

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0708527-3 A2**

(22) Data de Depósito: 02/03/2007
(43) Data da Publicação: 31/05/2011
(RPI 2108)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 48/00 2006.01

(54) Título: **TRATAMENTO DA TENDINOPATIA POR INIBIÇÃO DE MOLÉCULAS QUE CONTRIBUEM PARA A FORMAÇÃO DE CARTILAGEM**

(30) Prioridade Unionista: 03/03/2006 US 60/779,165

(73) Titular(es): Wyeth

(72) Inventor(es): Joanne M. Archambault, Scott Jelinsky

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007063177 de 02/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO WO2007/103787de
13/09/2007

(57) Resumo: TRATAMENTO DA TENDINOPATIA POR INIBIÇÃO DE MOLÉCULAS QUE CONTRIBUEM PARA A FORMAÇÃO DE CARTILAGEM. A presente invenção refere-se a métodos para tratar a tendinopatia. Os distúrbios tratados ou prevenidos incluem, por exemplo, tendinite, tendinose, paratendinite, tenossinovite, lesão por uso excessivo e trauma do tendão, peritendinite, e paratenonite, ou outros distúrbios degenerativos do tendão. Os métodos terapêuticos descritos incluem administrar para um paciente um inibidor de moléculas envolvidas na formação de cartilagem ou fibrocartilagem em tendão tendinopático, em uma quantidade eficaz para tratar ou prevenir um distúrbio degenerativo do tendão, deterioração lenta do tendão, restaurar a estrutura sadia do tendão, estimular a regeneração do tendão e 1 ou manter a massa do tendão e/ou a qualidade.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "TRATAMENTO DA TENDINOPATIA POR INIBIÇÃO DE MOLÉCULAS QUE CONTRIBUEM PARA A FORMAÇÃO DE CARTILAGEM".

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

5 PEDIDOS DE PATENTE ANTERIORES

Este pedido de patente reivindica a prioridade para o Pedido de Patente Provisória Série Nº 60/779.165, depositada em 3 de março de 2006, cujos conteúdos estão aqui a seguir incorporados por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

10 O campo técnico da invenção refere-se ao tratamento de tendinopatia pela redução da produção de cartilagem e / ou tecido de fibrocartilagem em tendões lesionados. A invenção adicionalmente refere-se à inibição de moléculas envolvidas na produção de cartilagem e/ou fibrocartilagem em tendões lesionados.

15 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Tendinopatia é um termo geral usado para descrever vários tipos de distúrbios do tendão. O termo "tendinite" — que significa "inflamação do tendão" — é muitas vezes usado para descrever problemas de tendão, porém a inflamação raramente é a causa de dor do tendão. Mais comumente, a dor do tendão é realmente um sintoma de uma série de microrrompimentos no tecido conjuntivo, em ou ao redor do tendão, mais apropriadamente chamado tendinose. Outros distúrbios do tendão incluem dor no tendão devido à degeneração do colágeno com desorientação da fibra, aumento da substância básica mucóide no tendão, calcificação, superutilização do tendão, vascularização, envelhecimento, e fricção do tendão contra uma protuberância do corpo. A tendinopatia é usada por um número cada vez maior de especialistas em tendão para descrever coletivamente essas condições, em geral caracterizadas como tendinite, tendinose, paratendinite, tenossinovite, paratenonite, lesões por superutilização e trauma do tendão. Khan et al., Sports Med 27:393-408 (1999).

O tecido do tendão normal é composto de tecido conjuntivo acondicionado densamente com feixes regularmente dispostos de fibras de

colágeno correndo na mesma direção em feixes de fibras primários, secundários e terciários que têm alta resistência à tensão. Dispersos entre essas fibras estão os tenócitos planos, recobertos que sintetizam a matriz extracelular viscosa (ECM) rica em colágeno do tipo I. Os feixes de colágeno tipo I provêm a flexibilidade e o apoio estrutural do tendão. Em tendões saudáveis, existe um equilíbrio dinâmico entre síntese e degradação do ECM. Entretanto, a tendinopatia afeta adversamente esse equilíbrio e resulta em reorganização estrutural e desorganização das fibras de colágeno. A desorganização dos feixes de colágeno dá para o tendão a aparência de cartilagem. Fibroblastos, miofibroblastos, neovascularização e acumulação patológica de glicosaminoglicanos (GAGs) no ECM são claramente notados no tecido tendinopático. Tallon et al., *Med Sci Sports Exerc* 33(12): 1983-90 (2001); Khan et al., *Sports Med* 27(6) :393-408 (1999). Mudanças metabólicas e morfológicas de um tendão danificado resultam em dor e susceptibilidade à rompimentos e rupturas.

Atualmente, acredita-se que a degradação e remodelagem de um ECM de tendão danificado sejam causadas pela liberação de metaloproteínases das células do tecido conjuntivo residente, e das células inflamatórias invasoras que são capazes de degradar as macromoléculas da matriz tais como agregano, decorino, e biglicano. Essas metaloproteínases incluem MMPs (Metaloproteínases da Matriz), ADAMs (uma Disintegrina e Metaloproteínase), e ADAMTs (uma Disintegrina e Metaloproteínase com Motivos de Trombospondina, tais como agreganase). Riley G., *Expert Rev Mol Med* 7(5)-A -23 (2005); Rees et al., *Biochem J* 350: 180-188 (2000). Entretanto, experimentos clínicos de inibidores de largo espectro de MMPs não foram bem-sucedidos no tratamento da osteoartrite, que tem similaridades patológicas com a tendinopatia. Clark et al., *Expert Opin Ther Targets* 7(1):19-34 (2003). Dessa maneira, não é provável que a inibição de metaloproteínases seja eficaz para tratar a tendinopatia. Na realidade, em tendões altamente tensionados, tais como tendões de aquiles e supra-espinhais, um nível mínimo de atividade de metaloproteínase pode ser necessário para prover para o tendão um nível ideal de ECM. Riley G., *Expert Rev Mol Mec* 7(5):1-23

(2005).

Presentemente, existem vários tratamentos não-operatórios e operatórios padrão da tendinopatia. As medidas não-operatórias incluem repouso, crioterapia, mudança de atividade, fisioterapia, fármacos antiinflamatórios não-esteroidais (NSAIDs), e corticosteróides. Repouso e mudança de atividade podem ajudar os pacientes portadores de algumas dessas condições, mas ainda resta uma população clínica significativa que não é tratável com essas terapias. A despeito do uso muito difundido, medicações anti-inflamatórias orais têm demonstrado, em estudos controlados, não serem úteis e podem ter efeitos colaterais indesejáveis. Alguns estudos ainda sugerem que a medicação não-esteroidal pode realmente ter um efeito adverso sobre o processo de cura, devido aliviarem a dor eles permitem que o paciente ceda ignore os sintomas da tendinopatia.

Os corticosteróides são normalmente usados para reduzir a inflamação nos tecidos, mas o uso de tais fármacos para tratar a tendinopatia não é recomendado, particularmente porque os corticosteróides inibem a síntese do colágeno. Diversos estudos observaram uma melhoria a curto prazo em pacientes tratados com cortisona, mas estudos que acompanharam pacientes durante mais de um ano revelaram uma taxa alta recorrência dos sintomas, e uma taxa de eficiência equivocada. As injeções de cortisona também acarretam o risco de ruptura infecção, despigmentação da pele e atrofia subdérmica do tendão. Em pacientes diabéticos, a injeção pode causar hiperglicemia.

Medidas cirúrgicas para reparar o tendão incluem desbridamento e reparo dos tendões danificados. Entretanto, cirurgia aberta ou artroscópica tem muitas complicações em potencial tais como infecção profunda, lesão das estruturas neurovasculares e formação de cicatrizes. A cirurgia é também dispendiosa e acarreta riscos adicionais associados com anestesia regional ou geral.

Dessa maneira, ainda existe uma necessidade de protocolos para tratamento de lesões relacionadas ao tendão superior aos tratamentos existentes. Lesões ou outros danos para tecidos de tendão flexíveis são lentos

para curar, e pode durar meses ou até anos para reparar completamente. Lesões relacionadas ao tendão têm um impacto significativo na sociedade. Lesões por superutilização respondem por quase 7 por cento de todas as visitas aos consultórios médicos relacionadas a lesões, nos Estados Unidos.

- 5 Woodwell et al., Adv Data 346:1-44 (2004). Com base nas informações do Ministério do Trabalho dos Estados Unidos, Departamento de Estatísticas do Trabalho (U.S. Department of Labor, Bureau of Labor Statistics), tais lesões equivalem a perdas significativas de tempo de trabalho (vide <http://www.bls.gov/lif>).

10 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta invenção provê uma abordagem nova para o tratamento da tendinopatia. Ao realizar um perfil transcricional de tendões de rato superutilizados, foi agora descoberto que os níveis de expressão de genes específicos de cartilagem, tais como agrecano, versicano, Col2a1 (colágeno tipo II),
15 e Sox9 estão aumentados nos tendões lesionados. Esse resultados sugerem que o tecido do tendão lesionado é convertido em fibrocartilagem como resultado do uso excessivo. Ao contrário do tendão, que é composto de colágeno do tipo I principalmente, a fibrocartilagem contém colágeno tipo II e grandes proteoglicanos, tais como agrecano e versicano. A formação de cartilagem e
20 fibrocartilagem dentro de um tendão é prejudicial para o reparo do tendão porque o tecido da cartilagem rompe as fibras de colágeno tipo I do tendão compactamente acondicionadas. Esse rompimento reduz a resistência à tração do tendão e a elasticidade.

Desta maneira, a invenção provê métodos de tratar a tendinopatia em um paciente reduzindo a formação de proteoglicanos específicos de
25 cartilagem no tecido do tendão do paciente. A invenção também provê o uso de compostos que reduzem a formação de proteoclicanos específicos de cartilagem para a fabricação de medicamentos para tratar a tendinopatia.

Em algumas modalidades, os métodos e usos incluem reduzir a
30 atividade de uma enzima envolvida na síntese de agrecano e/ou versicano no tecido do tendão do paciente. Em modalidades particulares, os métodos e usos incluem reduzir a atividade do sulfato de condroitina N-

acetilgalactosaminiltransferase 1 (CS-GalNAcT-1) e/ou o polipeptídeo de galactosamina N- acetilgalactosaminiltransferase 1 (GalNT-1) no tecido do tendão do paciente. Em outras modalidades, os métodos e usos incluem reduzir a atividade de uma ou mais outras enzimas envolvidas na síntese de proteoglicano da cartilagem, incluindo, mas não limitado a, UDP-D-xilose:proteína de núcleo β -D-xilosiltransferase, Gal transferases, GlcA transferases, GlcNAc transferases, sulfotransferases, sintase de sulfato de condroitina, e sulfotransferases de sulfato de heparano.

A atividade das enzimas e de outras proteínas envolvidas na produção de proteínas estruturais da cartilagem pode ser reduzida por direta ou indiretamente inibir a função da enzima ou de outra proteína, ou pode ser reduzida através da inibição da expressão das próprias enzimas ou de outras proteínas.

A invenção também provê métodos de tratar a tendinopatia em um paciente reduzindo a expressão de proteínas estruturais específicas da cartilagem no tecido do tendão do paciente. A invenção ainda provê usos de compostos que reduzem a expressão de proteínas estruturais específicas da cartilagem para fabricação de um medicamento para tratar a tendinopatia. Em algumas modalidades, a expressão de proteínas estruturais específicas da cartilagem, tais como, mas não limitadas a, agrecano, sindecano 3 (syn-3), versicano e do colágeno tipo II, está diretamente inibida. Em outras modalidades, a atividade de fatores de transcrição envolvidos na expressão de genes específicos da cartilagem é reduzida. Esses fatores de transcrição e as proteínas de transdução de sinais incluem, por exemplo, Sox9.

Em outras modalidades, a invenção inclui métodos de identificação de um composto para tratar a tendinopatia compreendendo administrar um composto de teste para um sujeito com necessidade de tratamento e medir a capacidade do agente para inibir a atividade de uma enzima envolvida na síntese de glicoglicosaminoglicanos (GAGs) no tecido do tendão.

Em certas modalidades, os métodos de identificação de um composto para tratar tendinopatia ou avaliar o tratamento compreendem: (1) prover pelo menos um componente de amostra selecionado do grupo con-

sistindo em CS-GalNAcT-1 , CS- GalNAcT-2, sulfato de heparano (glucosamina) 3-O-sulfotransferase 1 (Hs3st1), GalNT- 1 , e Sox9; (2) combinar a amostra com um composto de teste; (3) medir a atividade do componente de amostra em resposta ao composto de teste ; e (4) determinar se o composto de teste inibe a atividade do componente de amostra.

Objetivos e vantagens adicionais da invenção serão demonstrados em parte na descrição a seguir, e em parte serão óbvios a partir da descrição, ou podem ser aprendidos pela prática da invenção. Os objetivos e as vantagens da invenção serão realizados e alcançados por meio de elementos e combinações particularmente salientados na descrição detalhada a seguir, e nas reivindicações em anexo.

Deve ficar entendido que ambas, a descrição geral anterior e a descrição detalhada a seguir, são exemplares e explanatórias e não são restritivas da invenção, como reivindicado.

As figuras anexas, que estão incorporadas em e constituem uma parte desta especificação, ilustram diversas modalidades da invenção e, junto com a descrição, servem para explicar os princípios da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Nas figuras 1-7, SST quer dizer tendão superespinhal; PT significa controle interno não-lesionado do tendão patelar; R significa animais submetidos ao protocolo de superuso (Soslowsky et al., J. Shoulder Elbow Surg. 9:79-84 (2000)); C significa animais de controle não submetidos ao protocolo de superuso; tempo decorrido é 1 , 2, e 4 semanas; e BM significa medula óssea.

A figura 1 mostra os perfis de expressão de genes para Col2a1 (colágeno tipo II), em tendões superusados (figura 1A) durante quatro semanas usando chips de gene 2,0 Affymetrix RAE230. Os níveis de expressão de genes Col2a1 foram também medidos em tecidos músculo-esqueléticos normais como indicado (figura 1 B). Os perfis de expressão indicam que Col2a1 é altamente expresso em ambos, no tecido da cartilagem quando comparado ao tecido do tendão normal, e no tecido do tendão superusado, quando comparado ao tecido de tendão normal.

A figura 2 mostra perfis de expressão de gene para Agc1 (agrecano), em tendões superusados (figura 2A) durante quatro semanas usando chips de genes Affymetrix RAE230 2,0. Os níveis de expressão de genes de Agc1 foram também medidos em tecidos músculo-esqueléticos normais como indicado (figura 2B). Os perfis de expressão indicam que o Agc1 é altamente expresso em ambos, no tecido da cartilagem quando comparado ao tecido de tendão normal, e no tecido do tendão superusado quando comparado ao tecido do tendão normal.

A figura 3 mostra perfis de expressão de genes para Sox9 (caixa 9 do grupo de alta mobilidade do tipo sry), em tendões superusados (figura 3A) durante quatro semanas usando chips de gene Affymetrix RAE2302,0. Os níveis de expressão dos genes de Sox9 foram também medidos em tecidos músculo-esqueléticos normais como indicado (figura 3B). Os perfis de expressão indicam que Sox9 é altamente expresso em ambos, no tecido da cartilagem quando comparado ao tecido do tendão normal, e no tecido do tendão superusado quando comparado ao tecido do tendão normal.

A figura 4 mostra perfis de expressão de genes para Cspg2 (versicano), em tendões superusados (figura 4A) durante quatro semanas usando chips de genes Affymetrix RAE230 2,0. Os níveis de expressão do gene de versicano foram também medidos em tecidos músculo-esqueléticos normais como indicado (figura 4B). Os perfis de expressão indicam que o versicano é altamente expresso no tecido de cartilagem, quando comparado do tecido de tendão normal e tecido de tendão superusado, quando comparado ao tecido de tendão normal.

A figura 5 mostra perfis de expressão de gene para sulfato de condroitina N-acetilgalactosaminiltransferase (CS-G al N AcT- 1) em tendões superusados (figura 5A) durante quatro semanas usando chips de genes Affymetrix RAE230 2,0. A expressão níveis de gene CS-GalNAcT-1 foi também medida em tecidos músculo-esqueléticos normais como indicado (figura 5B). Os perfis de expressão indicam que o CS- GalNAcT-1 é altamente expresso tanto no tecido da cartilagem, quando comparado ao tecido do tendão normal e tecido de tendão superusado, e em tecido de tendão superu-

sado quando comparado ao tecido de tendão normal.

A figura 6 mostra perfis de expressão de genes para GalNT-1 (GalNT1-UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina: polipeptídeo-N-acetilgalactosaminiltransferase 1) em tendões superusados (figura 6A) durante quatro se-
 5 manas usando chips de genes Affymetrix RAE230 2,0. Os níveis de expressão do gene de GalNT-1 foram também medidos em tecidos músculo-esqueléticos normais, como indicado (figura 6B). O índice de perfis de expressão indicam que o GalNT-1 é altamente expresso em tecido de tendão superusado, quando comparado ao tecido de tendão normal.

10 A figura 7 mostra perfis de expressão de genes para Hs3st1 (sulfato de heparano (glucosamina) 3-O-sulfotransferase 1) em tendões superusados (figura 7A) durante quatro semanas usando chips de gene Affymetrix RAE230 2,0. Os níveis de expressão do gene Hs3st1 foram também medidos em tecidos músculo-esqueléticos normais como indicado (figura 7B). Os
 15 perfis de expressão indicam que o Hs3st1 é altamente expresso em tendão superusado quando comparado ao tendão normal e em tecido de cartilagem, quando comparado ao tecido de tendão normal.

BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos de CS-GalNAcT-1
 20 estão disponíveis em Genbank sob os números de acesso a seguir: seres humanos (NM_018371); camundongo (NM_172753); e rato (XIVL224757).

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos de CS-GalNAcT-2 estão disponíveis em Genbank sob os números de acesso a seguir: seres humanos (NM_018590); camundongo (NM_030165); e rato (XM_232316).

25 As sequências de nucleotídeos e aminoácidos de GalNT-1 estão disponíveis em Genbank sob os números de acesso a seguir: seres humanos (NM_020474); camundongo (NM_013814); e rato (NM_124373).

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos de agregcano estão disponíveis em Genbank sob os números de acesso a seguir: seres hu-
 30 manos (NM_001135); camundongo (NM_007427); e rato (NM_022190).

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos de Col2a1 estão disponíveis em Genbank sob os números de acesso a seguir: seres huma-

nos (NM_001844); camundongo (NM_031163) e rato (NM_012929).

As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos de Sox9 estão disponíveis em Genbank sob os números de acesso a seguir: seres humanos (NM_000346); camundongo (NM_011448); e rato (XM_343981).

5 As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos de versicano estão disponíveis em Genbank sob os números de acesso a seguir: seres humanos (NM_004385); camundongo (XM_488510) e rato (XM_215451).

10 As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos de sulfato de heparano (glucosamina) 3-O-sulfotransferase 1 estão disponíveis em Genbank sob os números de acesso a seguir: seres humanos (NM_005114), camundongo (NML.010474), e rato (NM_053391).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

15 A presente invenção provê métodos para tratar a tendinopatia pela redução da atividade de uma ou mais moléculas envolvidas na formação da cartilagem e/ou fibrocartilagem em tecidos de tendão.

Para a presente invenção ser mais prontamente compreendida, certos termos são primeiro definidos. Definições adicionais são estabelecidas através de descrição detalhada da invenção.

20 Como usado aqui a seguir, o termo "**tendinopatia**" inclui todas as patologias que surgem em ou ao redor de tendões, incluindo, mas não limitado a, tendinites, tendonites, tendinoses, paratendinites, tenossinovites, lesão e trauma de superuso do tendão, peritendinites, e paratenonites.

Como usado aqui a seguir, o termo "**defeito de tendão**" refere-se a qualquer distúrbio no tendão incluindo, mas não limitado a, tendinopatia.

25 Como usado aqui a seguir, o termo "tendão danificado" refere-se a um tecido de tendão que sofre de tendinopatia ou de um defeito de tendão.

Como usado aqui a seguir, o termo tendão "**superusado**" refere-se a um tendão que está sofrendo de defeito de tendão ou tendinopatia como resultado de superuso, ao contrário do trauma direto.

30 Como usado aqui a seguir, o termo "**paciente**" ou "**sujeito**" refere-se a qualquer pessoa ou animal que é suscetível, sofre de ou está em processo de recuperação de um defeito de tendão e está com necessidade

de tratamento.

Como usado aqui a seguir, o termo "**tendinite**" refere-se a tendinite (uma ortografia alternativa), tendinopatia, ou inflamação do tendão.

5 Como usado aqui a seguir, o termo "**tendinose**" refere-se a tendinopatia ou qualquer condição degenerativa em que microrrompimentos ocorrem no tendão que enfraquecem o tendão, geralmente causando dor, rigidez e perda da resistência.

10 Como usado aqui a seguir, o termo "**lesão de tendão**" refere-se a tendinopatia ou qualquer condição em que o tecido do tendão torna-se defeituoso ou degenerativo.

Como usado aqui a seguir, o termo "**molécula pequena**" inclui qualquer porção química ou outra, que não são polipeptídeos e ácidos nucleicos, que podem atuar para afetar os processos biológicos.

Como usado aqui a seguir, os termos "**tratar**" ou "**tratamento**" referem-se a qualquer administração ou aplicação de remédios para doença em um mamífero, incluindo um ser humano, e inclui a inibição da doença. Inclui interromper o desenvolvimento da doença e aliviar a doença, tal como causando a regressão ou restaurando uma perda, falta ou função defeituosa, ou estimulando um processo ineficaz.

20 Como usado aqui a seguir, o termo "**atividade**" refere-se à função biológica de uma enzima ou uma proteína que pode ser inibida, reduzida, ou interferida por vários meios.

25 Como usado aqui a seguir, o termo "**atividade enzimática**" refere-se a uma ou mais atividades fisiológicas, catalíticas, reguladoras ou enzimáticas associadas a uma enzima.

Como usado aqui a seguir, o termo "**quantidade eficaz**" significa a quantidade total de cada inibidor da presente invenção que é suficiente para mostrar um benefício significativo para o paciente, isto é, a cura da tendinopatia ou o aumento na taxa de cura e melhoria dos sintomas.

30 I. Os Componentes de Tendão e Cartilagem

O tendão é composto de uma hierarquia ordenada de colágeno tipo I, que é dispersa em pequenas quantidades de colágeno tipo III, tenóci-

tos tipo Fibroblastos, e fibrocondrócitos tipo condrócito. O colágeno tipo I é acondicionado em fibras de colágeno densas, que provêm o tendão com força e firmeza, enquanto ele é esticado e puxado pelos músculos acoplados. Em contraste, a cartilagem é composta de colágeno tipo II e proteoglicanos, e é projetada para suportar a compressão, não tensão. A fibrocartilagem é uma mistura de tecidos de tendão e cartilagem, e é principalmente encontrada na interface entre tendão e osso. A formação de cartilagem e fibrocartilagem dentro de um tendão é prejudicial à função do tendão porque ele rompe as fibras do colágeno do tipo I acondicionadas firmemente e reduz a resistência à tração do tendão. Dessa maneira, os métodos da invenção podem ser empregados para prevenir ou reduzir a formação de cartilagem e / ou fibrocartilagem em tecido de tendão danificado ou lesionado.

Uma indicação de formação de cartilagem em tendão é a presença de níveis de proteoglicanos aumentados no tecido, muitas vezes detectada pela presença das cadeias laterais de glicosaminoglicano (GAG) de proteoglicanos. Proteoglicanos são uma família de glicoproteínas caracterizada por uma proteína de núcleo que tem uma ou mais cadeias lineares de GAG, que são feitas da repetição de unidades de dissacarídeos. Proteoglicanos de sulfato de condroitina, tais como agregano e versicano, são específicos da cartilagem. O agregano é o componente estrutural principal da cartilagem e é responsável pela força compressora e elasticidade da cartilagem. A hidratação e agregação de moléculas de agregano criam um gel viscoso que absorve a carga compressora em tecidos de cartilagem. Watanabe et al., J. Biochem 124(4):687-93 (1998). Outros proteoglicanos presentes no tecido da cartilagem incluem proteoglicanos de sulfato de heparano, tais como, por exemplo, sindecano 3 (syn-3). Kirn-Safran et al., Birth Defects Res 72(Part C):69- 88 (2004).

II. Moléculas que Promovem Cartilagem e Fibroformação de cartilagem

A invenção está baseada, em parte, na descoberta de que a expressão de genes específicos de cartilagem (por exemplo, agregano, versicano, e colágeno tipo II) aumenta em tendões lesionados. Esse resultado, usando perfis de expressão de genes obtidos em um modelo de superuso de

tendão de rato descrito em Soslowky et al., J Shoulder Elbow Surg. 9:79-84 (2000), sugere que o tendão lesionado é convertido em fibrocartilagem como um resultado do superuso.

A invenção é também baseada, em parte, na descoberta de que a expressão de enzimas envolvidas na síntese de glicosaminoglicano (GAG) cadeias laterais de proteoglicanos específicos de cartilagem, é aumentada nos tendões de superuso. A descoberta de que enzimas específicas de cartilagem são reguladas a montante em tendões danificados, provê um mecanismo para a acumulação de GAGs observada em tendões gravemente danificados. Khan et al., Sports Med 27:393-408 (1999) e Tallon et al., Med Sci Sports Exerc 33(12):1983-90 (2001). Esses níveis de GAG aumentados indicam que níveis de proteoglicanos tais como agrecano, versicano, e syn-3 aumentam em tendões danificados. Dessa maneira, a tendinopatia pode ser tratada prevenindo a acumulação de proteoglicanos específicos de cartilagem, reduzindo a atividade das enzimas responsáveis pela produção desses proteoglicanos.

A. Moléculas que Promovem a Formação de Cartilagem são Reguladas à Montante em Tendinopatia

O sistema Affymetrix GeneChip® foi usado para identificar diferenças em expressão de genes entre tendão normal e tendão submetido a um protocolo de superuso. Os perfis de expressão de genes renderam mais de 400 genes que são diferencialmente regulados no tendão superespinhal após o superuso. Por 4 semanas de superuso, 107 genes foram regulados à montante e 27 genes foram infra-regulados. Alguns dos genes mais altamente supra-regulados são genes específicos de cartilagem, incluindo cadeia de colágeno alfa-1 do tipo 2 (Col2a1), Sox9, versicano, e agrecano. Outros genes supra-regulados incluem aqueles envolvidos na formação de cadeias laterais de GAG em proteoglicanos de cartilagem, incluindo CS-GalNAcT-1, GalNT-1, e Hs3st1. Com base nesses resultados, é provável que essas próprias moléculas, ou outras moléculas responsáveis pela iniciação ou manutenção da atividade dessas moléculas ou expressão dos genes que codificam essas moléculas, podem estar envolvidas na formação de cartilagem

e/ou fibrocartilagem em tendões de superuso. Essas moléculas podem incluir enzimas, fatores de transcrição, e fatores de transdução de sinal, como listado abaixo:

1. Enzimas

5 Um método para inibir a produção de cartilagem ou fibrocartilagem no tecido do tendão é inibir a expressão ou atividade das enzimas envolvidas na síntese de proteoglicanos. Para uma lista completa de enzimas envolvidas na síntese da cadeia de GAG de proteoglicanos, vide Silbert et al., IUBMB Life 54:177-186 (2002) e Sugahara et al., IUBMB Life 54:163-175
10 (2002). Essas enzimas incluem proteínas cuja expressão é aumentada em tendões de superuso (Exemplo 1). Dessa maneira, uma modalidade da invenção envolve inibir a expressão ou atividade de qualquer uma das enzimas a seguir:

CS-GalNAcT-1 e CS-GalNAcT-2 (EC 2.4.1.174 e EC 2.4.1.175),
15 envolvidas na iniciação e alongamento de cadeias laterais GAG de sulfato de condroitina. CS- GalNAcT-1 é envolvida na iniciação e alongamento de GAGs de condroitina, enquanto que CS-GalNAcT-2 é envolvida no alongamento daquelas mesmas GAGs de condroitina. Para uma descrição detalhada dessas enzimas, por favor vide Uyama et al., J. Biol. Chem, 277(11):8841 -8846 (2002); Gotoh et al., J. Biol. Chem. 277(41):38189-38196 (2002); Sato et al. J. Biol. Chem. 278(5) :3063-3071 (2003); Uyama et al., J. Biol. Chem. 278(5) :3072-3078 (2003).
20

UDP-D-xilose: proteína do núcleo β -D-xilosiltransferase (EC 2.4.2.269), envolvida na adição da porção inicial de Xyl sobre uma proteína do núcleo de proteoglicano, uma das primeiras etapas da síntese de cadeia lateral de GAG.
25

Transferases de Gal (EC 2.4.1.133 e EC 2.4.1.134), envolvidas na adição de resíduos de galactose sobre a porção Xyl das novas cadeias laterais de GAG.

30 Transferases de GlcA (EC 2.4.1.135, EC 2.4.1.226, e EC 2.4.1.225), envolvidas na adição de porções de GlcA sobre resíduo de galactose de novas cadeias laterais de GAG.

Transferases de GlcNAc (EC 2.4.1.223 e EC 2.4.1.224), envolvidas na adição de porções de GlcNAc para as porções de GalNAc de sulfato de condroitina GAGs adicionada pelas enzimas CS-GalNAcT.

5 Sulfotransferases (EC 2.8.2.5 e EC 2.8.2.1), envolvidas na transferência de GAGs de resíduos de sulfato em sulfato de condroitina.

Sintases de sulfato de condroitina (EC 3.1.6.4 e EC 3.1.6.12), envolvidas na adição inicial de resíduos de sulfato para GAGs de sulfato de condroitina.

10 GalNT-1 (E.C.2.4.1.41) cataliza a primeira etapa na formação de cadeias laterais de oligossacarídeos O- ligados em glicoproteínas. White et al., J Biol Chem 270(41):24156-65 (1995).

Hs3st1 (EC 2.8.2.23) cataliza a adição de resíduos de sulfato sobre GAGs de sulfato de heparano. Shworak et al., J Biol Chem 272(44): 28008-19 (1997).

15 Inibir a atividade de qualquer uma dessas enzimas, seja direta ou indiretamente, reduzirá a formação de proteoglicanos. Os métodos para inibição dessas enzimas são discutidos abaixo.

2. Expressão de Gene

20 Um método alternativo para prevenir a formação de cartilagem e / ou fibrocartilagem é prevenir a expressão de proteínas específicas de cartilagem no tecido do tendão danificado, quer direta ou indiretamente. Por exemplo, a expressão de versicano ou agrecano, proteoglicanos específicos de cartilagem, pode ser reduzida por diversos métodos de transcrição ou tradução dos genes que codificam agrecano ou versicano, ou previnem a
25 expressão ou função de fatores de transcrição envolvidos na expressão dos genes de agrecano ou versicano que teriam o resultado de prevenir a transcrição desses genes.

30 Quando praticar a invenção, é importante invenção garantir que a inibição de fatores específicos da cartilagem seja localizada para o tendão danificado, porque muitos fatores específicos da cartilagem, incluindo proteoglicanos e colágeno tipo II, são elementos importantes da cartilagem articular funcional e outros tecidos.

Um método para inibir a formação de cartilagem e / ou fibrocartilagem no tecido do tendão é inibir a atividade ou expressão de proteínas não-enzimáticas envolvidas na expressão de proteínas estruturais da cartilagem. Inibindo a expressão ou atividade desses genes, a pessoa pode indiretamente inibir a expressão das proteínas que constituem a cartilagem e/ou tecido da fibrocartilagem. Proteínas envolvidas na expressão de proteínas estruturais da cartilagem incluem, mas não estão limitadas a Sox9.

Outros métodos para inibir a formação de cartilagem ou fibrocartilagem no tecido do tendão envolvem inibir diretamente a expressão (ao contrário da atividade) das principais proteínas estruturais da cartilagem, tais como, por exemplo, agregano, versicano, colágeno do tipo II. Os genes a seguir foram descoberto como sendo supra-regulados no tecido do tendão danificado e são ligados à formação de cartilagem.

a) Sox9

Sox9 (estojo 9 do grupo de mobilidade alta do tipo sry) é um fator de transcrição envolvido no desenvolvimento de cartilagem. Sox9 é expresso em condrócitos, coincidindo com a expressão do gene de colágeno alfa 1 (II) (Col2a1). Sox9 regula a condrogênese ativando ou aumentando a transcrição de genes que expressam as proteínas da estrutura da cartilagem tais como o colágeno do tipo II. Shum et al., Arthritis Res. 4(2):94-106 (2002); Bi et al., Nat. Genet. 22(1):85-9 (1999).

b) Col2a1

Col2a1 codifica a cadeia alfa 1 do colágeno tipo II, o principal componente da cartilagem. Cheah et al., Proc Natl Acad Sci U S A 82(9):2555-9 (1985).

c) Agc1

Agc1 codifica a proteína do núcleo do proteoglicano agregano, Doege et al., Extracellular Matrix Genes (Sandel, L J.; Boyd, C. D., eds.) Academic Press (New York) 137-152 (1990). Como usado aqui a seguir, o termo "agregano" refere-se a um grande proteoglicano específico dos tecidos da cartilagem. O agregano é composto de um núcleo de proteína revestido com numerosas porções de GAG de sulfato de condroitina. O agregano

é o principal componente estrutural da cartilagem e é capaz de ligar a água e formar uma substância viscosa do tipo gel. Essa hidratação provê o tecido da cartilagem com sua elasticidade e força compressora.

d) Cspg2

- 5 Cspg2 codifica a proteína do núcleo do proteoglicano versicano. O versicano e outro proteoglicano grande com numerosas cadeias laterais de sulfato de condroitina. Como o agregano, o versicano liga a água e forma um gel viscoso que aumenta a resistência e elasticidade do tecido. Knudson et al., Sem Cell Dev Biol 12:69-78 (2001).

10 B. Tratamento de Tendinopatia por Inibição de Moléculas Que Promovem a Formação de Cartilagem

- A invenção provê métodos para tratamento ou prevenção de tendinopatia reduzindo a expressão e/ou atividade das moléculas listadas acima. A invenção ainda provê métodos de administrar um inibidor das mo-
15 léculas listadas acima para tratar ou prevenir a tendinopatia.

1. Estratégia de Tratamento

- A invenção do momento é baseada, em parte, na descoberta de que os níveis de expressão dos genes que codificam agregano, versicano, Sox9, colágeno tipo II, CS-GalNAcT-1 , GalNT-1 , e HS3st1 são aumentados
20 significativamente nos tecidos do tendão superusado quando comparados aos tecidos de controle (figuras 1-7). Esse resultado indica que a expressão de enzimas aumentada, ou outras moléculas envolvidas na via da síntese de proteoglicanos leva à conversão do tecido do tendão lesionado em cartilagem e / ou fibrocartilagem. Dessa maneira, em uma modalidade, a invenção
25 inclui métodos para tratar a tendinopatia que compreendem reduzir a formação de cartilagem e/ou fibrocartilagem no tecido do tendão, inibindo a atividade, expressão, ou acumulação de enzimas ou outras moléculas envolvidas na síntese de cartilagem e/ou fibrocartilagem.

- Inibidores que podem bloquear a atividade das enzimas ou de
30 outras moléculas envolvidas em formação de cartilagem ou fibrocartilagem no tendão são úteis na invenção. Inibidores úteis nos métodos da invenção são opcionalmente glicosilados, peguilados, ou ligados a outro polímero não-

proteínáceo. Os inibidores podem ser modificados para ter um padrão de glicosilação alterado (isto é, alterado a partir do padrão de glicosilação original ou nativo). Como usado aqui a seguir, "alterado" significa ter uma ou mais porções de carboidrato adicionadas ou deletadas, e / ou ter um ou mais sítios de glicosilação adicionados ou deletados quando comparado ao inibidor original. A adição de sítios de glicosilação para os inibidores pode ser realizada pela alteração da seqüência de aminoácidos para conter seqüências de consenso dos sítios de glicosilação bem-conhecidas na técnica. Outros meios de aumentar o número de porções de carboidratos é acoplando glicosídeos químicos ou enzimáticos aos resíduos de aminoácidos do inibidor. Esses métodos são descritos em WO 87/05330, e em Aplin et al., Crit Rev Biochem 22:259-306 (1981). A remoção de quaisquer porções de carboidratos presentes no substrato pode ser realizada quimicamente ou enzimaticamente como descrito por Sojar et al., Arch Biochem Biophys 259:52-57 (1987); Edge et al., Anal Biochem 118:131 -137 (1981); e por Thotakura et al., Meth Enzymol 138:350-359 (1987).

Inibidores de protéináceos e não-protéináceos incluindo, por exemplo, peptídeos, moléculas pequenas e ácidos nucléicos, podem ser também usados nos métodos da invenção.

20 a) Peptídeos e Moléculas Pequenas

Inibidores úteis nos métodos da invenção incluem peptídeos e moléculas orgânicas pequenas, e moléculas inorgânicas pequenas. Esses peptídeos e moléculas pequenas incluem inibidores de ocorrência natural sintéticos e purificados. Os métodos para identificar peptídeos e moléculas pequenas que especificamente alvejam uma proteína de interesse são bem-conhecidos na técnica. Por exemplo, peptídeo e/ou bibliotecas de moléculas pequenas podem ser rastreados para inibição das proteínas alvo, tais como, por exemplo, CS-GalNAcT-1, CS-GalNAcT-2, GalNT-1, e / ou Sox9, usando um ensaio da função enzimática e/ou biológica da proteína alvo. Em outra modalidade, a molécula pequena e/ou as bibliotecas de peptídeos podem ser rastreadas em um ensaio ligando radioligante competitivo de uma proteína alvo, tal como CS-GalNAcT-1, CS-GalNAcT-2, GalNT-1, e/ou Sox9, com

seus substratos ou ligantes.

Alternativamente, ensaios baseados na transferência de energia de ressonância fluorescente (FRET), tais como o ensaio de FRET de Resolução por Hora (TR-FRET), podem ser usados para identificar um inibidor.

- 5 Em uma modalidade exemplar, a proteína do núcleo de um proteoglicano é rotulada com um marcador His ou GST e um anticorpo anti-His ou GST acoplado ao Europium, um fluoróforo, é usado para rotular a proteína. Alternativamente, a proteína do núcleo é rotulada não-especificamente com Europium sobre resíduos de lisina ou cisteína. A molécula doadora de açúcar é
- 10 rotulada com Cy5, um corante fluorescente. Uma lista de moléculas de doadores e aceitantes úteis nesse ensaio pode ser encontrada na Tabela I de Uyama et al., J Biol Chem 278(5):3072-78 (2003).

- As moléculas de doador e aceitante são combinadas em proporções diferentes, com e sem a enzima alvo. O ensaio de TR-FRET é realizado excitando o sistema a 340 nm, medindo a emissão de Europium e Cy5 a
- 15 615 e 665 nm, respectivamente, e calculando a proporção de emissão de Cy5 para a emissão de Europium.

- Quando não há enzima presente, as moléculas doadoras e aceitantes não entram em proximidade estreita umas com as outras, e não existe
- 20 extinção da fluorescência individual das moléculas de Cy5 e Europium, resultando em uma proporção a nível de linha de base. Quando a enzima alvo é adicionada ao sistema de ensaio, a molécula doadora de açúcar é transferida para a proteína aceitante, e a fluorescência do sistema é extinguida. A relação de Cy5 para a fluorescência de Europium aumenta com a quantidade
- 25 de moléculas de açúcar transferida até um máximo.

- Para identificar inibidores da enzima alvo, peptídeos ou moléculas pequenas são adicionadas ao sistema de ensaio. Quando um composto de teste é capaz de inibir a transferência do açúcar para a proteína, a extinção da fluorescência diminui. Se o composto de teste é capaz de inibir 100%
- 30 da atividade de transferência da enzima, a proporção de emissão de Cy5 para emissão de Europium está em níveis da linha de base. Compostos que inibem pelo menos 50% da atividade da enzima nesse ensaio são depois ava-

liados em sistemas baseados em células para avaliar sua capacidade para reduzir a síntese de GAG (descrita abaixo).

5 A invenção também provê o uso de ensaios de rastreamento adicionais, por exemplo ensaios secundários e terciários, para ainda identificar o efeito de tais moléculas sobre a morfologia do tendão, por exemplo, usando os ensaios descritos em detalhes acima.

b) Mutantes Negativos Dominantes

10 Em certas modalidades da invenção, as proteínas CS-GalNAcT-1 , CS- GalNAcT-2, GalNT-1 , Hs3st1 , ot Sox9 mutantes podem ser usadas como inibidoras nos métodos da invenção. Por exemplo, uma variante de ocorrência natural, ou um homólogo mecânico que tem efeito negativo dominante sobre a atividade das moléculas mencionadas acima, tanto *in vivo* e *in vitro*, podem ser usados nos métodos da invenção.

c) Ácidos Nucléicos

15 Os ácidos nucleicos que podem bloquear a atividade das moléculas alvo listadas acima, são úteis nesta invenção. Tais inibidores podem codificar proteínas que interagem com, por exemplo, CS-GalNAcT-1 , CS-GalNAcT-2, GalNT-1 , Hs3st1 , ou Sox9. Alternativamente, tais inibidores podem codificar proteínas que podem interagir com substratos ou ligantes da
20 molécula alvo (tal como GalNAc) e podem ser eficazes nos métodos da invenção, se as proteínas codificadas bloquearem a ligação da molécula alvo para seu substrato ou ligante, ou se elas bloquearem a atividade do substrato ou ligante após a ligação da molécula alvo. Inibidores, naturalmente, podem codificar proteínas que interagem com a molécula alvo e seu substrato
25 ou ligante ao mesmo tempo. Tais ácidos nucleicos podem ser usados para expressar, por exemplo, inibidores de CS-GalNAcT- 1 , CS-GalNAcT-2, Hs3st1 , GalNT-1 , ou Sox9 para uso nos métodos da invenção.

30 Os métodos da invenção também abrangem o uso de moléculas de RNA interferente ("RNAi"), incluindo, mas não limitado a, RNAs de pequena interferência (siRNA), RNAs de grampo curto (shRNA), e RNA rastreada de duplo curto (sdsRNA), para reduzir a expressão de qualquer uma das moléculas listadas acima ou seus parceiros de ligação de proteínas. A RNAi

pode ser iniciada pela introdução de moléculas de ácido nucléico, por exemplo agentes que interferem em siRNAs RNA de interferência curta sintética, para inibir ou silenciar a expressão de genes alvo. Vide, por exemplo, Patente Norte Americana Publicações Nos. 2003/0153519 e 2003/01674901 , Patente Norte Americana Nos. 6.506.559, e 6.573.099.

O siRNA pode ser quimicamente sintetizado, produzido por transcrição *in vitro*, ou produzido dentro de uma célula hospedeira. Tipicamente, um siRNA tem pelo menos 15-50 nucleotídeos de comprimento, por exemplo, 20, 21 , 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30 nucleotídeos de comprimento. O siRNA pode ser um RNA duplo rastreado (dsRNA) de cerca de 15 a cerca de 40 nucleotídeos de comprimento, por exemplo, cerca de 15 a cerca de 28 nucleotídeos de comprimento, incluindo cerca de 19, 20, 21 , ou 22 nucleotídeos de comprimento, e podem conter um a 3' e/ou 5' inversos em cada filamento tendo de cerca de 0, 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 nucleotídeos. O siRNA pode inibir um gene alvo silenciando os transcritos. Preferivelmente o siRNA é capaz de promover a interferência do RNA através de degradação ou silenciamento de genes pós-transcritos específicos (PTGS) do RNA mensageiro alvo.

Os siRNAs usados nos métodos da invenção também incluem RNAs de grampo pequeno (shRNAs). Os shRNAs são compostos de um pequeno (por exemplo cerca de 19 a cerca de 25 nucleotídeos) filamento antisentido, seguido por um *loop* de nucleotídeo de cerca de 5 a cerca de 9 nucleotídeos, e o filamento de sentido análogo. Alternativamente, o filamento de sentido pode preceder a estrutura de *loop* do nucleotídeo e o filamento antisentido pode seguir. Esses shRNAs podem estar contidos em plasmídeos e vetores virais.

A região alvejada das moléculas siRNA pode ser selecionada a partir de uma dada seqüência alvo. Por exemplo, seqüências de nucleotídeos podem começar a partir de cerca de 25-100 nucleotídeos a jusante do códon de partida. As seqüência de nucleotídeos pode conter 5' ou 3' regiões não traduzidas, como também regiões próximas do códon de partida. Métodos para o projeto e preparação de moléculas de siRNA são bem-

conhecidos na técnica, incluindo uma variedade de regras para selecionar seqüências como reagentes de RNAi. Vide, por exemplo, Boese et al., *Métodos Enzymol* 392:73-96 (2005).

O siRNA pode ser produzido usando técnicas padrão como descrito em Hannon et al., *Nature* 418:244-251 (2002); McManus et al., *Nat Reviews* 3:737-747 (2002); Heasman et al., *Dev Biol* 243:209-214 (2002); Stein et al., *J Clin Invest*, 108:641 -644 (2001); e Zamore et al., *Nat Struct Biol* 8 (9): 746-750 (2001). Os siRNAs preferidos são 5' fosforiladas.

Os inibidores de siRNA podem ser usados para alvejar, por exemplo, CS-GalNAcT-1 , CS-GalNAcT-2, GalNT-1 , Hs3st1 , Sox9, Agd , Cspgi , ou Col2a1, ou outras moléculas listadas acima, como também substratos ou ligantes.

Os ácidos nucléicos podem ser obtidos, isolados, e / ou purificados a partir de seu ambiente natural, em forma substancialmente pura ou homogênea. Sistemas para clonagem e expressão de um polipeptídeo em uma variedade de células hospedeiras diferentes são bem-conhecidos. Células hospedeiras apropriadas incluem bactéria, célula de mamíferos, levedura, e sistemas de baculovírus. As linhas de células de mamíferos disponíveis na técnica para expressão de um peptídeo heterólogo incluem, por exemplo, células de ovário de hamster chinês, células HeLa, células de rim de hamster recém-nascido, células de melanoma de camundongo NSO e muitas outras. Para outras células apropriadas para produzir proteínas de ácidos nucléico, vide *Gene Expression Systems*, Eds. Fernandez et al., Academic Press (1999). As moléculas de RNAi podem ser quimicamente sintetizadas ou expressas a partir de seqüências de DNA codificadas as seqüências de siRNA ou shRNA.

Para a produção de mutantes negativos dominantes das moléculas listadas acima, podem ser escolhidos ou construídos vetores apropriados, contendo seqüências reguladoras apropriadas, incluindo seqüências promotoras, seqüências terminadoras, seqüências de poliadenilação, seqüências intensificadoras, genes de seleção ou marcadores e outras seqüências como apropriado. Os vetores podem ser plasmídeos ou virais, por

exemplo, bacteriófago, ou fagemídeo, como apropriado. Para detalhes adicionais vide, por exemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook et al., 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Muitas técnicas e protocolos conhecidos para a manipulação de ácido nucléico, por exemplo, na preparação de construtos de ácido nucléico, mutagênese, seqüenciamento, introdução de DNA em células e expressão de genes, e análise de proteínas, são descritos com detalhes em *Current Protocols in Molecular Biology*, Eds. Ausubel et al., 2nd ed., John Wiley & Sons (1992).

Um ácido nucléico pode ser fundido a outras seqüências codificando seqüências de polipeptídeos adicionais, por exemplo, seqüências que funcionam como um marcador ou relator. Exemplos de genes marcadores ou relatores incluem lactamase, cloranfenicol acetiltransferase (CAT), adenosina de aminase (ADA), aminoglicosídeo fosfotransferase (responsável pela resistência à neomicina (G418)), diidrofolato reductase (DHFR), higromicin-B-fosfotransferase (HPH), timidina cinase (TK), lacZ (codificando - galactosidase), xantina guanina fosforibossiltransferase (XGPRT), luciferase. Muitos outros são bem-conhecidos na técnica.

2. Inibição da Atividade Enzimática

Em particular as modalidades da invenção, os métodos para tratamento de tendinopatia compreendem reduzir, inibir ou infra-regular a atividade de enzimas envolvidas na biossíntese de proteoglicanos, tais como aquelas envolvidas na adição de sulfato de condroitina de GAGs para agrecano e / ou versicano. Essas enzimas incluem, por exemplo, CS-GalNAcT-1, CS-GalNAcT-2, UDP-D-xilose: proteína de núcleo β -D-xilosiltransferase, Gal transferases, GlcA transferases, GlcNAc transferases, sulfotransferases, síntese de sulfato de condroitina, Hs3st1, e GalNT-1.

Em uma modalidade exemplar, a invenção inclui métodos para reduzir, inibir ou infra-regular a atividade de CS-GalNAcT-1, CS-GalNAcT-2, GalNT-1, e / ou enzimas Hs3st1 em tendões danificados. Em outras modalidades, a invenção inclui métodos para reduzir, inibir ou infra-regular a atividade de Xyl transferase, Gal transferase, GlcA transferase, GalNAc transferase, GlcNAc transferase, sulfotransferase, ou sintase de sulfato de

condroitina em tendões danificados. O peptídeo ou inibidores de moléculas pequenas descritos acima podem ser usados para praticar esses métodos.

a) Identificar Inibidores de Atividade de Enzima

5 A invenção ainda compreende métodos de identificar e avaliar a eficácia de agentes que podem atuar como inibidores de CS-GalNAcT-1 , CS-GalNAcT-2, GalNT-1 , Hs3st1 , Xyl transferase, Gal transferase, GlcA transferase, GalNAc transferase, GlcNAc transferase, sulfotransferase, e/ou sintase de sulfato de condroitina no tecido do tendão danificado.

10 Tais inibidores bloqueiam ou reduzem a atividade das enzimas envolvidas na cartilagem ou formação de fibrocartilagem no tendão. Esses inibidores incluem substratos solúveis modificados, proteínas, moléculas pequenas, e ácidos nucleicos.

Os métodos de identificação de um agente para tratar tendinopatia envolvem ensaiar o efeito de cada agente individual na atividade da enzima, interação da proteína alvo, ou interação proteína-proteína das enzimas listadas acima. Vários ensaios **in vivo** ou **in vitro** podem ser usados para determinar a eficácia de um inibidor para tratar a tendinopatia. Em uma modalidade exemplar, as moléculas pequenas são avaliadas **in vitro** por sua utilidade terapêutica potencial ensaiando sua capacidade de afetar, por exemplo, a atividade da enzima, ligação alvo ou interações proteína-proteína das enzimas listadas acima através de um método do tipo rastreamento de produtividade operacional alta (HTS):

15 20

Em um ensaio de HTS típico, o efeito inibidor de um composto candidato, por exemplo, na atividade da enzima, ligação ligante-receptor e os similares, pode ser medido pela comparação do ponto final do ensaio na presença de uma concentração conhecida do candidato para uma referência que é realizada na ausência do candidato; e / ou na presença de um inibidor composto conhecido. Geralmente, moléculas de corante convencional, fluorescentes ou radioativas são usadas para monitorar o efeito do candidato composto. Dessa maneira, por exemplo, um candidato composto pode ser identificado que inibe a ligação de um ligante e seu receptor, ou que inibe a atividade da enzima, diminuindo a renovação do processo enzimático.

25 30

Uma modalidade exemplar da presente invenção provê um método **in vitro** de identificação de um agente para tratar a tendinopatia compreendendo: (1) prover uma amostra de pelo menos um componente da amostra selecionado do grupo que consiste em CS-GalNAcT-1 , CS-GalNAcT-2, GalNT-1 , e Hs3st1 ; (2) combinar o componente de amostra com pelo menos um agente de teste; (3) medir a atividade do componente de amostra em resposta ao agente de teste; e (4) determinar se o agente de teste inibe a atividade do componente de amostra.

Em uma modalidade exemplar, um método **in vitro** de identificação de um agente para tratar tendinopatia envolve tratar um explante de cartilagem, uma cultura de pélete de condrócito primário, ou um linha de células de condrócito com uma proteína BMP-2 ou um adenovírus, expressando uma proteína BMP-2. A BMP-2 estimula ECM e a síntese de GAG. Um composto de teste é depois adicionado à cultura e o efeito do inibidor sobre a síntese de GAG é avaliada por mensuração de incorporação ³⁵S nas cadeias laterais de GAG e/ou através do ensaio de DMMB. O efeito do composto de teste será comparado aos controles do veículo apropriado.

Um ensaio **in vivo** de um inibidor de enzima potencial pode compreender: (1) administrar um inibidor de teste repetidamente para um mamífero (por exemplo, um rato Sprague-Dawley) durante um período de pelo menos 2, 4, 6, ou 8 semanas; (2) submeter um mamífero a um protocolo de corrida em declive a 17 m/min durante 1 h/dia, 5 dias/semana (Exemplo 1); e (3) determinar o efeito do inibidor sobre o tendão superespinhal por ensaio de DMMB ou AB ou através do traçado do perfil de expressão de gene, em que uma diminuição da degeneração do tendão (por exemplo, anormalidades celulares e morfológicas) é considerada para ser atribuída ao inibidor, e indica que o inibidor é eficaz para tratamento de um distúrbio degenerativo do tendão.

Deverá ficar entendido que um inibidor de teste útil nos métodos da invenção pode ser avaliado em um ou mais modelos animais de distúrbios degenerativos de tendão e/ou em seres humanos.

Vários ensaios para a atividade de mensuração da enzima na

presença de um inibidor **in vivo** e **in vitro** são conhecidos na técnica. Exemplos de alguns dos ensaios usados mais freqüentemente incluem espectrofotometria, espectrofluorimetria, dicroísmo circular, procedimentos espectrofotométrico e espectrofluorimétricos automático, ensaios acoplados, titulação automática de ácido ou base, procedimentos radioativos, detecção óptica livre de marcas, e ensaio de inibição de enzima. Em modalidades exemplares, a atividade da enzima de CS-GalNAcT-1 e/ou CSGalNAcT-2 é medida como descrito em Uyama et al., J Biol Chem 277(11):8841 -46 (2002). Em outra modalidade exemplar, a atividade da enzima de GalNT-1 é medida como descrito em White et al., J Biol Chem 270 (41):24156-65 (1995).

Inibidores de enzima úteis nos métodos da invenção, por exemplo, podem interagir com as enzimas que eles inibem. Alternativamente, inibidores podem interagir com um substrato de enzima (tal como GalNAc) ou outros parceiros de ligação, por exemplo. Inibidores podem reduzir ou e podem ser eficazes na invenção se eles bloquearem a ligação da enzima para seu substrato e/ou se eles bloquearem a atividade do substrato depois da ligação da enzima. Inibidores, naturalmente, podem interagir com a enzima e um segundo fator, tal como seu substrato. A este respeito, os inibidores CS-GalNAcT-1, CS-GalNAcT-2, GalNT-1, e/ou Hs3st1 incluem, por exemplo, substratos solúveis modificados, outras proteínas (incluindo aquelas que se ligam à enzima e / ou um substrato de enzima), formas modificadas da enzima ou fragmentos das mesmas, propeptídeos, peptídeos, e miméticos de todos esses inibidores.

Um inibidor de enzima pode, por exemplo, ser um inibidor direto de enzima; fazer a ligação para, e neutralizar a atividade da enzima; diminuir os níveis de expressão de enzima; afetar a estabilidade ou conversão da molécula precursora para a forma ativa, madura; interferir na ligação da enzima para um ou mais de seus substratos; ou pode interferir nas funções intracelulares da enzima.

30 3. Inibição da Atividade do Fator de Transcrição

Inibidores de fatores de transcrição úteis nos métodos da invenção podem inibir ou reduzir a atividade dos fatores diretamente através de

ligação, ou indiretamente ao interferir nas suas interações proteína-proteína e/ou propriedades de ligação. A esse respeito, inibidores de Sox9 podem incluir ligantes solúveis modificados ou moléculas alvo, moléculas pequenas e ácidos nucleicos.

- 5 Ensaios para medir a atividade de Sox9 na presença de um inibidor **in vivo** e **in vitro** são conhecidos na técnica. Exemplos de alguns dos ensaios mais freqüentemente usados para inibidores de Sox9 incluem o sistema bi-híbrido de levedura, gene de reporter de luciferase; ensaios de PCR para determinar os níveis de expressão de genes específicos de condrócito
- 10 (por exemplo, Col2a1 , Agd) na presença de um inibidor de Sox9 , análise de *western blot* de Sox9 ou genes específicos de condrócito, transfecção transiente, ensaios de acetiltransferase de cloranfenicol (CAT) e análises de *northern-blot*.

- Vários ensaios de interação proteína-proteína ou proteína-ácido
- 15 nucleico, baseados na transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET), podem ser utilizados para ensaiar os efeitos de inibidores sobre as interações de Sox9 com seus parceiros de ligação. Por exemplo, um pode usar o ensaio homogêneo de proximidade de luminescência ampliada AlphaScreen™ (de PerkinElmer®) ou Transferência de Energia de Ressonância de Bioluminescência (BRET™ de PerkinElmer®) que pode ser em-
- 20 pregado para realizar um ensaio **in vitro** para inibidores que interferem nas interações de ligação de Sox9.

- Em uma modalidade, a presente invenção provê um método para um ensaio **in vitro** a fim de identificar um agente para tratar a tendinopatia
- 25 que compreende: (1) prover uma molécula alvo listada acima fundida a uma molécula fluorogênica doadora; combinar a molécula alvo com um agente de teste; (3) adicionar o parceiro de ligação da molécula alvo fundido a uma molécula fluorescente receptora; (4) medir os níveis de transferência de energia de fluorescência entre a molécula alvo e seu parceiro de ligação; e (5)
- 30 determinar se o agente de teste inibe a interação da molécula alvo com seu parceiro de ligação.

Um inibidor pode interferir na ligação de uma molécula alvo para

seu parceiro de ligação e subsequente afetar os níveis de FRET entre os dois. Por conseguinte, as mensurações de FRET podem ser usadas para identificar inibidores de eficiência diversa. Uma vez identificado **in vitro** um inibidor de uma molécula alvo, um teste **in vivo** adicional pode ser realizado para determinar a eficácia e aplicabilidade do inibidor para prevenir a formação de cartilagem e fibrocartilagem no tendão.

4. Inibição de Expressão de Proteína

Em outra modalidade, os métodos para tratar tendinopatia compreendem reduzir, inibir ou infra-regular a expressão e/ou acumulação de genes tais como CS-GalNAcT-1, CS-GalNAcT-2, GalNT-1, Hs3st1, Col2a1, Cspgi, Agc1 e/ou Sox9, e seus polipeptídeos ou proteínas codificadas. Composições úteis para inibir a expressão desses genes incluem, por exemplo, moléculas que interferem no RNA, que estão descrita na Seção N(B)(1)(c) acima.

Esses inibidores podem ser administrados de qualquer maneira, porém em modalidades particulares, o DNA que expressa um inibidor de RNAi é incorporado em um vetor de adenovírus, que é depois injetado em um paciente com necessidade de reparo do tendão. Em modalidades exemplares, a sequência de nucleotídeos codificando o RNAi é posicionada a jusante de um promotor *polIII*, como descrito em Wahdwa et al., Curr Opin Mol Ther 6(4):367-72 (2004). Métodos para inserir siRNA e shRNA em vetores de adenovírus são bem-conhecidos na técnica e estão descritos, por exemplo, em Krom et al., BMC Biotech 6(11):[e-published ahead of print]. Alternativamente, o inibidor de RNAi é injetado diretamente no tecido do tendão lesionado e transportado em células através de electroporação, como descrito em Schiffelers et al., Arthritis & Rheumatism 52(4):1314-18 (2005).

5. Condições para Tendinopatia

Os métodos da invenção podem ser usados para tratar ou prevenir uma tendinopatia em qualquer mamífero com necessidade de tal tratamento, incluindo seres humanos, primatas, macacos, roedores, carneiros, coelhos, cães, porcos da índia, cavalos, vacas e gatos. Os distúrbios que podem ser tratados ou prevenidos incluem, por exemplo, tendinite, tendonite,

tendinose, paratendinite, tenocinovite, lesões por superuso do tendão, trauma de tendão, peritendinite, paratenonite, e quaisquer outras condições da família de condições de "tendinopatia".

5 A tendinopatia pode ser causada por superuso e movimentos repetidos, uma lesão súbita (variando de benígna até grave), uma degeneração gradual ou por envelhecimento. A maioria das lesões de tendão consiste em uma série de microrrompimentos de cura lenta (tendinose) que enfraquecem o tendão, muitas vezes causando dor, rigidez e perda da resistência. As tendinopatias usualmente requerem diversas semanas de tratamento, atividade reduzida ou modificada, e repouso. Voltar a usar o tendão lesionado muito cedo pode provocar mais dano no tendão, tornando o tendão lesionado mais suscetível a rompimentos ou rupturas. Da mesma maneira, os distúrbios tratados ou prevenidos pela presente invenção incluem distúrbios degenerativos, tanto agudos como crônicos, que são associados ao
10 superuso, lesões e traumas relacionados a esporte ou acidente, deficiências nutricionais e idade avançada.

Um exemplo de tendinopatia é a epicondilite lateral, também conhecida como "cotovelo de tenista," um distúrbio ortopédico e bem-conhecido da medicina esportiva. Uma patologia que é subjacente ao distúrbio está relacionada ao superuso e microrompimento de um tendão *carpi radialis brevis* do extensor do cotovelo. O corpo tenta reparar esses microrompimentos mas em muitos casos o processo de cura é incompleto. Espécies patológicas de pacientes que se submetem a cirurgia devido a epicondilite lateral crônica revelam uma displasia angiofibroblástica desorganizada
20 no tendão danificado. Essa tentativa de reparo incompleta resulta em tecido degenerado, imaturo e vascularizado. O tecido reparado de maneira incompleta é mais fraco do que o tecido do tendão normal e não tem força para funcionar normalmente. Esse tecido enfraquecido também limita o paciente por devido causar dor e impactar negativamente a qualidade de vida. Reparo incompleto similar pode estar presente em outros tipos de tendão relacionados a lesões ou danos, tais como tendinite patelar (Joelho de Jumper), tendão de Aquiles (comum em corredores), e tendinite de manguito rotator (co-
25
30

mumente vista em atletas "aéreos" tais como arremessadores de beisebol).

A tendinopatia pode também ser causada, por exemplo, por idade avançada, dieta deficiente, atividades esportivas, trauma, lesões, ou fármacos tais como pefloxacina. Por exemplo, a tendinopatia induzida por prostaglandina E1 (PGE1)-, prostaglandina E2 (PGE2)- ou pefloxacina é um modelo animal bem-estabelecido de tendinopatia de ser humano. Em uma modalidade, a invenção provê métodos para tratar ou prevenir a tendinopatia induzida por fármacos tais como a tendinopatia induzida por pefloxacina em um indivíduo. Em outras modalidades exemplares, a invenção provê métodos para tratar ou prevenir a tendinopatia induzida por lesões e traumas relacionados ao superuso, esporte ou acidente, deficiências nutricionais e idade avançada.

A presente invenção ainda provê métodos para tratar ou prevenir distúrbio degenerativo do tendão, lenta deterioração do tendão, restaurar a qualidade do tendão, manter a saúde do tendão, tratar ou prevenir a degeneração hipóxica dos tecidos do tendão, tratar ou prevenir a degeneração hialina dos tecidos do tendão, tratar ou prevenir a degeneração mucóide ou mixóide dos tecidos do tendão, tratar ou prevenir a degeneração fibrinóide dos tecidos do tendão, tratar ou prevenir a degeneração lipóide dos tecidos do tendão, tratar ou prevenir a calcificação de tecidos do tendão, tratar ou prevenir a fibrocartilaginose e metaplasia óssea de tecidos do tendão, manter a integridade microestrutural do tendão, manter a estrutura da fibra do tendão, manter a disposição da fibra no tendão, manter a vascularização normal do tendão, manter a celularidade normal em tecidos do tendão, restaurar o conteúdo ECM normal em tecidos do tendão, reduzir a acumulação patológica de GAG no tecido do tendão; e/ou manter a massa do tendão, a resistência de tração e/ou a qualidade da flexibilidade através da administração para um mamífero de um inibidor da atividade e/ou expressão de moléculas tais como CS-GalNAcT-1 , CS-GalNAcT-2, GalNT-1 , Xyl transferase, Gal transferase, GlcA transferase, GalNAc transferase, GlcNAc transferase, sulfotransferase, sintase de sulfato de condroitina, Col2a1 , agrecano, versicano, Hs3st1 , e/ou Sox9 em uma quantidade eficaz para prevenir ou reduzir a ati-

vidade e/ou expressão de tais moléculas em tecidos tendinopáticos.

6. Avaliação de Tratamento e Modelos Animais

Os métodos da invenção podem ser usados para tratar tendinopatia ou microdefeitos em tecidos do tendão. A qualidade do tendão em seguida ou durante um tratamento pode ser determinada, por exemplo, assessando a integridade microestrutural do tendão, imaculabilidade do colágeno do tendão, variação na celularidade do tecido do tendão, vascularização de tendão, e/ou conteúdo de GAG. Métodos para avaliação da saúde do tendão em seguida ou durante um tratamento são conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, imagem de ressonância magnética (MRI), ultrasonografia, e avaliações de dor e/ou funcional. Alternativamente, a saúde do tendão pode ser medida pela avaliação dos níveis de GAG no tecido do tendão.

Um ensaio para determinar o conteúdo de GAG do tendão é o ensaio de azul de 1,9- dimetilmetileno (DMMB) para a mensuração de concentrações de glicosaminoglicano sulfatado (GAG) no tendão. Outro ensaio para determinar o conteúdo de GAG do tendão é a tintura de azul Alcian histológico (AB) que pode ser usada para detectar o aumento da quantidade de GAG nos tecidos do tendão.

III. Métodos de Tratamento e Composições Farmacêuticas

Inibidores úteis nos métodos da invenção podem ser administrados localmente ou sistemicamente através de meio tópico, oral, intravenoso, intraperitoneal, intramuscular, intracavidade, subcutâneo, implante, ou transdérmico.

Em modalidades exemplares, a administração de um inibidor para um indivíduo pode também ser realizada por meio de terapia de genes, em que uma seqüência de ácido nucléico codificando o inibidor é administrada para o paciente *in vivo*. Em uma modalidade exemplar, um ácido nucléico compreendendo uma seqüência promotora e uma seqüência codificando um inibidor de ácido nucléico útil nos métodos da invenção, é inserido em um vetor de expressão de adenovírus. O adenovírus é depois injetado diretamente no tendão de um paciente, onde o inibidor de ácido nucléico é

expresso. Exemplos de distribuição, mediada por adenovírus, de ácidos nucleicos para o tecido do tendão são descritos, por exemplo, em Mehta et al., J Hand Surg 30A(1):136-41 (2005); Lou et al., J Orthoped Res 19:1199-1202 (2001), e Lou, Clin Orthopaed Rel Res 379S:S252- 55 (2000).

5 Em outras modalidades exemplares, o inibidor de ácido nucléico é incorporado em outros vetores de expressão viral, tais como, por exemplo, lentivírus, herpesvírus, e adeno-associados-vírus. O vetor apropriado pode ser escolhido pela avaliação da infectividade *in vitro* de cada tipo de vírus em células primárias do tendão.

10 Alternativamente, um inibidor de ácido nucléico é injetado no tecido do tendão diretamente, e transferido para as células por electroporação, como descrito em Schiffelers et al., Arthritis & Rheumatism 52(4):1314-18 (2005).

 Em outras modalidades exemplares, inibidores de peptídeos ou
15 de molécula pequena úteis nos métodos da invenção podem ser revestidos em placas transdérmicas e aplicados diretamente na pele cobrindo o tecido do tendão, como descrito em Paoloni et al., J Bone Joint Surg 86A(5):916-22 (2004).

 Métodos de administração de moléculas para o tratamento de
20 tendinopatia são conhecidos na técnica. A "Administração" não está limitada a qualquer sistema de distribuição particular e pode incluir, sem limitação, parenteral (incluindo injeção subcutânea, intravenosa, intramedular, intrarticular, intramuscular, intracavidade, ou intraperitoneal) retal, tópica, transdérmica, ou oral (por exemplo, em cápsulas, suspensões, ou comprimidos).
25 A administração para um indivíduo pode ocorrer localmente ou sistemicamente em uma dose única ou em administrações repetidas contínuas ou intermitentes, e em qualquer uma dentre uma variedade de formas de sal aceitáveis fisiologicamente, e/ou com um veículo farmacêutico aceitável e/ou aditivo como parte de uma composição farmacêutica (descrita antes). For-
30 mas de sal aceitáveis fisiologicamente e técnicas e excipientes de formulação farmacêutica padrão são bem-conhecidos das pessoas versadas na técnica. Vide, por exemplo, Physicians' Desk Reference (PDR) 2003, 57th

ed., Medical Economics Company, 2002; e Remington: The Science and Practice of Pharmacy, eds. Gennado et al., 20th ed, Lippincott, Williams & Wilkins, 2000).

Inibidores úteis nos métodos da invenção podem ser administrados em uma dosagem de cerca de 1 µg/kg a cerca de 20 mg/kg, dependendo da gravidade dos sintomas e do progresso da doença. A dose eficaz apropriada é selecionada através de tratamento clínico a partir das seguintes variações: cerca de 1 µg/kg a cerca de 20 mg/kg, cerca de 1 µg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 1 µg/kg a cerca de 1 mg/kg, cerca de 10 µg/kg a cerca de 1 mg/kg, cerca de 10 µg/kg a cerca de 100 µg/kg, cerca de 100 µg a cerca de 1 mg/kg, e cerca de 500 µg/kg a cerca de 1 mg/kg, por exemplo.

Em outra modalidade exemplar, um inibidor é administrado repetidamente por um período de pelo menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 20, ou 40 semanas ou por pelo menos 1, 1,5, ou 2 anos ou até o tempo de vida do sujeito como, por exemplo, para o tratamento de tendinopatia. Em outra modalidade da invenção, um inibidor pode ser administrado em uma dose única, por exemplo para estimular a restauração da estrutura e composição normais do tendão.

Geralmente, inibidores úteis nos métodos da invenção podem ser administrados em uma dose entre 10^{-8} e 10^{-7} ; 10^{-7} e 10^{-6} ; 10^{-6} e 10^{-5} ; ou 10^{-5} e 10^{-4} g/kg. Dosagens terapeuticamente eficazes alcançadas em um modelo animal podem ser convertidas para uso em outro animal, incluindo seres humanos, usando fatores de conversão conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Freireich et al., Cancer Chemother Reports 50(4):219-244 (1966).

A dosagem exata de um inibidor para ser usada nos métodos da invenção é determinada empiricamente com base no(s) resultado(s) desejado(s). Resultados exemplares incluem: (1) o distúrbio degenerativo do tendão é tratado ou prevenido; (2) a deterioração do tendão é diminuída; (3) a qualidade do tendão é restaurada; (4) a saúde do tendão é mantida; (5) a degeneração hipóxica do tendão é tratada ou prevenida; (6) a degeneração hialina do tendão é tratada ou prevenida; (7) a degeneração mucóide ou mi-

xióide do tendão é tratada ou prevenida; (8) a degeneração fibrinóide do tendão é tratada ou prevenida; (9) a degeneração lipóide do tendão é tratada ou prevenida; (10) a calcificação do tendão é tratada ou prevenida; (11) a metaplasia fibrocartilaginosa e óssea do tendão é tratada ou prevenida; (12) a estrutura da fibra do tendão é mantida; (13) a disposição das fibras no tendão é mantida; (14) a vascularidade normal do tendão é mantida; (15) a celularidade normal do tendão é mantida; (16) o conteúdo ECM normal do tendão é restaurado; e/ou (17) a qualidade de massa, resistência à tração e/ou flexibilidade do tendão é mantida. Por exemplo, um inibidor é administrado em uma quantidade eficaz para diminuir a deterioração do tendão (por exemplo, perda de massa do tendão, formação estrutural e/ou susceptibilidade a microrrompimentos e dor) por pelo menos 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, ou 500%.

Em algumas modalidades, as composições usadas nos métodos da invenção ainda compreendem um excipiente farmacologicamente aceitável. Como usado aqui a seguir, a frase "excipiente farmacologicamente aceitável" refere-se a qualquer um ou todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardo da absorção, e os similares, que são compatíveis com a administração farmacêutica. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacologicamente ativas são bem-conhecidos na técnica. As composições podem também conter outros compostos ativos que provêm funções suplementares, adicionais ou terapêuticas aumentadas. As composições farmacêuticas podem também ser incluídas em um recipiente, compressa, ou dispensador, junto com as instruções para administração.

Uma composição farmacêutica para ser administrada em conjunto com os métodos da invenção deverá ser formulada para ser compatível com suas vias de administração pretendidas. Exemplos de tais formulações incluem formulações de proteína cristalina, provida só ou em combinação com polímeros biodegradáveis (por exemplo, PEG, PLGA).

Um inibidor útil nos métodos da invenção pode ser administrado como uma composição farmacêutica em conjunto com géis e matrizes de

veículo ou outras composições usadas para a regeneração de osso orientada, e / ou substituição do osso. Exemplos de tais matrizes incluem polietileno glicol sintético (PEG), hidroxiapatita, matrizes de colágeno e baseadas em fibrina, goma de fibrina Tisseel® etc.

5 Em certas modalidades os inibidores podem ser administrados em combinação ou concomitantemente com outros compostos terapêuticos, tais como, por exemplo, NSAIDs, corticosteróides, óxido nítrico, testosterona, estrógeno, fatores de crescimento (por exemplo, BMP-12, BMP-13, e MP52).

10 Inibidores úteis nos métodos da invenção podem ser revestidos sobre, ou incorporados nos implantes de tendão, matrizes, e sistemas de depósito de modo a promover o tratamento ou a prevenção de lesões de tendão.

EXEMPLOS

15 Exemplo 1: Tendão Supra-espinhal de Rato Expressa Formadores de Cartilagem Com Superuso

A resposta do tendão supra-espinhal do rato ao superuso foi estudada a nível molecular usando perfis transcricionais. Um modelo de tendão de rato de superuso foi anteriormente descrito, Soslowsky et al., J Shoulder
20 Elbow Surg 9:79-84 (2000). Foi mostrado que formadores angiogênicos e inflamatórios são alterados nesse modelo (Perry et al., J Shoulder Elbow Surg 14:79S-83S (2005)), porém uma abordagem mais ampla foi empreendida para compreender os eventos em torno da lesão por superuso.

Vinte e quatro ratos machos Sprague-Dawley (400-450 g) foram
25 submetidos a um protocolo de superuso do tendão supra-espinhal (SST), por 1 semana (n=8), 2 semanas (n=8), e 4 semanas (n=8). O protocolo consiste no funcionamento em declive (10% de graus) a 17 m/min por 1 hora/dia, 5 dias/semana. Um adicional de seis ratos foi usado como controles de atividade em gaiola (0 hora). Em cada ponto do tempo, dois ratos adicionais, que
30 não corriam, foram usados para controles de bando combinados por idade.

Na necropsia, os tendões supra-espinhais de cada ombro e os tendões patelares (PT) de cada joelho foram removidos. O tendão patelar

serviu como um controle interno do efeito do exercício, porque ele não mostrou sinais grosseiros de superuso com este protocolo. Os tendões colhidos foram pesados e congelados instantaneamente em nitrogênio líquido. Os tecidos foram congelados-fraturados e extraídos com o reagente TRIzol (Invitrogen). O RNA foi isolado da fase aquosa do extrato usando um *kit* RNeasy (QIAGEN). As concentrações de RNA foram determinadas usando um espectrofotômetro. O perfil transcricional para monitorar o nível de expressão de mais de 30.000 transcritos foi realizado com uma rede de 230 2,0 genomas de rato Affymetrix. Todas as imagens da rede foram visualmente inspecionadas para verificar defeitos e qualidade. Redes com altos antecedentes, intensidade de sinal baixa ou maiores defeitos foram eliminadas de análises adicionais. Os valores de sinal foram determinados usando Gene Chip Operating System 1,0 (GCOS, Affymetrix). Para cada rede, os valores estatísticos foram normalizados para um valor de intensidade de sinal médio de 100. Os valores estatísticos do GCOS foram usados para todas as análises. Um gene era considerado detectável se a expressão do meio em qualquer tecido fosse maior do que 100 unidades de sinal, e a percentagem de amostras com uma chamada Presente (P) como determinado pelos ajustes de padrão de GCOS foi maior ou igual a 66%. Valores de sinal normalizados foram transformados para base de log 10. Um gene era considerado como sendo diferencialmente expresso se o valor de p de um teste de ANOVA fosse $<0,01$ e a diferença entre corrida e controle, pelo menos 2 vezes em qualquer ponto de tempo.

Mais de 400 genes foram diferencialmente regulados no tendão supra-espinhal depois do superuso. Por 4 semanas de corrida 107 genes foram supra-regulados e 27 genes foram infra-regulados. Do topo de genes supra-regulados, muitos são altamente expressos em tecidos de cartilagem, incluindo colágeno tipo II alfa 1, versicano, e agrecano. Esses resultados sugerem que o tendão superusado foi convertido em um fenótipo de fibrocartilagem. Esses mesmos genes não foram supra-regulados nos tendões patelares dos animais que estavam correndo (vide figuras 1-7).

Exemplo 2: Preparação de Inibidor de siRNA ,

Um siRNA é selecionado introduzindo a sequência de nucleotídeos em CS- GalNAcT-1 , GalNT-1 , ou Hs3st1 em um "website" comercial para projetar siRNAs específicos (por exemplo sirnawizard.com ou Ambion® siRNA Target Finder). As diretrizes para seleção de sequências estão embu-

5 tidas nessas ferramentas.

A eficácia do siRNA é medida ao transfectá-la para dentro de células de condrócitos C- 20/A4 e/ou C-28/I2 e monitorando a expressão de CS- GalNAcT-1 e/ou GalNT-1 em tempo real RT-PCR. A mistura apropriada

10 de siRNA com a mesma composição de nucleotídeo é usada em controle experimental.

Exemplo 3: Sistema de Ensaio In vitro para Inibidor de Síntese de Proteoglicano

Se o siRNA é capaz de reduzir a expressão de CS-GalNAcT-1,

15 GalNT-1 , ou Hs3st1 nas células de condrócitos C-20/A4 e/ou C-28/I2, sua capacidade de reduzir a produção de cadeias laterais de GAG de proteoglicano é depois testada. As células de condrócitos C- 20/A4 e / ou C-28/I2 são tratadas com a proteína BMP-2 ou um adenovírus expressando BMP-2 para estimular a matriz extracelular e a síntese de GAG. O siRNA ou, alternativa-

20 mente, a molécula pequena inibidora de síntese de GAG, é adicionada para a cultura, e o efeito do inibidor é avaliado por comparar 35S incorporações em proteoglicanos na presença ou ausência do inibidor. Alternativamente, o efeito do inibidor é avaliado por comparar os níveis de GAG na presença ou ausência do inibidor com o ensaio DMMB, como descrito em Arai et al., Osteoarthritis and Cartilage 12:599-613 (2004).

25

Exemplo 4: Protocolo para Tratamento de Tendinopatia por Inibição de siRNA de CS-GalNAcT-1 , GalNT-1, ou Hs3st1

A tendinopatia é induzida em ratos ou com um protocolo de superuso exaustivo (Exemplo 1) ou injeção local de PGE1 , PGE2 ou Pefloxacina (300 mg/ml), cinco vezes por semana durante 1 semana.

30

Uma vez descoberto um siRNA para reduzir a atividade de CS-GalNAcT-1 , GalNT-1 , ou Hs3st1 **in vitro**, ele é convertido em shRNA e a

seqüência de shRNA é clonada e inserida em um adenovírus, como descrito, por exemplo, em Krom et al., BMC Biotech 6(11):[e-publiished]. O adenovírus é usado para a expressão **in vivo** do shRNA e inibição subsequente da expressão de CS-GalNAcT-1 e / ou GalNT-1. Os métodos de infecção são oti-

5 mizados em células de tendão primárias.

O adenovírus funcional que expressa o shRNA é diretamente injetado no tendão lesionado (Mehta et al., J Hand Surg 30A(1):136-41 (2005)) para localmente reduzir a expressão dos genes CS-GalNAcT-1 e/ou GalNT- 1. As seqüências de misturas são incluídas como controles experi-
10 mentais. A quantidade de formação de tecido de cartilagem nos tendões é avaliada por níveis de avaliação de GAG. A tintura Azul Histológica Alciana é usada para detectar quantidades aumentadas de glicosaminoglicano (GAG) no tecido do tendão. O reagente DMMB é usado para quantificar a quantidade e GAGs sulfatados extraídos do tendão.

15 Avaliações **in vivo** do efeito da inibição de CS-GalNAcT-1 e/ou GalNT-1 em tendinopatia são determinadas por histologia e teste mecânico ou funcional da resistência do tendão. Um inibidor é considerado eficaz se os níveis de GAG são significativamente reduzidos quando comparados com controles não tratados e / ou são reduzidos para níveis similares até nor-
20 mais, no tendão danificado. Alternativamente, um inibidor é considerado eficaz se os testes funcionais ou mecânicos demonstram função melhorada e/ou redução da dor, quando comparado com controles que não foram tratados.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de tratar tendinopatia em um paciente compreendendo reduzir a formação de proteoglicanos específicos de cartilagem no tecido do tendão do paciente.

5 2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o paciente é um ser humano.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o paciente é selecionado do grupo que consiste em primatas, macacos, roedores, carneiros, coelhos, cães, porquinhos-da-Índia, cavalos, vacas e gatos.

10 4. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo reduzir a atividade de uma enzima envolvida na síntese de um proteoglicano selecionado do grupo que consiste em agregano, versicano, e sindecano-3 no tecido do tendão do paciente.

15 5. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo reduzir a atividade do sulfato de condroitina N-acetilgalactosaminiltransferase 1 (CS-GalNAcT-1) e / ou polipeptídeo de galactosamina N-acetilgalactosaminiltransferase 1 (GalNT-1) no tecido do tendão do paciente.

20 6. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a atividade é reduzida por inibir a atividade enzimática de CS-GalNAcT-1, CS-GalNAcT-2, Hs3st1, e/ou GalNT-1.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a atividade é reduzida por inibir a expressão dos genes de CS-GalNAcT-1, CS-GalNAcT-2, Hs3st1, e/ou GalNT-1.

25 8. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo reduzir a atividade de um fator de transcrição envolvido na produção de cartilagem.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, compreendendo reduzir a atividade de Sox9.

30 10. Método de acordo com a reivindicação 9, em que a atividade é reduzida por inibir a capacidade de Sox9 para aumentar a expressão de genes específicos da cartilagem.

11. Método de acordo com a reivindicação 8, em que a atividade

é reduzida pela inibição da expressão do gene Sox9.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo reduzir a expressão de proteínas específicas da cartilagem.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, compreendendo
5 reduzir a expressão de um proteoglicano selecionado do grupo que consiste em agrecano, versicano, e sindecano-3.

14. Método de acordo com a reivindicação 12, compreendendo reduzir a expressão de Col2a1.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a tendino-
10 patia é tendinite.

16. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a tendino-
patia é tendinose.

17. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a tendino-
patia é uma lesão do tendão.

18. Método de tratar tendinopatia em um paciente compreen-
15 dendo administrar um inibidor de CS-GalNAcT-1, CS-GalNAcT-2, GalNT-1, Hs3st1, e/ou Sox9 para o tecido do tendão em um paciente.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, em que o inibidor
reduz a atividade enzimática de CS-GalNAcT-1 e/ou GalNT-1.

20. Método de acordo com a reivindicação 18, em que o inibidor
20 reduz a expressão de CS-GalNAcT- 1 e/ou GalNT-1.

21. Método de acordo com a reivindicação 18, em que o inibidor
é administrado localmente.

22. Método de acordo com a reivindicação 18, em que o inibidor
25 compreende a interferência de uma molécula de RNA.

23. Método de acordo com a reivindicação 18, em que o inibidor
compreende uma molécula pequena.

24. Método de tratar tendinopatia em um paciente compreen-
dendo reduzir a expressão de proteínas específicas da cartilagem no tecido
30 do tendão do paciente.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, compreendendo
inibir a expressão de agrecano, versicano, e / ou colágeno tipo II.

26. Método de acordo com a reivindicação 24, compreendendo inibir a expressão de Sox9.

27. Método de acordo com a reivindicação 24, compreendendo inibir a atividade de Sox9.

5 28. Método para identificar um agente para tratar tendinopatia compreendendo administrar um agente de teste para um sujeito com necessidade de tratamento, e mensuração da capacidade do agente para inibir a atividade de uma enzima envolvida na biossíntese de glicoglicosaminoglicanos (GAGs) em tecido de tendão.

10 29. Método de identificar um composto útil no tratamento de tendinopatia compreendendo administrar um composto de teste para um sujeito com necessidade de tratamento e mensuração da capacidade do composto para inibir a atividade de uma enzima envolvida na síntese de glicoglicosaminoglicanos em tecido de tendão.

15 30. Método de acordo com a reivindicação 29 compreendendo adicionalmente as etapas de

(a) prover pelo menos um componente de amostra selecionado do grupo que consiste em CS-GalNAcT-1, CS-GalNAcT-2, sulfato de heparina (glucosamina) 3-O-sulfotransferase 1, GalNT-1, e Sox9;

20 (b) combinar a amostra com um composto de teste;

(c) medir a atividade do componente de amostra em resposta ao composto de teste; e

(d) determinar se o composto de teste inibe a atividade do componente de amostra.

25 31. Uso de um composto que reduz a formação de proteoglicanos específicos da cartilagem na fabricação de um medicamento para tratar tendinopatia.

30 32. Uso de acordo com a reivindicação 31, em que o composto reduz a atividade de uma enzima, ou outra proteína, envolvida na síntese da cartilagem.

33. Uso de acordo com a reivindicação 32, em que o composto direta ou indiretamente inibe a função da enzima ou proteína.

34. Uso de acordo com a reivindicação 32 ou 33, em que o composto inibe a expressão da enzima ou proteína.

35. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 a 34, em que a enzima é selecionada do grupo que consiste em UDP-D-xilose: proteína de núcleo β -D- xilosiltransferases, Gal transferases, GlcA transferases, GlcNAc transferases, sulfotransferases, sintase de sulfato de condroitina e sulfotransferases de sulfato de heparina.

36. Uso de acordo com a reivindicação 35, em que a enzima é selecionada do grupo que consiste em sulfato de condroitina N-acetilgalactosaminiltransferase 1 (CS-Gal NAcT-1), sulfato de condroitina N-acetilgalactosaminiltransferase 2 (CS- GalNAcT-2), polipeptídeo de galactosamina N-acetilgalactosaminiltransferase 1 (GalNAcT-1), e sulfato de heparina (glucosamina) 3-O-sulfotransferase 1 (Hs3st1).

37. Uso de acordo com a reivindicação 31, em que o composto reduz a expressão de uma proteína estrutural específica da cartilagem.

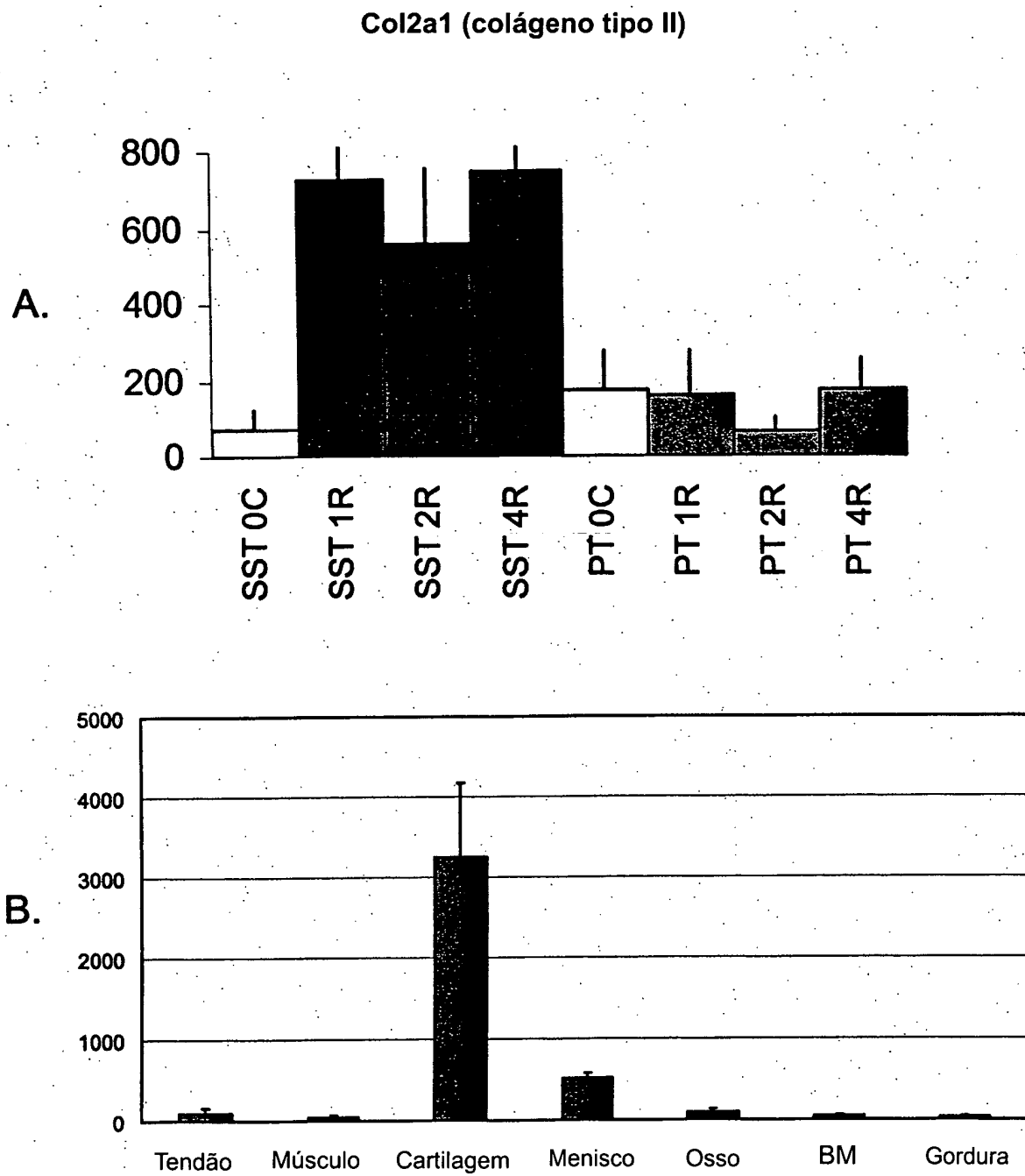
38. Uso de acordo com a reivindicação 31, em que o composto reduz a atividade de fatores de transcrição envolvidos na expressão da proteína estrutural específica da cartilagem.

39. Uso de acordo com a reivindicação 38, em que o fator de transcrição é Sox9.

40. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 39, em que o proteoglicano é selecionado do grupo consistindo de agrecano, versicano, sindecano-3, e colágeno tipo II.

41. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 40, em que a tendinopatia é selecionada do grupo consistindo em tendonite, tendinite, tendinose, paratendinite, tenossinovite, lesão de tendão, trauma de tendão, peritendinite, e paratenonite.

42. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 41, em que o medicamento que é administrado para um paciente é selecionado do grupo que consiste em primatas, macacos, roedores, carneiros, coelhos, cães, porquinhos-da-Índia, cavalos, vacas e gatos.

**FIG. 1**

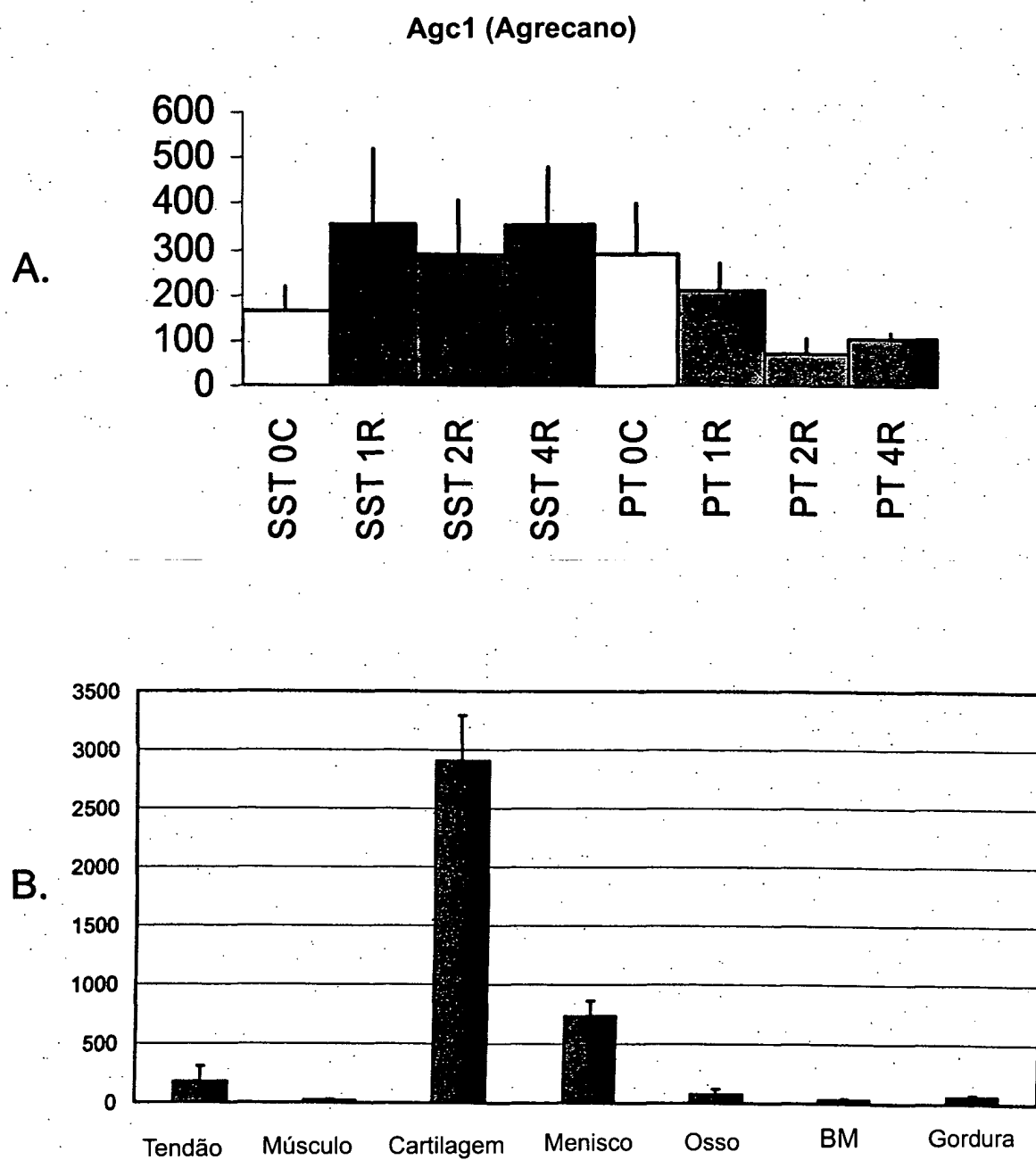


FIG. 2

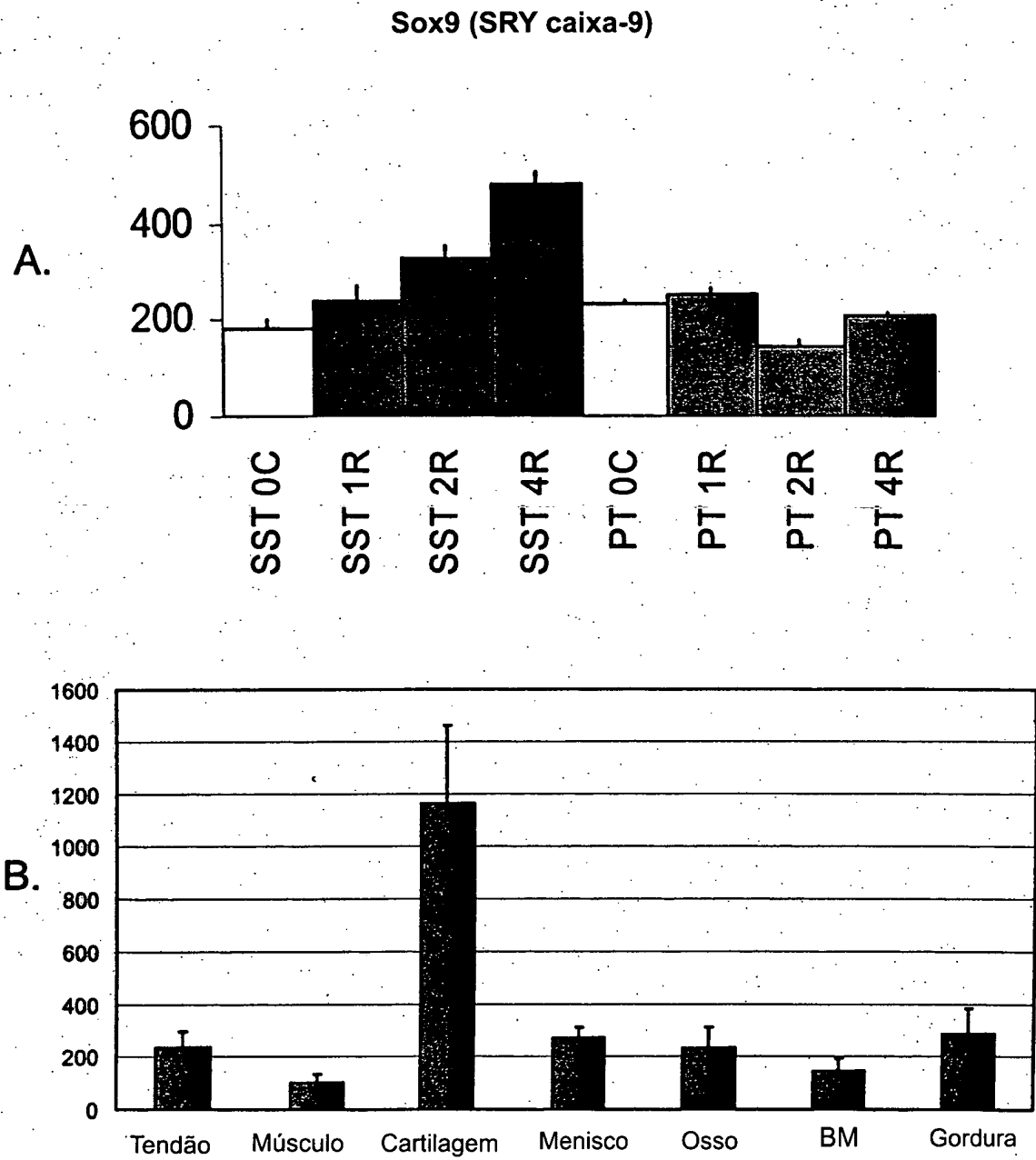


FIG. 3

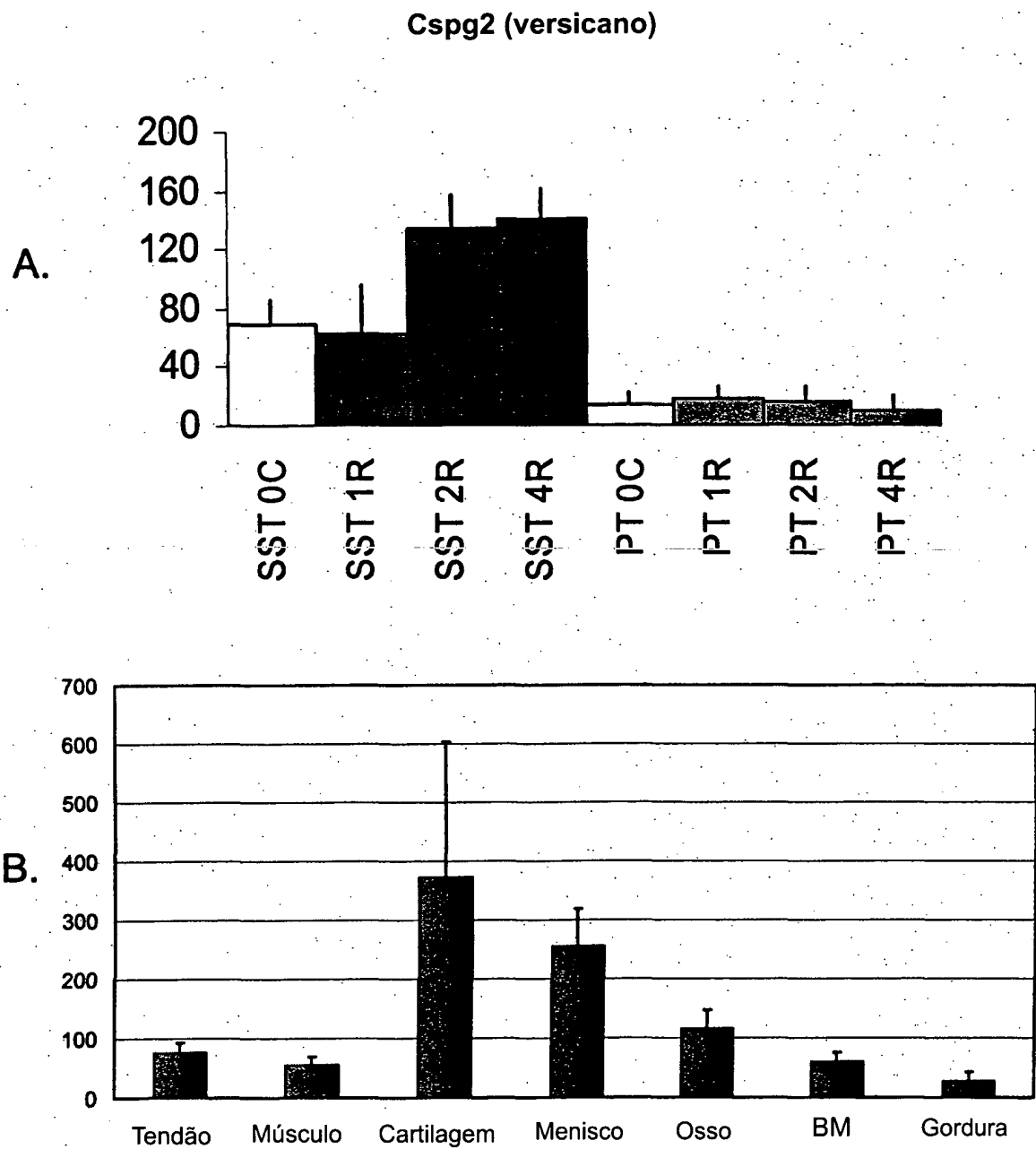
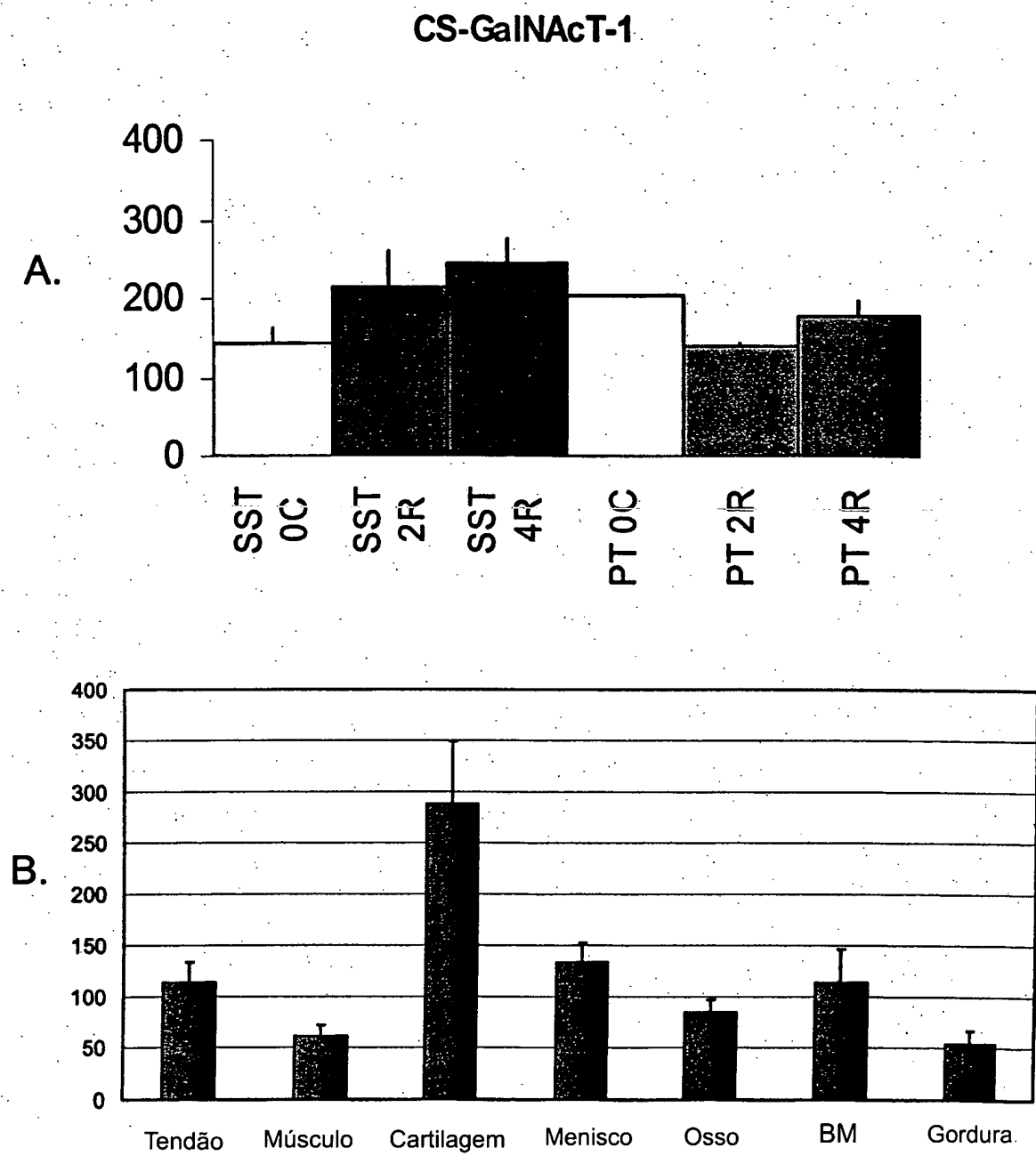


FIG. 4

**FIG. 5**

GaINT-1

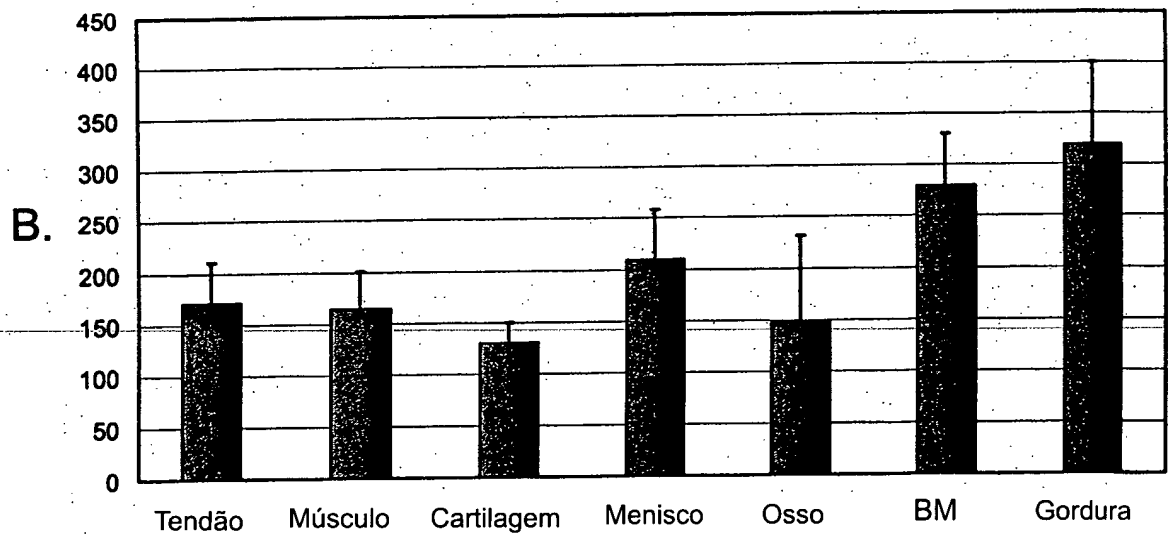
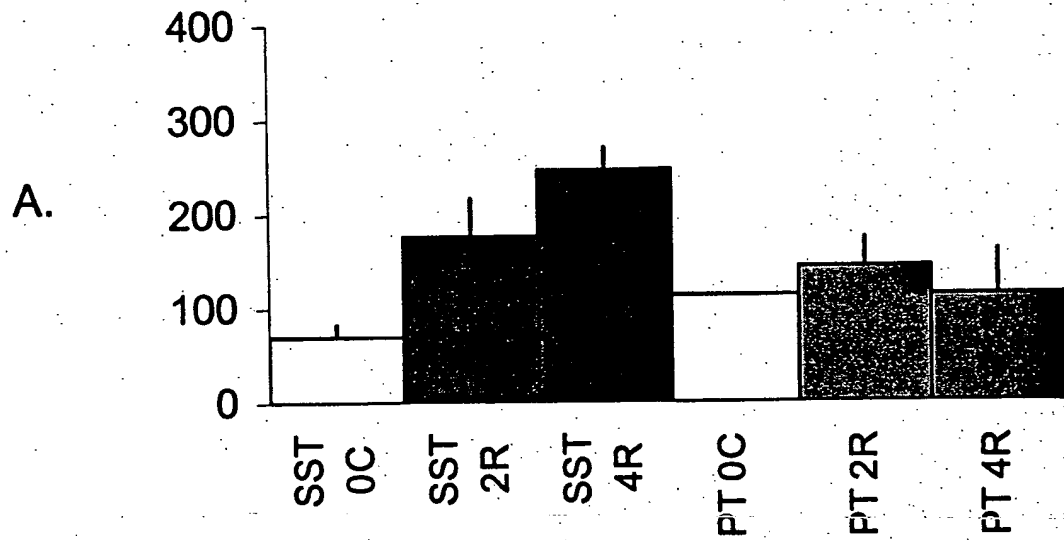


FIG. 6

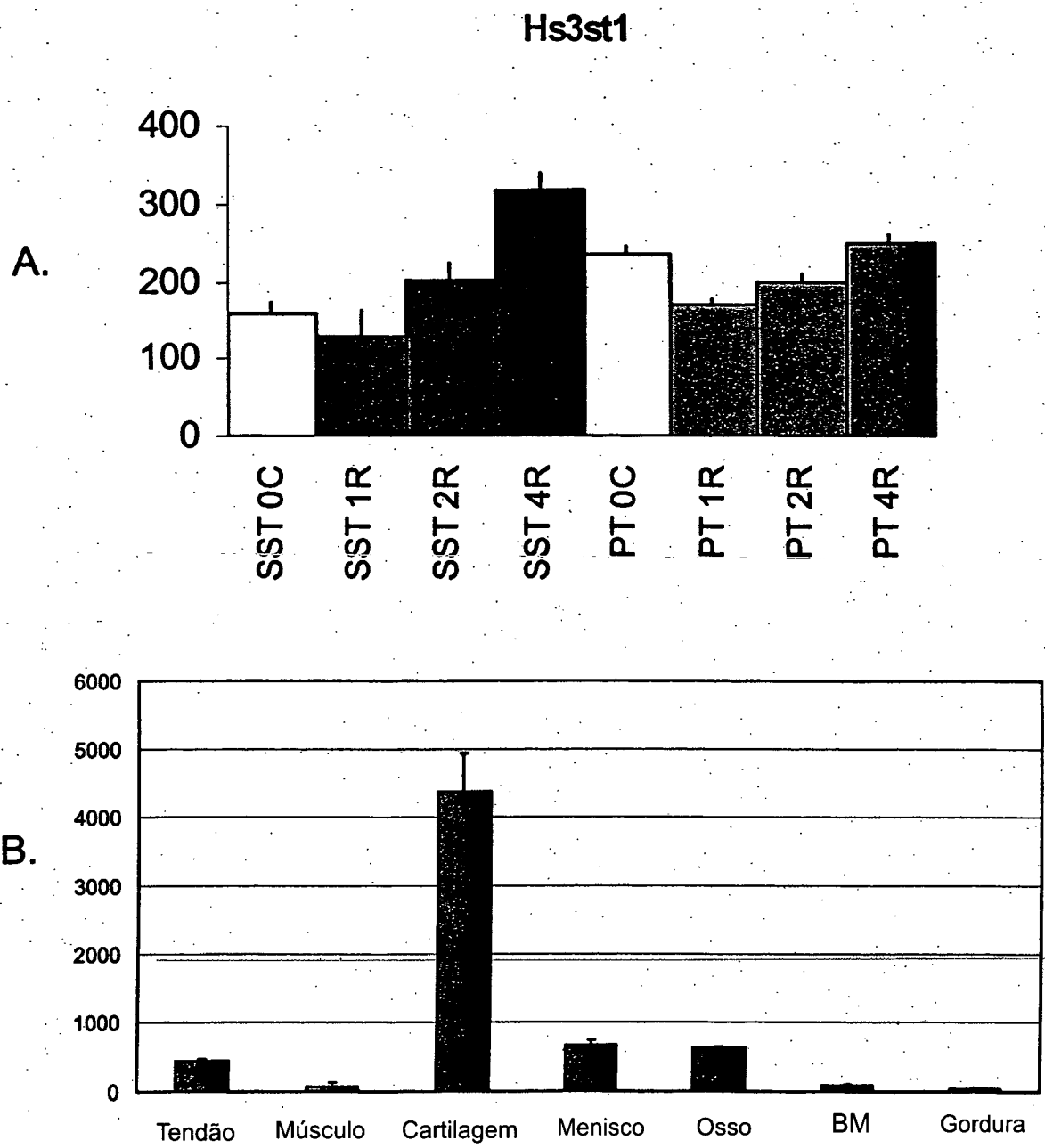


FIG. 7

RESUMO

Patente de Invenção: **"TRATAMENTO DA TENDINOPATIA POR INIBIÇÃO DE MOLÉCULAS QUE CONTRIBUEM PARA A FORMAÇÃO DE CARTILAGEM"**.

- 5 A presente invenção refere-se a métodos para tratar a tendinopatia. Os distúrbios tratados ou prevenidos incluem, por exemplo, tendinite, tendinose, paratendinite, tenossinovite, lesão por uso excessivo e trauma do tendão, peritendinite, e paratenonite, ou outros distúrbios degenerativos do tendão. Os métodos terapêuticos descritos incluem administrar para um pa-
- 10 ciente um inibidor de moléculas envolvidas na formação de cartilagem ou fibrocartilagem em tendão tendinopático, em uma quantidade eficaz para tratar ou prevenir um distúrbio degenerativo do tendão, deterioração lenta do tendão, restaurar a estrutura sadia do tendão, estimular a regeneração do tendão e / ou manter a massa do tendão e/ou a qualidade.