



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

(21) BR 112021007237-3 A2



(22) Data do Depósito: 16/10/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 10/08/2021

(54) **Título:** MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE UMA VASCULOPATIA EM UM INDIVÍDUO E PARA O TRATAMENTO DE UM TRANSTORNO DO TECIDO CONJUNTIVO EM UM INDIVÍDUO, KIT, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE UMA VASCULOPATIA

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/445; A61P 9/14; C12N 9/12.

(30) **Prioridade Unionista:** 16/10/2018 US 62/746,524; 18/10/2018 US 62/747,587; 24/04/2019 US 62/838,049.

(71) **Depositante(es):** THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY.

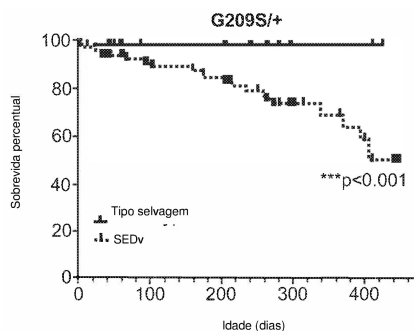
(72) **Inventor(es):** HARRY C. DIETZ; CAITLIN J. BOWEN; JUAN FRANCISCO CALDERON GIADROSIC.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019056616 de 16/10/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2020/081741 de 23/04/2020

(85) **Data da Fase Nacional:** 16/04/2021

(57) **Resumo:** MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE UMA VASCULOPATIA EM UM INDIVÍDUO E PARA O TRATAMENTO DE UM TRANSTORNO DO TECIDO CONJUNTIVO EM UM INDIVÍDUO, KIT, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE UMA VASCULOPATIA. A presente invenção refere-se a composições e métodos para o tratamento da síndrome de Ehlers Danlos vascular e transtornos associados do tecido conjuntivo.



MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE UMA VASCULOPATIA EM UM INDIVÍDUO E PARA O TRATAMENTO DE UM TRANSTORNO DO TECIDO CONJUNTIVO EM UM INDIVÍDUO, KIT, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE UMA VASCULOPATIA

Referência cruzada a pedidos de patente correlatos

[001] Este Pedido de Patente reivindica o benefício de prioridade do Pedido de Patente Provisório dos EUA 62/838.049, depositado em 24 de abril de 2019, ao Pedido de Patente Provisório dos EUA 62/747.587, depositado em 18 de outubro de 2018 e ao Pedido de Patente Provisório dos EUA 62/746.524 depositado em 16 de outubro de 2018, cujos conteúdos são aqui incorporados, em sua totalidade por referência.

Declaração de financiamento federal à pesquisa

[002] Esta invenção foi criada com apoio do Governo sob a subvenção número 5T32GM007309-44, concedida por *National Institutes of Health*. O Governo detém certos direitos na invenção.

Campo da invenção

[003] A presente invenção refere-se a transtornos do tecido conjuntivo.

Fundamentos da invenção

[004] A síndrome de Ehlers-Danlos vascular (SEDv) é uma doença hereditária do tecido conjuntivo causada por mutações heterozigóticas no gene *COL3A1*. Pacientes portadores de SED vascular têm a pele fina, translúcida, sofrem ferimentos facilmente, têm um tipo facial característico e desenvolvem dissecção espontânea em vasos sanguíneos de médio a grande calibre e ruptura de órgãos (útero, cólon), o que resulta na morte prematura e sobrevida mediana de aproximadamente 45 anos¹.

[005] Muitas características da SEDv são distintamente diferentes de outras vasculopatias hereditárias, como síndrome de Marfan (MFS) e síndrome de Loeys-Dietz (LDS), que foram associadas com atividade

excessiva de TGF- β . Essas características incluem dissecção aórtica sem aneurisma anterior e ruptura em qualquer vaso de médio ou grande calibre, bem como em órgãos ocos. Essas características tornam a predição e monitoramento difíceis ou impossíveis, e os sinais apresentados na maioria dos adultos diagnosticados com SEDv são dissecção vascular ou ruptura de órgãos, com 25% dos pacientes experimentam uma complicação importante antes dos 20 anos de idade^{1,2}. Assim, há uma necessidade não atendida para o tratamento de SEDv e transtornos relacionados do tecido conjuntivo.

Sumário da invenção

[006] São aqui providos, entre outros, composições, formulações e métodos para inibir, tratar, prevenir e/ou reduzir os sintomas de gravidade de transtornos do tecido conjuntivo, p. ex., vasculopatias. Aspectos da presente matéria relacionam-se ao uso de agentes para o tratamento de uma grande variedade de transtornos do tecido conjuntivo. Em modalidades específicas, o transtorno do tecido conjuntivo compreende a vasculopatia e, em certas modalidades, a vasculopatia compreende síndrome de Ehlers-Danlos vascular (SEDv).

[007] Está incluído um método para tratar uma vasculopatia (p. ex., SEDv) em um indivíduo. O método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente, de tal modo que o agente diminua a atividade ou expressão de quinase regulada por sinal extracelular (ERK) ou proteína quinase C (PKC).

[008] Em certas modalidades, um agente inibe a expressão de proteína quinase ativada por mitógeno /quinase regulada por sinal extracelular (MEK), quinase regulada por sinal extracelular (ERK), fosfolipase C (PLC), inositol trifosfato (IP3) ou proteína quinase C (pKC), inibindo, assim, a atividade de ERK, PLC, IP3 ou PKC.

[009] Em certas modalidades, um agente inibe a atividade ou expressão de uma ou mais moléculas associadas com a via da proteína

quinase ativada por mitógeno (MAPK), p. ex., as proteínas quinases RAS-RAF/MEK/quinase regulada por sinal extracelular (ERK).

[0010] Em modalidades, o agente compreende um anticorpo ou fragmento do mesmo, um polipeptídeo, uma pequena molécula, uma molécula de ácido nucleico ou qualquer combinação dos mesmos. Em modalidades específicas, o agente compreende uma pequena molécula.

[0011] Em alguns casos, o agente compreende uma pequena molécula. Uma pequena molécula é um composto com menos de 2000 Daltons de massa. De preferência, a massa molecular da pequena molécula é inferior a 1000 Daltons, mais preferivelmente inferior a 600 Daltons, p. ex., o composto tem menos de 500 Daltons, menos de 400 Daltons, menos de 300 Daltons, menos de 200 Daltons ou menos de 100 Daltons.

[0012] As pequenas moléculas são orgânicas ou inorgânicas. Pequenas moléculas orgânicas exemplares incluem, entre outros, hidrocarbonetos alifáticos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos orgânicos, ésteres, mono- e dissacarídeos, hidrocarbonetos aromáticos, aminoácidos e lipídios. As pequenas moléculas inorgânicas exemplares compreendem minerais traço, íons, radicais livres e metabólitos. Alternativamente, as pequenas moléculas podem ser projetadas sinteticamente para que consistam em um fragmento ou uma cadeia mais longa de aminoácidos e preencham um bolso (*pocket*) de ligação de uma enzima. Tipicamente, as pequenas moléculas têm menos de um quilodalton.

[0013] Em alguns casos, o agente compreende uma molécula de ácido nucleico. Por exemplo, ácido ribonucleico (RNA) ou ácido desoxirribonucleico (DNA) inibe a expressão de proteína quinase ativada por mitógeno /quinase regulada por sinal extracelular (MEK), quinase regulada por sinal extracelular (ERK), fosfolipase C (PLC), inositol trifosfato (IP3) ou proteína quinase C (pKC), inibindo, assim, a atividade de ERK, PLC, IP3 ou PKC. Em alguns casos, o ácido nucleico compreende pequeno RNA

interferente (siRNA), RNA de interferência (RNAi), RNA mensageiro (mRNA), pequeno RNA tipo grampo de cabelo (*hairpin*) ou RNA curto tipo grampo de cabelo (shRNA), ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA), RNA *antisense* ou microRNA, ou qualquer porção dos mesmos. No entanto, o técnico no assunto pode identificar prontamente ácidos nucleicos adicionais que inibem/são antagonistas ou ativam/são agonistas de ERK ou PKC ou IP3 ou PLC.

[0014] Os polinucleotídeos, polipeptídeos ou outros agentes, neste relatório descritivo, são purificados e/ou isolados. Especificamente, neste relatório descritivo, uma molécula “isolada” ou “purificada” de ácido nucleico, polinucleotídeo, polipeptídeo ou proteína é substancialmente livre de outro material celular, ou meio de cultura quando produzida por técnicas recombinantes, ou de precursores químicos ou outros químicos quando sintetizada quimicamente. Os compostos purificados constituem pelo menos 60% em peso (peso seco) do composto de interesse. De preferência, o preparado constitui pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 90% e, o mais preferível, pelo menos 99% em peso do composto de interesse. Por exemplo, um composto purificado é aquele que constitui pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 98%, 99% ou 100% (p/p) do composto desejado em peso. A pureza é medida por qualquer método padrão adequado, por exemplo, análise por cromatografia em coluna, cromatografia em camada fina ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Um polinucleotídeo purificado ou isolado (ácido ribonucleico (RNA) ou ácido desoxirribonucleico (DNA)) é livre dos genes ou das sequências que o flanqueiam em seu estado natural. Um polipeptídeo purificado ou isolado é livre dos aminoácidos ou das sequências em seu estado natural. Purificado também define um grau de esterilidade que é seguro para administração a um humano, p. ex., desprovido de agentes infecciosos ou tóxicos.

[0015] Em modalidades, o agente compreende cobimetinibe ou um sal

farmaceuticamente aceitável do mesmo. Em outras modalidades, o agente compreende ruboxistaurina, ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma. Em outras modalidades, o agente compreende enzastaurina, ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma. Em outras modalidades contempladas, o agente compreende sotrastaurina, ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma.

[0016] Em modalidades alternativas, o método compreende ainda administrar um agente que diminui a atividade ou expressão de fosfolipase C (PLC) ou inositol trifosfato (IP3).

[0017] Em modalidades, o método compreende administrar uma quantidade eficaz do agente. A quantidade eficaz do agente é entre aproximadamente 0,001 mg/kg e 250 mg/kg de peso corporal, p. ex., 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 ou aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal. Finalmente, o médico ou veterinário atendente decide a quantidade e o regime posológico adequados

[0018] Em alguns casos, o agente é administrado pelo menos uma vez ao dia, pelo menos uma vez por semana ou pelo menos uma vez por mês. O agente adequadamente pode ser administrado por uma duração de um dia, uma semana, um mês, dois meses, três meses, seis meses, 9 meses ou um ano. Em alguns casos, o agente é administrado diariamente, p. ex., a cada 24 horas. Ou, o agente é administrado continuamente ou várias vezes ao dia, p. ex., de 1 em 1 hora, de 2 em 2 horas, de 3 em 3 horas, de 4 em 4 horas, de 5 em 5 horas, de 6 em 6 horas, de 7 em 7 horas, de 8 em 8 horas, de 9 em 9 horas, de

10 em 10 horas, de 11 em 11 horas ou de 12 em 12 horas.

[0019] Além disso, os métodos aqui descritos impedem ou reduzem a gravidade de uma vasculopatia (SEDv) em pelo menos aproximadamente 1%, p. ex., pelo menos aproximadamente 5%, pelo menos aproximadamente 10%, pelo menos aproximadamente 15%, pelo menos aproximadamente 20%, pelo menos aproximadamente 25%, pelo menos aproximadamente 30%, pelo menos aproximadamente 35%, pelo menos aproximadamente 40%, pelo menos aproximadamente 45%, pelo menos aproximadamente 50%, pelo menos aproximadamente 55%, pelo menos aproximadamente 60%, pelo menos aproximadamente 65%, pelo menos aproximadamente 70%, pelo menos aproximadamente 75%, pelo menos aproximadamente 80%, pelo menos aproximadamente 85%, pelo menos aproximadamente 90%, pelo menos aproximadamente 95% ou pelo menos aproximadamente 99%.

[0020] Há disponível uma variedade de vias de administração. Por exemplo, o agente é administrado por via tópica, oral, através de inalação ou através de injeção.

[0021] De preferência, o indivíduo é um mamífero com necessidade de tal tratamento ou profilaxia, p. ex., um indivíduo que foi diagnosticado com uma vasculopatia ou uma predisposição para a mesma. O mamífero é qualquer mamífero, p. ex., um humano, um primata, um camundongo, um rato, um cão, um gato, um cavalo, bem como rebanhos ou animais criados para consumo de alimentos, p. ex., bovinos, ovelhas, suínos, galinhas e cabras. Em uma modalidade preferida, o mamífero é um humano.

[0022] Em aspectos, um indivíduo que é portador ou está em risco de sofrer um transtorno do tecido conjuntivo, p. ex., uma vasculopatia (e, em certas modalidades, SEDv), apresenta um nível da proteína ou do mRNA de ERK ou PKC que é diferente de um controle normal. Em algumas modalidades, uma amostra de teste obtida do indivíduo compreende um nível da proteína ou do mRNA de ERK ou PKC que é diferente de um controle

normal. Por exemplo, a amostra de teste pode compreender um nível da proteína ou do mRNA de ERK ou PKC que é pelo menos aproximadamente 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 vezes, 3 vezes, 4 vezes ou 5 vezes maior em comparação a um controle normal.

[0023] Em certas modalidades, a amostra de teste pode compreender um nível da atividade de ERK ou PKC que é pelo menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100%, aproximadamente 5 to aproximadamente 50%, aproximadamente 50 to aproximadamente 75%, aproximadamente 75 to aproximadamente 100%, 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes ou 5 vezes maior em comparação a um controle normal.

[0024] Uma amostra ou valor “controle” refere-se a uma amostra que serve como referência, normalmente uma referência conhecida, para comparação com uma amostra de teste. Por exemplo, uma amostra de teste pode ser retirada de um indivíduo em teste, p. ex., um indivíduo com um transtorno do tecido conjuntivo tal como uma vasculopatia (p. ex., SEDv) ou com necessidade de diagnóstico, e comparada a amostras de condições conhecidas, p. ex., um indivíduo (ou indivíduos) que não é portador da doença (um controle negativo ou normal), ou um indivíduo (ou indivíduos) que é portador da doença (controle positivo). Um controle pode também representar um valor médio compilado a partir de vários testes ou resultados. O técnico no assunto reconhecerá que é possível planejar controles para avaliação de qualquer número de parâmetros. O técnico no assunto entenderá quais controles são valiosos em uma dada situação e ser capaz de analisar dados com base em comparações com valores controle. Os controles são também valiosos para determinar a significância dos dados. Por exemplo, se os valores para um dado parâmetro forem variáveis em controles, a variação em amostras de teste não será considerada significativa.

[0025] O termo “quantidade normal” em relação a um composto (p. ex., uma proteína ou mRNA) refere-se a uma quantidade normal do composto em um indivíduo que não é portador de um transtorno do tecido conjuntivo, tal como uma vasculopatia (p. ex., SEDv), ou em uma população sadia ou em geral. A quantidade de um composto pode ser medida em uma amostra de teste e comparada ao nível do “controle normal”, utilizando técnicas tais como limites de referência, limites de discriminação, ou limiares que definem risco para definir pontos de corte e valores anormais (p. ex., para uma determinada SEDv ou um sintoma da mesma). O nível do controle normal significa o nível de um ou mais compostos ou compostos combinados tipicamente encontrados em um indivíduo conhecido por não sofrer uma SEDv. Tais níveis de controle normal e pontos de corte podem variar com base em se um composto é usado sozinho ou em uma fórmula combinando com outros compostos em um índice. Alternativamente, o nível do controle normal pode ser um banco de dados de padrões dos compostos provenientes de indivíduos testados anteriormente que não desenvolveram um SEDv ou um sintoma da mesma em particular (p. ex., no caso de desenvolver-se a SEDv ou um indivíduo já portador da SEDv ser testado) ao longo de um horizonte de tempo clinicamente relevante.

[0026] O nível determinado pode ser igual a um nível controle, a um nível de corte ou a um nível limiar. Em alguns aspectos, o indivíduo controle é um controle combinado da mesma espécie, sexo, etnia, grupo etário, situação em relação ao tabagismo, índice de massa corporal (IMC), situação do esquema terapêutico atual, história médica ou uma combinação dos mesmos, mas difere do indivíduo sendo diagnosticado pelo fato de que o controle não sofre da doença (ou de um de seus sintomas) em questão ou não está em risco para a doença.

[0027] Em relação a um nível controle, o nível determinado pode ser um nível aumentado. Neste relatório descritivo, o termo “aumentado” com

respeito ao nível (p. ex., nível da proteína ou do mRNA) refere-se a qualquer % de aumento acima de um nível controle. Em várias modalidades, o nível aumentado pode ser um aumento de pelo menos ou quase 5%, um aumento de pelo menos ou quase 10%, um aumento de pelo menos ou quase 15%, um aumento de pelo menos ou quase 20%, um aumento de pelo menos ou quase 25%, um aumento de pelo menos ou quase 30%, um aumento de pelo menos ou quase 35%, um aumento de pelo menos ou quase 40%, um aumento de pelo menos ou quase 45%, um aumento de pelo menos ou quase 50%, um aumento de pelo menos ou quase 55%, um aumento de pelo menos ou quase 60%, um aumento de pelo menos ou quase 65%, um aumento de pelo menos ou quase 70%, um aumento de pelo menos ou quase 75%, um aumento de pelo menos ou quase 80%, um aumento de pelo menos ou quase 85%, um aumento de pelo menos ou quase 90% ou um aumento de pelo menos ou quase 95% em relação a um nível controle.

[0028] Em relação a um nível controle, o nível determinado pode ser um nível diminuído. Neste relatório descritivo, o termo “diminuído” com respeito ao nível (p. ex., nível da proteína ou do mRNA) refere-se a qualquer % de diminuição abaixo de um nível controle. Em várias modalidades, o nível diminuído pode ser uma diminuição de pelo menos ou quase 5%, uma diminuição de pelo menos ou quase 10%, uma diminuição de pelo menos ou quase 15%, uma diminuição de pelo menos ou quase 20%, uma diminuição de pelo menos ou quase 25%, uma diminuição de pelo menos ou quase 30%, uma diminuição de pelo menos ou quase 35%, uma diminuição de pelo menos ou quase 40%, uma diminuição de pelo menos ou quase 45%, uma diminuição de pelo menos ou quase 50%, uma diminuição de pelo menos ou quase 55%, uma diminuição de pelo menos ou quase 60%, uma diminuição de pelo menos ou quase 65%, uma diminuição de pelo menos ou quase 70%, uma diminuição de pelo menos ou quase 75%, uma diminuição de pelo menos ou quase 80%, uma diminuição de pelo menos ou quase 85%, uma

diminuição de pelo menos ou quase 90% ou uma diminuição de pelo menos ou quase 95% em relação a um nível controle.

[0029] Em aspectos, a amostra de teste obtida do indivíduo compreende sangue, soro, plasma, saliva, lágrimas, humor vítreo, líquido cefalorraquidiano, suor ou urina.

[0030] Além disso, são aqui providos métodos para o tratamento de um transtorno do tecido conjuntivo em um indivíduo. O método compreende administrar uma quantidade eficaz de um agente, em que o agente diminui a atividade ou expressão de quinase relacionada a sinal extracelular (ERK) ou proteína quinase C (PKC). Em modalidades, o transtorno do tecido conjuntivo é selecionado a partir do grupo que consiste em uma vasculopatia (p. ex., SEDv), síndrome de Marfan, síndrome de Loeys-Dietz e aneurisma aórtico torácico familiar. Outros exemplos incluem, entre outros, dermatomiosite amiópática; proliferação osteocondromatosa parosteal bizarra; síndrome de Ehlers-Danlos clássica; síndrome de Ehlers-Danlos, dermatoparaxia; síndromes de Ehlers-Danlos; fasciíte eosinofílica; epidermólise bolhosa (EB) doença de Legg-Calve-Perthes; síndrome de Marfan; melorreostose; melorreostose com osteopoiquiose; doença mista do tecido conjuntivo; poliartrite com fator reumatoide negativo; osteosclerose com ictiose e insuficiência ovariana prematura; displasia de Pacman; doença óssea de Paget; doença óssea de Paget familiar; polimiosite; surdez progressiva com fixação do estapédio; doença de Ribbing; esclerodermia; anquilose temporomandibular; distrofia das vinte unhas; síndrome de Ehlers-Danlos vascular; síndrome de Weill-Marchesani; osteoesclerose dominante autossômica tipo Worth. Em certas modalidades, o transtorno do tecido conjuntivo compreende vasculopatia.

[0031] Além do tratamento da própria síndrome de Marfan, a presente invenção também provê métodos para o tratamento de uma variedade transtornos relacionados à síndrome de Marfan. Em algumas modalidades, o

transtorno relacionado à Marfan é selecionado a partir do grupo que consiste em: síndrome de Loeys-Dietz, aneurisma aórtico familiar, válvula aórtica bicúspide com dilatação aórtica, ectopia do cristalino familiar (deslocamento do cristalino), síndrome do prolapso da válvula mitral, hábito marfanoide, aracnodactilia contratural congênita (síndrome de Beals), síndrome de Stickler, síndrome de Shprintzen-Goldberg, síndrome de Weill-Marchesani e síndrome de Ehlers-Danlos.

[0032] Em modalidades, o método para o tratamento de um transtorno do tecido conjuntivo compreende administrar um agente, em que o agente compreende um anticorpo ou fragmento do mesmo, um polipeptídeo, uma pequena molécula, uma molécula de ácido nucleico ou qualquer combinação dos mesmos. Em modalidades preferidas, o compreende uma pequena molécula.

[0033] Em modalidades, o agente compreende cobimetinibe ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. Em outras modalidades, o agente compreende ruboxistaurina ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. Em outras modalidades, o agente compreende enzastaurina ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. Em outras modalidades contempladas, o agente compreende sotrastaurina ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma.

[0034] Em modalidades alternativas, o método compreende ainda administrar um agente que diminua a atividade ou expressão de fosfolipase C (PLC) ou inositol trifosfato (IP3).

[0035] Além disso, são também providas composições farmacêuticas para o tratamento de uma vasculopatia. Em modalidades, a composição compreende uma quantidade eficaz de um agente que diminui a atividade ou expressão de quinase regulada por sinal extracelular (ERK) ou proteína quinase C (PKC). A composição farmacêutica compreende um agente, em que o agente compreende um anticorpo ou fragmento do mesmo, um

polipeptídeo, uma pequena molécula, uma molécula de ácido nucleico ou qualquer combinação dos mesmos.

[0036] As composições aqui descritas são administradas por administração, administração intravenosa, administração tópica, administração parenteral, administração intraperitoneal, administração intramuscular, administração intratecal, administração intralesional, administração intracraniana, administração intranasal, administração intraocular, administração intracardíaca, administração intravítrea, administração intraóssea, administração intracerebral, administração intra-arterial, administração intra-articular, administração intradérmica, administração transdérmica, administração transmucosa, administração, sublingual, administração enteral, administração sublabial, administração por insuflação, administração por supositório, administração por inalação ou administração subcutânea.

[0037] Além disso, são também providos kits para o tratamento de vasculopatia. Em modalidades, os kits compreendem 1) uma composição farmacêutica de qualquer uma das composições aqui descritas e 2) instruções por escrito para o tratamento da vasculopatia.

[0038] Em outros aspectos, são contemplados métodos para o tratamento de um transtorno do tecido conjuntivo (p. ex., síndrome de Marfan). Em modalidades, o método compreende administrar uma quantidade eficaz de um agente, em que o agente compreende um anticorpo ou fragmento do mesmo, um polipeptídeo, uma pequena molécula, uma molécula de ácido nucleico ou qualquer combinação dos mesmos. Em certas modalidades, quantidades terapeuticamente eficazes de um ou mais agentes são coadministradas ao indivíduo.

[0039] Em certas modalidades, o método para o tratamento de um transtorno do tecido conjuntivo (p. ex., síndrome de Marfan) compreende administrar um agente que diminui a atividade ou expressão de proteína

quinase C (PKC). Em certas modalidades, o método para o tratamento de um transtorno do tecido conjuntivo (p. ex., síndrome de Marfan) compreende administrar um agente que diminui a atividade ou expressão de quinase regulada por sinal extracelular (ERK). Em certas modalidades, o método para o tratamento de um transtorno do tecido conjuntivo (p. ex., síndrome de Marfan) compreende administrar um agente que diminui a atividade ou expressão de proteína quinase C (PKC), uma quinase regulada por sinal extracelular (ERK) ou uma combinação das mesmas.

[0040] Em certas modalidades, o método para o tratamento de um transtorno do tecido conjuntivo (p. ex., síndrome de Marfan) compreende administrar um agente que diminui ou inibe a expressão de proteína quinase ativada por mitógeno /quinase regulada por sinal extracelular (MEK), quinase regulada por sinal extracelular (ERK), fosfolipase C (PLC), inositol trifosfato (IP3) ou proteína quinase C (pKC), inibindo, assim, a atividade de ERK, PLC, IP3 ou PKC.

[0041] Em certas modalidades, o método para o tratamento de um transtorno do tecido conjuntivo (p. ex., síndrome de Marfan) compreende administrar um agente que diminui ou inibe a atividade ou expressão de uma ou mais moléculas associadas com a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), p. ex., as proteínas quinases RAS-RAF/MEK/Quinase regulada por sinal extracelular (ERK).

[0042] Em algumas modalidades, o paciente é um paciente humano. Em algumas modalidades, o paciente tem 15 anos de idade ou mais. Em algumas modalidades, o paciente é um paciente adulto. Em algumas modalidades, o paciente é um paciente pediátrico.

[0043] Em algumas modalidades, o método é iniciado assim que (ou logo depois) a SEDv é diagnosticada. Em algumas modalidades, o método é iniciado quando o paciente tem 15 anos de idade ou quando é diagnosticado pela primeira vez.

[0044] Em algumas modalidades, o paciente é diagnosticado com base em um fenótipo de SEDv, ou com base em um teste molecular para SEDv (p. ex., determina-se que o paciente é portador de SEDv com base em um ou mais testes genéticos tais como um teste que determina que o paciente tem uma substituição de glicina na tripla hélice ou uma variante de sítio de *splice*).

[0045] Em algumas modalidades, o paciente carrega uma mutação COL3A1. Em algumas modalidades, o paciente tem uma substituição de glicina na tripla hélice ou uma variante de sítio de splice. Em algumas modalidades, o paciente apresenta substituições *missense* de glicina na sequência (Gly-X-Y)_n repetida da tripla hélice do colágeno e/ou variantes de sítio de *splice* que levam à exclusão de éxons em fase (*in-phase exon-skipping*). Em algumas modalidades, o paciente apresenta uma substituição de glicina na tripla hélice (Grupo I). Em algumas modalidades, o paciente carrega uma variante de sítio de splice, inserções-deleção dentro da fase ou duplicação (Grupo II). Em algumas modalidades, o paciente carrega uma variante levando à insuficiência haploide (Grupo III).

[0046] Em algumas modalidades, o paciente teve anteriormente um evento agudo relacionado à SEDv (p. ex., um evento arterial tal como uma ruptura ou dissecação, uma ruptura intestinal ou uterina) antes da dose inicial de um ou mais agentes aqui incorporados, ou um sal farmacologicamente aceitável dos mesmos.

[0047] Em certas modalidades, o agente diminui o nível da proteína PKC ou do mRNA em pelo menos aproximadamente 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 vezes, 3 vezes, 4 vezes ou 5 vezes em comparação a um controle normal. Em outras modalidades, o agente diminui o nível de atividade de PKC em pelo menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%,

80%, 90%, 95%, 99%, 100%, 5-50%, 5 vezes em comparação a um controle normal.

[0048] Em algumas modalidades, o agente diminui o nível da proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK) ou de mRNA em pelo menos aproximadamente 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 vezes, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes ou 5 vezes em comparação a um controle normal. Em outras modalidades, o agente diminui o nível de atividade de ERK em pelo menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100%, 5-50%, 5 vezes em comparação a um controle normal.

[0049] Em modalidades, o agente para o tratamento de um transtorno do tecido conjuntivo (p. ex., síndrome de Marfan) compreende enzastaurina ou um sal farmacologicamente aceitável da mesma. Em outras modalidades, o agente para o tratamento de um transtorno do tecido conjuntivo (p. ex., síndrome de Marfan) compreende sotrastaurina ou um sal farmacologicamente aceitável da mesma. Em outros exemplos contemplados, o agente para o tratamento de um transtorno do tecido conjuntivo (p. ex., síndrome de Marfan) compreende ruboxistaurina ou um sal farmacologicamente aceitável da mesma.

Definições

[0050] A menos que definidos de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste relatório descritivo têm o significado comumente entendido pelo técnico no assunto ao qual pertence esta invenção. As referências seguintes fornecem ao técnico no assunto uma definição geral de muitos dos termos usados nesta invenção: *The Cambridge Dictionary of Science and Technology* (Walker ed., 1988); *The Glossary of Genetics*, 5ª Ed., R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); e Hale & Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology* (1991). Neste relatório descritivo, os termos a

seguir têm os significados que lhes é atribuído abaixo, a menos que especificado de outra forma.

[0051] O termo “composição farmacêutica” significa qualquer composição que contenha pelo menos um agente terapêutico ou biologicamente ativo e seja adequado para administração ao paciente. Qualquer uma dessas formulações pode ser preparada por métodos bem conhecidos e aceitos da técnica. Ver, por exemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edição, (ed. A. R. Gennaro), Mack Publishing Co., Easton, Pa., 2000.

[0052] Por “receptores acoplados à proteína G (GPCR)”, entende-se um receptor proteico que detecta moléculas fora de uma célula e ativa, dentro da célula, vias de transdução de sinais e, em última instância, respostas celulares. GPCRs são chamados receptores de sete domínios transmembranares porque atravessam a membrana celular sete vezes.

[0053] Por “agonista”, entende-se uma substância química que se liga a um receptor e ativa o receptor para que produza uma resposta biológica. Enquanto um agonista causa uma ação, um “antagonista” bloqueia a ação do agonista e um agonista invertido provoca uma ação oposta àquela do agonista. Neste relatório descritivo, os termos “antagonista” e “inibidor” são usados alternadamente para se referir a qualquer molécula que neutralize ou iniba, diminua ou suprima a atividade biológica de sua molécula alvo. Em algumas modalidades, um agonista é um “superagonista” quando induz ou aumenta a atividade biológica de sua molécula alvo. Em algumas modalidades, um antagonista é um “superantagonista” quando neutraliza ou inibe, diminui ou suprime a atividade biológica de sua molécula alvo. Os inibidores, antagonistas, agonistas adequados incluem receptores solúveis, inibidores peptídicos, inibidores de pequena molécula, fusões de ligandos e anticorpos.

[0054] Neste relatório descritivo, o termo “sal” refere-se a sais de ácidos ou bases dos agentes aqui utilizados. Exemplos ilustrativos, mas não

limitantes de sais aceitáveis são sais de ácidos minerais (ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico e semelhantes), sais de ácidos orgânicos (ácido acético, ácido propiônico, ácido glutâmico, ácido cítrico e semelhantes) e sais de amônio quaternário (iodeto de metila, iodeto de etila e semelhantes).

[0055] Neste relatório descritivo, um “antagonista” pode referir-se a um anticorpo ou fragmento do mesmo, peptídeos, polipeptídeo ou fragmentos dos mesmos, pequenas moléculas e ácidos nucleicos inibidores ou fragmentos dos mesmos que interferem com a atividade ou a ligação de outro, por exemplo, ao competirem por um ou mais sítios de ligação de um agonista, mas não induzem uma resposta ativa.

[0056] Por “tipo selvagem” ou “WT”, entende-se o fenótipo da forma típica de uma espécie como ela ocorre na natureza. Alternativamente, o tipo selvagem é conceitualizado como um produto do alelo padrão, “normal” em um *locus*, ao contrário daquele produzido por um alelo não padrão, “mutante”.

[0057] O termo “administrar”, neste relatório descritivo, refere-se a qualquer modo de transferência, entrega, introdução ou transporte de um agente, por exemplo, para um indivíduo com necessidade de tratamento para uma doença ou condição. Esses modos incluem, entre outros, administração oral, tópica, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, intranasal e subcutânea.

[0058] Por “coadministrar”, entende-se que uma composição aqui descrita é administrada ao mesmo tempo, um pouco antes ou logo depois da administração de terapias adicionais. O agente ou a composição da invenção pode ser administrado isoladamente ou pode ser coadministrado ao paciente. A coadministração pretende a incluir administração simultânea ou sequencial do composto individualmente ou em combinação (mais de um composto ou agente). Os preparados podem também ser combinados, quando desejado,

com outras substâncias ativas.

[0059] Neste relatório descritivo, “administração sequencial” significa que a administração de dois agentes (p. ex., os agentes ou composições aqui descritos) ocorre separadamente no mesmo dia ou não ocorre em um mesmo dia (p. ex., ocorre em dias consecutivos).

[0060] Neste relatório descritivo, “administração simultânea” inclui a sobreposição pelo menos em parte na duração. Por exemplo, quando dois agentes (p. ex., qualquer um dos agentes aqui descritos com bioatividade) são administrados simultaneamente, a administração deles ocorre dentro de certo período desejado. A administração dos agentes pode começar e terminar no mesmo dia. A administração de um agente pode também preceder a administração de um segundo agente por dia(s) desde que ambos os agentes sejam tomados pelo menos uma vez no mesmo dia. Do mesmo modo, a administração de um agente pode estender-se para além da administração de um segundo agente desde que ambos os agentes sejam tomados pelo menos uma vez no mesmo dia. Os agentes bioativos/agentes não precisam ser tomados ao mesmo tempo cada dia para incluir administração simultânea.

[0061] Neste relatório descritivo, “administração intermitente inclui a administração de um agente por um período de tempo (que pode ser considerado um “primeiro período de administração”), seguido por um tempo durante o qual o agente não é tomado ou é tomado em uma dose menor de manutenção (que pode ser considerado “período fora”) seguido por um período durante o qual o agente é administrado novamente (que pode ser considerado um “segundo período de administração”). Geralmente, durante a segunda fase de administração, o nível de dosagem do agente se equipará àquele administrado durante o primeiro período de administração, mas pode ser aumentado ou diminuído conforme clinicamente necessário.

[0062] Neste relatório descritivo, uma “alteração” também inclui uma mudança de 2 vezes ou mais em níveis de expressão ou atividade de um gene

ou polipeptídeo, por exemplo, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 100 vezes, 500 vezes, 1000 vezes ou mais.

[0063] Conforme definido neste relatório descritivo, o termo “inibição”, “inibe”, “inibir” e semelhantes em referência a uma interação proteína-inibidor (p. ex., um inibidor de ERK ou PKC, ou inibidor de PLC ou IP3) significa afetar negativamente (p. ex., diminuir) a atividade ou função da proteína (p. ex., diminuir a atividade ou quantidade de ERK ou PKC ou PLC ou IP3, diminuir a capacidade de ERK ou PKC ou PLC ou IP3 para ligar-se a um receptor, diminuir a capacidade de um receptor para ligar-se a ERK ou PKC ou diminuir a sinalização de ERK ou PKC quando da ligação de ERK ou PKC ou PLC ou IP3 a um receptor) em relação à atividade ou função da proteína na ausência do inibidor. Em modalidades, inibição refere-se à redução de uma doença ou sintomas da doença (p. ex., transtorno do tecido conjuntivo). Do mesmo modo, um “inibidor” é um composto ou proteína que inibe um alvo ao se ligar, bloquear parcial ou totalmente, diminuir, impedir, retardar, inativar, dessensibilizar ou regular negativamente a atividade.

[0064] Por “melhorar”, entende-se diminuir, suprimir, atenuar, reduzir, parar ou estabilizar o desenvolvimento ou progressão de uma doença tal como, por exemplo, uma reação do tipo pseudo-alérgica.

[0065] Por “amplificar”, entende-se aumentar o número de cópias de uma molécula. Em um exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é usada para amplificar ácidos nucleicos.

[0066] Por “ligar-se”, entende-se ter uma afinidade físico-química por uma molécula. A ligação é medida por qualquer um dos métodos da invenção, p. ex., um fármaco/composto com um receptor expresso em uma célula.

[0067] Neste relatório descritivo, “compreende”, “compreender”, “conter”, “ter” e semelhantes podem ter o significado que lhes é atribuído na lei sobre Patentes dos Estados Unidos e podem significar “inclui”, “incluir” e semelhantes; os termos “consistir essencialmente em” ou “consiste

essencialmente”, do mesmo modo, têm o significado atribuído na lei de Patentes dos Estados Unidos e esses termos são abertos, permitindo a presença de mais do que aquilo que foi mencionado desde que as características básicas ou inovadoras daquilo que é mencionado não sejam alteradas pela presença de mais do que aquilo que é mencionado, mas exclui modalidades da técnica anterior.

[0068] Por “quantidade eficaz”, entende-se a quantidade requerida para melhorar os sintomas de uma doença em relação a um paciente não tratado. A quantidade eficaz de composto(s) ativo(s), usada na prática da presente invenção, para o tratamento terapêutico de uma doença varia dependendo da maneira de administração, a idade, peso corporal e saúde em geral do indivíduo. No final, o médico ou veterinário atendente decidirá a quantidade apropriada e o esquema posológico. Tal quantidade é referida como uma quantidade “eficaz”.

[0069] A dosagem e frequência (dose única ou múltiplas) administradas a um mamífero podem variar dependendo de uma variedade de fatores, por exemplo, se o mamífero sofre de outra doença, e sua via de administração; tamanho, idade, sexo, saúde, peso corporal, índice de massa corporal e dieta do receptor; natureza e extensão dos sintomas da doença em tratamento, tipo de tratamento simultâneo, complicações da doença em tratamento ou outros problemas relacionados à saúde. Outros esquemas terapêuticos ou agentes podem ser utilizados em conjunção com os métodos e agentes desta invenção. Ajustes e manipulação de doses estabelecidas (p. ex., frequência e duração) estão ao alcance da competência dos técnicos no assunto.

[0070] Para qualquer agente aqui descrito, a quantidade terapêuticamente eficaz (p. ex., dose eficaz ou quantidade eficaz) pode ser determinada inicialmente a partir de ensaios em culturas celulares. As concentrações alvo serão aquelas concentrações do(s) fármaco(s)

terapêutico(s) que sejam capazes de realizar os métodos aqui descritos, conforme medidas utilizando os métodos aqui descritos ou conhecidos na técnica.

[0071] Conforme bem sabido na técnica, as quantidades terapêuticamente eficazes para uso em humanos podem também ser determinadas a partir de modelos animais. Por exemplo, uma dose para humanos pode ser formulada para alcançar uma concentração que tenha sido verificada como eficaz em animais. A dose em humanos pode ser ajustada monitorando a eficácia do agente e ajustando a dose para cima ou para baixo, como descrito acima. Ajustar a dose para alcançar a eficácia máxima em humanos tendo por base os métodos descritos acima e outros métodos estão ao alcance das capacidades de qualquer técnico no assunto.

[0072] As doses podem ser variadas dependendo dos requisitos do paciente e do fármaco terapêutico empregado. A dose administrada a um paciente deve ser suficiente para obter uma resposta terapêutica benéfica no paciente ao longo do tempo. O tamanho da dose também será determinado pela existência, natureza e extensão de quaisquer efeitos colaterais adversos. A determinação da dose apropriada para uma determinada situação está ao alcance da competência do médico. Em geral, o tratamento é iniciado com doses menores, que são inferiores à dose ótima do agente. Posteriormente, a dose é aumentada por pequenos incrementos até que atingido o efeito ótimo sob as circunstâncias. As quantidades das doses e os intervalos podem ser ajustados individualmente para fornecer níveis eficazes do agente administrado para a indicação clínica em particular sendo tratada. Isso fornecerá um esquema terapêutico que se comensura com a gravidade do estado de doença do indivíduo.

[0073] A dose eficaz do agente (p. ex., inibidor farmacológico) da presente invenção para o tratamento de SEDv, o tratamento da síndrome de Marfan e/ou para alterar a expressão ou atividade da via de sinalização de

PLC/IP3/PKC/ERK pode ser entre aproximadamente 0,001 mg/kg e 0,01 mg/kg do agente, entre aproximadamente 0,01 mg/kg e 0,1 mg/kg do agente, entre aproximadamente 0,1 mg/kg e 1,0 mg/kg do agente, entre aproximadamente 1,0 mg/kg e 5,0 mg/kg do agente, entre aproximadamente 5,0 mg/kg e 10 mg/kg do agente, entre aproximadamente 10 mg/kg e 15 mg/kg do agente, entre aproximadamente 15 mg/kg e 20 mg/kg do agente, entre aproximadamente 20 mg/kg e 25 mg/kg do agente, entre aproximadamente 25 mg/kg e 30 mg/kg do agente, entre aproximadamente 30 mg/kg e 35 mg/kg do agente, entre aproximadamente 35 mg/kg e 40 mg/kg do agente, entre aproximadamente 40 mg/kg e 45 mg/kg do agente, entre aproximadamente 45 mg/kg e 50 mg/kg do agente, entre aproximadamente 50 mg/kg e 55 mg/kg do agente, entre aproximadamente 55 mg/kg e 60 mg/kg do agente, entre aproximadamente 60 mg/kg e 65 mg/kg do agente, entre aproximadamente 65 mg/kg e 70 mg/kg do agente, entre aproximadamente 70 mg/kg e 75 mg/kg do agente, entre aproximadamente 75 mg/kg e 80 mg/kg do agente, entre aproximadamente 80 mg/kg e 85 mg/kg do agente, entre aproximadamente 85 mg/kg e 90 mg/kg do agente, entre aproximadamente 90 mg/kg e 95 mg/kg do agente ou entre aproximadamente 95 mg/kg e 100 mg/kg do agente.

[0074] Em alguns aspectos, a presente invenção inclui composições com uma dose eficaz de um agente(s) da presente invenção na qual o agente pode ser entre aproximadamente 0,1% e 20% p/v da composição. Uma porcentagem em peso de um componente, a menos que especificamente declarado o contrário, baseia-se no peso total da formulação ou composição no qual o componente está incluído.

[0075] Por exemplo, a dose eficaz de um agente aqui descrito pode ser entre aproximadamente 0,001%- 0,01%, entre aproximadamente 0,01%- 0,1%, entre aproximadamente 0,1%-1,0%, entre aproximadamente 1,0%- 2,0%, entre aproximadamente 2,0%-3,0%, entre aproximadamente 3,0%-

4,0%, entre aproximadamente 4,0%-5,0%, entre aproximadamente 5,0%-6,0%, entre aproximadamente 6,0%-7,0%, entre aproximadamente 7,0%-8,0%, entre aproximadamente 8,0%-9,0%, entre aproximadamente 9,0%-10%, entre aproximadamente 10%-11%, entre aproximadamente 11%-12%, entre aproximadamente 12%-13%, entre aproximadamente 13%-14%, entre aproximadamente 14%-15%, entre aproximadamente 15%-16%, entre aproximadamente 16%-17%, entre aproximadamente 17%-18%, entre aproximadamente 18%-19% ou entre aproximadamente 19%-20% p/v da composição.

[0076] Os termos “tratar” e “tratamento”, neste relatório descritivo, referem-se à administração de um agente ou formulação a um indivíduo clinicamente sintomático acometido por uma condição adversa, transtorno ou doença que tenha como efeito reduzir a gravidade e/ou frequência dos sintomas, eliminar os sintomas e/ou a sua causa subjacente e/ou facilitar a melhora ou correção dos danos.

[0077] Os termos “sujeito”, “paciente”, “indivíduo” e semelhantes, neste relatório descritivo, não se destinam a ser limitantes e podem em geral ser trocados. Um indivíduo descrito como “sujeito”, “paciente”, “indivíduo” e semelhantes não precisa ter necessariamente uma dada doença, mas pode estar simplesmente buscando aconselhamento médico. Os termos “sujeito”, “paciente”, “indivíduo” e semelhantes, neste relatório descritivo, incluem todos os membros do reino animal que possam sofrer do transtorno indicado. Em alguns aspectos, o indivíduo é um mamífero e, em alguns aspectos, o indivíduo é um humano.

[0078] O termo “amostra” neste relatório descritivo refere-se a uma amostra biológica obtida para fins de avaliação *in vitro*. Em modalidades, a amostra pode compreender um líquido corporal. Em algumas modalidades, o líquido corporal inclui, entre outros, sangue total, plasma, soro, linfa, leite materno, saliva, muco, sêmen, extratos celulares, líquidos inflamatórios,

líquido cefalorraquidiano, humor vítreo, lágrimas, humor vítreo, aquoso ou urina obtidos do indivíduo. Em alguns aspectos, a amostra é um painel composto de dois ou mais líquidos corporais. Em aspectos exemplares, a amostra compreende sangue ou uma fração do mesmo (p. ex., plasma, soro ou uma fração obtida por leucoférese).

[0079] As faixas aqui fornecidas são entendidas como abreviações de todos os valores dentro da faixa. Por exemplo, entende-se que uma faixa de 1 a 50 inclui qualquer número, combinação de números ou subfaixa do grupo que consiste em 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 ou 50, bem como todos os valores decimais intermediários entre os números inteiros mencionados acima tais como, por exemplo, 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; e 1,9. Em relação às subfaixas, “subfaixas aninhadas” que se estendem desde um ponto final da faixa são especificamente contempladas. Por exemplo, uma subfaixa aninhada de uma faixa exemplar de 1 a 50 pode compreender 1 a 10, 1 a 20, 1 a 30 e 1 a 40, em uma direção, ou 50 a 40, 50 a 30, 50 a 20 e 50 a 10 na outra direção.

[0080] Por “recombinante”, entende-se moléculas de ácido nucleico formadas por métodos laboratoriais de recombinação genética (como clonagem molecular) para juntar material genético de múltiplas fontes, criar sequências que do contrário não seriam encontradas em organismos biológicos.

[0081] A palavra “expressão” ou “expresso” neste relatório descritivo, em referência a uma sequência de ácido nucleico tipo DNA (p. ex., um gene) significa o produto da transcrição e/ou da tradução daquela sequência. O nível de expressão de uma molécula de DNA em uma célula pode ser determinado com base na quantidade de mRNA correspondente que esteja presente dentro da célula ou na quantidade da proteína codificada por aquele DNA, produzida pela célula (Sambrook *et al.*, 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*,

18.7-18.88). Quando usada em referência a polipeptídeos, expressão inclui qualquer etapa envolvida na produção de um polipeptídeo, incluindo, entre outras, transcrição, modificação pós-transcricional, tradução, modificação pós-traducional e secreção. A expressão pode ser detectada usando técnicas convencionais para detecção de proteínas (p. ex., ELISA, *Western blotting*, citometria de fluxo, imunofluorescência, imuno-histoquímica etc.).

[0082] Por “reduzir”, entende-se uma alteração negativa de pelo menos 10%, 25%, 50%, 75% ou 100%.

[0083] Por “referência”, entende-se uma condição padrão ou controle.

[0084] A menos que especificamente declarado ou óbvio pelo contexto, neste relatório descritivo, entende-se que os termos “um”, “uma”, “o” e “a” estão no singular ou plural. A menos que especificamente declarado ou óbvio pelo contexto, neste relatório descritivo, entende-se que o termo “ou” seja inclusivo.

[0085] A menos que especificamente declarado ou óbvio pelo contexto, neste relatório descritivo, entende-se o termo “aproximadamente” como dentro de uma faixa de tolerância normal na técnica, por exemplo, dentro de 2 desvios padrão da média. Aproximadamente pode ser entendido como dentro de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% ou 0,01% do valor declarado. A menos que de outra forma evidente pelo contexto, todos os valores numéricos aqui fornecidos são modificados pelo termo “aproximadamente”.

[0086] Neste relatório descritivo, o termo “derivado” refere-se a um composto com uma estrutura derivada da estrutura de um composto original (p. ex., um composto aqui descrito) e cuja estrutura é suficientemente semelhante às aquelas aqui descritas e, tendo por base essa similaridade, seria esperado pelo técnico no assunto que exibisse as mesmas ou semelhantes atividades e utilidades que os compostos reivindicados, ou que induzisse, como um precursor, as mesmas ou semelhantes atividades e utilidades que os

compostos reivindicados. Os derivados exemplares incluem sais, ésteres, amidas, sais de ésteres ou amidas e N-óxidos de um composto original.

[0087] Cada modalidade aqui descrita é contemplada como aplicável a cada uma das outras modalidades descritas. Assim, todas as combinações dos vários elementos aqui descritos são abrangidos pelo âmbito da invenção.

[0088] Outras características e vantagens da invenção ficarão evidentes pela descrição a seguir das suas modalidades preferidas e a partir das reivindicações. A menos que definidos de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados têm o mesmo significado que comumente entendido por qualquer técnico no assunto ao qual pertence esta invenção. Embora métodos e materiais semelhantes ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser utilizados na prática ou para testar a presente invenção, métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Todas as publicações de patentes estrangeiras e pedidos de patentes citados são aqui incorporados por referência. Apresentações do Genbank e NCBI indicadas pelo número de acesso citado são aqui incorporados por referência. Todas as outras referências publicadas, documentos, manuscritos e literatura científica citados são aqui incorporados por referência. No caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo as definições, prevalecerá. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são ilustrativos somente e não se destinam a ser limitantes.

Breve descrição dos desenhos

[0089] A Figura 1A é um gráfico demonstrando que o modelo de camundongo G209S/+ recapitulou fenótipos da síndrome de Ehlers-Danlos vascular (SEDv). É mostrada a porcentagem de sobrevida *versus* idade. A sobrevida mediana foi 400 dias, $p < 0,0001$.

[0090] A Figura 1B é um gráfico demonstrando que o modelo de camundongo G938D/+ recapitulou fenótipos de SEDv. É mostrada a porcentagem de sobrevida *versus* idade. A sobrevida mediana foi 45 dias,

p<0,0001.

[0091] A Figura 1C é uma imagem que representa o coração e a aorta de um camundongo com SEDv. A ponta da flecha (lado esquerdo) indica a aorta ascendente e a planta da flecha vermelha (lado direito) indica o sítio de dissecação aórtica na aorta descendente.

[0092] A Figura 1D é um gráfico demonstrando que as amostras de SEDv agrupadas separadamente dos controles, indicam uma diferença significativa no transcriptoma de aortas de SEDv.

[0093] A Figura 1E é uma ilustração demonstrando uma análise da rede que indicou que aortas de SEDv exibiam assinaturas da expressão gênica para elevações na atividade de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) (P38, JNK, AKT, ERK, ERK1/2).

[0094] A Figura 1F é uma tabela ilustrando a predição de acordo com a análise a montante (*upstream*) de que as diferenças transcricionais entre aortas de SEDv eram conduzidas pelas aortas pela ativação do receptor acoplados à proteína G (GPCR), que foi sinalizada pelo eixo PLC/IP3/PKC/ERK relacionado.

[0095] A Figura 1G é um *immunoblot* e um gráfico que demonstraram a assinatura para elevações na sinalização de GPCR e MAPK por *immunoblotting* de marcadores de sinalização ativa através dessa via. Verificou-se que a fosforilação de ERK1/2 e a fosforilação de PKC eram significativamente maiores em aortas de SEDv.

[0096] A Figura 2A é um gráfico representando a sobrevida de camundongos tratados com cobimetinibe, um inibidor de MEK aprovado pela FDA. Observou-se 94% de sobrevida após 45 dias de tratamento, em comparação a apenas 55% de sobrevida sem tratamento.

[0097] A Figura 2B é um gráfico representando a sobrevida de camundongos tratados com ruboxistaurina, um agente farmacológico bem tolerado administrado oralmente que inibe especificamente PKC beta.

Observou-se 100% de sobrevida após 39 dias de tratamento, em comparação a apenas 55% de sobrevida sem tratamento.

[0098] A Figura 2C é um gráfico representando a sobrevida de camundongos tratados com hidralazina, que bloqueia o eixo PLC/IP3/PKC/ERK. Observou-se uma proteção de 98% de sobrevida aos 45 dias de idade, a sobrevida mediana para um camundongo com SEDv não tratado.

[0099] A Figura 3A é um gráfico mostrando que, no modelo de camundongo SEDv aqui descrito, a prenhez e lactação estão associadas com 60% de letalidade devido à dissecação arterial nos 30 primeiros dias após o parto em camundongos SEDv.

[00100] A Figura 3B é um gráfico mostrando que a prevenção da lactação pela remoção dos filhotes após o nascimento foi capaz de impedir a dissecação e morte em camundongos SEDv, observou-se 100% de sobrevida.

[00101] A Figura 3C é um gráfico mostrando que a sobrevida quase completa (95%) foi alcançada quando do tratamento com hidralazina (16 mg/kg/dia), a qual bloqueia o eixo PLC/IP3/PKC/ERK que é ativado por oxitocina.

[00102] A Figura 3D é um gráfico mostrando que se observou proteção (95% de sobrevida) quando do tratamento com trametinibe (GSK-1120212) a 1 mg/kg/dia, um inibidor de MEK aprovado pela FDA, a quinase que ativa ERK.

[00103] A Figura 3E é um gráfico de barras mostrando que risco aumentado de morte se correlacionou com aumento na ativação de ERK, enquanto proteção contra dissecação aórtica correlacionou-se com diminuição na ativação de ERK, conforme medido por *immunoblotting*.

[00104] A Figura 3F é um gráfico de barras mostrando que risco aumentado de morte se correlacionou com aumento na ativação de ERK, enquanto proteção contra dissecação aórtica correlacionou-se com diminuição

na ativação de ERK, conforme medido pela expressão do gene alvo de ERK.

[00105] A Figura 4A é uma imagem de um *immunoblot* indicando que a inibição farmacológica de PKC β impediu a autofosforilação de PKC bem como a fosforilação de ERK na parede aórtica, conforme avaliado pelo *immunoblot* de lisados aórticos e indicando que a inibição farmacológica de MEK se correlacionou com a redução prevista na fosforilação de ERK, o substrato a jusante de MEK, mas também, curiosamente, com fosforilação reduzida de PKC, sugerindo a presença de uma alça de *feedback* positivo.

[00106] As Figuras 4B e 4C são gráficos que descrevem a quantificação da imagem de *immunoblot* mostrando que a inibição farmacológica de PKC β impediu a autofosforilação de PKC, bem como a fosforilação de ERK na parede aórtica e que a inibição farmacológica de MEK se correlacionou com a redução prevista na fosforilação de ERK, o substrato a jusante de MEK, mas também, curiosamente, a fosforilação reduzida de PKC, sugerindo a presença de uma alça de *feedback* positivo (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Nem cobimetinibe nem ruboxistaurina tiveram efeito sobre a pressão arterial.

[00107] As Figuras 5A e 5B são gráficos que descrevem que camundongos tratados com hidralazina (32 mg/kg/dia), que bloqueia o eixo PLC/IP3/PKC/ERK, confere proteção notável: 98% de sobrevida aos 45 dias de idade, a sobrevida mediana para um camundongo SEDv não tratado e que a sobrevida foi afetada na puberdade, e o risco foi visto quase que exclusivamente em camundongos machos (Figura 5A, camundongos machos e Figura 5B, camundongos fêmeas).

[00108] A Figura 6 é um gráfico mostrando que a combinação de hidralazina (32 mg/kg/dia) com bicalutamida (50 mg/kg/dia) levou a 90% de sobrevida em camundongos machos, em comparação a apenas 24% de sobrevida camundongos machos tratados somente com hidralazina. Os camundongos machos continuaram a sobreviver após a remoção de

bicalutamida depois da puberdade, sugerindo que havia uma dependência no tempo para sensibilidade de androgênios nesse modelo de camundongo.

[00109] A Figura 7 é um gráfico descrevendo que camundongos machos tratados apenas com bicalutamida leva a uma sobrevida intermediária de ~80%, e os machos não continuaram a sobreviver após a remoção de bicalutamida depois da puberdade, sugerindo que a inibição apenas da sinalização de androgênios não era suficiente para impedir a doença aórtica em nossos modelos de camundongos de SEDv.

[00110] As Figuras 8A e 8B são gráficos descrevendo que camundongos tratados apenas com espironolactona (100 mg/kg/dia) mostraram uma sobrevida intermediária de ~80%, da mesma forma que bicalutamida isoladamente, no entanto, a combinação de espironolactona (100 mg/kg/dia) e hidralazina (32mg/kg/dia) leva a 100% de sobrevida após 50 dias de tratamento, da mesma forma que a combinação de hidralazina e bicalutamida.

[00111] A Figura 9 é um gráfico mostrando que camundongos tratados com doses maiores de hidralazina tiveram uma dose aumentada de hidralazina (50 mg/kg/dia) e que a sobrevida deles não melhorou mais do que com a dose de 32 mg/kg/dia.

[00112] A Figura 10A é um gráfico mostrando que adicionar um antagonista 2 específico para o receptor de oxitocina ao tratamento de camundongos leva a 95% de sobrevida nos 30 primeiros dias após o parto em camundongos SEDv que ainda estão na fase de lactação, o que demonstrou que o risco de morte significativamente elevado devido à dissecação aórtica com a prenhez foi impulsionado especificamente pela ativação do receptor de oxitocina receptor durante a amamentação.

[00113] A Figura 10B é um gráfico mostrando que propranolol, um β -antagonista não específico que diminui a pressão arterial em camundongos SEDv, não melhora a sobrevida nos 30 primeiros dias após o parto em

camundongos SEDv que estão ainda na fase de lactação, o que demonstrou que o risco de morte significativamente elevado devido à dissecção aórtica com a prenhez não é melhorado pela diminuição da pressão arterial.

[00114] A Figura 11A é um gráfico indicando que a inibição da sinalização de angiotensina-II pelo tratamento dos camundongos com um antagonista do receptor de angiotensina, losartana (60 mg/kg/dia) não revelou impacto sobre a sobrevida (Figura 11A). O tratamento dos camundongos com um antagonista do receptor de trombina, voraprxar (1 mg/kg/dia) também demonstrou não ter impacto sobre a sobrevida (Figura 11B).

[00115] A Figura 12 é um gráfico mostrando que o tratamento dos camundongos com um antagonista não específico de receptores tirosina quinases, nintedanibe (50 mg/kg/dia) não teve impacto sobre a sobrevida, sugerindo que a ativação de receptores tirosina quinases não estava impulsionando a ativação da via de sinalização PLC/IP3/PKC/ERK em camundongos com SEDv.

[00116] As Figuras 13A-13C são gráficos mostrando que o tratamento de camundongos com um β -antagonista não específico, propranolol (80 mg/kg/dia) (Figura 13A), um antagonista- β_1 específico, atenolol (120 mg/kg/dia) (Figura 13B) e um antagonista- β_1 /agonista- β_2 , celiprolol (200 mg/kg/dia) (Figura 13C) não revelou que nenhuma dessas manipulações leva a uma melhora na sobrevida em nossos modelos de camundongo SEDv, apesar de diminuir a pressão arterial.

[00117] A Figura 14 é um gráfico mostrando que celiprolol, que acelera o risco de dissecção aórtica nos modelos de camundongo, e a mutação na SEDv com a mutação Col3a1^{G209S/+} também demonstrou risco aumentado de dissecção aórtica em uso de celiprolol.

[00118] A Figura 15 é um gráfico mostrando que anlodipina (12 mg/kg/dia) também aumentou o risco de dissecção aórtica no modelo de camundongo, e isso também demonstrou ser condizente com camundongos

MFS.

[00119] A Figura 16A é um gráfico demonstrando a inibição farmacológica de PKC β usando um segundo inibidor específico de PKC β , enzastaurina. Figura 16A: Enzastaurina (60 mg/kg/dia) também resgatou do risco de morte por dissecação aórtica, com 80% dos camundongos SEDv tratados com enzastaurina sobrevivendo após 40 dias de tratamento em comparação a apenas 50% dos camundongos SEDv não tratados (p=0,0305).

[00120] A Figura 16B é um gráfico demonstrando que o tratamento dos camundongos com um antagonista do receptor de endotelina, bosentana, melhorou a sobrevida. Figura 16B: O tratamento com bosentana levou a 80% de sobrevida após 40 dias de tratamento, em comparação a apenas 50% de sobrevida em camundongos SEDv não tratados (p=0,0298).

[00121] A Figura 17 é uma coloração imunofluorescente demonstrando que a via de sinalização está elevada em amostras de tecido vascular de pacientes humanos com SEDv. A Figura 17 demonstrou fosforilação de PKC em duas amostras de tecido (artéria ilíaca e aorta torácica descendente) de pacientes com SEDv.

[00122] A Figura 18 é uma coloração imunofluorescente demonstrando que a via de sinalização está elevada em amostras de tecido vascular de pacientes humanos com SEDv. A Figura 18 demonstra a fosforilação de ERK1/2 em duas amostras de tecido (artéria ilíaca e aorta torácica descendente) de pacientes com SEDv.

[00123] A Figura 19 é um gráfico demonstrando que o tratamento com ruboxistaurina reduz o crescimento de raízes aórticas em camundongos 129 MFS.

Descrição detalhada da invenção

[00124] A invenção baseia-se, pelo menos em parte, na identificação de uma nova anormalidade na sinalização como alvo que contribui para a patogênese de SEDv. Especificamente, observou-se que agentes

farmacológicos que inibem a ativação de ERK1/2 ou a ativação de PKC eram capazes de prevenir com sucesso a morte por dissecação aórtica. Além disso, agentes que inibem a ativação da via de sinalização PLC/IP3/PKC/ERK também previnem a morte por dissecação aórtica. Considerados em conjunto, esses novos achados fornecem a primeira evidência para uma anormalidade na sinalização como alvo que contribui para a patogênese de SEDv e de outras vasculopatias em potencial, bem como outros transtornos do tecido conjuntivo.

Vasculopatia

[00125] Vasculopatia é um termo usado para descrever uma doença que afeta vasos sanguíneos. Frequentemente estão incluídas anormalidades vasculares causadas por condições degenerativas, metabólicas e inflamatórias, doenças embólicas, defeitos de coagulação e transtornos funcionais como síndrome da encefalopatia posterior ou reversível. A etiologia da vasculopatia é em geral desconhecida e a condição frequentemente não é comprovada patologicamente. Vasculite, por outro lado, é um termo mais específico e definido como inflamação da parede de um vaso sanguíneo.

[00126] Neste relatório descritivo, “vasculite (angeíte ou angite)” refere-se à inflamação de um vaso sanguíneo, p. ex., arterite, flebite ou, no vaso linfático, p. ex., linfangite. A vasculite pode assumir várias formas, tais como vasculite cutânea, vasculite urticariforme, vasculite leucocitoclástica, vasculite liveidoide e vasculite nodular. Vasculite de pequenos vasos pode referir-se à inflamação de vasos sanguíneos ou linfáticos de tamanho pequeno ou médio, p. ex., capilares, vênulas e artérias.

Síndrome de Ehlers-Danlos vascular (SEDv)

[00127] A síndrome de Ehlers-Danlos vascular (SEDv) é um transtorno hereditário do tecido conjuntivo causado por mutações heterozigóticas no gene da cadeia alfa 1 do colágeno tipo III (*COL3A1*). A principal causa de mortalidade na SEDv é dissecação e/ou ruptura arterial, mas pouco se sabe

sobre a patogênese dessa doença. Não existem estratégias terapêuticas eficazes para essa condição devastadora. A crença atual é que quantidades reduzidas de colágeno III levam diretamente aos sinais e sintomas da SEDv devido a uma perda inerente da integridade estrutural dos tecidos. No entanto, modelos patogênicos iniciais da síndrome de Marfan (MFS) também invocam singularmente a fraqueza de tecidos imposta pelo fracasso da elastogênese, mas o trabalho subsequente demonstrou claramente a sinalização aprimorada do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) em um modelo de camundongo deficiente em fibrilina-1, o produto gênico deficiente na MFS^{3,4}. O trabalho de acompanhamento prosseguiu para mostrar que TGF- β e moléculas de sinalização celular a jusante eram mediadores importantes da patologia da doença. Além disso, terapias que atenuam a sinalização de TGF- β e vias correlatas, tais como o anticorpo neutralizante contra TGF- β (Nab), o bloqueador do receptor tipo 1 de angiotensina-II (Ang-II) (ARB), losartana, ou o inibidor da ativação de ERK1/2, RDEA119/trametinibe, pode suprimir a doença aórtica em camundongos com MFS mice³⁻⁶.

[00128] No entanto, da mesma forma que vasculopatias como síndrome de Marfan e síndrome de Loeys-Dietz, são aqui providas anormalidades na sinalização que são mediadores importantes na patologia da doença em SEDv. O perfil de sequenciamento do RNA nas aortas de camundongos portadores de mutações *Col3a1* derivadas de pacientes demonstraram sinalização elevada de PLC/IP3/PKC/ERK em comparação às aortas do tipo selvagem. O *immunoblotting* da aorta torácica descendente proximal confirmou ativação elevada de PKC e ERK1/2.

[00129] Em certas modalidades, COL3A1 compreende a sequência de aminoácidos a seguir (Nº de acesso NCBI: AAH28178.1 (SEQ ID NO: 1), aqui incorporado, em sua totalidade, por referência):

1 mmsfvqkgs wllallhpti ilaqqeaveg gcshlgqsya drdvwkpepc
qicvcdsgsv

61 lcddiicddq eldcpnpeip fgeccavcpq pptaptrppn gqgpqgpkgd
pgppgipgrn

121 gdpqipgqpg spgspgppgi cescptgpqn yspqydsydv
ksgvavggla gypgpagppg

181 pppppgtsgh pgspgspgyq gppgepgqag psgppgppga
igpsgpagkd gesgrpgrpg

241 erglpgppgi kgpagipgfp gmkghrgfdg rngekgetga
pglkgenglp gengapgpmg

301 prgapgergr pglpgaagar gndgargsdg qppppgppgt
agfpgspgak gevgpagspg

361 sngapgqrge pgpqghagaq gppgppging spgkkgemgp
agipgapglm gargpppag

421 angapglrgg agepgkngak gepgprgerg eagipgvpga
kgedgkdgsp gepganglpg

481 aagergapgf rgpagpngip gekgpagerg apgpagprga
agepgrdgvp ggpgmrgmpg

541 spggpgsdgk pgppgsqges grppppgpsg prgqpvgmgf
pgpkgndgap gknnergppg

601 ggpqgppgk ngetgpqgpp gptgpggdkg dtgppgpqgl
qglpgtggpp gengkpgepg

661 pkgdagapga pggkgdagap gergppglag apglrggagp
pgpeggkgaa gppgppgaag

721 tpqlqgmpge rgglgspgpk gdkgepggpg adgvpgkdgp
rgptgpigpp gpagqpdkg

781 eggapglpgi agprgspger getgppgpag fpgapgqng
pggkgergap gekgeggppg

841 vagppgkdgt sgphgpigpp gprgnrgerg segspghpgq
pgppgppgap gpccggvgaa

901 aiagiggeka ggfapyygde pmdfkintde imtslksvng qieslispdg

srknparncr

961 dlkfchpelk sgeywvdpnq gckldaikvf cnmetgetci sanplnvprk

hwwtdssaek

1021 khvwfgesmd ggfqfsygnp elpedvldvq laflrllssr asqnityhck

nsiaymdqas

1081 gnvkkalklm gsnegefkae gnskftytlv edgctkhtge wsktvfeyrt

rkavrlpivd

1141 iapydiggpq qefgvdvgpv cfl

[00130] Em certas modalidades, COL3A1 compreende a sequência de ácido nucleico a seguir, os códons de início e parada estão em negrito e sublinhados (Nº de acesso NCBI: NM_000090.3 (SEQ ID NO: 2), aqui incorporado, em sua totalidade, por referência):

1 ggctgagttt tatgacgggc ccggtgctga agggcaggga acaacttgat

ggtgctactt

61 tgaactgctt ttctttctc cttttgcac aaagagtctc atgtctgata

tttagac**atg**

121 atgagctttg tgcaaaaggg gagctggcta cttctcgctc tgcttcatcc

cactattatt

181 ttggcacaac aggaagctgt tgaaggagga tgttcccatc ttggtcagtc

ctatgcggat

241 agagatgtct ggaagccaga accatgccaa atatgtgtct gtgactcagg

atccgttctc

301 tgcgatgaca taatatgtga cgatcaagaa ttagactgcc ccaaccaga

aattccattt

361 ggagaatgtt gtgcagtttg cccacagcct ccaactgctc ctactcgccc

tcctaattgt

421 caaggacctc aaggcccaaa gggagatcca ggccctctg gtattctgg

gagaaatggt

481 gaccctggtg ttccaggaca accagggtcc cctggttctc ctggccccc

tggaatctgt

541 gaatcatgcc ctactggtcc tcagaactat tctccccagt atgattcata

tgatgtcaag

601 tctggagtag cagtaggagg actcgcaggc tatcctggac cagctggccc

cccaggccct

661 cccgggtcccc ctggtacatc tggatcatcct ggttcccctg gatctccagg

ataccaagga

721 ccccctggtg aacctgggca agctggtcct tcaggccctc caggacctcc

tgggtctata

781 ggtccatctg gtcctgctgg aaaagatgga gaatcaggta gacccggacg

acctggagag

841 cgaggattgc ctggacctcc aggtatcaaa ggtccagctg ggatacctgg

attccctggt

901 atgaaaggac acagaggctt cgatggacga aatggagaaa agggtgaaac

aggtgctcct

961 ggattaaagg gtgaaaatgg tcttcaggc gaaaatggag ctctggacc

catgggtcca

1021 agaggggctc ctggtgagcg aggacggcca ggacttctg

gggctgcagg tgctcggggt

1081 aatgacggtg ctcgaggcag tgatggtaa ccaggccctc ctggtcctcc

tggaactgcc

1141 ggattccctg gatccctgg tgctaagggt gaagttggac ctgcagggtc

tcctggttca

1201 aatggtgccc ctggacaaag aggagaacct ggacctcagg

gacacgctgg tgctcaaggt

1261 cctcctggcc ctctgggat taatggtagt cctggtggta aaggcgaaat

gggtcccgt

1321 ggcatcctg gagctcctgg actgatggga gcccggggtc ctccaggacc

agccggtgct

1381 aatggtgctc ctggactgcg aggtggtgca ggtgagcctg gtaagaatgg
tgccaaagga

1441 gagcccggac cacgtggtga acgcggtgag gctggtattc caggtgttcc
aggagctaaa

1501 ggcgaagatg gcaaggatgg atcacctgga gaacctggtg caaatgggct
tccaggagct

1561 gcaggagaaa ggggtgcccc tgggttccga ggacctgctg
gaccaaattg catcccagga

1621 gaaaagggtc ctgctggaga gcgtggtgct ccaggccctg
cagggccccag aggagctgct

1681 ggagaacctg gcagagatgg cgtccctgga ggtccaggaa
tgaggggcat gcccggaagt

1741 ccaggaggac caggaagtga tgggaaacca gggcctccc
gaagtcaagg agaaagtgg

1801 cgaccaggtc ctctgggcc atctggccc cgaggtcagc ctggtgtcat
gggcttcccc

1861 ggtcctaaag gaaatgatgg tgctcctggt aagaatggag aacgaggtgg
ccctggagga

1921 cctggccctc agggctctcc tggaaagaat ggtgaaactg gacctcaggg
acccccaggg

1981 cctactgggc ctggtggtga caaaggagac acaggacccc ctggtccaca
aggattacaa

2041 ggcttgcttg gtacaggtgg tctccagga gaaaatggaa aacctgggga
accaggtcca

2101 aagggtgatg ccggtgcacc tggagctcca ggaggcaagg
gtgatgctgg tgcccctggt

2161 gaacgtggac ctctggatt ggcaggggcc ccaggactta gaggtggagc
tggtccccct

2221 ggtcccgaag gaggaagggt tgctgctggt cctctgggc cacctggtgc

tgctggtact

2281 cctggtctgc aaggaatgcc tggagaaaga ggaggtcttg gaagtcttg

tccaaagggt

2341 gacaagggtg aaccaggcgg tccaggtgct gatggtgtcc

cagggaaaga tggcccaagg

2401 ggtcctactg gtcctattgg tctcctggc ccagctggcc agcctggaga

taagggtgaa

2461 ggtggtgccc ccggacttcc aggtatagct ggacctctg gtagccctgg

tgagagaggt

2521 gaaactggcc ctccaggacc tgctggttcc cctggtgctc ctggacagaa

tggtgaacct

2581 ggtggtaaag gagaaagagg ggctccgggt gagaaaggtg

aaggaggccc tctggagtt

2641 gcaggacccc ctggaggttc tggacctgct ggtcctctg gtccccaagg

tgtcaaaggt

2701 gaacgtggca gtctggtgg acctggtgct gctggcttcc ctggtgctcg

tggtcttct

2761 ggtcctctg gtagtaatgg taaccagga ccccaggtc ccagcggttc

tccaggcaag

2821 gatgggcccc caggtcctgc gggtaacact ggtgctcctg gcagccctgg

agtgtctgga

2881 ccaaaagggtg atgctggcca accaggagag aagggatcgc

ctggtgcccc gggcccacca

2941 ggagctccag gccacttgg gattgctggg atcactggag cacggggtct

tgcaggacca

3001 ccaggcatgc caggtcctag gggaagccct ggccctcagg

gtgtcaaggg tgaaagtggg

3061 aaaccaggag ctaacggtct cagtggagaa cgtggtcccc ctggaccca

gggtcttct

3121 ggtctggctg gtacagctgg tgaacctgga agagatggaa accctggatc
agatggctctt

3181 ccaggccgag atggatctcc tggaggcaag ggtgatcgtg gtgaaaatgg
ctctcctggg

3241 gcccctggcg ctctgggtca tccaggccca cctggctctg tcgggtccage
tggaagaggt

3301 ggtgacagag gagaaagtgg ccctgctggc cctgctgggtg ctcccggctc
tgctgggtcc

3361 cgaggtgctc ctggctctca aggcccacgt ggtgacaaag gtgaaacagg
tgaacgtgga

3421 gctgctggca tcaaaggaca tcgaggatc cctggtaatc caggtgcccc
aggttctcca

3481 ggccctgctg gtcagcaggg tgcaatcggc agtccaggac ctgcaggccc
cagaggacct

3541 gttggacca gtggacctcc tggcaaagat ggaaccagtg gacatccagg
tcccattgga

3601 ccaccagggc ctcgaggtaa cagaggtgaa agaggatctg
agggtcccc aggccacca

661 gggcaaccag gccctcctgg acctcctggt gcccctggc cttgctgtgg
tggtgttgga

3721 gccgctgcca ttgctgggat tggaggtgaa aaagctggcg gttttgcccc
gtattatgga

3781 gatgaaccaa tggatttcaa aatcaacacc gatgagatta tgacttcaact
caagtctgtt

3841 aatggacaaa tagaaagcct cattagtcct gatggttctc gtaaaaaccc
cgctagaaac

3901 tgcagagacc tgaaattctg ccctcctgaa ctcaagagtg gagaatactg
ggttgaccct

3961 aaccaaggat gcaaattgga tgctatcaag gtattctgta atatggaaac

tggggaaaca

4021 tgcataagtg ccaatccttt gaatgttcca cggaaacact ggtggacaga

ttctagtgt

4081 gagaagaaac acgtttggtt tggagagtcc atggatggtg gtttcagtt

tagctacggc

4141 aatcctgaac ttctgaaga tgccttgat gtgcagctgg cattccttcg

acttctctcc

4201 agccgagctt cccagaacat cacatatcac tgcaaaaata gcattgcata

catggatcag

4261 gccagtggaa atgtaaagaa ggccctgaag ctgatggggt caaatgaagg

tgaattcaag

4321 gctgaaggaa atagcaaatt cacctacaca gttctggagg atggttgcac

gaaacacact

4381 ggggaatgga gcaaaacagt cttgaatat cgaacacgca aggctgtgag

actacctatt

4441 gtagatattg caccctatga cattggtggt cctgatcaag aatttggtgt

ggacgttggc

4501 cctgtttgct tttataaac caaactctat ctgaaatccc aacaaaaaaaa

atttaactcc

4561 atatgtgttc ctctgttct aatcttgta accagtgcaa gtgaccgaca

aaattccagt

4621 tatttatttc caaaatgttt ggaaacagta taatttgaca aagaaaaatg

atacttctct

4681 tttttgctg ttccacaaa tacaattcaa atgcttttg tttatttt ttaccaattc

4741 caatttcaaa atgtctcaat ggtgctataa taaataaact tcaacactct

ttatgataac

4801 aacactgtgt tatattcttt gaatcctagc ccatctgcag agcaatgact

gtgctcacca

4861 gtaaaagata acctttcttt ctgaaatagt caaatacgaa attagaaaag

ccctccctat

4921 ttaactacc tcaactggc agaaacacag attgtattct atgagtccca
gaagatgaaa

4981 aaaattttat acgttgataa aacttataaa ttccattgat taatctctg
gaagattggt

5041 ttaaaaagaa aagtgtaatg caagaattta aagaaatatt tttaaagcca
caattatttt

5101 aatattggat atcaactgct tgtaaagggtg ctctctttt ttcttgcat
tgctgggtcaa

5161 gattactaat atttggaag gctttaaaga cgcattgtat ggtgctaag
tactttcact

5221 tttaactct agatcagaat tgttgactg cattcagaac ataatgcac
aaaatctgta

5281 catgtctccc atcagaaaga ttcattggca tgccacaggg gattctctc
cttcacctg

5341 taaagggtcaa caataaaaac caaattatgg ggctgctttt gtcacactag
catagagaat

5401 gtgttgaaat ttaactttgt aagcttgat gtggttggtg atctttttt
tccttacaga

5461 cacccataat aaaatatcat attaaaattc

Via MAP/ERK

[00131] A via MAPK/ERK (também conhecida como a via Ras-Raf-MEK-ERK) é uma cadeia de proteínas na célula que comunica um sinal de um receptor na superfície da células para o DNA no núcleo da célula.

[00132] O sinal inicia quando a molécula de sinalização se liga ao receptor na superfície da célula e termina quando o DNA no núcleo expressa uma proteína e produz alguma mudança na célula, tal como divisão celular. A via inclui muitas proteínas, entre elas MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógeno, originalmente chamadas ERK, quinases reguladas por sinal

extracelular), que se comunicam pela adição de grupos fosfato a uma proteína vizinha, e que atua como um botão “liga” ou “desligada”.

[00133] O termo “ERK” refere-se a qualquer proteína ou gene humano ERK1 ou ERK2. ERK1 é conhecido por diversos nomes incluindo, por exemplo, proteína quinase 3 ativada por mitógeno, quinase regulada por sinal extracelular 1, MAP2 quinase estimulada por insulina, quinase 1 MAP, MAPK 1, p44-ERK1, ERT2, p44-MAPK ou proteína quinase 2 associada a microtúbulos.

[00134] ERK2 é conhecido por diversos nomes incluindo, por exemplo, proteína quinase 1 ativada por mitógeno, quinase regulada por sinal extracelular 2, proteína quinase 2 ativada por mitógeno, quinase MAP 2, MAPK 2, p42-MAPK ou ERT1.

[00135] Em certas modalidades, ERK1 compreende a sequência de aminoácidos a seguir (Nº de acesso NCBI: P27361.4 (SEQ ID NO: 3), aqui incorporado, em sua totalidade, por referência):

```

1  MAAAAAQGGG  GGEPRRTEGV  GPGVPGEVEM
VKGQPFDVGP RYTQLQYIGE GAYGMVSSAY
61  DHVRKTRVAI  KKISPFHQQT  YCQRTLREIQ
ILLRFRHENV IGIRDILRAS TLEAMRDVYI
121  VQDLMETDLY  KLLKSQQLSN  DHICYFLYQI
LRGLKYIHSA NVLHRDLKPS NLLINTTCDL
181  KICDFGLARI  ADPEHDHTGF  LTEYVATRWW
RAPEIMLSNK GYTKSIDIWS VGCILAEMLS
241  NRPIFPGKHY  LDQLNHILGI  LGSPSQEDLN
CIINMKARNY LQSLPSKTKV AWAKLFPKSD
301  SKALDLLDRM  LTFNPNKRIT  VEEALAHPYL
EQYYDPTDEP VAEEPFTFAM ELDDLPERL
361 KELIFQETAR FQPGVLEAP

```

[00136] Em certas modalidades, o ERK1 compreende a seguinte

sequência nucleotídicas, a região de codificação está em negrito e sublinhada (Nº de acesso NCBI: X60188.1 (SEQ ID NO: 4), aqui incorporado, em sua totalidade, por referência):

```

1  cgttctctcgg cgccgccggg gccccagagg gcagcggcag caacagcagc
agcagcagca
61  gcgggagtg agatggcggc ggcggcggct caggggggcg
ggggcgggga gccccgtaga
121 accgaggggg tcggcccggg ggtcccgggg gaggtggaga
tggtgaagg gcagccgttc
181 gacgtgggcc cgcgctacac gcagttgcag tacatcggcg agggcgcgta
cggcatggtc
241 agctcggcct atgaccacgt gcgcaagact cgcgtggcca tcaagaagat
cagccccttc
301 gaacatcaga cctactgcca ggcacgctc cgggagatcc agatcctgct
gcgcttcgcg
361 catgagaatg tcacggcat ccgagacatt ctgcgggcgt ccaccctgga
agccatgaga
421 gatgtctaca ttgtgcagga cctgatggag actgacctgt acaagttgct
gaaaagccag
481 cagctgagca atgaccatat ctgctacttc ctctaccaga tctgcgggg
cctcaagtac
541 atccactccg ccaacgtgct ccaccgagat ctaaagccct ccaacctgct
cagcaacacc
601 acctgcgacc ttaagatttg tgatttcggc ctggcccgga ttgccgatcc
tgagcatgac
661 cacaccggct tctgacgga gtatgtggct acgcgtggt accgggcccc
agagatcatg
721 ctgaactcca agggctatac caagtccatc gacatctggt ctgtgggctg
cattctggct

```

781 gagatgctct ctaaccggcc catcttcct ggcaagcact acctggatca
gctcaaccac

841 attctgggca tcttgggctc cccatcccag gaggacctga attgtatcat
caacatgaag

901 gcccgaaact acctacagtc tctgccctcc aagaccaagg tggcttgggc
caagcttttc

961 cccaagtcag actccaaagc ccttgacctg ctggaccgga tgtaacctt
taaccccaat

1021 aaacggatca cagtggagga agcgctggct caccctacc tggagcagta
ctatgaccgg

1081 acggatgagc cagtggccga ggagcccttc acctcgcca tggagctgga
tgacctacct

1141 aaggagcggc tgaaggagct catcttcag gagacagcac gttccagcc
cggagtgtg

1201 gagggccctagcccagaca gacatctctg caccctgggg cctggacctg
cctcctgcct

1261 gcccctctcc cgccagactg ttagaaaatg gacactgtgc ccagcccga
ccttggcagc

1321 ccaggccggg gtggagcatg ggcctggcca cctctctct ttgctgaggc
ctccagcttc

1381 aggcaggcca aggccttctc ctccccacc gccctccca cggggcctcg
ggagctcagg

1441 tggccccagt tcaatctccc gctgctgtg ctgctgccc cttaacctc
ccagcgtccc

1501 agtctctggc agttctggaa tggaagggtt ctggctgccc caacctgtg
aagggcagag

1561 gtggagggtg gggggcgctg agtagggact cagggccatg
cctgcccccc tcattctcatt

1621 caaacccac cctagtttcc ctgaaggaa attccttagt ctcaagggt

agcatccctg

1681 aggagccagg ccgggccgaa tccctccct gtcaaagctg tcaactcgcg

tgcctcgct

1741 gcttctgtgt gtggtgagca gaagtggagc tggggggcgt ggagagcccg

gcgcccctgc

1801 cacctccctg acccgtctaa tatataaata tagagatgtg tctatggctg

aaaaaaaaaa

1861 aaaaaa

[00137] Em certas modalidades, ERK2 compreende a sequência de aminoácidos a seguir (No de acesso NCBI: P28482.3 (SEQ ID NO: 5), aqui incorporado, em sua totalidade, por referência):

1 MAAAAAAGAG PEMVRGQVFD VGPRYTNLSY
IGEGAYGMVC SAYDNVNKVR VAIKKISPFE

61 HQTTCQRTL R EIKILLRFRH ENIIGINDII
RAPTIEQMKD VYIVQDLMET DLYKLLKTQH

121 LSNDHICYFL YQILRGLKYI HSANVLHRDL
KPSNLLLNTT CDLKICDFGL ARVADPDHDH

181 TGFLTEYVAT RWYRAPEIML NSKGYTKSID
IWSVGCILAE MLSNRPIFPG KHYLDQLNHI

241 LGILGSPSQE DLNCIINLKA RNYLLSLPHK
NKVPWNRLFP NADSKALDLL DKMLTFNPHK

301 RIEVEQALAH PYLEQYYDPS DEPIAEAPFK
FDMELDDL PK EKLKELIFEE TARFQPGYRS

[00138] Em certas modalidades, o ERK2 compreende a seguinte sequência nucleotídica, a sequência de codificação está em **negrito** e sublinhada (Nº de acesso NCBI: NM_138957.3 (SEQ ID NO: 6), aqui incorporado, em sua totalidade, por referência):

1 gcccctccct **ccgcccgcgc** gccggccgc **ccgtcagtct** ggcaggcagg
caggcaatcg

61 gtccgagtgg ctgtcggctc ttcagctctc ccgctcggcg tcttccttcc
tcttccccgt

121 cagcgtcggc ggctgcaccg gcggcggcgc agtccttcgc
ggagggggcga caagagctga

181 gcggcggccg ccgagcgtcg agctcagcgc ggcggaggcg
gcggcggccc ggcagccaac

241 **atg**gcggcgg cggcggcggc gggcgcgggc ccggagatgg
tccgcgggca ggtgttcgac

301 gtggggccgc gctacaccaa cctctcgtac atcggcgagg gcgcctacgg
catggtgtgc

361 tctgcttatg ataattgcaa caaagttcga gtagctatca agaaaatcag
cccctttgag

421 caccagacct actgccagag aaccctgagg gagataaaaa tcttactgcg
cttcagacat

481 gagaacatca ttggaatcaa tgacattatt cgagcaccaa ccatcgagca
aatgaaagat

541 gtatatatag tacaggacct catggaaaca gatctttaca agctcttgaa
gacacaacac

601 ctcagcaatg accatatctg ctattttctc taccagatcc tcagagggtt
aaaatatatc

661 cattcagcta acgttctgca ccgtgacctc aagccttcca acctgtgtct
caacaccacc

721 tgtgatctca agatctgtga ctttggcctg gcccggtgtg cagatccaga
ccatgatcac

781 acagggttcc tgacagaata tgtggccaca cgttgggtaca gggctccaga
aattatgttg

841 aattccaagg gctacaccaa gtccattgat atttggctctg taggctgcat
tctggcagaa

901 atgctttcta acaggcccat cttccaggg aagcattatc ttgaccagct

gaaccacatt

961 ttgggtattc ttgatcccc atcacaagaa gacctgaatt gtataataaa

tttaaaagct

1021 aggaactatt tgctttctct tccacacaaa aataagggtgc catggaacag

gctgttccca

1081 aatgctgact ccaaagctct ggacttattg gacaaaatgt tgacattcaa

cccacacaag

1141 aggattgaag tagaacaggc tctggccccc ccatatctgg agcagtatta

cgacccgagt

1201 gacgagccca tcgccgaagc accattcaag ttcgacatgg aattggatga

cttgccctaag

1261 gaaaagctca aagaactaat tttgaagag actgctagat tccagccagg

atacagatct

1321 taaatttgc aggtacctgg agttaatac agtgagctct agcaagggag

gcgctgcctt

1381 ttgtttctag aatattatgt tctcaaggt ccattatttt gtattctttt

ccaagctcct

1441 tattggaagg tattttttta aatttagaat taaaaattat ttagaaagtt

acatatataaa

1501 aaaaaaaaaa aaaa

[00139] Em certas modalidades, a invenção provê métodos para o tratamento de vasculopatias (p. ex., SEDv) em um indivíduo com necessidade do mesmo, em que os métodos compreendem administrar ao indivíduo uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente que diminui a atividade ou expressão de ERK. Exemplos de inibidores de ERK incluem ASN007 (Asana BioSciences, Bridgewater, New Jersey), Ulixertinibe (BVD-523) (BioMed Valley Discoveries, Kansas City, MO), CC-90003 (Celgene Corporation, Summit, New Jersey), GDC-0994 (Array BioPharma, Boulder, CO), KO-947 (Kura Oncology, San

Diego, California), LTT462 (Novartis, Basel, Switzerland), LY3214996 (Eli Lilly e Company, Indianapolis, IN), MK-8353 (Merck Sharp e Dohme Corp, Kenilworth, NJ).

Inibidores de MEK

[00140] Em modalidades, a invenção provê métodos para o tratamento de vasculopatias (p. ex., SEDv) em um indivíduo com necessidade do mesmo, em que os métodos compreendem administrar ao indivíduo uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente que diminui a atividade ou expressão de ERK ou PKC. Por exemplo, um inibidor da via Ras/Raf/MEK/ERK. Em modalidades, o inibidor da via Ras é selecionado dentre um inibidor de Raf como vemurafenibe, sorafenibe ou dabrafenibe, um inibidor de MEK como AZD6244 (Selumetinibe), PD0325901, GSK1120212 (Trametinibe), U0126-EtOH, PD184352, RDEA119 (Rafametinibe), PD98059, BIX 02189, MEK162 (Binimetinibe), AS-703026 (Pimasertibe), SL-327, BIX02188, AZD8330, TAK-733, cobimetinibe ou PD318088, e um inibidor de ERK como LY3214996, BVD-523 ou GDC-0994.

[00141] Em modalidades, o inibidor de MEK é selecionado a partir do grupo que consiste em Trametinibe, Refametinibe, Cobimetinibe, TAK-733, PD0325901, PD184352 (CI-10-40), R05126766, RO-4987655; E6201; GDC-0623; CH5126766; G-573; WX-554; Selumetinibe, Binimetinibe e Pimasertibe. Em modalidades, o inibidor de MEK compreende cobimetinibe. Em modalidades, o inibidor de MEK compreende trametinibe. Em modalidades, o inibidor de MEK compreende trametinibe e cobimetinibe. Em modalidades, os inibidores de MEK ou seus sais farmacêuticamente aceitáveis são também contemplados.

[00142] Em certas modalidades, o inibidor de MEK pode ser administrado em uma concentração entre aproximadamente 0,001 mg/kg e 250 mg/kg de peso corporal, p. ex., 0,001 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,01 mg/kg,

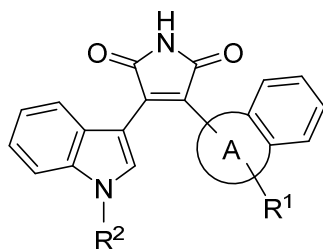
0,05mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 225 mg/kg ou 250 mg/kg de peso corporal.

Inibidores de proteína quinase C (PKC)

[00143] A proteína quinase C, abreviada comumente como PKC, constitui uma família de enzimas de proteínas quinases que estão envolvidas no controle da função de outras proteínas por meio da fosforilação de grupos hidroxila de resíduos de aminoácidos serina e treonina nessas proteínas, ou um membro desta família. As enzimas PKC, por sua vez, são ativadas por sinais como aumentos na concentração de diacilglicerol (DAG) ou íons cálcio (Ca^{2+}). Desse modo, as enzimas PKC desempenham papéis importantes em várias cascatas de transdução de sinal. A família PKC consiste em quinze isozimas em humanos, e estão divididas em três subfamílias, com base em seus requisitos de segundo mensageiro: convencional (ou clássico), novo e atípico. As PKCs convencionais contêm as isoformas α , β_I , β_{II} e γ . Essas requerem Ca^{2+} , DAG e um fosfolipídio, como fosfatidilserina para ativação. As novas (n) PKCs incluem as isoformas δ , ϵ , η e θ , e requerem DAG, mas não requerem Ca^{2+} para ativação. Desse modo, as PKCs convencionais e novas são ativadas por meio da mesma via de transdução de sinal que a fosfolipase C. Por outro lado, as (a) PKCs atípicas (incluindo as isoformas de proteína quinase $M\zeta$ e ι / λ) não requerem Ca^{2+} nem diacilglicerol para ativação. O termo “proteína quinase C” neste relatório descritivo em geral refere-se a toda a família de isoformas.

[00144] Os agentes exemplares para PKC incluem, entre outros, ruboxistaurina, queleritrina, miyabenol C, miricitrina, gossipol, verbascosídeo, BIM-1 ou Briostatina 1. Em modalidades, o inibidor de PKC compreende enzastaurina. Em modalidades, o inibidor de PKC compreende ruboxistaurina. Em modalidades, os agentes para PKC, ou seus sais farmacologicamente aceitáveis são também contemplados.

[00145] Em algumas modalidades, o inibidor de PKC pode ter a estrutura de:



(I), ou um sal do mesmo,

em que:

O Anel A é um cicloalquila C_5-C_6 substituído ou não substituído, heterocicloalquila de 5 a 6 membros substituído ou não substituído e tendo mais de um membro N, O ou S no anel, fenila substituído ou não substituído ou heteroarila substituído ou não substituído de 5 a 6 membros e tendo mais de um membro N, O ou S no anel;

cada R^1 e R^2 são independentemente hidrogênio, halogênio, $-N_3$, $-CN$, $-NO_2$, $-NR^A R^B$, $-C(O)R^C$, $-C(O)-OR^C$, $-C(O)NR^A R^B$, $-OR^D$, $-NR^A C(O)R^C$, $-NR^A C(O)OR^C$, alquila substituído ou não substituído (p. ex., C_1-C_2 , C_1-C_4 , C_1-C_8 ou C_1-C_{10}), heteroalquila substituído ou não substituído (p. ex., 2 a 8 membros, 2 a 6 membros, 4 a 6 membros, 2 a 3 membros ou 4 a 5 membros tendo um ou mais membros N, O ou S no anel), cicloalquila substituído ou não substituído (p. ex., C_3-C_8 , C_3-C_6 , C_4-C_6 , ou C_5-C_6), heterocicloalquila substituído ou não substituído (p. ex., 3 a 8 membros, 3 a 6 membros, 4 a 6 membros, 4 a 5 membros, ou 5 a 6 membros tendo um ou mais membros N, O ou S no anel), arila substituído ou não substituído (p. ex., C_6-C_{10} ou fenila) ou heteroarila substituído ou não substituído (p. ex., 5 a 10 membros, 5 a 9 membros ou 5 a 6 membros tendo um ou mais membros N, O ou S no anel); ou

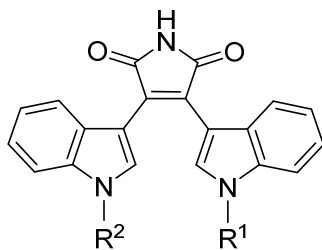
R^1 e R^2 são conectados juntos para formar um ligante alquilenos substituído ou não substituído (p. ex., C_1-C_2 , C_1-C_4 , C_1-C_8 , C_1-C_{10}), heteroalquilenos substituído ou não substituído (p. ex., 2 a 8 membros, 2 a 6 membros, 4 a 6 membros, 2 a 3 membros ou 4 a 5 membros tendo um ou mais

N, O ou S na cadeia do heteroalquileno), cicloalquileno substituído ou não substituído (p. ex., C₃-C₈, C₃-C₆, C₄-C₆ ou C₅-C₆), heterocicloalquileno substituído ou não substituído (p. ex., 3 a 8 membros, 3 a 6 membros, 4 a 6 membros, 4 a 5 membros ou 5 a 6 membros tendo um ou mais membros N, O ou S no anel)), arileno substituído ou não substituído (p. ex., C₆-C₁₀ ou fenileno) ou heteroarileno substituído ou não substituído (p. ex., 5 a 10 membros, 5 a 9 membros, ou 5 a 6 membros tendo um ou mais membros N, O ou S no anel));

em que cada R^A, R^B, R^C e R^D em cada ocorrência é independentemente hidrogênio, alquila substituído ou não substituído, heteroalquila substituído ou não substituído (p. ex., 2 a 8 membros com um ou mais átomos de N, O ou S), cicloalquila substituído ou não substituído (p. ex., 2 a 3 membros), heterocicloalquila substituído ou não substituído ((p. ex., 3 a 8 membros com um ou mais membros N, O ou S no anel), arila substituído ou não substituído como fenila; ou heteroarila substituído ou não substituído (p. ex., p. ex., 5 a 10 membros, com um ou mais membros N, O ou S no anel).

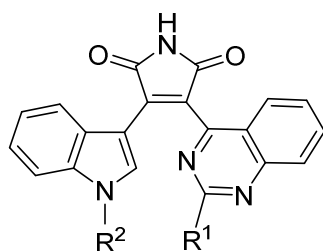
[00146] Em algumas modalidades, o Anel A é heteroarila de 5-6 membros que pode incluir um ou mais nitrogênios como membros do anel.

[00147] Em algumas modalidades, o inibidor de PKC pode ter a estrutura de:



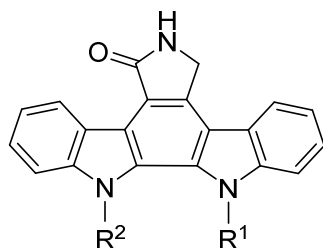
(II). R¹ e R² são como descritos acima.

[00148] Em algumas modalidades, o inibidor de PKC pode ter a estrutura de:

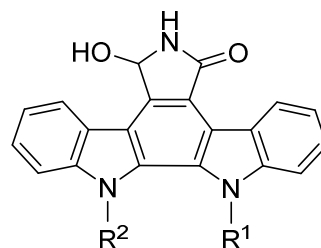


(III). R^1 e R^2 são como descritos acima.

[00149] Em algumas modalidades, o inibidor de PKC pode ter a estrutura de:



(IV-A) ou

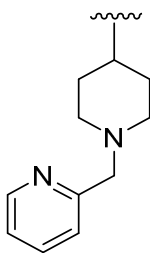


(IV-B).

R^1 e R^2 são como descritos acima.

[00150] Em algumas modalidades, para o inibidor de PKC de fórmula (I), (II), (III), (IV-A) ou (IV-B), cada R^1 e R^2 é hidrogênio, alquila C_1 - C_4 substituído ou não substituído, heteroalquila substituído ou não substituído de 2 a 6 membros (p. ex., tendo um ou mais membros N, O ou S), cicloalquila C_3 - C_6 substituído ou não substituído, heterocicloalquila substituído ou não substituído de 5 a 10 membros (p. ex., tendo um ou mais membros N, O ou S no anel), fenila substituído ou não substituído ou heteroarila substituído ou não substituído de 5 a 10 membros (p. ex., tendo um ou mais membros N, O ou S no anel). Em algumas modalidades, cada R^1 e R^2 são independentemente hidrogênio, alquila C_1 - C_4 substituído ou não substituído ou heterocicloalquila substituído com um ou mais membros N, O ou S no anel. Em algumas modalidades, cada R^1 e R^2 são independentemente hidrogênio ou alquila C_1 - C_4 não substituído.

[00151] Em algumas modalidades, para o inibidor de PKC de fórmula (II), R^1 é piperidinila, piperazinila, piridila ou pirimidila substituído ou não

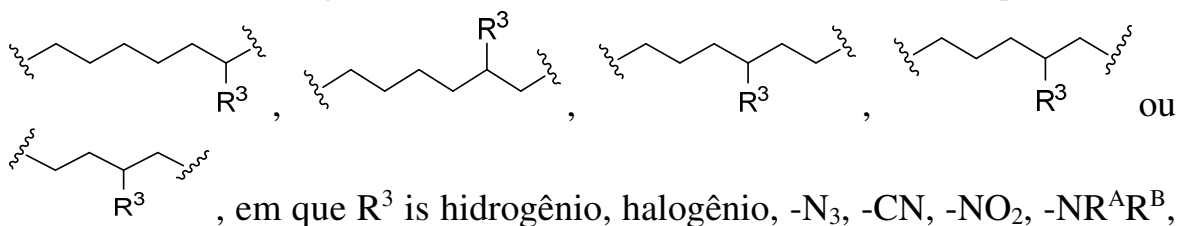


substituído. Por exemplo, R^1 é .

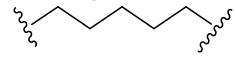
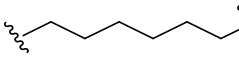
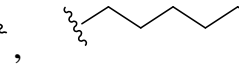
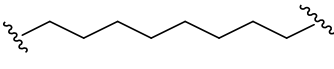
[00152] Em algumas modalidades, R^2 é hidrogênio ou alquila C_1 - C_4 não substituído. Em algumas modalidades, R^2 é hidrogênio. Em algumas modalidades, R^2 é metila. Em algumas modalidades, R^2 é etila. Em algumas modalidades, R^2 é propila. Em uma modalidade, R^2 é butila. Em algumas modalidades, R^2 é t-butila.

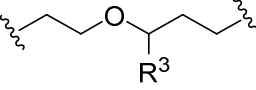
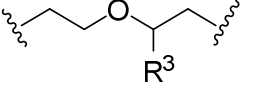
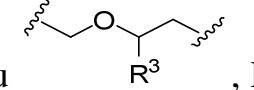
[00153] Em algumas modalidades, para o inibidor de PKC de fórmula (I), (II), (III), (IV-A) ou (IV-B), R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar um ligante alquilenos C_1 - C_8 substituído ou não substituído ou heteroalquilenos substituído ou não substituído de 2 a 8 membros tendo um ou mais átomos de N, O ou S na cadeia do heteroalquilenos. Em algumas modalidades, R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar um ligante alquilenos C_1 - C_8 substituído ou não substituído. Em algumas modalidades, R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar um ligante alquilenos C_1 - C_8 substituído. Em algumas modalidades, R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar um ligante alquilenos C_1 - C_8 não substituído. Em algumas modalidades, R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar um ligante heteroalquilenos de 2 a 8 membros tendo um ou mais átomos de N, O ou S na cadeia do heteroalquilenos. Em algumas modalidades, R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar um ligante heteroalquilenos não substituído de 2 a 8 membros tendo um ou mais átomos de N, O ou S na cadeia do ligante heteroalquilenos.

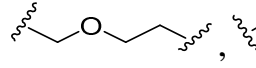
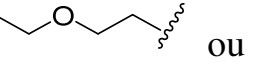
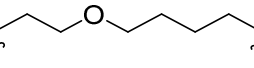
[00154] Em algumas modalidades, R^1 e R^2 são conectados para formar



$-\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{C}}$, $-\text{C}(\text{O})-\text{OR}^{\text{C}}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{\text{A}}\text{R}^{\text{B}}$, $-\text{OR}^{\text{D}}$, $-\text{NR}^{\text{A}}\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{C}}$, $-\text{NR}^{\text{A}}\text{C}(\text{O})\text{OR}^{\text{C}}$, alquila substituído ou não substituído (p. ex., $\text{C}_1\text{-C}_2$, $\text{C}_1\text{-C}_4$, $\text{C}_1\text{-C}_8$ ou $\text{C}_1\text{-C}_{10}$), heteroalquila substituído ou não substituído (p. ex., 2 a 8 membros, 2 a 6 membros, 4 a 6 membros, 2 a 3 membros ou 4 a 5 membros tendo um ou mais membros N, O ou S), cicloalquila substituído ou não substituído (p. ex., $\text{C}_3\text{-C}_8$, $\text{C}_3\text{-C}_6$, $\text{C}_4\text{-C}_6$ ou $\text{C}_5\text{-C}_6$), heterocicloalquila substituído ou não substituído (p. ex., 3 a 8 membros, 3 a 6 membros, 4 a 6 membros, 4 a 5 membros ou 5 a 6 membros e tendo um ou mais membros N, O ou S no anel), arila substituído ou não substituído (p. ex., $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ ou fenila) ou heteroarila substituído ou não substituído (p. ex., 5 a 10 membros, 5 a 9 membros, ou 5 a 6 membros e tendo um ou mais membros N, O ou S no anel). R^{A} , R^{B} , R^{C} e R^{D} são como descritos acima.

[00155] Em algumas modalidades, R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar , ,  ou , o qual pode ser substituído com um ou mais dentre os R^3 descritos acima.

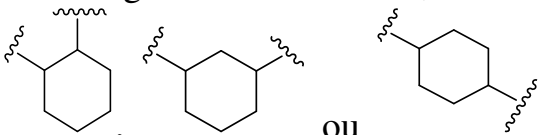
[00156] Em algumas modalidades, R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar ,  ou , R^3 é como descrito acima.

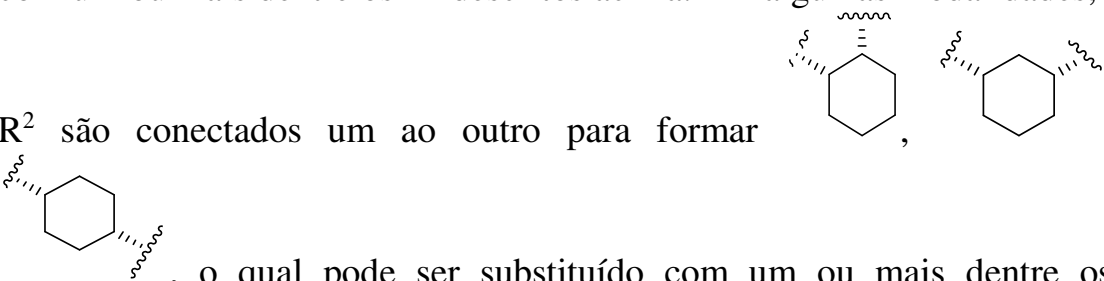
[00157] Em algumas modalidades, R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar ,  ou , o qual pode ser substituído com um ou mais dentre os R^3 descritos acima.

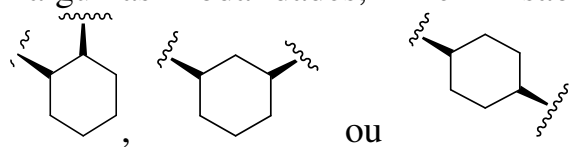
[00158] Em algumas modalidades, para o inibidor de PKC de fórmula (IV-A) ou (IV-B), R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar um ligante cicloalquilenos $\text{C}_5\text{-C}_6$ substituído ou não substituído. Em algumas modalidades, R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar um ligante cicloalquilenos $\text{C}_5\text{-C}_6$ substituído, por exemplo, o qual pode ser substituído com um ou mais R^3 descritos acima. Em algumas modalidades, R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar um ligante cicloalquilenos $\text{C}_5\text{-C}_6$ não

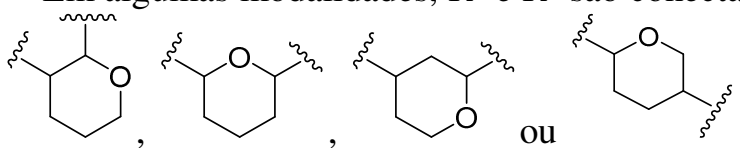
substituído.

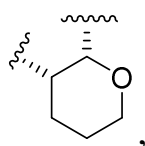
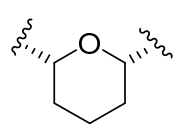
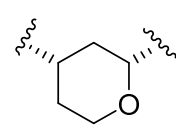
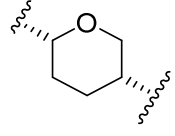
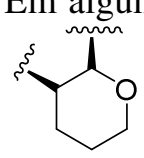
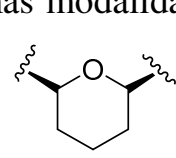
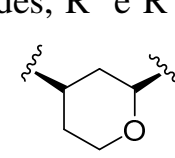
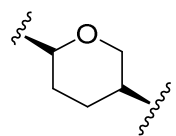
[00159] Em algumas modalidades, R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar um ligante heterocicloalquilenos substituído ou não substituído de 5 a 6 membros (p. ex., tendo um ou mais átomos de N, O ou S na cadeia do ligante). Em algumas modalidades, R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar um ligante heterocicloalquilenos substituído de 5 a 6 membros tendo um ou mais átomos de N, O ou S na cadeia do ligante, por exemplo, o qual pode ser substituído com R^3 descrito acima. Em algumas modalidades, R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar um ligante heterocicloalquilenos não substituído de 5 a 6 membros tendo um ou mais átomos de N, O ou S na cadeia do ligante.

[00160] Em algumas modalidades, R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar , o qual pode ser substituído com um ou mais dentre os R^3 descritos acima. Em algumas modalidades, R^1 e

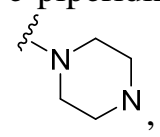
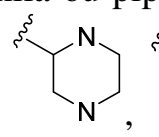
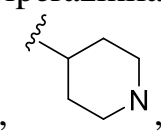
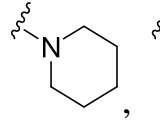
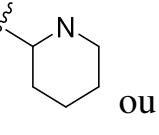
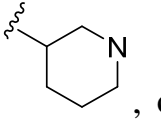
R^2 são conectados um ao outro para formar , o qual pode ser substituído com um ou mais dentre os R^3 descritos acima. Em algumas modalidades, R^1 e R^2 são conectados um ao

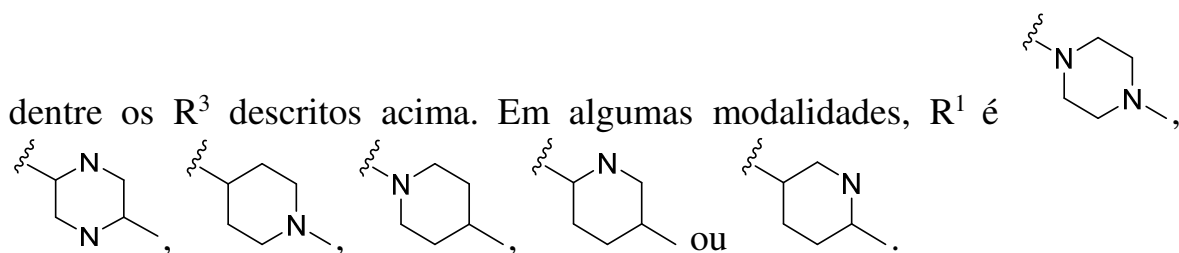
outro para formar , o qual pode ser substituído com um ou mais dentre os R^3 descritos acima.

[00161] Em algumas modalidades, R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar , o qual pode ser substituído com um ou mais dentre os R^3 descritos acima. Em algumas

modalidades, R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar ,
,
 ou , o qual pode ser substituído com um ou mais dentre os R^3 descritos acima. Em algumas modalidades, R^1 e R^2 são conectados um ao outro para formar , ,  ou , o qual pode ser substituído com um ou mais dentre os R^3 descritos acima.

[00162] Em algumas modalidades, para o inibidor de PKC de fórmula (III), cada R^1 e R^2 são independentemente hidrogênio, alquila C_1 - C_4 substituído ou não substituído ou heterocicloalquila substituído ou não substituído de 5 a 6 membros e tendo um ou mais membros N, O ou S no anel. Em algumas modalidades, R^1 é alquila C_1 - C_4 não substituído. Em algumas modalidades, R^1 é heterocicloalquila substituído de 5 a 6 membros tendo um ou mais membros N, O ou S no anel, o qual pode ser substituído com um ou mais dentre os R^3 descrito acima. Em algumas modalidades, R^1 é heterocicloalquila substituído de 5 a 6 membros tendo um ou mais membros N, O ou S no anel, o qual pode ser substituído com um ou mais dentre os R^3 descritos acima. Em alguma modalidade, R^1 é piperidinila ou piperazinila substituído ou não substituído. Em alguma modalidade, R^1 é piperidinila ou piperazinila substituído, o qual pode ser substituído com um ou mais dentre os R^3 descritos acima. Em alguma modalidade, R^1 é piperidinila ou piperazinila não substituído. Em algumas modalidades, R^1 é

, , ,
,  ou , o qual pode ser substituído com um ou mais

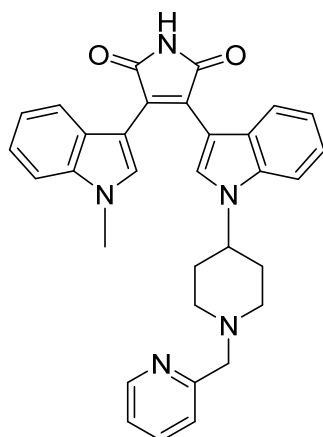


[00163] Em algumas modalidades, R^2 é hidrogênio. Em uma modalidade, R^2 é metila.

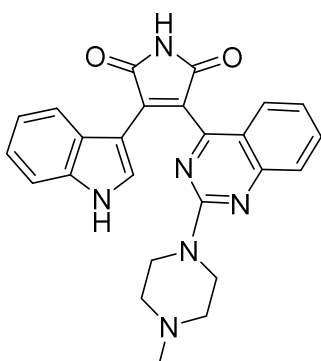
[00164] Como discutido acima, os grupos que são “substituídos” são substituídos por outro diferente de hidrogênio em uma ou mais posições disponíveis, tipicamente 1, 2, 3, 4 ou 5 posições, por um ou mais grupos adequados (os quais podem ser iguais ou diferentes), por exemplo, halogênio, ciano, amino, hidroxí, nitro, azido, carboxamido, $-\text{COOH}$, SO_2NH_2 , alquila (p. ex., alquila $\text{C}_1\text{-C}_8$), alquenila (p. ex., alquenila $\text{C}_2\text{-C}_8$), alquinila (p. ex., alquinila $\text{C}_2\text{-C}_8$), alcóxi (p. ex., alcóxi $\text{C}_1\text{-C}_8$), alquil éter (p. ex., alquil $\text{C}_2\text{-C}_8$ éter), alquiltio (p. ex., alquiltio $\text{C}_1\text{-C}_8$), mono- ou di-(alquil $\text{C}_1\text{-C}_8$)amino, haloalquila (p. ex., haloalquila $\text{C}_1\text{-C}_6$), hidroxialquila (p. ex., hidroxialquila $\text{C}_1\text{-C}_6$), aminoalquila (p. ex., aminoalquila $\text{C}_1\text{-C}_6$), haloalcóxi (p. ex., haloalcóxi $\text{C}_1\text{-C}_6$), alcanoíla (p. ex., alcanoíla $\text{C}_1\text{-C}_8$), alcanona (p. ex., alcanona $\text{C}_1\text{-C}_8$), alcanoiloxi (p. ex., alcanoiloxi $\text{C}_1\text{-C}_8$), alcóxicarbonila (p. ex., alcóxicarbonila $\text{C}_1\text{-C}_8$), mono- e di-(alquil $\text{C}_1\text{-C}_8$)amino, mono- e di-(alquil $\text{C}_1\text{-C}_8$)amino-alquila $\text{C}_1\text{-C}_8$, mono- e di-(alquil $\text{C}_1\text{-C}_8$)carboxamido, mono- e di-(alquil $\text{C}_1\text{-C}_8$)sulfonamido, alquilsulfinila (p. ex., alquilsulfinila $\text{C}_1\text{-C}_8$), alquilsulfonila (p. ex., alquilsulfonila $\text{C}_1\text{-C}_8$), arila (p. ex., fenila), arilalquila (p. ex., (aril $\text{C}_6\text{-C}_{18}$)alquila $\text{C}_1\text{-C}_8$, como benzila e fenetila), ariloxi (p. ex., ariloxi $\text{C}_6\text{-C}_{18}$ como fenóxi), arilalcoxi (p. ex., (aril $\text{C}_6\text{-C}_{18}$)-alcóxi $\text{C}_1\text{-C}_8$) e/ou grupos heterocíclicos de 3 a 8 membros tendo um ou mais membros N, O ou S no anel.

[00165] Como aqui referido, um grupo tendo um número especificado de “membros” refere-se a um número especificado de átomos do grupo.

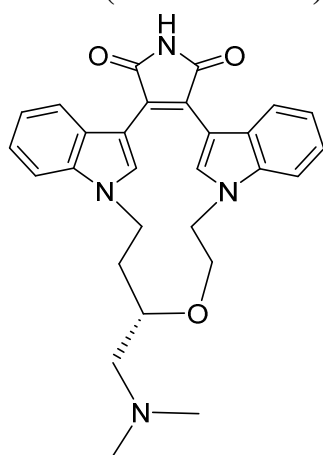
[00166] Os inibidores exemplares de PKC podem incluir:



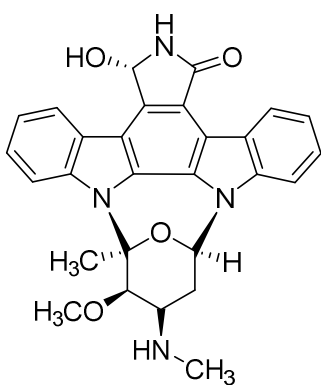
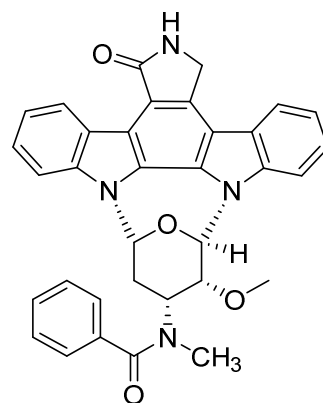
(Enzastaurina),



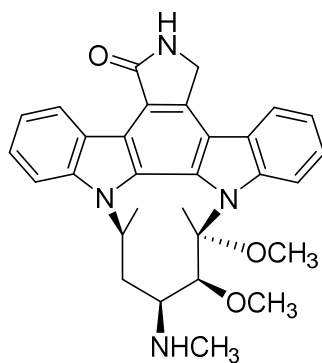
(Sotrastaurina),



(Ruboxistaurina),



ou



[00167] Em certas modalidades, um inibidor de proteína quinase ou um anticorpo monoclonal que inibe receptores envolvidos nas vias de sinalização de proteínas quinases ou fatores de crescimentos como um inibidor de EGFR,

VEGFR, AKT, Erb1, Erb2, ErbB, Syk, Bcr-Abl, JAK, Src, GSK-3, PI3K, Ras, Raf, MAPK, MAPKK, mTOR, c-Kit, receptor eph ou BRAF é administrado a um indivíduo. Exemplos não limitantes de inibidores das vias de sinalização de proteínas quinase ou fatores de crescimento incluem Afatinibe, Axitinibe, Bevacizumabe, Bosutinibe, Cetuximabe, Crizotinibe, Dasatinibe, Erlotinibe, Fostamatinibe, Gefitinibe, Imatinibe, Lapatinibe, Lenvatinibe, Mubritinibe, Nilotinibe, Panitumumabe, Pazopanibe, Pegaptanibe, Ranibizumabe, Ruxolitinibe, Saracatinibe, Sorafenibe, Sunitinibe, Trastuzumabe, Vandetanibe, AP23451, Vemurafenibe, MK-2206, GSK690693, A-443654, VQD-002, Miltefosine, Perifosine, CAL101, PX-866, LY294002, rapamicina, tensirolimo, everolimo, ridaforolimo, Alvocidibe, Genisteína, Selumetinibe, AZD-6244, Vatalanibe, P1446A-05, AG-024322, ZD1839, P276-00, GW572016 ou uma mistura dos mesmos.

[00168] Em certas modalidades, o agente que diminui a atividade ou expressão de PKC pode ser administrado em uma concentração entre aproximadamente 0,001 mg/kg e 250 mg/kg de peso corporal, p. ex., 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 ou 250 mg/kg de peso corporal.

[00169] Em certas modalidades, PKC compreende a seguinte sequência de aminoácidos (Nº de acesso NCBI: NP_002728.1 (SEQ ID NO: 7), aqui incorporado, em sua totalidade, por referência):

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 SVEIWDWDRT TRNDFMGSL S FGVSELMKMP
ASGWYKLLNQ EGEYYNVPI PEGDEEGNME

301 LRQKFEKAKL GPAGNKVISP SEDRKQPSNN
LDRVKLTDNF FLMVLGKGSF GKVMLADRKG

361 TEELYAIKIL KKDVVIQDDD VECTMVEKRV
LALLDKPPFL TQLHSCFQTV DRLYFVMEYV

421 NGGDLMYHIQ QVGKFKEPQA VFYAAEISIG
LFFLHKRGII YRDLKLDNVM LDSEGHKIA

481 DFGMCKEHMM DGVTTTRTFCG TPDYIAPEII
AYQPYGKSVD WWAYGVLLYE MLAGQPPFDG

541 EDEDELFSI MEHNVSYPKS LSKEAVSICK
GLMTKHPAKR LGCGPEGERD VREHAFFRI

601 DWEKLENREI QPPFKPKVCG KGAENFDKFF
TRGQPVLTTP DQLVIANIDQ SDFEGFSYVN

661 PQFVHPILQS AV

[00170] Em certas modalidades, a PKC compreende a seguinte
sequência nucleotídica, a sequência de codificação está em negrito e
sublinhada (Nº de acesso NCBI: NM_002737.2 (SEQ ID NO: 8), aqui
incorporado, em sua totalidade, por referência):

1 ggccgcagct ccccgccgga ggcaagaggt ggttgggggg gacc**atg**gct
gacgtttcc

61 cgggcaacga ctccacggcg tctcaggacg tggccaaccg ctccgcccgc
aaaggggcgc

121 tgaggcagaa gaacgtgcac gaggtgaagg accacaaatt catcgcgcg
ttcttcaagc

181 agccacctt ctgcagccac tgcaccgact tcattctgggg gtttgggaaa
caaggcttcc

241 agtgccaagt ttgctgttt gtggtccaca agaggtgcc tgaattgtt

actttttctt

301 gtccgggtgc ggataaggga cccgacactg atgaccccag gagcaagcac

aagttcaaaa

361 tccacactta cggaagcccc accttctgcg atcactgtgg gtcactgctc

tatggactta

421 tccatcaagg gatgaaatgt gacacctgcg atatgaacgt tcacaagcaa

tgcgtcatca

481 atgtccccag cctctgcgga atggatcaca ctgagaagag ggggctgatt

tacctaaagg

541 ctgagggtgc tgatgaaaag ctccatgtca cagtacgaga tgcaaaaaat

ctaataccta

601 tggatccaaa cgggctttca gatccttatg tgaagctgaa acttattcct

gateccaaga

661 atgaaagcaa gcaaaaaacc aaaaccatcc gctccacact aaatccgcag

tggaatgagt

721 cctttacatt caaattgaaa ccttcagaca aagaccgacg actgtctgta

gaaatctggg

781 actgggatcg aacaacaagg aatgacttca tgggacccct ttctttgga

gtttcggagc

841 tgatgaagat gccggccagt ggatggtaca agttgcttaa ccaagaagaa

ggtgagtact

901 acaacgtacc cattccggaa ggggacgagg aaggaaacat ggaactcagg

cagaaattcg

961 agaaagccaa acttggccct gctggcaaca aagtcacag tcctctgaa

gacaggaaac

1021 aaccttccaa caaccttgac cgagtgaac tcacggactt caatttcctc

atggtgttgg

1081 gaaaggggag ttttggaag gtgatgcttg ccgacaggaa gggcacagaa

gaactgtatg

1141 caatcaaaat cctgaagaag gatgtggtga ttcaggatga tgacgtggag
tgcacatgg
1201 tagaaaagcg agtcttgGCC ctgcttgaca aacccccgtt ctgacgcag
ctgcactcct
1261 gcttcagac agtggatcgg ctgtactcg tcatggaata tgtcaacggt
ggggacctca
1321 tgtaccacat tcagcaagta ggaaaattta aggaaccaca agcagtattc
tatgcggcag
1381 agatttccat cggattgttc tttctcata aaagaggaat catttatagg
gatctgaagt
1441 tagataacgt catgttggat tcagaaggac atatcaaat tgctgacttt
gggatgtgca
1501 aggaacacat gatggatgga gtcacgacca ggacctctg tgggactcca
gattatateg
1561 cccagagat aatcgcttat cagccgtatg gaaaatctgt ggactggtgg
gcctatggcg
1621 tctgttgta tgaaatgctt gccgggcagc ctccattga tggatgaagat
gaagacgagc
1681 tatttcagtc tatcatggag cacaacgttt cctatccaaa atcctgtcc
aaggaggctg
1741 ttctatctg caaaggactg atgaccaaac accagccaa gcggtgggc
tgtgggcctg
1801 agggggagag ggacgtgaga gagcatgcct tctccggag
gatcactgg gaaaaactgg
1861 agaacaggga gatccagcca ccattcaagc ccaaagtgtg tggcaaagga
gcagagaact
1921 ttgacaagtt cttcacacga ggacagcccg tettaacacc acctgatcag
ctggttattg
1981 ctaacataga ccagtctgat ttgaagggt tctcgtatgt caacccccag

tttgtgcacc

2041 ccatcttaca gagtgcagta **tga**aactcac cagcgagaac aaacacctcc

ccagccccca

2101 gccctccccg cagtgggaag tgaatcctta accctaaaat ttaaggcca

cggccttggtg

2161 tctgattcca tatggaggcc tgaaaattgt aggggttatta gtccaaatgt

gatcaactgt

2221 tcagggtctc tctcttacia ccaagaacat tatcttagtg gaagatggta

cgtcatgctc

2281 agtgtccagt ttaattctgt agaagttacg tctggctcta ggtaaccct

tcctagaaag

2341 caagcagact gttgccccat ttgggtaca attgatata cttccatac

cctccatctg

2401 tggatttttc agcattggaa tcccccaacc agagatgtta aagtgagcct

gtcccaggaa

2461 acatctccac ccaagacgtc ttggaatcc aagaacagga agccaagaga

gtgagcaggg

2521 agggattggg ggtgggggag gcctcaaat accgactgcg tccattctct

gcctccatgg

2581 aaacagcccc tagaatctga aaggccggga taaacctaat cactgttccc

aaacattgac

2641 aaatcctaac ccaaccatgg tccagcagtt accagttaa acaaaaaaac

ctcagatgag

2701 tgttgggtga atctgtcatc tggtaccctc cttggttgat aactgtcttg

atacttttca

2761 ttctttgtaa gaggccaaat cgtctaagga cgttgctgaa caagcgtgtg

aaatcatttc

2821 agatcaagga taagccagtg tgtacatatg ttcattttaa tctctgggag

attatttttc

2881 catccagggt gccatcagta atcatgccac tactcaccag tgtgttcgc
caacacccac

2941 cccacacac accaacattt tgctgcctac cttgttatcc ttctcaagaa
gctgaagtgt

3001 acgccctctc ccctttgtg cttatttatt taataggctg cagtgtcgct
tatgaaagta

3061 cgatgtacag taacttaatg gaagtgtga ctctagcacc agcctctacc
gattgatttt

3121 cctcccttct ctagccctgg atgtccactt agggataaaa agaatatggt
tttggtccc

3181 atttctagtt cacgttgaat gacaggcctg gagctgtaga atcaggaaac
ccgcatgcct

3241 aacagctcaa agatgttttg ttaatagaag gattttaata cgttttcaa
atgcatcatg

3301 caatgaattt tgcatgttta taataaacct taataacaag tgaatctata
ttattgatat

3361 aatcgatatca agtataaaga gagtattata ataattttat aagacacaat
tgtgctctat

3421 ttgtgcaggt tctgtttct aatcctcttt tctaattaag ttttagctga
atcccttgc

3481 tctgtgcttt ccctccctgc acatgggcac tgtatcagat agattacttt
ttaaatgtag

3541 ataaaatttc aaaaatgaat ggctagttta cgtgatagat taggctctta
ctacatatgt

3601 gtgtgtatat atatgtattt gattctacct gcaaacaaat tttattggt
gaggactatt

3661 ttgagctga cactccctct tagtttcttc atgtcacctt tcgtcctggt
tcctcggcca

3721 ctcttctct tggggacaac aggaagtgtc tgattccagt ctgcctagta

cgttggtaca

3781 cacgtggcat tgccgcagca cctgggctga cctttgtgtg tgcgtgtgtg

tgtgtttcct

3841 tcttcccttc agcctgtgac tgttgctgac tccaggggtg ggagggatgg

ggagactccc

3901 ctcttgctgt gtgtactgga cacgcaggaa gcatgctgtc ttgctgcctc

tgcaacgacc

3961 tgtcgtttgc tccagcatgc acaaacttcg tgagaccaac acagccgtgc

cctgcaggca

4021 ccagcacgtg cttttcagag gctgcggact ttctccagc cattgtggca

ttggccttc

4081 cagtcttggg aggagcgcgc tgctttggtg agacaccccc atgcaaggtc

ctcagagtag

4141 ccgggttcta ccacaaacag aaacagaatg aaagtagctg tcagtccttg

tagagagccg

4201 ctctgtttcc tcccagaagc atctcccagc taagctcgca ttattttct

cctctggctg

4261 tttgcctgaa gttcacagaa cacacaacca tgaaaggctt tttgaggtga

gaggcccagg

4321 tggctctggc aaccctgagt agaaggagag acggggtagg

gaacggggccc ggccagaaaa

4381 gaaccatttc ttctgccatc tttatgcac catagacatc gagactccag

ggggtcctgg

4441 ctcccctgtc cctgcagccc tgcaggtcag tgcattgatc gggttcgtgt

cctgaccagg

4501 tgctcctect ttgatccgag gggaaaggga ctggtttata gaaagagcct

aggagacaaa

4561 agggccagtc cccctgcccga gaatggagca gcagcaggac

agacccccac gagggccccc

4621 agagaggagg aagatccac ggaggaacac atgaggtag ggaccctgt
tcagaccccc

4681 aaacagcctg cctgtttaa gcaggcagca ggcttaggcc ttccctgcaa
ccccaacacc

4741 cacaagttg ttctctagg aaacacattc actgtctcag ctggctgtta
ctctctcaga

4801 ccatatggca aagttttcca agaaaatgcc ccgacagggg tgcccagcac
actgcctgag

4861 ggacaacaga catcagaaca aacccccaga gagaacagt
caaaatcagg gcccggtgca

4921 gtgtgtcat gtggaacctg cttatccat tgctgagtgt tgaatgtggg
taatggttag

4981 ggctttccag atctcagcag ccaaagacag ttattgttg aagactgtca
ttagataac

5041 catgagcaat ggctgcctc agaatcagtt cataaaattc tatggtactg
gccccttctg

5101 gggatttg tgaaatgaga tggggcgag ggggtgcgctg tggaactgcc
gcagccacgc

5161 aggaggtccc tgggggatgc ttgggaagt ccttgcccct gagcactgcc
tgattgccag

5221 ggctgtgga ggtctaggcc gcctggcaga atctagcacc gtccgaatcc
ccgcaggacc

5281 catggagcta tgaccacacc aggccattca aatggctctg cattatcttc
ccttggaagg

5341 tggccactcc tcggtggcag ggctttccc tgaggctgca ggccgtgggc
tggcagcccg

5401 tctcttgga ttcaattga aggtcaccag gtgctgggtt tgaaaggaag
tcactggagt

5461 gctgccaggg gccgccctcc aaggtaatg agaggccac atccaggcaa

gaactaattc

5521 aaaaggcaga tcagaaacca caggagtcaa aattattgct ccggcagtgc

ttcccttct

5581 ttcattccact ggcctcgtgt ggtccatgca gggccactgt ctgcccttc

tgatgccacg

5641 tattaggctt tcttactcag aattttgata gaaaaccatg gggccaagag

ctctggaagc

5701 ctggccggaa agaccaaggt tcatgcagcc caacaaatga ttgttgagca

cctctcggag

5761 ccaaagtctt taggcgagtg tggtagcttc ctggaaggag gatgcagact

tccagagagc

5821 ccccccaacg gacgtgctga gaaggagag ggaggcgggg

gctgtagtca ggaaggagcc

5881 agagaagaac agggtttggg tgcattccaga aatatgcctg cagtaggagg

gagaggaagg

5941 ggtgccaccg tcaacggctt cccatcggag gtggttggtg cagatggaag

tttctgtctg

6001 ctggccctca agagagtgtt ttgccaggga cacagtctgt tctctctcag

aaaacacccc

6061 ccaaatgcta acaacatccc caccagctgc tagaagcccc ttccccctcc

ccaccttgaa

6121 gtagctcata gttctctggg cagagccaga ccatccagtg taccccagag

gccagtaggt

6181 tctgcccatt ttctctctct ggcttctctgc caagaattat ggcagctgag

gatgaatgga

6241 gaagtaaaaa caactaacac cgcacaacta acaactaaca ccgcagtcc

cacctgggtt

6301 ccacttagca ggagacattt cggagggttt tttttgttt ttgtctgtt

ttttttttt

6361 ttgctggaat ttgtttctc agtactgaaa agagaaaaag tgacaatctt
gtatttttaa

6421 aagcctcgga aaggtgatac catctgacag tcattttctc acgttggtct
tctaaagtca

6481 cctatttctt gtgtgtgcac atcacacat ttctgtttc ttataaccc
gacaagggtga

6541 ggagtgccctg tttcccctgc tgggcacacc agacaatcgt aatcacaaaa
cagacactga

6601 gccaggggcc caaagggtgt gatcatgaga gttaccggga
cagcagtagg catgacagtc

6661 accaggaagg acaagggtgc tctgttgta gtggccacac accaattga
caaggagtgt

6721 tgcgaaattt ttatttattt atttattat ttgagatgg agtttctc
ttgttgccca

6781 ggctggagtg cgggtgtaca atctcggctc actgcaacct ccacctcca
ggttcaagcg

6841 atttcctgc ctcagcctcc caagtacctg ggactacagg tgcgtgccac
cacaccagc

6901 taaattttgt gtttttagta gagatggggt ttaccatgt tggccaggat
ggtcttgaac

6961 ccctgacctc atgatctgcc tgcctcggcc tcccaaagt ctgggattac
aggcatgagc

7021 caccacgccc agccaaaata ttttttaa gtcatttcc ttaagctgct
tgggctacat

7081 gtgaaatata ctggacggtc aacattcctg tctctccca tttgggtga
tgcagcagat

7141 ccagggaatg ttacctgtt ctgctgctag aagatccagg aaattgggaa
ggttacctga

7201 cgcacacatg gatgaaggcc atcatctaga aatgggggtca accacaattg

tgtaattcc

7261 gtagtgtcag ggattcttcg ggaaggtcaa cagtatgaag gattctgacc

cctgtgcctc

7321 ccatttatgt gatcaggtga cagttaataa ccgtggaggt cacactcage

catccaacag

7381 ccttacagt accctacaca aaagccccca aattccaaag acttttctt

aacctaagg

7441 aagaaattat ttgtaattc cagtagagca actgaatata ctgggctatt

tgtactttt

7501 tatagagaac ttaataata attctttaa aatgagttt tagaacaag

caactgacga

7561 ttcctaaga ttccaatgcc ctggagcttg taggaggact tagcctgggt

cagctggagc

7621 acccccgacc tgatctcca ctgccagatt ttccatgct cctagggtat

ggagtccacg

7681 tgggaatgac tgcaagtca ggtggaact ggccgactga tgctctgca

gttttaata

7741 gacactgggg acaactgctt aaggtttaga aactccaaa ccacaggaaa

gacatttta

7801 gtgtcccca tccagaggca gccctggaat aggattcca ggggtttctg

ggacccttt

7861 ccttgctccg tgaggctctg tggccatctt ttggcaggag gaggatgctt

ccttggtct

7921 gtgcccagac ccgctggtc cccaggtctc tcacctggg tgaagattca

gagatgcct

7981 gtaaggattt tgcccactgg gcaactcaga aatactcga tctcccaaga

tataagaggc

8041 agcagcaaac gtgcctattg acgtctgtt catagttacc acttacgcga

gtagacagaa

8101 ctcggctttt cagaaaatag gtgtcaagtc cactttataa gaacctttt
 ttctaaaata
 8161 agataaaagg tggctttgca tttctgatt aaacgactgt gtctttgtca
 cctctgctta
 8221 actttaggag tatccattcc tgtgattgta gacttttgtt gatattcttc
 ctggaagaat
 8281 atcattcttt tcttgaaggg ttggtttact agaattattca aaatcaatca
 tgaaggcagt
 8341 tactattttg agtctaaagg ttttctaaaa attaacctca catcccttct
 gttagggtct
 8401 ttcagaatat cttttataaa cagaagcatt tgaagtcatt gcttttgcta
 catgatttgt
 8461 gtgtgtgaag gacataccac gtttaaatca ttaattgaaa aacatcatat
 aagccccaac
 8521 tttgtttgga ggaagagacg gaggttgagg ttttccttc tgtataagca
 cctactgaca
 8581 aaatgtagag gccattcaac cgtcaaacac catttggtta tatcgagag
 gagacggatg
 8641 tgtaaattac tgcattgctt ttttttcag ttgtataac ctctaatec
 cgtttgcag
 8701 atacgctttg ttagaaacat taattgtagt ttggaagcaa gtgtgtatga
 ataaagataa
 8761 tgatcattcc aaaaaaaaaa aaaaaaa

Agentes que diminuem a expressão ou atividade de fosfolipase C (PLC) ou Inositol Trifosfato (IP3)

[00171] Em alguns exemplos, certos agentes que atuam como vasodilatores são usados para bloquear a atividade ou expressão de PLC ou IP3. Em modalidades, os inibidores de PLC compreendem U-73122, U73343 e ET-18-OCH₃. Em modalidades, os inibidores de IP3 compreendem 2-APB e

Xestospongina C. Em modalidades, o agente compreende hidralazina. Contempla-se que os inibidores podem ser usados isoladamente ou em qualquer combinação. Em modalidades, os inibidores de PLC ou IP3 ou seus sais farmacologicamente aceitáveis, são também contemplados

[00172] Em certas modalidades, o agente que diminui a atividade ou expressão de PLC ou IP3 pode ser administrado em uma concentração entre aproximadamente 0,001 mg/kg e 250 mg/kg de peso corporal, p. ex., 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 ou 250 mg/kg de peso corporal. Em outras modalidades, contempla-se que o agente pode ser administrado em uma concentração maior, p. ex., até 1000mg/kg de peso corporal.

[00173] Em algumas modalidades, contempla-se a terapia combinada com um antagonista de androgênios (p. ex., antiandrogênicos). Os antiandrogênicos são uma classe de fármacos que impedem que androgênios como testosterona e di-hidrotestosterona (DHT) de mediar seus efeitos biológicos no corpo. Eles atuam bloqueando o receptor de androgênios (AR) e/ou inibindo ou suprimindo a produção de androgênios. Os antiandrogênicos exemplares incluem:

Antagonistas do receptor de androgênios: Fármacos que se ligam diretamente e bloqueiam o AR. Esses fármacos incluem os antiandrogênicos esteroides acetato de ciproterona, acetato de megestrol, acetato de clormadinona, espironolactona, oxendolona e acetato de osaterona (veterinário) e os antiandrogênicos não esteroides flutamida, bicalutamida, nilutamida, topilutamida, enzalutamida e apalutamida. Afora o acetato de ciproterona e acetato de clormadinona, poucas outras progestinas usadas em contraceptivos orais e/ou na TRH na menopausa incluindo dienogeste, drospirenona, medrogestona, acetato de nomegestrol, promegestona e trimegestona também apresentam graus variáveis de atividade antagonista de

AR;

Inibidores da síntese de androgênios: Fármacos que inibem diretamente a biossíntese enzimática de androgênios como testosterona e/ou DHT. Os exemplos incluem os inibidores de CYP17A1 cetoconazol, acetato de abiraterona e seviteronel, o inibidor de CYP11A1 (P450_{scc}) aminoglutetimida, e os inibidores de 5 α -redutase finasterida, dutasterida, epristerida, alfatradiol e extrato de palmeira-serra (*Saw Palmetto* ou *Serenoa repens*). Vários outros antiandrogênicos, incluindo acetato de ciproterona, espironolactona, medrogestona, flutamida, nilutamida e bifluranol, são também conhecidos por inibir fracamente a síntese de androgênios.

[00174] **Antigonadotrofinas:** Fármacos que suprimem a liberação de gonadotrofinas induzida pelo hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e ativação consequente da produção de androgênios pelas gônadas. Os exemplos incluem moduladores de GnRH como leuprorelina (um agonista de GnRH) e cetorelix (um antagonista de GnRH), progestogênios como alilestrenol, acetato de clormadinona, acetato de ciproterona, caproato de gestonorona, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, acetato de osaterona (veterinário) e oxendolona, e estrogênios como estradiol, ésteres do estradiol, etinilestradiol, estrogênios conjugados e dietilestilbestrol.

[00175] **Exemplos adicionais:** Fármacos que se contrapõem aos efeitos de androgênios por outros meios diferentes dos acima. Os exemplos incluem estrogênios, especialmente orais e sintéticos (p. ex., etinilestradiol, dietilestilbestrol), que estimulam a produção da globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) no fígado e, desse modo, diminuem níveis livres e, conseqüentemente, bioativos de testosterona e DHT; anticorticotrofinas como glicocorticoides, que suprimem a produção induzida pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) de androgênios adrenais; e imunógenos e vacinas contra androstenediona como albumina ovandrotona e albumina

androstenediona, que diminuem os níveis de androgênios via a geração de anticorpos contra o androgênio e o precursor androgênico androstenediona (usado somente na medicina veterinária).

Transtornos do tecido conjuntivo

[00176] Doença do tecido conjuntivo refere-se a um grupo de transtornos envolvendo o tecido rico em proteínas que sustenta órgãos e outras partes do corpo. Exemplos de tecido conjuntivo são gordura, osso e cartilagem. Esses transtornos frequentemente envolvem as articulações, músculos e a pele, mas podem também envolver outros órgãos e sistemas de órgãos, incluindo os olhos, coração, pulmões, rins, trato gastrointestinal e vasos sanguíneos. Existem mais de 200 transtornos que afetam o tecido conjuntivo. As causas e sintomas específicos variam pelos diferentes tipos.

[00177] Os exemplos de doenças de tecido (p. ex., tecido epitelial, conjuntivo, muscular e nervoso) potencialmente tratáveis com as composições e métodos incluem, entre outras, as seguintes: autoimunes, degenerativas, inflamatórias, infecciosas, cancerosas, virais, fúngicas, derivadas de lesão ou trauma. Essas doenças de tecido e/ou órgão podem ser a doença primária ou podem ser causadas por uma doença e/ou enfermidade existente. Os exemplos incluem amiloidose, fibrilação atrial, convulsão, câibra, dermatomiosite, encondroma, fibroma, lumbago, transtorno hereditário do tecido conjuntivo (p. ex., síndrome de Marfan, doença de Peyronie, síndrome de Ehlers-Danlos, osteogênese imperfeita, síndrome de Stickler, síndrome de Alport, aracnodactilia contratural congênita), transtorno autoimune do tecido conjuntivo (p. ex., lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatoide, esclerodermia, síndrome de Sjogren, doença mista do tecido conjuntivo, artrite psoriática), escorbuto, doença muscular (p. ex., tumor muscular, distrofia muscular, atrofia por desuso, atrofia por desnervação, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular facioscapulohumeral), doença hepática da miastenia grave, miopatia, miosite, miosite ossificante, câncer,

fibromialgia, fadiga muscular, espasmo, espasticidade, distensão, tensão, lesão cerebral, lesão da medula espinhal, gliomas, neuroepiteliomatoso, hipertensão, doença cardiovascular, diabetes, doença de Alzheimer, cistite, AIDS, raquitismo e tumores da bainha neural. Os exemplos de tecidos, órgãos e/ou sistemas do corpo afetados por doença e que podem ser tratados com as composições e métodos aqui descritos incluem, entre outros, as seguintes: sistema imune, órgãos sensoriais (p. ex., órgãos do paladar, olfato, visão, audição), sistema digestivo (p. ex., boca, garganta, faringe, esôfago, abdômen, estômago, intestino delgado, intestino grosso, fígado, pâncreas), aparelho urogenital, sistema endocrinológico, metabolismo, sistema cardiovascular (p. ex., coração, pressão arterial, artérias), hematologia (p. ex., bioquímica sanguínea), órgãos urinários (p. ex., rins, ureteres, bexiga, uretra masculina, uretra feminina, órgãos genitais masculinos (p. ex., testículos e sua cobertura, ducto eferente, vesículas seminais, ducto ejaculador, pênis, próstata, glândulas bulbouretrais), órgãos genitais femininos (p. ex., ovários, trompa uterina, útero, vagina, clitóris, glândulas de Bartholin, órgãos externos, mamas)), glândulas sem ductos (p. ex., tiroide, paratireoide, timo, hipófise cerebral, corpo pineal, sistemas de cromófilas e corticol, baço), reprodução, respiratório (p. ex., laringe, traqueia, brônquios, pleura, mediastino, pulmões), sistema nervoso central (p. ex., nervos, fibras nervosas), pele, epitelial (p. ex., simples, estratificado, colunar pseudoestratificado, glandular), conjuntivo (p. ex., conjuntivo frouxo (p. ex., areolar, adiposo, reticular) e conjuntivo denso (p. ex., regular denso, irregular denso)), cartilagem (p. ex., hialina, elástico, fibroso), muscular (p. ex., musculoesquelético (p. ex., tipo I, II, IIa, IIx, IIb), músculo cardíaco, músculo liso), nervoso (p. ex., neurônio (p. ex., neurônios motores, interneurônio, neurônio sensorial), neuroglia, medula espinhal, nervos, cérebro).

[00178] Em modalidades, o transtorno do tecido conjuntivo compreende uma vasculopatia (p. ex., síndrome de Ehlers-Danlos vascular),

síndrome de Marfan, síndrome de Loeys-Dietz ou aneurisma aórtico torácico familiar.

Síndromes de Ehlers-Danlos (SEDs)

[00179] As síndromes de Ehlers–Danlos (SEDs) são um grupo de transtornos genéticos do tecido conjuntivo. Os sintomas podem incluir frouxidão articular, pele elástica e formação anormal de cicatrizes. Elas podem ser percebidas no nascimento ou no início da infância. As complicações podem incluir dissecção aórtica, deslocamentos articulares, escoliose, dor crônica ou início precoce de osteoartrite.

[00180] SEDs são devido a uma mutação em um de mais de uma dúzia de genes diferentes. O gene específico afetado determina a SED específica. Alguns casos resultam de uma nova mutação ocorrida durante a fase inicial do desenvolvimento, enquanto outros são hereditários de maneira dominante autossômica ou recessiva. Isso resulta em defeitos na estrutura ou no processamento do colágeno. O diagnóstico pode ser confirmado com testes genéticos ou uma biópsia da pele. As pessoas podem ser equivocadamente diagnosticadas com hipocondria, depressão ou síndrome da fadiga crônica.

[00181] Até o momento, nenhuma cura é conhecida, no entanto, fisioterapia e *bracing* (contração/ativação da musculatura) podem ajudar a fortalecer os músculos e sustentar as articulações. Embora alguns transtornos resultem em expectativa de vida normal, aqueles que afetam os vasos sanguíneos geralmente resultam em expectativa de vida mais curta. As SEDs afetam aproximadamente uma em 5.000 pessoas no mundo, e o prognóstico depende do transtorno específico.

Classificação de SED

[00182] A **SED hipermóvel (SEDh tipo 3)** é caracterizada primariamente por hipermobilidade articular que afeta tanto grandes e pequenas articulações, o que pode levar a deslocamentos articulares recorrentes e subluxações (deslocamento parcial). Em geral, as pessoas com

esse tipo têm pele macia, lisa e aveludada que sofre ferimentos com facilidade e dor crônica dos músculos e/ou ossos. A mutação que causa esse tipo de SED é desconhecida. É visto menos envolvimento da pele do que em outros tipos. Não há teste genético disponível para esse tipo.

[00183] A **SED clássica (SEDc tipo 1)** é associada com pele macia extremamente elástica (estirável), que é frágil e se fere com facilidade; cicatrizes amplas, atróficas (cicatrizes planas ou deprimidas); e hipermobilidade articular. Pseudotumores moluscoides (hematomas calcificados sobre pontos de pressão como o cotovelo) e esferoides (cistos contendo gordura nos antebraços e canelas) são também vistos com frequência. Hipotonia e desenvolvimento motor retardado podem ocorrer. A mutação que causa esse tipo de SED está nos genes *COL5A1*, *COL5A2* e *COL1A1*. Envolve mais a pele do que SED.

[00184] A **SED vascular (SEDv tipo 4)** é caracterizada por pele fina, translúcida extremamente frágil e que se fere facilmente. As artérias e certos órgãos, como os intestinos e útero, são também frágeis e propensos à ruptura. As pessoas com esse tipo tipicamente são de baixa estatura e com cabelo fino no couro cabeludo. Tem também um tipo facial característico, incluindo olhos grandes, queixo pequeno, fáceis emagrecidas, nariz e lábios finos e orelhas sem lobos. A hipermobilidade articular está presente, mas geralmente restringe-se às articulações pequenas (dedos das mãos e dos pés). Outras características comuns incluem pé torto, ruptura de tendão e/ou músculo, acrogeria (envelhecimento prematuro da pele das mãos e dos pés), início precoce de veias varicosas, pneumotórax (colapso de um pulmão), recessão gengival e quantidade diminuída de gordura embaixo da pele. Pode ser causada pelas mutações no gene *COL3A1*.

[00185] A **SED cifoescoliose (SEDk tipo 6)** está associada com hipotonia grave no Nascimento, desenvolvimento motor retardado, escoliose progressiva (presente desde o nascimento) e fragilidade da esclerótica. As

peessoas afetadas podem também sofrer ferimentos com facilidade, apresentar artérias frágeis que são propensas à ruptura, córneas excepcionalmente pequenas e osteopenia (baixa densidade óssea). Outras características comuns incluem “hábito marfanoide” que é caracterizado por dedos longos, finos (aracnodactilia), membros incomumente longos e tórax escavado (*pectus excavatum*) ou tórax carinato (*pectus carinatum*). Pode ser causada por mutações no gene *PLOD1*.

[00186] **A SED Artrocalásia (SEDa tipos 7A e B)** é caracterizada por hipermobilidade articular grave e deslocamento congênito do quadril. Outras características comuns incluem pele frágil, elástica com facilidade de ferimentos, hipotonia, cifoescoliose (cifose e escoliose) e osteopenia leve. O colágeno tipo I normalmente é afetado. É muito rara, com cerca de 30 casos relatados. É mais grave do que o tipo hipermobilidade. Causada por mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2*.

[00187] **A SED Dermatosparaxia (SEDD tipo 7C)** está associada com pele extremamente frágil levando a ferimentos graves e formação de cicatrizes; pele flácida, redundante, especialmente na face; e hérnias. É extremamente rara, com cerca de 10 casos relatados.

[00188] **A síndrome da córnea frágil** é caracterizada por córnea fina, início precoce de ceratoglobo ou ceratocone progressivo e esclerótica azul. Os sintomas clássicos, como hipermobilidade articular e pele hiperelástica, são também vistos com frequência.

[00189] **A SED tipo clássica (SEDC tipo 1)** é caracterizada por hiperextensibilidade cutânea com textura aveludada da pele e ausência de cicatrizes atróficas, hipermobilidade articular generalizada com ou sem deslocamentos recorrentes (mais frequentemente no ombro e tornozelo) e pele facilmente ferida ou com equimoses espontâneas (descolorações da pele resultante de sangramento embaixo).

[00190] **A SED espondilodisplásica (SEDsp)** é caracterizada por

baixa estatura (progressiva na infância), hipotonia muscular (variando de congênita grave a início tardio leve) e membros arqueados.

[00191] A **SED musculocontratural (SEDmc)** é caracterizada por múltiplas contraturas congênitas, contraturas caracteristicamente de adução-flexão e/ou *talipes equinovarus* (pé torto), tipo craniofacial característico, que é evidente no nascimento ou no início da infância, e características cutâneas como hiperextensibilidade da pele, ferimentos, fragilidade cutânea com cicatrizes atróficas e pregas palmares aumentadas.

[00192] A **SED miopática (SEDm)** é caracterizada por hipotonia muscular congênita e/ou atrofia muscular que melhora com a idade, contraturas de articulações proximais (articulações do joelho, quadril e cotovelo) e hipermobilidade de articulações distais (articulações dos tornozelos, punhos, pés e mãos).

[00193] A **SED periodontal (SEDp)** é caracterizada por periodontite grave e intratável de início precoce (infância ou adolescência), ausência de gengiva inserida, placas pré-tibiais e história familiar de um parente de primeiro grau que atende aos critérios clínicos.

[00194] A **SED cardíaca-valvular (SEDcv)** é caracterizada por problemas cardíacos-valvulares graves progressivos (válvula aórtica, válvula mitral), problemas cutâneos (hiperextensibilidade, cicatrizes atróficas, pele fina, ferimentos com facilidade) e hipermobilidade articular (generalizada ou restrita a pequenas articulações).

Métodos de tratamento

[00195] A presente invenção provê métodos para o tratamento de vasopatia (p. ex., SEDv) ou transtornos do tecido conjuntivo em um indivíduo com necessidade do mesmo, administrando ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente, em que o agente diminui a atividade ou expressão de quinase regulada por sinal extracelular (ERK) ou proteína quinase C (PKC). O método compreende ainda administrar um agente que

diminui a atividade ou expressão de fosfolipase C (PLC) ou inositol trifosfato (IP3). Em modalidades, o agente compreende um anticorpo ou fragmento do mesmo, um polipeptídeo, uma pequena molécula, uma molécula de ácido nucleico, ou qualquer combinação, na preparação de um medicamento útil para o tratamento de vasopatia (p. ex., SEDv) ou transtornos do tecido conjuntivo.

[00196] A presente invenção também provê métodos que compreendem terapia combinada. Neste relatório descritivo, “terapia combinada” ou “coterapia” inclui a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente (p. ex., um agente que diminui a atividade ou expressão de ERK, PKC e/ou PLC ou IP3), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, com pelo menos um agente ativo adicional, também aqui referido como “ingrediente farmacêutico ativo” (“IFA”), como parte de um esquema de tratamento que visa um efeito benéfico proporcionado pela ação conjunta do agente (p. ex., um agonista, antagonista ou inibidor) e do agente ativo adicional.

[00197] De acordo com as modalidades descritas abaixo, entende-se que “o IFA adicional” se refere a pelo menos um IFA adicional administrado em um esquema de terapia combinada com o agente (p. ex., um agente que diminui a atividade ou expressão de ERK, PKC e/ou PLC ou IP3). Além disso, entende-se que mais de um dos IFAs adicionais descritos abaixo podem ser utilizados no esquema. Os termos “terapia combinada” ou “esquema de terapia combinada” não pretendem abranger a administração de dois ou mais compostos terapêuticos como parte de esquemas separados de monoterapias que resultam de modo incidental e arbitrário em um efeito benéfico que não era pretendido ou previsto.

[00198] De preferência, a administração de uma composição que compreende o agente (p. ex., um agente que diminui a atividade ou expressão de ERK, PKC e/ou PLC ou IP3) em combinação com um ou mais IFAs

adicionais conforme aqui discutido fornece uma resposta sinérgica no indivíduo em tratamento. Nesse contexto, o termo “sinérgico” refere-se ao fato de que a eficácia da combinação é mais eficaz que os efeitos aditivos de qualquer uma das terapias isoladamente.

[00199] A presente invenção também provê métodos que compreendem terapia combinada para o tratamento de vasopatia (p. ex., SEDv) ou transtornos do tecido conjuntivo. Neste relatório descritivo, “terapia combinada” ou “coterapia” inclui a administração e um composto aqui descrito com pelo menos um agente adicional, como aqui revelado, como parte de um esquema de tratamento específico que visa o efeito benéfico proporcionado pela ação conjunta desses compostos terapêuticos. Pelo menos um agente adicional pode ser um agente terapêutico ou um agente não terapêutico. O efeito benéfico da combinação inclui, entre outros, a ação conjunta farmacocinética ou farmacodinâmica resultante da combinação de compostos terapêuticos. O efeito benéfico da combinação pode também estar relacionado à mitigação de uma toxicidade, efeito colateral ou evento adverso associado com outro agente na combinação. “Terapia combinada” pode, mas geralmente não pretende abranger a administração de dois ou mais desses compostos terapêuticos como parte de esquemas de monoterapias separadas que de resultam modo incidental ou arbitrário nas combinações da presente invenção.

[00200] Consequentemente, em certas modalidades, é administrado a um indivíduo com necessidade do mesmo um ou mais agentes que inibem a expressão ou atividade de proteína quinase ativada por mitógeno /quinase regulada por sinal extracelular (MEK), quinase regulada por sinal extracelular (ERK), fosfolipase C (PLC), inositol trifosfato (IP3) ou proteína quinase C (pKC), inibindo, assim, a atividade de ERK, PLC, IP3 ou PKC.

[00201] Em certas modalidades, é administrado a um indivíduo com necessidade do mesmo um ou mais agentes que inibem a atividade ou

expressão de uma ou mais moléculas associadas com a via de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), p. ex., as proteínas quinases RAS-RAF/MEK/quinase regulada por sinal extracelular (ERK).

[00202] No contexto de terapia combinada, a administração de um antagonista pode ser simultânea ou sequencial à administração de um ou mais agentes adicionais. Em outro aspecto, a administração dos diferentes componentes de uma terapia combinada pode ser em frequências diferentes. Um ou mais agentes adicionais podem ser administrados antes de (p. ex., 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hour, 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 ou 12 semanas antes), concomitantemente com ou subsequentemente a (p. ex., 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hour, 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 ou 12 semanas depois) a administração de um composto da presente invenção.

[00203] Um ou mais agentes adicionais podem ser formulados para coadministração com um agente da presente invenção em uma forma farmacêutica única, como descrito mais detalhadamente abaixo. Um ou mais agentes adicionais podem ser administrados separadamente da forma farmacêutica que compreende o composto da presente invenção. Quando o agente adicional é administrado separadamente de um composto da presente invenção, pode ser pela mesma ou por uma via de administração diferente que a empregada para o composto da presente invenção.

[00204] De preferência, a administração de uma composição que compreende um agente da presente invenção em combinação com um ou mais agentes adicionais fornece uma resposta sinérgica no indivíduo portador de um transtorno, doença ou condição da presente invenção. Nesse contexto, o termo “sinérgico” refere-se ao fato de que a eficácia da combinação é mais

eficaz do que os efeitos aditivos de qualquer uma das terapias isoladamente. O efeito sinérgico da terapia combinada de acordo com a invenção pode permitir o uso de doses menores e/ou administração menos frequente de pelo menos um agente na combinação, em comparação à sua dose e/ou frequência fora da combinação. O efeito sinérgico pode ser manifestado pelo evitamento ou redução de efeitos colaterais indesejados, associados com o uso de qualquer uma das terapias na combinação isoladamente.

[00205] “Terapia combinada” também abrange a administração dos compostos da presente invenção em outra combinação com terapias não medicamentosas (p. ex., tratamento cirúrgico ou com radiação). Quando a terapia combinada compreende ainda um tratamento não medicamentoso, o tratamento não medicamentoso pode ser conduzido em qualquer momento adequado desde que seja alcançado um efeito benéfico pela ação conjunta da combinação dos compostos terapêuticos e o tratamento não medicamentoso. Por exemplo, em casos apropriados, o efeito benéfico é ainda alcançado quando o tratamento não medicamentoso é suspenso temporalmente da administração dos compostos terapêuticos, talvez por dias ou mesmo semanas.

[00206] Em modalidades dos métodos aqui descritos, os agentes (p. ex., um agente que diminui a atividade ou expressão de ERK, PKC e/ou PLC ou IP3) podem ser administrados isoladamente ou em combinação com pelo menos um agente adicional em um método para o tratamento de vasopatia (p. ex., SEDv) ou transtornos do tecido conjuntivo. Em modalidades, o agente e pelo menos um agente adicional são administrados em uma única forma farmacêutica. Em outro aspecto, o agente e pelo menos um agente adicional são administrados em formas farmacêuticas separadas. Em modalidades, pelo menos um agente adicional é um agente terapêutico. Em modalidades, o agente terapêutico é indicado para o tratamento de vasopatia (p. ex., SEDv) ou transtornos do tecido conjuntivo. Em outro aspecto, o agente é

administrado em combinação com pelo menos um agente adicional que não é para o tratamento de vasopatia (p. ex., SEDv) ou transtornos do tecido conjuntivo, p. ex., um segundo agente que tem como função atenuar uma toxicidade ou evento adverso associado com outro agente ativo administrado na terapia combinada.

[00207] Em modalidades, pelo menos um agente adicional é voltado para terapia direcionada, em que o tratamento visa uma vasopatia (p. ex., SEDv) ou transtornos do tecido conjuntivo, proteínas ou o ambiente tecidual que contribui para progressão da vasopatia (p. ex., SEDv) ou transtorno do tecido conjuntivo.

[00208] Em algumas modalidades, contempla-se uma terapia combinada com um antagonista de androgênios (p. ex., antiandrogênico). Os antiandrogênicos são uma classe de fármacos que impedem androgênios como testosterona e di-hidrotestosterona (DHT) de mediar seus efeitos biológicos no corpo. Eles atuam bloqueando o receptor de androgênios (AR) e/ou inibindo ou suprimindo a produção de androgênios.

[00209] Em modalidades, as combinações exemplares compreendem antagonistas de androgênios mais inibidores de PLC, IP3, PKC ou ERK.

[00210] O termo “quantidade terapeuticamente eficaz” refere-se a uma quantidade suficiente para tratar, melhorar um sintoma, reduzir a gravidade ou reduzir a duração da doença, transtorno ou condição, ou para reforçar ou melhorar o efeito terapêutico de outra terapia, para prevenir uma doença, transtorno ou condição identificada, ou para exibir um efeito terapêutico ou inibidor detectável. O efeito pode ser detectado por qualquer método de ensaio conhecido na técnica. A quantidade eficaz precisa para um indivíduo dependerá do peso corporal, tamanho e saúde do indivíduo; da natureza e extensão da condição; e do agente terapêutico ou combinação de agentes terapêuticos selecionados para administração.

[00211] Uma quantidade eficaz do agente pode ser administrada uma

vez diariamente, de duas a cinco vezes diariamente, até duas vezes ou até três vezes diariamente ou até oito vezes diariamente. Em modalidades, o agente é administrado três vezes ao dia, duas vezes ao dia, uma vez ao dia, durante quatorze dias (quatro vezes diariamente, três vezes diariamente ou duas vezes diariamente ou uma vez diariamente) e 7 dias sem tratamento em um ciclo de 3 semanas, durante até cinco ou sete dias (quatro vezes diariamente, três vezes diariamente ou duas vezes diariamente ou uma vez diariamente) e 14-16 dias sem tratamento em um ciclo de 3 semanas, ou uma vez a cada dois dias, ou uma vez por semana ou uma vez a cada 2 semanas ou uma vez a cada 3 semanas.

[00212] Uma quantidade eficaz de um agente (p. ex., um agente que diminui a atividade ou expressão de ERK, PKC e/ou PLC ou IP3) pode variar entre aproximadamente 0,001 mg/kg e 1000 mg/kg, entre aproximadamente 0,01 mg/kg e 100 mg/kg, entre aproximadamente 0,1 mg/kg e 10 mg/kg; ou qualquer faixa na qual o limite menor da faixa seja qualquer quantidade entre 0,001 mg/kg e 900 mg/kg e o limite superior da faixa seja qualquer quantidade entre 0,1 mg/kg e 1000 mg/kg (p. ex., 0,005 mg/kg e 200 mg/kg, 0,5 mg/kg e 20 mg/kg). As doses eficazes também variarão, como reconhecido pelos técnicos no assunto, dependendo das doenças tratadas, a via de administração, da utilização de excipientes e a possibilidade de utilização conjunta com outros tratamentos terapêuticos como o uso de outros agentes.

[00213] Em aspectos mais específicos, um agente da invenção (p. ex., um agente que diminui a atividade ou expressão de ERK, PKC e/ou PLC ou IP3) é administrado em um esquema posológico de 30-300 mg/dia (p. ex., 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 ou 300 mg/dia) por pelo menos 1 semana (p. ex., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 36, 48 ou mais semanas). Em certas modalidades, um composto(s) aqui incorporado(s) é/são administrado(s) em um esquema

posológico de 100-300 mg/dia por 4 ou 16 semanas. Alternativa ou subsequentemente, um agente aqui incorporado é administrado em um esquema posológico de 100 mg duas vezes ao dia por 8 semanas ou, opcionalmente, por 52 semanas.

[00214] Neste relatório descritivo, um “indivíduo com necessidade do mesmo” é um indivíduo portador de uma doença, transtorno ou condição, ou um indivíduo com risco aumentado de desenvolver uma doença, transtorno ou condição em relação à população em geral. Em um aspecto preferido, o indivíduo com necessidade do mesmo é um indivíduo com vasopatia (p. ex., SEDv) ou transtornos do tecido conjuntivo ou com risco aumento de desenvolver vasopatia (p. ex., SEDv) ou transtornos do tecido conjuntivo em relação à população em geral. O indivíduo com necessidade do mesmo pode ser aquele que é “não responsivo” ou “refratário” a uma terapia atualmente disponível para a doença ou transtorno. Nesse contexto, os termos “não responsivo” e “refratário” referem-se à resposta do indivíduo à terapia como não clinicamente adequada para aliviar um ou mais sintomas associados com a doença ou transtorno.

[00215] Um “indivíduo” inclui um mamífero. O mamífero pode ser, p. ex., qualquer mamífero, p. ex., um humano, primata, vertebrado, ave, camundongo, rato, galinha, cão, gato, vaca, cavalo, cabra, camelo, ovelha ou um porco. De preferência, o mamífero é um humano. Os termos “indivíduo” e “paciente” são usados alternadamente neste relatório descritivo.

[00216] A presente invenção provê uma monoterapia para o tratamento de uma doença, transtorno ou condição como aqui descritos. Neste relatório descritivo, “monoterapia” refere-se à administração de um único composto ativo ou terapêutico a um indivíduo com necessidade do mesmo. De preferência, a monoterapia envolverá a administração e uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto ativo. Por exemplo, a monoterapia com um agente da invenção pode ser administrada em uma quantidade

terapeuticamente eficaz a um indivíduo com necessidade de tratamento. Monoterapia pode ser diferenciada de terapia combinada pelo fato de uma combinação de múltiplos compostos ativos ser administrada, de preferência com cada componente da combinação presente em uma quantidade terapêuticamente eficaz. Em um aspecto, a monoterapia com um agente da invenção é mais eficaz do que a terapia combinada na indução de um efeito biológico desejado.

[00217] Neste relatório descritivo, “tratamento”, “tratando” ou “tratar” descreve o manejo e cuidados de um paciente visando combater uma doença, condição ou transtorno e inclui a administração de um agente da invenção para aliviar os sintomas ou complicações de uma doença, condição ou transtorno, ou para eliminar a doença, condição ou transtorno.

[00218] Neste relatório descritivo, “prevenção”, “prevenindo” ou “prevenir” descreve reduzir ou eliminar o início dos sintomas ou complicações da doença, condição ou transtorno e inclui a administração de um agente da invenção para reduzir o início, o desenvolvimento ou a recorrência de sintomas da doença, condição ou transtorno.

[00219] Neste relatório descritivo, o termo “aliviar” destina-se a descrever um processo pelo qual a gravidade de um sinal ou sintoma de um transtorno é diminuída. De modo importante, um sinal ou sintoma pode ser aliviado sem ser eliminado. Em uma modalidade preferida, a administração de um agente da invenção leva à eliminação de um sinal ou sintoma, no entanto, a eliminação não é necessária. Prevê-se que doses eficazes diminuam a gravidade de um sinal ou sintoma.

[00220] Neste relatório descritivo, o termo “sintoma” é definido como uma indicação de doença, enfermidade, lesão ou de que algo que não está certo no corpo. Sintomas são sentidos ou percebidos pelo indivíduo que sofre o sintoma, mas pode não ser facilmente percebido por outros. Outros são definidos como não profissionais de saúde.

[00221] O tratamento de um transtorno, doença ou condição de acordo com os métodos aqui descritos pode resultar em uma diminuição na taxa de progressão da vasopatia (p. ex., SEDv) ou do transtorno do tecido conjuntivo. De preferência, após o tratamento, a taxa de progressão da vasopatia (p. ex., SEDv) ou do transtorno do tecido conjuntivo é reduzida em pelo menos 5% em relação ao número anterior ao tratamento; mais preferivelmente, a taxa de progressão da vasopatia (p. ex., SEDv) ou transtorno do tecido conjuntivo é reduzida em pelo menos 10%; mais preferivelmente, reduzida em pelo menos 20%; mais preferivelmente, reduzida em pelo menos 30%; mais preferivelmente, reduzida em pelo menos 40%; mais preferivelmente, reduzida em pelo menos 50%; ainda mais preferivelmente, reduzida em pelo menos 50%; e o mais preferível, reduzida em pelo menos 75%. A taxa de progressão da vasopatia (p. ex., SEDv) ou de transtornos do tecido conjuntivo pode ser medida por qualquer meio de medição que possa ser reproduzido.

[00222] Neste relatório descritivo, o termo “seletivamente” significa tendendo a ocorrer em uma frequência maior em uma população do que em outra população. As populações comparadas podem ser populações celulares. De preferência, um agente da presente invenção atua seletivamente nas células em hiper proliferação, mas não em uma célula normal. Um agente da presente invenção atua seletivamente na modulação de um alvo molecular, mas não modula significativamente outro alvo molecular.

Terapia combinada

[00223] Em modalidades, a invenção também provê métodos que compreendem a terapia combinada de hidralazina com pelo menos um agente ativo adicional. Em modalidades, pelo menos um agente ativo adicional é um agente terapêutico, p. ex., um composto antiandrogênico como bicalutamida ou espironolactona.

[00224] Neste relatório descritivo, “terapia combinada” ou “coterapia” inclui a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um

agente aqui descrito com pelo menos um agente ativo adicional, como parte de um esquema de tratamento específico que visa um efeito benéfico proporcionado pela ação conjunta do agente e o agente ativo adicional. O efeito benéfico da combinação inclui, entre outros, a ação conjunta farmacocinética ou farmacodinâmica resultante da combinação de compostos terapeuticamente ativos. “Terapia combinada” pretende abranger a administração de dois ou mais compostos terapêuticos como parte de esquemas separados de monoterapia que resultam de modo incidental em um efeito benéfico que não era pretendido ou previsto.

[00225] De preferência, a terapia combinada fornece uma resposta sinérgica no indivíduo em tratamento. Nesse contexto, o termo “sinérgico” refere-se ao fato de que a eficácia da combinação é mais eficaz do que os efeitos aditivos de qualquer uma das terapias isoladamente. O efeito sinérgico de uma terapia combinada de acordo com a invenção pode permitir o uso de doses menores e/ou a administração menos frequente de pelo menos um agente na combinação em comparação à sua dose e/ou frequência fora da combinação. Os efeitos benéficos adicionais da combinação podem ser manifestados no evitamento ou redução de efeitos colaterais adversos ou indesejados associadas com o uso de qualquer uma das terapias na combinação isoladamente (também referido como monoterapia).

[00226] “Terapia combinada” também abrange a administração do agente que inibe ou reduz a atividade biológica e/ou expressão de uma via de sinalização (p. ex., PLC/IP3/PKC/ERK) da presente invenção em combinação adicional com terapias não medicamentosas (p. ex., tratamento cirúrgico ou com radiação). Quando a terapia combinada compreende ainda a tratamento não medicamentoso, o tratamento não medicamentoso pode ser conduzido em qualquer momento adequado desde que alcançado um efeito benéfico pela ação conjunta da combinação dos compostos terapêuticos e tratamento não medicamentoso. Por exemplo, em casos adequados, o efeito benéfico é ainda

alcançado quando o tratamento não medicamentoso é temporalmente suspenso da administração dos compostos terapêuticos, talvez por dias ou mesmo semanas. O tratamento não medicamentoso pode ser selecionado dentre quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia antiestrogênica, terapia gênica e cirurgia.

[00227] No contexto dos métodos aqui descritos, a quantidade administrada de um agente ao indivíduo é uma quantidade terapeuticamente eficaz. O termo “quantidade terapeuticamente eficaz” refere-se a uma quantidade suficiente para tratar, melhorar um sintoma, reduzir a gravidade ou reduzir a duração da doença em tratamento (p. ex., SEDv), ou reforçar ou melhorar o efeito terapêutico de outra terapia, ou suficiente para exibir um efeito terapêutico detectável no indivíduo. Em uma modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do agente é a quantidade eficaz em reduzir uma via de sinalização (p. ex., PLC/IP3/PKC/ERK).

[00228] Em modalidades, a administração de hidralazina e um agente antiandrogênico de acordo com os métodos aqui descritos leva à eliminação de um sintoma ou complicação da doença (p. ex., SEDv) em tratamento; no entanto, a eliminação não é necessária. Em uma modalidade, a gravidade do sintoma ou complicação é diminuída.

Composições farmacêuticas

[00229] Em certas modalidades, a presente invenção provê uma composição farmacêutica que compreende um agente (p. ex., um agente que diminui a atividade ou expressão de ERK, PKC e/ou PLC ou IP3) e é empregada na presente invenção. O agente pode ser adequadamente formulado e introduzido em um indivíduo ou no ambiente de uma célula por meios reconhecidos para tal entrega.

[00230] Uma “composição farmacêutica” é uma formulação que contém os agentes aqui descritos em uma forma farmacêuticamente aceitável para administração a um indivíduo. Neste relatório descritivo, a expressão

“farmaceuticamente aceitável” refere-se àqueles compostos, materiais, composições, veículos e/ou formas farmacêuticas que são, no âmbito do juízo médico fundamentado, adequados para uso em contato com os tecidos de seres humanos e animais sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica ou outro problema ou complicação, comensurado com uma relação risco/benefício razoável.

[00231] Tais composições incluem tipicamente o agente e um veículo farmaceuticamente aceitável. Neste relatório descritivo, a redação “veículo farmaceuticamente aceitável” inclui solução salina, solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardadores da absorção e similares, compatíveis com a administração farmacêutica. Compostos ativos suplementares podem também ser incorporados nas composições.

[00232] Neste relatório descritivo, o termo “sal farmaceuticamente aceitável” é um sal formado a partir de, por exemplo, um ácido e um grupo básico de um agente aqui descrito. Sais ilustrativos incluem, entre outros, os sais sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloreto, brometo, iodeto, nitrato, bissulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartarato, oleato, tanato, pantotenato, bitartarato, ascorbato, succinato, maleato, besilato, gentisinato, fumarato, gliconato, glucaronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metanossulfonato, etanossulfonato, benzenossulfonato, p-toluenossulfonato e pamoato (p. ex., 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)).

[00233] Uma composição farmacêutica é formulada para ser compatível com sua via de administração pretendida. Os exemplos de vias de administração incluem administração parenteral, p. ex., intravenosa, intradérmica, subcutânea, oral (p. ex., inalação), transdérmica (tópica), transmucosa e retal. As soluções ou suspensões usadas para aplicação parenteral, intradérmica ou subcutânea podem incluir os seguintes

componentes: um diluente estéril como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietilenoglicóis, glicerina, propilenoglicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos como álcool benzílico ou metilparabenos; antioxidantes como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes como ácido etilenodiaminotetracético; tampões como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajuste da tonicidade como cloreto de sódio ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. O preparado parenteral pode estar contido em ampolas, seringas descartáveis ou frascos-ampolas de doses múltiplas de vidro ou plástico.

[00234] Composições farmacêuticas adequadas para uso injetável incluem soluções aquosas estéreis (quando solúveis em água) ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersão injetáveis. Para administração intravenosa, os veículos adequados incluem solução salina fisiológica, água bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) ou solução salina com tampão fosfato (PBS). Em todos os casos, a composição precisa ser estéril e deve ser suficientemente fluida para que exista fácil seringabilidade. Ela deve ser estável sob as condições de fabricação e armazenamento e precisa ser conservada contra a ação contaminante de microrganismos como bactérias e fungos. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido, e semelhantes), e misturas adequadas dos mesmos. A devida fluidez pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento como lecitina, pela manutenção do tamanho de partículas requerido no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. A prevenção da ação de microrganismos pode ser alcançada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal e semelhantes. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo,

açúcares, poliálcoois como manitol, sorbitol, cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser ocasionada pela inclusão na composição de um agente que retarda a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[00235] As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o composto ativo na quantidade requerida em um solvente selecionado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, se necessário, seguido por filtração estéril. Em geral, as dispersões são preparadas incorporando o composto ativo em um veículo estéril que contém um meio básico de dispersão e os outros ingredientes necessários dentre aqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos são secagem a vácuo e liofilização que produz um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução filtrada estéril dos mesmos.

[00236] As composições orais geralmente incluem um diluente inerte ou um veículo comestível. Para fins da administração terapêutica oral, o composto ativo pode ser incorporado com excipientes e usadas na forma de comprimidos, drágeas ou cápsulas, p. ex., cápsulas gelatinosas. As composições orais podem também ser preparadas usando um veículo fluido para uso como um enxaguante bucal. Agentes de ligação farmacologicamente compatíveis e/ou materiais adjuvantes podem ser incluídos como parte da composição. Os comprimidos, pílulas, cápsulas, drágeas e semelhantes podem conter qualquer um dos ingredientes a seguir, ou composto de natureza semelhante: um aglutinante como celulose microcristalina, goma tragacanta ou gelatina; um excipiente como amido ou lactose, um agente desintegrante como ácido algínico, Primogel ou amido de milho; um lubrificante como estearato de magnésio ou Sterotes; um deslizante como dióxido de silício coloidal; um agente adoçante como sacarose ou sacarina; ou um agente aromatizante como hortelã-pimenta, salicilato de metila ou sabor de laranja.

[00237] As composições da invenção poderiam também ser formuladas como formulações de nanopartículas. Os compostos da invenção podem ser administrados para aplicações de liberação imediata, liberação retardada, liberação modificada, liberação sustentada, liberação pulsada e/ou liberação controlada. As composições farmacêuticas da invenção podem conter de 0,01 a 99% em peso - por volume do material ativo. Para administração por inalação, os compostos estão na forma de um *spray* de aerossol, liberado desde um recipiente pressurizado ou dispensador que contém um propelente adequado, p. ex., um gás como dióxido de carbono, ou um nebulizador. Tais métodos incluem aqueles descritos na Patente U.S. Nº 6 468 798.

[00238] A administração sistêmica pode também ser por meio transmucoso ou transdérmico. Para administração transmucosa ou transdérmica, são usados penetrantes adequados à barreira a ser permeada na formulação. Tais penetrantes são geralmente conhecidos na técnica, e incluem, por exemplo, para administração transmucosa, detergentes, sais biliares e derivados do ácido fusídico. A administração transmucosa pode ser conseguida através do uso de *sprays* nasais ou supositórios. Para administração transdérmica, os compostos ativos são formulados em unguentos, pomadas, géis ou cremes como geralmente conhecido na técnica. Os compostos podem também ser preparados na forma de supositórios (p. ex., com bases convencionais para supositório como manteiga de cacau e outros glicerídeos) ou enemas de retenção para liberação retal.

[00239] Em uma modalidade, os compostos ativos são preparados com veículos que protegerão o composto contra eliminação rápida do corpo, como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes e sistemas microencapsulados de liberação. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser utilizados, como acetato de vinil etileno, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Tais formulações podem ser preparadas utilizando técnicas padrão. Os materiais podem também

ser obtidos comercialmente da Alza Corporation e Nova Pharmaceuticals, Inc. Suspensões lipossomais (incluindo lipossomas direcionados a células infectadas com anticorpos monoclonais contra antígenos virais) podem também ser utilizadas como veículos farmacêuticamente aceitáveis. Essas podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos pelos técnicos no assunto, por exemplo, como descrito na Patente U.S. Nº 4 522 811.

[00240] A toxicidade e eficácia terapêutica de tais compostos podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas celulares ou animais experimentais, p. ex., para determinar a LD₅₀ (a dose letal para 50% da população) e a ED₅₀ (a dose terapêuticamente eficaz em 50% da população). A razão da dose entre efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e pode ser expresso como a razão LD₅₀/ED₅₀. Compostos que exibem índices terapêuticos elevados são preferidos. Embora compostos que exibam efeitos colaterais tóxicos possam ser utilizados, deve-se tomar cuidado ao se projetar um sistema de liberação que direciona tais compostos para o sítio do tecido afetado para minimizar danos potenciais a células não afetadas e, assim, reduzir os efeitos colaterais.

[00241] Os dados obtidos de ensaios em cultura celular e estudos com animais podem ser utilizados para formular uma faixa de dosagem para uso em humanos. A dosagem de tais compostos reside preferivelmente dentro de uma faixa de concentrações circulantes que incluem a ED₅₀ com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro dessa faixa dependendo da forma farmacêutica empregada e a via de administração utilizada. Para um composto usado em um método da invenção, a dose terapêuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente a partir de ensaios em cultura celular. Uma dose pode ser formulada em modelos animais para alcançar uma concentração plasmática circulante que inclui a IC₅₀ (ou seja, a concentração do composto em teste alcança a metade da inibição máxima de sintomas), conforme determinada em cultura celular. Tais informações podem ser utilizadas para

determinar com mais exatidão doses úteis em humanos. Os níveis no plasma podem ser medidos, por exemplo, por cromatografia líquida de alta eficiência.

[00242] Como definida neste relatório descritivo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente (ou seja, uma dose eficaz) depende do agente selecionado. Por exemplo, quantidades de dose única de um agente na faixa de aproximadamente 1 pg a 1000 mg podem ser administradas; em algumas modalidades, 10, 30, 100 ou 1000 pg, ou 10, 30, 100 ou 1000 ng, ou 10, 30, 100 ou 1000 µg, ou 10, 30, 100 ou 1000 mg podem ser administrados. Em algumas modalidades, 1-5 g das composições podem ser administradas.

[00243] Uma quantidade terapeuticamente eficaz do composto da presente invenção pode ser determinada por métodos conhecidos na técnica. Além de depender do agente selecionado e da formulação farmacêutica utilizadas, as quantidades terapeuticamente eficazes de uma composição farmacêutica da invenção dependerá da idade e da condição fisiológica geral do paciente e da via de administração. Em certas modalidades, as doses terapêuticas serão em geral entre aproximadamente 10 e 2000 mg/dia e, de preferência, entre aproximadamente 30 e 1500 mg/dia. Outras faixas podem ser utilizadas, incluindo, por exemplo, 50-500 mg/dia, 50-300 mg/dia, 100-200 mg/dia.

[00244] A administração pode ser uma vez ao dia, duas vezes ao dia ou mais frequentemente, e pode ser diminuída durante uma fase de manutenção da doença ou transtorno, p. ex., uma vez a cada dois ou a cada três dias em vez de todos os dias ou duas vezes ao dia. A dose e a frequência da administração dependerão dos sinais clínicos, os quais confirmam a manutenção da fase de remissão, com a redução ou ausência de pelo menos uma ou mais preferivelmente mais de um sinal clínico da fase aguda, conhecidos pelo técnico no assunto. O técnico no assunto apreciará que certos fatores podem influenciar a dosagem e o horário requerido para tratar efetivamente um indivíduo, incluindo, entre outros, a gravidade da doença ou

transtorno, tratamentos anteriores, a saúde em geral e/ou a idade do indivíduo e outras doenças presentes. Além disso, o tratamento de um indivíduo com uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente pode incluir um tratamento único ou, opcionalmente, uma série de tratamentos.

[00245] Pode ser apreciado que o método para introduzir um agente no ambiente de uma célula dependerá do tipo de célula e da composição de seu ambiente. Quantidades adequadas de um agente precisam ser introduzidas e essas quantidades podem ser determinadas empiricamente utilizando métodos padrão. As concentrações eficazes exemplares de um agente individual no ambiente de uma células podem ser 500 milimolar ou menos, 50 milimolar ou menos, 10 milimolar ou menos, 1 milimolar ou menos, 500 nanomolar ou menos, 50 nanomolar ou menos, 10 nanomolar ou menos, ou ainda composições nas quais concentrações de 1 nanomolar ou menos podem ser utilizadas.

[00246] As composições farmacêuticas podem estar incluídas em um kit, recipiente, pacote ou dispensador, juntamente com instruções para administração.

Exemplos

[00247] Os exemplos a seguir são apresentados de modo a fornecer aos técnicos no assunto uma exposição e descrição completa de como criar e utilizar os métodos de ensaio, rastreamento e terapêuticos da invenção, e não se destinam a limitar o âmbito daquilo considerado pelos inventores como a sua invenção.

Exemplo 1: Geração de camundongos SEDv com *knock-in* (inserção visada de um gene) para substituição de glicina

[00248] Criaram-se novos camundongos SEDv com *knock-in* para substituição de glicina (*Col3a1* G209S/+ e *Col3a1* G938D/+) usando a técnica CRISPR/Cas9. O modelo de camundongo recapitulou os fenótipos vasculares humanos e uma base molecular para falha final da parede vascular

foi descoberta, através da exploração de efeitos ambientes no fenótipo da doença.

[00249] Para introduzir cada mutação, 3 RNAs guia (tracrRNA + crRNA) foram desenhados para atingir as regiões do DNA que flanqueavam o sítio de mutação pretendido. Um molde para reparo de DNA oligo (ssDNA oligo) foi também desenhado que incluísse sequências homólogas a montante e a jusante da região alvo, bem como a mutação pretendida. A injeção pró-nuclear de embriões C57BL/6J unicelulares foi realizada pelo JHU Transgenic Core usando técnicas padrão de microinjeção com uma mistura de proteína Cas9, tracrRNA, crRNA, e ssDNA oligo diluída no tampão de injeção livre de RNase. Os embriões injetados foram transferidos para os oviductos de fêmeas ICR pseudoprenhes utilizando técnicas estabelecidas. O sequenciamento de Sanger do sítio foi utilizado para confirmar a introdução da mutação, e os camundongos foram retrocruzados por pelo menos 4 gerações para eliminar efeitos fora do alvo. Para o camundongo G209S, a mutação introduzida foi c.625_626GG>TC, correspondendo a p.Gly210Ser em humanos. Para o camundongo G938D, a mutação introduzida foi c.2813G>A, correspondendo a p.Gly939Ser em humanos. O mRNA de Col3a1 humano do tipo selvagem, N° de acesso NCBI: NM_000090.3; o mRNA de Col3a1 de camundongo, N° de acesso NCBI.: NM_009930.2.

Exemplo 2: Modelos de camundongos *Col3a1* G209S/+ e *Col3a1* G938D/+ recapitularam fenótipos de SEDv

[00250] Os modelos de camundongos *Col3a1* G209S/+ e *Col3a1* G938D/+ recapitularam fenótipos de SEDv. Camundongos com SEDv morrem subitamente devido à ruptura aórtica ou ruptura de órgão, mais frequentemente apresentando hemotórax ou hemoperitônio na necrópsia. Os camundongos com a mutação *Col3a1* G938D/+ apresentam um fenótipo mais grave (sobrevida mediana = 45 dias *versus* 400 dias para o modelo *Col3a1* G209S/+, $p < 0,0001$, Figura 1A – 1C). A Figura 1A é um gráfico

demonstrando que o modelo de camundongo G209S/+ recapitulou fenótipos de SEDv, e a sobrevida mediana foi 400 dias, $p < 0,0001$. Na Figura 1B, é mostrada a sobrevida do modelo de camundongo G938D/+, e SEDv recapitulada, e a sobrevida mediana foi 45 dias, $p < 0,0001$.

[00251] Em qualquer dos modelos de camundongo, não foi observada evidência de aneurisma em raízes aórticas através de ecocardiografia.

Exemplo 3: Anormalidades na sinalização foram mediadores da patologia da doença na SEDv

[00252] Foi levantada a hipótese de que anormalidades na sinalização poderiam ser mediadores importantes da patologia da doença na SEDv. Para testar essa hipótese, realizou-se o sequenciamento do RNA na aorta torácica descendente proximal de três camundongos *Col3a1* G209S/+, três camundongos *Col3a1* G938D/+ e três camundongos *Col3a1* +/+ (tipo selvagem), dado que a aorta descendente proximal é a localização mais comum de dissecação aórtica nesse modelo. Foi realizado o agrupamento hierárquico não supervisionado usando os genes com expressão mais diferenciada ($FDR < 0,10$). Amostras de SEDv agruparam-se separadamente de controles (Figura 1D), indicando diferenças significativas no transcriptoma de aortas de SEDv.

[00253] A análise em rede indicou que as aortas de SEDv exibiram assinaturas de expressão gênica para elevações na atividade de proteínas quinases (MAPK) [P38, JNK, AKT, ERK, ERK1/2] (Figura 1E).

[00254] Além disso, a análise a montante predisse que as diferenças transcricionais em aortas de SEDv eram impulsionadas pela ativação do receptor acoplado à proteína G (GPCR), que sinaliza através do eixo PLC/IP3/PKC/ERK relacionado (Figura 1F).

[00255] A assinatura para elevações na sinalização de GPCR e MAPK foram confirmadas por *immunoblotting* para marcadores de sinalização ativa através dessa via, e confirmou a fosforilação de ERK1/2 e fosforilação de

PKC como significativamente maiores em aortas de SEDv (Figura 1G).

[00256] Em contraste à síndrome de Marfan (MFS) ou síndrome de Loeys-Dietz (LDS), o perfil de expressão da aorta SEDv não mostra um repertório sintético típico para alta sinalização de TGF β , no entanto, foi observada evidência de ativação aumentada de ERK (de modo semelhante a MFS e LDS). Um pequeno estudo em humanos sugeriu que o beta-bloqueador celiprolol tem o potencial para retardar eventos adversos em pacientes com SEDv, enquanto bloqueadores do receptor de angiotensina como losartana conferiram proteção dramática em modelos de MFS ou LDS em camundongos.

[00257] Além disso, não há evidência de proteção contra dissecação ou morte em camundongos SEDv tratados com losartana, enquanto celiprolol se associa com aceleração significativa de dissecação e morte em modelos de SEDv; os dois fármacos conseguiram a redução prevista de estresse hemodinâmico. Embora dados iniciais mostrem que hidralazina, que inibe o eixo PLC/IP3/PKC/ERK, confere alguma proteção em camundongos SEDv, esses dados destacam a necessidade de métodos com base em descoberta para revelar estratégias terapêuticas não antecipadas.

[00258] As mutações de SEDv foram introduzidas nos *backgrounds* de 129 puro e BL6 para avaliar a modulação de gravidade fenotípica. Ambas as mutações são associadas com morte precoce devido à dissecação aórtica no *background* BL6. Muito notavelmente, o *background* 129 levou à proteção completa contra dissecação para ambos os genótipos de SEDv, com uma expectativa de vida inteiramente normal. O resgate associa-se com a normalização de perfis de expressão gênica para a parede aórtica. Esses dados fornecem a justificativa e incentivam a realização de estudos genéticos para identificar a fonte e o mecanismo da modificação em camundongos SEDv, com a esperança e intenção de similar estratégias bem sucedidas da natureza utilizando agentes farmacológicos.

Exemplo 4: Inibição farmacológica do eixo PLC/IP3/PKC/ERK diminuiu o risco de ruptura aórtica em camundongos SEDv

[00259] Dado que a ativação do eixo PLC/IP3/PKC/ERK demonstrou ser patogênica na MFS⁷, foi levantada a hipótese de que a inibição farmacológica desse eixo diminuiria o risco de ruptura aórtica em camundongos SEDv.

Antagonista farmacológico de ERK aumentou a sobrevida

[00260] Antagonistas farmacológicos de ERK foram testados para respaldar o papel da ativação de ERK na patogênese de SEDv e como um método para identificar estratégias terapêuticas para SEDv. Camundongos foram tratados com cobimetinibe [GDC-0973, RO5514041] (2 mg/kg/dia), um inibidor de MEK aprovado pela FDA, a quinase que ativa ERK⁸. Foi levantada a hipótese de que se a ativação de ERK estivesse verdadeiramente impulsionando o risco da doença, a inibição de ERK resgataria do risco de morte por dissecação aórtica.

[00261] Em conformidade com essa hipótese, uma sobrevida de 94% foi observada após 45 dias de tratamento, em comparação a apenas 55% de sobrevida sem tratamento (Figura 2A).

Inibição farmacológica de PKC aumentou a sobrevida

[00262] Em seguida, foram realizados estudos adicionais para testar agentes que inibem a ativação de PKC. Camundongos foram tratados com ruboxistaurina [LY 333531] (10mg/kg/dia), um agente farmacológico bem tolerado administrado oralmente que inibe especificamente PKC beta⁹. Foi levantada a hipótese de que se a ativação de ERK e, assim, o risco da doença, fosse impulsionada pela ativação de PLC/IP3/PKC, um inibidor farmacológico de PKC também resgataria do risco de morte por dissecação aórtica.

[00263] Em conformidade com essa hipótese, foi observada uma sobrevida de 100% após 39 dias de tratamento, em comparação a apenas 55%

sobrevida sem tratamento (Figura 2B).

Agentes que inibem a cascata de sinalização de PLC/IP3/PKC/ERK aumentaram a sobrevida

[00264] Foram realizados estudos adicionais para testar outros medicamentos que inibem essa cascata de sinalização. Os camundongos foram tratados pela administração de hidralazina (32mg/kg/dia), que bloqueia o eixo PLC/IP3/PKC/ERK, sugerindo que esse medicamento atingiria a mesma via e, assim, conferiria proteção semelhante¹⁰. Uma proteção notável foi observada, 98% de sobrevida aos 45 dias de idade, a sobrevida mediana para um camundongo com SEDv não tratado (Figura 2C).

[00265] Embora a sobrevida fosse afetada na puberdade, esse risco foi visto quase que exclusivamente em camundongos machos e, assim, o tratamento com um antagonista androgênico pode ser benéfico para esses camundongos. Além disso, a dose de hidralazina pode ser insuficiente para inibir completamente essa via nesse modelo de camundongo, e uma dose maior de hidralazina pode comprovar ser benéfica.

[00266] Os camundongos foram tratados com a terapia combinada de hidralazina e um antagonista de androgênios.

[00267] Além disso, os camundongos foram tratados com doses maiores de hidralazina.

[00268] Esses resultados sugerem que a inibição da sinalização excessiva de PLC/IP3/PKC/ERK na aorta resgata do risco de morte por dissecação aórtica no modelo de SEDv em camundongo.

Exemplo 5: Sinalização de ERK induzida por oxitocina ativou o eixo PLC/IP3/PKC/ERK e agravou o risco de dissecação aórtica

[00269] Pacientes com a síndrome de Ehlers Danlos vascular (SEDv) sofrem dissecação de artérias de médio a grande calibre. Muitas características de SEDv são distintamente diferentes de outras vasculopatias hereditárias, como a síndrome de Marfan (MFS) e a síndrome de Loeys-Dietz

(LDS) que foram associadas com atividade excessiva de TGF β . Essas não incluem predisposição em particular para envolvimento da raiz aórtica e dissecação sem dilação anterior do vaso. É difícil antecipar ou impedir a ruptura vascular em pacientes com SEDv. A gravidez especificamente aumenta o risco de dissecação, com complicações ocorrendo em mais de 50% das gestações, e o óbito em aproximadamente 12-25% das gestações. A ocorrência predominante no pós-parto de dissecação vascular não é condizente com um mecanismo que invoca singularmente estresse hemodinâmico. Em vez disso, foi levantada a hipótese de que a oxitocina, um hormônio que inicia a contração uterina e é sustentado no pós-parto durante a lactação, pode contribuir para o risco associado à gravidez. A expressão do receptor de oxitocina é induzida na aorta durante a gravidez, e o hormônio estimula tecidos periféricos através da ativação de ERK, uma cascata de sinalização implicada antes na patogênese de MFS e LDS.

[00270] Anteriormente, foi demonstrado que a dissecação aórtica associada à gravidez é impulsionada em grande medida pela liberação de oxitocina associada à lactação e a sinalização de ERK induzida pela oxitocina em aortas de camundongos MFS¹¹. Desse modo, a sinalização de ERK induzida pela oxitocina foi usada como um método para testar se a ativação do eixo PLC/IP3/PKC/ERK agravaria o risco de dissecação aórtica.

[00271] No modelo de camundongo SEDv, foi identificado que gravidez e lactação estavam associadas com 60% de letalidade por dissecação arterial nos 30 primeiros dias após o parto em camundongos SEDv (Figura 3A). Além disso, a prevenção da lactação pela remoção dos filhotes após o nascimento foi capaz de impedir a dissecação e morte em camundongos SEDv (100% de sobrevida, Figura 3B). Ademais, uma sobrevida quase completa (95%) foi alcançada quando do tratamento com hidralazina (16 mg/kg/dia), que bloqueia o eixo PLC/IP3/PKC/ERK que é ativado pela oxitocina (Figura 3C). Proteção semelhante (95% de sobrevida) foi observada quando do

tratamento com trametinibe [GSK-1120212] (1 mg/kg/dia), um inibidor de MEK aprovado pela FDA, a quinase que ativa ERK (Figura 3D).

[00272] Esse risco aumentado de morte correlacionou-se com um aumento na ativação de ERK, enquanto a proteção contra dissecção aórtica correlacionou-se com uma diminuição na ativação de ERK, conforme medido por *immunoblotting* e pela expressão do gene alvo de ERK (Figura 3E e Figura 3F). Esses dados respaldam ainda mais que aumentar a ativação da via de sinalização PLC/IP3/PKC/ERK leva a um risco significativamente elevado de morte por dissecção aórtica no modelo de camundongo de SEDv e, além disso, que inibir a via de sinalização PLC/IP3/PKC/ERK melhorou esse risco.

Exemplo 6: Composições e métodos para o tratamento da síndrome de Ehlers Danlos e transtornos associados

[00273] O uso de antagonistas farmacológicos de eMEK/ERK e de antagonistas de PKC resgata do risco de morte por dissecção aórtica, demonstrando que a ativação de ERK dependente de PKC é um componente crítico da doença aórtica em SEDv e que o direcionamento para essa via de sinalização é benéfico para reduzir a doença aórtica em modelos de camundongos SEDv.

[00274] Aqui, demonstra-se que a inibição farmacológica e PKC β usando um segundo inibidor específico de PKC β , enzastaurina (60 mg/kg/dia), também resgatou do risco de morte por dissecção aórtica, com 80% dos camundongos SEDv tratados com enzastaurina sobrevivendo após 40 dias de tratamento em comparação a apenas 50% dos camundongos SEDv não tratados ($p=0,0305$, **Figura 16A**). Isso fornece evidência adicional de que a fosforilação de PKC β é um componente crítico da doença aórtica em camundongos SEDv.

[00275] Dado que se identificou aqui que essa ativação da via de sinalização PLC/IP3/PKC/ERK é patogênica em SEDv, a identidade do receptor que poderia estar ativando essa via de sinalização anormal foi

examinada. O sinal de GPCRs (Gq) através dessa via – os receptores Gq comuns na aorta incluem o receptor de angiotensina II, o receptor de trombina, o receptor de endotelina-1, o receptor de vasopressina 1, o receptor de esfingosina-1-fosfato, o receptor adrenérgico α -1 e o receptor de serotonina. No entanto, há também GPCRs órfãos, como GPR56 que demonstrou interagir com colágeno 33,4, que também são expressos na aorta.

[00276] Sem a intenção de ficar preso à teoria, foi levantada a hipótese de que se o receptor que está ativado anormalmente for inibido, seria possível identificar como a via de sinalização está sendo ativada. Além disso, os camundongos foram tratados com bosentana (100 mg/kg/dia), um antagonista do receptor de endotelina não específico biodisponível por via oral. O tratamento com bosentana levou a 80% de sobrevida após 40 dias de tratamento, em comparação a apenas 50% de sobrevida em camundongos SEDv não tratados ($p=0,0298$, **Figura 16B**). Isso sugere que a sinalização do receptor de endotelina contribui para a patogênese de SEDv.

[00277] O uso de ambos, antagonistas farmacológicos de MEK/ERK e antagonistas de PKC, resgata do risco de morte por dissecação aórtica, demonstrando que a ativação de ERK dependente de PKC é um componente crítico da doença aórtica em SEDv e que o direcionamento para essa via de sinalização é benéfico para reduzir a doença aórtica em modelos de camundongo SEDv. Em seguida, buscou-se identificar uma evidência de que essa via de sinalização está elevada em amostras de tecido vascular de pacientes humanos com SEDv. Tanto a fosforilação de PKC (**Figura 17**) bem como a fosforilação de ERK1/2 (**Figura 18**) foram identificadas em duas amostras de tecido (artéria ilíaca e aorta torácica descendente) de pacientes com SEDv. Nenhuma dessas proteínas fosforiladas foram vista em uma amostra de tecido retirada da aorta ascendente de alguém sem SEDv.

Conclusões

[00278] Considerados em conjunto, os resultados fornecem a primeira

evidência para uma anormalidade na sinalização direcionável que contribui para a patogênese de SEDv. Esses dados apoiam a hipótese de que a sinalização aumentada de PLC/IP3/PKC impulsiona a ativação aumentada de MAPK/ERK, o que, por sua vez, aumenta o risco de morte por dissecação aórtica em modelos de camundongos SEDv.

[00279] Foi demonstrado que a inibição da ativação de ERK através da inibição farmacológica de MEK, o ativador de ERK, ou a inibição farmacológica de PKC ou a inibição farmacológica do eixo PLC/IP3/PKC/ERK é suficiente para resgate da morte por dissecação aórtica. Agentes que inibem essa via proporcionarão benefício terapêutico para a síndrome de Ehlers Danlos vascular e potencialmente para outros transtornos do tecido conjuntivo.

[00280] Além disso, o ativador de PLC/IP3/PKC/ERK poderia mostrar regulação positiva coordenada em aortas de SEDv, o que é testado através de análises de candidatos que surgem dos perfis de sequenciamento do RNA.

Referências

[00281] 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.

[00282] 2. Pepin MG, Schwarze U, Rice KM, Liu M, Leistritz 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.

[00283] 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.

[00284] 4. Holm TM, Habashi JP, Doyle JJ, *et al.* Noncanonical TGFβ

signaling contributes to aortic aneurysm progression in Marfan syndrome mice. *Science*. 2011;332(6027):358-361. doi:10.1126/science.1192149.

[00285] 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.

[00286] 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.

[00287] 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.

[00288] 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.

[00289] 9. PKC-DRS2 Group 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.opthta.2006.07.032.

[00290] 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>. Accessed September 24, 2018.

[00291] 11. Habashi JP, Gallo EM, Bagirzadeh R, *et al.* Oxytocin Antagonism Prevents Pregnancy-Associated Aortic Dissection in a Mouse Model of Marfan Syndrome.; 2018.

Exemplo 7: Androgênios tiveram um papel significativo no risco de dissecação aórtica e terapia combinada com hidralazina

[00292] A inibição farmacológica de PKC β impediu a autofosforilação de PKC bem como a fosforilação de ERK na parede aórtica (Figura 4A-4C),

conforme avaliado por *immunoblot* de lisados aórticos. A inibição farmacológica de MEK correlacionou-se com a redução prevista na fosforilação de ERK, o substrato a jusante de MEK, mas também, curiosamente, reduziu a fosforilação de PKC, sugerindo a presença de uma alça de *feedback* positivo (Figura 1, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Nem cobimetinibe nem ruboxistaurina tiveram um efeito sobre a pressão arterial.

Terapia combinada de hidralazina e bicalutamida para o tratamento de SEDv [00293] O tratamento dos camundongos com hidralazina (32 mg/kg/dia), que bloqueia o eixo PLC/IP3/PKC/ERK, confere proteção notável: 98% de sobrevida aos 45 dias de idade, a sobrevida mediana para um camundongo com SEDv não tratado. Embora a sobrevida fosse afetada na puberdade, esse risco foi visto quase que exclusivamente em camundongos machos (Figura 2A e 2B) e, desse modo, foi levantada a hipótese de que o tratamento com um antagonista de androgênios pode ser benéfico para esses camundongos. De fato, a combinação de hidralazina (32 mg/kg/dia) com bicalutamida (50 mg/kg/dia) levou a 90% de sobrevida em camundongos machos, em comparação a apenas 24% de sobrevida em camundongos machos tratados somente com hidralazina (Figura 6).

[00294] Curiosamente, se bicalutamida fosse suspensa depois da puberdade (aos 90 dias de vida), os camundongos machos continuaram a sobreviver na mesma taxa enquanto ainda em uso de hidralazina (Figura 6), sugerindo que houve uma dependência no tempo para a sensibilidade ao androgênio nesse modelo de camundongo. Para fins informativos, os camundongos machos tratados apenas com bicalutamida tiveram uma sobrevida intermediária de ~80% e os machos não continuaram a sobreviver após a suspensão da bicalutamida depois da puberdade (Figura 7), sugerindo que a inibição apenas da sinalização de androgênios não era suficiente para impedir a doença aórtica no modelo de camundongos of SEDv.

Terapia combinada de hidralazina e espironolactona para tratamento de SEDv

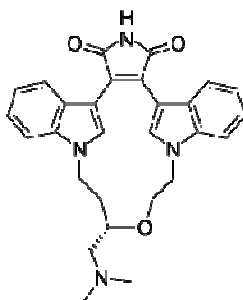
[00295] Essas novas observações e compreensão de que os androgênios desempenham um papel significativo no risco de dissecação aórtica em nosso modelo de camundongo SEDv levou a testes de outro medicamento aprovado pela FDA em combinação com hidralazina. Espironolactona é um medicamento diurético aprovado pela FDA que exibe antagonismo direto a androgênios como um efeito colateral. A espironolactona é usada fora de sua indicação no rótulo (*off label*) para tratar especificamente acne, hirsutismo e outros transtornos dependentes de androgênios¹. Foi levantada a hipótese de que a espironolactona poderia também ser usada como um antagonista direto de androgênios nesse transtorno.

[00296] Camundongos foram tratados apenas com espironolactona (100 mg/kg/dia) (Figura 8A) e uma sobrevida intermediária de ~80% foi observada, de modo semelhante à bicalutamida isoladamente. No entanto, a combinação de espironolactona (100 mg/kg/dia) e hidralazina (32 mg/kg/dia) levou a 100% de sobrevida após 50 dias de tratamento, de modo semelhante à combinação de hidralazina e bicalutamida (Figura 8B).

Terapia combinada de hidralazina e ruboxistaurina para o tratamento de SEDv

[00297] Em exemplos, contempla-se a terapia combinada compreendendo a administração e hidralazina e ruboxistaurina. Ruboxistaurina é um inibidor da proteína quinase C-beta (PKC-β) e um composto macrocíclico de bisindolilmaleimida em desenvolvimento pela Eli Lilly com potencial como uma terapia para edema macular diabético e outras angiopatias diabéticas, incluindo retinopatia diabética, neuropatia periférica diabética e nefropatia diabética. A nomenclatura adicional de ruboxistaurina incluem Arxxant (nome de marca proposto), IUPAC: (9S)-9-[[dimetilamino)metil]-6,7,10,11-tetrahidro-9H,18H-5,21:12,17-di(meteno)dibenzo[e,k]pirrol[3,4-h][1,4,13]oxadiazaciclohexadecino-18,20-diona e Número CAS: 169939-94-0.

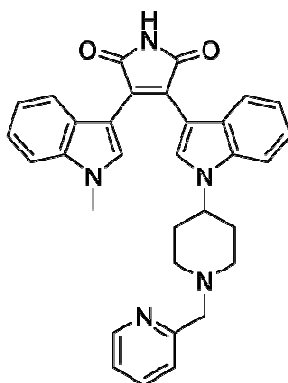
[00298] A estrutura da ruboxistaurina é fornecida abaixo:



Terapia combinada de hidralazina e enzastaurina para o tratamento de SEDv

[00299] Em exemplos, contempla-se a terapia combinada compreendendo a administração de hidralazina e enzastaurina. Enzastaurina é um bisindolilmaleimida sintético com atividade antineoplásica potencial. Ao se ligar ao sítio de ligação de ATP, a enzastaurina inibe seletivamente a proteína quinase C beta (PKC- β), uma enzima envolvida na indução de neoangiogênese estimulada pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Esse agente pode diminuir o suprimento de sangue para o tumor, impedindo o crescimento. A nomenclatura adicional da enzastaurina inclui: LY-317615, IUPAC: 3-(1-Metilindol-3-il)-4-[1-[1-(piridin-2-ilmetil)piperidin-4-il]indol-3-il]pirrol-2,5-diona e Número CAS: 170364-57.

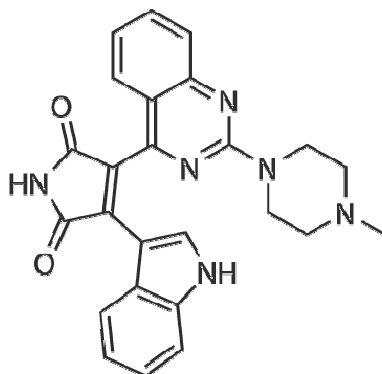
[00300] A estrutura de enzastaurina é fornecida abaixo:



Terapia combinada de hidralazina e sotrastaurina para o tratamento de SEDv

[00301] Em exemplos, contempla-se a terapia combinada compreendendo a administração de hidralazina e sotrastaurina. Sotrastaurina (EAB071) é um imunossupressor em investigação que bloqueia a ativação de linfócitos T através da inibição de proteína quinase C.

[00302] A estrutura de sotrastaurina é fornecida abaixo:



Terapia combinada de hidralazina e antiandrogênicos para o tratamento de SEDv

[00303] Combinações adicionais de hidralazina e diferentes antiandrogênicos são testadas. Por exemplo, hidralazina e antagonistas do receptor de androgênios, incluindo antiandrogênicos esteroides (acetato de ciproterona, acetato de megestrol, acetato de clormadinona, oxendolona e acetato de osaterona) são contempladas. Além disso, contempla-se hidralazina em combinação com antiandrogênicos não esteroides, como flutamida, nilutamida, topilutamida, enzalutamida, drospirenona ou medrogestona.

[00304] Em outros exemplos, contempla-se uma terapia combinada compreendendo hidralazina e inibidores da síntese de androgênios ou antagonistas de androgênios. Os inibidores exemplares da síntese de androgênios incluem cetozonazol, acetato de abiraterona, seviteronel, aminoglutetimida, finasterida, dutasterida, epristerida e alfatradiol. Os antagonistas de androgênios exemplares incluem leuprorelina e cetorelix. Outros antiandrogênicos contemplados incluem etinilestradiol e dietilestilbestrol.

Dose aumentada de hidralazina

[00305] Além disso, a dose de hidralazina pode ser insuficiente para inibir completamente essa via nesse modelo de camundongo, e uma dose maior de hidralazina pode provar ser benéfica. Assim, esses camundongos foram tratados com doses maiores de hidralazina, e foi verificado que uma dose aumentada de hidralazina (50 mg/kg/dia) não melhorou a sobrevivência mais

do que o fez a dose de 32 mg/kg/dia (Figura 9).

Exemplo 8: Sinalização induzida pela oxitocina

[00306] A sinalização de ERK induzida pela oxitocina foi usada como um método para testar a hipótese de que a ativação do eixo PLC/IP3/PKC/ERK agravaria o risco de dissecção aórtica. No modelo de camundongo SEDv aqui descrito, foi verificado que gravidez e lactação estavam associadas com 60% de letalidade devida à dissecção arterial nos 30 primeiros dias após o parto em camundongos SEDv, e a prevenção da lactação pela remoção dos filhotes após o nascimento, o tratamento com hidralazina (16 mg/kg/dia) ou o tratamento com trametinibe, foi capaz de impedir a dissecção e morte em camundongos SEDv. Esse risco aumentado de morte correlacionou-se com um aumento na ativação de ERK, enquanto a proteção contra dissecção aórtica correlacionou-se com uma diminuição na ativação de ERK, conforme medido por *immunoblotting* e pela expressão do gene alvo de ERK.

[00307] O tratamento de camundongos com um antagonista específico do receptor de oxitocina² foi adicionado (o antagonista seletivo do receptor de oxitocina usado foi des Gly-NH₂,d(CH₂)₅[D-Tyr₂,Thr₄]OVT), que levou a 95% de sobrevivência nos 30 primeiros dias após o parto em camundongos SEDv ainda na fase de lactação, demonstrando que o risco significativamente elevado de morte por dissecção aórtica com a gestação foi impulsionado especificamente pela ativação do receptor de oxitocina durante a amamentação (Figura 10A e 10B).

[00308] Além disso, demonstrou-se que o tratamento com propranolol (Figura 10B), que é o padrão de cuidados nessa população e reduz a pressão arterial sem afetar a sinalização de PLC/IP3/PKC/ERK não afetou a sobrevivência (46% de sobrevivência *versus* 50% de sobrevivência após 30 dias pós-parto) nesse modelo de gravidez/amamentação. Esses dados apoiam mais que aumentar a ativação da via de sinalização de PLC/IP3/PKC/ERK leva a um risco

significativamente elevado de morte por dissecação aórtica em nosso modelo de SEDv em camundongo e, mais, inibir a via de sinalização de PLC/IP3/PKC/ERK melhorou esse risco.

GPCRs ativou as vias de sinalização de PLC/IP3/PKC/ERK

[00309] Dado que foi identificado que a ativação da via de sinalização de PLC/IP3/PKC/ERK era patogênica em SEDv, foi identificado um receptor que pudesse estar ativando essa via de sinalização anormal. GPCRs (Gq) sinalizam através dessa via - os receptores Gq comuns na aorta incluem o receptor de angiotensina II, o receptor de trombina, o receptor de endotelina-1, o receptor de vasopressina 1, o receptor de esfingosina-1-fosfato, o receptor adrenérgico alfa-1 e o receptor de serotonina. No entanto, há também GPCRs, órfãos, como GPR56 que demonstrou interagir com colágeno ^{3,4}, que são igualmente expressos na aorta.

[00310] Foi levantada a hipótese de que se a atividade do receptor fosse inibida, o modo como a via de sinalização podia estar sendo ativada seria identificado. A sinalização de angiotensina-II foi inicialmente inibida pelo tratamento dos camundongos com um antagonista do receptor de angiotensina, losartana (60 mg/kg/dia) (Figura 11A), mas verificou-se que ele não tinha impacto sobre a sobrevida. Em seguida, os camundongos foram tratados com um antagonista do receptor de trombina, vorapaxar (1 mg/kg/dia), mas verificou-se igualmente que ele não tinha impacto sobre a sobrevida (Figura 11B).

[00311] Inibidores adicionais de receptores Gq específicos são testados. Os inibidores exemplares de receptores Gq que são testados incluem o receptor de endotelina-1, o receptor de vasopressina 1, o receptor de esfingosina-1-fosfato, o receptor adrenérgico alfa-1, o receptor de serotonina receptor e os GPCRs órfãos como GPR56.

Receptores tirosina quinases e a via de sinalização PLC/IP3/PKC/ERK

[00312] A via de sinalização PLC/IP3/PKC/ERK pode também ser

transativada por receptores tirosina quinases expressos na aorta. Esses incluem EGFR, VEGFR, FGFR e PDGFR. Para testar a hipótese de que um receptor tirosina quinase está sendo anormalmente ativado e que leva a elevações na via de sinalização PLC/IP3/PKC/ERK, foram tratados com um antagonista não específico de receptores tirosina quinases, nintedanibe (50 mg/kg/dia), mas verificou-se que ele também não tinha impacto sobre a sobrevida (Figura 12). Isso sugeriu que a ativação de receptores tirosina quinases não estava impulsionando a ativação via de sinalização PLC/IP3/PKC/ERK em camundongos SEDv.

Bloqueadores beta-adrenérgicos e o risco de ruptura aórtica

[00313] Outros propuseram⁵⁻⁸ que fenótipos de SEDv são resultantes de tecido cronicamente “fraco” e, portanto, propõe que diminuir a pressão arterial com bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos deve diminuir o risco de ruptura aórtica nesses pacientes. Para abordar essa hipótese, os camundongos com um antagonista β não específico, propranolol (80 mg/kg/dia), um antagonista β_1 específico, atenolol (120 mg/kg/dia) e um antagonista β_1 /agonista β_2 , celiprolol (200mg/kg/dia), mas verificou-se que nenhuma dessas manipulações levou a uma melhora na sobrevida em nossos modelos de camundongo SEDv (Figura 13A-13C) apesar diminuírem a pressão arterial. Celiprolol até mesmo acelerou o risco de dissecação aórtica no modelo de camundongos, e a mutação de SEDv com a mutação Col3a1^{G209S/+} também demonstrou risco aumentado de dissecação aórtica em uso de celiprolol (Figura 14). Considerando que isso não era comum a todos os antagonistas β , essa observação poderia ser conduzida por atividade agonista β_2 de celiprolol.

[00314] Bloqueadores dos canais de cálcio, que reduzem a pressão arterial por outro mecanismo, foram também testados. Verificou-se que anlodipina (12 mg/kg/dia) aumentou igualmente o risco de dissecação aórtica no modelo de camundongo, e isso demonstrou ser igualmente condizente com

camundongos MFS (síndrome de Marfan)⁹ (Figura 15).

Exemplo 9: Tratamento da síndrome de Marfan com inibidores da proteína quinase C-beta (PKC- β)

[00315] Em exemplos, diferentes inibidores de PKC- β são usados para o tratamento da síndrome de Marfan. Por exemplo, o tratamento da síndrome de Marfan pode incluir a administração de ruboxistaurina. Aqui, demonstra-se que a inibição farmacológica de PKC β com o uso de ruboxistaurina (10 mg/kg/dia) resgatou do crescimento de raízes aórticas em camundongos com síndrome de Marfan ($p=2E-4$, **Figura 19**). Em outros exemplos, o tratamento da síndrome de Marfan inclui a administração de enzastaurina ou sotrastaurina.

Terapia combinada de hidralazina e antiandrogênicos para o tratamento de SEDv

[00316] Combinações adicionais de hidralazina e diferentes antiandrogênicos são testadas. Por exemplo, contempla-se hidralazina e antagonistas do receptor de androgênios, incluindo antiandrogênicos esteroides (acetato de ciproterona, acetato de megestrol, acetato de clormadinona, oxendolona e acetato de osaterona). Além disso, contempla-se hidralazina em combinação com antiandrogênicos não esteroides como flutamida, nilutamida, topilutamida, enzalutamida, drospirenona ou medrogestona.

[00317] Em outros exemplos, contempla-se uma terapia combinada compreendendo hidralazina e inibidores da síntese de androgênios e antagonistas de androgênios. Inibidores exemplares da síntese de androgênios incluem cetoconazol, acetato de abiraterona, seviteronel, aminoglutetimida, finasterida, dutasterida, epristerida e alfatradiol. Antagonistas de androgênios exemplares incluem leuprorelina e cetorelix. Outros antiandrogênicos contemplados incluem etinilestradiol e dietilestilbestrol.

Exemplo 10: Inibição farmacológica aumenta a sobrevida em camundongos

SEDv.

Inibição farmacológica de PKC com enzastaurina aumenta a sobrevida em camundongos SEDv

[00318] Ambos os modelos de camundongos *Col3a1* G209S/+ e *Col3a1* G938D/+ recapitularam fenótipos de SEDv e são usados em testes de agentes para o tratamento de SEDv. Os camundongos são tratados com um agente bem tolerado administrado oralmente, enzastaurina aproximadamente 30 mg/kg/dia. Ao se ligar ao sítio de ligação de ATP, a enzastaurina inibe seletivamente a proteína quinase C beta (PKC- β) e, desse modo, sugere-se que um inibidor farmacológico de PKC resgatará do risco de morte por dissecação aórtica. Uma taxa de sobrevida de aproximadamente 100% é observada após cerca de 30 dias (1 mês) de tratamento, em comparação a uma taxa de sobrevida significativamente diminuída em camundongos sem tratamento (p. ex., uma diferença estatisticamente significativa em comparação aos camundongos controle).

[00319] Os camundongos foram igualmente tratados por pelo menos aproximadamente 45 dias e a taxa de sobrevida de camundongos tratados com enzastaurina, em relação a camundongos controle, foi avaliada.

[00320] Os camundongos foram igualmente tratados com doses maiores de enzastaurina, p. ex., aproximadamente 40 mg/kg/dia, 50 mg/kg/dia ou 100 mg/kg/dia . Em outros exemplos, os camundongos foram tratados uma vez ao dia ou duas vezes ao dia com enzastaurina.

[00321] Esses resultados sugerem que a inibição da sinalização excessiva de PLC/IP3/PKC/ERK com enzastaurina na aorta resgata do risco de morte por dissecação aórtica no modelo de SEDv em camundongo

Inibição farmacológica de PKC com sotrastaurina aumenta a sobrevida em camundongos SEDv

[00322] Estudos adicionais usando os modelos de camundongo aqui descritos (p. ex., modelos de camundongo *Col3a1* G209S/+ e *Col3a1*

G938D/+) são empregados em testes de agentes adicionais para o tratamento de SEDv. Camundongos tratados com um agente bem tolerado administrado oralmente, sotrastaurina em aproximadamente 30 mg/kg/dia, são avaliados. Sotrastaurina (AEB071) é um imunossupressor que bloqueia a ativação de linfócitos T através da inibição de proteína quinase C. Do mesmo modo que enzastaurina, sugere-se que um inibidor de PKC (p. ex., sotrastaurina) também resgatará do risco de morte por dissecação aórtica. Uma taxa de sobrevida de aproximadamente 100% é observada após cerca de 30 dias (1 mês) de tratamento, em comparação a uma taxa de sobrevida significativamente diminuída em camundongos sem tratamento (p. ex., uma diferença estatisticamente significativa em comparação aos camundongos controle). Os camundongos foram igualmente tratados por pelo menos aproximadamente 45 dias e a taxa de sobrevida de camundongos tratados com sotrastaurina, em relação a camundongos controle, é avaliada.

[00323] Os camundongos foram igualmente tratados com doses maiores de sotrastaurina, p. ex., aproximadamente 40 mg/kg/dia, 50 mg/kg/dia ou 100mg/kg/dia. Em outros exemplos, os camundongos foram tratados uma vez ao dia ou duas vezes ao dia com sotrastaurina.

[00324] Esses resultados fornecem evidência de que a inibição da sinalização excessiva de PLC/IP3/PKC/ERK com sotrastaurina na aorta resgata do risco de morte por dissecação aórtica no modelo de SEDv em camundongo

Referências

[00325] 1. Zaenglein AL. Acne Vulgaris. Solomon CG, ed. N Engl J Med. 2018;379(14):1343-1352.

[00326] 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.

[00327] 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.

[00328] 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.

[00329] 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.

[00330] 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.

[00331] 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).

[00332] 8. Shalhub S, Black JH, Cecchi AC, et al. Molecular diagnosis in vascular Ehlers-Danlos syndrome predicts pattern of arterial involvement and outcomes. J Vasc Surg.

[00333] 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.

Outras modalidades

[00334] Embora a invenção tenha sido descrita juntamente com a sua descrição detalhada, a descrição anterior destina-se a ilustrar e não limitar o âmbito da invenção, o qual é definido pelo âmbito das reivindicações anexadas. Outros aspectos, vantagens e modificações são abrangidos pelo âmbito das reivindicações a seguir.

[00335] A literatura de patentes e científica aqui mencionadas

estabelece o conhecido disponível para os técnicos no assunto. Todas as patentes dos Estados Unidos e pedidos de patentes dos Estados Unidos, publicados ou não, mencionados são aqui incorporados por referência. Todas as publicações de patentes e pedidos de patente estrangeira mencionados são aqui incorporados por referência. Apresentações submetidas do Genbank e NCBI, indicados pelo número de acesso citado, são aqui incorporadas por referência. Todas as outras referências publicadas, documentos, manuscritos e literatura científica citados são aqui incorporados por referência.

[00336] Embora esta invenção tenha sido particularmente mostrada e descrita com referências a modalidades preferidas da mesma, será entendido pelos técnicos no assunto que várias mudanças na forma e detalhes podem ser feitas na mesma sem que se desviem do âmbito da invenção abrangido pelas reivindicações anexadas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para o tratamento de uma vasculopatia em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

administrar uma quantidade eficaz de um agente, em que o agente diminui a atividade ou expressão de quinase regulada por sinal extracelular (ERK) ou proteína quinase C (PKC), tratando, assim, a vasculopatia.

2. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que a vasculopatia compreende síndrome de Ehlers-Danlos vascular (SEDv).

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente compreende um anticorpo ou fragmento do mesmo, um polipeptídeo, uma pequena molécula, uma molécula de ácido nucleico ou qualquer combinação dos mesmos.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o agente compreende uma pequena molécula.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente compreende cobimetinibe ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

6. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o agente compreende ruboxistaurina ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma.

7. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o agente compreende enzastaurina ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma.

8. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o agente compreende sotrastaurina ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo

fato de que compreende ainda administrar um agente que diminui a atividade ou expressão de fosfolipase C (PLC) ou inositol trifosfato (IP3).

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz do agente é entre aproximadamente 0,001 mg/kg e 250 mg/kg de peso corporal.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o indivíduo compreende um nível da proteína ou do mRNA de ERK ou PKC que é diferente de um controle normal.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o indivíduo compreende um nível da proteína ou do mRNA de ERK ou PKC que é pelo menos aproximadamente 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 vezes, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, ou 5 vezes maior em comparação a um controle normal.

13. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o indivíduo compreende um nível de atividade de ERK ou PKC que é pelo menos aproximadamente 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 vezes, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, ou 5 vezes maior em comparação a um controle normal.

14. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o nível está em uma amostra de teste obtida do indivíduo.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a amostra de teste compreende sangue, soro, plasma, saliva, lágrimas, humor vítreo, líquido cefalorraquidiano, suor, líquido cefalorraquidiano ou urina.

16. Método para o tratamento de um transtorno do tecido conjuntivo em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

administrar uma quantidade eficaz de um agente, em que o agente diminui a atividade ou expressão de quinase regulada por sinal extracelular (ERK) ou proteína quinase C (PKC), tratando, assim, o transtorno do tecido conjuntivo.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o transtorno do tecido conjuntivo é selecionado a partir do grupo que consiste em uma vasculopatia, síndrome de Marfan, síndrome de Loeys Dietz e aneurisma aórtico torácico familiar.

18. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a vasculopatia compreende síndrome de Ehlers-Danlos vascular (SEDv).

19. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o agente compreende um anticorpo ou fragmento do mesmo, um polipeptídeo, uma pequena molécula, uma molécula de ácido nucleico ou qualquer combinação dos mesmos.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o agente compreende uma pequena molécula.

21. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o agente compreende cobimetinibe ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

22. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o agente compreende enzastaurina ou um sal farmacologicamente aceitável da mesma.

23. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o agente compreende sotrastaurina ou um sal farmacologicamente aceitável da mesma.

24. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o agente compreende ruboxistaurina ou um sal farmacologicamente aceitável da mesma.

25. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que compreende ainda administrar um agente que diminui a atividade ou expressão de fosfolipase C (PLC) ou inositol trifosfato (IP3).

26. Composição farmacêutica para o tratamento de uma vasculopatia, caracterizada pelo fato de que a composição compreende uma quantidade eficaz um agente, em que o agente diminui a atividade ou expressão de quinase regulada por sinal extracelular (ERK) ou proteína quinase C (PKC), tratando, assim, a vasculopatia.

27. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de que o agente compreende um anticorpo ou fragmento do mesmo, um polipeptídeo, uma pequena molécula, uma molécula de ácido nucleico ou qualquer combinação dos mesmos.

28. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende 1) uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 26 ou 27, e 2) instruções por escrito para o tratamento da vasculopatia.

29. Método para o tratamento de um transtorno do tecido conjuntivo, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

administrar uma quantidade eficaz de um agente, em que o agente compreende um anticorpo ou fragmento do mesmo, um polipeptídeo, uma pequena molécula, uma molécula de ácido nucleico ou qualquer combinação dos mesmos, tratando, assim, o transtorno do tecido conjuntivo.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o transtorno do tecido conjuntivo compreende síndrome de Marfan.

31. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o agente diminui a atividade ou expressão de proteína quinase C (PKC).

32. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o agente diminui o nível da proteína ou do mRNA de PKC

em pelo menos aproximadamente 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 vezes, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes ou 5 vezes em comparação a um controle normal.

33. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o agente diminui o nível de atividade de PKC em pelo menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100%, 5-50%, 5 vezes, em comparação a um controle normal.

34. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o agente compreende enzastaurina ou um sal farmacologicamente aceitável da mesma.

35. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o agente compreende sotrastaurina ou um sal farmacologicamente aceitável da mesma.

36. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o agente compreende ruboxistaurina ou um sal farmacologicamente aceitável da mesma.

Figura 1A

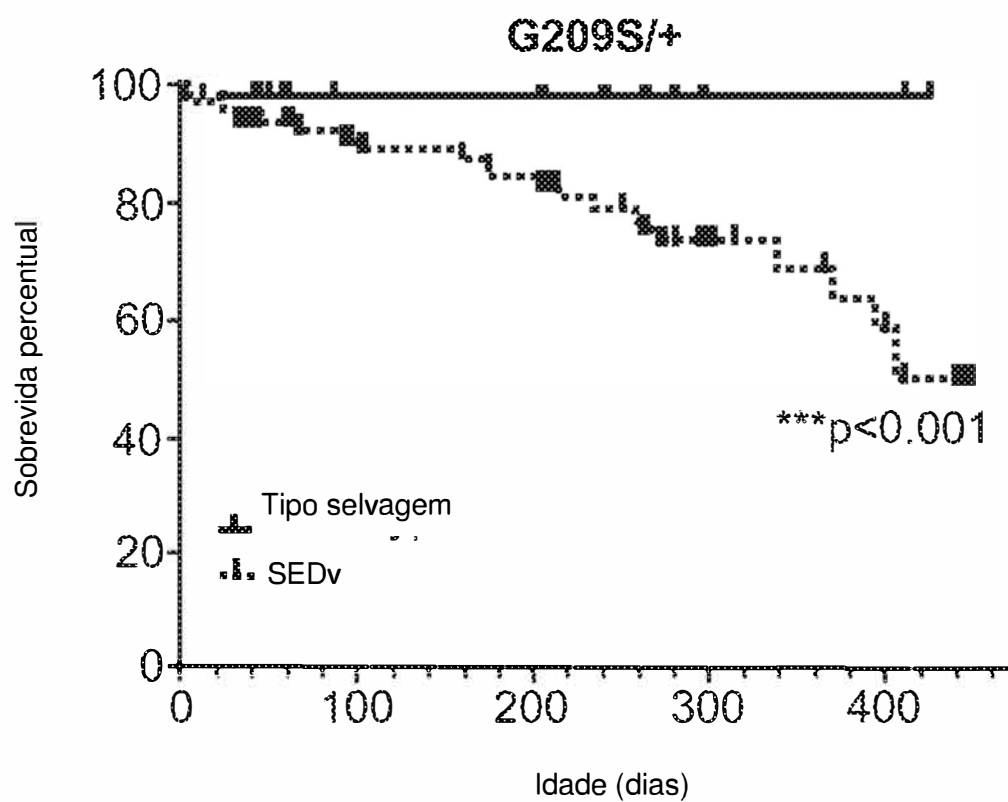


FIG. 1B

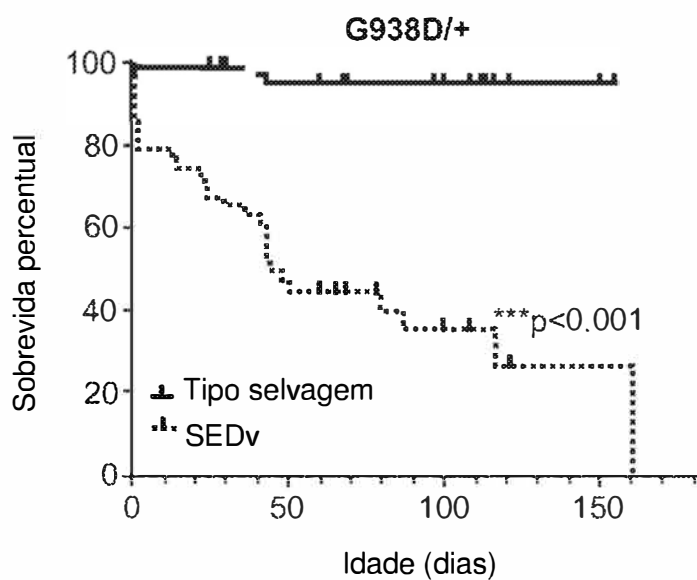


FIG. 1C

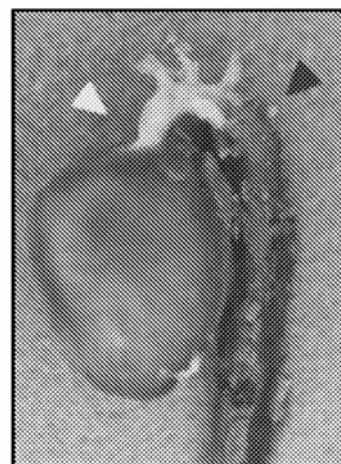


Figura 1D

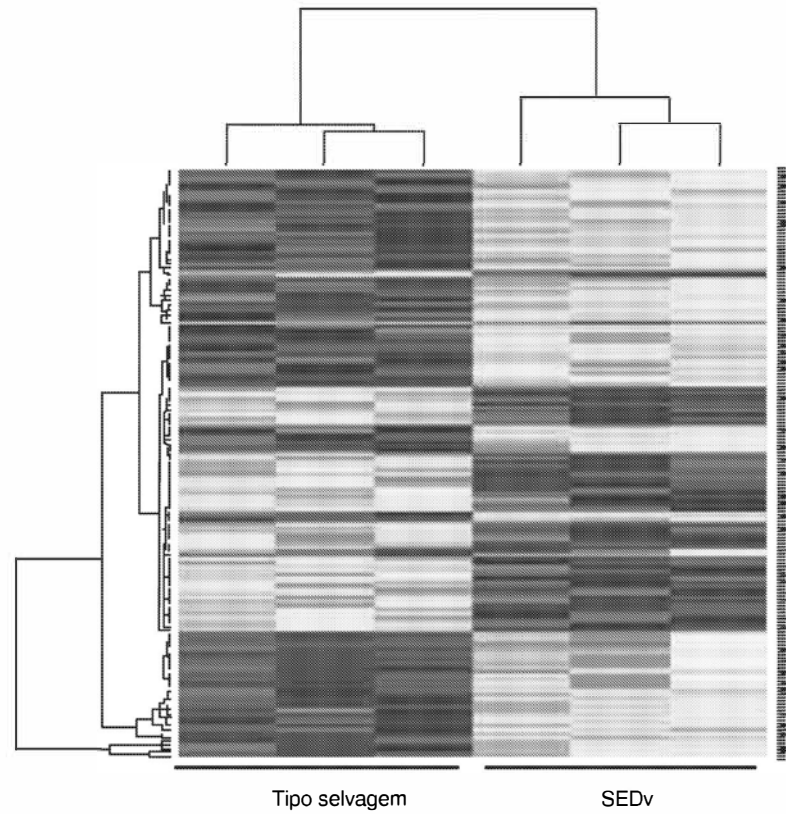


Figura 1E

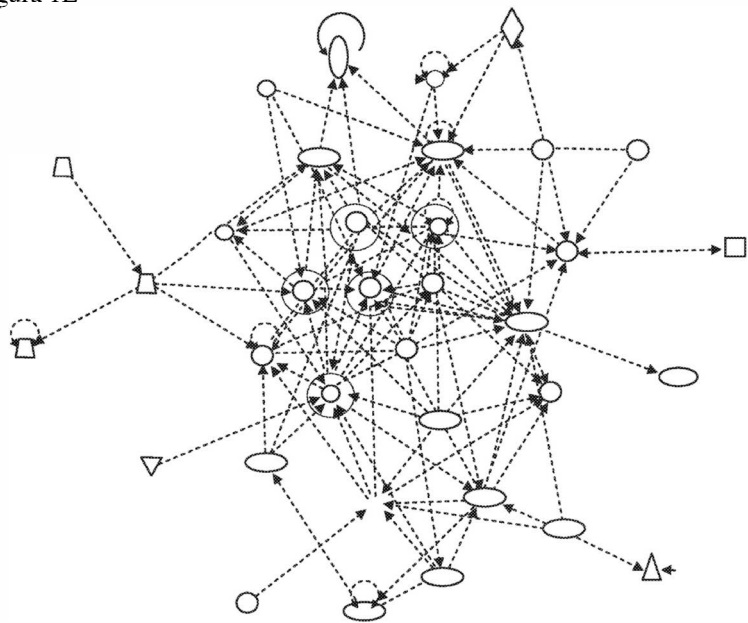


FIG. 1F

Regulador a montante	Descrição	Valor p de sobreposição
APOE	Transportador	3.47E-12
NFATC3	Regulador da transcrição ativado por Ca ²⁺	8.70E-11
F2R	GPCR	8.70E-08
ELK3	Regulador da transcrição ativado por ERK	5.41E-08
Mt2	GPCR	1.45E-07
Mt1	GPCR	1.79E-07
LIPE	Enzima	3.09E-07
ELK4	Regulador da transcrição ati- vado por ERK	4.71E-07
AFP	Transportador	4.71E-07
ERK1/2	Grupo	5.92E-07

Figura 1G

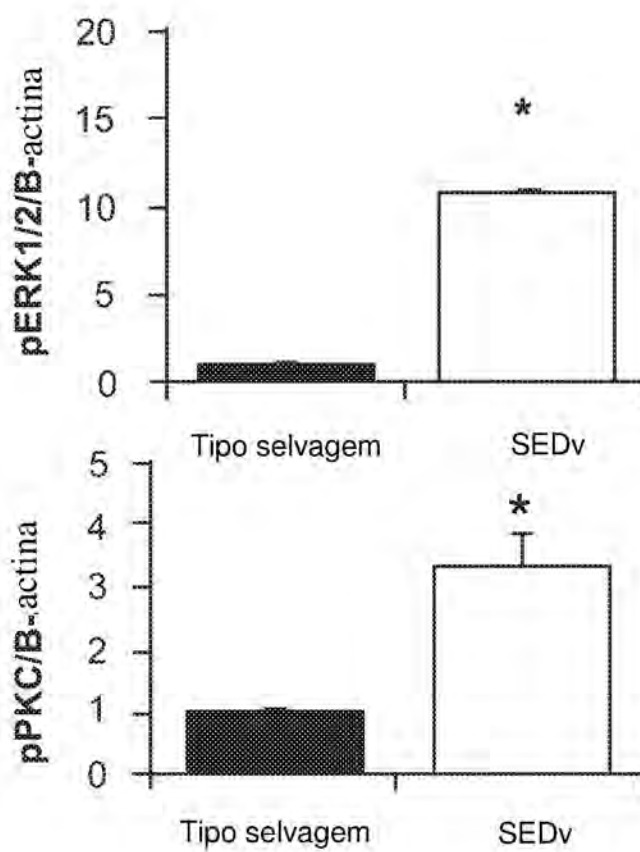
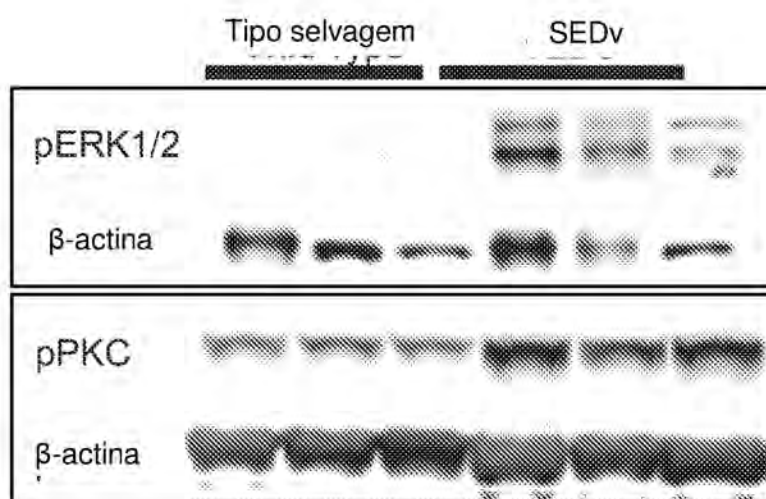


Figura 2A

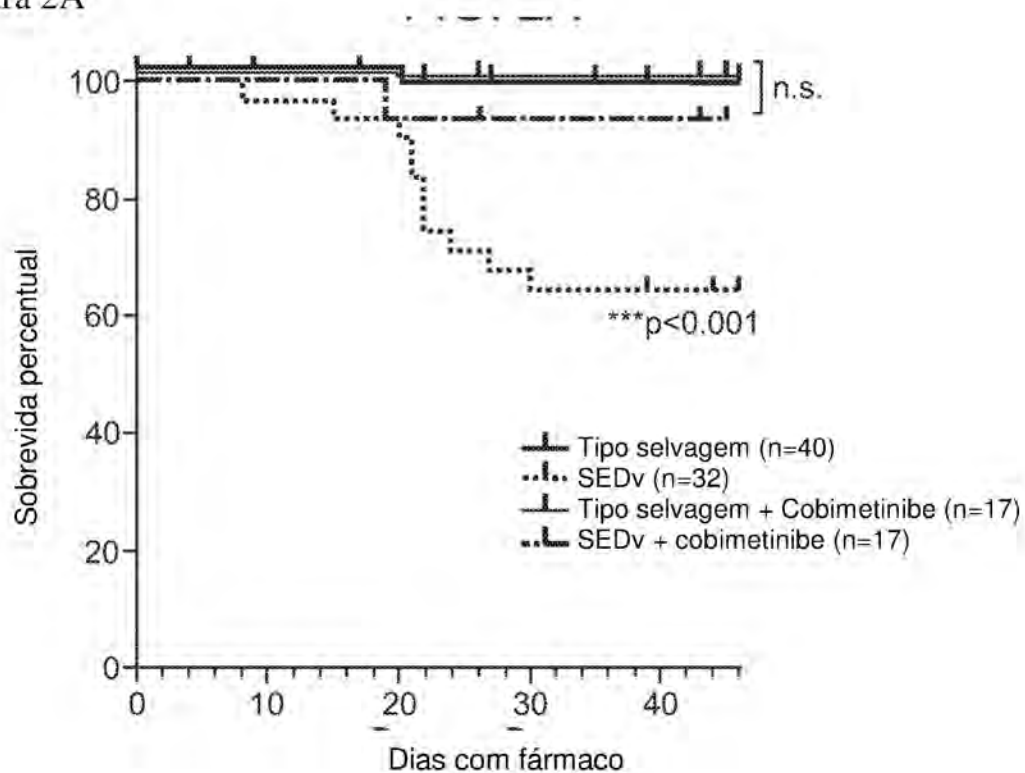


FIG. 2B

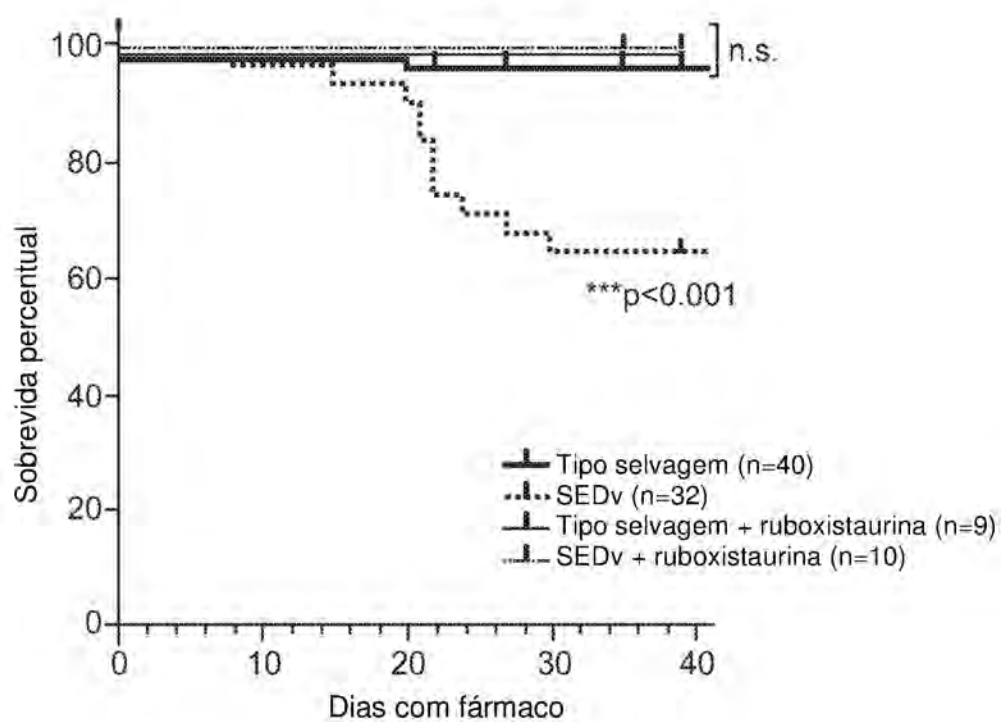


Figura 2C

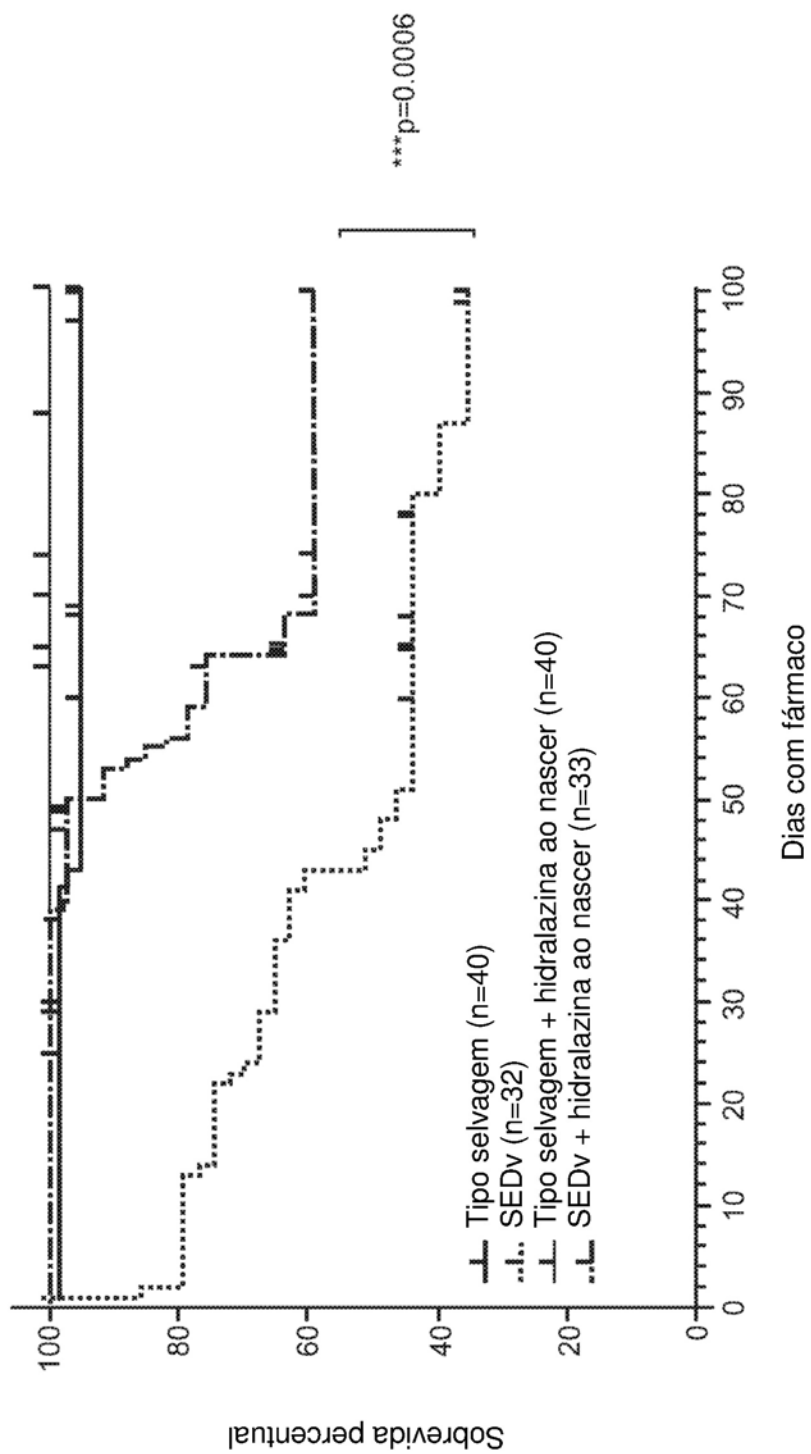


FIG. 3A

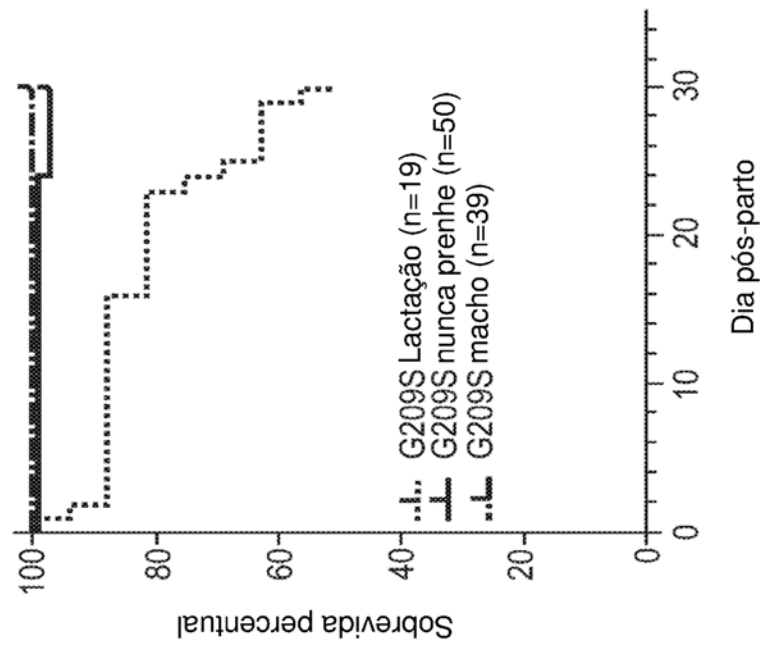


FIG. 3B

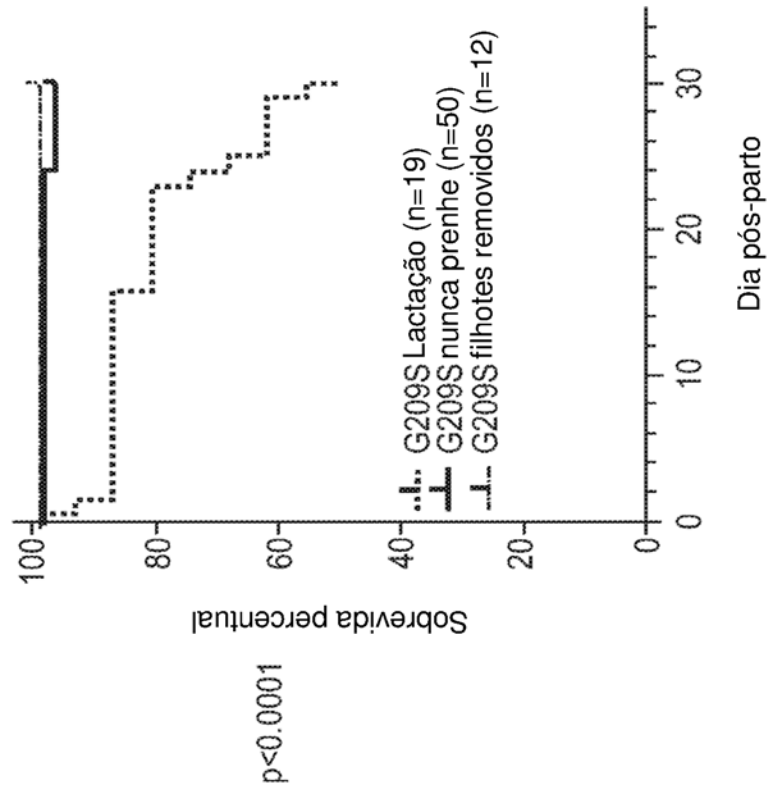


FIG. 3C

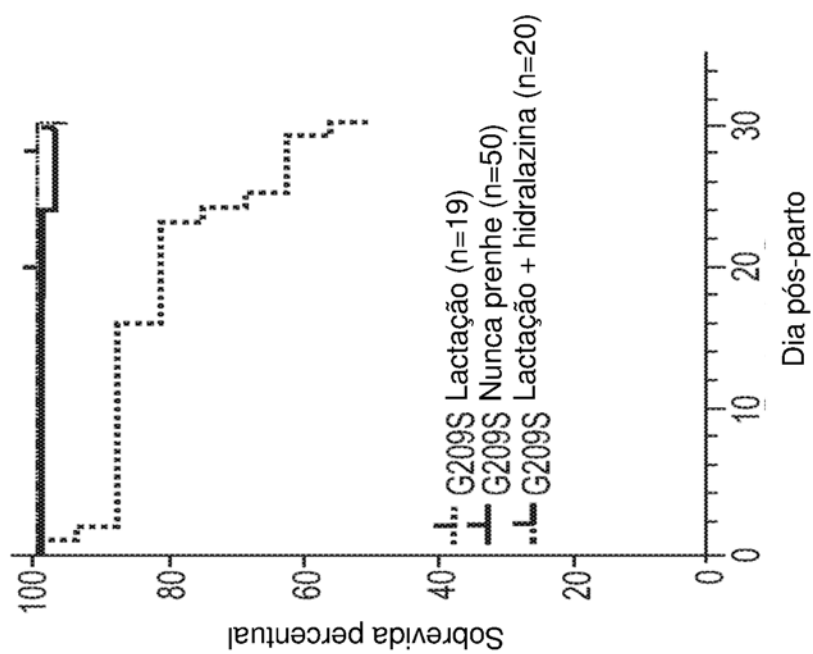


FIG. 3D

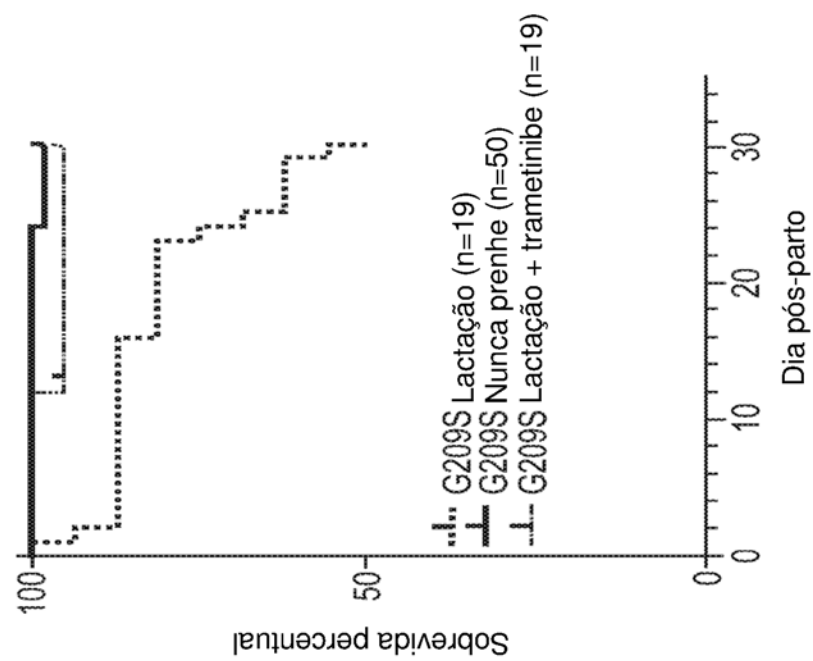


FIG. 3E

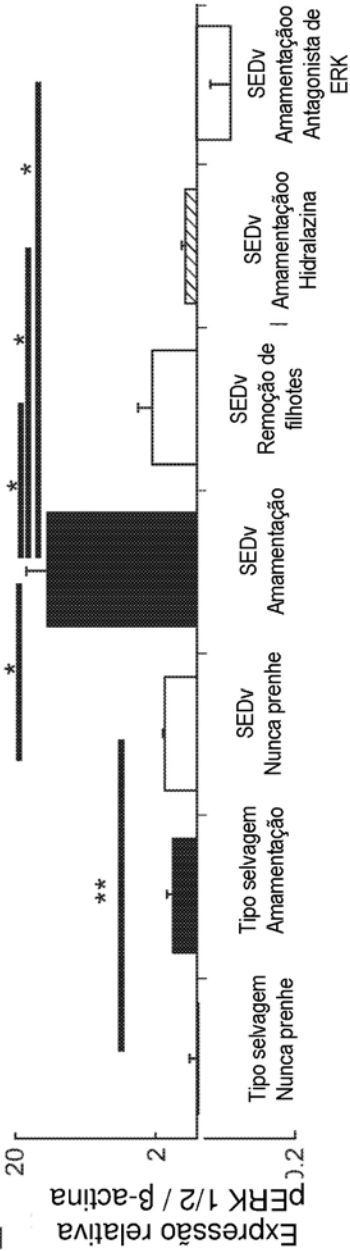


FIG. 3F

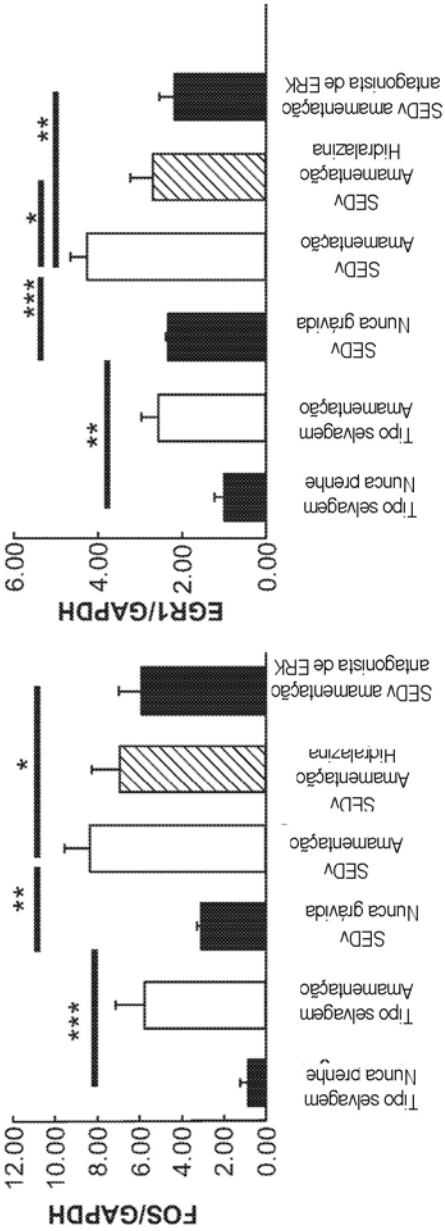


Figura 4A

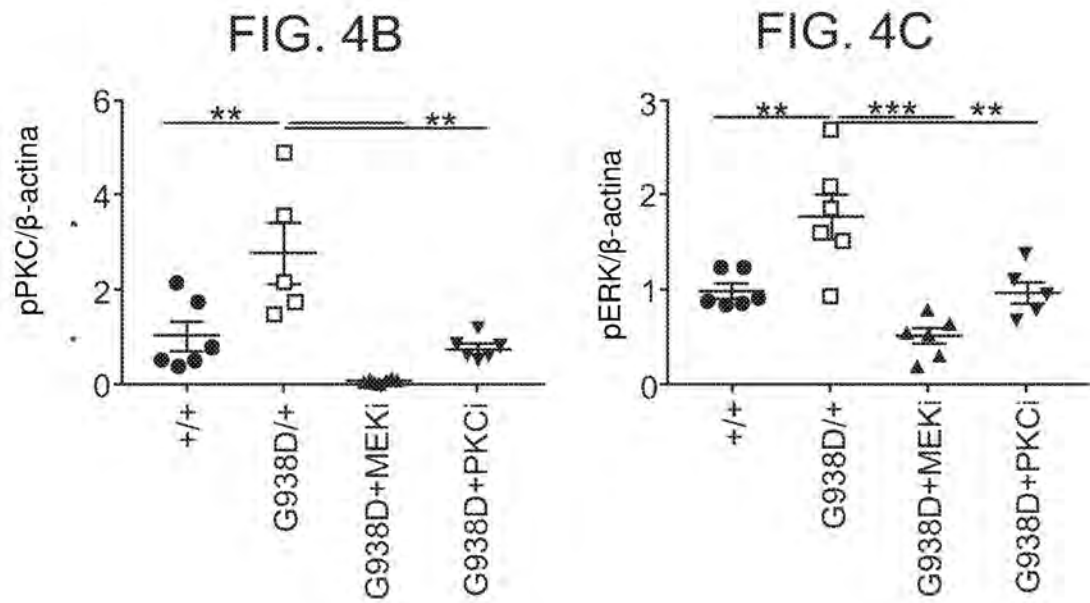
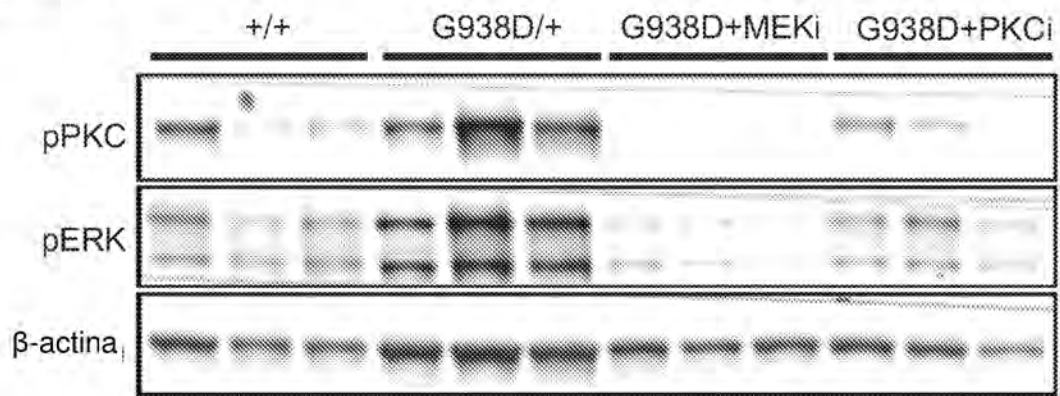


Figura 5A

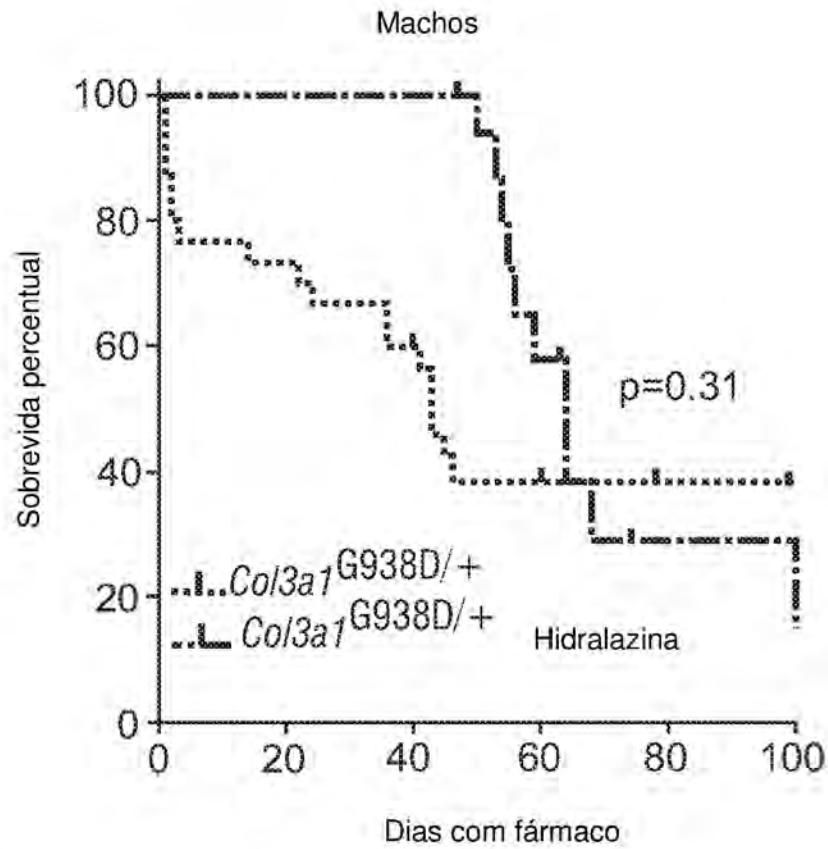


Figura 5B

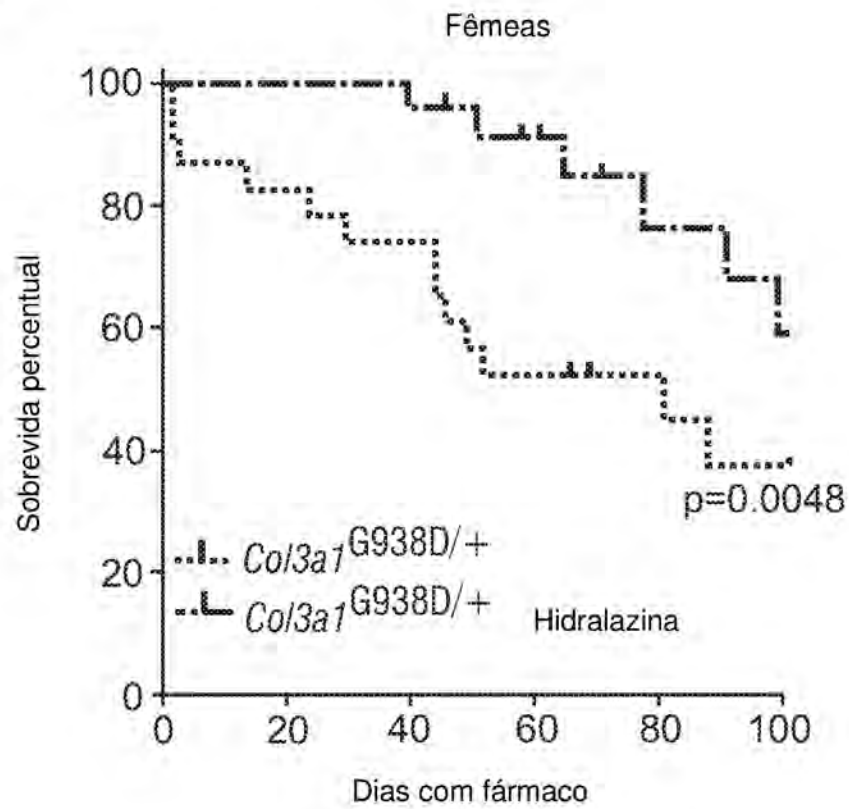


Figura 6

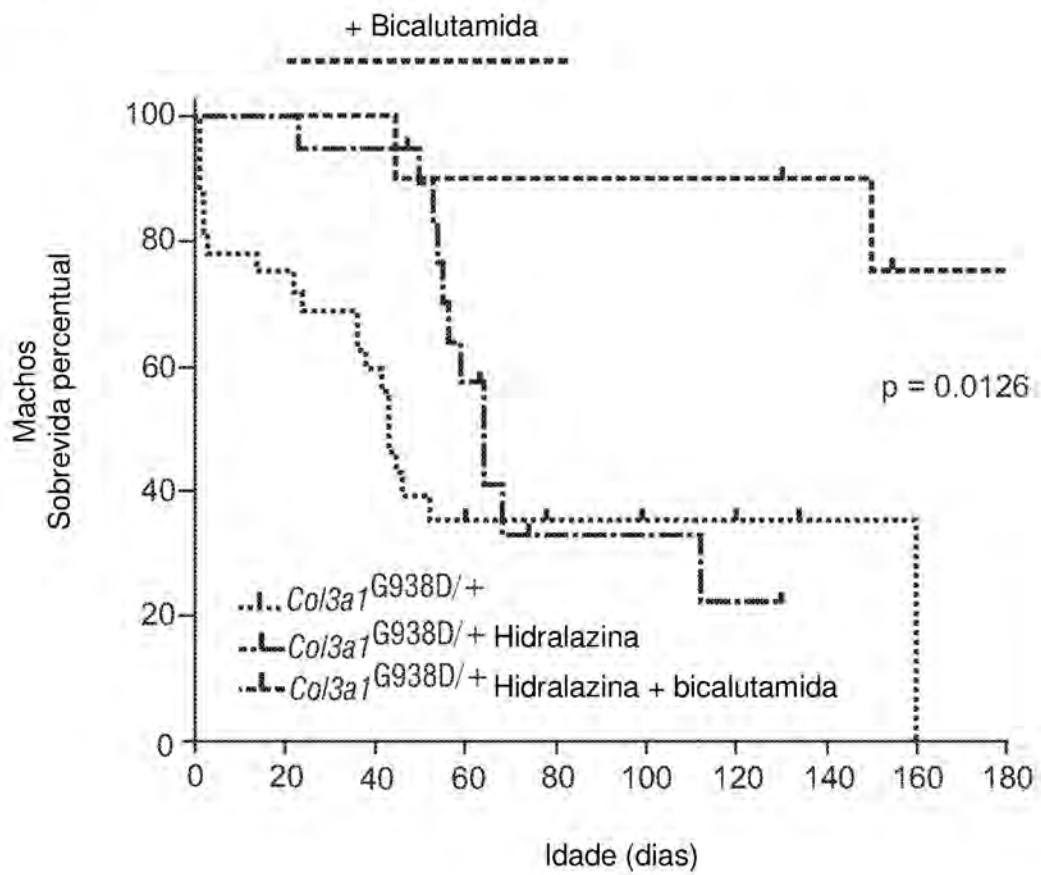


Figura 7

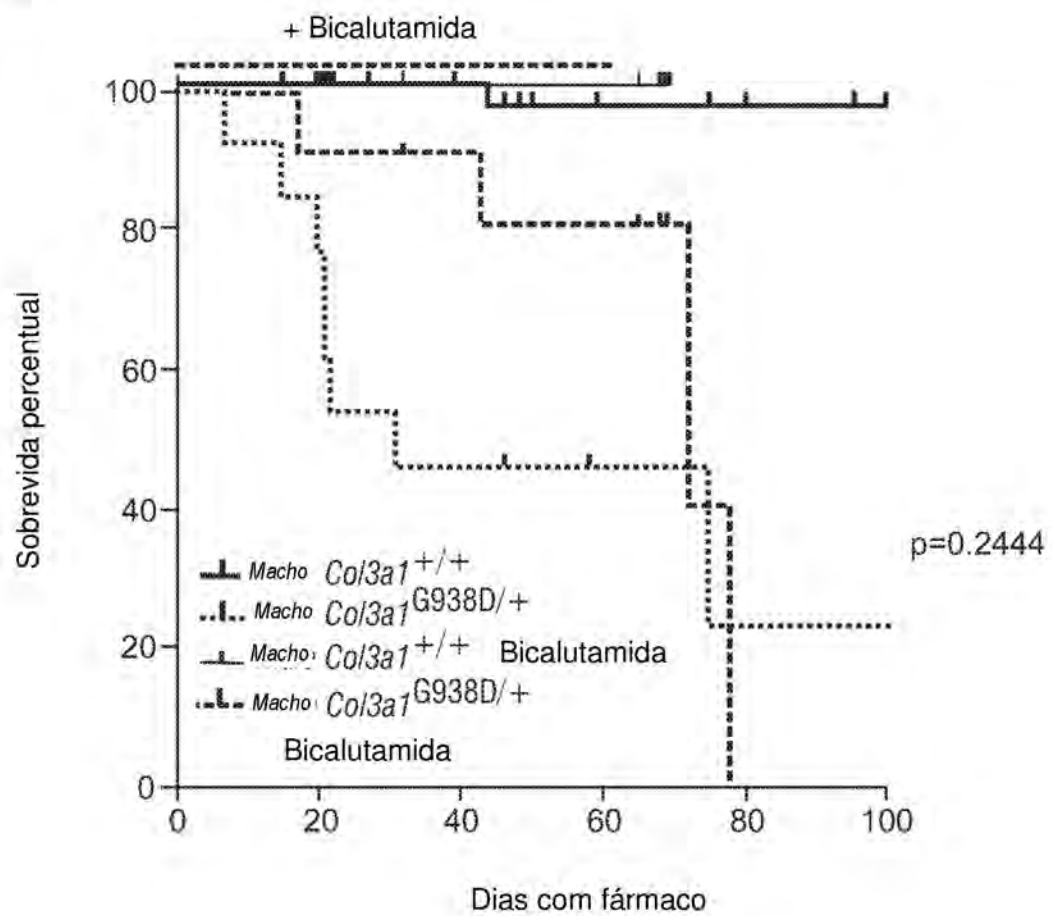


Figura 8A

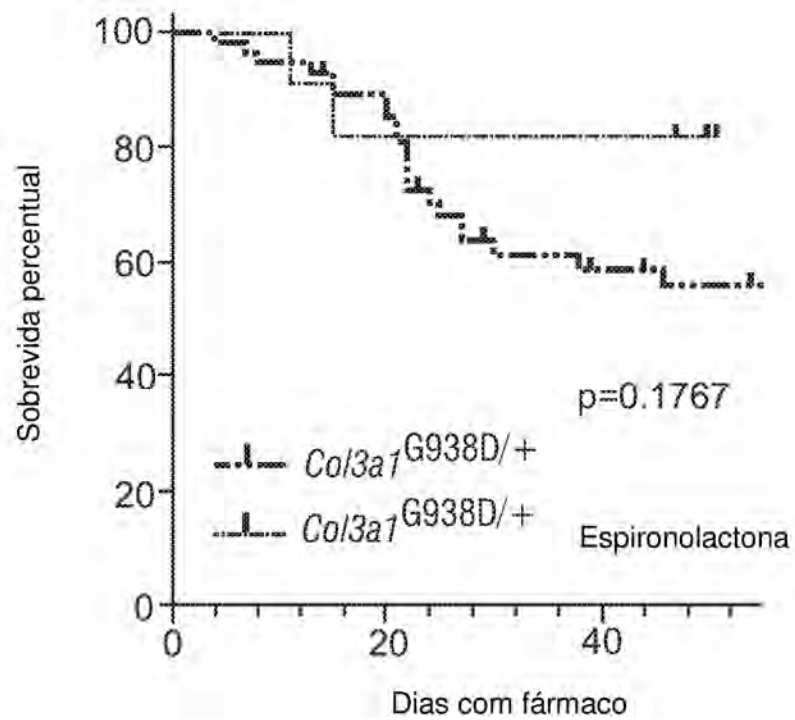


Figura 8B

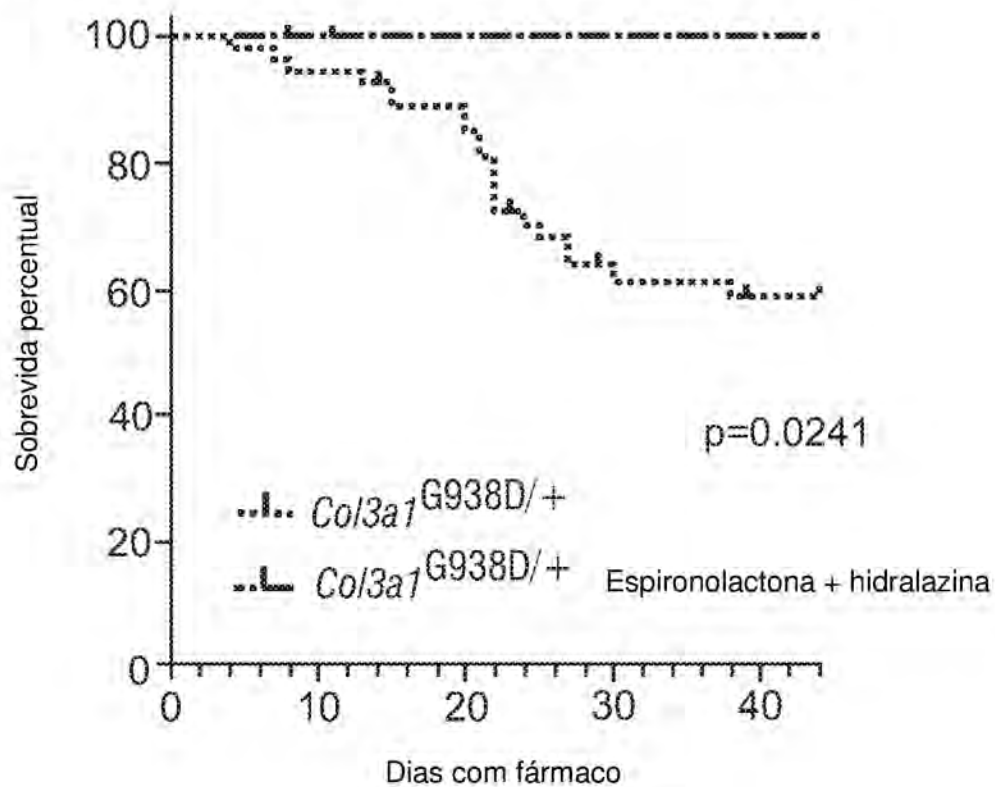


Figura 9

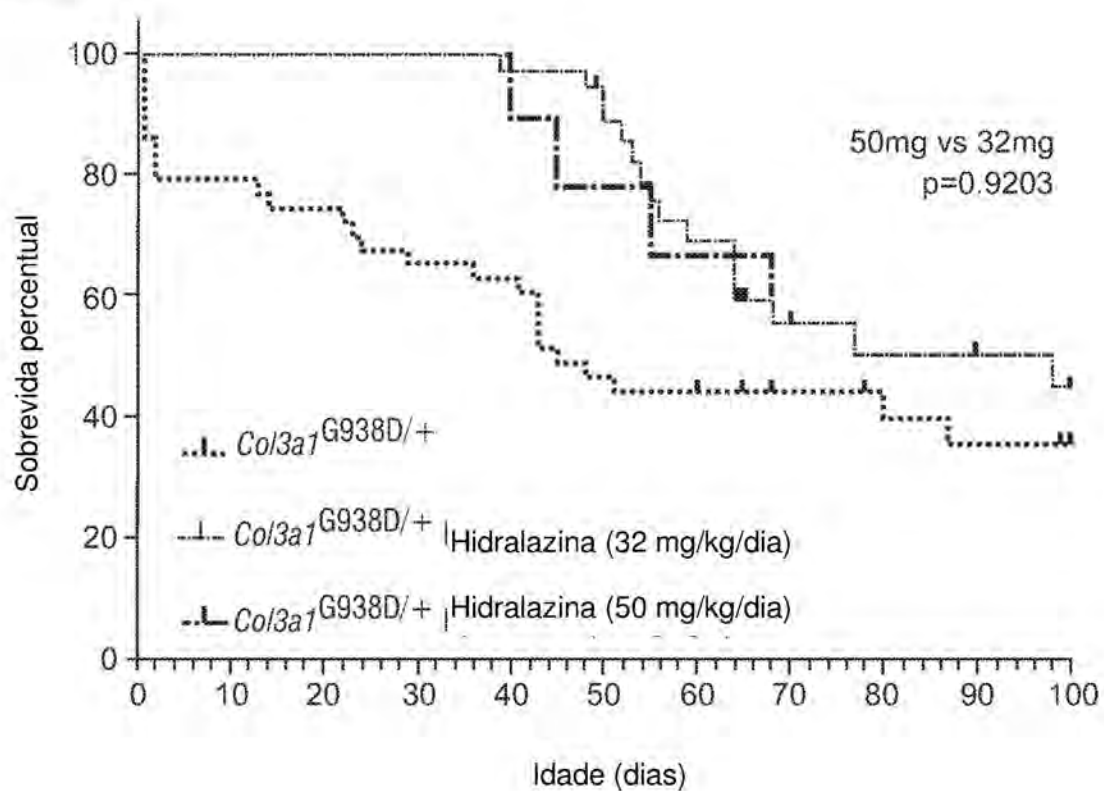


Figura 10A

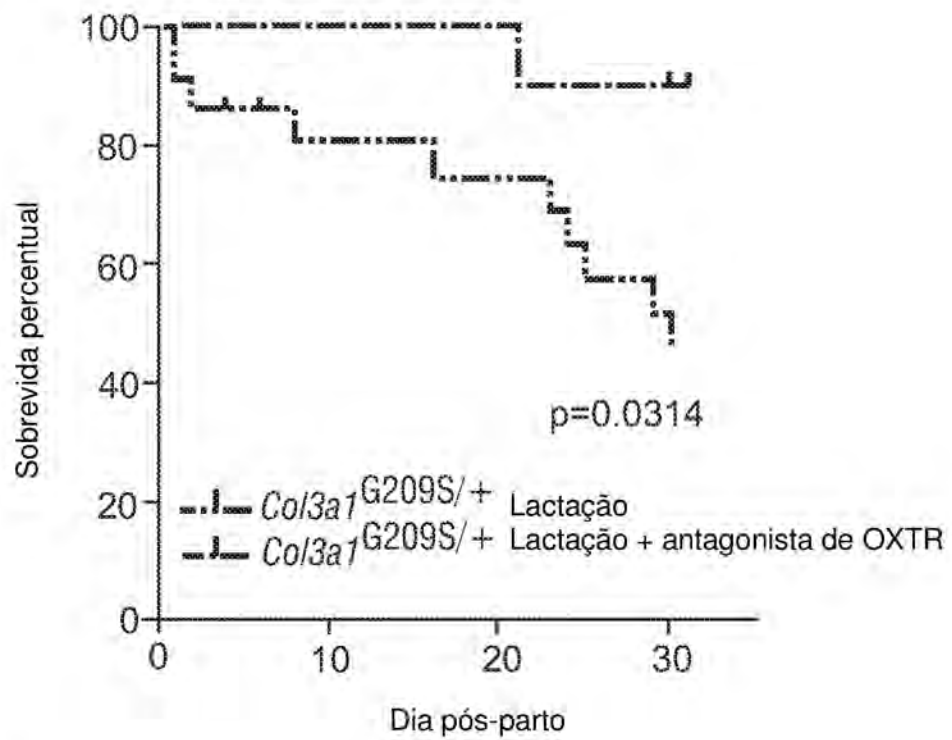


Figura 10B

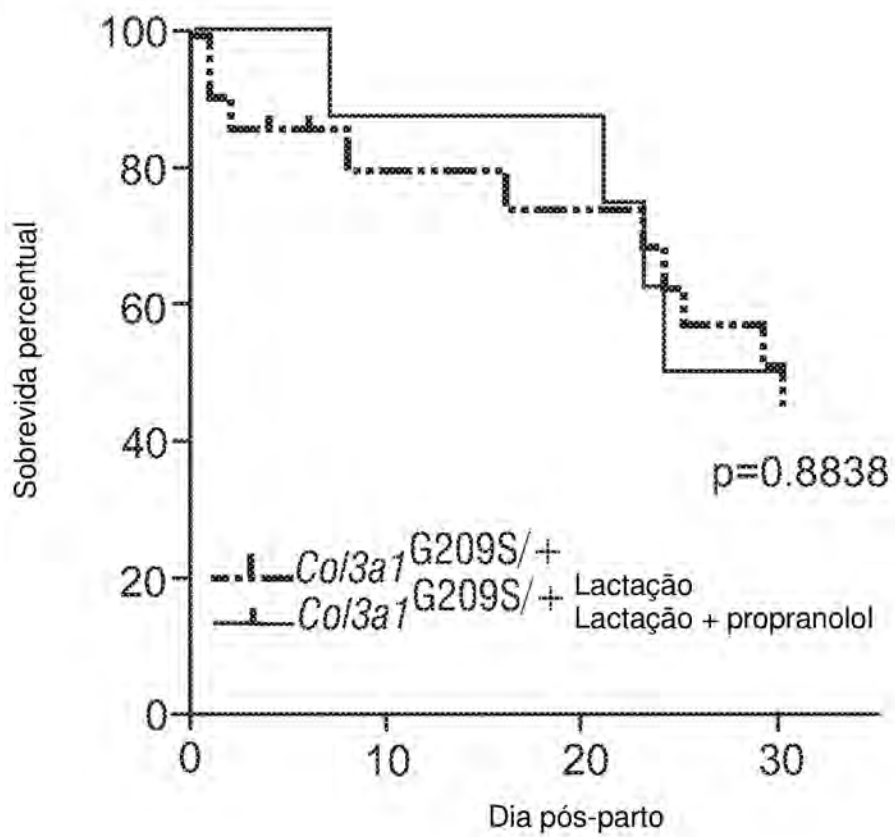


Figura 11A

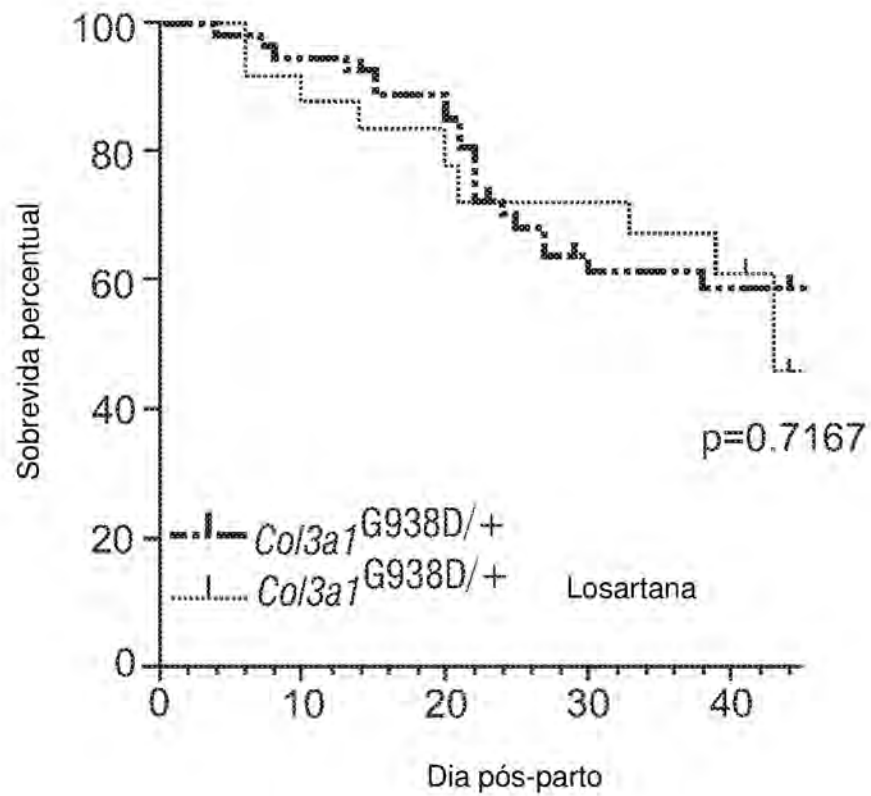


Figura 11B

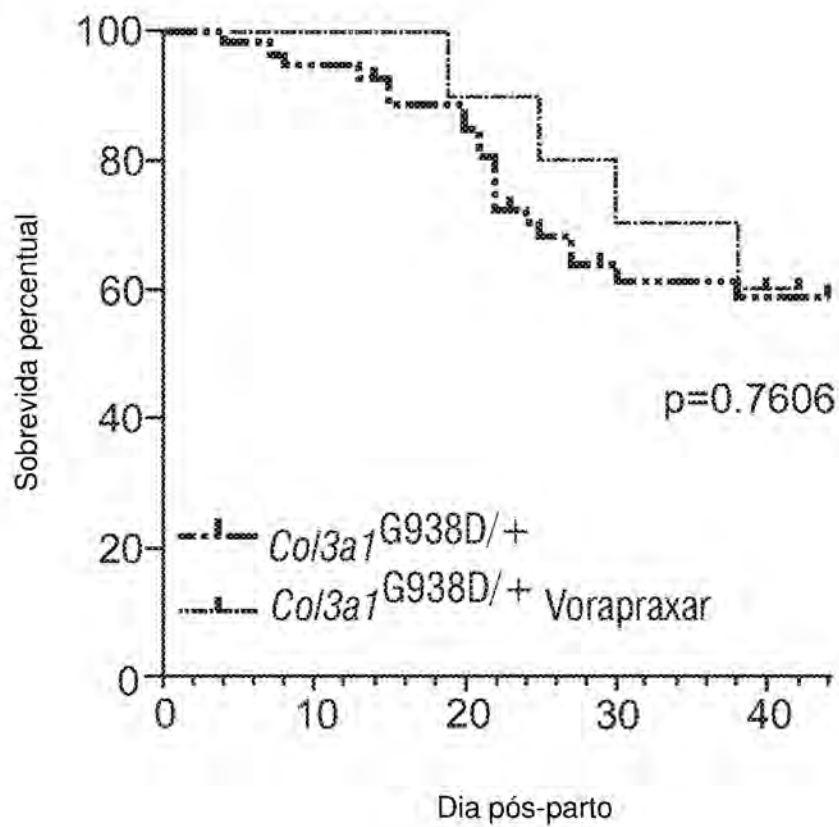
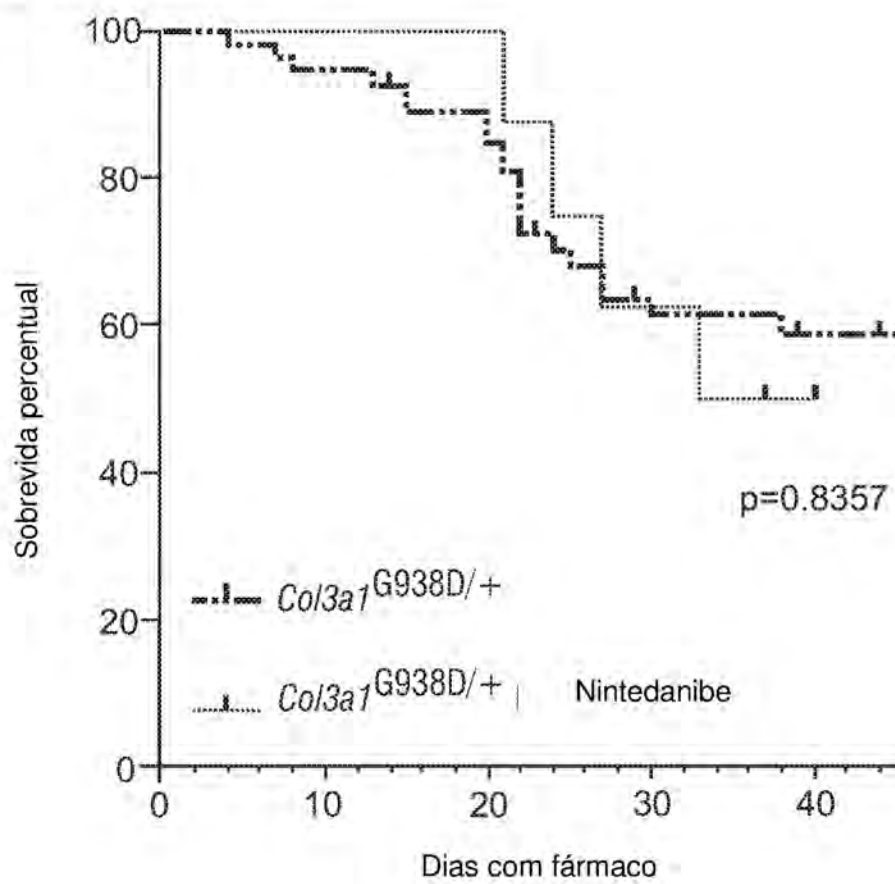


Figura 12



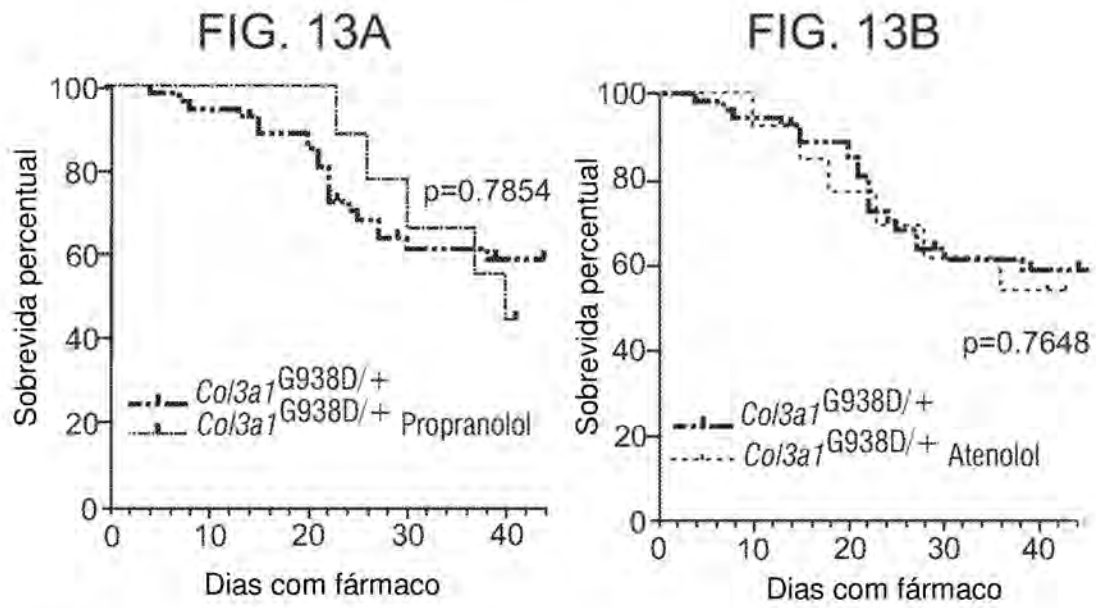


Figura 13C

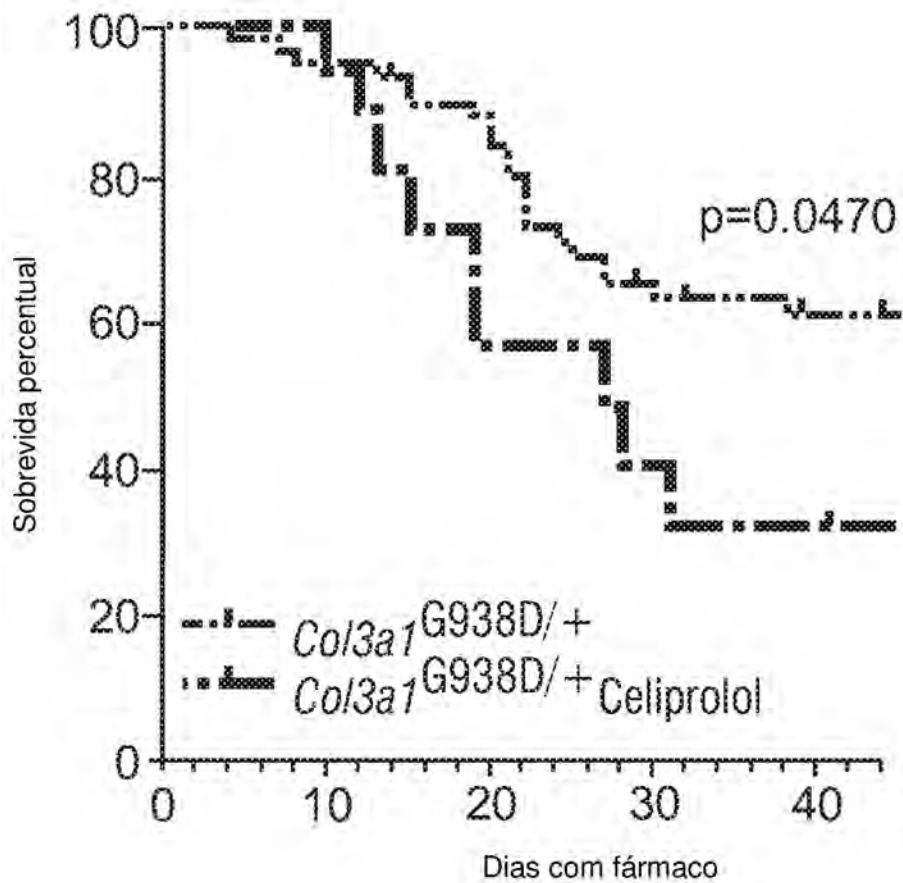


FIG. 14

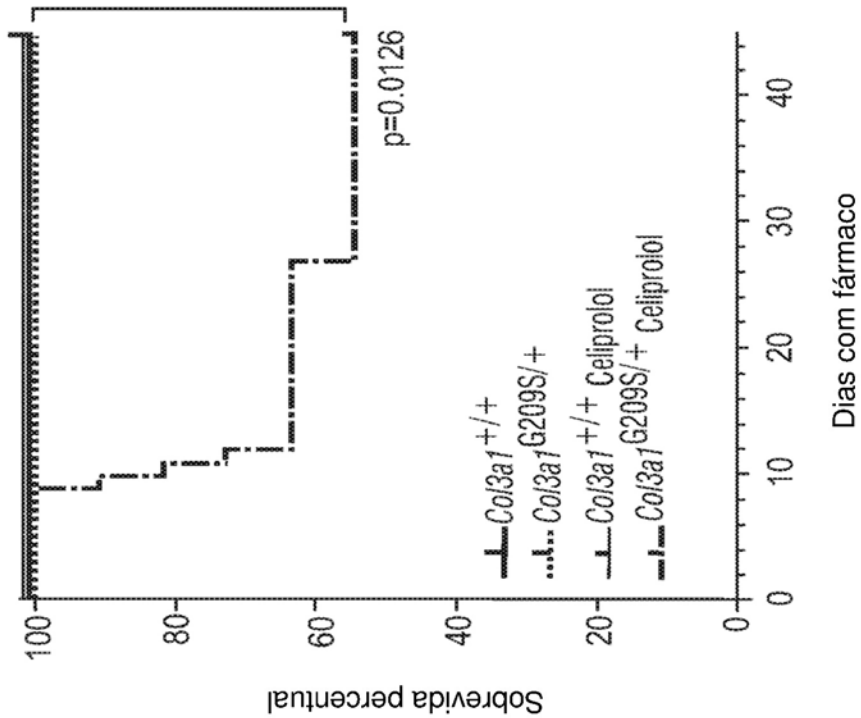


FIG. 15

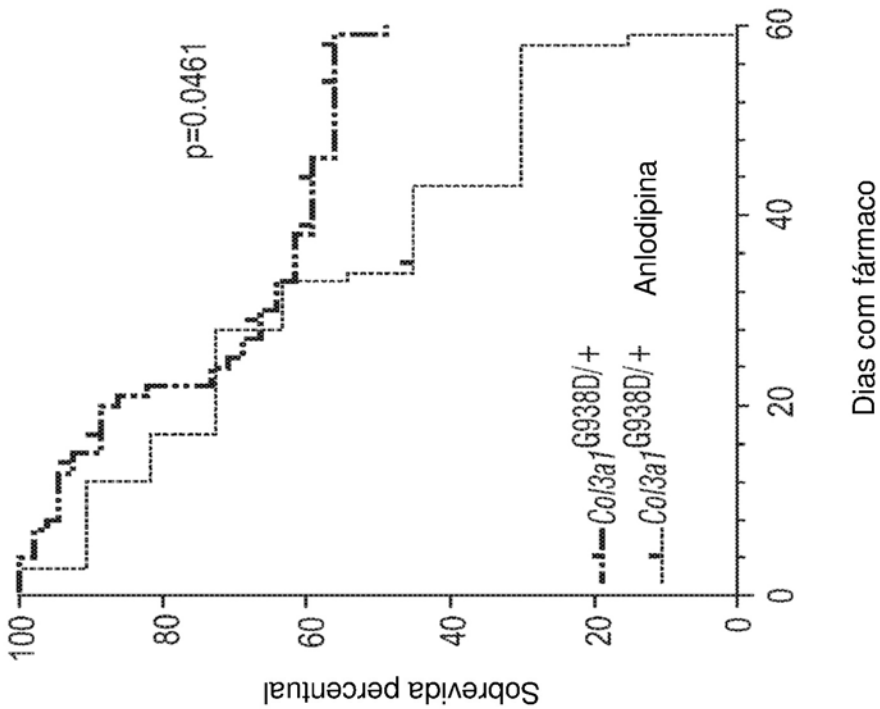


FIG. 16B

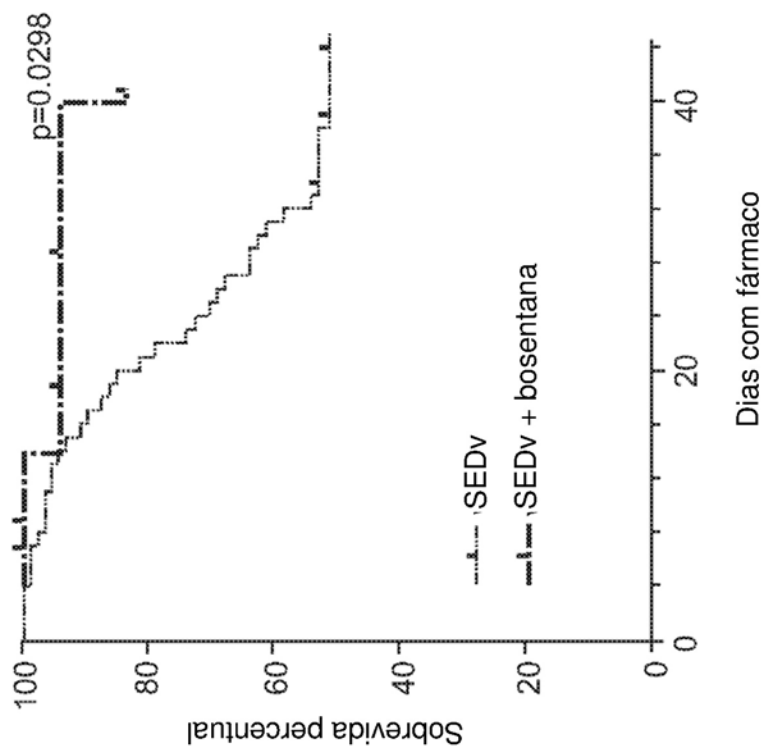


FIG. 16A

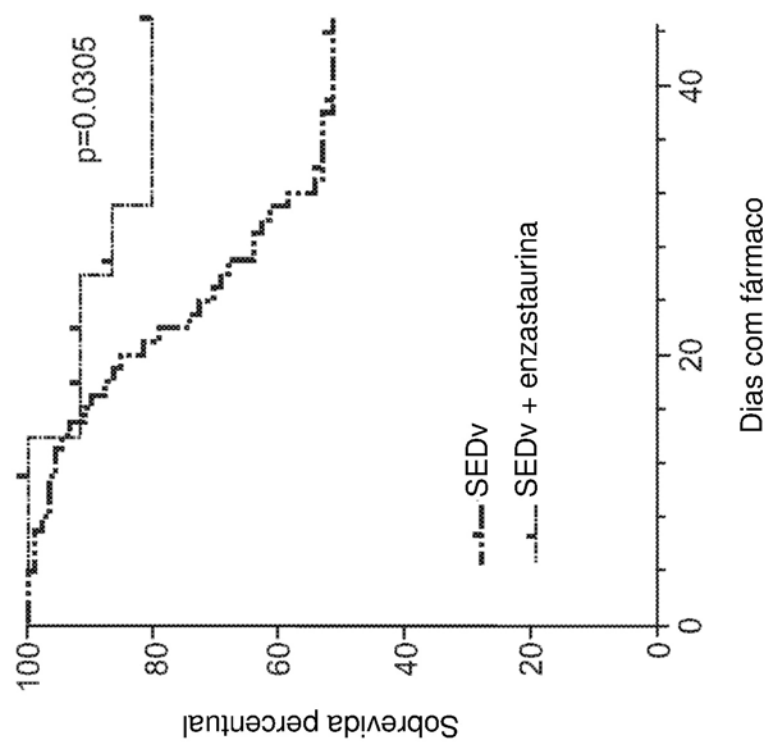


Figura 17

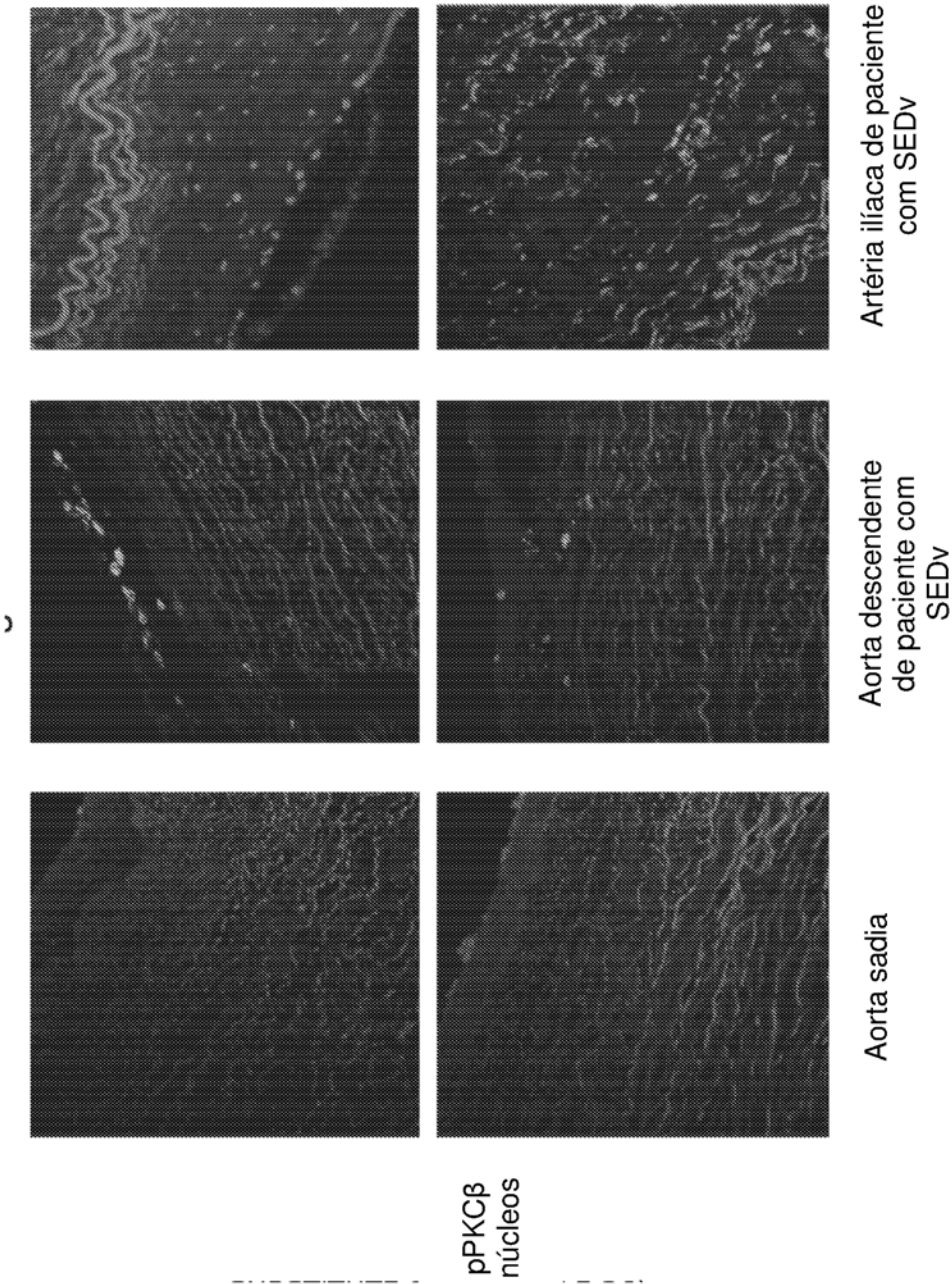


Figura 18

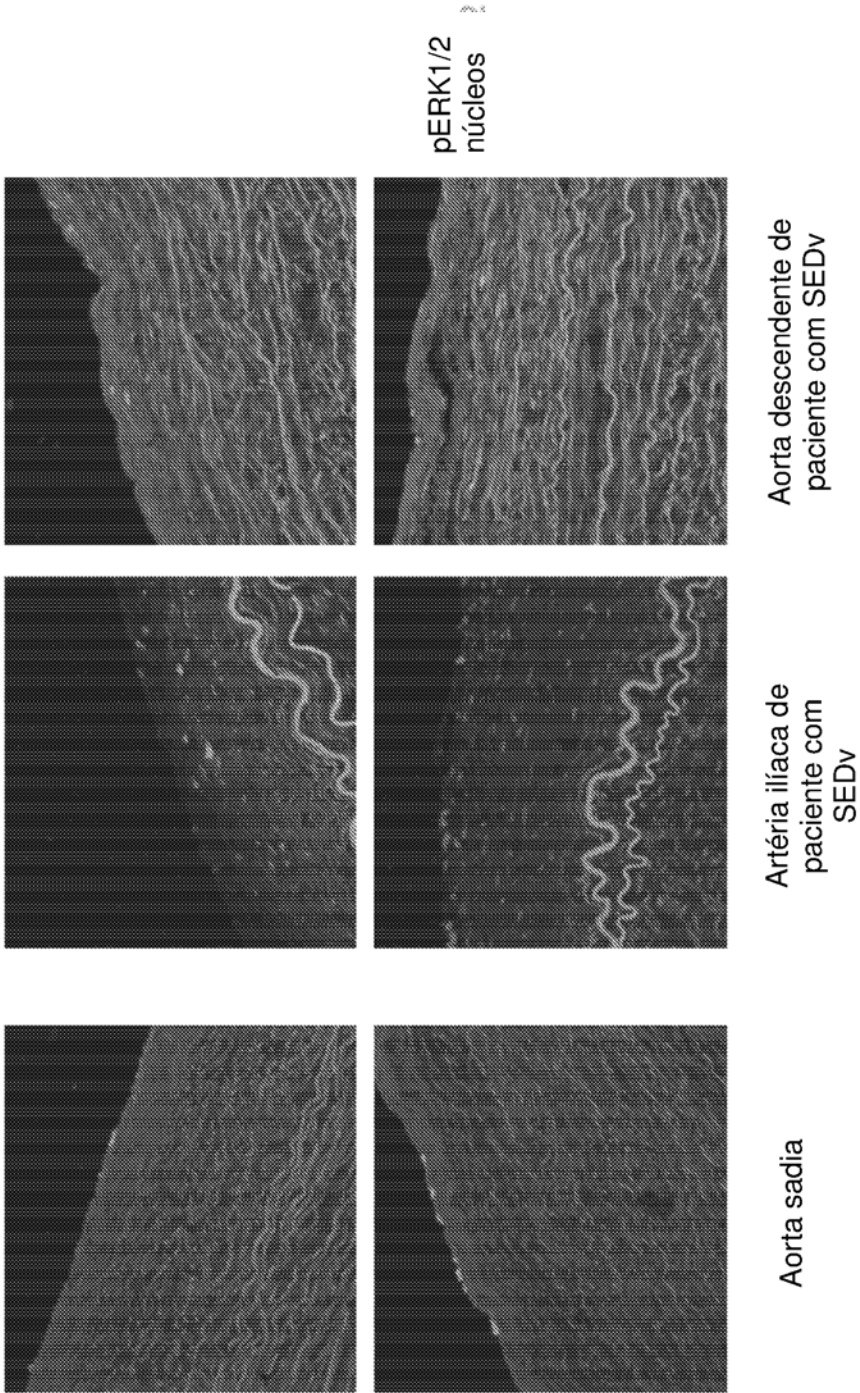
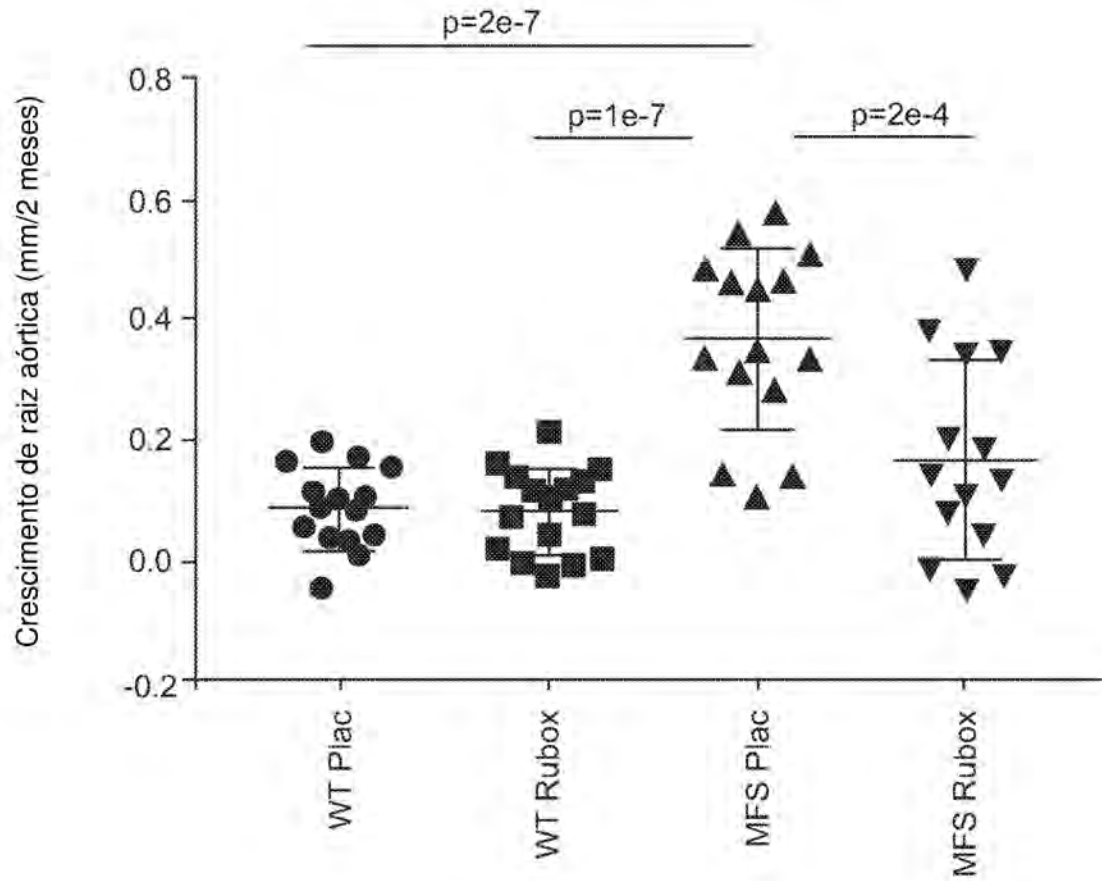


Figura 19

Tratamento com ruboxistaurina reduz o crescimento de raízes aórticas em camundongos 129 MFS



RESUMO

MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE UMA VASCULOPATIA EM UM INDIVÍDUO E PARA O TRATAMENTO DE UM TRANSTORNO DO TECIDO CONJUNTIVO EM UM INDIVÍDUO, KIT, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE UMA VASCULOPATIA

A presente invenção refere-se a composições e métodos para o tratamento da síndrome de Ehlers Danlos vascular e transtornos associados do tecido conjuntivo.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LIST SEQ P143387.txt
- Data de Geração do Código: 16/04/2021
- Hora de Geração do Código: 09:24:54
- Código de Controle:
 - Campo 1: D16AD80134AEB54C
 - Campo 2: 31BE3A9D7D5711D7