirada de la bicalutamida después de la pubertad, lo que sugiere que existe una dependencia temporal de la sensibilidad a los andrógenos en este modelo de ratón.

La figura 7 es un gráfico que representa que los ratones macho tratados únicamente con bicalutamida conducen a una supervivencia intermedia del ~80 % y los machos no siguieron sobreviviendo tras la eliminación de la bicalutamida después de la pubertad, lo que sugiere que la inhibición de la señalización androgénica por sí sola no fue suficiente para prevenir la enfermedad aórtica en estos modelos de ratón de vEDS.

Las figuras 8A y 8B son gráficos que muestran que los ratones tratados con espirolactona sola (100 mg/kg/día) mostraron una supervivencia intermedia del ~80 %, similar a la de la bicalutamida sola; sin embargo, la combinación de espirolactona (100 mg/kg/día) e hidralazina (32 mg/kg/día) condujo a una supervivencia del 100 % tras 50 días de tratamiento, similar a la de la combinación de hidralazina y bicalutamida.

La figura 9 es un gráfico que muestra que los ratones tratados con dosis más altas de hidralazina tenían una dosis mayor de hidralazina (50 mg/kg/d) y su supervivencia no mejoró más de lo que lo hizo la dosis de 32 mg/kg/d.

La figura 10A es un gráfico que representa que la adición de un antagonista específico del receptor de oxitocina 2 al tratamiento de ratones conduce a una supervivencia del 95 % en los primeros 30 días posparto en ratones vEDS que aún están lactando, lo que demuestra que el riesgo significativamente elevado de muerte por disección aórtica con la preñez se debe específicamente a la activación del receptor de oxitocina durante la lactancia.

La figura 10B es un gráfico que muestra que el propranolol, un antagonista β no específico que disminuye la presión arterial en ratones vEDS no mejora la supervivencia en los primeros 30 días postparto en ratones vEDS que todavía están lactando, lo que demostró que el riesgo significativamente elevado de muerte por disección aórtica con la preñez no se mejora disminuyendo la presión arterial.

La figura 11A es un gráfico que indica que la inhibición de la señalización de la angiotensina-II mediante el tratamiento de los ratones con un antagonista de los receptores de angiotensina, losartán (60 mg/kg/d) no mostró ningún impacto en la supervivencia (Figura 11A). El tratamiento de los ratones con un antagonista de los receptores de trombina, vorapaxar (1 mg/kg/d) demostró que tampoco tenía ningún impacto en la supervivencia (Figura 11B).

La figura 12 es un gráfico que muestra que el tratamiento de los ratones con un antagonista inespecífico del receptor tirosina cinasa, nintedanib (50 mg/kg/d) no tuvo impacto en la supervivencia, lo que sugiere que la activación del receptor tirosina cinasa no estaba impulsando la activación de la ruta de señalización PLC/IP3/PKC/ERK en los ratones vEDS.

La figura 13A-13C son gráficos que representan el tratamiento de ratones con un antagonista β no específico, propranolol (80 mg/kg/d) (Figura 13A), un antagonista β_1 específico, atenolol (120 mg/kg/d) (Figura 13B), y un agonista β_1 antagonista/02, celiprolol (200 mg/kg/d) (Figura 13C) mostraron que ninguna de estas manipulaciones conducen a una mejora en la supervivencia en nuestros modelos de ratón vEDS, a pesar de las disminuciones en la presión arterial.

La figura 14 es un gráfico que representa el celiprolol, que acelera el riesgo de disección aórtica en los modelos de ratón, y la mutación vEDS con la mutación Col3a1^{G209S/+}, que también demostró un mayor riesgo de disección aórtica con celiprolol.

La figura 15 es un gráfico que muestra que el amlodipino (12 mg/kg/d) también aumentó el riesgo de disección aórtica en el modelo de ratón, y se ha demostrado que esto también es consistente con los ratones MFS.

La figura 16A es un gráfico que demuestra la inhibición farmacológica de PKC β utilizando un segundo inhibidor específico de PKC β , la enzastaurina. Figura 16A: La enzastaurina (60 mg/kg/d) también redujo el riesgo de muerte por disección aórtica: el 80 % de los ratones vEDS tratados con enzastaurina sobrevivieron tras 40 días de tratamiento, frente a sólo el 50 % de los ratones vEDS no tratados ($p=0,0305$).

La figura 16B es un gráfico que demuestra que el tratamiento de los ratones con un antagonista del receptor de la endotelina, el bosentán, mejoró la supervivencia. Figura 16B: El tratamiento con bosentán condujo a una supervivencia del 80 % tras 40 días de tratamiento, frente a una supervivencia de sólo el 50 % en los ratones vEDS no tratados ($p=0,0298$).

La figura 17 es una tinción inmunofluorescente que demuestra que la ruta de señalización está elevada en muestras de tejido vascular de pacientes humanos con vEDS. La figura 17 muestra la fosforilación de PKC en dos muestras de tejido (arteria ilíaca y aorta torácica descendente) de pacientes con vEDS.

5 La figura 18 es una tinción inmunofluorescente que demuestra que la ruta de señalización está elevada en muestras de tejido vascular de pacientes humanos con vEDS. La figura 18 muestra la fosforilación de ERK1/2 en dos muestras de tejido (arteria ilíaca y aorta torácica descendente) de pacientes con vEDS.

La figura 19 es un gráfico que demuestra que el tratamiento con ruboxistaurina reduce el crecimiento de la raíz aórtica en ratones 129 MFS.

Descripción detallada

10 La invención se basa, al menos en parte, en la identificación de una nueva anomalía de señalización que contribuye a la patogénesis del vEDS. En particular, se observó que los agentes farmacológicos que inhiben la activación de ERK1/2 o la activación de PKC fueron capaces de prevenir con éxito la muerte debida a la disección aórtica. Por otra parte, los agentes que inhiben la activación de la ruta de señalización PLC/IP3/PKC/ERK también previenen la muerte por disección aórtica. En conjunto, estos hallazgos novedosos proporcionan la primera
15 evidencia de una anomalía de señalización abordable que contribuye a la patogénesis del vEDS y de otras posibles vasculopatías, así como de otros trastornos del tejido conectivo.

Vasculopatía

20 Vasculopatía es un término utilizado para describir una enfermedad que afecta a los vasos sanguíneos. A menudo incluye anomalías vasculares causadas por afecciones degenerativas, metabólicas e inflamatorias, enfermedades embólicas, trastornos de la coagulación y trastornos funcionales tales como el síndrome de encefalopatía posterior reversible. La etiología de la vasculopatía suele ser desconocida y, con frecuencia, la enfermedad no se demuestra patológicamente. La vasculitis, por su parte, es un término más específico y se define como la inflamación de la pared de un vaso sanguíneo.

25 Como se utiliza en la presente memoria, "vasculitis (angiitis o angitis)" se refiere a la inflamación de un vaso sanguíneo, por ejemplo, arteritis, flebitis, o vaso linfático, por ejemplo, linfangitis. La vasculitis puede adoptar diversas formas, como vasculitis cutánea, vasculitis urticarial, vasculitis leucocitoclástica, vasculitis livedo y vasculitis nodular. La vasculitis de vasos pequeños puede referirse a la inflamación de vasos sanguíneos o linfáticos de tamaño pequeño o mediano, por ejemplo, capilares, vénulas, arteriolas y arterias.

Síndrome de Ehlers-Danlos vascular (vEDS)

30 El síndrome de Ehlers-Danlos vascular (vEDS) es un trastorno hereditario del tejido conectivo causado por mutaciones heterocigotas en el gen de la cadena alfa 1 del colágeno tipo III (*COL3A1*). La principal causa de mortalidad en el SVED es la disección y/o rotura arterial, pero se sabe poco sobre la patogenia de esta enfermedad. No existen estrategias de tratamiento eficaces para esta enfermedad devastadora. La creencia actual es que las cantidades reducidas de colágeno III conducen directamente a los signos y síntomas del vEDS debido a una
35 pérdida inherente de la integridad estructural de los tejidos. Sin embargo, los primeros modelos patogénicos del síndrome de Marfan (MFS) también invocaban singularmente la debilidad tisular impuesta por una elastogénesis fallida, pero trabajos posteriores demostraron claramente un aumento de la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) en un modelo de ratón deficiente en fibrilina-1, el producto génico deficiente en el MFS^{3,4}. Los trabajos de seguimiento demostraron que el TGF- β y las moléculas de señalización celular corriente
40 abajo eran los principales mediadores de la patología de la enfermedad. Además, las terapias que atenúan la señalización del TGF- β y las rutas relacionadas, como el anticuerpo neutralizante del TGF- β (Nab), el bloqueante de los receptores de angiotensina-II (Ang-II) tipo 1 (ARB) losartán, o el inhibidor de la activación de ERK1/2 RDEA119/trametinib, pueden suprimir la enfermedad aórtica en ratones con MFS³⁻⁶.

45 Sin embargo, de forma similar a otras vasculopatías hereditarias como el síndrome de Marfan y el síndrome de Loeys-Dietz, en la presente memoria se proporcionan anomalías de señalización que son mediadores principales de la patología de la enfermedad en el vEDS. Los perfiles de ARN-seq en las aortas de ratones con mutaciones *Co/3a1* derivadas de pacientes demostraron una señalización PLC/IP3/PKC/ERK elevada en comparación con las aortas de tipo salvaje. La inmunotransferencia de la aorta torácica descendente proximal confirmó la elevada activación de PKC y ERK1/2.

50 En determinadas realizaciones, COL3A1 comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (No de acceso NCBI: AAH28178.1 (SEQ ID NO: 1)):

ES 2 973 130 T3

```

1 mmsfvqkqsw lllallhpti ilaqqeaveg gcshlgqsy a drdvwkpepc qicvcdsgsv
61 lcddiicddq eldcpnpeip fgeccavcpq pptaptrppn gqgpqgpkgd ppppgipgrn
121 gdpqipgqpg spgspgppgi cescptgpqn yspqydsydv ksgvavvgla gypgpagppg
181 ppppgtsg h pgspspgyq gppgepgqag psgppppga igpsgpagkd gesgrpgrpg
241 erglpqppgi kgpagipgfp gmkghrgfdg rngekgetga pglkgenglp gengapgpmg
301 prgapgergr pglpgaagar gndgargsdg qpppppppgt agfpgspgak gevvpagspg
361 sngapqqrge pppqghagaq gpppppping spggkgemgp agipgapglm gargppgpag
421 angapglrgg agepgkngak gepgprgerg eagipgvpga kgedgkdgsp gepganglp
481 aagergapgf rpgagpnpip gekgpagerg apgpagprga agepgrdgvp gppgmrgmpg
541 spggpqsdk ppppsqges grpppppsg prgpqgvmgf pppkngdgap gkngergppg
601 gpppqpqppg ngetgpqppp gptgpqgdkg dtgppppqgl qglpgtgppp gengkpgepg
661 pkgdagapga pggkgdagap gergppglag apglrggagp pppeggkga gpppppaa
721 tpqlqmpge rgglgspgpk gdkgeppgpg adgvpgkdgp rgptgpigpp gpagqpdkg
781 eggapglpgi agprgspger getgppgpag fpgapqng e pggkgergap gekgeggppg
841 vagppgkdt sghppigpp gprgnrgerg segspghpgq pppppppgap gpccggvga
901 aiagiggeka ggfapyygde pmdfkintde imtslksvng qieslispdg srknparncr
961 dlkfchpelk sgeywvdpnq gckldaikvf cnmetgetci sanplnvprk hwwtdssaek

1021 khvwfgesmd ggfqfsygnp elpedvldvq laflrllssr asqnityhck nsiaymdqs
1081 gnvkkalklm gsnegefkae gnskftytlv edgctkhtge wsktvfeyrt rkavrlpivd
1141 iapydigppd qefgvdvppv cfl

```

En determinadas realizaciones, COL3A1 comprende la siguiente secuencia de ácido nucleico, los codones de inicio y parada están en **negrita** y subrayados (No de acceso NCBI: NM_000090.3 (SEQ ID NO: 2)):

ES 2 973 130 T3

1 ggctgagttt tatgacgggc ccggtgctga agggcagggg acaacttgat ggtgctactt
 61 tgaactgctt ttcttttctc ctttttgcaac aaagagtctc atgtctgata tttagacatg
 121 atgagctttg tgcaaaaagg gagctggcta cttctcgcctc tgcttcaccc cactattatt
 181 ttggcacaac aggaagctgt tgaaggagga tgttcccatc ttggctcagtc ctatgcggat
 241 agagatgtct ggaagccaga accatgccaa atatgtgtct gtgactcagg atccgttctc
 301 tgcgatgaca taatatgtga cgatcaagaa ttgactgccc ccaaccocaga aattccattt
 361 ggagaatggt gtgcagtttg ccacagcctc ccaactgctc ctactcgcctc tctaatggt
 421 caaggacctc aaggccccaa gggagatcca ggcctcctc gtattcctgg gagaaatggt
 481 gaccctggta ttccaggaca accagggctc cctggttctc ctggccccc tggaaatctgt
 541 gaatcatgcc ctactggctc tcagaactat tctcccagc atgattcata tgatgtcaag
 601 tctggagtag cagtaggagg actcgcaggc tctcctggac cagctggccc ccagggcct
 661 cccggtcccc ctggtacatc tggctcctc ggttcccctg gatctccagg ataccaagga
 721 cccctgggtg aacctgggca agctggctct tcaggccctc caggacctcc tgggtctata
 781 ggtccatctg gtctcgtctg aaaagatgga gaatcaggta gaccocggag acctggagag
 841 cgaggattgc ctggacctcc aggtatcaaa ggtccagctg ggatacctgg attcctggt
 901 atgaaaggac acagaggctt cgatygacga aatggagaaa agggtgaaac aggtgctcct
 961 ggattaaagg gtgaaaatgg tcttccaggc gaaaaatggag ctctggacc catgggtcca
 1021 agaggggctc ctggtgagcg aggacggcca ggacttctc gggctgcagg tgctcgggt
 1081 aatgacggtg ctcgaggcag tgatggtcaa ccagggcctc ctggctctcc tggaaactgcc
 1141 ggattcctcgt gatcccctgg tgctaagggt gaagtggac ctgcagggtc tctcgttca
 1201 aatgggtgccc ctggacaaaag aggagaacct ggacctcagg gacacgctgg tgctcaaggt
 1261 cctcctggcc ctctcgggat taatggtagt cctgggtgga aaggcgaat gggctcccgt
 1321 ggcatctctg gagctcctgg actgatggga gcccggggtc ctccaggacc agccgggtgct
 1381 aatgggtgctc ctggactgcg aggtgggtgca ggtgagcctg gtaagaatgg tgccaaagga
 1441 gagcccgagc cacgtggtga acgcggtgag gctgglattc caggtgttcc aggagctaaa
 1501 ggcgaaagatg gcaaggatgg atcacctgga gaacctgggt caaatgggtc tccaggagct
 1561 gcaggagaaa ggggtgcccc tgggttccga ggaacctgct gaccaaatgg catccagga
 1621 gaaaagggtc ctgctggaga gcgtgggtgct ccaggccctg cagggcccag aggagctgct
 1681 ggagaacctg gcagagatgg cgtcccctgga ggtccaggaa tgaggggcat gcccggaagt
 1741 ccaggaggac caggaagtga tgggaaacca gggcctcccg gaagtcagg agaaagtggt
 1801 cgaccaggtc ctctcgggcc atctggctcc cgaggtcagc ctgggtgtcat gggcttcccc
 1861 ggtcctaaaag gaaatgatgg tgctcctggt aagaaatggag aacgaggtgg cctcggagga
 1921 cctggccctc agggctctcc tggaaagaat ggtgaaactg gacctcaggg acccccaggg
 1981 cctactgggc ctggtggtga caaaggagac acaggacccc ctggctccca aggattacaa
 2041 ggcttgccctg gtacagggtgg tctccagga gaaaaatgga aacctgggga accaggtcca
 2101 aagggatgat ccggtgcacc tggagctcca ggaggcaagg gtgatgctgg tgcccctggt
 2161 gaacgtggac ctctcggatt ggcaggggcc ccaggactta gaggtggagc tggctcccct
 2221 ggtcccgaag gaggaaaggg tgctgctggt cctcctgggc caectggtgc tgctggtact
 2281 cctggtctgc aaggaatgcc tggagaaaga ggaggtcttg gaagtcctgg tccaaagggt
 2341 gacaaggggtg aaccaggcgg tccaggtgct gatggtgtcc cagggaaaga tggcccaagg
 2401 ggtcctactg gtccatttgg tctcctcggc ccagctggcc agcctggaga taaggggtgaa
 2461 ggtggtgccc ccggacttcc aggtatagct ggacctcgtg gtagccctgg tgagagaggt
 2521 gaaactggcc ctccaggacc tgctggtttc cctgggtgctc ctggacagaa tgggtgaacct
 2581 ggtggtaaaag gagaagaggg ggtccgggt gagaaagggt aaggaggccc tctcggagtt
 2641 gcaggacccc ctggaggttc tggacctgct ggtcctcctg gtcccaagg tgctaaaggt

2701 gaacgtggca gtcttgggtg accctgggtg gctggcttcc ctgggtgctcg tggcttctct
 2761 ggtcctcctg gttagtaatgg taaccacagga cccccaggto ccagcgggttc tccaggcaag
 2821 gatgggcccc caggctcctgc gggtaacact ggtgctcctg gcagccctgg agtgctctgga
 2881 ccaaaagggtg atgctggcca accaggagag aagggatcgc ctgggtgccc gggcccacca
 2941 ggagctccag gccacttgg gattgctggg atcactggag cacggggctct tgcaggacca
 3001 ccaggcatgc caggctcctag ggaagccct ggccctcagg gtgtcaaggg tgaagtggg
 3061 aaaccaggag ctaacggctc cagtggagaa cgtggctccc ctggaccca gggcttctct
 3121 ggtctggctg gtacagctgg tgaacctgga agagatggaa accctggatc agatggctct
 3181 ccaggccgag atggatctcc tgggtggcaag ggtgatcgtg gtgaaaatgg ctctcctggg
 3241 gccctggcg ctctgggtca tccaggcca cctggctcctg tgggtccagc tggaaagagt
 3301 ggtgacagag gagaaagtgg cctgctggc cctgctggg ctcccggctc tgcctggctc
 3361 cgagggtgct ctggctcctc aggccacgt ggtgacaaag gtgaaacagg tgaacgtgga
 3421 gctgctggca tcaaaggaca tccaggatc cctggtaatc cagggtgccc aggtctctca
 3481 ggccctgctg gtcagcaggg tgaatcggc agtccaggac ctgcaggccc cagaggacct
 3541 gttggaccca gtggacctcc tggcaaatg ggaaccagtg gacatccagg tccattgga
 3601 ccaccagggc ctgcaggtaa cagaggtgaa agaggatctg agggctccc aggccacca
 3661 gggcaaccag gccctcctgg acctcctggg gccctggctc ctgctgctgg tgggtgtgga
 3721 gccgctgcca ttgctgggat tggaggtgaa aaagctggcg gttttgccc gtattatgga
 3781 gatgaaccaa tggatttcaa aatcaacacc gatgagatta tgacttcaact caagtctggt
 3841 aatggacaaa tagaaagcct cattagctct gatggttctc gtaaaaacc ccgtagaac
 3901 tgcagagacc tgaattctg ccatcctgaa ctcaagagtg gagaatactg ggttgacct
 3961 aaccaaggat gcaaatgga tgcctatcaag gtattctgta atatggaaac tggggaaaca
 4021 tgcataagtg ccaatccttt gaatgttcca cggaaacact ggtggacaga ttctagtgt
 4081 gagaagaaac acgtttggtt tggagagtcc atggatggg gttttcagtt tagctacggc
 4141 aatcctgaac ttcctgaaga tgccttgat gtcagctgg cattcctctg acttctctcc
 4201 agccgagctt cccagaacat cacatatcac tgcataaata gcattgcata catggatcag
 4261 gccagtggaa atgtaaagaa ggcctgaag ctgatgggg caaatgaagg tgaattcaag
 4321 gctgaaggaa atagcaaat cactacaca gttctggagg atggttgac gaaacacact
 4381 ggggaatgga gcaaacagt ctttgaatat cgaacacgca aggctgtgag actacctatt
 4441 gtagatattg caccctatga cattgggtgg cctgatcaag aatttgggtg ggacgttggc
 4501 cctgtttgct ttttataaac caactctat ctgaaatccc acaaaaaaaaa atttaactcc
 4561 atatgtgttc ctcttgttct aatcttgtca accagtgcaa gtgacogaca aaattccagt
 4621 tttttatttc caaatgttt ggaaacagta taatttgaca aagaaaatg atacttctct
 4681 ttttttgctg ttcaccaaa tacaattcaa atgctttttg ttttattttt ttaccaatc
 4741 caatttcaaa atgtctcaat ggtgctataa taaataaact tcaacactct ttatgataac
 4801 aacactgtgt tatattcttt gaatcctagc ccatctgcag agcaatgact gtgctacca
 4861 gtaaaagata acctttcttt ctgaaatagt caaatacga attagaaaag cctcctctat
 4921 ttttaactacc tcaactggtc agaaacacag attgtattct atgagtcaca gaagatgaa
 4981 aaaattttat acgttgataa aacttataaa tttcattgat taatctctg gaagattgg
 5041 ttaaaaagaa aagtgtaatg caagaattta aagaaatatt tttaaagcca caattatttt
 5101 aatattggat atcaactgct tglaaagggtg ctctcttttt ttcttgtcat tgcctggctaa
 5161 gattactaat atttgggaag gctttaaaga cgcattgtat ggtgctaatg tactttcact
 5221 tttaaactct agatcagaat tgttgacttg cattcagaac ataaatgcac aaaatctgta
 5281 catgtctccc atcagaaaga ttcattggca tgcacagggt gattctctct cttcatcctg
 5341 taaaggtaaa caataaaaac caaattatgg ggctgctttt gtcacactag catagagaat
 5401 gtgttgaaat ttaactttgt aagcttgtat gttggtgttg atcttttttt tctttacaga
 5461 caccataat aaaatatcat attaaaatc

Ruta MAP/ERK

La ruta MAPK/ERK (también conocida como ruta Ras-Raf-MEK-ERK) es una cadena de proteínas en la célula que comunica una señal desde un receptor en la superficie de la célula hasta el ADN en el núcleo de la célula.

- 5 La señal comienza cuando una molécula señalizadora se une al receptor en la superficie celular y termina cuando el ADN en el núcleo expresa una proteína y produce algún cambio en la célula, tal como la división celular. La ruta incluye muchas proteínas, entre ellas las MAPK (proteínas cinasa activadas por mitógenos, originalmente llamadas ERK, cinasa reguladas por señales extracelulares), que se comunican agregando grupos fosfato a una proteína vecina, lo que actúa como un interruptor de "encendido" o "apagado".

ES 2 973 130 T3

El término "ERK" se refiere a cualquier gen o proteína humana ERK1 o ERK2. La ERK1 se conoce con varios nombres, incluyendo, por ejemplo, proteína cinasa 3 activada por mitógenos, cinasa 1 regulada por señales extracelulares, cinasa MAP2 estimulada por insulina, MAP cinasa 1, MAPK 1, p44-ERK1, ERT2, p44-MAPK o proteína cinasa 2 asociada a microtúbulos.

- 5 ERK2 se conoce por varios nombres, incluyendo, por ejemplo, proteína cinasa activada por mitógenos 1, cinasa regulada por señales extracelulares 2, proteína cinasa activada por mitógenos 2, MAP cinasa 2, MAPK 2, p42-MAPK o ERT1.

En determinadas realizaciones, ERK1 comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (No de acceso NCBI: P27361.4 (SEQ ID NO: 3)):

```

1  MAAAAAQQGGG  GGEPRRTEGV  GPGVPGEVEM  VKGQPFDVGP  RYTQLQYIGE  GAYGMVSSAY
61  DHVRKTRVAI  KKISPFHQY  YCQRTLREIQ  ILLRFRHENV  IGIRDILRAS  TLEAMRDVYI
121 VQDLMETDLY  KLLKSQQLSN  DHICYFLYQI  LRGLKYIHS  NVLHRDLKPS  NLLINTTCDL
181 KICDFGLARI  ADPEHDHTGF  LTEYVATRWY  RAPEIMLNSK  GYTKSIDIWS  VGCILAEMLS
241 NRPIFFGKHY  LDQLNHILGI  LGSPSQEDLN  CIINMKARNY  LQSLPSKTRV  AWAKLFPKSD
301 SKALDLLDRM  LTFNPNKRIT  VEEALAHPLY  EQYYDPTDEP  VAEFPFTFAM  ELDDLPERL
10 361 KELIFQETAR  FQPGVLEAP

```

En determinadas realizaciones, la ERK1 comprende la siguiente secuencia de nucleótidos, la región codificante está en **negrita** y subrayada (No de acceso NCBI: X60188.1 (SEQ ID NO: 4)):

```

1  cgttcctcgg  cgcgcgcggg  gcccagagg  gcagcggcag  caacagcagc  agcagcagca
61  gcgggagtg  agatggcggc  ggcgcgcgct  caggggggcg  ggggcgggga  gcccgcgtaga
121 accgaggggg  tcggccccgg  ggtccccggg  gaggtggaga  tgggtgaagg  gcagccggtc
181 gacgtgggcc  cgcgctacac  gcagttgcag  tacatcggcg  agggcgcgta  cggcatggtc
241 agctcggcct  atgaccacgt  gcgcaagact  cgcgtggcca  tcaagaagat  cagccccctc
301 gaacatcaga  cctactgcca  gcgcacgctc  cgggagatcc  agatcctgct  gcgcttcggc
361 catgagaatg  tcatcggcat  ccgagacatt  ctgcggcgct  ccaccctgga  agccatgaga
421 gatgtctaca  ttgtgcagga  cctgatggag  actgacctgt  acaagttgct  gaaaagccag
481 cagctgagca  atgaccatat  ctgctacttc  ctctaccaga  tctcggggg  cctcaagtac
541 atccactcgg  ccaacgtgct  ccaccgagat  ctaaagccct  ccaaccctgct  cagcaaaccc
601 acctgcgacc  ttaagatttg  tgatttcggc  ctggccccga  ttgcgatcc  tgagcatgac
661 cacaccggct  tctgacgga  gtatgtggct  acgcgctggt  accgggcccc  agagatcatg
721 ctgaactcca  agggctatac  caagtccatc  gacatctggt  ctgtgggctg  cattctggct
781 gagatgctct  ctaaccggcc  catcttccct  ggcaagcact  acctggatca  gctcaaccac
841 attctgggca  tcttgggctc  cccatcccag  gaggacctga  attgtatcat  caacatgaag

901 gcccgaact  acctacagtc  tctgcctctc  aagaccaagg  tggttgggc  caagcttttc
961 cccaagtccg  actccaaagc  ccttgacctg  ctggaccgga  tgttaacct  taaccoccat
1021 aaacgatca  cagtggagga  agcgtggt  caccctacc  tggagcagta  ctatgacctg
1081 acgatgagc  cagtggcga  ggagccttc  acctcgcca  tggagctgga  tgacctacct
1141 aaggagcggc  tgaaggagct  catcttcag  gagacagcac  gcttcagcc  cggagtgtg
1201 gaggccccct agccccagaca  gacatctctg  caccctggg  cctggacctg  cctcctgct
1261 gcccctctcc  cgcagactg  ttagaaaatg  gacctgtgc  ccagccccga  ccttggcagc
1321 ccaggccggg  gtggagcatg  ggcttgcca  cctctctct  ttgtgaggg  ctccagcttc
1381 aggcaggcca  aggccttctc  ctccccacc  gccctccca  cggggcctcg  ggagctcagg
1441 tggccccagt  tcaatctccc  gctgctgctg  ctgctgccc  cttaacctcc  ccagcgtccc
1501 agtctctggc  agttctgga  tggaaagggt  ctggctgccc  caacctgctg  aagggcagag
1561 gtggagggtg  gggggcgctg  agtagggact  cagggccatg  cctgcccccc  tcatctcatt
1621 caaacccccc  cctagtttcc  ctgaaggaac  attccttagt  ctcaagggct  agcatccctg
1681 aggagccagg  cggggccgaa  tccccctcc  gtcaaagctg  tcaactcggc  tgccccctg
1741 gcttctgtgt  gtggtgagca  gaagtggagc  tggggggcgt  ggagagccc  gcgccccctg
1801 cacctccctg  accgctctaa  tatataaata  tagagatgtg  tctatggctg  aaaaaaaaaa
1861 aaaaaa

```

- 15 En determinadas realizaciones, ERK2 comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (No de acceso NCBI: P28482.3 (SEQ ID NO: 5)):

```

1 MAAAAAAGAG PEMVRGQVFD VGPRYTNSLY IGEGAYGMVC SAYDNVNKVR VAIKKISPFE
61 HQTYCQRTL R EIKILLRFRH ENIIIGINDII RAPTIEQMKD VYIVQDLMET DLYKLLKTOH
121 LSNHDICYFL YQILRGLKYI HSANVLHRDL KPSNLLLNTT CDLKICDFGL ARVADPDHHD
181 TGFLTEYVAT RWYRAPEIML NSKGYTKSID IWSVGCILAE MLSNRPIFFG KHYLDQLNHI
241 LGILGSPSQE DLNCIINLKA RNYLLSLPHK NKVPWNRLFP NADSKALDLL DKMLTFNPHK
301 RIEVEQALAH PYLEQYYDPS DEPIAEAPFK FDMELDDLPK EKLKELIFEE TARFQPGYRS
    
```

En determinadas realizaciones, la ERK2 comprende la siguiente secuencia de nucleótidos, la secuencia codificante está en negrita y subrayada (No de acceso NCBI: NM_138957.3 (SEQ ID NO: 6)):

```

1 gcccctccct ccgcccgcgc gccggccgc ccgtcagctt ggcaggcagg caggcaatcg
61 gtcagagtgg ctgtcggctc ttcagctctc ccgctcggcg tcttccttcc tctcccgggt
121 cagcgtcggc ggtgcaccg gcggcggcgc agtccctgcg ggagggggca caagagctga
181 gcggcggcgc ccgagcgtcg agctcagcgc ggcggagggc gcggcggccc ggcagccaac
241 atggcggcgc cggcggcggc gggcggcggc ccggagatgg tccgcgggca ggtgttcgac
301 gtcggggcgc gctacaccaa cctctcgtac atcggcagg gcgctcagg catggtctgc
361 tctgcttatg ataatgtcaa caaagttcga gtacgtatca agaaaatcag cccctttgag
421 caccagacct actgcagag aacctgagg gagataaaaa tcttactgcg cttcagacat
481 gagaacatca ttggaatcaa tgacattatt cagcaccaca ccatcgagca aatgaaagat
541 gtatatatag tacaggacct catggaaca gatctttaca agctcttgaa gacacaacac
601 ctcagcaatg accatattctg ctatcttctc taccagatcc tcagaggggt aaaatatatc
661 cattcagcta acgttcttgc ccgtgacctc aagccttcca acctgctgct caacaccacc
721 tgtgatctca agatctgtga ctttggcctg gcccggtgtg cagatccaga ccatgatcac
781 acaggggttc tgacagaata tgtggccaca cgttgggtaca gggctccaga aattatggtg
841 aattccaagg gctacaccaa gtccattgat atttgggtctg taggctgat tctggcagaa
901 atgctttcta acaggcccat ctttccaggg aagcattatc ttgaccagct gaaccacatt
961 ttgggtattc ttggatcccc atcacaagaa gacctgaatt gtataataaa tttaaaagct
1021 aggaactatt tgctttctct tccacacaaa aataagggtc catggaacag gctgttccca
1081 aatgctgact ccaaagctct ggacttattg gacaaaatgt tgacattcaa cccacacaag
1141 aggattgaag tagaacaggc tctggcccac ccatactctg agcagtatta cgacccgagt
1201 gacgagccca tcgccgaagc accattcaag ttcgacatgg aattggatga cttgcctaag
1261 gaaaagctca aagaactaat ttttgaagag actgctagat tccagccagg atacagatct

1321 taaatcttgc aggtacctgg agtttaatac agtgagctct agcaaggag gcgctgcctt
1381 ttgtttctag aatattatgt tcttcaaggt ccattatctt gtattctttt ccaagctcct
1441 tattggaagg tattttttta aatttagaat taaaattat ttagaaagtt acatataaaa
5 1501 aaaaaaaaaa aaaa
    
```

En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona procedimientos para tratar vasculopatías (por ejemplo, vEDS) en un sujeto que las necesita, los procedimientos comprenden administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que disminuye la actividad o expresión de ERK. Algunos ejemplos de inhibidores de ERK son ASN007 (Asana BioSciences, Bridgewater, Nueva Jersey), Ulixertinib (BVD-523) (BioMed Valley Discoveries, Kansas City, MO), CC-90003 (Celgene Corporation, Summit, Nueva Jersey), GDC-0994 (Array BioPharma, Boulder, CO), KO-947 (Kura Oncology, San Diego, California), LTT462 (Novartis, Basilea, Suiza), LY3214996 (Eli Lilly and Company, Indianápolis, IN), MK-8353 (Merck Sharp and Dohme Corp, Kenilworth, NJ).

Inhibidores de MEK

En las realizaciones, la divulgación proporciona procedimientos para tratar vasculopatías (por ejemplo, vEDS) en un sujeto que las necesita, los procedimientos comprenden administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que disminuye la actividad o expresión de ERK o PKC. Por ejemplo, un inhibidor de la ruta Ras/Raf/MEK/ERK. En algunas realizaciones, el inhibidor de la ruta de Ras se selecciona entre un inhibidor de Raf tal como vemurafenib, sorafenib o dabrafenib, un inhibidor de MEK como AZD6244 (Selumetinib), PD0325901, GSK1120212 (Trametinib), U0126-EtOH, PD184352, RDEA119 (Rafametinib), PD98059, BIX 02189, MEK162 (Binimetinib), AS-703026 (Pimasertib), SL-327, BIX02188, AZD8330, TAK-733, cobimetinib o PD318088, y un inhibidor de ERK tal como LY3214996, BVD-523 o GDC-0994.

En las realizaciones, el inhibidor de MEK se selecciona del grupo que consiste en Trametinib, Refametinib, Cobimetinib, TAK-733, PD0325901, PD184352 (CI-10-40), R05126766, RO-4987655; E6201; GDC-0623; CH5126766; G-573; WX-554; Selumetinib, Binimetinib y Pimasertib. En algunas realizaciones, el inhibidor de MEK comprende cobimetinib. En algunas realizaciones, el inhibidor de MEK comprende trametinib. En algunas

realizaciones, el inhibidor de MEK comprende trametinib y cobimetinib. En las realizaciones de los inhibidores de MEK, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos también se contemplan en el presente documento.

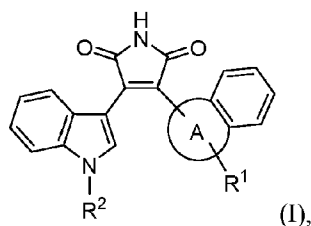
En determinadas realizaciones, el inhibidor de MEK puede administrarse en una concentración de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, 0,001 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,05 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 225 mg/kg o 250 mg/kg de peso corporal.

Inhibidores de la proteína cinasa C (PKC)

La proteína cinasa C, comúnmente abreviada PKC, es una familia de enzimas proteína cinasas que participan en el control de la función de otras proteínas a través de la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de aminoácidos de serina y treonina en estas proteínas, o un miembro de esta familia. A su vez, las enzimas PKC se activan por señales como el aumento de la concentración de diacilglicerol (DAG) o de iones de calcio (Ca^{2+}). Por tanto, las enzimas PKC desempeñan papeles importantes en varias cascadas de transducción de señales. La familia PKC consta de quince isozimas en humanos, y se dividen en tres subfamilias, basadas en sus requisitos de segundo mensajero: convencional (o clásica), novedosa y atípica. Las PKC convencionales contienen las isoformas α , β_1 , β_2 y γ . Para su activación necesitan Ca^{2+} , DAG y un fosfolípido tal como la fosfatidilserina. Las nuevas (n) PKC incluyen las isoformas δ , ϵ , η y θ , y requieren DAG, pero no requieren Ca^{2+} para su activación. Por tanto, las PKC convencionales y las nuevas se activan a través de la misma ruta de transducción de señales que la fosfolipasa C. Por otra parte, las PKC atípicas (λ) (incluidas la proteína cinasa $\text{M}\zeta$ y las isoformas ν y ξ) no requieren ni Ca^{2+} ni diacilglicerol para su activación. El término "proteína cinasa C", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere generalmente a toda la familia de isoformas.

Agentes PKC ejemplares incluyen, pero no se limitan a ruboxistaurina, queleritrina, miyabenol C, miricitrina, gopipol, verbascósido, BIM-1, o Briostatina 1. En las realizaciones, el inhibidor de PKC comprende enzastaurina. En las realizaciones, el inhibidor de PKC comprende ruboxistaurina. En las realizaciones, los agentes PKC o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos también se contemplan en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el inhibidor de PKC puede tener la estructura de:



o una sal del mismo, en la que:

El anillo A es un cicloalquilo C_5 - C_6 sustituido o no sustituido, un heterocicloalquilo de 5 a 6 miembros sustituido o no sustituido y con uno o más miembros N, O o S en el anillo, un fenilo sustituido o no sustituido, o un heteroarilo de 5 a 6 miembros sustituido o no sustituido y con uno o más miembros N, O o S en el anillo;

cada R^1 y R^2 es independientemente hidrógeno,

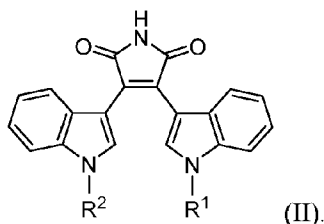
halógeno, N_3 , $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{NR}^{\text{A}}\text{R}^{\text{B}}$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{C}}$, $-\text{C}(\text{O})-\text{OR}^{\text{C}}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{\text{A}}\text{R}^{\text{B}}$, $-\text{OR}^{\text{D}}$, $-\text{NR}^{\text{A}}\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{C}}$, $-\text{NR}^{\text{A}}\text{C}(\text{O})\text{OR}^{\text{C}}$, alquilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, C_1 - C_2 , C_1 - C_4 , C_i - C_s , or C_i - C_{10}) heteroalquilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, de 2 a 8 miembros, de 2 a 6 miembros, de 4 a 6 miembros, de 2 a 3 miembros, o de 4 a 5 miembros con uno o más miembros N, O o S en el anillo), cicloalquilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, C_3 - C_8 , C_3 - C_6 , C_4 - C_6 , o C_5 - C_6), heterocicloalquilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, de 3 a 8 miembros, de 3 a 6 miembros, de 4 a 6 miembros, de 4 a 5 miembros, o de 5 a 6 miembros con uno o más miembros N, O o S en el anillo), arilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, C_6 - C_{10} o fenilo), o heteroarilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, de 5 a 10 miembros, de 5 a 9 miembros o de 5 a 6 miembros, con uno o más miembros N, O o S en el anillo); o

R^1 y R^2 están conectados entre sí para formar un alquileno sustituido o no sustituido (por ejemplo, C_i - C_2 , C_1 - C_4 , C_1 - C_8 , C_1 - C_{10}), o heteroalquileno sustituido o no sustituido (por ejemplo, de 2 a 8 miembros, de 2 a 6 miembros, de 4 a 6 miembros, de 2 a 3 miembros, o de 4 a 5 miembros con uno o más miembros N, O o S en la cadena de heteroalquileno), cicloalquileno sustituido o no sustituido (por ejemplo, C_3 - C_8 , C_3 - C_6 , C_4 - C_6 , o C_5 - C_6), heterocicloalquileno sustituido o no sustituido (por ejemplo, de 3 a 8 miembros, de 3 a 6 miembros, de 4 a 6 miembros, de 4 a 5 miembros, o de 5 a 6 miembros con uno o más miembros N, O o S en el anillo), arileno sustituido o no sustituido (por ejemplo, C_6 - C_{10} o fenileno), o heteroarileno sustituido o no sustituido (por ejemplo, de 5 a 10 miembros, de 5 a 9 miembros, o de 5 a 6 miembros que tengan uno o más miembros N, O o S en el anillo)) enlazante;

5 en el que cada R^A , R^B , R^C , y R^D en cada ocurrencia es independientemente hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, de 2 a 8 miembros con uno o más átomos de N, O o S), cicloalquilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, de 2 a 3 miembros), heterocicloalquilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, de 3 a 8 miembros, con uno o más átomos de N, O o S), arilo sustituido o no sustituido, tal como el fenilo, o heteroarilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, de 5 a 10 miembros, con uno o más miembros N, O o S en el anillo).

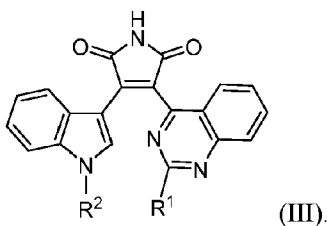
En algunas realizaciones, el anillo A es un heteroarilo de 5-6 miembros que puede incluir uno o más nitrógenos como miembros del anillo.

En algunas realizaciones, el inhibidor de PKC puede tener la estructura de:



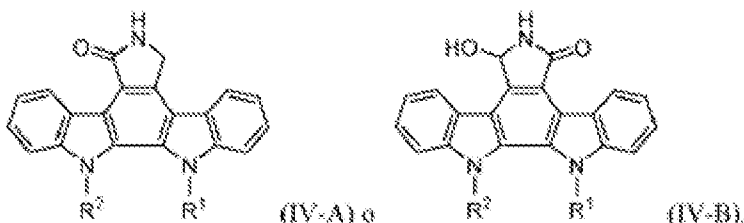
R^1 y R^2 son los descritos anteriormente.

En algunas realizaciones, el inhibidor de PKC puede tener la estructura de:



R^1 y R^2 son los descritos anteriormente.

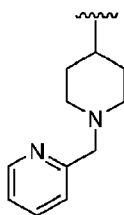
15 En algunas realizaciones, el inhibidor de PKC puede tener la estructura de:



R^1 y R^2 son los descritos anteriormente.

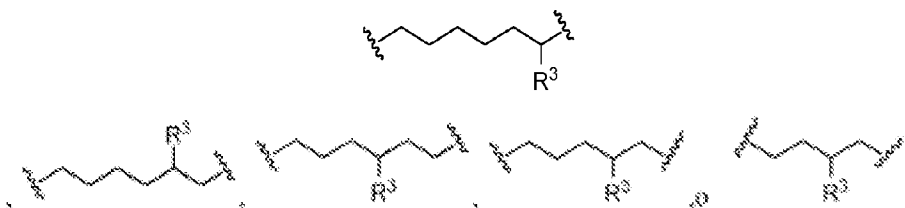
20 En algunas realizaciones, para el inhibidor de PKC de fórmula (I), (II), (III), (IV-A) o (IV-B), cada R^1 y R^2 es hidrógeno, alquilo C_1-C_4 sustituido o no sustituido, heteroalquilo de 2 a 6 miembros sustituido o no sustituido (por ejemplo, con uno o más miembros N, O o S), cicloalquilo C_3-C_6 sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo de 5 a 10 miembros sustituido o sin sustituir (por ejemplo, con uno o más miembros N, O o S), fenilo sustituido o sin sustituir, o heteroarilo de 5 a 10 miembros sustituido o sin sustituir (por ejemplo, con uno o más miembros N, O o S). En algunas realizaciones, cada R^1 y R^2 es independientemente hidrógeno, alquilo C_1-C_4 sustituido o no sustituido, o heterocicloalquilo sustituido con uno o más miembros del anillo N, O o S. En algunas realizaciones, cada R^1 y R^2 es independientemente hidrógeno, o alquilo C_1-C_4 no sustituido.

En algunas realizaciones, para el inhibidor de PKC de fórmula (II), R^1 es piperidinilo, piperazinilo, piridilo o pirimidilo sustituido o no sustituido. Por ejemplo, R^1 es



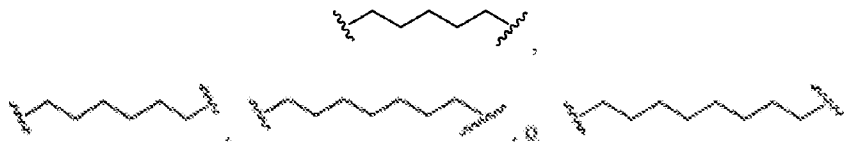
En algunas realizaciones, R² es hidrógeno o alquilo C₁-C₄ no sustituido. En algunas las realizaciones, R² es hidrógeno. En las realizaciones, R² es metilo. En las realizaciones, R² es etilo. En las realizaciones, R² es propilo. En la realización, R² es butilo. En algunas realizaciones, R² es t-butilo.

- 5 En algunas realizaciones, para el inhibidor de PKC de fórmula (I), (II), (III), (IV-A) o (IV-B), R¹ y R² están conectados entre sí para formar un alquileno Ci-Cs sustituido o no sustituido, o un enlazante de heteroalquileno de 2 a 8 miembros sustituido o no sustituido que tiene uno o más átomos de N, O o S en la cadena de heteroalquileno. En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar un enlazante de alquileno C₁-C₈ sustituido o no sustituido. En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar un enlazante de alquileno Ci-Cs sustituido. En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar un enlazante de alquileno Ci-Cs no sustituido. En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar un enlazante de heteroalquileno de 2 a 8 miembros que tiene uno o más átomos de N, O o S en la cadena de heteroalquileno. En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar un enlazante heteroalquileno no sustituido de 2 a 8 miembros que tiene uno o más átomos de N, O o S en la cadena del enlazante heteroalquileno.
- 10
- 15 En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar



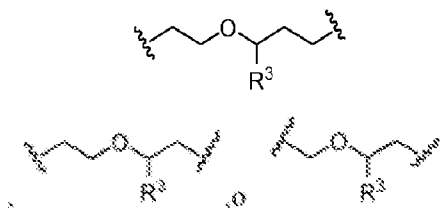
- 20 en la que R³ es hidrógeno, halógeno, -N₃, -CN, -NO₂, -NR^AR^B, -C(O)R^C, -C(O)-OR^C, -C(O)NR^AR^B, -OR^D, -NR^AC(O)R^C, -NR^AC(O)OR^C, alquilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, C₁-C₂, C₁-C₄, Ci-Cs, o Ci-C₁₀) heteroalquilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, de 2 a 8 miembros, de 2 a 6 miembros, de 4 a 6 miembros, de 2 a 3 miembros, o de 4 a 5 miembros con uno o más miembros N, O o S), cicloalquilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, C₃-C₈, C₃-C₆, C₄-C₆, o C₅-C₆), heterocicloalquilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, de 3 a 8 miembros, de 3 a 6 miembros, de 4 a 6 miembros, de 4 a 5 miembros, o de 5 a 6 miembros y con uno o más miembros N, O o S del anillo), arilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, C₆-C₁₀ o fenilo), o heteroarilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, de 5 a 10 miembros, de 5 a 9 miembros o de 5 a 6 miembros y que tenga uno o más miembros N, O o S en el anillo). R^A, R^B, R^C, y R^D se describen como arriba.
- 25

En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar



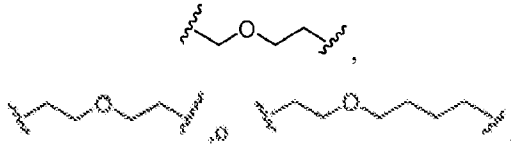
- 30 que puede estar sustituido con uno o más de los R³ descritos anteriormente.

En algunas realizaciones, R¹ y R² se conectan entre sí para formar



R³ se describe como arriba.

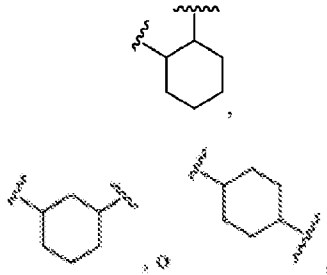
En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar



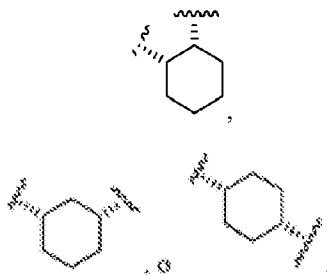
que puede estar sustituido con uno o más de los R³ descritos anteriormente.

- 5 En algunas realizaciones, para el inhibidor de PKC de fórmula (IV-A) o (IV-B), R¹ y R² están conectados entre sí para formar un enlazante de cicloalquileno C₅-C₆ sustituido o no sustituido. En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar un enlazante de cicloalquileno C₅-C₆ sustituido, por ejemplo, que puede estar sustituido con uno o más R³ descritos anteriormente. En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar un enlazante de cicloalquileno C₅-C₆ no sustituido.
- 10 En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar un enlazante heterocicloalquileno de 5 a 6 miembros sustituido o no sustituido (por ejemplo, con uno o más átomos de N, O o S en la cadena enlazante). En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar un enlazante heterocicloalquileno de 5 a 6 miembros sustituido que tiene uno o más átomos de N, O o S en la cadena enlazante, por ejemplo, que puede estar sustituido con R³ descrito anteriormente.
- 15 En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar un enlazante heterocicloalquileno no sustituido de 5 a 6 miembros que tiene uno o más átomos de N, O o S en la cadena enlazante.

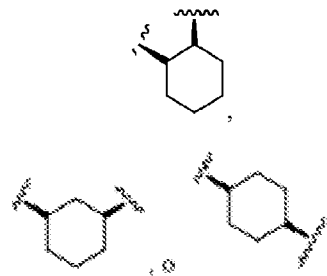
En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar



- 20 que puede estar sustituido con uno o más de los R³ descritos anteriormente. En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar

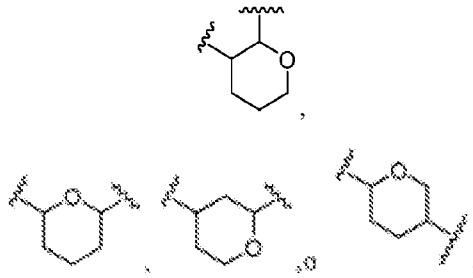


- 25 que puede estar sustituido con uno o más de los R³ descritos anteriormente. En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar

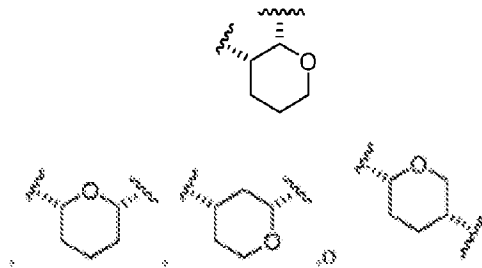


que puede estar sustituido con uno o más de los R³ descritos anteriormente.

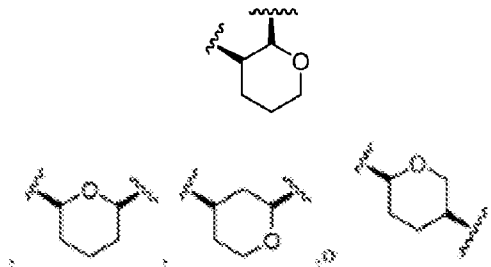
En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar



5 que puede estar sustituido con uno o más de los R³ descritos anteriormente. En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar

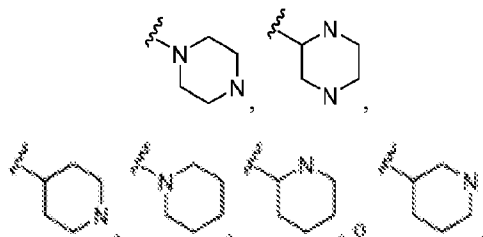


10 ,que puede estar sustituido con uno o más de los R³ descritos anteriormente. En algunas realizaciones, R¹ y R² están conectados entre sí para formar



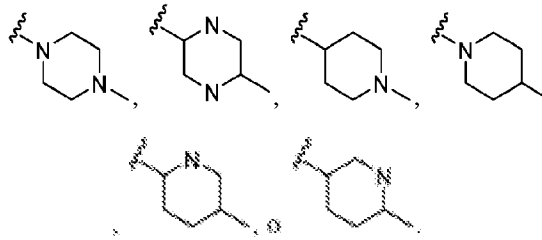
que puede estar sustituido con uno o más de los R³ descritos anteriormente.

15 En algunas realizaciones, para el inhibidor de PKC de fórmula (III), cada R¹ y R² es independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₄ sustituido o no sustituido, o heterocicloalquilo de 5 a 6 miembros sustituido o no sustituido y que tiene uno o más miembros de anillo N, O o S. En algunas realizaciones, R¹ es alquilo C₁-C₄ no sustituido. En algunas realizaciones, R¹ es heterocicloalquilo de 5 a 6 miembros sustituido que tiene uno o más miembros de anillo N, O o S, que pueden estar sustituidos uno o más de los R³ descritos anteriormente. En algunas realizaciones, R¹ es heterocicloalquilo de 5 a 6 miembros sustituido que tiene uno o más miembros de anillo N, O o S, que pueden estar sustituidos uno o más de los R³ descritos anteriormente. En algunas realizaciones, R¹ es piperidinilo o piperazinilo sustituido o no sustituido. En alguna realización, R¹ es piperidinilo o piperazinilo sustituido, que puede estar sustituido uno o más de los R³ descritos anteriormente. En algunas realizaciones, R¹ es piperidinilo o piperazinilo no sustituido. En algunas realizaciones, R¹ es



25

que puede estar sustituido con uno o más de los R³ descritos anteriormente. En algunas realizaciones, R¹ es

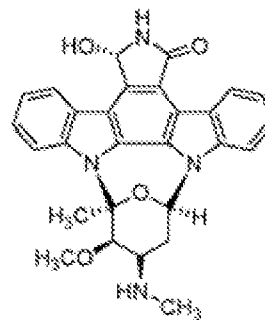
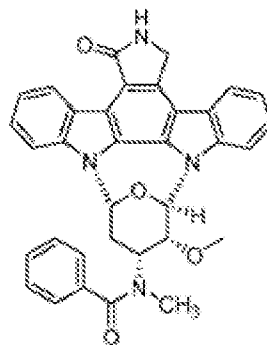
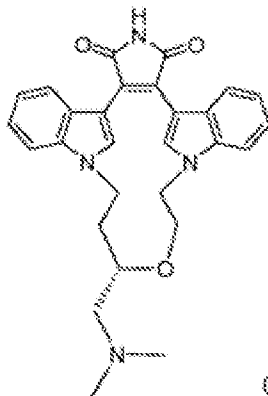
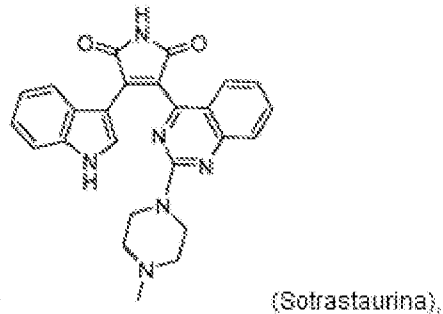
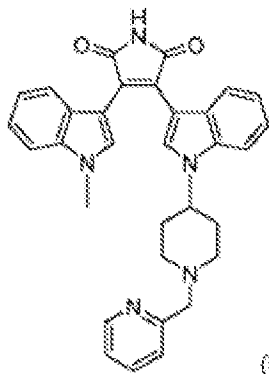


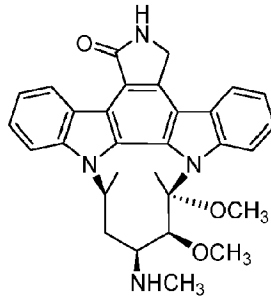
En algunas realizaciones, R² es hidrógeno. En la realización, R² es metilo.

- 5 Como se ha discutido anteriormente, los grupos que están "sustituidos" están sustituidos por otro que no sea hidrógeno en una o más posiciones disponibles, por lo general 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones, por uno o más grupos adecuados (que pueden ser iguales o diferentes), por ejemplo, halógeno, ciano, amino, hidroxilo, nitro, azido, carboxamido, -COOH, SO₂NH₂, alquilo (por ejemplo, alquilo C₁-C₈), alqueno (por ejemplo, alqueno C₂-C₈), alquino (por ejemplo, alquino C₂-C₈), alcoxi (por ejemplo, alcoxi C₁-C₈), éter alquílico (por ejemplo, éter alquílico C₂-C₈), alquiltio (por ejemplo, alquiltio C₁-C₈), mono o di-(alquil C₁-C₈)amino, haloalquilo (por ejemplo, haloalquilo C₁-C₈), hidroxialquilo (por ejemplo, hidroxialquilo C₁-C₈), aminoalquilo (por ejemplo, aminoalquilo C₁-C₈), haloalcoxi (por ejemplo, haloalcoxi C₁-C₈), alcanilo (por ejemplo, alcanilo C₁-C₈), alcanona (por ejemplo, alcanona C₁-C₈), alcanoiloxi (por ejemplo, alcanoiloxi C₁-C₈), alcoxycarbonilo (por ejemplo, alcoxycarbonilo C₁-C₈), mono y di-(alquil C₁-C₈)amino, mono- y di-(alquilo C₁-C₈)aminoalquilo C₁-C₈, mono- y di-(alquil C₁-C₈)carboxamido, mono- y di-(alquil C₁-C₈)sulfonamido, alquilsulfonilo (por ejemplo, alquilsulfonilo C₁-C₈), alquilsulfonilo (por ejemplo, alquilsulfonilo C₁-C₈), arilo (por ejemplo, fenilo), arilalquilo (por ejemplo, (arilo C₆-C₁₈)alquilo C₁-C₈, tal como bencilo y fenitilo), ariloxi (por ejemplo, ariloxi C₆-C₁₈, tal como fenoxi), arilalcoxi (por ejemplo, (arilo C₆-C₁₈)alcoxi C₁-C₈) y/o grupos heterocíclicos de 3 a 8 miembros que tienen uno o más miembros N, O o S en el anillo.

20 Como se menciona en la presente memoria, un grupo que tiene un número determinado de "miembros" se refiere a un número determinado de átomos del grupo.

Algunos ejemplos de inhibidores de la PKC son





Según la invención, el agente se selecciona entre ruboxistaurina, enzastaurina, sostrastaurina o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas.

5 En determinadas realizaciones, se administra a un sujeto un inhibidor de proteína cinasa o un anticuerpo monoclonal que inhibe receptores implicados en rutas de señalización de proteína cinasa o factor de crecimiento, como un inhibidor de EGFR, VEGFR, AKT, Erb1, Erb2, ErbB, Syk, Bcr-Abl, JAK, Src, GSK-3, PI3K, Ras, Raf, MAPK, MAPKK, mTOR, c-Kit, receptor eph o BRAF. Ejemplos no limitantes de inhibidores de las vías de señalización de la proteína cinasa o del factor de crecimiento incluyen Afatinib, Axitinib, Bevacizumab, Bosutinib, Cetuximab, Crizotinib, Dasatinib, Erlotinib, Fostamatinib, Gefitinib, Imatinib, Lapatinib, Lenvatinib, Mubritinib, Nilotinib, Panitumumab, Pazopanib, Pegaptanib, Ranibizumab, Ruxolitinib, Saracatinib, Sorafenib, sunitinib, trastuzumab, vandetanib, AP23451, vemurafenib, MK-2206, GSK690693, A-443654, VQD-002, miltefosina, perifosina, CAL101, PX-866, LY294002, rapamicina, temsirolimus, everolimus, ridaforolimus, alvocidib, genisteína, selumetinib, AZD-6244, vatalanib, P1446A-05, AG-024322, ZD1839, P276-00, GW572016 o una mezcla de los mismos.

15 En determinadas realizaciones, el agente que disminuye la actividad o expresión de PKC puede administrarse en una concentración desde aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, 0,001 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,05 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 225 mg/kg o 250 mg/kg de peso corporal.

20 En determinadas realizaciones, la PKC comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (No de acceso NCBI: NP_002728.1 (SEQ ID NO: 7)):

```

1  MADVFPGNDS  TASQDVANRF  ARKGALRQKN  VHEVKDHKFI  ARFFKQPTFC  SHCTDFIWGF
61  GKQGFQCQVC  CFVVHKRCHE  FVTFSCPGAD  KGPDTDDPRS  KHKFKIHTYG  SPTFCDHCGS
121 LLYGLIHQGM  KCDTCDMNVH  KQCVINVPSL  CGMDHTEKRG  RIYLKAEVAD  EKLHVTVRDA
181  KNLIPMDPNG  LSDPYVKLKL  IPDPKNESKQ  KTKTIRSTLN  PQWNESFTFK  LKPSDKDRRL
241  SVEIWDWDR  TRNDFMGSL  S  FGVSELMKMP  ASGWYKLLN  Q  EGEYYNVPI  PEGDEEGNME
301  LRQKFEKAK  L  GPAGNKVIS  P  SEDRKQPSNN  LDRVKLTFN  FLMVLGKGS  F  GKVMLADRKG
361  TEELYAIKIL  KKDVIQDDD  VECTMVEKRV  LALLDKPPFL  TQLHSCFQTV  DRLYFVMEYV
421  NGGDLMYHI  Q  QVGKFKEPQA  VFYAAEISIG  LFFLHKRGII  YRDLKLDNVM  LDSEGHKIA
481  DFGMCKEHMM  DGVTTRTEFC  G  TPDYIAPEII  AYQPYGKSVD  WWAYGVLLYE  MLAGQPPFDG
541  EDEDELFSI  MEHNVSYPKS  LSKEAVSICK  GLMTKHPAKR  LGCPEGERD  VREHAFFRRI
601  DWEKLENREI  QPPFKPKVCG  KGAENFDKFF  TRGQPVLT  PP  DQLVIANIDQ  SDFEGFSYVN
661  PQFVHPILQS  AV
    
```

En determinadas realizaciones, la PKC comprende la siguiente secuencia de nucleótidos, la secuencia codificante está en **negrita** y subrayada (No de acceso NCBI: NM_002737.2 (SEQ ID NO: 8)).

ES 2 973 130 T3

1 ggccgcagct ccccgggcga ggcaagaggt ggttgggggg gaccatggct gacgttttcc
 61 cgggcaacga ctccacggcg tctcaggacg tggccaaccg cttcgcccgc aaagggggcg
 121 tgaggcagaa gaacgtgcac gaggtgaagg accacaaatt catcgcgcgc ttcttcaagc
 181 agcccacett ctgcagccac tgcaccgact tcatctgggg gtttgggaaa caaggcttcc
 241 agtgccaagt ttgctgtttt gtggtccaca agaggtgcca tgaatttggt actttttctt
 301 gtccgggtgc ggataaggga cccgacactg atgaccccag gagcaagcac aagttcaaaa
 361 tccacactta cggaaagccc acctctgcg atcactgtgg gtcactgctc tatggactta
 421 tccatcaagg gatgaaatgt gacacctgcg atatgaacgt tcacaagcaa tgcgtoatca
 481 atgtcccag cctctgcgga atggatcaca ctgagaagag ggggcggatt tacctaaagg
 541 ctgaggttgc tgatgaaaag ctccatgtca cagtacgaga tgcaaaaaat ctaatcccta
 601 tggatccaaa cgggctttca gatccttatg tgaagctgaa acttatctct gatcccaaga
 661 atgaaagcaa gcaaaaaacc aaaacctacc gctccacact aaatccgcag tggaatgagt
 721 cctttacatt caaattgaaa ccttcagaca aagaccgacg actgtctgta gaaatctggg
 781 actgggatcg aacaacaagg aatgacttca tgggatccct ttctttgga gtttcggagc
 841 tgatgaagat gccggccagt ggatggtaca agttgcttaa ccaagaagaa ggtgagtact
 901 acaacgtacc cattccggaa ggggacgagg aaggaaacat ggaactcagg cagaaattcg
 961 agaaagccaa acttggccct gctggcaaca aagtcatcag tccctctgaa gacaggaaac
 1021 aaccttccaa caaccttgac cgagtgaaac tcacggactt caatttctc atggtgttg
 1081 gaaaggggag ttttggaag gtgatgcttg ccgacaggaa gggcacagaa gaactgtatg
 1141 caatcaaaat cctgaagaag gatgtggtga ttcaggatga tgacgtggag tgcaccatgg
 1201 tagaaaagcg agtcttgcc ctgcttgaca aacccccgtt cttgacgcag ctgcactcct
 1261 gcttcacagc agtggatcgg ctgtacttcg tcatggaata tgtcaacggt ggggacctca
 1321 tgtaccacat tcagcaagta ggaaaattta aggaaccaca agcagtatc tatgcggcag
 1381 agatttccat cggattgttc tttcttcata aaagaggaat catttatagg gatctgaagt
 1441 tagataacgt cabgttggat tcagaaggac atabcaaaat tgcctgacttt gggatgtgca
 1501 aggaacacat gatggatgga gtcacgacca ggaccttctg tgggactcca gattatatcg
 1561 cccagagat aatcgcttat cagccgtatg gaaaatctgt ggactggtgg gcctatggcg
 1621 tctgtttgta tgaaatgctt gccgggcagc ctccatttga tggatgaagat gaagacgagc
 1681 tatttcagtc tabcatggag cacaacgttt cctatccaaa atccttgcct aaggaggctg
 1741 tttctatctg caaaggactg atgaccaaac acccagccaa ggggctgggc tgtgggcctg
 1801 agggggagag ggacgtgaga gagcatgcct tcttccggag gatcgactgg gaaaaactgg
 1861 agaacagggg gatccagcca ccattcaagc ccaaagtgtg tggcaaagga gcagagaact
 1921 ttgacaagtt cttcacacga ggacagcccg tcttaacacc acctgatcag ctggttatg

ES 2 973 130 T3

1981 ctaacataga ccagtctgat tttgaagggt tctcgtatgt caacccccag tttgtgcacc
 2041 ccatcttaca gagtgcagta tgaaactcac cagcgagaac aaacacctcc ccagccccc
 2101 gccctccccg cagtgggaag tgaatcctta accctaaaat ttaaggcca cggccttgtg
 2161 tctgattcca tatggaggcc tgaaaattgt agggttatta gtccaaatgt gatcaactgt
 2221 tcagggtctc tctcttaca ccaagaacat tatcttagtg gaagatggta cgtcatgctc
 2281 agtgtccagt ttaattctgt agaagttacg tctggctcta ggtaaccct tcttagaaag
 2341 caagcagact gttgcccacat tttgggtaca atttgatata ctttccatac cctccatctg
 2401 tggatttttc agcattggaa tcccccaacc agagatgta aagtgagcct gtcccaggaa
 2461 acatctccac ccaagacgtc tttggaatcc aagaacagga agccaagaga gtgagcaggg
 2521 agggattggg ggtgggggag gcctcaaaat accgactgcg tccattctct gcctccatgg
 2581 aaacagcccc tagaatctga aaggccggga taaacctaat cactgttccc aaacattgac
 2641 aaatcctaac ccaaccatgg tccagcagtt accagtttaa acaaaaaaac ctcagatgag
 2701 tgttgggtga atctgtcatc tggtagcctc cttggttgat aactgtcttg atacttttca
 2761 ttctttgtaa gaggccaaat cgtctaagga cgttgctgaa caagcgtgtg aaatcatttc
 2821 agatcaagga taagccagtg tgtacatag ttcattttaa tctctgggag attatttttc
 2881 catccagggt gccatcagta atcatgccac tactcaccag tgttgttctc caacaccac
 2941 cccacacac accaacattt tgctgcctac cttgttatcc ttctcaagaa gctgaagtgt
 3001 acgccctctc cccttttgtg cttatttatt taataggctg cagtgtcgtc tatgaaagta
 3061 cgatgtacag taacttaatg gaagtgtgta ctctagcatc agcctctacc gattgatttt
 3121 cctcccttct ctagccctgg atgtccactt agggataaaa agaatatggt tttggttccc
 3181 atttctagtt cacgttgaat gacaggcctg gagctgtaga atcaggaaac ccggatgcct
 3241 aacagctcaa agatgttttg ttaatagaag gattttaata cgttttgcaa atgcatcatg
 3301 caatgaattt tgcattgta taataaacct taataacaag tgaatctata ttattgatat
 3361 aatcgtatca agtataaaga gagtattata ataattttat aagacacaat tgtgctctat
 3421 ttgtgcaggt tcttgtttct aatcctcttt tctaattaag ttttagctga atcccttgct
 3481 tctgtgcttt ccctccctgc acatgggac tgtatcagat agattacttt ttaaatgtag
 3541 ataaaatttc aaaaatgaat ggctagttta cgtgatagat taggctctta ctacatatgt
 3601 gtgtgtatat atatgtattt gattctacct gcaaacaaat ttttattggt gaggactatt
 3661 tttgagctga cactccctct tagtttcttc atgtcacctt tegtccctgg tccctccgca
 3721 ctcttctctc tggggacaac aggaagtgtc tgattccagt ctgcctagta cgtttgttaca
 3781 cacgtggcat tgccgcagca cctgggctga cctttgtgtg tgcgtgtgtg tgtgtttcct
 3841 tcttcccttc agcctgtgac tgttgctgac tccaggggtg ggagggatgg ggagactccc
 3901 ctcttgctgt gtgtaactga cacgcaggaa gcatgctgtc ttgctgcctc tgcaacgacc
 3961 tgcgttttgc tccagcatgc acaaacttcg tgagaccaac acagccgtgc cctgcaggca
 4021 ccagcacgtg cttttcagag gctgaggact ttcttccagc catttgtggca ttggccttcc
 4081 cagtcttggg aggagcgcgc tgccttgggt agacaacccc atgcaaggte ctcagagtag
 4141 ccgggttcta ccacaaacag aaacagaatg aaagtactgt tcagtccttg tagagagccg
 4201 ctctgttttc tcccagaagc atctcccagc taagctcgca ttatttttct cctctggctg
 4261 tttgcctgaa gttcacagaa cacacaacca tgaaaggctt tttgaggtga gaggcccagg
 4321 tggctcctggc aaccctgagt agaaggagag acggggtagg gaacgggccc ggccagaaaa
 4381 gaaccatttc ttctgccatc ttttatgcac catagacatc gagactccag ggggtcctgg
 4441 ctcccctgtc cctgcagccc tgcaggtcag tgcatgatct gggttcgtgt cctgaccagg
 4501 tgcctcctct ttgatccgag gggaaaggga ctggtttata gaaagacct aggcagaaa
 4561 agggccagtc ccctgcccga gaatggagca gcagcaggac agacccccac gaggccccc
 4621 agagaggagg aagatcccac ggaggaacac atgaggttag ggacccttgt tcagcaccac
 4681 aaacagcctg cctgtttaaa gcaggcagca ggcttaggcc ttccctgcaa ccccaacacc
 4741 cacaagtttg tttctctagg aaacacatte actgtctcag ctggctgtta ctctctcaga
 4801 ccatatggca aagttttcca agaaaatgcc ccgacagggg tgcccagcac actgcctgag
 4861 ggacaacaga catcagaaca aacccccaga gagaaacagt caaaatcagg gcccggtgca
 4921 gtgttgtcat gtggaaacct ctttatccat tgcctgagtgt tgaatgtggg taatggttag
 4981 ggctttccag atctcagcag ccaagacag ttattgttgg aagactgtca thtagataac
 5041 catgagcaat ggctcgcctc agaatcagtt cataaaatc tatggtaactg gcccttctgt
 5101 gggatttgtg tgaaatgaga tgggtggcgag ggggtgcgctg tggaaactgc gcagccaagc
 5161 aggaggtccc tgggggatgc tttgggaagt ccttgcccct gagcactgce tgattgccag
 5221 ggctgtgga ggtctaggcc gcctggcaga atctagcacc gtccgaatcc ccgcaggacc
 5281 catggagcta tgaccacacc aggccattca aatggctctg cattatcttc ccttgggaag
 5341 tggccactcc tcgggtggcag ggcctttccc tgaggctgca ggccgtgggc tggcagcccc

5401 tctcttggca tttcaattga aggtcaccag gtgctggggt tgaaaggaag tcaactggagt
 5461 gctgccaggg gcgcctcc aaggttaatg agaggccac atccaggcaa gaactaatc
 5521 aaaaggcaga tcagaaacca caggagtcaa aattattgct ccggcagtgc tcccttccct
 5581 ttcattccact ggctctgtgt ggtccatgca gggccactgt ctgcccttc tgatgccacg
 5641 tattaggctt tcttactcag aattttgata gaaaaccatg gggccaagag ctctggaagc
 5701 ctggccggaa agaccaaggt tcatgcagcc caacaaatga ttgttgagca cctctcggag
 5761 ccaaagtcct taggcgagtg tggtgacttc ctggaaggag gatgcagact tccagagagc
 5821 ccccccaacg gacgtgctga gaagggagag ggaggcgggg gctgtagtca ggaaggagcc
 5881 agagaagaac agggtttggg tgcattccaga aatatgcctg cagtaggagg gagaggaagg
 5941 ggtgccaccg tcaacggctt cccatcggag gtggttgggt cagatggaag tttctgtctg
 6001 ctggccctca agagagtgtt ttgccaggga cacagtctgt tccctctcag aaaaaccccc
 6061 ccaaagtcta acaacatccc caccagctgc tagaagcccc tttcccctcc ccacottgaa
 6121 gtagctcata gttctctggg cagagccaga ccatccagtg taccocagag gccagtaggt
 6181 tcttgcccat tttctctctc ggcttccctg caagaattat ggcagctgag gatgaatgga
 6241 gaagtaaaaa caactaacac cgcacaacta acaactaaca ccgcagttcc cacctggggt
 6301 ccacttagca ggagacattt cggaggggtt tttttgtttt tgttctgttt tttttttttt
 6361 ttgctggaat ttgttttctc agtactgaaa agagaaaaag tgacaatctt gtatttttaa
 6421 aagcctcgga aagggtgatac catctgacag tcattttctc acgttggctt tctaaagtca
 6481 cctattttctt gtgtgtgcac atcacaccat ttcctgtttc tttataacc gacaagggta
 6541 ggagtgcctg tttcccctgc tgggcacacc agacaatcgt aatcacaaaa cagacactga
 6601 gccaggggccc caaaggggtg gatcatgaga gttaccggga cagcagtagg catgacagtc
 6661 accaggaagg acaaggggtc tctgttggta gtggccacac accaatttga caaggagtgt
 6721 tgcgaaatth ttatttattt atttatttat tttgagatgg agtttcactc ttgttgccca
 6781 ggctggagtg cgggtgtaca atctcggctc actgcaacct ccacctccca ggttcaagcg
 6841 attctcctgc ctcagcctcc caagtaoctg ggaactacag tgctgtccac cacaccagc
 6901 taaatthtgt gtttttagta gagatggggg ttcaccatgt tggccaggat ggtcttgaac
 6961 cctgacctc atgatctgcc tgcctcggcc tcccaaagtg ctgggattac aggcattgagc
 7021 caccacgccc agccaaaata tttttttaaa gtcattttcc ttaagctgct tgggctacat
 7081 gtgaaataca ctggacggtc aacattcctg tctcctccca tttgggctga tgcagcagat
 7141 ccagggaaatg ttacctgttt ctgctgctag aagatccagg aaattgggaa ggttacctga
 7201 cgcacacatg gatgaaggcc atcatctaga aatggggtea accacaattg tgttaattcc
 7261 gtagtctcag ggattcttcc ggaaggtcaa cagtatgaag gattctgacc cctgtgcctc
 7321 ccatttatgt gatcaggtga cagttaataa ccgtggaggt cacactcagc catccaacag
 7381 ccttacagtg accctacaca aaagccccc aattccaaag actttttctt aacctaaagg
 7441 aagaaattat ttgttaatc cagtagagca actgaatata ctgggctatt tgtacttttt
 7501 tatagagaac ttttaataata attctttaaa aatgagtttt tagaacaag caactgacga
 7561 tttcctaaga ttccaatgcc ctggagcttg taggaggact tagcctgggt cagctggagc
 7621 acccccagcc tgatctccca ctgccagatt ttcctatgct cctagggtat ggagtccacg
 7681 tgggaatgac tgcaagttca ggtggaactt ggcgcactga tgctctgcga gtttttaata
 7741 gacactgggg acaactgctt aaggtttaga aacttccaaa ccacaggaaa gacattttta
 7801 gtgtccccc tccagaggca gccctggaat aggattccca ggggtttctg ggaccctttt
 7861 ccttgctccg tgaggctctg tggccatctt ttggcaggag gaggatgctt ccttggctct
 7921 gtgccagac ccgcctggtc cccaggtctc tcacctggg tgaagattca gagatgcctt
 7981 gtaaggattt tgcccactgg gcaactcaga aatacttcga tctcccaaga tataagaggc
 8041 agcagcaaac gtgcctattg acgtctgttt catagttacc acttacgcga gtagacagaa
 8101 ctcggttttt cagaaaatag gtgtcaagtc cactttataa gaaccttttt ttctaaaata
 8161 agataaaaagg tggctttgca tttcttgatt aaacgactgt gcttttgtca cctctgctta
 8221 actttaggag tatccattcc tgtgattgta gacttttggt gatattcttc ctggaagaat
 8281 atcattcttt tcttgaaggg ttggtttact agaataattca aaatcaatca tgaaggcagt
 8341 tactattht agtctaaagg ttttctaaaa ataacctca catccctctt gttagggctt
 8401 ttcagaatat cttttataaa cagaagcatt tgaagtcatt gcttttgcta catgatttgt
 8461 gtgtgtgaag gacataccac gtttaaatca ttaattgaaa aacatcatat aagccccaac
 8521 tttgtttgga ggaagagacg gaggttgagg ttttcccttc tgtataagca cctactgaca
 8581 aatgttagag gccattcaac cgtcaaacac catttggtta tatcgcagag gagacggatg
 8641 tgtaaattac tgcattgctt tttttttcag tttgtataac ctctaacttc cgtttgcattg
 8701 atacgctttg ttagaaacat taattgtagt ttggaagcaa gtgtgtatga ataaaagataa
 8761 tgatcattcc aaaaaaaaaa aaaaaaa

Agentes que disminuyen la expresión o la actividad de la fosfolipasa C (PLC) o del inositol trifosfato (IP3)

En algunos ejemplos, se utilizan determinados agentes que actúan como vasodilatadores que bloquean la actividad o expresión de PLC o IP3. En algunas realizaciones, los inhibidores de PLC comprenden U-73122, U73343 y ET-18-OCH₃. En las realizaciones, los inhibidores de IP3 comprenden 2-APB y Xestospongin C. En las realizaciones, el agente comprende hidralazina. Se contempla que los inhibidores puedan utilizarse solos o en cualquier combinación. En algunas realizaciones, los inhibidores de PLC o IP3, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos también se contemplan en el presente documento.

En determinadas realizaciones, el agente que disminuye la actividad o expresión de PLC o IP3 puede administrarse en una concentración desde aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, 0,001 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,05 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 225 mg/kg o 250 mg/kg de peso corporal. En otras realizaciones, se contempla que el agente pueda administrarse en una concentración superior, por ejemplo, hasta 1000 mg/kg de peso corporal.

En algunas realizaciones, se contempla la terapia de combinación con un antagonista androgénico (por ejemplo, antiandrógeno). Los antiandrógenos son una clase de fármacos que impiden que andrógenos como la testosterona y la dihidrotestosterona (DHT) ejerzan sus efectos biológicos en el organismo. Actúan bloqueando el receptor de andrógenos (RA) y/o inhibiendo o suprimiendo la producción de andrógenos. Los antiandrógenos ejemplares incluyen:

Antagonistas de los receptores de andrógenos: Fármacos que se unen directamente al AR y lo bloquean. Estos fármacos incluyen los antiandrógenos esteroideos acetato de ciproterona, acetato de megestrol, acetato de clormadinona, espironolactona, oxendolona y acetato de osaterona (veterinarios) y los antiandrógenos no esteroideos flutamida, bicalutamida, nilutamida, topilutamida, enzalutamida y apalutamida. Aparte del acetato de ciproterona y el acetato de clormadinona, algunas otras progestinas utilizadas en anticonceptivos orales y/o en HRT menopáusica, como el dienogest, la drospirenona, la medrogestona, el acetato de nomegestrol, la promegestona y la trimegestona, también tienen diversos grados de actividad antagonista del AR;

Inhibidores de la síntesis de andrógenos: fármacos que inhiben directamente la biosíntesis enzimática de andrógenos como la testosterona y/o la DHT. Algunos ejemplos son los inhibidores del CYP17A1 ketoconazol, acetato de abiraterona y seviteronel, el inhibidor del CYP11A1 (P450scc) aminoglutetimida y los inhibidores de la 5 α -reductasa finasterida, dutasterida, epristerida, alfatradiol y extracto de palma enana americana (*Serenoa repens*). También se sabe que otros antiandrógenos, incluyendo el acetato de ciproterona, la espironolactona, la medrogestona, la flutamida, la nilutamida y el bifluranol, inhiben débilmente la síntesis de andrógenos.

Antigonadotropinas: Fármacos que suprimen la liberación de gonadotropinas inducida por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y la consiguiente activación de la producción de andrógenos gonadales. Algunos ejemplos son los moduladores de la GnRH como la leuprorelina (un agonista de la GnRH) y el cetorelix (un antagonista de la GnRH), progestágenos como el alilestrenol, el acetato de clormadinona, el acetato de ciproterona, el caproato de gestonorona, el caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, acetato de osaterona (veterinario) y oxendolona, y estrógenos como estradiol, ésteres de estradiol, etinilestradiol, estrógenos conjugados y dietilestilbestrol.

Ejemplos adicionales: Fármacos que se oponen a los efectos de los andrógenos por medios distintos de los anteriores. Algunos ejemplos son los estrógenos, especialmente los orales y sintéticos (p. ej, etinilestradiol, dietilestilbestrol), que estimulan la producción de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) en el hígado y, por consiguiente, disminuyen los niveles libres y bioactivos de testosterona y DHT; anticorticotropinas como los glucocorticoides, que suprimen la producción de andrógenos suprarrenales inducida por la hormona adrenocorticotrópica (ACTH); e inmunógenos y vacunas contra la androstenediona como la albúmina de ovandrotona y la albúmina de androstenediona, que disminuyen los niveles de andrógenos mediante la generación de anticuerpos contra el andrógeno y el precursor androgénico androstenediona (utilizados únicamente en medicina veterinaria).

Trastornos del tejido conjuntivo

Las enfermedades del tejido conjuntivo se refieren a un grupo de trastornos que afectan al tejido rico en proteínas que sostiene los órganos y otras partes del cuerpo. Ejemplos de tejido conjuntivo son la grasa, el hueso y el cartilago. Estos trastornos suelen afectar a las articulaciones, los músculos y la piel, pero también pueden afectar a otros órganos y sistemas orgánicos, incluyendo los ojos, el corazón, los pulmones, los riñones, el tracto gastrointestinal y los vasos sanguíneos. Existen más de 200 trastornos que afectan al tejido conjuntivo. Las causas y los síntomas específicos varían según los distintos tipos.

Ejemplos de enfermedades tisulares (por ejemplo, tejido epitelial, conectivo, muscular y nervioso) potencialmente tratables con las composiciones y procedimientos incluyen, pero no se limitan a las siguientes: autoinmunes,

degenerativas, inflamatorias, infecciosas, cancerosas, víricas, fúngicas, derivadas de lesiones o traumatismos. Estas enfermedades de tejidos y/u órganos pueden ser la enfermedad primaria o estar causadas por una enfermedad y/o dolencia existente. Algunos ejemplos son: amiloidosis, fibrilación auricular, convulsiones, calambres, dermatomiositis, encondroma, fibroma, lumbago, trastorno hereditario del tejido conjuntivo (por ejemplo, síndrome de Marfan, enfermedad de Peyronie, síndrome de Ehlers-Danlos, osteogénesis imperfecta, síndrome de Stickler, síndrome de Alport, aracnodactilia contractural congénita), trastorno autoinmune del tejido conjuntivo (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide, esclerodermia, síndrome de Sjogren, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, artritis psoriásica), escorbuto, enfermedad muscular (por ejemplo, tumor muscular, distrofia muscular, atrofia por desuso, atrofia por denervación, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular facioescapulohumeral), enfermedad hepáticaemiastemia grave, miopatía, miositis, miositis osificante, cáncer, fibromialgia, fatiga muscular, espasmo, espasticidad, esguince, distensión, lesión cerebral, lesión medular, gliomas, neuroepteliomatosis, hipertensión, enfermedad cardiovascular, diabetes, enfermedad de Alzheimer, cistitis, SIDA, raquitismo y tumores de la vaina nerviosa. Ejemplos de tejidos, órganos y/o sistemas corporales afectados por enfermedades y que pueden ser tratados con las composiciones, y procedimientos descritos en las mismas, pero no se limitan a los siguientes: Sistema inmunitario, órganos sensoriales (por ejemplo, órganos del gusto, olfato, vista, oído), aparato digestivo (por ejemplo, boca, fauces, faringe, esófago, abdomen, estómago, intestino delgado, intestino grueso, hígado, páncreas), aparato urogenital, sistema endocrinológico, metabolismo, sistema cardiovascular (por ejemplo, corazón, tensión arterial, arterias), hematología (por ejemplo, química sanguínea), órganos urinarios (por ejemplo, riñones, uréteres, vejiga urinaria, uretra masculina, uretra femenina, órganos genitales masculinos (por ejemplo, testículos y su cubierta, conducto deferente, vesículas seminales, conductos eyaculadores, pene, próstata, glándulas bulbouretrales), órganos genitales femeninos (por ejemplo, ovarios, trompa uterina, útero, vagina, clítoris, glándulas de Bartolino, órganos externos, mamas)), glándulas sin conductos (por ejemplo, tiroides, paratiroides, timo, hipófisis cerebral, cuerpo pineal, sistemas cromaffilico y corticol, bazo), reproducción, respiratorio (por ejemplo, laringe, tráquea, bronquios, pleurae, mediastino, pulmones), sistema nervioso central (por ejemplo, nervios, fibras nerviosas), piel, epitelial (por ejemplo, simple, estratificado, columnar pseudoestratificado, glandular), conectivo (por ejemplo, conectivo laxo (por ejemplo, areolar, adiposo, reticular), y conectivo denso (por ejemplo, denso regular, denso irregular)), cartílago (por ejemplo, hialino, elástico, fibroso), músculo (por ejemplo, músculo esquelético (por ejemplo, tipo I, II, IIa, IIx, IIb), músculo cardíaco, músculo liso), nervioso (por ejemplo, neurona (por ejemplo, motoneurona, interneurona, neurona sensorial), neuroglía, médula espinal, nervios, cerebro).

En las realizaciones de la divulgación, el trastorno del tejido conectivo comprende una vasculopatía (por ejemplo, síndrome de Ehlers-Danlos vascular), síndrome de Marfan, síndrome de Loeys-Dietz o aneurisma aórtico torácico familiar.

Síndromes de Ehlers-Danlos (EDS)

Los síndromes de Ehlers-Danlos (EDS) son un grupo de trastornos genéticos del tejido conectivo. Los síntomas pueden incluir articulaciones flojas, piel elástica y formación anormal de cicatrices. Pueden manifestarse al nacer o en la primera infancia. Las complicaciones pueden incluir disección aórtica, luxaciones articulares, escoliosis, dolor crónico u osteoartritis precoz.

Los EDS se deben a una mutación en uno de más de una docena de genes diferentes. El gen específico afectado determina el EDS específico. Algunos casos son el resultado de una nueva mutación que se produce durante el desarrollo temprano, mientras que otros se heredan de forma autosómica dominante o recesiva. Esto da lugar a defectos en la estructura o el procesamiento del colágeno. El diagnóstico puede confirmarse con pruebas genéticas o una biopsia de piel. Las personas pueden ser diagnosticadas erróneamente de hipocondriasis, depresión o síndrome de fatiga crónica.

Hasta la fecha, no se conoce ninguna cura, sin embargo, la fisioterapia y la ortesis pueden ayudar a fortalecer los músculos y apoyar las articulaciones. Mientras que algunos trastornos dan lugar a una esperanza de vida normal, los que afectan a los vasos sanguíneos suelen dar lugar a una esperanza de vida más corta. Los EDS afectan aproximadamente a una de cada 5.000 personas en todo el mundo, y el pronóstico depende del trastorno específico.

Clasificación EDS

El SEDH hiper móvil (hSED tipo 3) se caracteriza principalmente por una hiper movilidad articular que afecta tanto a las articulaciones grandes como a las pequeñas, lo que puede provocar luxaciones y subluxaciones articulares recurrentes (luxación parcial). En general, las personas con este tipo tienen la piel suave, lisa y aterciopelada, con moretones fáciles y dolor crónico de los músculos y/o huesos. Se desconoce la mutación que causa este tipo de EDS. La afectación cutánea es menor que en otros tipos. No se dispone de ninguna prueba genética para este tipo.

El EDS clásico (EDSc tipo 1) se asocia a una piel extremadamente elástica (elástica) y lisa que es frágil y se magulla con facilidad; cicatrices anchas y atróficas (cicatrices planas o deprimidas); e hiper movilidad articular. También se observan con frecuencia pseudotumores moluscosos (hematomas calcificados sobre puntos de

presión tales como el codo) y esferoides (quistes que contienen grasa en antebrazos y espinillas). Puede producirse hipotonía y retraso en el desarrollo motor. La mutación que causa este tipo de EDS se encuentra en los genes *COL5A1*, *COLSA2* y *COL1A1*. Afecta más a la piel que el hEDS.

5 **El EDS vascular (tipo 4 vEDS)** se caracteriza por una piel fina y translúcida que es extremadamente frágil y se magulla con facilidad. Las arterias y determinados órganos, tales como los intestinos y el útero, también son frágiles y propensos a romperse. Las personas con este tipo suelen tener baja estatura y el cuero cabelludo fino. También presenta rasgos faciales característicos, como ojos grandes, mentón pequeño, mejillas hundidas, nariz y labios finos y orejas sin lóbulos. La hiper movilidad articular está presente, pero generalmente se limita a las articulaciones pequeñas (dedos de manos y pies). Otras características comunes son pie zambo, rotura de tendones y/o

10 músculos, acrogeria (envejecimiento prematuro de la piel de manos y pies), aparición precoz de varices, neumotórax (colapso de un pulmón), recesión de las encías y disminución de la cantidad de grasa bajo la piel. Puede estar causada por mutaciones en el gen *COL3A1*.

15 **La cifoescoliosis EDS (tipo 6 kEDS)** se asocia con hipotonía grave al nacer, retraso en el desarrollo motor, escoliosis progresiva (presente desde el nacimiento) y fragilidad escleral. Las personas afectadas también pueden presentar hematomas con facilidad, arterias frágiles propensas a romperse, córneas inusualmente pequeñas y osteopenia (baja densidad ósea). Otros rasgos comunes son el "hábito marfanoide", caracterizado por dedos largos y delgados (aracnodactilia), extremidades inusualmente largas y tórax hundido (pectus excavatum) o protuberante (pectus carinatum). Puede estar causada por mutaciones en el gen *PLOD1*.

20 **La artrocalasia EDS (tipos 7A y B aEDS)** se caracteriza por una hiper movilidad articular grave y una luxación congénita de cadera. Otros rasgos comunes son la piel frágil y elástica, con fácil aparición de hematomas, hipotonía, cifoescoliosis (cifosis y escoliosis) y osteopenia leve. El colágeno de tipo I suele estar afectado. Es muy poco frecuente, con aproximadamente 30 casos registrados. Es más grave que el tipo de hiper movilidad. La causan mutaciones en los genes *COL141* y *COL1A2*.

25 **La dermatosparaxis EDS (tipo 7C dEDS)** se asocia con una piel extremadamente frágil que provoca hematomas y cicatrices graves; piel flácida y redundante, especialmente en la cara; y hernias. Es extremadamente rara, con unos 10 casos registrados.

El síndrome de la córnea quebradiza se caracteriza por una córnea delgada, queratoglobo progresivo de aparición temprana o queratocono y escleróticas azules. También se observan a menudo síntomas clásicos, tales como articulaciones hiper móviles y piel hiperelástica.

30 **El EDS de tipo clásico (EDSc tipo 1)** se caracteriza por hiper extensibilidad cutánea con textura cutánea aterciopelada y ausencia de cicatrices atróficas, hiper movilidad articular generalizada con o sin luxaciones recurrentes (con mayor frecuencia hombro y tobillo), y piel fácilmente amoratada o equimosis espontáneas (decoloraciones de la piel resultantes de hemorragias subyacentes).

35 **El EDS espondilodisplásico (spEDS)** se caracteriza por baja estatura (progresiva en la infancia), hipotonía muscular (que van desde congénita grave a leve de aparición posterior) y arqueamiento de las extremidades.

El EDS musculoesquelético (mcEDS) se caracteriza por contracturas múltiples congénitas, característicamente contracturas de aducción-flexión y/o talipes equinovarus (pie equinovaro), rasgos craneofaciales característicos, que son evidentes al nacer o en la primera infancia, y rasgos cutáneos como hiper extensibilidad cutánea, hematomas, fragilidad cutánea con cicatrices atróficas y aumento de las arrugas palmares.

40 **El EDS miopático (mEDS)** se caracteriza por hipotonía muscular congénita y/o atrofia muscular que mejora con la edad, contracturas articulares proximales (articulaciones de la rodilla, la cadera y el codo) e hiper movilidad de las articulaciones distales (articulaciones de los tobillos, las muñecas, los pies y las manos).

45 **El EDS periodontal (pEDS)** se caracteriza por periodontitis grave e intratable de aparición temprana (infancia o adolescencia), falta de encía adherida, placas pretibiales e historia familiar de un pariente de primer grado que cumpla los criterios clínicos.

El EDS cardiaco-valvular (cvEDS) se caracteriza por problemas cardiacos-valvulares graves y progresivos (válvula aórtica, válvula mitral), problemas cutáneos (hiper extensibilidad, cicatrices atróficas, piel fina, fácil aparición de hematomas) e hiper movilidad articular (generalizada o restringida a pequeñas articulaciones).

Métodos de tratamiento

50 La presente divulgación proporciona procedimientos para el tratamiento de vasopatía (por ejemplo, vEDS) o trastornos del tejido conectivo en un sujeto que los necesita, administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, en el que el agente disminuye la actividad o expresión de la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) o proteína cinasa C (PKC). El procedimiento comprende además la administración de un agente que disminuye la actividad o expresión de la fosfolipasa C (PLC) o del inositol trifosfato (IP3). En las realizaciones,

55 el agente comprende un anticuerpo o fragmento del mismo, un polipéptido, una molécula pequeña, una molécula

de ácido nucleico, o cualquier combinación, para la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de vasopatías (por ejemplo, vEDS) o trastornos del tejido conectivo.

La presente divulgación también proporciona procedimientos que comprenden terapia de combinación. Como se utiliza en la presente memoria, la "terapia combinada" o "coterapia" incluye la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente (por ejemplo, un agente que disminuye la actividad o expresión de ERK, PKC y/o PLC o IP3), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con al menos un agente activo adicional, también denominado en la presente memoria "ingrediente farmacéutico activo" ("API"), como parte de un régimen de tratamiento destinado a proporcionar un efecto beneficioso de la coacción del agente (por ejemplo, un agonista, antagonista o inhibidor) y el agente activo adicional.

De acuerdo con las realizaciones descritas a continuación, se entiende que "el API adicional" se refiere a al menos un API adicional administrado en un régimen de terapia de combinación con un agente (por ejemplo, un agente que disminuye la actividad o expresión de ERK, PKC y/o PLC o IP3). Además, se entiende que en el régimen puede utilizarse más de uno de los API adicionales descritos a continuación. Los términos "terapia combinada" o "régimen de terapia combinada" no pretenden abarcar la administración de dos o más compuestos terapéuticos como parte de regímenes de monoterapia separados que incidental y arbitrariamente resultan en un efecto beneficioso que no se pretendía ni se preveía.

Preferentemente, la administración de una composición que comprende un agente (por ejemplo, un agente que disminuye la actividad o expresión de ERK, PKC y/o PLC o IP3) en combinación con uno o más API adicionales como se discute en la presente memoria proporciona una respuesta sinérgica en el sujeto tratado. En este contexto, el término "sinérgico" se refiere a que la eficacia de la combinación es mayor que los efectos aditivos de cualquiera de las terapias por separado.

La presente divulgación también proporciona procedimientos que comprenden terapia de combinación para el tratamiento de vasopatía (por ejemplo, vEDS) o trastornos del tejido conectivo. Como se utiliza en la presente memoria, la "terapia combinada" o "coterapia" incluye la administración de un compuesto descrito en la presente memoria, con al menos un agente adicional, tal como se describe en la presente memoria, como parte de un régimen de tratamiento específico destinado a proporcionar el efecto beneficioso de la coacción de estos compuestos terapéuticos. El al menos un agente adicional puede ser un agente terapéutico o un agente no terapéutico. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero no se limita a, la coacción farmacocinética o farmacodinámica resultante de la combinación de compuestos terapéuticos. El efecto beneficioso de la combinación también puede estar relacionado con la mitigación de una toxicidad, efecto secundario o acontecimiento adverso asociado con otro agente de la combinación. "Terapia combinada" puede ser, pero generalmente no pretende abarcar la administración de dos o más de estos compuestos terapéuticos como parte de regímenes de monoterapia separados que incidental y arbitrariamente dan lugar a las combinaciones de la presente divulgación.

De acuerdo con lo anterior, en determinadas realizaciones, a un sujeto que lo necesita se le administra uno o más agentes que inhiben la expresión o actividad de la proteína cinasa activada por mitógenos/señal extracelular regulada cinasa (MEK), señal extracelular regulada cinasa (ERK), fosfolipasa C (PLC), inositol trifosfato (IP3) o proteína cinasa C (pKC), y de ese modo inhiben la actividad de ERK, PLC, IP3 o PKC.

En determinadas realizaciones, a un sujeto que lo necesita se le administra uno o más agentes que inhiben la actividad o expresión de una o más moléculas asociadas con la ruta de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), por ejemplo, las proteínas cinasa RAS-RAF/MEK/cinasa regulada por señales extracelulares (ERK).

En el contexto de la terapia de combinación, la administración del antagonista puede ser simultánea o secuencial a la administración de uno o más agentes adicionales. En otro aspecto, la administración de los distintos componentes de una terapia combinada puede realizarse con frecuencias diferentes. El uno o más agentes adicionales pueden administrarse antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes de), concomitantemente con, o posteriormente a (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) de la administración de un compuesto de la presente divulgación.

El uno o más agentes adicionales pueden formularse para coadministración con un agente de la presente divulgación en una forma de dosificación única, como se describe con mayor detalle en la presente memoria. El uno o más agentes adicionales pueden administrarse por separado de la forma de dosificación que comprende el compuesto de la presente divulgación. Cuando el agente adicional se administra por separado de un compuesto de la presente divulgación, puede ser por la misma vía de administración que el compuesto de la presente divulgación o por una vía diferente.

Preferentemente, la administración de una composición que comprende un agente de la presente divulgación en combinación con uno o más agentes adicionales proporciona una respuesta sinérgica en el sujeto que padece un

trastorno, enfermedad o afección de la presente divulgación. En este contexto, el término "sinérgico" se refiere a que la eficacia de la combinación es mayor que los efectos aditivos de cualquiera de las terapias por separado. El efecto sinérgico de la terapia combinada según la divulgación puede permitir el uso de dosificaciones más bajas y/o la administración menos frecuente de al menos un agente de la combinación en comparación con su dosis y/o frecuencia fuera de la combinación. El efecto sinérgico puede manifestarse en la evitación o reducción de los efectos secundarios adversos o no deseados asociados al uso de cualquiera de las terapias de la combinación por sí sola.

La "terapia de combinación" también abarca la administración de los compuestos de la presente divulgación en combinación adicional con terapias no farmacológicas (por ejemplo, cirugía o radioterapia). Cuando la terapia combinada comprende además un tratamiento no farmacológico, el tratamiento no farmacológico puede realizarse en cualquier momento adecuado siempre que se consiga un efecto beneficioso de la coacción de la combinación de los compuestos terapéuticos y el tratamiento no farmacológico. Por ejemplo, en los casos apropiados, el efecto beneficioso se sigue consiguiendo cuando el tratamiento no farmacológico se aleja temporalmente de la administración de los compuestos terapéuticos, quizás días o incluso semanas.

En las realizaciones de los procedimientos descritos en la presente memoria, los agentes (por ejemplo, un agente que disminuye la actividad o expresión de ERK, PKC y/o PLC o IP3), pueden administrarse solos o en combinación con al menos un agente adicional en un procedimiento para tratar vasopatías (por ejemplo, vEDS) o trastornos del tejido conectivo. En algunas realizaciones, el agente y al menos un agente adicional se administran en una única forma de dosificación. En otro aspecto, el agente y el al menos un agente adicional se administran en formas de dosificación separadas. En algunas realizaciones, el al menos un agente adicional es un agente terapéutico. En algunas realizaciones, el agente terapéutico está indicado para el tratamiento de vasopatías (por ejemplo, vEDS) o trastornos del tejido conectivo. En otro aspecto, el agente se administra en combinación con al menos un agente adicional que no es para el tratamiento de la vasopatía (por ejemplo, vEDS) o trastornos del tejido conectivo, por ejemplo, un segundo agente que sirve para mitigar una toxicidad o evento adverso asociado con otro agente activo que se administra en la terapia de combinación.

En las realizaciones, el al menos un agente adicional está dirigido a la terapia dirigida, en la que el tratamiento se dirige a la vasopatía (por ejemplo, vEDS) o a los trastornos del tejido conectivo, a las proteínas o al entorno tisular que contribuye a la vasopatía (por ejemplo, vEDS) o a la progresión del trastorno del tejido conectivo.

En algunas realizaciones, se contempla la terapia de combinación con un antagonista androgénico (por ejemplo, antiandrógeno). Los antiandrógenos son una clase de fármacos que impiden que andrógenos como la testosterona y la dihidrotestosterona (DHT) ejerzan sus efectos biológicos en el organismo. Actúan bloqueando el receptor de andrógenos (AR) y/o inhibiendo o suprimiendo la producción de andrógenos.

En las realizaciones, las combinaciones ejemplares comprenden antagonistas androgénicos más inhibidores de PLC, IP3, PKC o ERK.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para tratar, mejorar un síntoma de, reducir la gravedad de, o reducir la duración de la enfermedad, trastorno o afección, o potenciar o mejorar el efecto terapéutico de otra terapia, o para prevenir una enfermedad, trastorno o afección identificada, o para exhibir un efecto terapéutico o inhibitorio detectable. El efecto puede detectarse mediante cualquier procedimiento de ensayo conocido en la técnica. La cantidad eficaz precisa para un sujeto dependerá de su peso corporal, tamaño y estado de salud; de la naturaleza y extensión de la afección; y de la terapéutica o combinación de terapéuticas seleccionadas para su administración.

Una cantidad eficaz del agente puede administrarse una vez al día, de dos a cinco veces al día, hasta dos veces o hasta tres veces al día, o hasta ocho veces al día. En algunas realizaciones, el agente se administra tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, catorce días de inicio (cuatro veces al día, tres veces al día o dos veces al día, o una vez al día) y 7 días de descanso en un ciclo de 3 semanas, hasta cinco o siete días de inicio (cuatro veces al día, tres veces al día o dos veces al día, o una vez al día) y 14-16 días de descanso en un ciclo de 3 semanas, o una vez cada dos días, o una vez a la semana, o una vez cada 2 semanas, o una vez cada 3 semanas.

Una cantidad eficaz de un agente (por ejemplo, un agente que disminuye la actividad o expresión de ERK, PKC y/o PLC o IP3) puede oscilar entre aproximadamente 0,001 mg/kg y aproximadamente 1000 mg/kg, entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg, entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg; o cualquier intervalo en el que el extremo inferior del intervalo sea cualquier cantidad comprendida entre 0,001 mg/kg y 900 mg/kg y el extremo superior del intervalo sea cualquier cantidad comprendida entre 0,1 mg/kg y 1000 mg/kg (por ejemplo, 0,005 mg/kg y 200 mg/kg, 0,5 mg/kg y 20 mg/kg). Las dosis eficaces también variarán, como reconocen los expertos en la técnica, en función de las enfermedades tratadas, la vía de administración, el uso de excipientes y la posibilidad de utilización conjunta con otros tratamientos terapéuticos, tales como el uso de otros agentes.

En aspectos más específicos, un agente de la divulgación (por ejemplo, un agente que disminuye la actividad o expresión de ERK, PKC y/o PLC o IP3) se administra en un régimen de dosificación de 30-300 mg/día (por ejemplo,

30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 o 300 mg/día) durante al menos 1 semana (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 36, 48 o más semanas). En determinadas realizaciones, un compuesto(s) aquí incluido(s) se administra(n) en un régimen de dosificación de 100-300 mg/día durante 4 o 16 semanas. Alternativa o posteriormente, un agente incluido en la presente memoria se administra en un régimen de dosificación de 100 mg dos veces al día durante 8 semanas, u opcionalmente, durante 52 semanas.

Como se utiliza en la presente memoria, un "sujeto que lo necesita" es un sujeto que padece una enfermedad, un trastorno o una afección, o un sujeto que tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad, un trastorno o una afección en relación con la población en general. En un aspecto preferido, el sujeto que lo necesita es un sujeto que padece vasopatía (por ejemplo, vEDS) o trastornos del tejido conectivo o que tiene un mayor riesgo de desarrollar vasopatía (por ejemplo, vEDS) o trastornos del tejido conectivo en relación con la población en general. El sujeto que lo necesita puede ser uno que "no responda" o sea "refractario" a una terapia actualmente disponible para la enfermedad o trastorno. En este contexto, los términos "no responde" y "refractario" se refieren a que la respuesta del sujeto a la terapia no es clínicamente adecuada para aliviar uno o más síntomas asociados a la enfermedad o trastorno.

Un "sujeto" incluye un mamífero. El mamífero puede ser, por ejemplo, cualquier mamífero, como un ser humano, un primate, un vertebrado, un pájaro, un ratón, una rata, un ave, un perro, un gato, una vaca, un caballo, una cabra, un camello, una oveja o un cerdo. Preferentemente, el mamífero es un ser humano. Los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan indistintamente en la presente memoria.

La presente divulgación proporciona una monoterapia para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección como se describe en la presente memoria. Como se utiliza en la presente memoria, "monoterapia" se refiere a la administración de un único compuesto activo o terapéutico a un sujeto que lo necesite. Preferentemente, la monoterapia implicará la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto activo. Por ejemplo, la monoterapia con un agente de la divulgación, puede administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz a un sujeto que necesite tratamiento. La monoterapia puede contrastarse con la terapia combinada, en la que se administra una combinación de múltiples compuestos activos, preferentemente con cada componente de la combinación presente en una cantidad terapéuticamente eficaz. En un aspecto, la monoterapia con un agente de la divulgación es más eficaz que la terapia combinada para inducir un efecto biológico deseado.

Como se utiliza en la presente memoria, "tratamiento", "tratar" o "que trata" describe el manejo y cuidado de un paciente con el propósito de combatir una enfermedad, afección o trastorno e incluye la administración de un agente de la divulgación para aliviar los síntomas o complicaciones de una enfermedad, afección o trastorno, o para eliminar la enfermedad, afección o trastorno.

Como se utiliza en la presente memoria, "prevención", "prevenir" o "que previene" describe la reducción o eliminación de la aparición de los síntomas o complicaciones de la enfermedad, afección o trastorno e incluye la administración de un agente de la divulgación para reducir la aparición, desarrollo o recurrencia de los síntomas de la enfermedad, afección o trastorno.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "aliviar" se refiere a un procedimiento mediante el cual se disminuye la gravedad de un signo o síntoma de un trastorno. Es importante destacar que un signo o síntoma puede aliviarse sin ser eliminado. En una realización preferida, la administración de un agente de la divulgación conduce a la eliminación de un signo o síntoma, sin embargo, la eliminación no es necesaria. Se espera que las dosis eficaces disminuyan la gravedad de un signo o síntoma.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "síntoma" se define como una indicación de enfermedad, dolencia, lesión o de que algo no va bien en el cuerpo. Los síntomas son percibidos o percibidos por la persona que los experimenta, pero pueden no ser percibidos fácilmente por los otros. Otros se definen como profesionales no sanitarios.

El tratamiento de un trastorno, enfermedad o afección según los procedimientos descritos en la presente memoria puede dar lugar a una disminución de la tasa de progresión de la vasopatía (por ejemplo, vEDS) o de la tasa de progresión del del trastorno del tejido conectivo. Preferentemente, después del tratamiento, la tasa de progresión de la vasopatía (por ejemplo, vEDS) o del trastorno del tejido conectivo se reduce en al menos un 5 % con respecto al número anterior al tratamiento; más preferentemente, la tasa de progresión de vasopatía (por ejemplo, vEDS) o trastorno del tejido conectivo se reduce en al menos un 10 %; más preferentemente, se reduce en al menos un 20 %; más preferentemente, se reduce en al menos un 30 %; más preferentemente, se reduce en al menos un 40 %; más preferentemente, se reduce en al menos un 50 %; aún más preferentemente, se reduce en al menos un 50 %; y lo más preferentemente, se reduce en al menos un 75 %. La tasa de progresión de la vasopatía (por ejemplo, vEDS) o de los trastornos del tejido conjuntivo puede medirse por cualquier medio de medición reproducible.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "selectivamente" significa que tiende a ocurrir a una frecuencia más alta en una población que en otra población. Las poblaciones comparadas pueden ser poblaciones celulares. Preferentemente, un agente de la presente divulgación actúa selectivamente sobre una célula hiperproliferante

pero no sobre una célula normal. Un agente de la presente divulgación actúa selectivamente para modular una diana molecular pero no modula significativamente otra diana molecular.

Terapia combinada

5 En las realizaciones, la divulgación también proporciona procedimientos que comprenden terapia de combinación de hidralazina y al menos un agente activo adicional. En algunas realizaciones, el al menos un agente activo adicional es un agente terapéutico, por ejemplo, un compuesto antiandrógeno tal como la bicalutamida o la espironolactona.

10 Como se utiliza en la presente memoria, "Terapia de combinación" o "coterapia" incluye la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente descrito en la presente memoria con al menos un agente activo adicional, como parte de un régimen de tratamiento específico destinado a proporcionar un efecto beneficioso de la coacción del agente y el agente activo adicional. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero no se limita a, la coacción farmacocinética o farmacodinámica resultante de la combinación de compuestos terapéuticamente activos. La "Terapia combinada" no pretende abarcar la administración de dos o más compuestos terapéuticos como parte de regímenes monoterapéuticos separados que incidental y arbitrariamente resultan en un efecto beneficioso que no estaba previsto o intencionado.

15 Preferentemente, la terapia combinada proporciona una respuesta sinérgica en el sujeto tratado. En este contexto, el término "sinérgico" se refiere a que la eficacia de la combinación es mayor que los efectos aditivos de cualquiera de las terapias por separado. El efecto sinérgico de una terapia combinada según la divulgación puede permitir el uso de dosis más bajas y/o la administración menos frecuente de al menos un agente de la combinación en comparación con su dosis y/o frecuencia fuera de la combinación. Los efectos beneficiosos adicionales de la combinación pueden manifestarse en la evitación o reducción de los efectos secundarios adversos o no deseados asociados al uso de cualquiera de las terapias de la combinación sola (también denominada monoterapia).

20 La "Terapia de combinación" también abarca la administración del agente que inhibe o reduce la actividad biológica y/o la expresión de una ruta de señalización (por ejemplo, PLC/IP3/PKC/ERK) de la presente divulgación en combinación adicional con terapias no farmacológicas (por ejemplo, cirugía o radioterapia). Cuando la terapia combinada comprende además un tratamiento no farmacológico, el tratamiento no farmacológico puede realizarse en cualquier momento adecuado siempre que se consiga un efecto beneficioso de la coacción de la combinación de los compuestos terapéuticos y el tratamiento no farmacológico. Por ejemplo, en los casos apropiados, el efecto beneficioso se sigue consiguiendo cuando el tratamiento no farmacológico se aleja temporalmente de la administración de los compuestos terapéuticos, quizás días o incluso semanas. El tratamiento no farmacológico puede seleccionarse entre quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia antiestrogénica, terapia génica y cirugía.

25 En el contexto de los procedimientos descritos en la presente memoria, la cantidad de un agente administrada al sujeto es una cantidad terapéuticamente eficaz. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para tratar, mejorar un síntoma de, reducir la gravedad de, o reducir la duración de la enfermedad que se está tratando (por ejemplo, vEDS), o potenciar o mejorar el efecto terapéutico de otra terapia, o suficiente para exhibir un efecto terapéutico detectable en el sujeto. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del agente es la cantidad eficaz para reducir una ruta de señalización (por ejemplo, PLC/IP3/PKC/ERK).

30 En las realizaciones, la administración de hidralazina y un agente antiandrógeno según los procedimientos descritos en la presente memoria conduce a la eliminación de un síntoma o complicación de la enfermedad (por ejemplo, vEDS) que se está tratando; sin embargo, no se requiere la eliminación. En una realización, la gravedad del síntoma o complicación disminuye.

Composiciones farmacéuticas

35 En determinadas realizaciones, se emplea una composición farmacéutica que comprende un agente (por ejemplo, un agente que disminuye la actividad o expresión de ERK, PKC y/o PLC o IP3). El agente puede formularse adecuadamente e introducirse en un sujeto o en el entorno de una célula por cualquier medio reconocido para tal administración. Según la invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de tratamiento del síndrome de Ehlers-Danlos vascular (vEDS), que comprende una cantidad eficaz de un agente, en la que el agente disminuye la actividad o expresión de la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) o la proteína cinasa C (PKC) y en la que el agente se selecciona entre ruboxistaurina, enzastaurina, sotrastaurina o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas.

40 Una "composición farmacéutica" es una formulación que contiene los agentes descritos en la presente memoria en una forma farmacéuticamente aceptable adecuada para su administración a un sujeto. Como se utiliza en la presente memoria, la frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones, portadores y/o formas de dosificación que son, dentro del ámbito del buen juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una proporción beneficio/riesgo razonable.

Tales composiciones incluyen por lo general el agente y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en la presente memoria, el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye suero salino, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También pueden incorporarse a las composiciones compuestos activos suplementarios.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "sal farmacéuticamente aceptable" es una sal formada, por ejemplo, a partir de un ácido y un grupo básico de un agente descrito en la presente memoria. Las sales ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, besilato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (por ejemplo, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)).

Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Ejemplos de vías de administración incluyen la parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, como el ácido clorhídrico o el hidróxido de sodio. El preparado parenteral puede presentarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor. EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y fluida hasta el punto de que se pueda emplear una jeringa fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y conservarse contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente seleccionado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada estérilmente.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Para fines de administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos, pastillas o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también pueden prepararse utilizando un portador fluido para su uso como enjuague bucal. Pueden incluirse como parte de la composición agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, tal goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrador tal como ácido alginico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

Las composiciones de la divulgación también podrían formularse como formulaciones de nanopartículas. Los compuestos de la divulgación pueden administrarse para aplicaciones de liberación inmediata, liberación retardada, liberación modificada, liberación sostenida, liberación pulsátil y/o liberación controlada. Las composiciones farmacéuticas para su uso según la invención pueden contener desde 0,01 a 99 % en peso - por

volumen del material activo. Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de aerosol a partir de un recipiente a presión o dispensador que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como el dióxido de carbono, o un nebulizador. Tales procedimientos incluyen los descritos en U.S. Pat. No. 6,468,798.

5 La administración sistémica también puede ser por vía transmucosa o transdérmica. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes adecuados a la barrera que se desea permeabilizar. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa puede realizarse mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica. Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases convencionales para supositorios, tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

15 En una realización, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de entrega microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como el etilvinilacetato, los polianhídridos, el ácido poliglicólico, el colágeno, los poliortoésteres y el ácido poliláctico. Tales formulaciones pueden prepararse utilizando técnicas estándar. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluidos los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos) también pueden utilizarse como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse según procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4,522,811.

25 La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren los compuestos que presentan altos índices terapéuticos. Si bien pueden utilizarse compuestos que presenten efectos secundarios tóxicos, debe procurarse diseñar un sistema de administración que dirija tales compuestos al lugar del tejido afectado, a fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de este modo, reducir los efectos secundarios.

35 Los datos obtenidos de los ensayos en cultivos celulares y de los estudios en animales pueden utilizarse en la formulación de una gama de dosificaciones para su uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y de la vía de administración utilizada. Para un compuesto utilizado en un procedimiento de la divulgación, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) determinada en cultivo celular. Tal información puede utilizarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

45 Como se define en la presente memoria, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente (es decir, una dosis eficaz) depende del agente seleccionado. Por ejemplo, pueden administrarse cantidades de dosis única de un agente en el intervalo de aproximadamente 1 pg a 1000 mg; en algunas realizaciones, pueden administrarse 10, 30, 100 o 1000 pg, o 10, 30, 100 o 1000 ng, o 10, 30, 100 o 1000 µg, o 10, 30, 100 o 1000 mg. En algunas realizaciones, pueden administrarse de 1 a 5 g de las composiciones.

50 Una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la presente divulgación puede determinarse por procedimientos conocidos en la técnica. Además de depender del agente y de la formulación seleccionada/farmacéutica utilizada, las cantidades terapéuticamente eficaces de una composición farmacéutica para su uso según la invención dependerán de la edad y del estado fisiológico general del paciente y de la vía de administración. En determinadas realizaciones, las dosis terapéuticas serán generalmente de aproximadamente 10 y 2000 mg/día y preferentemente de aproximadamente 30 y 1500 mg/día. Pueden utilizarse otros intervalos, incluyendo, por ejemplo, 50-500 mg/día, 50-300 mg/día, 100-200 mg/día.

55 La administración puede ser una vez al día, dos veces al día o más a menudo, y puede disminuirse durante una fase de mantenimiento de la enfermedad o trastorno, por ejemplo, una vez cada segundo o tercer día en lugar de cada día o dos veces al día. La dosis y la frecuencia de administración dependerán de los signos clínicos, que confirman el mantenimiento de la fase de remisión, con la reducción o ausencia de al menos uno o más preferentemente más de un signo clínico de la fase aguda conocida para el experto en la técnica. El experto apreciará que determinados factores pueden influir en la dosis y el tiempo necesarios para tratar eficazmente a un

60

sujeto, incluyendo, pero no limitándose a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente puede incluir un único tratamiento u, opcionalmente, puede incluir una serie de tratamientos.

- 5 Puede apreciarse que el procedimiento de introducción de un agente en el entorno de una célula dependerá del tipo de célula y de la composición de su entorno. Deben introducirse cantidades adecuadas de un agente y estas cantidades pueden determinarse empíricamente utilizando procedimientos estándar. Las concentraciones eficaces ejemplares de un agente individual en el entorno de una célula pueden ser de 500 milimolar o menos, 50 milimolar o menos, 10 milimolar o menos, 1 milimolar o menos, 500 nanomolar o menos, 50 nanomolar o menos, 10 nanomolar o menos, o incluso composiciones en las que pueden utilizarse concentraciones de 1 nanomolar o menos.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un kit, contenedor, envase o dispensador junto con las instrucciones de administración.

Ejemplos

- 15 Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo fabricar y utilizar la composición farmacéutica según la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención.

Ejemplo 1: Generación de ratones con inserción génica de sustitución de glicina vEDS.

- 20 Se crearon nuevos ratones vEDS con inserción génica de sustitución de glicina (*Col3a1* G209S/+ y *Col3a1* G938D/+) utilizando CRISPR/Cas9. El modelo de ratón recapitulaba los fenotipos vasculares humanos, y se descubrió una base molecular para el fallo final de la pared vascular, mediante la explotación de los efectos ambientales sobre el fenotipo de la enfermedad.

- 25 Para introducir cada mutación, se diseñaron 3 ARN guía (tracrARN + crARN) dirigidos a las regiones de ADN que flanquean el sitio de mutación previsto. También se diseñó una plantilla de reparación de ADN oligo (ADNmc oligo) que incluía secuencias homólogas corriente arriba y corriente abajo de la región diana, así como la mutación prevista. La inyección pronuclear de embriones unicelulares C57BL/6J fue realizada por el Núcleo Transgénico de la JHU utilizando técnicas estándar de microinyección con una mezcla de proteína Cas9, tracrRNA, crRNA y ADNmc oligo diluidos en tampón de inyección sin ARNasa. Los embriones inyectados se transfirieron a los oviductos de hembras ICR pseudopreñadas mediante técnicas establecidas. Se utilizó la secuenciación Sanger del sitio para confirmar la introducción de la mutación, y los ratones se retrocruzaron durante al menos 4 generaciones para eliminar los efectos fuera del objetivo. Para el ratón G209S, la mutación introducida fue c.625_626GG>TC, correspondiente a p.Gly210Ser en humanos. Para el ratón G938D, la mutación introducida fue c.2813G>A, correspondiente a p.Gly939Ser en humanos. El ARNm *Col3a1* humano de tipo salvaje No de acceso NCBI: NM_000090.3; el ratón de tipo salvaje *Col3a1* ARNm No de acceso NCBI: NM_009930.2.

- 35 **Ejemplo 2: Los modelos de ratón *Col3a1* G209S/+ y *Col3a1* G938D/+ recapitulaban los fenotipos vEDS.**

- Tanto los modelos de ratón *Col3a1* G209S/+ como *Col3a1* G938D/+ recapitulaban los fenotipos vEDS. Los ratones con vEDS mueren súbitamente por rotura aórtica, disección aórtica o rotura de órganos, presentando con mayor frecuencia hemotórax o hemoperitoneo en la necropsia. Los ratones con la mutación *Col3a1* G938D/+ presentan un fenotipo más grave (mediana de supervivencia = 45 días frente a 400 días para el modelo *Col3a1* G209S/+, p<0,0001, Figura 1A - 1C). La figura 1A es un gráfico que demuestra que el modelo de ratón G209S/+ recapituló los fenotipos vEDS, y la mediana de supervivencia fue de 400 días, p<0,0001. En la figura 1B, se muestra la supervivencia del modelo de ratón G938D/+, y recapituló el vEDS, y la mediana de supervivencia fue de 45 días, p<0,0001.

- 45 En ninguno de los dos modelos de ratón se observó evidencia de aneurisma de la raíz aórtica mediante ecocardiografía.

Ejemplo 3: Las anomalías de señalización fueron mediadoras de la patología de la enfermedad en el vEDS.

- Se planteó la hipótesis de que las anomalías de señalización podrían ser los principales mediadores de la patología de la enfermedad en el vEDS. Para probar esta hipótesis, se realizó RNA-seq en las aortas torácicas descendentes proximales de tres ratones *Col3a1* G209S/+, tres ratones *Col3a1* G938D/+ y tres ratones *Col3a1* +/+ (tipo salvaje), dado que la aorta descendente proximal es la localización más común de la disección aórtica en este modelo. Se realizó una agrupación jerárquica no supervisada utilizando los genes más expresados diferencialmente (FDR <0,10). Las muestras de vEDS se agruparon por separado de los controles (Figura 1D), lo que indica diferencias significativas en el transcriptoma de las aortas de vEDS.

- 55 El análisis de redes indicó que las aortas vEDS mostraban firmas de expresión génica para elevaciones en la actividad de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) [P38, JNK, AKT, ERK, ERK1/2] (Figura 1E).

Por otra parte, el análisis corriente arriba predijo que las diferencias transcripcionales en las aortas vEDS eran impulsadas por la activación del receptor acoplado a proteína G (GPCR), que señala a través del eje PLC/IP3/PKC/ERK relacionado (Figura 1F).

5 La firma de elevaciones en la señalización GPCR y MAPK se confirmó mediante inmunotransferencia para marcadores de señalización activa a través de esta ruta, y se encontró que la fosforilación ERK1/2 y la fosforilación PKC eran significativamente mayores en las aortas vEDS (Figura 1G).

10 En contraste con el síndrome de Marfan (MFS) o el síndrome de Loeys-Dietz (LDS), el perfil de expresión de la aorta vEDS no muestra un repertorio sintético típico de alta señalización TGF β , sin embargo, se observó evidencia de aumento de la activación ERK (similar a MFS y LDS). Un pequeño estudio en humanos sugirió que el betabloqueante celiprolol tiene el potencial de retrasar los acontecimientos adversos en pacientes con vEDS, mientras que los bloqueadores de los receptores de angiotensina, tales como el losartán, ofrecen una protección espectacular en modelos de ratón de MFS o vEDS.

15 Por otra parte, no hay pruebas de protección frente a la disección o la muerte en los ratones con vEDS tratados con losartán, mientras que el celiprolol se asocia con una aceleración significativa de la disección y la muerte en ambos modelos de vEDS; ambos fármacos lograron la disminución prevista del estrés hemodinámico. Aunque los primeros datos muestran que la hidralazina, que inhibe el eje PLC/IP3/PKC/ERK, ofrece cierta protección en ratones con vEDS, estos datos ponen de relieve la necesidad de procedimientos basados en descubrimientos para revelar estrategias terapéuticas imprevistas.

20 Las mutaciones vEDS se introdujeron en fondos puros 129 y BL6 para evaluar la modulación de la severidad fenotípica. Ambas mutaciones están asociadas a la muerte prematura por disección aórtica en el fondo BL6. De forma bastante notable, el fondo 129 condujo a una protección completa frente a la disección para ambos genotipos vEDS, con una esperanza de vida totalmente normal. El rescate se asocia con la normalización de los perfiles de expresión génica de la pared aórtica. Estos datos justifican e incentivan la realización de estudios genéticos para identificar la fuente y el mecanismo de modificación en ratones vEDS, con la esperanza y la intención de imitar las estrategias de éxito de la naturaleza mediante agentes farmacológicos.

Ejemplo 4: La inhibición farmacológica del eje PLC/IP3/PKC/ERK disminuyó el riesgo de rotura aórtica en ratones vEDS.

Dado que se ha demostrado que la activación del eje PLC/IP3/PKC/ERK es patogénica en el MFS⁷, se planteó la hipótesis de que la inhibición farmacológica de este eje disminuiría el riesgo de rotura aórtica en ratones vEDS.

30 El antagonista farmacológico de ERK aumentó la supervivencia

35 Se probaron antagonistas farmacológicos de ERK para apoyar el papel de la activación de ERK en la patogénesis de vEDS y como un procedimiento para identificar estrategias terapéuticas para vEDS. Los ratones fueron tratados con cobimetinib [GDC-0973, RO5514041] (2 mg/kg/día), un inhibidor de MEK, la cinasa que activa ERK⁸, aprobado por la FDA. Se planteó la hipótesis de que si la activación de ERK era realmente la causa del riesgo de enfermedad, la inhibición de ERK rescataría el riesgo de muerte por disección aórtica.

De acuerdo con esta hipótesis, se observó una supervivencia del 94 % después de 45 días de tratamiento, en comparación con sólo el 55 % de supervivencia sin tratamiento (Figura 2A).

La inhibición farmacológica de la PKC aumentó la supervivencia

40 A continuación, se realizaron estudios adicionales para probar agentes que inhiben la activación de la PKC. Los ratones fueron tratados con ruboxistaurina [LY 333531] (10 mg/kg/día), un agente farmacológico bien tolerado administrado por vía oral que inhibe específicamente la PKC beta⁹. Se planteó la hipótesis de que si la activación de ERK, y de este modo el riesgo de enfermedad, se debía a la activación de PLC/IP3/PKC, un inhibidor farmacológico de PKC también reduciría el riesgo de muerte por disección aórtica.

45 De acuerdo con esta hipótesis, se observó un 100 % de supervivencia tras 39 días de tratamiento, en comparación con sólo un 55 % de supervivencia sin tratamiento (Figura 2B).

Los agentes que inhiben la cascada de señalización PLC/IP3/PKC/ERK aumentaron la supervivencia

50 Se realizaron estudios adicionales para probar otros medicamentos que inhiben esta cascada de señalización. Los ratones fueron tratados mediante la administración de hidralazina (32 mg/kg/día), que bloquea el eje PLC/IP3/PKC/ERK, con la hipótesis de que esta medicación se dirigiría a la misma ruta y, de este modo, proporcionaría una protección similar¹⁰. Se observó una notable protección, un 98 % de supervivencia a los 45 días de edad, la mediana de supervivencia de un ratón vEDS no tratado (Figura 2C).

Si bien la supervivencia se vio afectada en la pubertad, este riesgo se observó casi exclusivamente en ratones macho y, por lo tanto, el tratamiento con un antagonista de andrógenos puede ser beneficioso para estos ratones.

Por otra parte, la dosis de hidralazina puede ser insuficiente para inhibir completamente esta ruta en este modelo de ratón, y una dosis mayor de hidralazina puede resultar beneficiosa.

Los ratones son tratados con una terapia combinada de hidralazina y un antagonista androgénico.

Por otra parte, los ratones son tratados con dosis más altas de hidralazina.

- 5 Estos resultados sugieren que la inhibición de la señalización PLC/IP3/PKC/ERK excesiva en la aorta rescata el riesgo de muerte por disección aórtica en el modelo de ratón de vEDS.

Ejemplo 5: La señalización ERK inducida por la oxitocina activó el eje PLC/IP3/PKC/ERK y empeoró el riesgo de disección aórtica

- 10 Los pacientes con síndrome de Ehlers Danlos vascular (vEDS) experimentan disección de arterias medianas a grandes. Muchas características del vEDS son claramente diferentes de otras vasculopatías hereditarias, tales como el síndrome de Marfan (MFS) y el síndrome de Loeys-Dietz (LDS), que se han asociado a una actividad excesiva del TGF β . Entre ellas se incluyen la ausencia de predisposición particular a la afectación de la raíz aórtica y la disección sin dilatación previa del vaso. La rotura vascular en pacientes con vEDS es difícil de prever o prevenir. Concretamente, la preñez aumenta el riesgo de disección, con complicaciones en más del 50 % de los embarazos y muerte en aproximadamente el 12-25 % de los embarazos. La aparición predominante de disección vascular posparto no es coherente con un mecanismo que invoque singularmente el estrés hemodinámico. En su lugar, se planteó la hipótesis de que la oxitocina, una hormona que inicia la contracción uterina y se mantiene después del parto durante la lactancia, puede contribuir al riesgo asociado al embarazo. La expresión del receptor de oxitocina se induce en la aorta durante la preñez y la hormona estimula los tejidos periféricos a través de la activación de ERK, una cascada de señalización previamente implicada en la patogénesis del MFS y el LDS.

Anteriormente, se demostró que la disección aórtica asociada al embarazo es impulsada en gran medida por la liberación de oxitocina asociada a la lactancia y la señalización ERK inducida por oxitocina en aortas¹¹ de ratones MFS. Por tanto, la señalización ERK inducida por oxitocina se utilizó como procedimiento para comprobar si la activación del eje PLC/IP3/PKC/ERK empeoraría el riesgo de disección aórtica.

- 25 En el modelo de ratón vEDS, se identificó que la preñez y la lactancia estaban asociados con un 60 % de letalidad debido a la disección arterial en los primeros 30 días postparto en ratones vEDS (Figura 3A). Asimismo, la prevención de la lactancia mediante la retirada de la cría tras el nacimiento pudo evitar la disección y la muerte en los ratones vEDS (100 % de supervivencia, figura 3B). Además, se consiguió una supervivencia casi completa (95 %) con el tratamiento con hidralazina (16 mg/kg/día), que bloquea el eje PLC/IP3/PKC/ERK activado por la oxitocina (Figura 3C). Se observó una protección similar (supervivencia del 95 %) con el tratamiento con trametinib [GSK-1120212] (1 mg/kg/día), un inhibidor de MEK, la cinasa que activa ERK, aprobado por la FDA (Figura 3D).

- 35 Este aumento del riesgo de muerte se correlacionó con un aumento de la activación de ERK, mientras que la protección frente a la disección aórtica se correlacionó con una disminución de la activación de ERK, medida por inmunotransferencia y por la expresión de genes diana de ERK (Figura 3E y Figura 3F). Estos datos apoyan además que el aumento de la activación de la ruta de señalización PLC/IP3/PKC/ERK conduce a un riesgo significativamente elevado de muerte por disección aórtica en el modelo de ratón de vEDS y, además, la inhibición de la ruta de señalización PLC/IP3/PKC/ERK mejora este riesgo.

Ejemplo 6: composiciones y métodos para el tratamiento del síndrome de Ehlers Danlos vascular y trastornos asociados

- 40 El uso tanto de antagonistas farmacológicos MEK/ERK como de antagonistas PKC rescata el riesgo de muerte por disección aórtica, demostrando que la activación ERK dependiente de PKC es un componente crítico de la enfermedad aórtica en vEDS y que dirigirse a esta ruta de señalización es beneficioso para reducir la enfermedad aórtica en modelos de ratón vEDS.

- 45 Aquí se demuestra que la inhibición farmacológica de PKC β utilizando un segundo inhibidor específico de PKC β , enzastaurina (60 mg/kg/d), también rescató el riesgo de muerte por disección aórtica, con un 80 % de ratones vEDS tratados con enzastaurina que sobrevivieron después de 40 días de tratamiento en comparación con sólo el 50 % de ratones vEDS no tratados (p=0,0305, **Figura 16A**). Esto proporciona más pruebas de que la fosforilación de PKC β es un componente crítico de la enfermedad aórtica en ratones vEDS.

- 50 Dado que en la presente memoria se identificó que la activación de la ruta de señalización PLC/IP3/PKC/ERK es patogénica en vEDS, se examinó la identidad del receptor que podría estar activando esta ruta de señalización anormal. Los GPCR (Gq) envían señales a través de esta ruta: los receptores Gq habituales en la aorta son el receptor de angiotensina II, el receptor de trombina, el receptor de endotelina-1, el receptor de vasopresina 1, el receptor de esfingosina-1-fosfato, el receptor adrenérgico alfa-1 y el receptor de serotonina. Sin embargo, también hay GPCR huérfanos, como el GPR56, que ha demostrado interactuar con el colágeno 33,4, que también se expresan en la aorta.

Sin querer estar limitado por la teoría, se planteó la hipótesis de que si se inhibe el receptor que está anormalmente activado, se podría identificar exactamente cómo se está activando la ruta de señalización. Además, los ratones fueron tratados con bosentán (100 mg/kg/d), un antagonista inespecífico de los receptores de endotelina biodisponible por vía oral. El tratamiento con bosentán condujo a una supervivencia del 80 % tras 40 días de tratamiento, frente a una supervivencia de sólo el 50 % en los ratones vEDS no tratados ($p=0,0298$, **Figura 16B**). Esto sugiere que la señalización del receptor de endotelina contribuye a la patogénesis del vEDS.

El uso tanto de antagonistas farmacológicos MEK/ERK como de antagonistas PKC rescata el riesgo de muerte por disección aórtica, demostrando que la activación ERK dependiente de PKC es un componente crítico de la enfermedad aórtica en vEDS y que dirigirse a esta ruta de señalización es beneficioso para reducir la enfermedad aórtica en modelos de ratón vEDS. A continuación se trató de identificar pruebas de que esta ruta de señalización está elevada en muestras de tejido vascular de pacientes humanos con vEDS. Tanto la fosforilación de PKC (**Figura 17**) como la de ERK1/2 (**Figura 18**) se identificaron en dos muestras de tejido (arteria ilíaca y aorta torácica descendente) de pacientes con vEDS. Ninguna de estas proteínas fosforiladas se observó en una muestra de tejido tomada de la aorta ascendente de una persona sin vEDS.

Conclusiones

En conjunto, los resultados proporcionan la primera evidencia de una anomalía de señalización abordable que contribuye a la patogénesis del vEDS. Estos datos apoyan la hipótesis de que el aumento de la señalización PLC/IP3/PKC está impulsando el aumento de la activación MAPK/ERK, lo que a su vez aumenta el riesgo de muerte por disección aórtica en modelos de ratón vEDS.

Se demostró que la inhibición de la activación de ERK a través de la inhibición farmacológica de MEK, el activador de ERK, o la inhibición farmacológica de PKC, o la inhibición farmacológica del eje PLC/IP3/PKC/ERK es suficiente para rescatar la muerte por disección aórtica. Los agentes que inhiben esta ruta proporcionarán beneficios terapéuticos para el síndrome de Ehlers Danlos vascular y potencialmente para otros trastornos del tejido conectivo.

Por otra parte, el activador PLC/IP3/PKC/ERK podría mostrar una regulación al alza coordinada en aortas vEDS, lo que se comprueba mediante análisis de candidatos que surgen de los perfiles RNA-Seq.

Referencias

1. Pepin M, Schwarze U, Superti-Furga A, Byers PH. Clinical and Genetic Features of Ehlers-Danlos Syndrome Type IV, the Vascular Type. *N Engl J Med.* 2000;342(10):673-680. doi:10.1056/NEJM200003093421001.

2. Pepin MG, Schwarze U, Rice KM, Liu M, Leistriz Dru, Byers PH. Survival is affected by mutation type and molecular mechanism in vascular Ehlers-Danlos syndrome (EDS type IV). *Genet Med.* 2014;16(12):881-888. doi:10.1038/gim.2014.72.

3. Habashi JP, Judge DP, Holm TM, et al. Losartan, an AT1 Antagonist, Prevents Aortic Aneurysm in a Mouse Model of Marfan Syndrome. *Science (80-).* 2006;312(5770):117-121. doi:10.1126/science.1124287.

4. Holm TM, Habashi JP, Doyle JJ, et al. Noncanonical TGF β signaling contributes to aortic aneurysm progression in Marfan syndrome mice. *Science.* 2011;332(6027):358-361. doi:10.1126/science.1192149.

5. Habashi JP, Doyle JJ, Holm TM, et al. Angiotensin II Type 2 Receptor Signaling Attenuates Aortic Aneurysm in Mice Through ERK Antagonism. *Science (80-).* 2011;332(6027):361-365. doi:10.1126/science.1192152.

6. Judge DP, Biery NJ, Keene DR, et al. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114(2). doi:10.1172/JCI200420641.

7. Doyle JJ, Doyle AJ, Wilson NK, et al. A deleterious gene-by-environment interaction imposed by calcium channel blockers in Marfan syndrome. *Elife.* 2015;4. doi:10.7554/eLife.08648.

8. Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, et al. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med.* 2014;371(20):1867-1876. doi:10.1056/NEJMoa1408868.

9. PKC-DRS2 Grupo L, Aiello LP, Davis MD, et al. Effect of ruboxistaurin on visual loss in patients with diabetic retinopathy. *Ophthalmology.* 2006;113(12):2221-2230. doi:10.1016/j.optha.2006.07.032.

10. Gurney AM, Allam M. Inhibition of calcium release from the sarcoplasmic reticulum of rabbit aorta by hydralazine. *Br J Pharmacol.* 1995;114(1):238-244. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7712024>. Consultado el 24 de septiembre de 2018.

11. Habashi JP, Gallo EM, Bagirzadeh R, et al. Oxytocin Antagonism Prevents Pregnancy-Associated Aortic Dissection in a Mouse Model of Marfan Syndrome.; 2018.

Ejemplo 7: Los andrógenos desempeñaron un papel significativo en el riesgo de disección aórtica y en la terapia combinado con hidralazina.

La inhibición farmacológica de PKCβ impidió la autofosforilación de PKC así como la fosforilación de ERK en la pared aórtica (Figura 4A-4C), como se evaluó por inmunotransferencia de lisados aórticos. La inhibición farmacológica de MEK se correlacionó con la esperada reducción de la fosforilación de ERK, el sustrato corriente abajo de MEK, pero curiosamente también redujo la fosforilación de PKC, lo que sugiere la presencia de un bucle de retroalimentación positiva (Figura 1, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Ni el cobimetinib ni la ruboxistaurina tuvieron efecto sobre la presión arterial.

Terapia combinada de hidralazina y bicalutamida para el tratamiento del vEDS

El tratamiento de los ratones con hidralazina (32 mg/kg/día), que bloquea el eje PLC/IP3/PKC/ERK, proporciona una protección notable: 98 % de supervivencia a los 45 días de edad, la mediana de supervivencia para un ratón vEDS no tratado. Aunque la supervivencia se vio afectada en la pubertad, este riesgo se observó casi exclusivamente en ratones macho (Figura 2A y 2B), por lo que se planteó la hipótesis de que el tratamiento con un antagonista de los andrógenos podría ser beneficioso para estos ratones. De hecho, la combinación de hidralazina (32 mg/kg/día) con bicalutamida (50 mg/kg/día) condujo a una supervivencia del 90 % en ratones macho, frente a una supervivencia de sólo el 24 % en ratones macho tratados únicamente con hidralazina (Figura 6).

Curiosamente, si se retiraba la bicalutamida después de la pubertad (a los 90 días de vida), los ratones macho seguían sobreviviendo al mismo ritmo mientras seguían recibiendo hidralazina (Figura 6), lo que sugiere que había una dependencia temporal de la sensibilidad a los andrógenos en este modelo de ratón. Informativamente, los ratones macho tratados únicamente con bicalutamida dieron lugar a una supervivencia intermedia del ~80 % y los machos no siguieron sobreviviendo tras la retirada de la bicalutamida después de la pubertad (Figura 7), lo que sugiere que la inhibición de la señalización androgénica por sí sola no fue suficiente para prevenir la enfermedad aórtica en los modelos de ratón de vEDS.

Terapia combinada de hidralazina y espironolactona para el tratamiento del vEDS

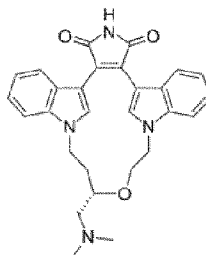
Estas nuevas observaciones y la comprensión de que los andrógenos desempeñan un papel importante en el riesgo de disección aórtica en nuestros modelos de ratón vEDS llevaron a probar otro medicamento aprobado por la FDA en combinación con hidralazina. La espironolactona es un medicamento diurético aprobado por la FDA que tiene como efecto secundario el antagonismo directo de los andrógenos. La espironolactona se utiliza fuera de etiqueta para tratar específicamente el acné, el hirsutismo y otros trastornos andrógeno-dependientes¹. Se planteó la hipótesis de que la espironolactona también podría utilizarse como antagonista androgénico directo en este trastorno.

Los ratones fueron tratados con espironolactona sola (100 mg/kg/d) (Figura 8A) y se observó una supervivencia intermedia de ~80 %, similar a la bicalutamida sola. Sin embargo, la combinación de espironolactona (100 mg/kg/día) e hidralazina (32 mg/kg/día) condujo a una supervivencia del 100 % tras 50 días de tratamiento, similar a la combinación de hidralazina y bicalutamida (Figura 8B).

Terapia combinada de hidralazina y ruboxistaurina para el tratamiento de vEDS

En algunos ejemplos, se contempla la terapia combinada que comprende la administración de hidralazina y ruboxistaurina. La ruboxistaurina es un inhibidor de la proteína cinasa C-beta (PKC-β) y un compuesto macrocíclico de bisindolilmaleimida que Eli Lilly está desarrollando con potencial terapéutico para el edema macular diabético y otras angiopatías diabéticas, como la retinopatía diabética, la neuropatía periférica diabética y la nefropatía diabética. La nomenclatura adicional de la ruboxistaurina incluye Arxxant (marca comercial propuesta), IUPAC: (9S)-9-[(dimetilamino)metil]-6,7,10,11-tetrahidro-9H,18H-5,21:12,17-di(meteno)dibenzo[e,k]pirrolo[3,4-h][1,4,13]oxadiazaciclohexadecina-18,20-diona, y Número CAS: 169939-94-0

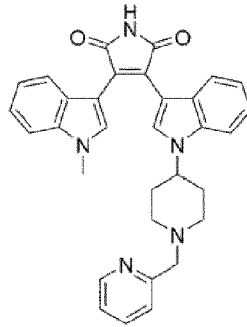
A continuación se presenta la estructura de la ruboxistaurina:



Terapia combinada de hidralazina y enzastaurina para el tratamiento del SEDV

5 En ejemplos, se contempla la terapia combinada que comprende la administración de hidralazina y enzastaurina. La enzastaurina es una bisindolilmaleimida sintética con potencial actividad antineoplásica. Al unirse al sitio de unión al ATP, la enzastaurina inhibe selectivamente la proteína cinasa C beta (PKC-β), una enzima implicada en la inducción de la neoangiogénesis estimulada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Este agente puede disminuir el riego sanguíneo del tumor, impidiendo su crecimiento. La nomenclatura adicional de la enzastaurina incluye: LY-317615, IUPAC 3-(1-metilindol-3-il)-4-[1-[1-(piridin-2-ilmetil)piperidin-4-il]indol-3-il]pirrol-2,5-diona, y Número CAS: 170364-57

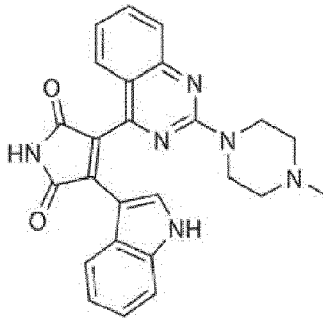
A continuación se presenta la estructura de la enzastaurina:



10 Terapia combinada de hidralazina y sotrastaurina para el tratamiento del vEDS

En algunos ejemplos, se contempla la terapia combinada que comprende la administración de hidralazina y sotrastaurina. La sotrastaurina (EAB071) es un inmunosupresor en fase de investigación que bloquea la activación de los linfocitos T mediante la inhibición de la proteína cinasa C.

A continuación se presenta la estructura de la sotrastaurina:



15 Terapia combinada de hidralazina y antiandrógenos para el tratamiento del vEDS

20 Se prueban combinaciones adicionales de hidralazina y diferentes antiandrógenos. Por ejemplo, se contemplan la hidralazina y los antagonistas de los receptores androgénicos, incluidos los antiandrógenos esteroideos (acetato de ciproterona, acetato de megestrol, acetato de clormadinona, oxendolona y acetato de osaterona). Además, se contempla la hidralazina en combinación con antiandrógenos no esteroideos como flutamida, nilutamida, topilutamida, enzalutamida, drospironona o medrogestona).

25 En otros ejemplos, se contempla una terapia combinada que comprende hidralazina e inhibidores de la síntesis de andrógenos o antigonadotropinas. Los inhibidores de la síntesis de andrógenos ejemplares incluyen ketoconazol, acetato de abiraterona, seviteronel, aminoglutetimida, finasterida, dutasterida, epristerida y alfatradiol. Algunos ejemplos de antigonadotropinas son la leuprorelina y el cetorelix. Otros antiandrógenos contemplados son el etinilestradiol y el dietilestilbestrol.

Aumento de la dosis de hidralazina

30 Además, la dosis de hidralazina puede ser insuficiente para inhibir completamente esta ruta en este modelo de ratón, y que una dosis más alta de hidralazina puede resultar beneficiosa. Así, estos ratones fueron tratados con dosis más altas de hidralazina, y se comprobó que una dosis mayor de hidralazina (50 mg/kg/d) no mejoraba la supervivencia más de lo que lo hacía la dosis de 32 mg/kg/d (Figura 9).

Ejemplo 8: Señalización inducida por la oxitocina

La señalización ERK inducida por oxitocina se utilizó como procedimiento para probar la hipótesis de que la activación del eje PLC/IP3/PKC/ERK empeoraría el riesgo de disección aórtica. En el modelo de ratón vEDS

descrito en la presente memoria, se observó que la preñez y la lactancia estaban asociados con un 60 % de letalidad debida a la disección arterial en los primeros 30 días postparto en ratones vEDS, y la prevención de la lactancia mediante la extracción de la cría tras el nacimiento, el tratamiento con hidralazina (16 mg/kg/d), o el tratamiento con trametinib, fue capaz de prevenir la disección y la muerte en ratones vEDS. Este mayor riesgo de muerte se correlacionó con un aumento de la activación de ERK, mientras que la protección frente a la disección aórtica se correlacionó con una disminución de la activación de ERK, medida mediante inmunotransferencia y mediante la expresión de genes diana de ERK.

Se agregó el tratamiento de ratones con un antagonista específico del receptor de oxitocina² (el antagonista selectivo del receptor de oxitocina utilizado fue des Gly-NH₂,d(CH₂)₅[D-Tyr₂,Thr₄]OVT), que condujo a una supervivencia del 95 % en los primeros 30 días posparto en ratones vEDS que seguían lactando, demostrando que el riesgo significativamente elevado de muerte por disección aórtica con la preñez estaba impulsado específicamente por la activación del receptor de oxitocina durante la lactancia (Figura 10A y 10B).

Además, se demostró que el tratamiento con propranolol (Figura 10B), que es el estándar de atención en esta población y disminuye la presión arterial sin afectar la señalización PLC/IP3/PKC/ERK no afectó la supervivencia (46 % de supervivencia vs. 50 % de supervivencia después de 30 días posparto) en este modelo de preñez/lactancia. Estos datos apoyan además que el aumento de la activación de la ruta de señalización PLC/IP3/PKC/ERK conduce a un riesgo significativamente elevado de muerte por disección aórtica en este modelo de ratón de vEDS, y además, la inhibición de la ruta de señalización PLC/IP3/PKC/ERK mejora este riesgo.

Los GPCR activaron las vías de señalización PLC/IP3/PKC/ERK

Dado que se identificó que la activación de la ruta de señalización PLC/IP3/PKC/ERK era patogénica en vEDS, se identificó un receptor que podría estar activando esta ruta de señalización anormal. Los GPCR (Gq) envían señales a través de esta ruta: los receptores Gq habituales en la aorta son el receptor de angiotensina II, el receptor de trombina, el receptor de endotelina-1, el receptor de vasopresina 1, el receptor de esfingosina-1-fosfato, el receptor adrenérgico alfa-1 y el receptor de serotonina. Sin embargo, también hay GPCR huérfanos, tales como el GPR56, que ha demostrado interactuar con el colágeno 3^{3,4}, que también se expresan en la aorta.

Se planteó la hipótesis de que si se inhibe la actividad del receptor, se identificaría cómo podría activarse la ruta de señalización. Primero se inhibió la señalización de la angiotensina-II tratando a los ratones con un antagonista del receptor de la angiotensina, el losartán (60 mg/kg/d) (Figura 11A), pero se comprobó que no tenía ningún efecto sobre la supervivencia. A continuación, se trató a los ratones con un antagonista de los receptores de trombina, vorapaxar (1 mg/kg/d), pero se comprobó que tampoco tenía ningún efecto sobre la supervivencia (Figura 11B).

Se prueban otros inhibidores específicos del receptor Gq. Algunos inhibidores de receptores Gq ejemplares que se prueban son el receptor de endotelina-1, el receptor de vasopresina 1, el receptor de esfingosina-1-fosfato, el receptor adrenérgico alfa-1, el receptor de serotonina y GPCR huérfanos como el GPR56.

Los receptores tirosina cinasa y la vía de señalización PLC/IP3/PKC/ERK

La ruta de señalización PLC/IP3/PKC/ERK también puede ser transactivada por receptores tirosina cinasa expresados en la aorta. Entre ellos se incluyen EGFR, VEGFR, FGFR y PDGFR. Para probar la hipótesis de que se estaba activando anormalmente un receptor de tirosina cinasa y provocando elevaciones en la ruta de señalización PLC/IP3/PKC/ERK, se trató con un antagonista inespecífico del receptor de tirosina cinasa, nintedanib (50 mg/kg/día), pero se comprobó que tampoco tenía impacto en la supervivencia (Figura 12). Esto sugería que la activación del receptor tirosina cinasa no impulsaba la activación de la ruta de señalización PLC/IP3/PKC/ERK en los ratones vEDS.

Bloqueadores de los receptores beta-adrenérgicos y el riesgo de rotura aórtica

Otros han propuesto⁵⁻⁸ que los fenotipos vEDS son el resultado de un tejido crónicamente "débil" y, por lo tanto, proponen que la disminución de la presión arterial con bloqueadores de los receptores beta-adrenérgicos debería disminuir el riesgo de rotura aórtica en estos pacientes. Para abordar esta hipótesis, los ratones con un β antagonista no específico, propranolol (80 mg/kg/d), un β1 antagonista específico, atenolol (120 mg/kg/d), y un β1 antagonista/agonista, celiprolol (200 mg/kg/d), pero se encontró que ninguna de estas manipulaciones conducen a una mejora en la supervivencia en nuestros modelos de ratón vEDS (Figura 13A-13C) a pesar de disminuciones en la presión arterial. El celiprolol incluso aceleró el riesgo de disección aórtica en los modelos de ratón, y la mutación vEDS con la mutación Col3a1^{G209S/+} también demostró un mayor riesgo de disección aórtica con celiprolol (Figura 14). Dado que esto no era común a todos los antagonistas β, esta observación podría deberse a la actividad agonista β2 del celiprolol.

También se probaron los bloqueadores de los canales de calcio, que reducen la presión arterial por otro mecanismo. Se descubrió que el amlodipino (12mg/kg/d) también aumentaba el riesgo de disección aórtica en el modelo de ratón, y se ha demostrado que esto también es consistente con los ratones MFS (Síndrome de Marfan)⁹ (Figura 15).

(Referencias)**Ejemplo 9: Tratamiento del síndrome de Marfan con inhibidores de la proteína cinasa C-beta (PKC-β).**

En los ejemplos, se utilizan diferentes inhibidores de PKC-β para el tratamiento del síndrome de Marfan. Por ejemplo, el tratamiento del síndrome de Marfan puede incluir la administración de ruboxistaurina. Aquí se demuestra que la inhibición farmacológica de la PKCβ utilizando ruboxistaurina (10 mg/kg/d), rescató el crecimiento de la raíz aórtica en ratones con síndrome de Marfan, ($p=2E-4$, **Figura 19**). En otros ejemplos, el tratamiento del síndrome de Marfan incluye la administración de enzastaurina o sotrastaurina.

Terapia combinada de hidralazina y antiandrógenos para el tratamiento del vEDS

Se prueban combinaciones adicionales de hidralazina y diferentes antiandrógenos. Por ejemplo, se contemplan la hidralazina y los antagonistas de los receptores androgénicos, incluidos los antiandrógenos esteroideos (acetato de ciproterona, acetato de megestrol, acetato de clormadinona, oxendolona y acetato de osaterona). Por otra parte, se contempla la hidralazina en combinación con antiandrógenos no esteroideos como flutamida, nilutamida, topilutamida, enzalutamida, drospirenona o medrogestona.

En otros ejemplos, se contempla una terapia combinada que comprende hidralazina e inhibidores de la síntesis de andrógenos o antigonadotropinas. Los inhibidores de la síntesis de andrógenos ejemplares incluyen ketoconazol, acetato de abiraterona, seviteronel, aminoglutetimida, finasterida, dutasterida, epristerida y alfatradiol. Algunos ejemplos de antigonadotropinas son la leuprorelina y el cetorelix. Otros antiandrógenos contemplados son el etinilestradiol y el dietilestilbestrol.

Ejemplo 10: La inhibición farmacológica aumenta la supervivencia en ratones vEDS.La inhibición farmacológica de la PKC con enzastaurina aumenta la supervivencia en ratones con vEDS

Ambos modelos de ratón *Col3a1* G209S/+ y *Col3a1* G938D/+ recapitulaban los fenotipos de vEDS y se utilizan para probar agentes para el tratamiento de vEDS. Los ratones se tratan con un agente bien tolerado administrado por vía oral, la enzastaurina, a aproximadamente 30 mg/kg/día. Al unirse al sitio de unión al ATP, la enzastaurina inhibe selectivamente la proteína cinasa C beta (PKC-β), por lo que se plantea la hipótesis de que un inhibidor farmacológico de la PKC rescatará el riesgo de muerte por disección aórtica. Se observa una tasa de supervivencia de aproximadamente el 100 % tras aproximadamente 30 días (1 mes) de tratamiento, en comparación con una tasa de supervivencia significativamente menor en los ratones sin tratamiento (por ejemplo, una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los ratones de control).

Los ratones también se tratan durante al menos aproximadamente 45 días y se evalúa la tasa de supervivencia de los ratones tratados con enzastaurina con respecto a los ratones de control.

Los ratones también son tratados con dosis más altas de enzastaurina, por ejemplo, aproximadamente 40 mg/kg/día, 50 mg/kg/día, o 100 mg/kg/día. En otros ejemplos, los ratones se tratan una o dos veces al día con enzastaurina.

Estos resultados sugieren que la inhibición de la señalización PLC/IP3/PKC/ERK excesiva con enzastaurina en la aorta rescata el riesgo de muerte por disección aórtica en el modelo de ratón de vEDS.

La inhibición farmacológica de la PKC con sotrastaurina aumenta la supervivencia en ratones con vEDS

Estudios adicionales utilizando los modelos de ratón descritos en la presente memoria (por ejemplo, los modelos de ratón *Col3a1* G209S/+ y *Col3a1* G938D/+) se utilizan para probar agentes adicionales para el tratamiento del vEDS. Se evalúan ratones tratados con un agente bien tolerado administrado por vía oral, la sotrastaurina, a aproximadamente 30 mg/kg/día. La sotrastaurina (AEB071) es un inmunosupresor que bloquea la activación de los linfocitos T mediante la inhibición de la proteína cinasa C. De forma similar a la enzastaurina, se plantea la hipótesis de que un inhibidor de la PKC (por ejemplo, la sotrastaurina) también rescatará el riesgo de muerte por disección aórtica. Se observa una tasa de supervivencia de aproximadamente el 100 % tras aproximadamente 30 días (1 mes) de tratamiento, en comparación con una tasa de supervivencia significativamente menor en los ratones sin tratamiento (por ejemplo, una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los ratones de control). También se trata a los ratones durante al menos aproximadamente 45 días y se evalúa la tasa de supervivencia de los ratones tratados con sotrastaurina con respecto a los ratones de control.

Los ratones también son tratados con dosis más altas de sotrastaurina, por ejemplo, aproximadamente 40 mg/kg/día, 50 mg/kg/día, o 100 mg/kg/día. En otros ejemplos, los ratones se tratan una o dos veces al día con sotrastaurina.

Estos resultados proporcionan pruebas de que la inhibición de la señalización PLC/IP3/PKC/ERK excesiva con sotrastaurina en la aorta rescata el riesgo de muerte por disección aórtica en el modelo de ratón de vEDS.

Referencias

1. Zaenglein AL. Acne Vulgaris. Solomon CG, ed. N Engl J Med. 2018;379(14):1343-1352
2. Manning M, Misicka A, Olma A, et al. Oxytocin and Vasopressin Agonists and Antagonists as Research Tools and Potential Therapeutics. J Neuroendocrinol. 2012;24(4):609-628
- 5 3. Luo R, Jin Z, Deng Y, Strokes N, Piao X. Disease-Associated Mutations Prevent GPR56-Collagen III Interaction. Mei L, ed. PLoS One. 2012;7(1):e29818
4. Luo R, Jeong S-J, Yang A, et al. Mechanism for Adhesion G Protein-Coupled Receptor GPR56-Mediated RhoA Activation Induced By Collagen III Stimulation. 2014.
- 10 5. Ong KT, Perdu J, De Backer J, et al. Effect of celiprolol on prevention of cardiovascular events in vascular Ehlers-Danlos syndrome: A prospective randomised, open, blinded-endpoints trial. Lancet. 2010;376(9751):1476-1484
6. D'hondt S, Guillemyn B, Syx D, et al. Type III collagen affects dermal and vascular collagen fibrillogenesis and tissue integrity in a mutant Col3a1 transgenic mouse model. Matrix Biol. 2018;70:72-83
- 15 7. Briest W, Cooper TK, Tae H-J, Krawczyk M, McDonnell NB, Talan MI. Doxycycline ameliorates the susceptibility to aortic lesions in a mouse model for the vascular type of Ehlers-Danlos syndrome. J Pharmacol Exp Ther. 2011;337 (3).
8. Shalhub S, Black JH, Cecchi AC, et al. Molecular diagnosis in vascular Ehlers-Danlos syndrome predicts pattern of arterial involvement and outcomes. J Vase Surg.
9. Doyle JJ, Doyle AJ, Wilson NK, et al. A deleterious gene-by-environment interaction imposed by calcium channel blockers in Marfan syndrome. Elife. 2015;4

20 **Otras realizaciones**

Aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

25 La literatura científica y de patentes a la que se hace referencia en la presente memoria establece los conocimientos disponibles para los expertos en la técnica.

Mientras que esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a las realizaciones preferidas de la misma, se entenderá por los expertos en la técnica que los diversos cambios en la forma y los detalles se pueden hacer en el mismo sin apartarse del alcance de la invención abarcada por las reivindicaciones adjuntas.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de tratamiento del síndrome de Ehlers-Danlos vascular (VEDS), la composición que comprende una cantidad eficaz de un agente, en la que el agente disminuye la actividad o expresión de la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) o proteína cinasa C (PKC) y en la que el agente se selecciona de ruboxistaurina, enzastaurina, sotrastaurina, o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas.
2. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el agente comprende una cantidad eficaz de enzastaurina.

FIG. 1A

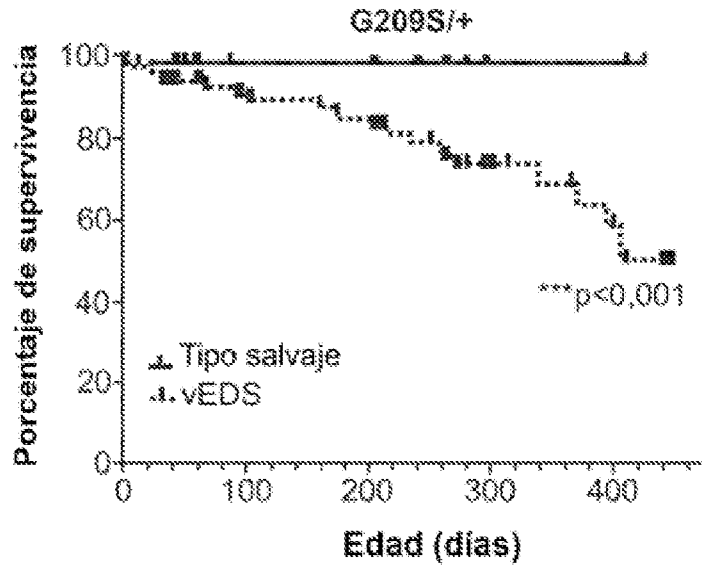


FIG. 1B

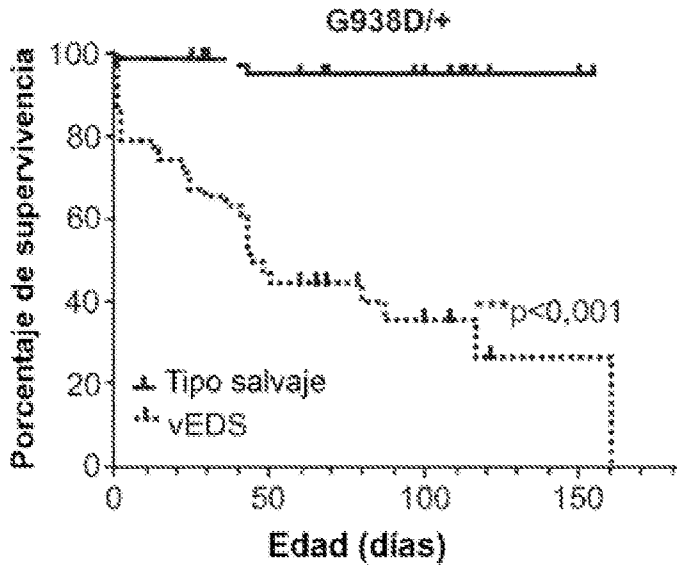


FIG. 1C



FIG. 1D

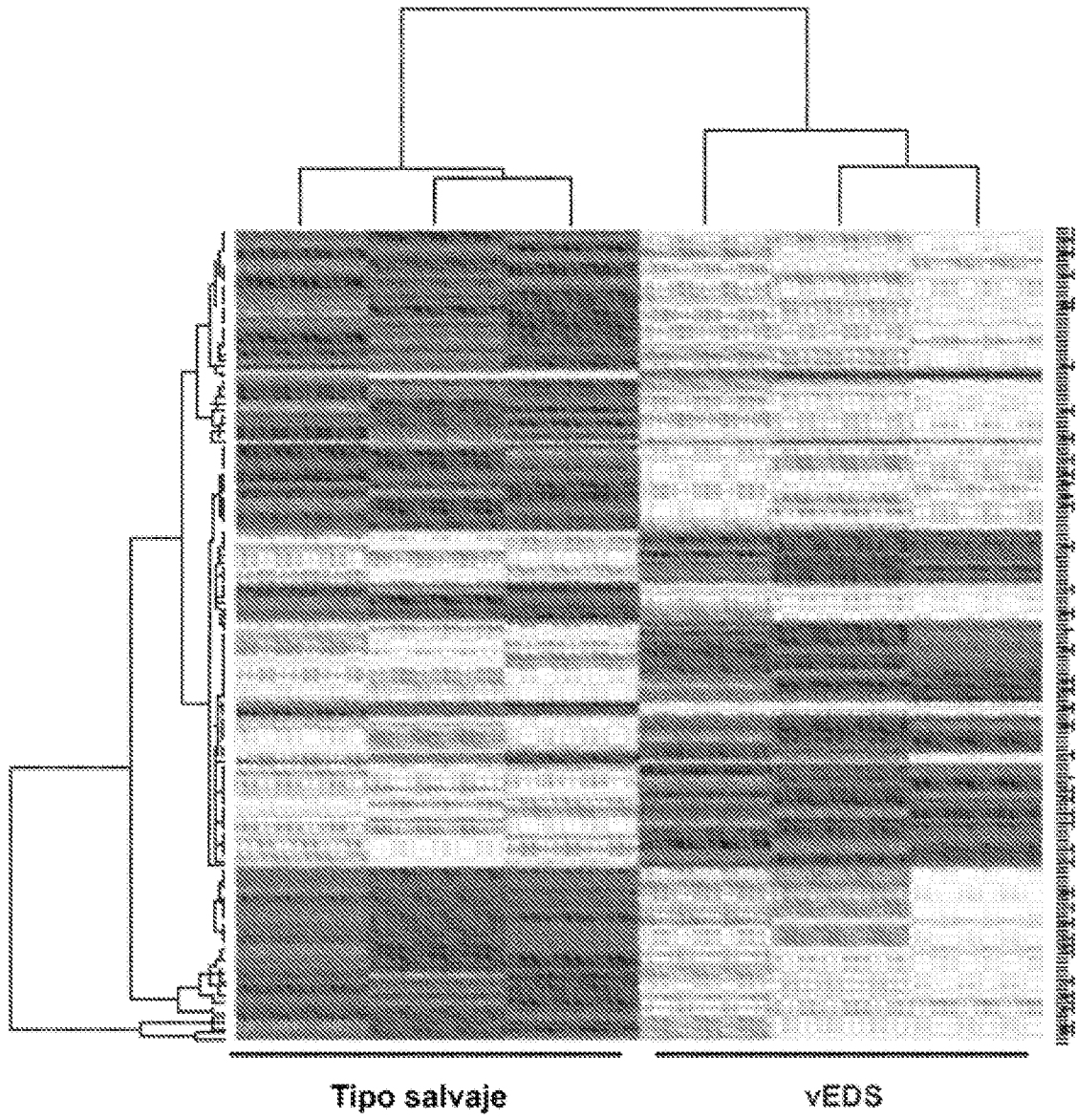


FIG. 1E

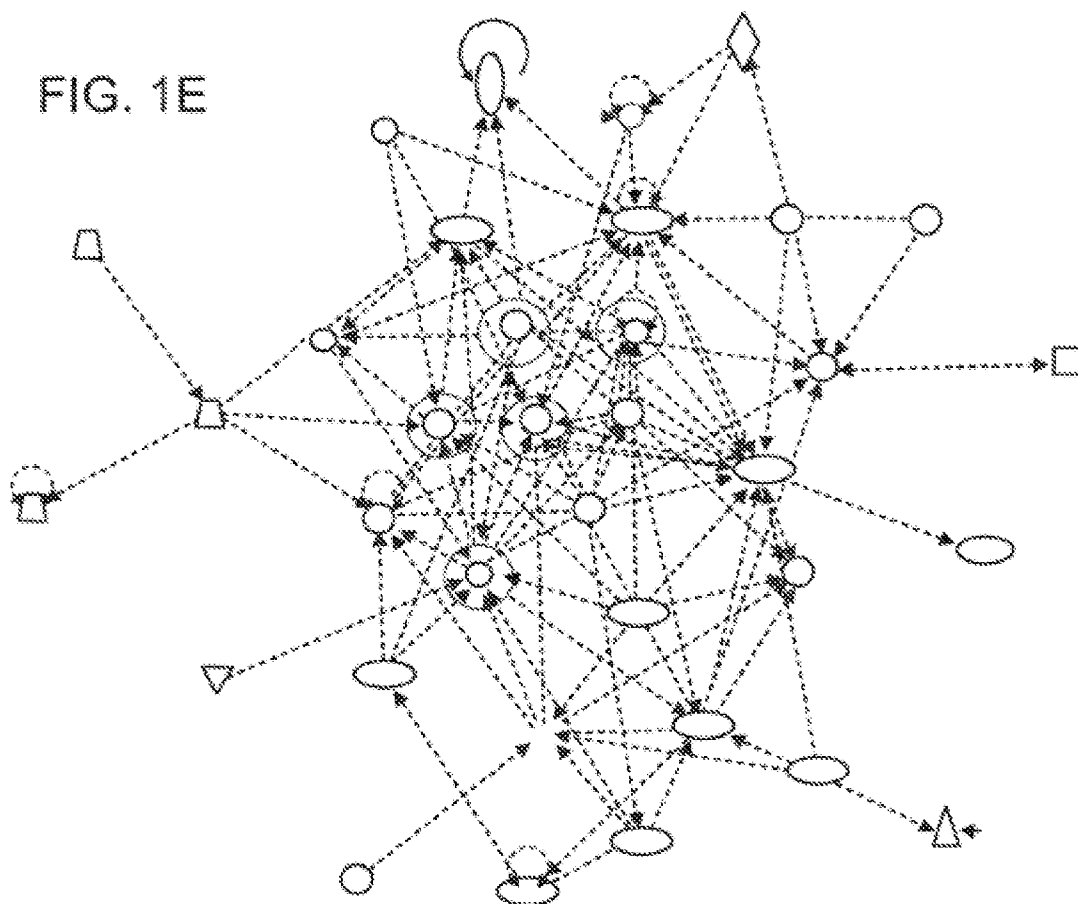


FIG. 1F

Regulador corriente arriba	Descripción	Valor-p de solapamiento
APOE	Transportador	3,47E-12
NFATC3	Regulador de la transcripción activado por Ca ²⁺	8,70E-11
F2R	GPCR	8,70E-08
ELK3	Regulador de la transcripción activado por ERK	5,41E-08
Mt2	GPCR	1,45E-07
Mt1	GPCR	1,79E-07
LIPE	enzyme	3,09E-07
ELK4	Regulador de la transcripción activado por ERK	4,71E-07
AFP	Transportador	4,71E-07
ERK1/2	grupo	5,92E-07

FIG. 1G

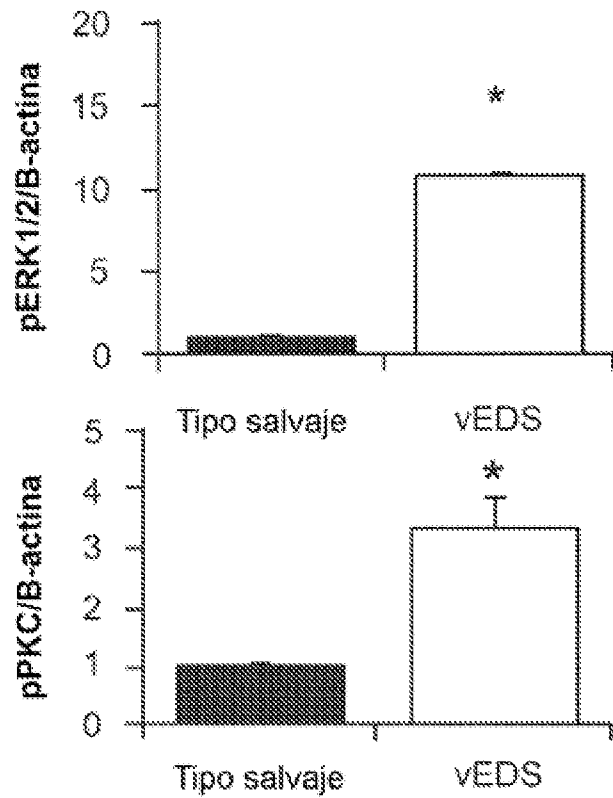
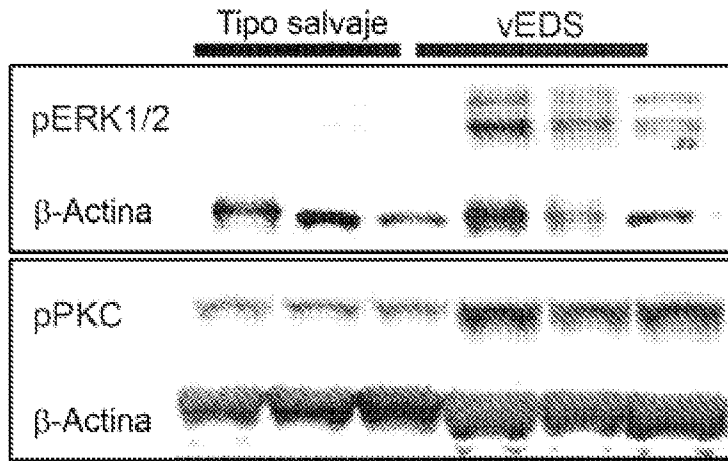


FIG. 2A

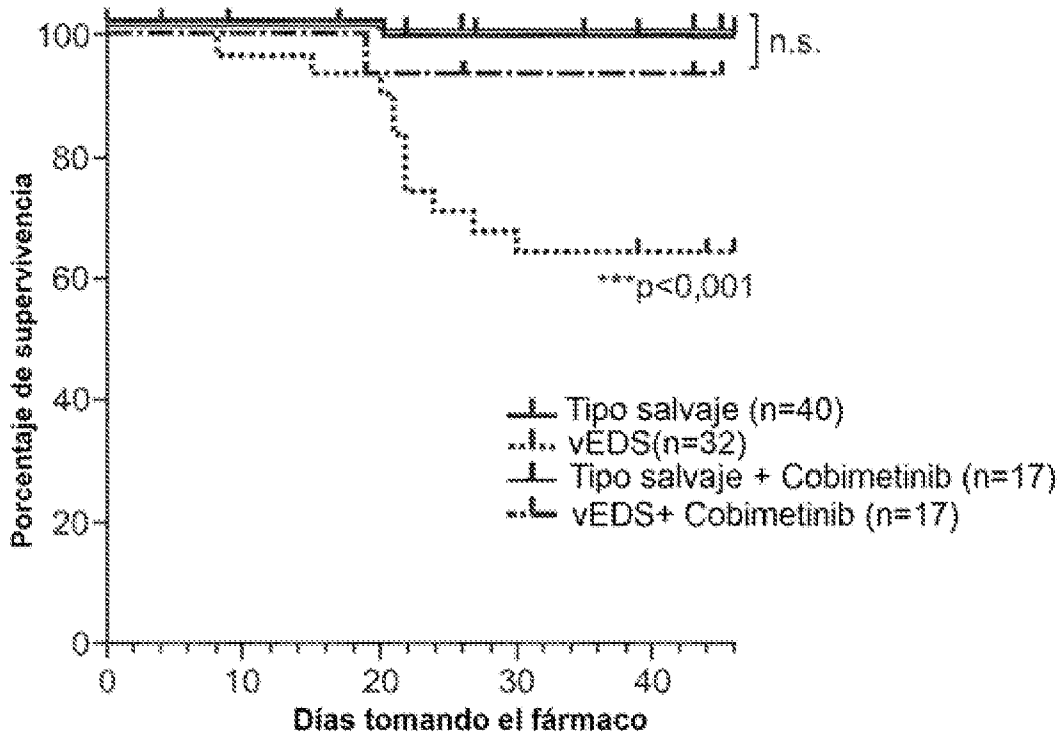


FIG. 2B

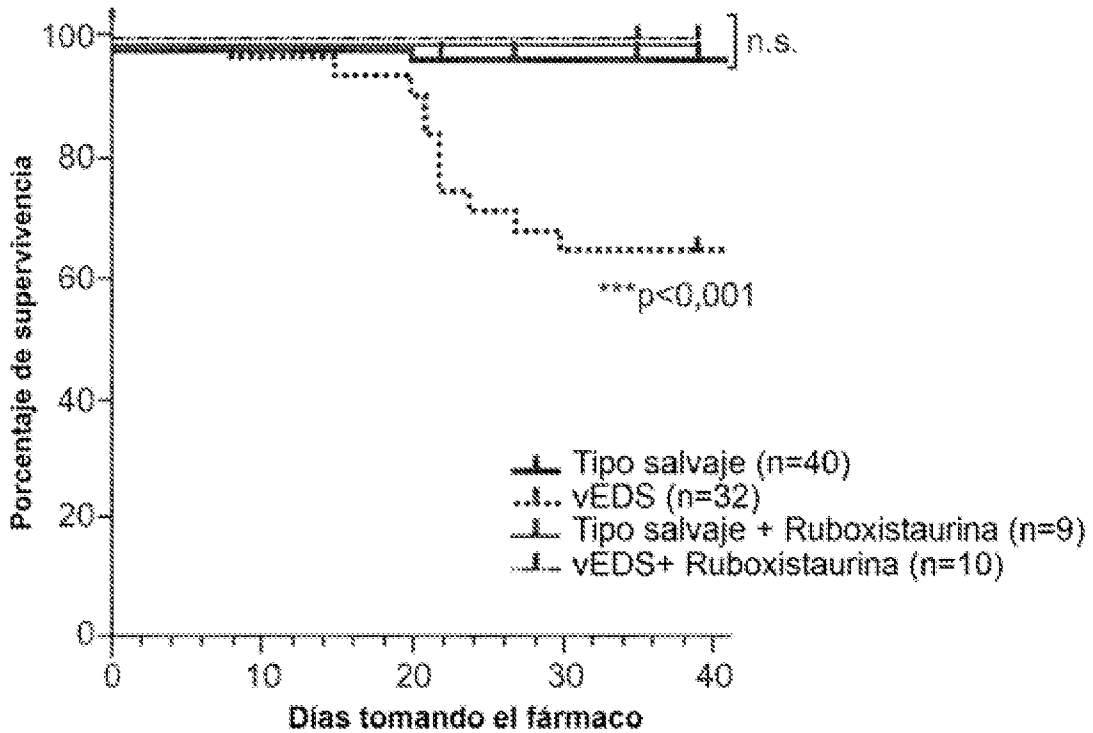


FIG. 2C

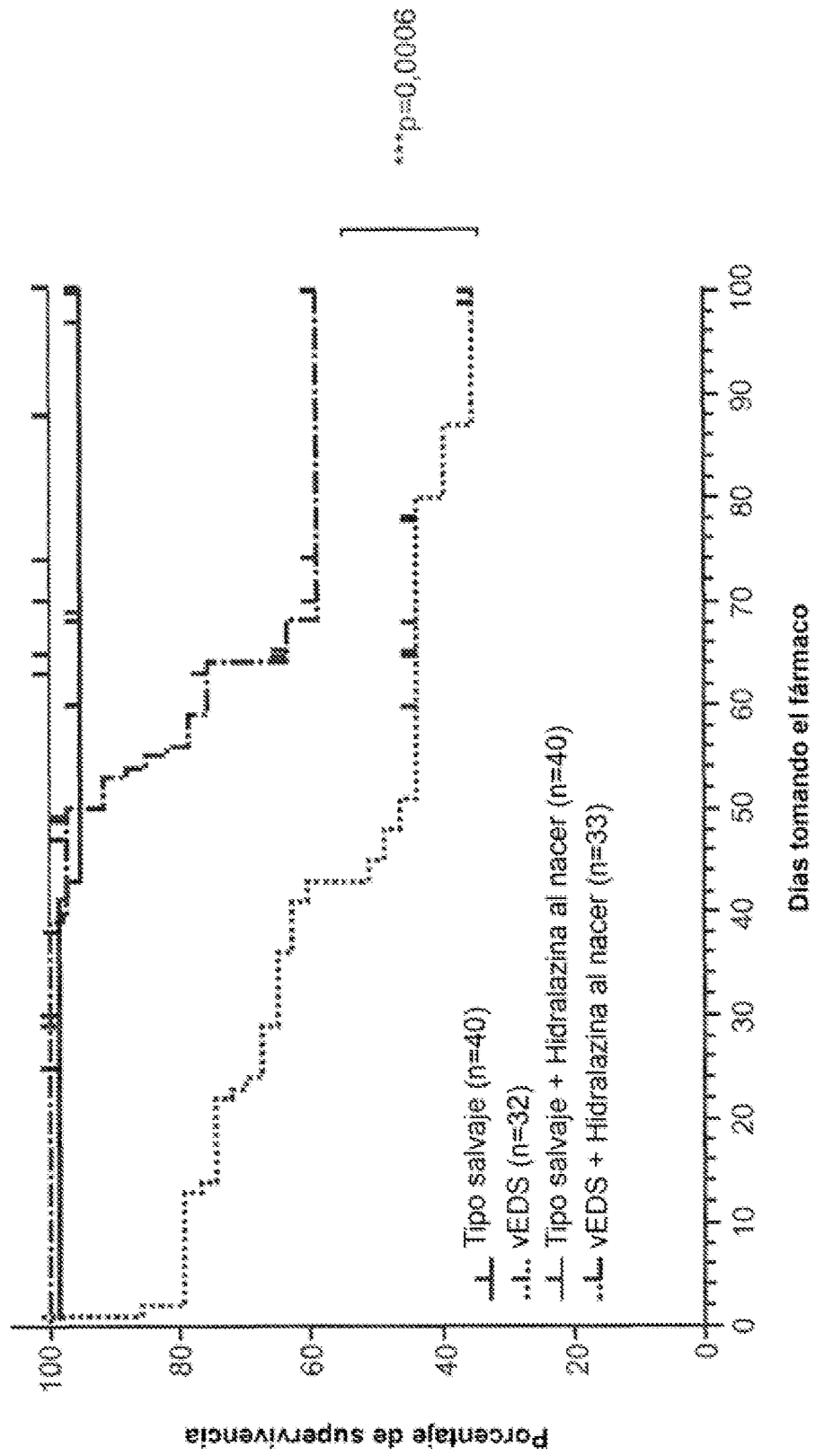


FIG. 3B

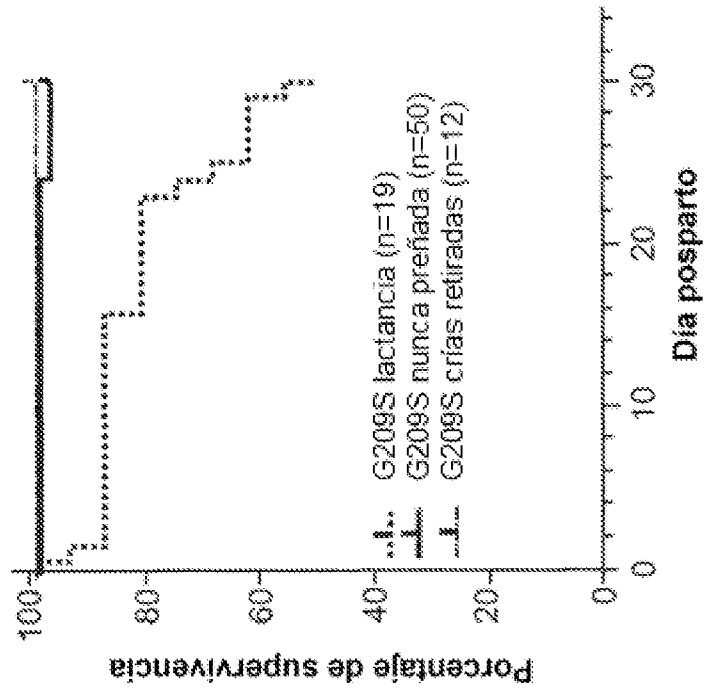


FIG. 3A

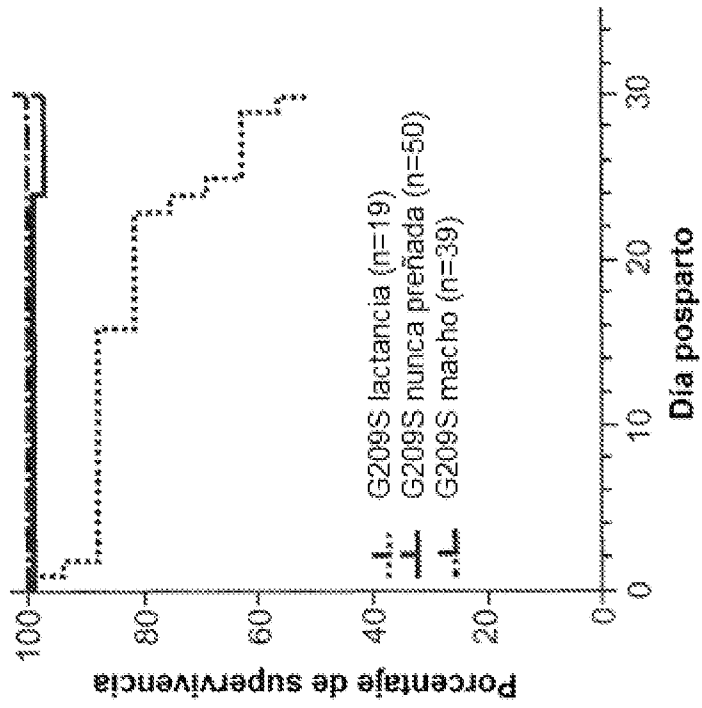


FIG. 3D

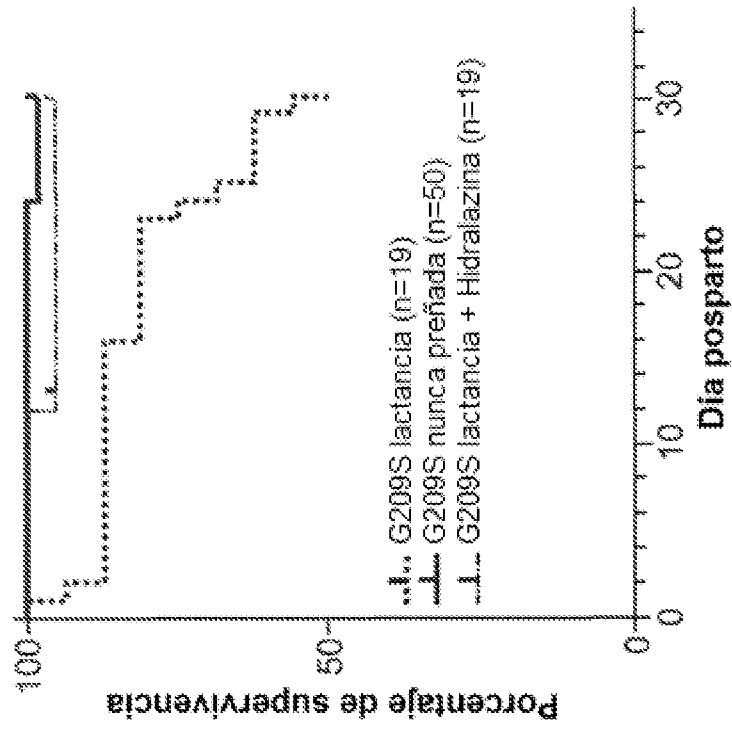
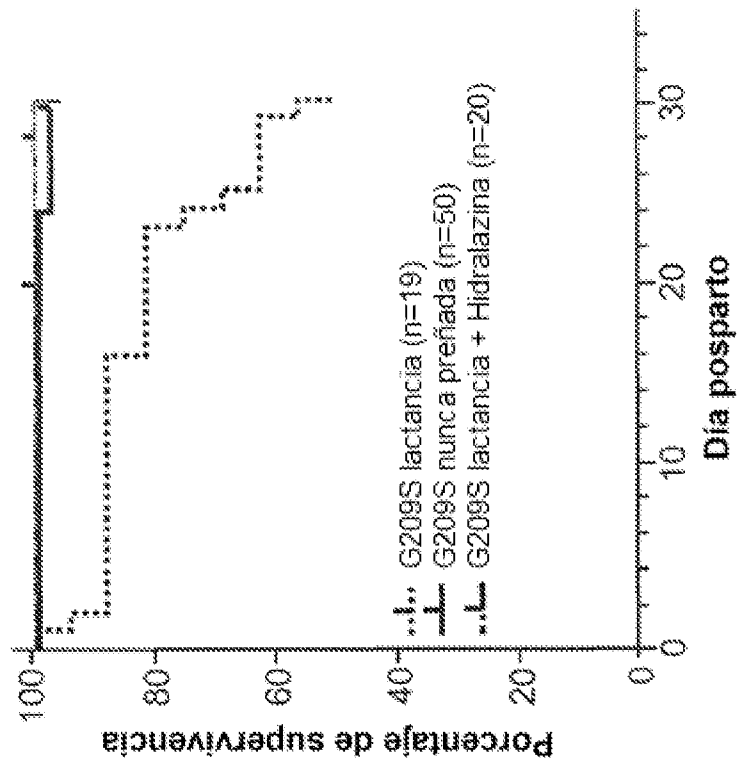


FIG. 3C



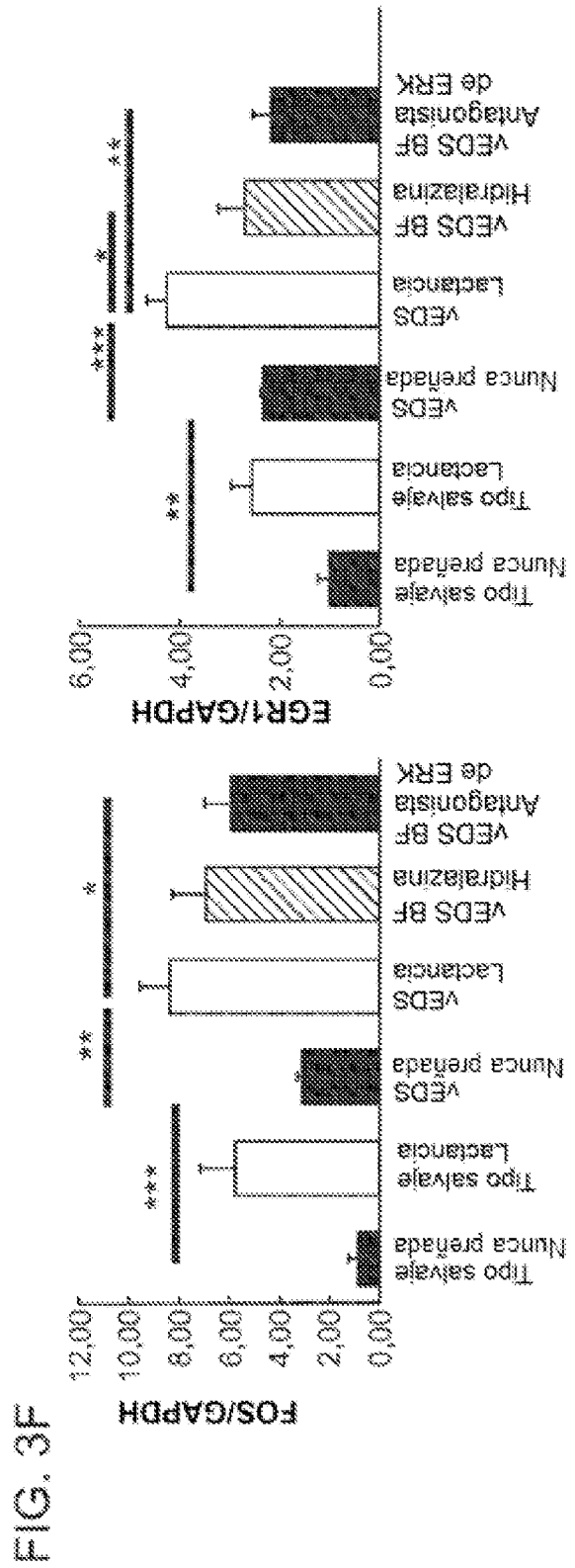
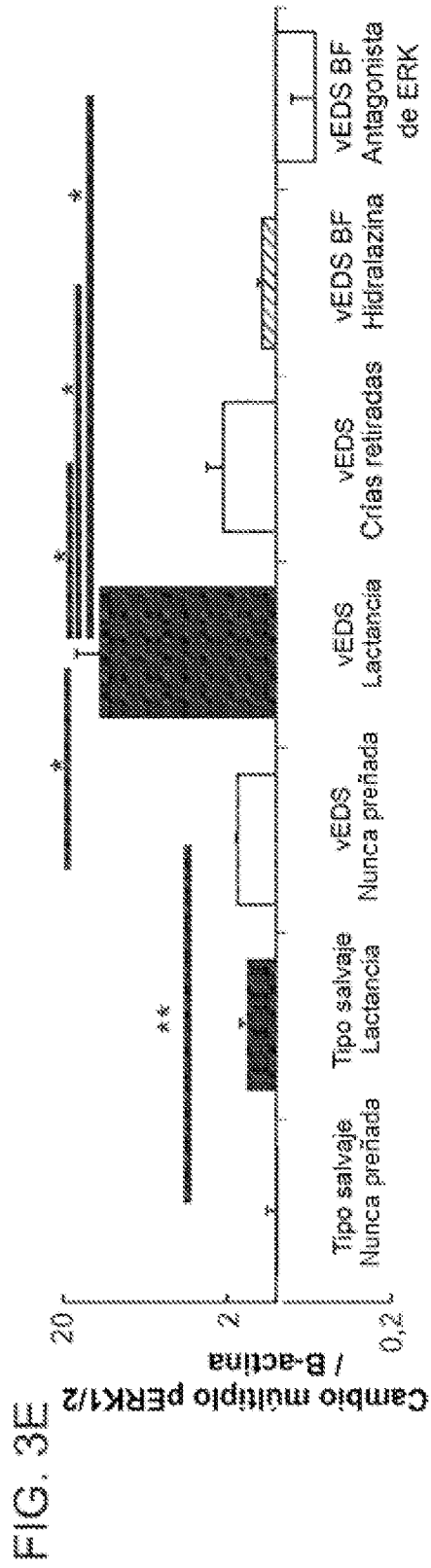


FIG. 4A

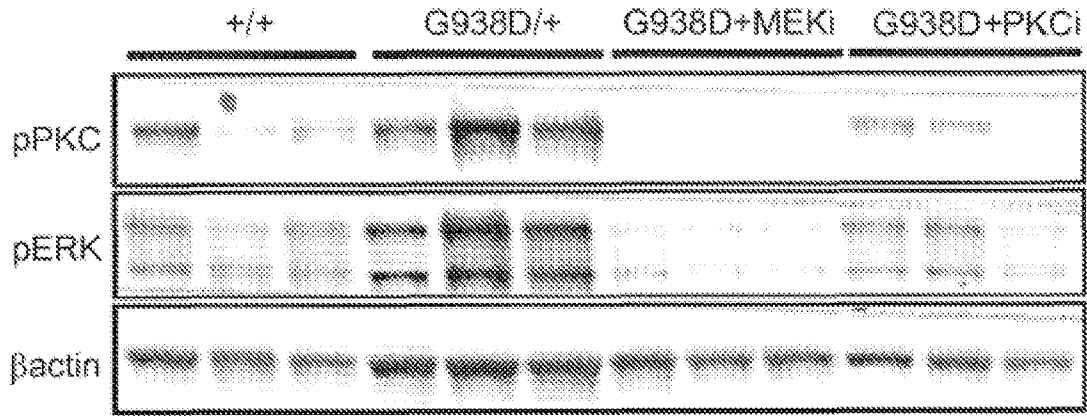


FIG. 4B

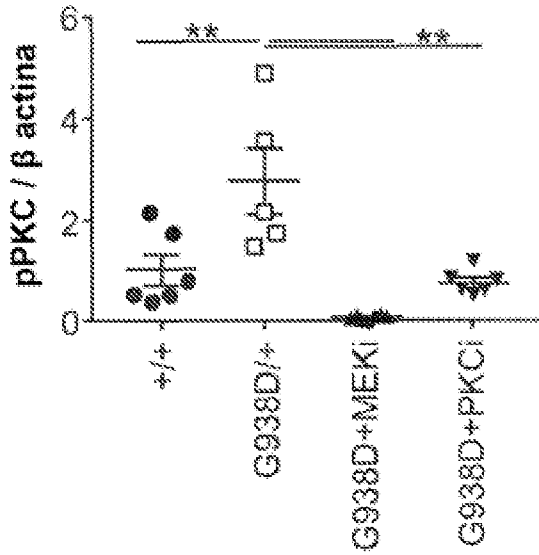


FIG. 4C

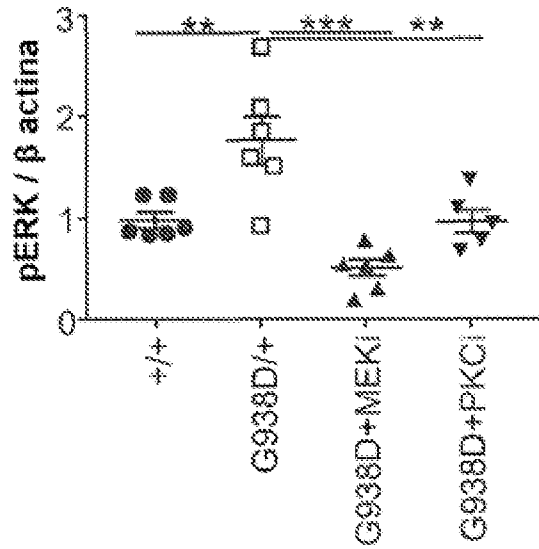


FIG. 5A

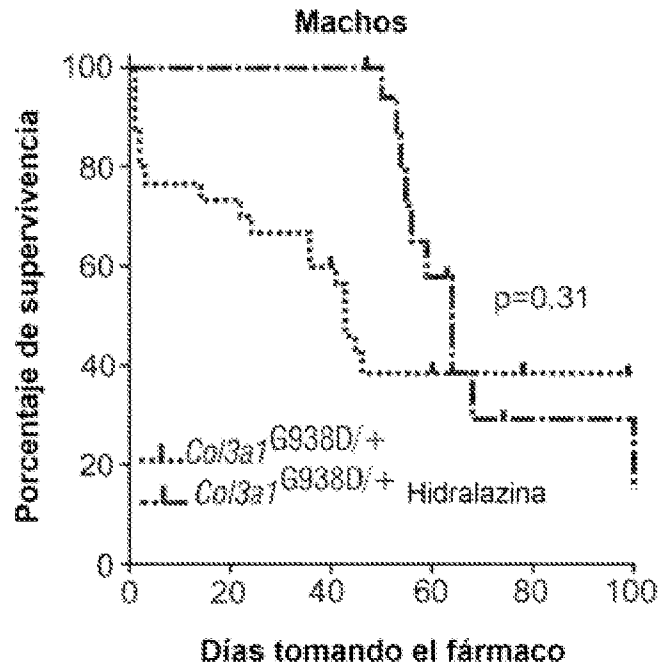


FIG. 5B

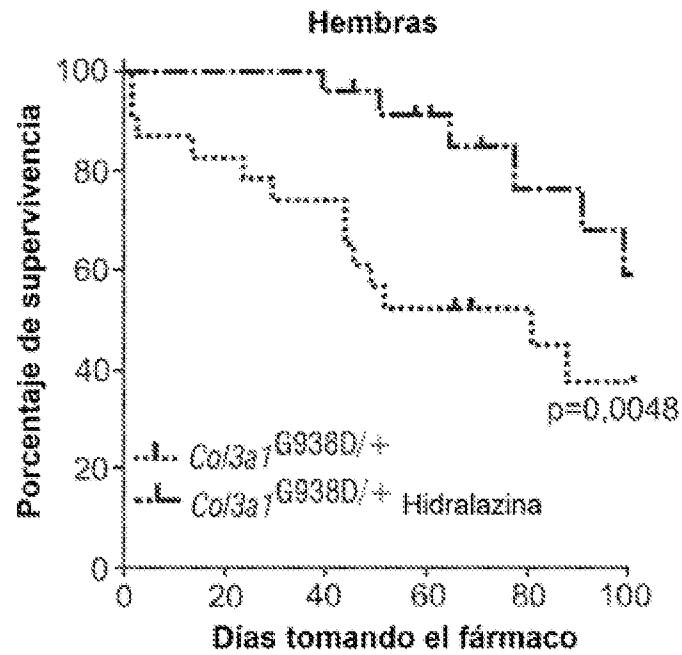


FIG. 6

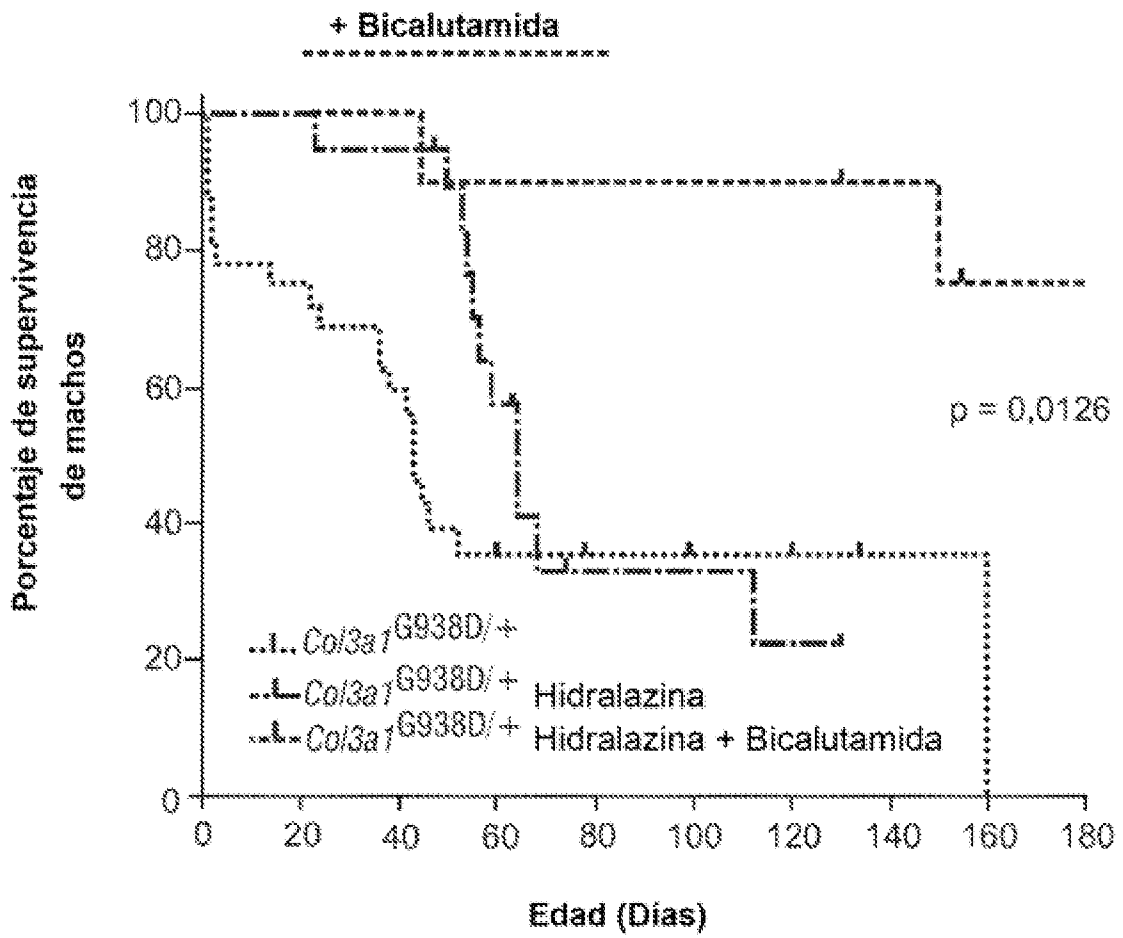


FIG. 7

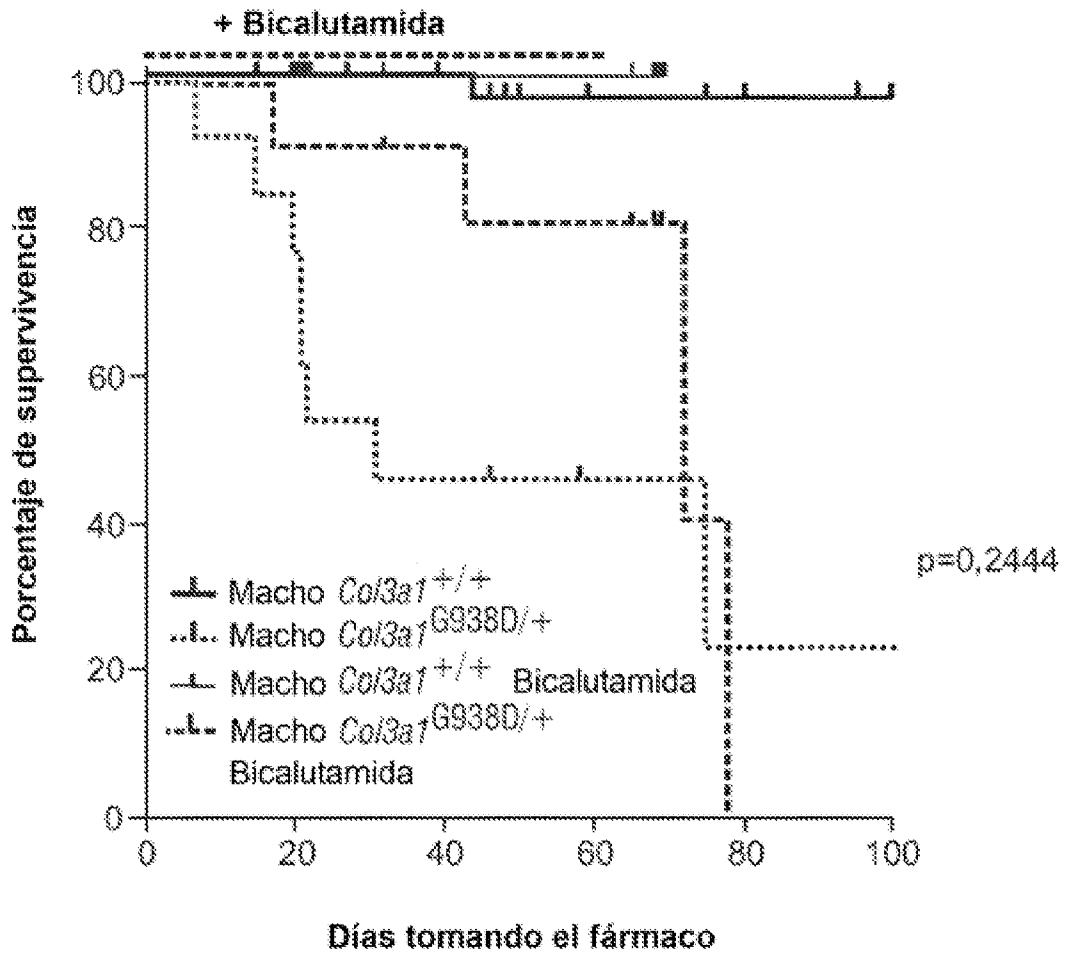


FIG. 8A

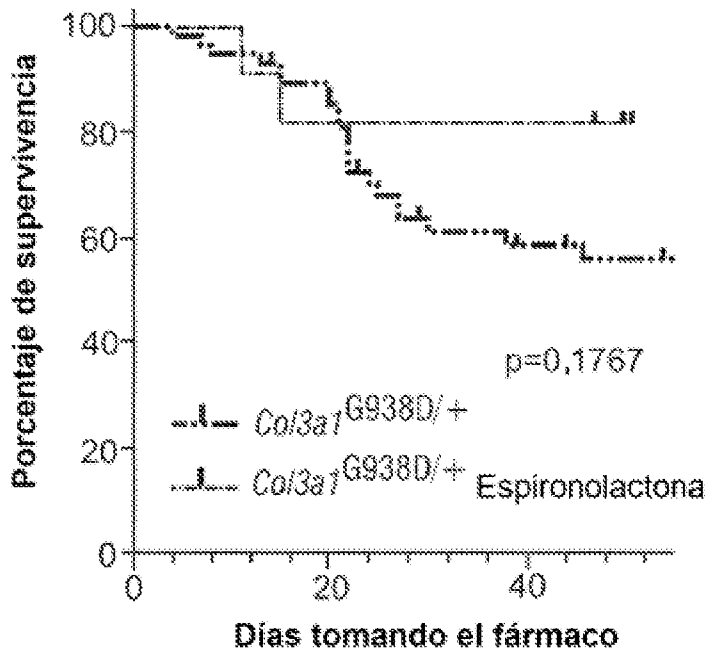


FIG. 8B

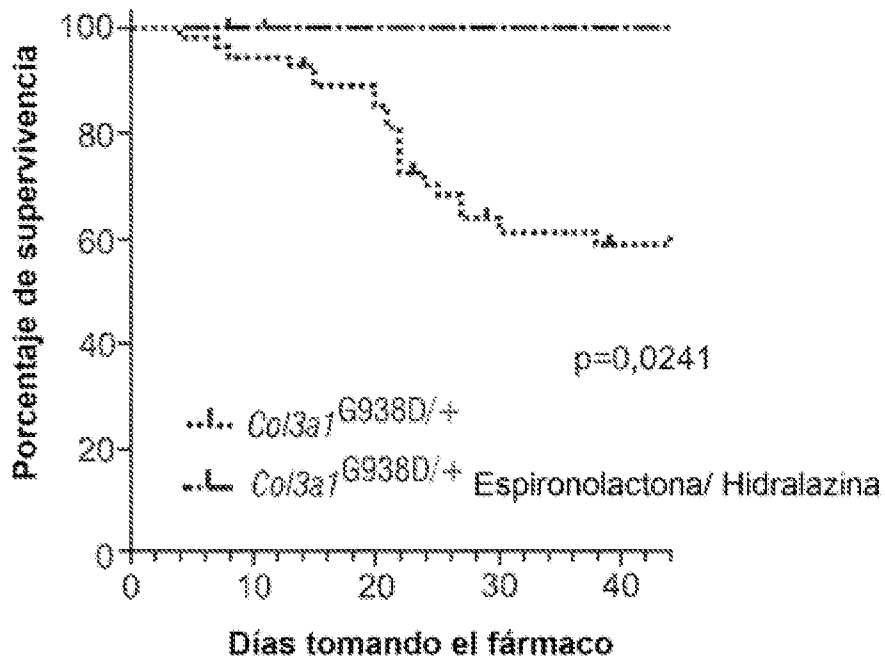


FIG. 9

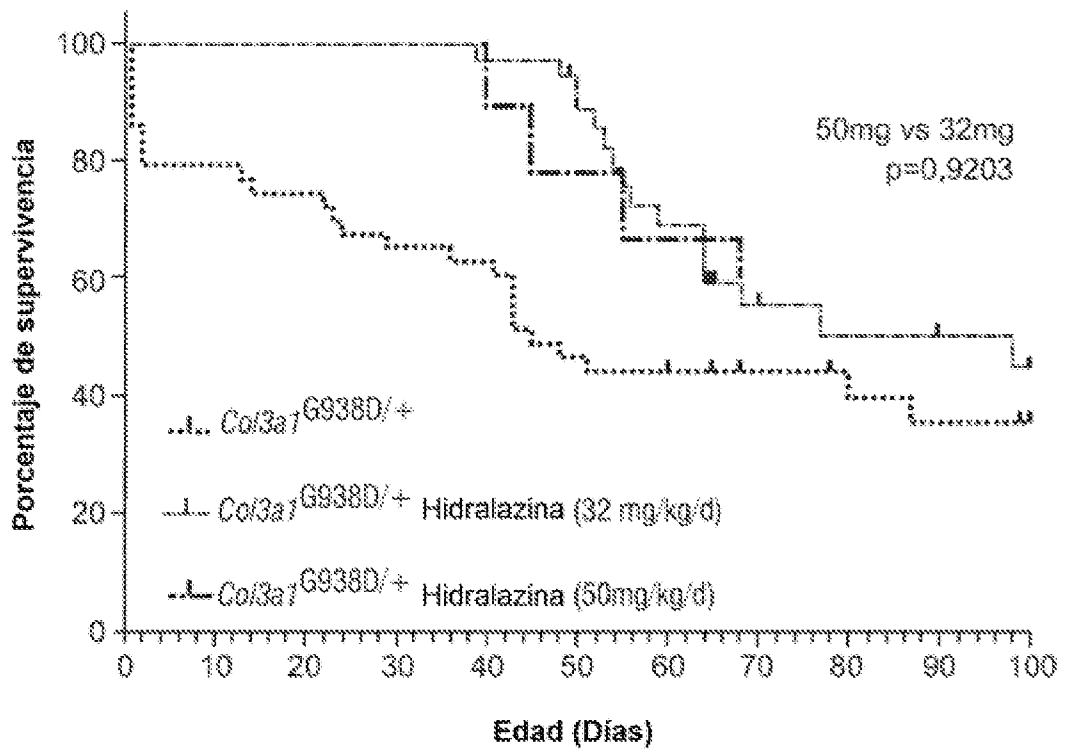


FIG. 10A

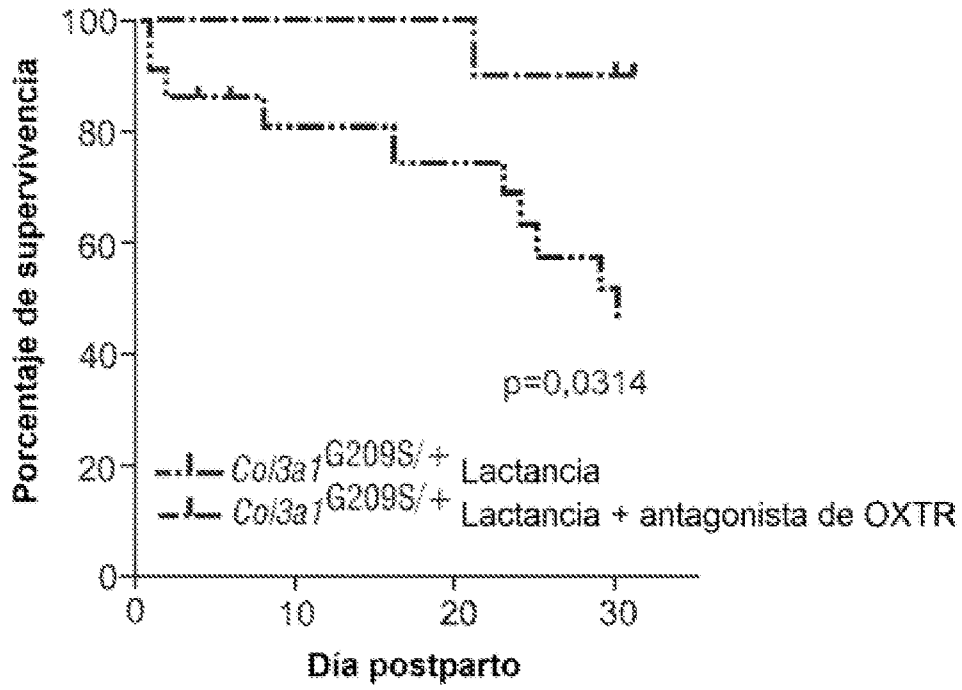


FIG. 10B

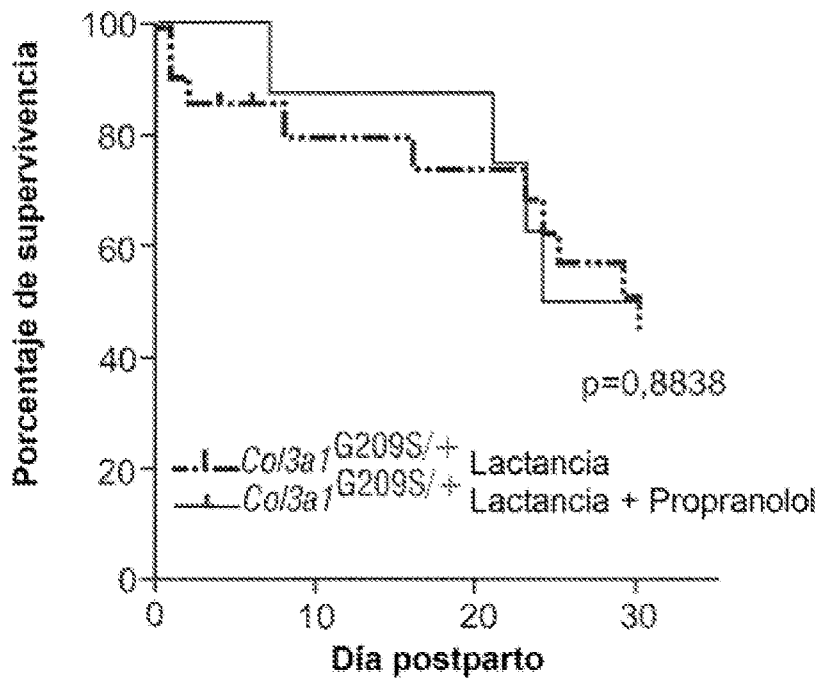


FIG. 11A

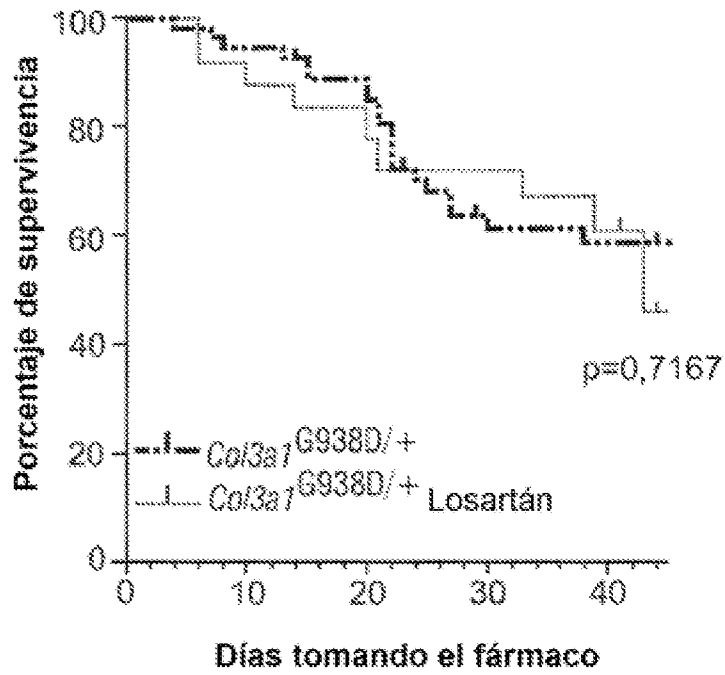


FIG. 11B

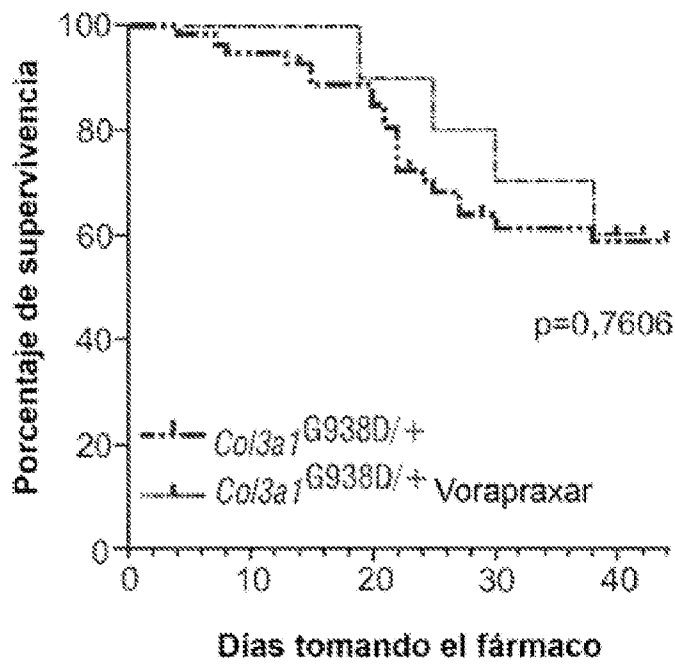


FIG. 12

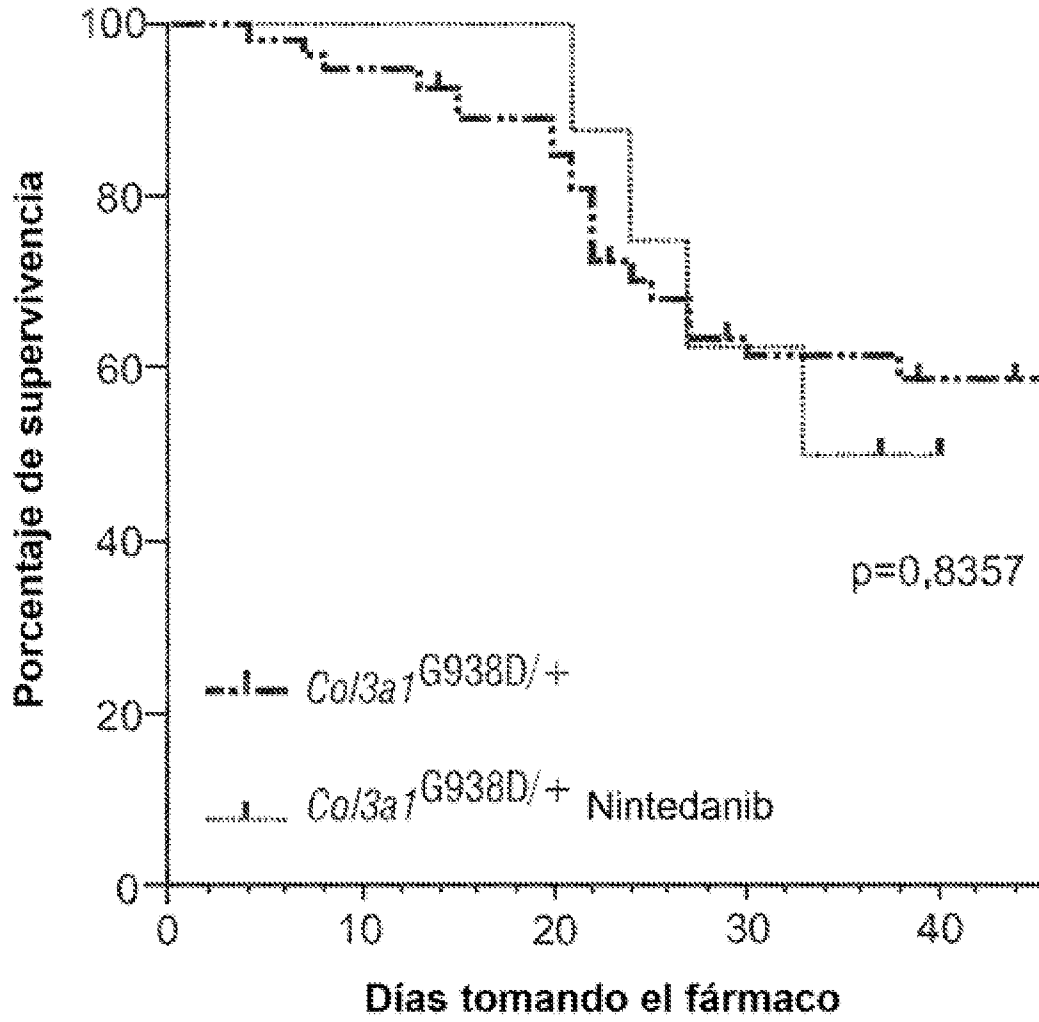


FIG. 13A

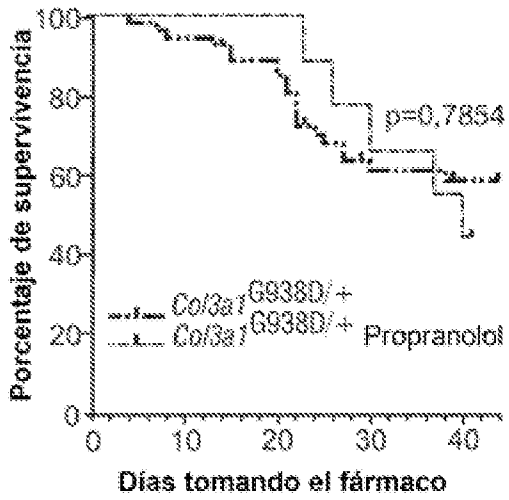


FIG. 13B

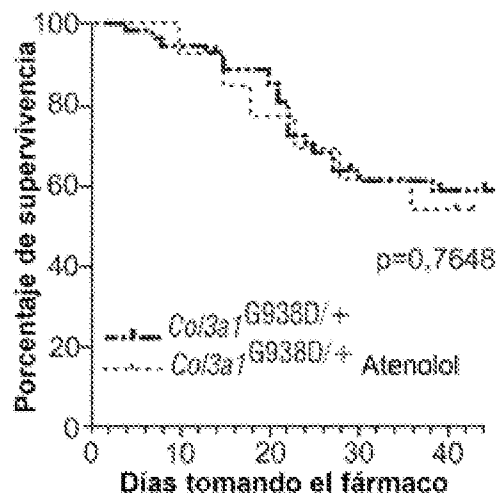


FIG. 13C

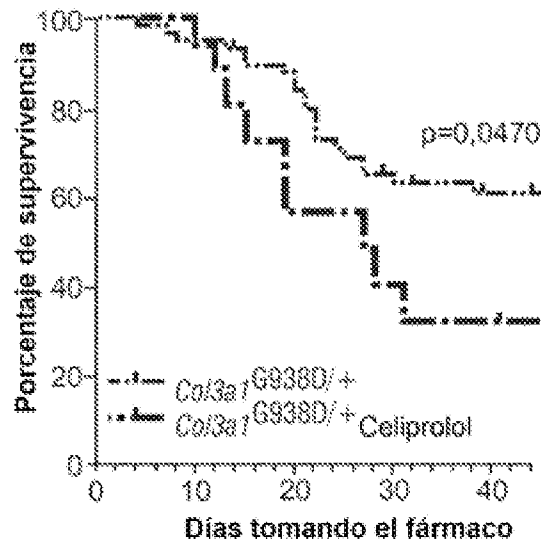


FIG. 15

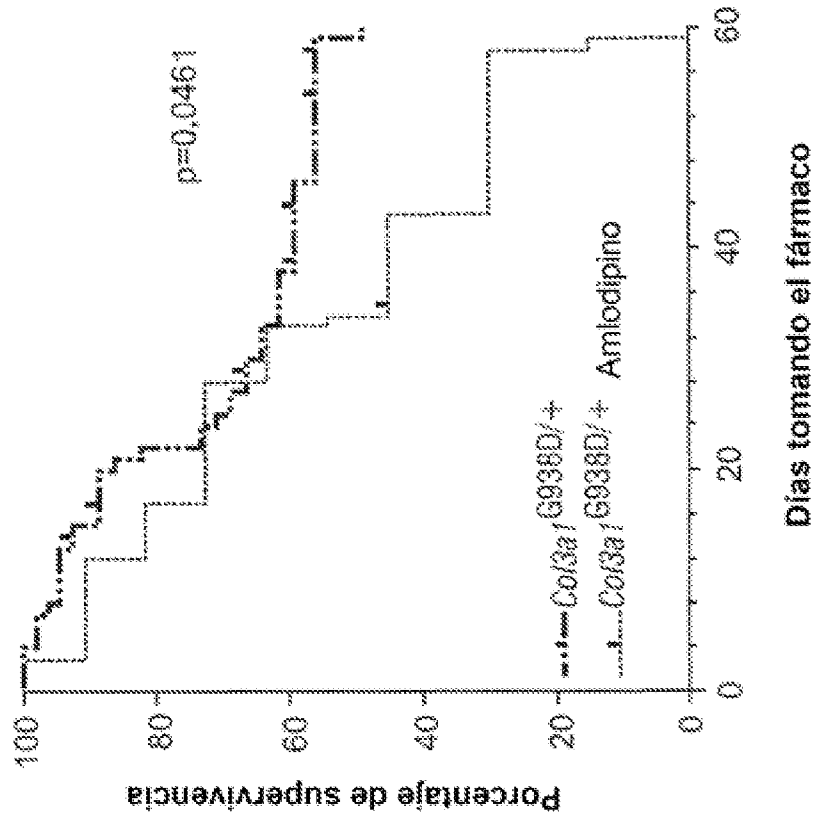


FIG. 14

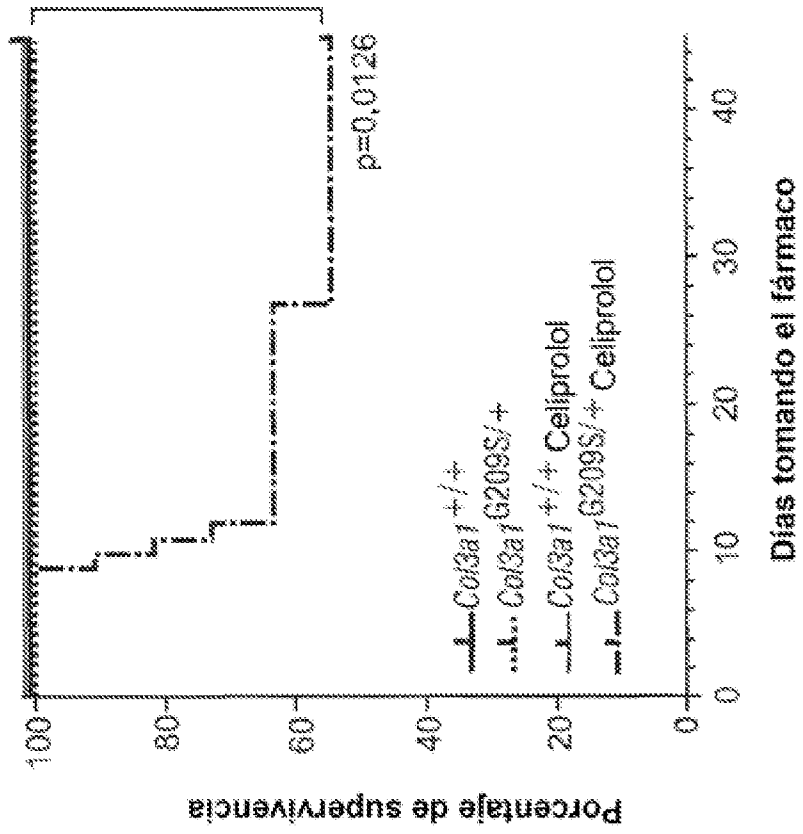


FIG. 16B

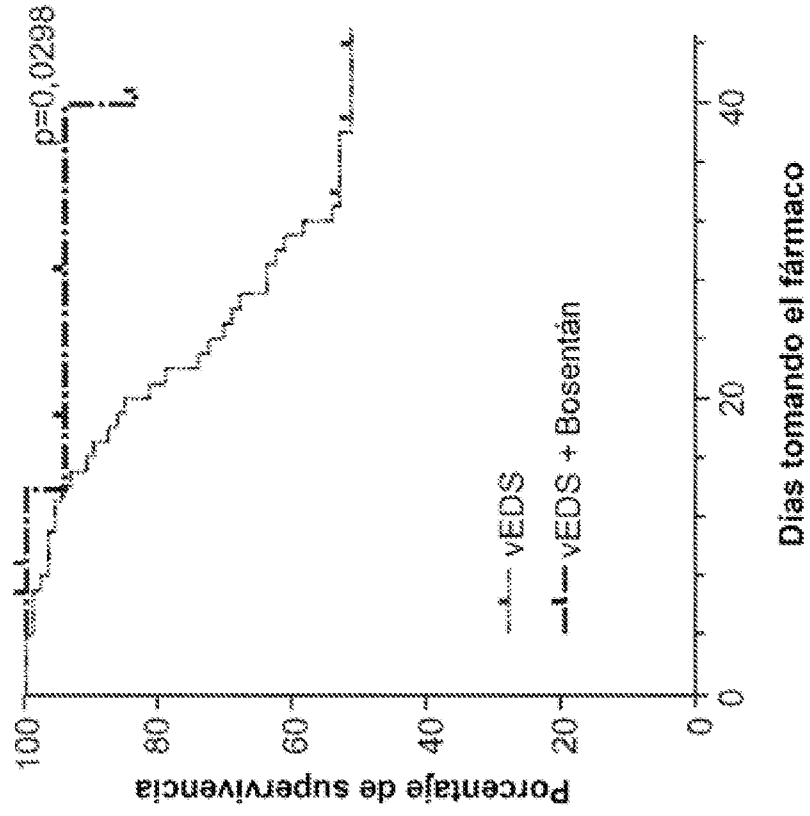


FIG. 16A

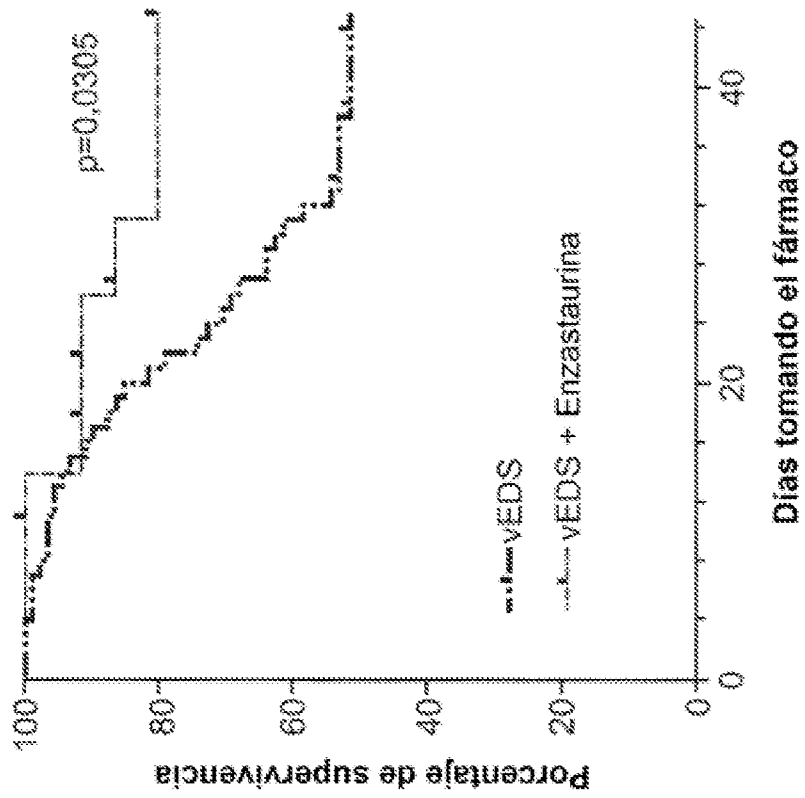


Figura 17

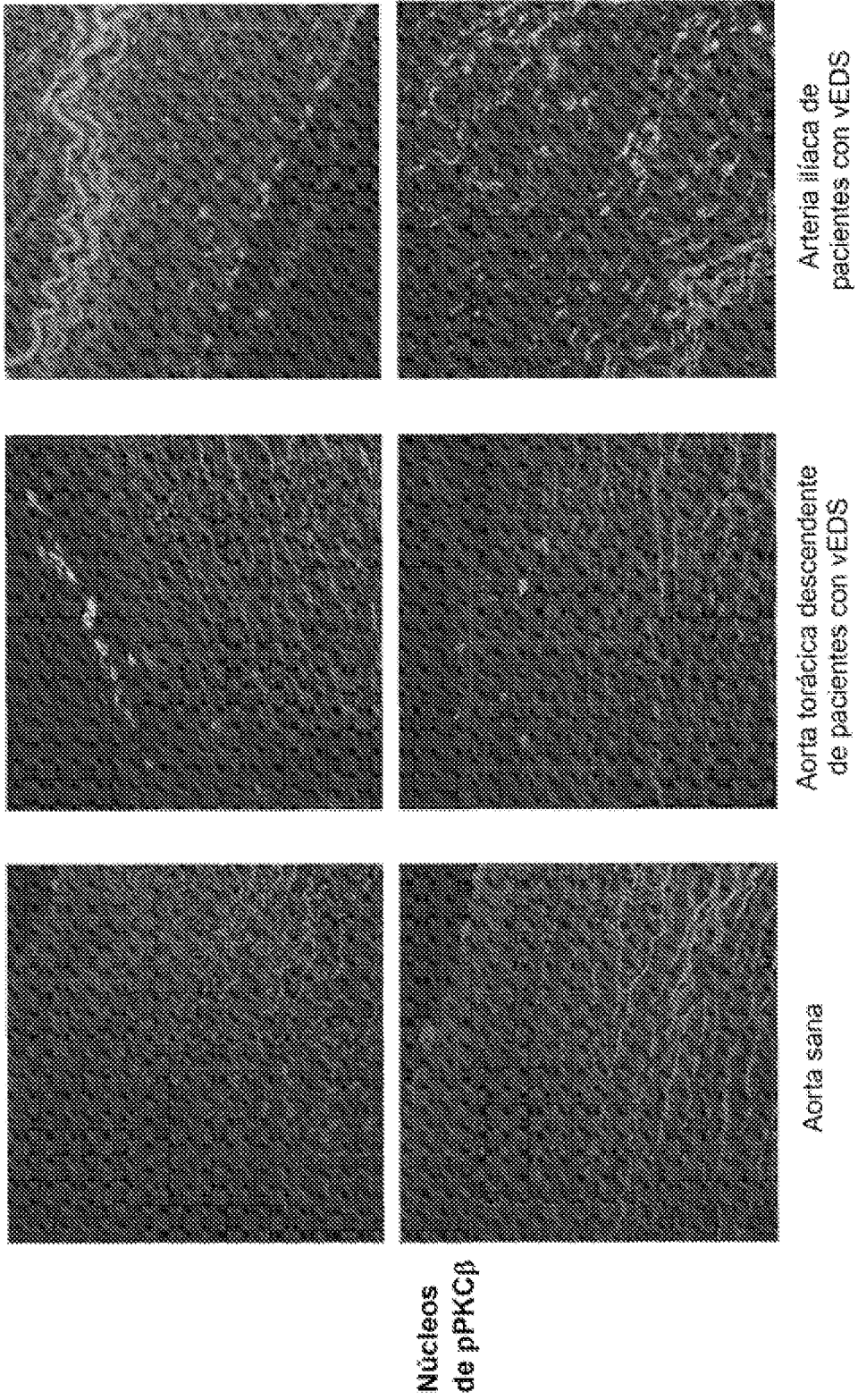


Figura 18

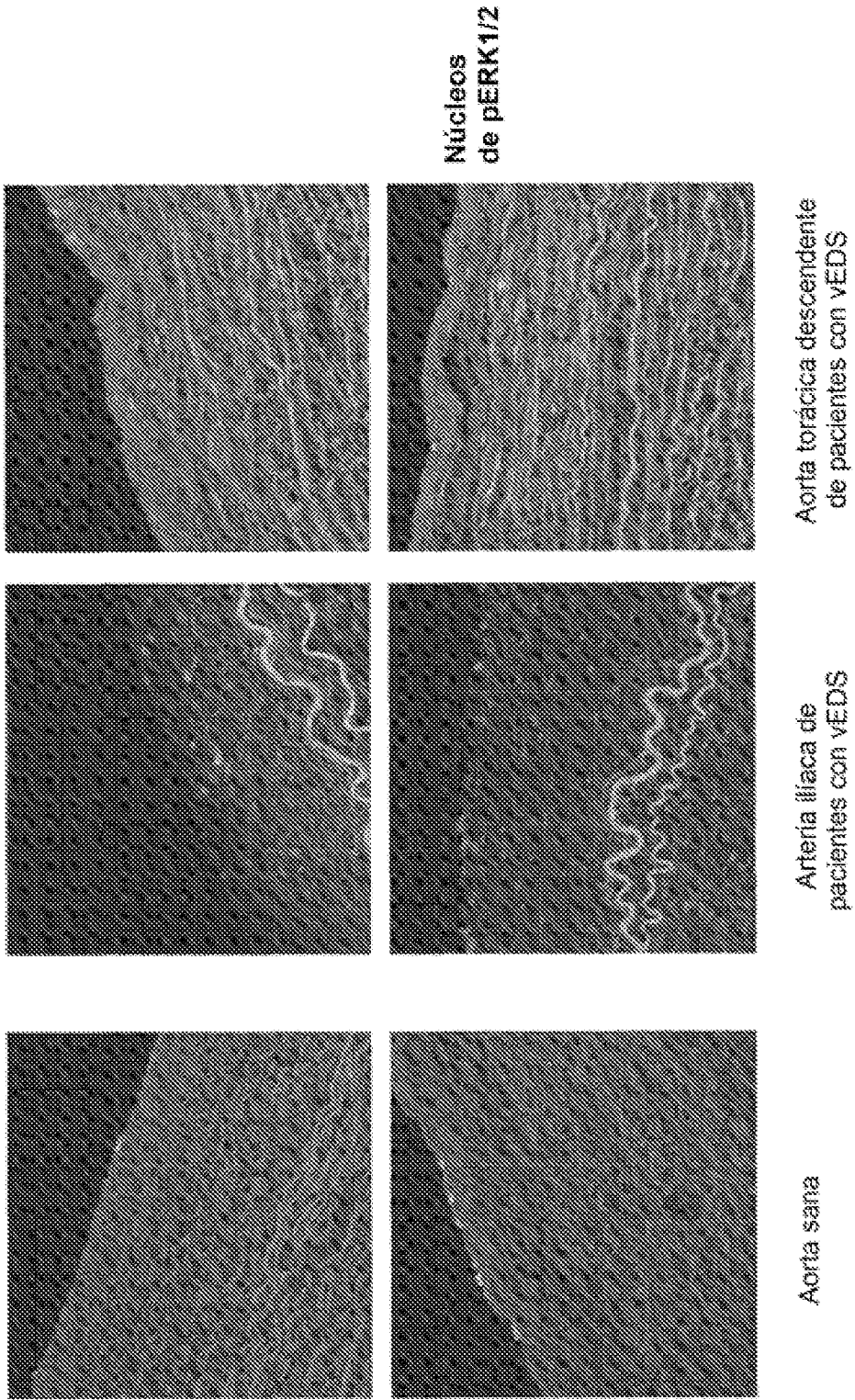


FIG. 19

Tratamiento con ruboxistaurina reduce el crecimiento de la raíz aórtica en ratones 129 MFS

