

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 322**

51 Int. Cl.:

A61K 31/58 (2006.01)

A61P 7/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2010 E 10792567 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2012 EP 2326332**

54 Título: **Método para el tratamiento de enfermedades**

30 Prioridad:

18.03.2010 US 315350 P

22.06.2009 US 219185 P

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

15.03.2013

73 Titular/es:

**DMI ACQUISITION CORP. (100.0%)
8400 E. Crescent Parkway, Suite 600
Greenwood Village, CO 80111, US**

72 Inventor/es:

BAR-OR, DAVID

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 398 322 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para el tratamiento de enfermedades

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un compuesto para su uso en el tratamiento del edema macular y otros efectos adversos que son el resultado del mismo, en el que el compuesto es danazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

Antecedentes

El endotelio vascular reviste el interior de todos los vasos sanguíneos. Actúa como interfaz entre la sangre y los tejidos y órganos. El endotelio forma una barrera semipermeable que mantiene la integridad del compartimiento del fluido sanguíneo, pero permite el paso de manera regulada de agua, iones, moléculas pequeñas, macromoléculas y células. La desregulación de este proceso produce la fuga vascular a los tejidos subyacentes. La fuga de fluido a los tejidos que provoca edema puede tener consecuencias graves y peligrosas para la vida en una variedad de enfermedades. Por consiguiente, resultaría muy deseable disponer de un método para reducir el edema, preferentemente en su etapa más temprana, y restaurar la barrera endotelial a la fisiológica.

20

Sumario de la invención

La invención proporciona un compuesto para su uso en un método de este tipo. En concreto, la invención proporciona una cantidad inhibitoria de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado de entre danazol y las sales farmacéuticamente aceptables de danazol, según la reivindicación 1 y una composición farmacéutica según la reivindicación 13. Las reivindicaciones dependientes contienen formas de realización ventajosas de la presente invención.

25

"Hiperpermeabilidad vascular" se utiliza en el presente documento para referirse a la permeabilidad de un endotelio vascular que está aumentada en comparación con los niveles basales. "Hiperpermeabilidad vascular", tal como se utiliza en el presente documento, incluye la hiperpermeabilidad de origen paracelular o la hiperpermeabilidad por transcitosis.

30

"Hiperpermeabilidad de origen paracelular" se utiliza en el presente documento para referirse a la hiperpermeabilidad vascular debida al transporte paracelular que está aumentada en comparación con los niveles basales. A continuación se describen otras características de la "hiperpermeabilidad de origen paracelular".

35

"Transporte paracelular" se utiliza en el presente documento para referirse al movimiento de iones, moléculas y fluidos a través de las uniones interendoteliales (IEJ) entre las células endoteliales de un endotelio.

40

"Hiperpermeabilidad por transcitosis" se utiliza en el presente documento para referirse a la hiperpermeabilidad vascular debida a la transcitosis que está aumentada en comparación con los niveles basales.

"Transcitosis" se utiliza en el presente documento para referirse al transporte activo de macromoléculas y constituyentes plasmáticos que acompañan la fase fluida a través de las células endoteliales del endotelio. A continuación se describen otras características de la "transcitosis".

45

"Nivel basal" se utiliza en el presente documento para referirse al nivel encontrado en un órgano o tejido normal.

50

"Inhibir", "que inhibe" y términos similares se utilizan en el presente documento para referirse a que reduce, retrasa o evita.

Un animal "necesita" tratamiento de acuerdo con la invención si el animal tiene actualmente una enfermedad o afección mediada por la hiperpermeabilidad vascular, presenta los primeros indicios de una enfermedad o afección de este tipo, o tiene una predisposición a desarrollar una enfermedad o afección de este tipo.

55

"Mediado" y términos similares se utilizan en el presente documento para referirse a que está debido a, que provoca, que implica o que es empeorada por, la hiperpermeabilidad vascular.

60 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra los niveles de DO medidos después de la incubación de las células HUVEC con danazol como una medida de su capacidad para evitar la proliferación inicial de las células endoteliales.

La Figura 2 muestra fotografías de las células HUVEC tomadas después de la incubación con danazol como una medida de su capacidad para evitar la formación de tubos en las células endoteliales. A = control; B = danazol 1 μ M, C = danazol 10 μ M, D = danazol 50 μ M y E = LY294002 50 μ M.

65

La Figura 3 muestra la fluorescencia medida después del tratamiento de las células HUVEC con danazol como una medida de su capacidad para evitar la invasión de las células endoteliales.

Descripción detallada de las formas de realización de la invención actualmente preferentes

- 5 El endotelio es un elemento de control clave que controla el intercambio de moléculas desde la sangre al parénquima tisular. Controla en gran medida la permeabilidad de un lecho vascular concreto a las moléculas transportadas por la sangre. La permeabilidad y la selectividad de la barrera celular endotelial son fuertemente dependientes de la estructura y del tipo de revestimiento endotelial de la microvasculatura en los diferentes lechos vasculares. Las células endoteliales que revisten los lechos microvasculares de diferentes órganos presentan una diferenciación estructural que se pueden agrupar en tres categorías morfológicas principales: sinusoidal, fenestrada y continua.
- 10 El endotelio sinusoidal (también denominado "endotelio discontinuo") tiene grandes espacios intercelulares e intracelulares y no tiene membrana basal, lo que permite un transporte mínimamente restringido de moléculas desde el lumen capilar al tejido y viceversa. El endotelio sinusoidal se encuentra en el hígado, el bazo y la médula ósea.
- 15 Los endotelios fenestrados se caracterizan por la presencia de un gran número de aberturas transcelulares circulares llamadas fenestraciones con un diámetro de 60 nm a 80 nm. Los endotelios fenestrados se encuentran en tejidos y órganos que requieren un rápido intercambio de moléculas pequeñas, que incluyen el riñón (glomérulos, capilares peritubulares y vasos rectos ascendentes), el páncreas, las glándulas suprarrenales, las glándulas endocrinas y el intestino. Las fenestraciones están cubiertas por finos diafragmas, a excepción las de los glomérulos maduros y sanos. Véase Ichimura et al., J. Am. Soc. Nephrol., 19:1463-1471 (2008).
- 20 Los endotelios continuos no contienen grandes espacios o fenestraciones. En su lugar, los endotelios continuos se caracterizan por una monocapa de células endoteliales sin interrupciones. La mayoría de los endotelios del cuerpo son endotelios continuos, y el endotelio continuo se encuentra en o alrededor del cerebro (barrera hematoencefálica), el diafragma, la musculatura duodenal, la grasa, el corazón, algunas zonas del riñón (microvasculatura papilar, vasos rectos descendentes), los vasos sanguíneos grandes, los pulmones, el mesenterio, los nervios, la retina (barrera hematorretiniana), el músculo esquelético, los testículos y otros tejidos y órganos del cuerpo.
- 25 El transporte endotelial en el endotelio continuo se puede considerar, en un sentido general, como producido por las vías paracelular y transcelular. La vía paracelular es la vía entre las células endoteliales, a través de las uniones interendoteliales (IEJ). En un endotelio continuo inalterado, el agua, los iones y las moléculas pequeñas se transportan paracelularmente por difusión y convección. Una cantidad significativa de agua (hasta el 40%) también cruza la barrera celular endotelial transcelularmente a través de los canales de membrana de transporte de agua llamados acuaporinas. Una variedad de estímulos pueden alterar la organización de las IEJ, generando de ese modo espacios en la barrera endotelial. La formación de estos espacios intercelulares permite el paso de fluido, iones, macromoléculas (por ejemplo, proteínas) y otros componentes plasmáticos entre las células endoteliales de manera no restringida. Esta hiperpermeabilidad de origen paracelular produce edema y otros efectos adversos que con el tiempo pueden provocar daños en los tejidos y órganos.
- 30 La vía transcelular es responsable del transporte activo de macromoléculas, tales como albúmina y otras proteínas plasmáticas, a través de las células endoteliales, un proceso conocido como "transcitosis". El transporte de macromoléculas se produce en las vesículas llamadas caveolas. Casi todos los endotelios continuos tienen abundantes caveolas, a excepción de los endotelios continuos situados en el cerebro y en los testículos, que tienen pocas caveolas. La transcitosis es un proceso en múltiples etapas que implica la sucesiva gemación y fisión de caveolas de la membrana plasmática y la translocación a través de la célula, seguido de acoplamiento y fusión con la membrana plasmática opuesta, donde la caveolas liberan su contenido al intersticio por exocitosis. La transcitosis es selectiva y está bien regulada en condiciones fisiológicas normales.
- 35 Existe una creciente toma de conciencia de la importancia fundamental de la vía transcelular. La transcitosis de proteínas plasmáticas, especialmente de albúmina, que representa el 65% de las proteínas plasmáticas, es de especial interés debido a su capacidad para regular el gradiente de presión oncótica transvascular. Como se puede entender entonces, el aumento de la transcitosis de albúmina y otras proteínas plasmáticas por encima de los niveles basales aumentará la concentración de proteínas tisulares de las mismas que, a su vez, hará que el agua se desplace a través de la barrera endotelial, produciendo de ese modo edema.
- 40 Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son también transportadas a través de las células endoteliales por transcitosis. En la hiperlipidemia, se ha detectado un aumento significativo en la transcitosis de las LDL como suceso inicial en la aterogénesis. Las LDL se acumulan en el espacio subendotelial, inmovilizadas dentro de la lámina basal expandida y la matriz extracelular. La acumulación subendotelial de lipoproteínas en la hiperlipidemia va seguida de una cascada de sucesos que dan como resultado la formación de la placa ateromatosa. Parece que lesiones ateroscleróticas avanzadas van acompañadas ocasionalmente de la apertura de las IEJ y el paso masivo incontrolado de LDL y albúmina.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

- Las complicaciones vasculares son las características distintivas de la diabetes. A nivel de los grandes vasos, la enfermedad parece ser expresada como una aceleración de un proceso aterosclerótico. Con respecto a la microangiopatía, las alteraciones en la microvasculatura de la retina, el glomérulo renal y los nervios provocan el mayor número de complicaciones clínicas, pero un número cada vez mayor de las investigaciones demuestran que la diabetes también afecta a la microvasculatura de otros órganos, tales como el mesenterio, la piel, el músculo esquelético, el corazón, el cerebro y el pulmón, provocando complicaciones clínicas adicionales. En todos estos lechos vasculares, los cambios en la permeabilidad vascular parecen representar una característica distintiva de la disfunción endotelial diabética.
- En el endotelio continuo, la hiperpermeabilidad capilar a las macromoléculas plasmáticas en la fase temprana de la diabetes se explica por la intensificación del transporte vesicular transendotelial (es decir, por el aumento de la transcitosis) y no por la desestabilización de las IEJ. Además, se ha descrito que las células endoteliales de los diabéticos, incluyendo las del cerebro, contienen un mayor número de caveolas en comparación con las normales, y las proteínas glicosiladas, especialmente la albúmina glicosilada, son absorbidas por las células endoteliales y transportadas por transcitosis a velocidades considerablemente mayores que sus formas nativas. Además, el aumento de la transcitosis de las macromoléculas es un proceso que continúa más allá de la fase temprana de la diabetes y que parece ser una causa del edema en los tejidos y órganos diabéticos durante la enfermedad si no se trata. Este edema, a su vez, conduce a daños en los tejidos y órganos. Se han descrito aumentos similares del transporte transcelular de macromoléculas en la hipertensión.
- La hiperpermeabilidad de origen paracelular también es un factor en la diabetes y en las complicaciones vasculares de la diabetes. Las IEJ de la vía paracelular incluyen las uniones adherentes (AJ) y las uniones estrechas (TJ). La diabetes modifica el contenido, la fosforilación y la localización de determinadas proteínas en las AJ y en las TJ, contribuyendo de ese modo al aumento de la permeabilidad de la barrera endotelial.
- En apoyo del análisis anterior y para mayor información, véanse Frank et al., *Cell Tissue Res.*, 335:41-47 (2009), Simionescu et al., *Cell Tissue Res.*, 335:27-40 (2009), Van den Berg et al., *J. Cyst. Fibros*, 7(6): 515-519 (2008); Viazzi et al., *Hypertens. Res.*, 31:873-879 (2008); Antonetti et al., Capítulo 14, páginas 340-342, en *Diabetic Retinopathy* (editado por J. Elia Duh, Humana Press, 2008), Felinski et al., *Current Eye Research.*, 30:949-957 (2005), Pascariu et al., *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(1):65-76 (2004); Bouchard et al., *Diabetologia*, 45:1017-1025 (2002); Arshi et al., *Laboratory Investigation*, 80(8):1171-1184 (2000); Vínorez et al., *Documenta Ophthalmologica*, 97:217-228 (1999); Oomen et al., *European Journal of Clinical Investigation*, 29:1035-1040 (1999); Vínorez et al., *Pathol. Res. Pract.*, 194:497-505 (1998); Antonetti et al., *Diabetes*, 47:1953-1959 (1998), Popov et al., *Acta Diabetol.*, 34:285-293 (1997); Yamaji et al., *Circulation Research*, 72:947-957 (1993); Vínorez et al., *Histochemical Journal*, 25:648-663 (1993); Beals et al., *Microvascular Research*, 45:11-19 (1993); Caldwell et al., *Investigative Ophthalmol. Visual Sci.*, 33(5):1610-1619 (1992).
- El transporte endotelial en el endotelio fenestrado también se produce por transcitosis y la vía paracelular. Además, el transporte endotelial se produce por medio de las fenestraciones. Los endotelios fenestrados presentan una permeabilidad muy alta al agua y a los solutos hidrófilos pequeños debido a la presencia de las fenestraciones.
- Las fenestraciones pueden estar cubiertas por un diafragma o no estarlo. Las ubicaciones de endotelio con fenestraciones con diafragma incluyen el tejido endocrino (por ejemplo, los islotes pancreáticos y la corteza suprarrenal), la mucosa gastrointestinal y los capilares peritubulares renales. La permeabilidad a las proteínas plasmáticas del endotelio con fenestraciones con diafragma no supera la del endotelio continuo.
- Las ubicaciones de endotelio con fenestraciones sin diafragma incluyen los glomérulos renales. El endotelio glomerular fenestrado está cubierto por un glicocáliz que se extiende al interior de las fenestraciones (formando los denominados "tapones de criba") y por una capa de glicoproteínas superficial de células endoteliales más estrechamente asociadas. Los análisis matemáticos de los estudios de permeabilidad selectiva funcional han concluido que el glicocáliz de las células endoteliales glomerulares, incluyendo el presente en las fenestraciones, y su capa superficial asociada, supone la retención de hasta un 95% de las proteínas plasmáticas dentro de la circulación.
- Se ha descubierto que la pérdida de fenestraciones en el endotelio glomerular está asociada con la proteinuria en varias enfermedades, que incluyen la nefropatía diabética, la glomerulopatía del trasplante, la preeclampsia, la diabetes, la insuficiencia renal, la nefropatía por ciclosporina, la nefritis por enfermedad del suero y la nefritis por Thy-1. Se ha descubierto que el reordenamiento de la actina y, en concreto, la despolimerización de las fibras de estrés es importante para la formación y el mantenimiento de las fenestraciones.
- En apoyo del análisis anterior acerca de los endotelios fenestrados y para obtener información adicional, véanse Satchell et al., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 296:F947-F956 (2009); Haraldsson et al., *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 18:331-335 (2009); Ichimura et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 19:1463-1471 (2008); Ballermann, *Nephron Physiol.*, 106:19-25 (2007); Toyoda et al., *Diabetes*, 56:2155-2160 (2007); Stan, "Endothelial Structures Involved In Vascular Permeability", páginas 679-688, *Endothelial Biomedicine* (ed. Aird, Cambridge University Press, Cambridge, 2007); Simionescu y Antohe, "Functional Ultrastructure of the Vascular Endothelium: Changes in Various Pathologies", páginas 42-69, *The Vascular Endothelium I* (eds. Moncada and Higgs, Springer-Verlag, Berlín, 2006).

El transporte endotelial en el endotelio sinusoidal se produce por transcitosis y a través de los espacios intercelulares (hendiduras interendoteliales) y los espacios intracelulares (fenestraciones). El tratamiento del endotelio sinusoidal con fármacos que alteran los filamentos de actina puede inducir un aumento rápido y considerable del número de espacios, lo que indica la regulación de la porosidad del revestimiento endotelial por el citoesqueleto de actina. Se ha descrito que otros fármacos que alteran el citoesqueleto cambian los diámetros de las fenestraciones. Por lo tanto, el citoesqueleto asociado a las fenestraciones probablemente controla la importante función de filtración endotelial en el endotelio sinusoidal. En el hígado, se ha asociado la defenestración (pérdida de fenestraciones), que provoca una reducción de la permeabilidad del endotelio, con la patogénesis de varias enfermedades y afecciones, que incluyen el envejecimiento, la aterogénesis, la aterosclerosis, la cirrosis, la fibrosis, la insuficiencia hepática y los cánceres hepáticos primario y metastásico. En apoyo de lo anterior y para obtener información adicional, véanse Yokomori, *Med. Mol. Morphol.*, 41:1-4 (2008); Stan, "Endothelial Structures Involved In Vascular Permeability", páginas 679-688, *Endothelial Biomedicine* (ed. Aird, Cambridge University Press, Cambridge, 2007); DeLeve, "The Hepatic Sinusoidal Endothelial Cell", páginas 1226-1238, *Endothelial Biomedicine* (ed. Aird, Cambridge University Press, Cambridge, 2007); Pries and Kuebler, "Normal Endothelium", páginas 1-40, *The Vascular Endothelium I* (eds. Moncada and Higgs, Springer-Verlag, Berlín, 2006); Simionescu y Antohe, "Functional Ultrastructure of the Vascular Endothelium: Changes in Various Pathologies", páginas 42-69, *The Vascular Endothelium I* (eds. Moncada and Higgs, Springer-Verlag, Berlín, 2006); Braet y Wisse, *Comparative Hepatology*, 1:1-17 (2002); Kanai et al., *Anat. Rec.*, 244:175-181 (1996); Kempka et al., *Exp. Cell Res.*, 176:38-48 (1988); Kishimoto et al., *Am. J. Anat.*, 178:241-249 (1987).

Se describe un método de inhibición de la hiperpermeabilidad vascular presente en cualquier tejido u órgano que contiene o que está rodeado por el endotelio continuo. Como se ha señalado anteriormente, el endotelio continuo está presente en o alrededor del cerebro (barrera hematoencefálica), el diafragma, la musculatura duodenal, la grasa, el corazón, algunas zonas del riñón (microvasculatura papilar, vasos rectos descendentes), los vasos sanguíneos grandes, los pulmones, el mesenterio, los nervios, la retina (barrera hematorretiniana), los tejidos del músculo esquelético, la piel, los testículos, la vena umbilical y otros tejidos y órganos del cuerpo. Preferentemente, el endotelio continuo es el que se encuentra en o alrededor del cerebro, el corazón, los pulmones, los nervios o la retina.

Se describe adicionalmente un método de inhibición de la hiperpermeabilidad vascular presente en cualquier tejido u órgano que contiene o está rodeado por endotelio fenestrado. Como se ha señalado anteriormente, el endotelio fenestrado está presente en o alrededor del riñón (glomérulos, capilares peritubulares y vasos rectos ascendentes), el páncreas, las glándulas suprarrenales, las glándulas endocrinas y el intestino. Preferentemente, el endotelio fenestrado es el que se encuentra en los riñones, especialmente el que se encuentra en los glomérulos renales.

Además, se puede tratar cualquier enfermedad o afección mediada por la hiperpermeabilidad vascular mediante el método descrito en el presente documento. Tales enfermedades y afecciones incluyen la diabetes, la hipertensión y la aterosclerosis.

En concreto, mediante la presente invención se pueden tratar las complicaciones vasculares de la diabetes, que incluyen las del cerebro, corazón, riñones, pulmón, mesenterio, nervios, retina, músculo esquelético, piel y otros tejidos y órganos que contienen endotelio continuo o fenestrado. Estas complicaciones vasculares incluyen el edema, la acumulación de LDL en el espacio subendotelial, la aterosclerosis acelerada, y las siguientes: cerebro (envejecimiento acelerado de las paredes vasculares), corazón (edema de miocardio, fibrosis del miocardio, disfunción diastólica, miocardiopatía diabética), riñones (nefropatía diabética), pulmón (retraso del desarrollo pulmonar de los fetos de madres diabéticas, alteraciones de varios parámetros fisiológicos pulmonares y aumento de la susceptibilidad a las infecciones), mesenterio (hiperplasia vascular), nervios (neuropatía diabética), retina (edema macular y retinopatía diabética) y piel (enrojecimiento, discromías, sequedad y ulceraciones).

La retinopatía diabética es la causa principal de ceguera que afecta aproximadamente al 25% de los cerca de 21 millones de estadounidenses con diabetes. Aunque su incidencia y progresión se pueden reducir mediante controles intensivos de la glucemia y de la presión arterial, casi todos los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y más del 60% de aquellos con diabetes mellitus tipo 2 desarrollan con el tiempo retinopatía diabética. Existen dos etapas en la retinopatía diabética. La primera, la retinopatía no proliferativa, es la etapa más temprana de la enfermedad y se caracteriza por el aumento de la permeabilidad vascular, los microaneurismas, el edema y, con el tiempo, la oclusión vascular. La neovascularización no es un componente de la fase no proliferativa. La mayor parte de la pérdida visual durante esta etapa se debe a la acumulación de líquido en la mácula, la zona central de la retina. Esta acumulación de líquido se llama edema macular y puede provocar disminución de la visión temporal o permanente. La segunda etapa de la retinopatía diabética se denomina retinopatía proliferativa y se caracteriza por la formación anormal de nuevos vasos. Por desgracia, esta neovascularización anormal puede ser muy perjudicial, debido a que puede provocar sangrado del ojo, tejido cicatricial en la retina, desprendimiento de retina diabética o glaucoma, cualquiera de los cuales puede provocar una disminución de la visión o la ceguera. El edema macular también se puede producir en la fase proliferativa.

La neuropatía diabética es una complicación común y grave de la diabetes. Existen cuatro tipos principales de neuropatía diabética: neuropatía periférica, neuropatía autonómica, radiculoplexopatía y mononeuropatía. Los

indicios y síntomas de la neuropatía periférica, el tipo más común de neuropatía diabética, incluyen entumecimiento o disminución de la capacidad de sentir dolor o cambios de temperatura (especialmente en los pies y dedos de los pies), una sensación de hormigueo o ardor, dolor agudo, dolor al caminar, sensibilidad extrema al toque más ligero, debilidad muscular, dificultad para caminar, y graves problemas en los pies (tales como úlceras, infecciones, deformidades y dolor óseo y articular). La neuropatía autonómica afecta al sistema nervioso autónomo, que controla el corazón, la vejiga, los pulmones, el estómago, los intestinos, los órganos sexuales y los ojos, y se pueden producir problemas en cualquiera de estas zonas. La radiculoplexopatía (también llamada amiotrofia diabética, neuropatía femoral o neuropatía proximal) suele afectar a los nervios en las caderas, hombros o abdomen, normalmente en un lado del cuerpo. La mononeuropatía implica daño a un solo nervio, por lo general en un brazo, una pierna o la cara. Las complicaciones comunes de la neuropatía diabética incluyen la pérdida de miembros (por ejemplo, dedos de los pies, pies o piernas), articulación de Charcot, infecciones del tracto urinario, incontinencia urinaria, hipoglucemia asintomática (incluso puede ser fatal), presión arterial baja, problemas digestivos (por ejemplo, estreñimiento, diarrea, náuseas y vómitos), disfunción sexual (por ejemplo, disfunción eréctil), y aumento o disminución de la sudoración. Como se puede ver, los síntomas pueden variar de leves a dolorosos, incapacitantes e incluso fatales.

La nefropatía diabética es la causa más común de enfermedad renal de fase terminal en los Estados Unidos. Es una complicación vascular de la diabetes que afecta a los capilares glomerulares del riñón y reduce la capacidad de filtración del riñón. El primer indicio de la existencia de una nefropatía es la aparición de hiperfiltración y, a continuación, microalbuminuria. La proteinuria masiva y el deterioro progresivo de la función renal preceden a la fase terminal de la enfermedad renal. Por lo general, antes de que aparezca cualquier indicio de nefropatía, normalmente se ha diagnosticado retinopatía. Se suele recomendar el trasplante renal a los pacientes con enfermedad renal en fase terminal debido a la diabetes. La tasa de supervivencia a los 5 años para los pacientes que reciben un trasplante es de aproximadamente el 60% en comparación con sólo el 2% de los pacientes en diálisis.

La hipertensión se desarrolla por lo general durante muchos años, y afecta con el tiempo a casi todo el mundo. La hipertensión no controlada aumenta el riesgo de problemas de salud graves, que incluyen infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, apoplejía, enfermedad arterial periférica, insuficiencia renal, aneurismas, daños oculares, y problemas de memoria o de comprensión.

La aterosclerosis también se desarrolla gradualmente. La aterosclerosis puede afectar a las arterias coronarias, arteria carótida, arterias periféricas o microvasculatura y las complicaciones de la aterosclerosis incluyen enfermedad de la arteria coronaria (que puede provocar angina o un ataque al corazón), enfermedad microvascular coronaria, enfermedad de la arteria carótida (que puede provocar un ataque isquémico transitorio o apoplejía), enfermedad arterial periférica (que puede provocar pérdida de sensibilidad al calor y al frío, o incluso la muerte del tejido), y aneurismas.

Otras enfermedades y afecciones que pueden ser tratadas incluyen la lesión pulmonar aguda, el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), la degeneración macular relacionada con la edad, el edema cerebral, el edema coroideo, la coroiditis, la enfermedad microvascular coronaria, la enfermedad microvascular cerebral, la enfermedad de Eals, el edema debida a lesiones (por ejemplo, traumatismo o quemaduras), el edema asociado con la hipertensión, la fuga vascular glomerular, el choque hemorrágico, el síndrome de Irvine Gass, la isquemia, el edema macular (por ejemplo, debido a oclusiones vasculares, después de una cirugía intraocular (por ejemplo, cirugía de cataratas), uveítis o retinitis pigmentosa, además de la debida a la diabetes), la nefritis (por ejemplo, glomerulonefritis, nefritis por enfermedad del suero y nefritis por Thy-1), las nefropatías, el edema nefrótico, el síndrome nefrótico, las neuropatías, la insuficiencia orgánica debida a edema tisular (por ejemplo, en las sepsis o debido a un trauma), la preeclampsia, el edema pulmonar, la hipertensión pulmonar, la insuficiencia renal, el edema retiniano, la hemorragia retiniana, la oclusión de la vena retiniana (por ejemplo, oclusiones de la vena central o de una de sus ramas), la retinitis, las retinopatías (por ejemplo, la retinopatía arteriosclerótica, la retinopatía hipertensiva, la retinopatía por radiación, la retinopatía de células falciformes y la retinopatía del prematuro, además de la retinopatía diabética), el infarto cerebral silencioso, el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), la glomerulopatía del trasplante, la uveítis, el síndrome de fuga vascular, la hemorragia vítrea y la enfermedad de Von Hippie Lindau. Además, se sabe que determinados fármacos, que incluyen los utilizados para tratar la esclerosis múltiple, provocan hiperpermeabilidad vascular, y se puede utilizar danazol para reducir este efecto secundario no deseado cuando se utilizan estos fármacos. El angioedema hereditario y el adquirido están expresamente excluidos de las enfermedades y afecciones que pueden tratarse de acuerdo con la invención.

"Tratar" o "tratamiento" se utilizan en el presente documento para referirse a la reducción (total o parcial) de los síntomas, la duración o la gravedad de una enfermedad o afección, incluyendo la curación de la enfermedad, o a la prevención de la enfermedad o afección.

Pruebas recientes indican que la hiperpermeabilidad por transcitosis es la primera etapa de un proceso que, con el tiempo, conduce a daños en los tejidos y órganos en muchas enfermedades y afecciones. Por consiguiente, la presente invención proporciona un medio de intervención temprana en estas enfermedades y afecciones que puede reducir, retrasar o incluso evitar potencialmente los daños en tejidos y órganos vistos en ellos. Por ejemplo, se puede tratar a un animal inmediatamente después del diagnóstico de una de las enfermedades o afecciones tratables de acuerdo con la invención (las enfermedades y afecciones descritas anteriormente). Como alternativa, resulta

preferente el tratamiento de los animales que presentan los primeros indicios de, o tienen una predisposición a desarrollar, una enfermedad o afección de este tipo antes de la existencia de los síntomas. Los primeros indicios de, y los factores de riesgo para, la diabetes, la hipertensión y la aterosclerosis son bien conocidos, y el tratamiento de un animal que presenta estos primeros indicios o factores de riesgo se puede iniciar antes de la presencia de los síntomas de la enfermedad o afección (es decir, profilácticamente).

Por ejemplo, se puede iniciar el tratamiento de un paciente al que se ha diagnosticado diabetes inmediatamente después del diagnóstico. En concreto, los diabéticos deben ser tratados preferentemente con un compuesto de danazol antes de que se presente cualquier síntoma de complicación vascular, aunque esto no suele ser posible, ya que la mayoría de los diabéticos presentan tales síntomas cuando son diagnosticados (véase más adelante). Como alternativa, los diabéticos deben ser tratados mientras la retinopatía diabética no proliferativa es leve (es decir, niveles moderados de microaneurismas y hemorragia retiniana). Véase *Diabetic Retinopathy*, página 9 (Ed. Elia Duh MD, Human Press, 2008). Tal tratamiento precoz proporcionará la mejor oportunidad de evitar el edema macular y la progresión de la retinopatía a una retinopatía diabética proliferativa. Además, la presencia de retinopatía diabética se considera un indicio de que existen o se van a desarrollar otras complicaciones microvasculares de la diabetes (véase *ibid.*, páginas 474-477), y el tratamiento temprano también puede evitar o reducir estas complicaciones adicionales. Por supuesto, también se pueden tratar con resultados beneficiosos las enfermedades y afecciones más avanzadas que son complicaciones vasculares de la diabetes.

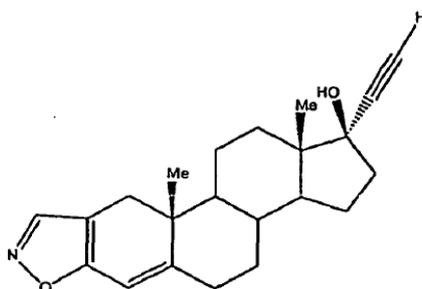
Sin embargo, como se ha señalado anteriormente, las complicaciones vasculares a menudo ya están presentes en el momento en que se diagnostica la diabetes. Por consiguiente, resulta preferente tratar profilácticamente a un paciente que presenta los primeros indicios de, o una predisposición a desarrollar, diabetes. Estos primeros indicios y los factores de riesgo incluyen alto nivel de glucosa en ayunas pero no lo suficientemente alto para clasificarse como diabetes ("prediabetes"), hiperinsulinemia, hipertensión, dislipidemia (colesterol alto, alto nivel de triglicéridos, alto nivel de lipoproteínas de baja densidad, y/o bajo nivel de lipoproteína de alta densidad), obesidad (índice de masa corporal superior a 25), inactividad, edad superior a 45 años, falta de sueño, antecedentes familiares de diabetes, pertenencia a una raza minoritaria, antecedentes de diabetes gestacional y antecedentes de síndrome de ovario poliquístico.

De manera similar, se puede iniciar el tratamiento de un paciente al que se ha diagnosticado hipertensión inmediatamente después del diagnóstico. Por lo general, la hipertensión no provoca ningún síntoma, pero se puede iniciar el tratamiento profiláctico en un paciente que tiene una predisposición a desarrollar hipertensión. Los factores de riesgo para la hipertensión incluyen la edad, la raza (la hipertensión es más común la raza negra), antecedentes familiares (la hipertensión es hereditaria), sobrepeso u obesidad, falta de ejercicio, tabaquismo, exceso de sal en la dieta, muy poco potasio en la dieta, muy poca vitamina D en la dieta, beber demasiado alcohol, niveles altos de estrés, determinadas afecciones crónicas (por ejemplo, colesterol alto, diabetes, enfermedad renal y apnea del sueño) y el uso de determinados fármacos (por ejemplo, anticonceptivos orales, anfetaminas, pastillas para adelgazar, y algunos medicamentos para la alergia y para el resfriado).

Se puede iniciar el tratamiento de un paciente al que se ha diagnosticado aterosclerosis inmediatamente después del diagnóstico. Sin embargo, resulta preferente tratar profilácticamente a un paciente que presenta los primeros indicios de, o una predisposición a desarrollar, aterosclerosis. Los primeros indicios y factores de riesgo para la aterosclerosis incluyen la edad, antecedentes familiares de aneurisma o de enfermedad cardíaca precoz, hipertensión, colesterol alto, alto nivel de triglicéridos, resistencia a la insulina, diabetes, obesidad, tabaquismo, falta de actividad física, dieta poco saludable, y alto nivel de proteína C-reactiva.

El método para inhibir la hiperpermeabilidad vascular comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de danazol a un animal que lo necesite para inhibir la hiperpermeabilidad vascular. Tal como se utiliza en el presente documento, "un compuesto de danazol" se refiere a danazol, profármacos de danazol y sales farmacéuticamente aceptables de danazol y sus profármacos.

El danazol (17[alfa]-pregna-2,4-dien-20-ino-[2,3-d]-isoxazol-17[beta]-ol) es una hormona esteroidea sintética conocida. Su estructura es:



Danazol

Los métodos de elaboración de danazol son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 3.135.743, y la patente de GB N° 905.844. Además, el danazol está disponible en el mercado de muchas fuentes, incluyendo Barr Pharmaceuticals, Inc., Lannett Co., Inc., Sanofi-Aventis Canadá, Sigma- Aldrich, y Parchem Trading Ltd.

"Profármaco" se refiere a cualquier compuesto que libera un fármaco precursor activo (danazol en este caso) *in vivo* cuando se administra tal profármaco a un animal. Los profármacos de danazol incluyen danazol en el que el grupo hidroxilo está unido a cualquier grupo que puede ser escindido *in vivo* para generar el hidroxilo libre. Ejemplos de profármacos de danazol incluyen ésteres (por ejemplo, acetato, formiato, y derivados de benzoato) de danazol.

Las sales farmacéuticamente aceptables de danazol y sus profármacos incluyen sales no tóxicas convencionales, tales como sales derivadas de ácidos inorgánicos (tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, y similares), ácidos orgánicos (tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, glutámico, aspártico, benzoico, salicílico, oxálico, ácido ascórbico, y similares) o bases (tales como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión de metal farmacéuticamente aceptable o cationes orgánicos derivados de N, N-dibenciletilendiamina, D-glucosamina, o etilendiamina). Las sales se preparan de manera convencional, por ejemplo, por neutralización de la forma de base libre del compuesto con un ácido. En concreto, los isoxazoles, tales como danazol, son sustancias débilmente básicas y formarán sales de adición de ácidos tras la adición de ácidos fuertes y sales de amonio cuaternario tras la adición de ésteres de ácidos fuertes (por ejemplo, un éster de aralquilo inferior, tal como yoduro de metilo, yoduro de etilo, bromuro de etilo, bromuro de propilo, bromuro de butilo, bromuro de alilo, sulfato de metilo, bencenosulfonato de metilo, sulfonato de metil-p-tolueno, cloruro de bencilo y similares). Véase la patente de EE.UU. N° 3.135.743.

Como se ha señalado anteriormente, se puede utilizar un compuesto de danazol para inhibir la hiperpermeabilidad vascular y para tratar una enfermedad o afección mediada por la hiperpermeabilidad vascular. Para ello, el compuesto de danazol se administra a un animal que necesite el tratamiento. Preferentemente, el animal es un mamífero, tal como un conejo, una cabra, un perro, un gato, un caballo o un ser humano. Lo más preferentemente, el animal es un ser humano.

Las formas eficaces de dosificación, los modos de administración y las dosis para los compuestos de la invención (es decir, danazol, un profármaco de danazol o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellos) se pueden determinar empíricamente utilizando la orientación proporcionada en el presente documento. Los expertos en la materia entenderán que la dosis variará con la enfermedad o afección concreta a tratar, la gravedad de la enfermedad o afección, la(s) vía(s) de administración, la duración del tratamiento, la identidad de los demás fármacos que se administran al animal, la edad, el tamaño y la especie del animal, y factores similares conocidos en las técnicas médicas y veterinarias. En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto de la presente invención será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico. Sin embargo, la dosis diaria será determinada por el médico o veterinario adjunto dentro del alcance del juicio médico. Si se desea, la dosis diaria eficaz se puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis, administradas por separado a intervalos apropiados durante el día. La administración del compuesto debe continuar hasta conseguir una respuesta aceptable.

Se ha descrito con anterioridad que los compuestos de danazol inhiben la angiogénesis. Véase la solicitud PCT WO 2007/009087. Sorprendente y bastante inesperadamente, se ha descubierto que se pueden utilizar compuestos de danazol en la práctica de la presente invención a dosis óptimas que son aproximadamente de 100 a 1.000 veces menores que las descritas con anterioridad para inhibir la angiogénesis y considerablemente más bajas que las cantidades actualmente administradas a pacientes para el tratamiento de otras enfermedades y afecciones (por lo general de 200 mg/día a 800 mg/día para un ser humano adulto). El uso de estas dosis más bajas de compuestos de danazol deberían evitar cualquier efecto secundario significativo, tal vez todos los efectos secundarios, lo que resultará especialmente ventajoso para el tratamiento temprano o profiláctico de las enfermedades y afecciones de acuerdo con la presente invención.

En concreto, una dosis eficaz de un compuesto de danazol para inhibir la hiperpermeabilidad vascular será de entre 0,1 ng/kg/día y 35 mg/kg/día, preferentemente de entre 40 ng/kg/día y 5,0 mg/kg/día, lo más preferentemente de entre 100 ng/kg/día y 1,5 mg/kg/día. Una dosis eficaz también será la cantidad que dé como resultado una concentración en un fluido pertinente (por ejemplo, sangre) de 0,0001 μM a 5 μM , preferentemente de 0,1 μM a 1,0 μM , más preferentemente de 0,1 μM a 0,5 μM , lo más preferentemente aproximadamente 0,1 μM . Una dosis eficaz también será la cantidad que dé como resultado una concentración en el tejido u órgano a tratar de aproximadamente el 0,17% (peso/peso) o menos, preferentemente del 0,00034% al 0,17%, lo más preferentemente del 0,0034% al 0,017%. Cuando se administra por vía tópica o local, el compuesto de danazol se administrará preferentemente a una concentración de 0,0001 μM a 5 μM , preferentemente de 0,1 μM a 1,0 μM , más preferentemente de 0,1 μM a 0,5 μM , lo más preferentemente de aproximadamente 0,1 μM , o a una concentración de aproximadamente el 0,17% (peso/peso) o menos, preferentemente del 0,00034% al 0,17%, lo más preferentemente del 0,0034% al 0,017%. Cuando se administra por vía oral a un ser humano adulto, la dosis será

preferentemente de aproximadamente 1 ng/día a aproximadamente 100 mg/día, más preferentemente la dosis será de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 100 mg/día, lo más preferentemente la dosis será de aproximadamente 10 mg/día a aproximadamente 90 mg/día, preferentemente en dos dosis iguales al día. Además, se espera que el danazol se acumule en las células y tejidos, de manera que se pueda reducir una dosis (de carga) inicial (por ejemplo, 100 mg al día) después de un período de tiempo (por ejemplo, 2 a 4 semanas) a una dosis de mantenimiento más baja (por ejemplo, 1 mg al día) que se puede dar de forma indefinida sin efectos secundarios significativos, tal vez sin efectos secundarios. Tal como se utiliza en el presente documento, una "cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular" de un compuesto de danazol se refiere a aquellas cantidades expuestas anteriormente en este párrafo.

También se describe un método para modular el citoesqueleto de las células endoteliales en un animal. Este método se basa en los descubrimientos de que el danazol inhibe la formación de fibras de estrés de F-actina, provoca la formación de anillos de actina cortical, potencia y prolonga la formación de anillos de actina cortical por la fosfoginosa-1-fosfato (SIP), inhibe la RhoA, aumenta la fosforilación de la VE-cadherina, parece activar las GTPasas estabilizadoras de barrera y parece estabilizar los microtúbulos. La modulación del citoesqueleto puede reducir la hiperpermeabilidad vascular y aumentar la hipopermeabilidad vascular (es decir, la permeabilidad por debajo de los niveles basales), devolviendo de ese modo el endotelio a la homeostasis. Por consiguiente, se pueden tratar las enfermedades y afecciones mediadas por la hiperpermeabilidad vascular (véase más arriba) y también se pueden tratar las enfermedades y afecciones mediadas por la hipopermeabilidad vascular. El último tipo de enfermedades y afecciones incluyen el envejecimiento hepático, la aterogénesis, la aterosclerosis, la cirrosis, la fibrosis hepática, la insuficiencia hepática y los cánceres hepáticos primario y metastásico.

El procedimiento de modulación del citoesqueleto de las células endoteliales comprende administrar al animal una cantidad eficaz de un compuesto de danazol. "Compuesto de danazol" y "animal" tienen los mismos significados expuestos anteriormente.

Las formas de dosificación, los modos de administración y las dosis de los compuestos (es decir, danazol, un profármaco de danazol o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellos) eficaces para modular el citoesqueleto se pueden determinar empíricamente utilizando la orientación proporcionada en el presente documento. Los expertos en la materia entenderán que la dosis variará con la enfermedad o afección concreta a tratar, la gravedad de la enfermedad o afección, la(s) vía(s) de administración, la duración del tratamiento, la identidad de los demás medicamentos que se administran al animal, la edad, el tamaño y la especie del animal, y factores similares conocidos en las técnicas médicas y veterinarias. En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico.

Sin embargo, la dosis diaria será determinada por el médico o veterinario adjunto dentro del alcance del juicio médico. Si se desea, la dosis diaria eficaz se puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis, administradas por separado a intervalos apropiados durante el día. La administración del compuesto debe continuar hasta conseguir una respuesta aceptable.

En concreto, una dosis eficaz de un compuesto de danazol para modular el citoesqueleto de las células endoteliales será de 0,1 ng/kg/día a 35 mg/kg/día, preferentemente de 40 ng/kg/día a 5,0 mg/kg/día, lo más preferentemente de 100 ng/kg/día a 1,5 mg/kg/día. Una dosis eficaz también será la cantidad que dé como resultado una concentración en un fluido pertinente (por ejemplo, sangre) de 0,0001 μM a 5 μM , preferentemente de 0,1 μM a 1,0 μM , más preferentemente de 0,1 μM a 0,5 μM , lo más preferentemente aproximadamente 0,1 μM . Una dosis eficaz también será la cantidad que dé como resultado una concentración en el tejido u órgano a tratar de aproximadamente el 0,17% (peso/peso) o menos, preferentemente del 0,00034% al 0,17%, lo más preferentemente del 0,0034% al 0,017%. Cuando se administra por vía tópica o local, el compuesto de danazol se administrará preferentemente a una concentración de 0,0001 μM a 5 μM , preferentemente de 0,1 μM a 1,0 μM , más preferentemente de 0,1 μM a 0,5 μM , lo más preferentemente aproximadamente 0,1 μM , o a una concentración de aproximadamente el 0,17% (peso/peso) o menos, preferentemente del 0,00034% al 0,17%, lo más preferentemente del 0,0034% al 0,017%. Cuando se administra por vía oral a un ser humano adulto, la dosis será preferentemente de aproximadamente 1 ng/día a aproximadamente 100 mg/día, más preferentemente la dosis será de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 100 mg/día, lo más preferentemente la dosis será de aproximadamente 10 mg/día a aproximadamente 90 mg/día, preferentemente en dos dosis iguales al día. Además, se espera que el danazol se acumule en las células y tejidos, de manera que se pueda reducir una dosis (de carga) inicial (por ejemplo, 100 mg al día) después de un período de tiempo (por ejemplo, 2 a 4 semanas) a una dosis de mantenimiento más baja (por ejemplo, 1 mg al día) que se puede dar de forma indefinida sin efectos secundarios significativos, tal vez sin efectos secundarios.

Los compuestos de la presente invención (es decir, danazol, sus profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de ellos) se pueden administrar a un paciente animal para el tratamiento mediante cualquier vía de administración adecuada, que incluye la vía oral, nasal, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular), transdérmica, intraocular y tópica (incluyendo bucal y sublingual). Generalmente resulta preferente la administración oral para cualquier enfermedad o afección que pueda tratarse de acuerdo con la

invención. Las vías de administración preferentes para el tratamiento de enfermedades y afecciones del ojo son la vía oral, intraocular y tópica. La más preferente es la vía oral. Resulta bastante inesperado y sorprendente que las enfermedades de los ojos puedan ser tratadas mediante la administración oral de un compuesto de danazol, ya que no se ha descrito con anterioridad el tratamiento con éxito de tales enfermedades y afecciones mediante la administración oral de un fármaco. Las vías de administración preferentes para el tratamiento de enfermedades y afecciones del cerebro son la vía oral y parenteral. La más preferente es la vía oral.

Aunque es posible la administración en solitario de un compuesto de la presente invención, resulta preferente administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición). Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden un compuesto o compuestos de la invención como principio activo mezclado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, con uno o varios otros compuestos, fármacos u otros materiales. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el animal. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Las formulaciones de la invención adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, obleas, píldoras, comprimidos, polvos, gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o una emulsión líquida de aceite-en-agua o agua-en-aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (utilizando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga), y similares, cada una conteniendo una cantidad predeterminada de un compuesto o compuestos de la presente invención como principio activo. Un compuesto o compuestos de la presente invención también se pueden administrar en forma de bolo, electuario o pasta.

En las formas de dosificación sólidas de la invención para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el principio activo (es decir, danazol, un profármaco de danazol, una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellos, o combinaciones de los anteriores) se mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato sódico o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (i) cargas o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como, agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos, y carbonato sódico; (5) agentes retardantes de solución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como arcilla de bentonita y caolín; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato sódico, y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de las cápsulas, los comprimidos y las píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponadores. Se pueden emplear como cargas composiciones sólidas de tipo similar en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras utilizando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular, y similares.

Se puede elaborar un comprimido por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos obtenidos por compresión se pueden preparar utilizando un agente aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa sódica reticulada), tensioactivo o dispersante. Los comprimidos obtenidos por moldeo se pueden elaborar moldeando, en una máquina adecuada, una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Los comprimidos, y otras formas de dosificación sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, se pueden hacer o preparar opcionalmente con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. También se pueden formular de manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del principio activo utilizando en los mismos, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser de una composición tal que liberen el principio activo sólo, o preferentemente, en una determinada parte del tracto gastrointestinal, opcionalmente de manera retardada. Ejemplos de composiciones de inclusión que pueden utilizarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El principio activo también puede estar en forma microencapsulada.

Las formas farmacéuticas líquidas para la administración oral de los compuestos de la invención incluyen emulsiones farmacéuticamente aceptables, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires. Además del principio activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes utilizados comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo,

propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en concreto, aceites de semilla de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos.

5 Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

10 Las suspensiones, además del principio activo, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de polioxietilensorbitol y sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

15 La invención también proporciona productos farmacéuticos adecuados para el tratamiento del ojo. Tales productos farmacéuticos incluyen dispositivos, implantes y composiciones farmacéuticas (que pueden ser composiciones o dispositivos).

20 Las formulaciones farmacéuticas (composiciones) para la inyección intraocular de un compuesto o compuestos de la invención en el globo ocular incluyen soluciones, emulsiones, suspensiones, partículas, cápsulas, microesferas, liposomas, matrices, etc. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 6.060.463, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. Nº 2005/0101582, y la solicitud PCT WO 2004/043480, cuyas divulgaciones completas se incorporan en el presente documento por referencia. Por ejemplo, una formulación farmacéutica para la inyección intraocular puede comprender uno o más compuestos de la invención en combinación con una o más soluciones, suspensiones o emulsiones no acuosas o acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes de suspensión, agentes espesantes o agentes que aumentan la viscosidad (tal como un polímero de ácido hialurónico). Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos incluyen agua, solución salina (preferentemente al 0,9%), dextrosa en agua (preferentemente al 5%), tampones, dimetilsulfóxido, alcoholes y polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares). Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes humectantes y agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como polímeros y gelatina. Las formas de liberación prolongada inyectables se pueden elaborar incorporando el fármaco en microcápsulas o microesferas hechas de polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres), ácido poli(glicólico), ácido poli(láctico), policaprolactona y poli(anhídridos). Las formulaciones de liberación prolongada inyectables también se preparan inmovilizando el fármaco en liposomas (compuestos por los ingredientes habituales, tales como dipalmitoil fosfatidilcolina) o microemulsiones que sean compatibles con el tejido ocular. Dependiendo de la relación entre fármaco y polímero o lípido, de la naturaleza de los componentes lipídicos o polímero concreto, del tipo de liposoma empleado, y de si las microcápsulas o microesferas están recubiertas o sin recubrimiento, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco de las microcápsulas, microesferas y liposomas.

40 Los compuestos de la invención también se pueden administrar de forma quirúrgica como implante ocular. Por ejemplo, se puede implantar en o sobre la esclerótica un recipiente con depósito que tiene una pared de difusión de alcohol de polivinilo o acetato de polivinilo y que contiene un compuesto o compuestos de la invención. Como otro ejemplo, se pueden incorporar un compuesto o compuestos de la invención en una matriz polimérica hecha de un polímero, tal como policaprolactona, ácido poli(glicólico), ácido poli(láctico), poli(anhídrido), o un lípido, tal como ácido sebácico, y se puede implantar en la esclerótica o en el ojo. Esto se logra normalmente administrando al animal una anestesia local o tópica y utilizando una pequeña incisión realizada detrás de la córnea. A continuación, se inserta la matriz a través de la incisión y se sutura a la esclerótica.

50 Los compuestos de la invención también se pueden administrar al ojo por vía tópica, y una forma de realización preferente de la invención es una composición tópica farmacéutica adecuada para la aplicación en el ojo. Las composiciones farmacéuticas tópicas adecuadas para la aplicación en el ojo incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, gotas, geles, hidrogeles y pomadas. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 5.407.926 y las solicitudes PCT WO 2004/058289, WO 01/30337 y WO 01/68053, cuyas divulgaciones completas se incorporan en el presente documento por referencia.

60 Las formulaciones tópicas adecuadas para la aplicación en el ojo comprenden uno o más compuestos de la invención en una base acuosa o no acuosa. Las formulaciones tópicas pueden incluir también potenciadores de la absorción, potenciadores de la permeación, agentes espesantes, potenciadores de la viscosidad, agentes para ajustar y/o mantener el pH, agentes para ajustar la presión osmótica, conservantes, tensioactivos, tampones, sales (preferentemente cloruro sódico), agentes de suspensión, agentes dispersantes, agentes solubilizantes, agentes de tonicidad y/o estabilizantes. Las formulaciones tópicas adecuadas para la aplicación en el ojo comprenderán preferentemente un potenciador de la absorción o de la permeabilidad para potenciar la absorción o la permeabilidad del compuesto o compuestos de la invención en el ojo y/o un agente espesante o potenciador de la viscosidad que sea capaz de aumentar el tiempo de residencia de un compuesto o compuestos de la invención en el ojo. Véanse las solicitudes PCT WO 2004/058289, WO 01/30337 y WO 01/68053. Los potenciadores de absorción/permeabilidad

ejemplares incluyen metilsulfonilmetano, solo o en combinación con dimetilsulfóxido, ácidos carboxílicos y tensioactivos. Los agentes espesantes y potenciadores de la viscosidad ejemplares incluyen dextranos, polietilenglicoles, polivinilpirrolidona, geles de polisacáridos, Gelrite®, polímeros de celulosa (tal como hidroxipropilmetilcelulosa), polímeros que contienen carboxilo (tales como polímeros o copolímeros de ácido acrílico), alcohol polivinílico y ácido hialurónico o una sal del mismo.

Las formas de dosificación líquidas (por ejemplo, soluciones, suspensiones, dispersiones y gotas) adecuadas para el tratamiento del ojo se pueden preparar, por ejemplo, disolviendo, dispersando, suspendiendo, etc. un compuesto o compuestos de la invención en un vehículo, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar una solución, dispersión o suspensión. Si se desea, la formulación farmacéutica también puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH y similares, por ejemplo acetato sódico, monolaurato de sorbitán, acetato de trietanolamina sódica, oleato de trietanolamina, etc.

Las suspensiones y soluciones acuosas adecuadas para el tratamiento del ojo pueden incluir, además de un compuesto o compuestos de la invención, conservantes, tensioactivos, tampones, sales (preferentemente cloruro sódico), agentes de tonicidad y agua. Si se utilizan suspensiones, los tamaños de partícula deben ser inferiores a 10 μm para minimizar la irritación del ojo. Si se utilizan soluciones o suspensiones, la cantidad administrada al ojo no debe ser superior a 50 μl para evitar el derrame excesivo fuera del ojo.

Las suspensiones coloidales adecuadas para el tratamiento del ojo se forman generalmente a partir de micropartículas (es decir, microesferas, nanoesferas, microcápsulas o nanocápsulas, en las que las microesferas y nanoesferas son generalmente partículas monolíticas de una matriz de polímero en la que la formulación está inmovilizada, adsorbida, o contenida de otra manera, mientras que en las microcápsulas y las nanocápsulas la formulación está realmente encapsulada). El límite superior para el tamaño de estas micropartículas es de aproximadamente 5 μm a aproximadamente 10 μm .

Las pomadas oftálmicas adecuadas para el tratamiento del ojo incluyen un compuesto o compuestos de la invención en una base apropiada, tal como aceite mineral, lanolina líquida, vaselina blanca, una combinación de dos o tres de los anteriores, o gel de polietileno-aceite mineral. Se puede incluir opcionalmente un conservante.

Los geles oftálmicos adecuados para el tratamiento del ojo incluyen un compuesto o compuestos de la invención suspendidos en una base hidrófila, tal como Carpobol-940 o una combinación de etanol, agua y propilenglicol (por ejemplo, en una relación de 40:40:20). Se utiliza un agente gelificante, tal como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o glicirricinato amoniacal. Se puede incluir opcionalmente un conservante y/o un agente de tonicidad.

Los hidrogeles adecuados para el tratamiento del ojo se forman por incorporación de un polímero formador de gel hinchable, tal como los enumerados anteriormente como agentes espesantes o potenciadores de la viscosidad, salvo que una formulación denominada en la técnica "hidrogel" tiene por lo general una viscosidad superior a una formulación denominada solución o suspensión "espesada". A diferencia de tales hidrogeles preformados, también se puede preparar una formulación para que forme un hidrogel *in situ* después de la aplicación al ojo. Tales geles son líquidos a temperatura ambiente, pero gelifican a mayores temperaturas (y por lo tanto se denominan hidrogeles "termorreversibles"), tal como cuando se ponen en contacto con fluidos corporales. Los polímeros biocompatibles que confieren esta propiedad incluyen copolímeros y polímeros de ácido acrílico, derivados de N-isopropilacrilamida y copolímeros de bloque ABA de óxido de etileno y óxido de propileno (denominados convencionalmente "poloxámeros" y disponibles con el nombre comercial Pluronic® de BASF-Waydotte).

Las dispersiones preferentes son liposomales, en cuyo caso la formulación se incluye dentro de liposomas (vesículas microscópicas compuestas por bicapas lipídicas y compartimentos acuosos alternos).

Las gotas oculares se pueden formular con una base acuosa o no acuosa que comprende también uno o más agentes dispersantes, agentes solubilizantes o agentes de suspensión. Las gotas se pueden administrar por medio de un simple frasco cuentagotas para los ojos o por medio de un frasco de plástico adaptado para administrar el contenido líquido gota a gota por medio de un cierre con forma especial.

Los compuestos de la invención también se pueden aplicar por vía tópica por medio de un vehículo sólido impregnado con el fármaco que se inserta en el ojo. La liberación del fármaco se efectúa generalmente por disolución o bioerosión del polímero, ósmosis, o combinaciones de los mismos. Se pueden utilizar varios sistemas de administración de tipo matriz. Tales sistemas incluyen lentes de contacto blandas hidrófilas impregnadas o empapadas con el compuesto deseado de la invención, así como dispositivos biodegradables o solubles que no tienen que ser retirados después de la colocación en el ojo. Estos insertos oculares solubles pueden estar compuestos por cualquier sustancia degradable que pueda ser tolerada por el ojo y que sea compatible con el compuesto de la invención que se va a administrar. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, poli(alcohol vinílico), polímeros y copolímeros de poli(acrilamida, acrilato de etilo y vinilpirrolidona, así como polipéptidos o polisacáridos reticulados, tales como quitina.

Las formas de dosificación para los demás tipos de administración tópica (es decir, no en el ojo) o para la administración transdérmica de los compuestos de la invención incluyen polvos, aerosoles, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches, gotas e inhaladores. El principio activo se puede mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier tampón, o propelente que se pueda necesitar. Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además del principio activo, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, óxido de talco y zinc, o mezclas de los mismos. Los polvos y los aerosoles pueden contener, además del principio activo, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles pueden contener adicionalmente propelentes habituales tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano. Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar la liberación controlada de los compuestos de la invención al cuerpo. Tales formas de dosificación se pueden elaborar disolviendo, dispersando o incorporando de otra manera uno o más compuestos de la invención en un medio apropiado, tal como un material de matriz elástica. También se pueden utilizar potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad de tal flujo se puede controlar proporcionando una membrana de control de la velocidad o dispersando el compuesto en un gel o en una matriz polimérica. También se puede utilizar un vehículo sólido impregnado con el fármaco (por ejemplo, un apósito) para la administración tópica.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen aquellas adecuadas para la administración por inhalación o insuflación, o para la administración nasal. Para su administración al tracto respiratorio superior (nasal) o inferior por inhalación, los compuestos de la invención se administran convenientemente desde un insuflador, nebulizador o envase presurizado u otros medios convenientes para administrar una pulverización de aerosol. Los envases presurizados pueden comprender un propelente adecuado tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono, u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida.

Como alternativa, para la administración por inhalación o insuflación, la composición puede adoptar la forma de polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo de uno o más compuestos de la invención y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón. La composición en polvo se puede presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en cápsulas o cartuchos, o, por ejemplo, envases blíster o de gelatina de los que se puede administrar el polvo con la ayuda de un inhalador, insuflador o un inhalador de dosis medida.

Para la administración intranasal, los compuestos de la invención se pueden administrar por medio de gotas nasales o una descarga líquida, tal como por medio de un frasco atomizador de plástico o un inhalador de dosis medida. Las descargas líquidas se administran convenientemente desde envases presurizados. Son típicos los atomizadores Mistometer (Wintrop) y Medihaler (Riker).

Las gotas nasales se pueden formular con una base acuosa o no acuosa que comprende también uno o más agentes dispersantes, agentes solubilizantes o agentes de suspensión. Las gotas se pueden administrar por medio de un simple frasco cuentagotas para los ojos o por medio de un frasco de plástico adaptado para administrar el contenido líquido gota a gota por medio de un cierre con forma especial.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para administración parenteral comprenden uno o más compuestos de la invención en combinación con una o más emulsiones, suspensiones, dispersiones, soluciones acuosas o no acuosas isotónicas estériles, o polvos estériles farmacéuticamente aceptables, que se pueden reconstituir en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor deseado o agentes de suspensión o espesantes. También se pueden utilizar stents recubiertos de fármaco.

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. También puede ser deseable incluir en las composiciones agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, resulta deseable ralentizar la absorción del fármaco de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con escasa solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco

depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender de la forma cristalina y del tamaño del cristal. Como alternativa, la absorción retardada de un fármaco administrado por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso.

- 5 Las formas de liberación prolongada inyectables se elaboran formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación entre fármaco y polímero, y de la naturaleza del polímero concreto empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones de liberación prolongada inyectables también se preparan inmovilizando el fármaco en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con el tejido corporal. Los materiales inyectables se pueden esterilizar por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias.

- 15 Las formulaciones se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitarias o de dosis múltiples, por ejemplo, ampollas y viales, y se pueden almacenar en un estado liofilizado que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas se pueden preparar a partir de gránulos, comprimidos y polvos estériles del tipo descrito anteriormente.

- 20 Se puede administrar en solitario un compuesto de danazol para tratar una enfermedad o afección que implica la hiperpermeabilidad vascular o la disfunción del citoesqueleto. Como alternativa, el compuesto de danazol se puede dar en combinación con uno o varios otros tratamientos o fármacos adecuados para tratar la enfermedad o afección. Por ejemplo, el compuesto del danazol se puede administrar antes de, junto con (incluyendo simultáneamente con), o después de otro tratamiento o fármaco. En el caso de otro fármaco, el fármaco y el compuesto de danazol se pueden administrar en composiciones farmacéuticas separadas o como parte de la misma composición farmacéutica. Se describen fármacos adecuados en la solicitud de EE.UU. Número 12/820.325, cuya divulgación completa se incorpora en el presente documento por referencia.

Tal como se utiliza en el presente documento, "un", "uno" o "una" significan uno o más.

- 30 Los objetos, las ventajas y las características novedosas adicionales de la presente invención se pondrán de manifiesto para los expertos en la materia al tener en cuenta los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

35 **Ejemplo 1: Efectos del danazol sobre la angiogénesis (Comparativo)**

A. Proliferación de células HUVEC

Protocolo:

- 40 Se obtuvieron células endoteliales primarias de vena umbilical humana (HUVEC) y medio de crecimiento EGM-2, de Cambrex (Walkersville, MD). Se realizó un pase de células en medio complementado con suero de ternera fetal (STF) al 2%, en matraces para cultivo de tejido a 37°C y CO₂ al 5%. El subcultivo se realizó utilizando tripsina cuando se obtuvo el 60%-80% de confluencia tal como especifica el proveedor.

- 45 Se descongelaron las ampollas crioconservadas de las HUVEC del pase 2 y se sembraron en placas para cultivo de tejido de 96 pocillos a una concentración de 5.000 células/cm². Se preparó una solución madre de danazol 50 mM en etanol y se aumentó el STF en el medio al 5% para mantener el danazol en solución. Se trataron las células con medio que contiene concentraciones finales de danazol que van de 0,1 µM a 100 µM, por triplicado. Se realizaron incubaciones de 24, 48, y 72 horas y se determinó la proliferación celular utilizando el ensayo CellTiter 96 AQUEOUS One Solution Cell Proliferation de Promega (Madison, WI). En resumen, se aspiró el medio de cada pocillo y se lavaron las células con 200 µl de solución salina tamponada con Hapes (HBSS) de Cambrex calentado a 37°C. Se añadieron a cada pocillo 100 µl de solución CellTiter diluida (15 µl de solución madre + 85 µl de EGM-2 que contenía STF al 0,1%) y se incubaron durante 4 horas más. Se determinó la densidad óptica mediante un lector de microplacas utilizando un filtro de 530 nm después de restar el blanco y los datos se presentaron como la DO ± desviación estándar. La concentración final de etanol en los pocillos fue inferior al 0,2% y no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad o la proliferación celular.

- 60 Todos los datos se presentan como experimentos representativos realizados por triplicado. Las diferencias entre los subconjuntos se analizaron mediante la prueba t de Student en Microsoft Excel. P < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados, observaciones y análisis:

- 65 El cultivo de HUVEC primarias en presencia de danazol disminuía la DO obtenida del ensayo de proliferación CellTiter de Promega de una manera dependiente de la dosis y del tiempo (Figura 1). El ensayo CellTiter se basa en

la reducción de la solución de ensayo por enzimas deshidrogenasa a un colorante de formazano que se correlaciona directamente con el número de células.

- 5 El tratamiento con danazol a las 24 horas parecía ser eficaz sólo a dosis muy altas. Se vieron disminuciones significativas (valor de $p < 0,05$) en el ensayo de DO a concentraciones de danazol de 10 μM o superiores. La DO detectada en los pocillos de control negativo fue $0,414 \pm 0,06$ y el tratamiento con danazol 10 μM disminuía la DO a $0,288 \pm 0,037$ mientras que 100 μM a $0,162 \pm 0,017$, lo que equivale a inhibiciones porcentuales del 30% y del 65% respectivamente.
- 10 A las 48 horas, la inhibición observada fue significativa incluso a niveles de 1 μM . La lectura del control negativo obtenida después de 48 horas de cultivo aumentó a 0.629 ± 0.095 y fue reducida a 0.378 ± 0.037 por 1 μM , $0,241 \pm 0,012$ por 10 μM , y $0,19 \pm 0,033$ por 100 μM (o inhibiciones porcentuales del 40%, 61%, y 70%, respectivamente).
- 15 Después de 72 horas, todos los tratamientos con danazol sometidos a ensayo presentaron una reducción significativa de la proliferación de HUVEC. La DO obtenida en los pocillos de control negativo fue 1.113 ± 0.054 y después de un tratamiento 0,1 μM se redujo a $0,798 \pm 0,037$, 1 μM a $0,484 \pm 0,022$, 10 μM a $0,229 \pm 0,016$, y 100 μM a $0.156 \pm 0,018$ (inhibiciones del 28%, 57%, 80% y 86%, respectivamente).
- 20 El examen de la DO obtenido a partir de todas las dosis de danazol 100 μM fue coherente en todos los instantes de tiempo, lo que indica una detención completa de la proliferación celular a esta concentración.

En resumen, el danazol presentó una fuerte inhibición de la proliferación de células endoteliales.

25 B. Formación de tubos por las HUVEC

Protocolo:

- 30 Para investigar la formación de estructuras similares a capilares por las HUVEC, se adquirió el ensayo Angiogenesis System: Endothelial Cell Tube Formation de BD Biosciences (San José, CA) y se utilizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, se sembraron 100.000 HUVEC en soportes de matrigel rehidratados en placas para cultivo de tejidos de 96 pocillos en presencia de STF al 5% para inducir la formación de tubos. Se añadió danazol a una concentración final de 1 μM , 10 μM , ó 50 μM y se añadió LY294002 (control positivo) a una concentración de 50 μM . Después de 18 horas, se fotografiaron los pocillos utilizando una cámara digital Kodak DCS Pro SLR/N (Rochester, NY) montada en un microscopio invertido. Se incluyeron pocillos tratados con etanol para determinar si el vehículo tenía algún efecto sobre la diferenciación celular.
- 35

Resultados, observaciones y análisis:

- 40 Para esclarecer si el danazol puede evitar la formación de estructuras similares a tubos por las HUVEC, se utilizaron placas de 96 pocillos que contenían soportes de matrigel. Las células endoteliales, cuando se cultivan en presencia de sustancias angiogénicas y se les proporciona una armazón de matriz extracelular, se diferenciarán en estructuras vagamente parecidas a vasos capilares. Las HUVEC cultivadas con danazol presentaron menos estructuras organizadas con interconexiones delgadas y menos definidas que los controles (véase la Figura 2, en la que A = control, B = danazol 1 μM , C = danazol 10 μM , D = danazol 50 μM , y E = LY294002 50 μM). El tratamiento con danazol 50 μM dio lugar a colonias aisladas de HUVEC situadas en el soporte con separaciones en el lumen del vaso o conexiones delgadas y escasas. El efecto del danazol fue muy similar al del compuesto de control positivo LY294002. Para garantizar que el vehículo utilizado no tenía ningún efecto, los pocillos se trataron con etanol a concentraciones correspondientes a la máxima dosis de danazol utilizada y no se observó ningún efecto sobre la formación de tubos (datos no mostrados). Estos datos indican que el danazol es un inhibidor eficaz de la formación de tubos a una concentración de 50 μM . El danazol no tuvo ningún efecto sobre la formación de tubos a concentraciones 1 μM ó 10 μM .
- 50

C. Invasión de las HUVEC

Protocolo:

- 55 Se adquirieron cámaras de invasión de BioCoat Matrigel de BD Biosciences (San José, CA). Se rehidrataron los insertos a 37°C con 500 μl de HBSS durante 2 horas antes de su uso en una incubadora humidificada. Las HUVEC tratadas con tripsina se lavaron dos veces con EGM-2 tibio que contenía STF al 0,1% y se añadieron a la cámara superior del inserto de invasión a una concentración de 100.000 células en un volumen total de 250 μl . Se añadieron al depósito superior danazol y compuestos de control a concentraciones finales de 10 μM y 100 μM . Se añadieron a la cámara inferior 750 μl de EGM-2 complementado con STF al 5% para iniciar la invasión y se incubaron las placas durante 24 horas. Se retiraron de la cámara superior las células no invasivas con hisopos de algodón humedecidos y a continuación se lavaron los insertos dos veces con HBSS. Se sumergieron los insertos en calceína AM 10 μM preparada en HBSS y se incubaron durante 4 horas. Se determinó la fluorescencia en un lector de microplacas con excitación a 485 nm y emisión a 595 nm. El LY294002 y el compuesto estructuralmente similar pero inactivo
- 60
- 65

LY303511 sirvieron como control positivo y negativo, respectivamente, para este experimento.

Resultados:

5 Los resultados se presentan en la Figura 3. Todos los datos se presentan como un experimento representativo realizado por triplicado. Las diferencias entre los subconjuntos se analizaron utilizando la prueba t de Student en Microsoft Excel. P < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

10 Se utilizaron insertos porosos recubiertos con Matrigel para determinar si el danazol puede interferir con la invasión o la migración de las células endoteliales (Figura 3). En el sistema utilizado para el estudio, se detectó un aumento significativo en las células mediante un colorante fluorescente después de la adición de STF a la cámara opuesta a las células endoteliales (5674 UF ± 77 a 7143 ± 516). El danazol a concentraciones de 10 µM y 100 µM no tuvo ningún efecto, mientras que el LY294002 presentó una atenuación casi completa de la invasión de células (5814 ± 153). Estos datos indican que los factores presentes en el STF inducen la producción de proteasas por las HUVEC
15 que digieren la matriz extracelular, seguido de la migración a lo largo de un gradiente quimiotáctico. El danazol no tiene efecto inhibitor aparente sobre la invasión y la migración de las HUVEC en este modelo.

D. Migración de las HUVEC

20 Protocolo:

Se realizaron ensayos para determinar el efecto del danazol sobre la migración de las HUVEC en un ensayo de migración por raspado. Se sembraron HUVEC del pase 8, número de lote 8750 (obtenidas de Lonza), en placas de 6 pocillos (ICS BioExpress) en medio completo de medio de crecimiento endotelial-2 (EGM-2) (obtenido de Lonza). Se cultivaron las placas en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5% durante 48-72 horas para conseguir monocapas
25 confluentes. A continuación, se “rasparon” las monocapas con una punta de pipeta de 1.000 µl y se lavaron dos veces con medio EGM-2 tibio. Se aspiró el medio de lavado final y reemplazado con un medio EGM-2 de nueva aportación o medio EGM-2 de nueva aportación que contenía un intervalo de concentraciones de las concentraciones de danazol (Sigma, # D8399). Se sacaron fotografías de las monocapas dañadas y se incubaron las placas en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5% durante otras 24 horas. Se fotografiaron de nuevo los pocillos. Se midieron los espacios en cada fotografía utilizando el software Adobe Photoshop, y las mediciones de los espacios se presentaron como el número de píxeles en el espacio.

35 Resultados:

En la Tabla 1 que aparece a continuación, se presentan los resultados de tres experimentos distintos. Como se puede ver en la Tabla 1, se descubrió que el danazol, a concentraciones de 50 µM, 75 µM y 100 µM, inhibe significativamente la migración de las HUVEC en este ensayo. El medio de cultivo EGM-2 utilizado en este ensayo contiene un cóctel de factores de crecimiento en comparación con el STF utilizado en el modelo de Matrigel descrito
40 en la sección C anterior. Esta diferencia en los factores de crecimiento puede suponer la diferencia de los resultados obtenidos utilizando los dos modelos.

TABLA 1

Compuesto(s)	Concentración de danazol	Media de los píxeles	Media del % de inhibición	STD	SEM
Diluyente de control (etanol)		1264,00			
Danazol	10 µM	1004,00	21,14	14,87	8,59
Danazol	25 µM	1184,00	5,50	8,80	5,08
Danazol	50 µM	895,33	27,64	17,63	10,18
Danazol	75 µM	317,33	74,62	6,80	3,93
Danazol	100 µM	178,67	85,90	0,92	0,53

45 **Ejemplo 2: Efecto del danazol sobre la permeabilidad vascular de las monocapas de HUVEC**

Protocolo:

Se realizaron ensayos para determinar el efecto del danazol sobre la permeabilidad de las monocapas de HUVEC. Se sembraron HUVEC del pase 5-10, número de lote 7016 (obtenidas de Lonza), sobre insertos con un tamaño de poro de 1 micra situados en los pocillos de una placa de 24 pocillos (insertos para cultivo de células Thincert de 24 pocillos de Greiner BioOne, # 662610, o ISC BioExpress, # T-3300-15) utilizando medio de crecimiento endotelial-2 (EGM-2) (obtenido de Lonza). Se cultivaron las placas en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5% durante 48-72 horas para conseguir la confluencia y desarrollar monocapas firmes. A continuación se retiró el medio y se reemplazó con medio de nueva aportación o medio de nueva aportación que contenía un intervalo de
55 concentraciones de danazol (Sigma, # D8399). Se añadieron a los pocillos apropiados factor de necrosis tumoral α

- (FNT α ; Pierce Biotechnology, # RTNFAI) e interleucina 1 β (IL-1 β ; Sigma, # I-9401) a concentraciones finales de 10 ng/ml cada uno. FNT α e IL-1 β inducen la permeabilidad; pueden provocar un aumento de la permeabilidad de hasta diez veces. Finalmente, se añadió a cada pocillo estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) (Pierce Biotechnology, # N100, 1,25 mg/ml) a una dilución final de 1:250. HRP es una molécula grande que tiene un peso molecular de aproximadamente 44.000. Los volúmenes finales fueron de 300 μ l en las cámaras superiores y de 700 μ l en las cámaras inferiores de cada pocillo. Se incubaron las placas durante 24 horas más en la incubadora a 37°C con CO₂ al 5%. Después de esta incubación, se retiraron y se desecharon los insertos. El examen visual de las células en los insertos indicó que todas las monocapas estaban todavía intactas.
- 10 Para evaluar el flujo continuo de HRP, se transfirieron 15 μ l de las soluciones resultantes en las cámaras inferiores a placas de ELISA de 96 pocillos (cada reacción se realizó por triplicado). A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de solución de tetrametilbencidina (TMB) (Pierce), y se desarrolló el color durante 5 minutos a temperatura ambiente. El desarrollo del color se detuvo añadiendo 100 μ l de solución ácida 0,18 N. Se determinó para cada pocillo la DO utilizando un lector de microplacas ajustado a 450 nm menos 530 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición de la permeabilidad frente a los controles, y las medias de tres experimentos distintos se presentan en la Tabla 2.
- 20 Como se puede ver en la Tabla 2, el danazol a concentraciones de 25,0 μ M o superiores aumentaba realmente la permeabilidad vascular. Una concentración de 10,0 μ M tuvo poco o ningún efecto sobre la permeabilidad vascular. El danazol a concentraciones de 0,1 μ M a 5,0 μ M, siendo las óptimas de 0,1 μ M a 0,5 μ M, disminuía la permeabilidad vascular. La curva de respuesta a la dosis es muy interesante, ya que existe un segundo pico de inhibición a concentraciones de 0,001 μ M (o quizás incluso inferiores) a 0,005 μ M. Por lo tanto, el danazol presenta una curva de respuesta a la dosis muy sorprendente e inesperada para la permeabilidad vascular.
- 25 Como se muestra en el Ejemplo 1, se necesitaría una concentración de 50 μ M a 100 μ M para obtener una inhibición de la proliferación, migración y formación de tubos de las HUVEC después de 18-24 horas de incubación con danazol. Como se muestra en este Ejemplo 2, estas concentraciones óptimas para inhibir la angiogénesis aumentarían drásticamente la permeabilidad vascular después de 24 horas (véase la Tabla 2). A la inversa, las concentraciones óptimas de uso para inhibir la permeabilidad vascular (0,1 μ M a 0,5 μ M) tienen efectos insignificantes sobre la angiogénesis a las 24 horas.

TABLA 2

Compuesto(s)	Concentración de danazol	Media del % de inhibición	STD	SEM
Danazol	0,001 μ M	19,35	5,39	3,11
Danazol	0,005 μ M	16,37	8,04	4,64
Danazol	0,01 μ M	-2,74	14,56	8,40
Danazol	0,05 μ M	7,67	8,83	5,10
Danazol	0,1 μ M	35,59	23,08	11,54
Danazol	0,5 μ M	30,95	12,01	6,01
Danazol	1,0 μ M	21,20	31,13	13,92
Danazol	5,0 μ M	14,63	15,30	7,65
Danazol	10,0 μ M	14,29	36,85	13,03
Danazol	25,0 μ M	-1,06	22,60	11,30
Danazol	50,0 μ M	-377,36	384,50	171,95
FNT α + IL-1 β + Danazol	0,1 μ M	31,30	25,26	12,63
FNT α + IL-1 β + Danazol	1,0 μ M	29,22	16,17	7,23
FNT α + IL-1 β + Danazol	10,0 μ M	8,47	20,45	9,14
FNT α + IL-1 β + Danazol	25,0 μ M	-39,93	15,53	7,76
FNT α + IL-1 β + Danazol	50,0 μ M	-117,16	29,20	14,60

Ejemplo 3: Efecto del danazol sobre la permeabilidad vascular

- 35 Se realizó un pase de células endoteliales retinianas humanas (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA), de pase 9, en medio EGM-2 (Lonza, Walkersville, MD) hasta que se obtuvo el 80% de confluencia. A continuación, se liberaron las células desde el matraz de subcultivo utilizando tripsina-EDTA, y se contaron las células en la suspensión resultante para determinar la viabilidad y el número de células. La viabilidad de la suspensión de células fue superior al 90% en este experimento.

- 45 A continuación, se sembraron las células sobre insertos (tamaño de poro de 1 micra) situados en los pocillos de una placa de 24 pocillos (insertos para cultivo de células Thincert de 24 pocillos de Greiner BioOne, # 662610) en 300 μ l de medio completo EGM-2 (obtenido de Lonza). A continuación, se colocaron 700 μ l de EGM-2 en la cámara inferior, y se cultivaron las placas en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5% durante 48 horas para conseguir monocapas confluentes. Las mediciones de resistencia eléctrica transendotelial (TER) se tomaron utilizando un electrodo STX 100 unido a un voltio-ohmímetro EVOM² (ambos de World Precision Instruments) para todos los insertos para confirmar la constitución de una barrera semipermeable. Para realizar las mediciones, se colocó una sonda en cada

pocillo con un electrodo en la cámara superior y uno en la cámara inferior.

A continuación, se trataron las células por duplicado de la siguiente manera. Se decantó cuidadosamente medio EGM-2 de los insertos y se sustituyó con medio IMDM que contenía suplementos de EGM-2 y suero bovino fetal al 0,5%, a excepción de VEGF e hidrocortisona (todos de Lonza). En algunos pocillos, el medio IMDM contenía danazol (Sigma, # D8399) en una dilución en serie con factor de dilución de 10. Se incubaron las placas en una incubadora a 37°C en CO₂ al 5% durante cuatro horas antes de añadir a la cámara superior de cada pocillo 30 µl de una solución que contenía albúmina de suero humano marcada con fluorescencia al 4%. Se incubaron las placas en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5% durante 18 horas más.

Después de esta incubación, se retiraron y desecharon los insertos, y se transfirieron 200 µl del medio de la cámara inferior a placas de fluorescencia negras de 96 pocillos (Falcon) por triplicado. A continuación, se midió la fluorescencia de cada pocillo a una longitud de onda de excitación de 340 nm y a una longitud de onda de emisión de 470 nm. A continuación, se calculó la media de las unidades de fluorescencia (UF) para cada inserto, y se promediaron las lecturas duplicadas. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

TABLA 3

Concentración de danazol	Media de las UF	STD
Ninguna	767,13	8,38
0,01 µM	688,50	14,94
0,1 µM	743,90	8,95
1,0 µM	783,39	14,59
10,0 µM	768,99	18,85

Como se puede ver, la concentración más baja de danazol (0,01 µM) dio la mayor inhibición (aproximadamente el 10%). Los pocillos de control sometidos a ensayo sin células dieron 4.000 UF en la cámara inferior, lo que demuestra que las monocapas endoteliales retinianas eran permeables de manera selectiva.

Ejemplo 4: Efecto del danazol sobre la TER de tres monocapas de células endoteliales diferentes

Se realizaron estudios para determinar el efecto del danazol sobre la resistencia eléctrica transendotelial (TER) de las células endoteliales retinianas humanas (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA). Para ello, se sembraron 150.000 células endoteliales retinianas humanas del pase 14 en insertos (tamaño de poro de 1 micra) situados en los pocillos de una placa de 24 pocillos (insertos para cultivo de células Thincert de 24 pocillos de Greiner BioOne, # 662610) en 300 µl de medio completo EGM- 2 (obtenido de Lonza). A continuación, se cultivaron las placas en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5% durante 24 horas. Después de la incubación, se decantó cuidadosamente el medio de cultivo y se sustituyó con EGM-2 de nueva aportación o EGM-2 de nueva aportación que contenía danazol a una concentración final de 1 µM. Las placas se colocaron de nuevo en la incubadora y se cultivaron durante 144 horas más. Los ensayos también se realizaron de la misma manera utilizando células endoteliales de cerebro humano del pase 8 y células endoteliales de vena umbilical humana del pase 8.

Se realizó una medición de TER inicial para cada inserto utilizando un voltio-ohmímetro EVOM² conectado a un electrodo STX100 (ambos de World Precision Instruments). Las mediciones se realizaron también a las 24, 48, 72 y 144 horas. Los resultados se presentan en las Tablas 4, 5 y 6 que aparecen a continuación. Todos los datos se presentan como mediciones de TER /cm² del inserto restando la TER de los insertos blancos.

TABLA 4

Células endoteliales retinianas humanas					
Concentración de danazol	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	144 horas
Ninguna	32,3	96,0	144,4	148,0	219,7
1,0 µM	21,7	132,3	182,3	217,7	234,8

TABLA 5

Células endoteliales de cerebro humano					
Concentración de danazol	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	144 horas
Ninguna	41,4	115,7	176,3	154,0	151,5
1,0 µM	32,3	139,9	188,4	149,5	125,8

TABLA 6

Células endoteliales de vena umbilical humana					
Concentración de danazol	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	144 horas
Ninguna	82,3	217,2	276,3	226,8	227,3
1,0 µM	70,2	246,0	364,1	270,7	286,4

Como se puede ver, el danazol mejoraba las mediciones de TER (permeabilidad a los iones reducida) en las monocapas de células endoteliales retinianas y de vena umbilical. El danazol no parecía tener mucho efecto sobre la TER de las monocapas de células endoteliales de cerebro, excepto en el instante de tiempo más temprano. La TER es una medición de la resistencia eléctrica a través de las monocapas celulares. Es una indicación de la integridad de la barrera y se correlaciona con la permeabilidad a los iones.

Ejemplo 5: Efecto del danazol sobre la fosforilación de Akt

Se realizaron ensayos para determinar el efecto del danazol sobre la fosforilación de Akt en células endoteliales retinianas humanas (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA). Se cultivaron las células en un matraz de 25 cm² hasta casi alcanzar la confluencia en medio EGM-2 (Lonza, Walkersville, MD) que contenía suero de ternera fetal al 2% (Lonza). A continuación, se liberaron las células del matraz de subcultivo utilizando Tripsina/EDTA. Se contaron las células en la suspensión resultante y se sembraron en una placa de 96 pocillos a una concentración de 1 x 10⁴ células/pocillo en medio EGM-2. Se incubó la placa a 37°C con CO₂ al 5% durante 24 horas. A continuación, se añadieron 200 µl de medio EGM-2 (control) o de diversas concentraciones de danazol, y se incubaron las placas durante 2 horas más. Después de esta incubación, se fijaron inmediatamente las células con formaldehído al 4%, refrigerado, y se determinó el grado de fosforilación de Akt utilizando el kit Akt Cellular Activation of Signaling ELISA (Kit CASE™ para AKT S473; SABiosciences, Frederick, MD) siguiendo los protocolos del fabricante. El Kit CASE™ para AKT S473 cuantifica la cantidad de proteína Aka activada (fosforilada) en relación con la proteína Akt total en ensayos paralelos utilizando un formato de ELISA convencional con detección colorimétrica. El sitio de fosforilación de la Akt es la serina 473 y es reconocido por uno de los anticuerpos utilizados en uno de los dos ensayos paralelos para proporcionar una medida de la proteína Akt activada. El otro anticuerpo utilizado en el otro ensayo paralelo reconoce la Akt para proporcionar una medida de la proteína Akt total. Ambos anticuerpos primarios se detectan utilizando un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano. La adición de solución de desarrollo del fabricante durante 10 minutos, seguida de la adición de solución de parada del fabricante, produce el resultado que se puede medir colorimétricamente.

Los resultados se presentan en la Tabla 7 que aparece a continuación. Como se puede ver en ella, todas las concentraciones de danazol provocaban un aumento de la fosforilación de la Akt (activación).

TABLA 7

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DEL AUMENTO DE LA FOSFORILACIÓN DE LA AKT FRENTE AL CONTROL	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Danazol 0,5 µM	73,8%	92,9%
Danazol 1,0 µM	66,7%	11,7%
Danazol 2,0 µM	101,6%	9,1%
Danazol 5,0 µM	40,5%	17,7%
Danazol 10,0 µM	115,3%	112,9%
Danazol 20,0 µM	161,3%	128,7%
Danazol 50,0 µM	98,6%	61,2%

Se cree que estos resultados proporcionan una posible explicación para la curva de respuesta a la dosis de la permeabilidad vascular obtenida en el Ejemplo 2. Como se muestra en el Ejemplo 2, las dosis bajas de danazol reducían la permeabilidad, mientras que las dosis altas aumentaban la permeabilidad. Se cree que un determinado nivel de fosforilación de la Akt en S473 reduce la permeabilidad (las concentraciones de 0,5 µM-5,0 µM en este experimento), mientras que la hiperfosforilación de la Akt en S473 provoca el aumento de la permeabilidad (las concentraciones de 10 µM-50 µM en este experimento).

Ejemplo 6: Efecto del danazol y de los antagonistas del receptor de esteroides sobre la TER de las monocapas de células endoteliales retinianas

Se realizaron ensayos para determinar el efecto del danazol y de los antagonistas del receptor de esteroides sobre la resistencia eléctrica transendotelial (TER) de las células endoteliales retinianas humanas (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA). Para ello, se recubrieron insertos en pocillos para cultivo de tejidos de Greiner (insertos para cultivo de células Thincert de 24 pocillos de Greiner BioOne, # 662610) con 5 µg/cm² de fibronectina (Sigma). A continuación, se sembraron células endoteliales retinianas humanas del pase 12 en la cámara superior de los pocillos a una concentración de 120.000 células por inserto en un volumen de 300 µl de medio EGM-2 (Lonza). El volumen para la cámara inferior fue de 700 µl de medio EGM-2 (Lonza). Se cultivaron las placas en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5% durante 48 horas para constituir las monocapas intactas. Al final de la incubación, se realizaron las mediciones de TER para todos los insertos utilizando una sonda STX 2 unida a un voltio-ohmímetro EVOM² (ambos de World Precision Instruments) para confirmar la integridad de la barrera endotelial. Todos los insertos presentaron resistencia elevada en comparación con los insertos sin células.

A continuación, se decantó cuidadosamente el medio de cultivo y se reemplazó con EGM-2 de nueva aportación, con y sin varios aditivos. Los aditivos fueron danazol, hidroxiflutamida (antagonista del receptor de andrógenos),

fluvestrant (antagonista de estrógenos) y el inhibidor de la PI3 quinasa LY294002 (control). Las soluciones madre de todos los aditivos, excepto del danazol, se elaboraron a una concentración de 10 mM en DMSO. La solución madre de danazol fue de 10 mM en etanol. Se elaboraron 200 μ M de diluciones de trabajo de todos los aditivos en los mismos disolventes. A continuación, se elaboraron diluciones 200 nM de cada aditivo, y de diluciones equivalentes de etanol y DMSO (controles), en medio EGM-2, y se añadieron a los pocillos danazol y cada uno de los demás aditivos o medio (control) en las combinaciones y a las concentraciones finales mostradas en la tabla que se presenta más adelante. A continuación, se colocaron de nuevo las placas en la incubadora, y se realizaron mediciones de TER para cada inserto como se ha descrito anteriormente a los 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos y 24 horas. Se calculó la TER restando la medición basal (inserto vacío) de la lectura de un inserto y dividiendo por el área superficial del inserto (0,33 cm²). Los resultados se presentan en la Tabla 8 que aparece a continuación.

TABLA 8

Tratamiento	TER a los 30 minutos	TER a los 60 minutos	TER a los 120 minutos	TER a las 24 horas
Ninguno	216,22	249,25	234,23	312,31
Danazol 0,1 μ M	255,26	267,27	249,35	366,37
Hidroxiiflutamida 0,1 μ M	177,18	186,19	201,20	297,30
Fluvestrant 0,1 μ M	228,23	270,27	258,26	336,34
Hidroxiiflutamida 0,1 μ M seguido de danazol 0,1 μ M	237,24	276,28	240,24	363,36
Fluvestrant 0,1 μ M seguido de danazol 0,1 μ M	195,20	309,31	255,26	393,39
LY294002 10,0 μ M	297,30	354,35	276,28	345,35
LY294002 10,0 μ M seguido de danazol 0,1 μ M	243,24	342,34	270,27	336,34

Como se puede ver en la Tabla 8, el danazol y el fluvestrant aumentaban las mediciones de TER (permeabilidad reducida), mientras que hidroxiflutamida reducía las lecturas (permeabilidad aumentada), en comparación con el control (sin tratamiento). El danazol evitaba la reducción debida a la hidroxiflutamida. Esto podría ser una prueba de que el danazol está ocupando el receptor de andrógenos en estas células. El danazol y el fluvestrant presentaron resultados aditivos en algunos instantes de tiempo.

20 Ejemplo 7: Efecto del danazol sobre la formación de fibras de estrés de actina

Las IEJ de la vía paracelular incluyen las AJ y las TJ. El citoesqueleto de actina está unido a cada unión y controla la integridad de las uniones a través de la remodelación de la actina. La reorganización de los filamentos de actina en fibras de estrés da como resultado la aplicación de fuerzas mecánicas a las uniones que las separan, provocan la contracción celular y cambios en la morfología. El proceso de polimerización de la actina es muy dinámico, lo que permite la rápida reorganización de las estructuras de actina y la transición del fenotipo quiescente, caracterizado por el anillo de actina cortical grueso y la ausencia de fibras de estrés, al fenotipo de células activadas con actina cortical delgada o sin ella y abundantes fibras de estrés. El citoesqueleto de actina parece también estar implicado en la transición, tal vez mediante la regulación del desplazamiento de las caveolas.

Se sembraron células endoteliales retinianas humanas (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA) en placas de ensayo Falcon Optilux (BD Biosciences) a una concentración de 1.000 células por pocillo en un volumen total de 200 μ l de medio EGM-2 (Lonza). Se cultivaron las placas en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5% durante 48 horas. A continuación, se retiró el medio y se reemplazó con 200 μ l de medio IMDM complementado con suero bovino fetal al 0,1% (todos de Lonza), y se cultivaron las células con estas condiciones de privación de factor de crecimiento y suero durante una hora para suprimir la polimerización de la actina. A continuación, se añadieron danazol (concentraciones finales de 0,1 μ M ó 10 μ M) o el inhibidor de la PI3 quinasa LY294002 (concentración final de 10 μ M) (control positivo). Inmediatamente después de la adición de estos compuestos, se añadió FNT α (concentración final de 50 ng/ml). Después de la incubación durante 30 minutos en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5%, se aspiró el medio y se fijaron las células con formaldehído al 3,6% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante diez minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron todos los pocillos dos veces con 100 μ l de PBS. Se permeabilizaron las células utilizando Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 5 minutos. A continuación, se lavaron todos los pocillos dos veces con 100 μ l de PBS, y se añadieron a las células 50 μ l de una dilución 1:40 de rodamina-faloïdina (Invitrogen) en PBS para tefir la F-actina y se dejó sobre las células durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron todos los pocillos dos veces con 100 μ l de PBS. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de PBS y se observaron y fotografiaron las células utilizando un microscopio invertido con filtros de rodamina (ex530/em590).

Los resultados demostraron que el danazol influía en la capacidad de desarrollo de las fibras de estrés. Cuando se trataron con danazol, las células presentaron diferentes patrones de tinción, en función de la dosis. A la dosis más baja de danazol (0,1 μ M), se observó por todo el citoplasma una tinción difusa, lo que posiblemente indica un suceso de estabilización o un fenotipo de reposo. A la dosis más alta de danazol (10,0 μ M), se detectaron fibras de estrés

con puntos focales múltiples. Estos hallazgos se correlacionan con los resultados anteriores (véanse los ejemplos anteriores) de que las dosis más bajas de danazol inhiben la permeabilidad y las dosis más altas de danazol aumentan la permeabilidad. El FNT α estimula las células y se llevó a un fuerte desarrollo de fibras de estrés intenso con tinción de centros de coordinación. El danazol y LY294002 disminuían el número de células que presentaban desarrollo de fibras de estrés con el FNT α .

Ejemplo 8: Efecto del danazol sobre la formación de fibras de estrés de actina

Se sembraron células endoteliales retinianas humanas (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA) en placas de ensayo Falcon Optilux (BD Biosciences) recubiertas con 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de fibronectina a una concentración de 3.000 células por pocillo en un volumen total de 200 μl de medio EGM-2 (Lonza). Se cultivaron las placas en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5% durante 48 horas. A continuación, se retiró el medio y se reemplazó con 200 μl de medio Ultraculture complementado con suero bovino fetal al 2,0% (todos de Lonza), y se cultivaron las células en estas condiciones de privación de factor de crecimiento y suero durante toda la noche para suprimir la polimerización de la actina. A continuación, se retiró el medio y se reemplazó con medio Ultraculture de nueva aportación complementado con suero bovino fetal al 2,0% que contenía danazol (0,1 μM , 1 μM ó 10 μM) o el inhibidor de la PI3 quinasa LY294002 (10 μM) (control positivo). Después de la incubación con estos compuestos durante 30 minutos en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5%, se añadió factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (concentración final de 25 ng/ml). Después de la incubación durante 30 minutos más en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5%, se aspiró el medio y se fijaron las células utilizando formaldehído al 3,6% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante diez minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron todos los pocillos dos veces con 100 μl de PBS. Se permeabilizaron las células utilizando Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 5 minutos. A continuación, se lavaron todos los pocillos dos veces con 100 μl de PBS, y se añadieron a las células 50 μl de una dilución 1:40 de rodamina-faloidina (Invitrogen) en PBS para teñir la F-actina y se dejó sobre las células durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron todos los pocillos dos veces con 100 μl de PBS. Para la tinción de contraste de los núcleos, se añadieron a cada pocillo 100 μl de una solución de DAPI 3 μM (4,6-diamino-2-fenilindol, dilactato (Invitrogen)). Después de 5 minutos, se lavaron las células dos veces con 100 μl de PBS. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 μl de PBS y se observaron y fotografiaron las células utilizando un microscopio invertido con rodamina (ex530/em590) y filtros para DAPI (ex350/em460).

Los resultados demostraron que el danazol influía en la capacidad de desarrollo de las fibras de estrés. Cuando se trataron con danazol, las células presentaron diferentes patrones de formación de fibras de estrés, en función de la dosis aplicada. A la dosis más baja de danazol (0,1 μM), se observó por todo el citoplasma una tinción difusa de la F-actina. A una concentración de danazol 1,0 μM , la tinción difusa persistía, pero las fibras de estrés y se podían observar puntos focales alrededor de todo el perímetro de la mayoría de las células. A la dosis más alta de danazol (10,0 μM), no existía ya ninguna tinción difusa, y se veían desarrollo de fibras de estrés y puntos focales. La tinción vista con las dosis más bajas de danazol presentó un patrón de tinción perinuclear, lo que indicaba una estabilización de microtúbulos similar a la observada con el paclitaxel (un compuesto de Taxol conocido por estabilizar y polimerizar microtúbulos). Con el VEGF, se produjo un fuerte desarrollo de fibras de estrés. El danazol cambiaba el patrón del VEGF de una manera dependiente de la dosis: (i) la dosis más baja de danazol de 0,1 μM hacía las fibras de estrés menos pronunciadas y apareció cierta tinción difusa; (ii) la dosis de 1,0 μM presentó un menor número de fibras de estrés gruesas, pero se vieron puntos focales en las superficies de contacto; y (iii) la dosis más alta de danazol de 10,0 μM presentó un fuerte desarrollo de fibras de estrés con puntos focales. El LY294002 evitaba el fuerte desarrollo de fibras de estrés visto con el VEGF y presentaba tinción difusa.

Ejemplo 9: Efecto del danazol sobre la fosforilación de la cadherina del endotelio vascular (VE-cadherina)

Se cultivaron células endoteliales retinianas humanas del pase 12 (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA) hasta la confluencia en placas de cultivo para tejidos de 10 cm^2 recubiertas de fibronectina (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) utilizando medio de cultivo EGM-2 (Lonza) en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5%. Cuando se consiguió la confluencia completa, se reemplazó el medio con medio Ultraculture complementado con suero bovino fetal al 0,5% y L-glutamina (todos de Lonza), y se cultivaron las células en estas condiciones de privación de factor de crecimiento y suero durante 24 horas. A continuación, se retiró el medio y se reemplazó con medio Ultraculture de nueva aportación complementado con suero bovino fetal al 0,5% y L-glutamina que contenía danazol (0,1 μM , 1 μM ó 10 μM) o etanol (vehículo de control). Después de la incubación durante 15 minutos en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5%, se añadió factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (concentración final de 50 ng/ml), y se incubaron las placas durante 15 minutos más en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5%.

Se trataron inmediatamente las placas de la siguiente manera para lisar las células. Se enfriaron, a 4°C, PBS y el tampón de lisis (PBS que contenía Triton X-100 al 1% complementado con las soluciones de inhibidor de fosfatasa 1 y 2 (Sigma), inhibidor de proteasa (Sigma) y ortovanadato sódico a una concentración final de 2 mM). Se lavaron las células dos veces con 5 ml del PBS helado y a continuación se lisaron en 500 μl de tampón de lisis helado. Los extractos de proteína resultantes se transfirieron a tubos de microcentrifuga de 1,7 ml, y los residuos celulares se eliminaron por centrifugación a 4°C a 10.000 rpm durante 10 minutos. A continuación, se transfirieron 450 μl de la solución clarificada a tubos que contenían 25 μl de Dynabeads de proteínas (Invitrogen), recubiertas con 10 μl de anticuerpo policlonal anti-VE-cadherina C-19 (Santa Cruz Biotechnology) (recubrimiento realizado siguiendo el

protocolo del fabricante). A continuación, se incubaron los extractos y las perlas durante toda la noche a 4°C en un agitador orbital para capturar la VE-cadherina de los extractos. A continuación, se lavaron las perlas cuatro veces con tampón de lisis helado. Para liberar la proteína de las perlas, se calentaron durante 10 minutos a 75°C en colorante de carga SDS que contenía colorante reductor al 20% (Invitrogen).

5 Las proteínas liberadas se separaron en geles de poliacrilamida al 4%-20% (Invitrogen) a 120 voltios durante 1 hora. Para determinar la fosforilación y la proteína total en los geles, se realizó de forma secuencial la tinción de proteínas con Pro-Q Diamond (Invitrogen) y SYPRO Ruby (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. Se fotografiaron los geles y se realizó la densitometría utilizando un puesto de formación de imágenes Kodak. Los resultados se
10 presentan en la Tabla 9 que aparece a continuación.

TABLA 9

VE-Cadherina				
	Control negativo (control de etanol)	Danazol 0,1 µM	VEGF	Danazol 0,1 µM seguido de VEGF
Intensidad relativa - Resultados ProQ (proteína fosforilada)	1,00	1,51	1,89	1,38
Intensidad relativa - Resultados SYPRO (proteína total)	1,00	0,89	0,84	0,83
Relación proteína fosforilada:proteína total	0,215	0,365 (aumento de 1,70 veces)	0,481 (aumento de 2,24 veces)	0,358 (aumento de 1,66 veces)

15 Como se puede ver, el danazol produjo un aumento de la fosforilación de la VE-cadherina. El VEGF produjo un aumento aún mayor de la fosforilación de la VE-cadherina (hiperfosforilación), que fue invertido por el danazol. La VE-cadherina es un componente de las AJ, y la fosforilación de la VE-cadherina puede tener una variedad de efectos en función del residuo. En general, la fosforilación de la tirosina de la VE-cadherina conduce al desensamblaje de las AJ y al aumento de la permeabilidad. Sin embargo, la fosforilación de la serina 665, provoca una rápida aunque reversible internalización de la VE-cadherina asociada con una función de barrera reducida.
20 Parece existir un bucle de retroalimentación en el que la VE-cadherina internalizada impulsa un aumento de la p120 citoplasmática, una proteína de armazón que forma complejos con las AJ. Esta regulación positiva induce una disminución de la RhoA activa en asociación con un aumento de las GTPasas estabilizadoras de barrera como Rac1, Rap-1, y Cdc42. Se cree que el aumento en la fosforilación de la VE-cadherina observado en este experimento después de un tratamiento con una dosis baja de danazol conduce a la activación de las GTPasas estabilizadoras de barrera. Además, el danazol puede evitar los sucesos de fosforilación desestabilizadores inducidos por el VEGF.
25

30 Ejemplo 10: Efecto del danazol y de los antagonistas del receptor de esteroides sobre la TER de las monocapas de células endoteliales retinianas

Se realizaron ensayos para determinar el efecto del danazol y de los antagonistas del receptor de esteroides sobre la resistencia eléctrica transendotelial (TER) de células endoteliales retinianas humanas (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA). Para ello, se recubrieron insertos en pocillos para cultivo de tejidos de Greiner (insertos para cultivo de células Thincert de 24 pocillos de Greiner BioOne, # 662610) con 5 µg/cm² de fibronectina. A continuación, se sembraron células endoteliales retinianas humanas del pase 13 en la cámara superior de los pocillos a una concentración de 120.000 células por inserto en un volumen de 300 µl de medio EGM-2 (Lonza). El volumen para la cámara inferior fue de 700 µl de medio EGM-2 (Lonza). Se cultivaron las placas en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5% durante 48 horas para constituir las monocapas intactas. Al final de la incubación, se realizaron las mediciones de TER para todos los insertos utilizando una sonda STX 2 conectada a un voltio-ohmímetro EVOM² (ambos de World Precision Instruments) para confirmar la integridad de la barrera endotelial. Todos los insertos presentaron resistencia elevada en comparación con los insertos sin células.
40

A continuación, se decantó cuidadosamente el medio de cultivo y se reemplazó con EGM-2 de nueva aportación, con y sin varios aditivos. Los aditivos fueron danazol, hidroxiflutamida (antagonista del receptor de andrógenos), fluevestrant (antagonista de estrógenos), testosterona, estradiol e inhibidor de la PI3 quinasa LY294002 (control). Las soluciones madre de todos los aditivos, excepto danazol, se elaboraron a una concentración de 10 mM en DMSO. La solución madre de danazol fue 10 mM en etanol. Se elaboraron diluciones de trabajo 200 µM de todos los aditivos en los mismos disolventes. A continuación, se elaboraron diluciones 200 nM de cada aditivo, y de diluciones equivalentes de etanol y DMSO (controles), en medio EGM-2, y se añadieron a los pocillos danazol y cada uno de los demás aditivos o medio (control) en las combinaciones y a las concentraciones finales mostradas en la tabla que se presenta más abajo. A continuación, se colocaron de nuevo las placas en la incubadora, y se realizaron las mediciones de TER para cada inserto como se ha descrito anteriormente a los 5 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 24 horas. Se calculó la TER restando la medición basal (inserto vacío) a partir de la lectura de un inserto y dividiendo
50

por el área superficial del inserto (0,33 cm²). Los resultados se presentan en la Tabla 10 que aparece más adelante.

5 Como se puede ver en la Tabla 10, el danazol aumentaba las mediciones de TER, la hidroxiflutamida reducía las lecturas, la testosterona reducía las lecturas muy ligeramente, y el fluvestrant no tenía prácticamente ningún efecto, en comparación con el control (sin tratamiento). El danazol evitaba la reducción debida a la hidroxiflutamida y la muy ligera reducción vista con la testosterona. Al igual que con los resultados del Ejemplo 6, esto podría ser una prueba de que el danazol está ocupando el receptor de andrógenos en estas células.

TABLA 10

Tratamiento	TER a los 5 minutos	TER a los 30 minutos	TER a los 60 minutos	TER a las 24 horas
Ninguno	250,30	262,31	251,00	287,09
Danazol 0,1 µM	280,03	311,56	313,06	348,35
Hidroxiflutamida 0,1 µM	190,44	207,46	215,97	267,27
Hidroxiflutamida 0,1 µM seguido de danazol 0,1 µM	230,48	275,53	262,01	312,31
Fluvestrant 0,1 µM	223,47	251,50	243,99	279,28
Fluvestrant 0,1 µM seguido de danazol 0,1 µM	219,47	279,53	273,02	343,34
Testosterona 10 nM	257,51	240,49	225,98	267,27
Testosterona 100 nM seguido de danazol 0,1 µM	273,52	287,54	259,01	283,28
Estradiol 10 nM	246,50	245,50	250,00	328,33
Estradiol 10 nM seguido de danazol 0,1 µM	276,53	307,56	282,03	363,36

10

Ejemplo 11: Efecto del danazol sobre la formación de fibras de estrés de actina

15 Se sembraron células endoteliales microvasculares de glomérulo renal humano del pase 6 (ACBRI 128, Cell Systems Corporation (distribuidor exclusivo del Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA) y células endoteliales retinianas humanas del pase 12 (ACBRI 181, Cell Systems Corporation (distribuidor exclusivo del Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA) en portaobjetos de vidrio de 16 cámaras recubiertos con 5 µg/cm² de fibronectina a una concentración de 2.000 células por pocillo en un volumen total de 200 µl de medio EGM-2 (Lonza). Se cultivaron las placas en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5% durante 48 horas con cambios diarios de medio. A continuación, se añadieron los compuestos de ensayo (danazol, FNTα y S1P), diluidos en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS; Lonza), para dar las siguientes concentraciones finales: danazol (1 µM) (Sigma), FNTα (1 ng/ml) (Sigma), y S1P (1 µM) (Sigma). Se incubaron los portaobjetos con los compuestos de ensayo durante 15 minutos, 30 minutos ó 24 horas en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5%. Después de esta incubación, se aspiró el medio y se fijaron las células utilizando formaldehído al 3,6% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante diez minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron todos los pocillos dos veces con 100 µl de PBS. Se permeabilizaron las células utilizando Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 5 minutos. 25 A continuación, se lavaron todos los pocillos dos veces con 100 µl de PBS, y se añadieron a las células 50 µl de una dilución 1:40 de rodamina-faloidina (Invitrogen) en PBS para teñir la F-actina y se dejó sobre las células durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron todos los pocillos dos veces con 100 µl de PBS. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 µl de PBS y se observaron y fotografiaron las células utilizando un microscopio invertido utilizando un filtro para rodamina (ex530/em590). 30

35 Los resultados demostraron que el danazol influía en la capacidad de desarrollo de las fibras de estrés en las células endoteliales microvasculares de glomérulo renal. Cuando se trataron con danazol en solitario, las células presentaron tinción perinuclear a los 15 minutos, tinción difusa por todas las células con bordes rugosos en muchas de las células a las 3 horas, y tinción similar a los controles no tratados a las 24 horas. Con el FNTα en solitario, se vieron en todo momento fibras de estrés, aumentando con el tiempo el grosor de las fibras y el número de células que presentaban fibras de estrés. El danazol disminuía en todo momento la formación de fibras de estrés y el grosor de las fibras, y los anillos de actina cortical y los bordes rugosos fueron visibles a partir de las 3 horas. Las células tratadas con S1P en solitario presentaron anillos corticales de actina, iniciándose el desarrollo a los 15 minutos y siendo más fuerte a las 3 horas. Las células volvían a una morfología similar a la de los controles no tratados a las 40 24 horas. El danazol parecía mejorar los anillos corticales. Además, se observó tinción difusa, especialmente a los 15 minutos y a las 24 horas.

45 Para las células endoteliales retinianas tratadas con danazol en solitario, las células presentaron tinción perinuclear a los 15 minutos, tinción difusa por todas las células con bordes rugosos en muchas de las células a las 3 horas, y tinción similar a los controles no tratados a las 24 horas. Con la NTα en solitario, se vieron en todo momento fibras de estrés, aumentando el grosor de las fibras y el número de células que presentaban fibras de estrés a partir de los 15 minutos y hasta las 3 horas y reduciéndose después de 24 horas de incubación. El danazol disminuía en todo momento la formación de fibras de estrés y/o el grosor de las fibras. Se observó tinción difusa a los 15 minutos y a

las 24 horas, y los anillos de actina cortical fueron visibles a las 3 horas. Las células tratadas con S1P en solitario presentaron anillos corticales de actina, iniciándose el desarrollo a los 15 minutos y siendo más fuerte a las 3 horas. Las células volvían a una morfología similar a la de los controles no tratados a las 24 horas. El danazol parecía mejorar los anillos corticales a las 3 horas. Además, se observó tinción difusa, especialmente a los 15 minutos y a las 24 horas.

La S1P (esfingosina-1-fosfato) desempeña una función muy importante en la formación y el mantenimiento del endotelio vascular. La S1P es una entrada de señalización constitutiva que facilita la organización y la función de barrera del endotelio vascular a través de sus efectos sobre el citoesqueleto de actina. En concreto, la S1P está implicada en la formación de fibras de actina cortical y en la organización de las uniones adherentes. El agotamiento de la S1P conduce a la fuga vascular y al edema, y la S1P puede invertir la disfunción endotelial y restaurar la función de barrera.

En este experimento, el danazol presentó la capacidad de fortalecer los efectos protectores de la S1P en las células endoteliales glomerulares y retinianas. El danazol también invirtió la formación de fibras de estrés inducidas por FNT α en estos dos tipos de células endoteliales. Se ve tinción perinuclear difusa en las células tratadas con danazol en solitario.

Ejemplo 12: Efecto del danazol sobre la ECIS

Se realizaron ensayos para determinar el efecto del danazol sobre la resistencia eléctrica transendotelial (TER) de las células endoteliales microvasculares de glomérulo renal humano (ACBRI 128, Cell Systems Corporation (distribuidor exclusivo del Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA) o de las células endoteliales retinianas humanas (ACBRI 181, Cell Systems Corporation (distribuidor exclusivo del Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA). Se midió la resistencia eléctrica utilizando el sistema de detección por impedancia eléctrica célula-sustrato (ECIS) (ECISZ θ , obtenido de Applied Biophysics) con placas con electrodos múltiples de 8 pocillos (8W10E). Cada pocillo de las placas se recubrió con 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de fibronectina en HBSS añadiendo la fibronectina en un volumen de 100 μl por pocillo e incubando las placas durante 30 minutos en una incubadora a 37°C con CO $_2$ al 5%. Se eliminó la solución de fibronectina, y se añadieron a cada pocillo 400 μl de medio de cultivo EGM-2 (Lonza). Se conectaron las placas al sistema ECISZ θ y se estabilizaron eléctricamente. Se aspiró el medio EGM-2 y se reemplazó con 200 μl de medio de cultivo EGM-2 que contenía 100.000 células por pocillo. Se volvieron a conectar las placas al sistema ECISZ θ y se incubaron durante 24 horas en una incubadora a 37°C con CO $_2$ al 5%. Se aspiró el medio EGM-2 y se reemplazó con 400 μl de medio de cultivo EGM-2 de nueva aportación por pocillo. Se volvieron a conectar las placas al sistema ECISZ θ y se incubaron durante 6 horas en una incubadora a 37°C con CO $_2$ al 5%. Se prepararon soluciones concentradas de los compuestos de ensayo en HBSS y se colocaron en la incubadora para equilibrarlas. A continuación, se añadieron los compuestos de ensayo a los pocillos apropiados a las siguientes concentraciones finales: danazol (1 μM) (Sigma) y S1P (1 μM) (Sigma). Se monitorizó la ECIS (resistencia) durante 90 horas.

En las células endoteliales retinianas, el danazol 1,0 μM en solitario presentó un aumento de la ECIS en comparación con las células no tratadas que se inició aproximadamente 1,5-2,0 horas después del tratamiento y persistió durante 5 horas. La S1P en solitario presentó un aumento de la ECIS en comparación con las células no tratadas que se inició dentro de los primeros 15 minutos después del tratamiento y persistió durante aproximadamente 3 horas. El danazol y la S1P en combinación aumentaron la ECIS en comparación con la S1P en solitario y las células no tratadas, y este aumento de la ECIS persistió durante aproximadamente 90 horas. Por lo tanto, el danazol presentaba la capacidad de potenciar los efectos tempranos de la S1P y de mantener una mayor resistencia durante todo el experimento cuando se encuentra presente la S1P.

Las células endoteliales glomerulares presentaron un patrón diferente. El danazol en solitario no tuvo ningún efecto sobre la ECIS hasta aproximadamente 30 horas después del tratamiento. El danazol en solitario aumentaba la ECIS en comparación con las células no tratadas desde aproximadamente las 30 hasta aproximadamente las 90 horas, teniendo lugar el mayor aumento entre aproximadamente las 60-90 horas. La S1P en solitario tampoco tuvo ningún efecto sobre la ECIS hasta aproximadamente las 30 horas después del tratamiento. La S1P en solitario aumentaba la ECIS en comparación con las células no tratadas desde aproximadamente las 30 hasta aproximadamente las 60 horas. La combinación de danazol y S1P no tuvo ningún efecto sobre la ECIS hasta aproximadamente las 30 horas después del tratamiento. Esta combinación aumentaba la ECIS en comparación con las células no tratadas, la S1P en solitario y el danazol en solitario. En concreto, la combinación aumentaba la ECIS en comparación con las células no tratadas desde aproximadamente las 30 hasta aproximadamente las 70 horas, aumenta la ECIS en comparación con la S1P en solitario desde aproximadamente las 30 hasta las 75 horas, y aumentaba la ECIS en comparación con el danazol en solitario desde aproximadamente las 30 hasta aproximadamente las 50 horas.

Ejemplo 13: Efecto del danazol sobre la ECIS

Se realizaron ensayos para determinar el efecto del danazol sobre la resistencia eléctrica transendotelial (TER) de las células endoteliales microvasculares de glomérulo renal humano (ACBRI 128, Cell Systems Corporation (distribuidor exclusivo del Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA). Se midió la resistencia eléctrica

utilizando el sistema de detección por impedancia eléctrica célula-sustrato (ECIS) (ECISZ0, obtenido de Applied Biophysics) con placas con electrodos múltiples de 8 pocillos (8W10E). Cada pocillo de las placas se recubrió con 5 µg/cm² de fibronectina en HBSS añadiendo la fibronectina en un volumen de 50 µl por pocillo e incubando las placas durante 30 minutos en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5%. Se eliminó la solución de fibronectina, y se añadieron a cada pocillo 200 µl de medio de cultivo EGM-2 (Lonza). Se conectaron las placas al sistema ECISZ0 y se estabilizaron eléctricamente. Se aspiró el medio EGM-2 y se reemplazó con 200 µl de medio de cultivo EGM-2 que contenía 40.000 células del pase 6 por pocillo. Se volvieron a conectar las placas al sistema ECISZ0 y se incubaron durante 24 horas en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5%. Se aspiró el medio EGM-2 y se reemplazó con 200 µl de medio de cultivo EGM-2 de nueva aportación por pocillo. Se volvieron a conectar las placas al sistema ECISZ0 y se incubaron durante 24 horas más en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5%. Se aspiró el medio EGM-2 y se reemplazó con 200 µl de medio de cultivo EGM-2 de nueva aportación sin dexametasona por pocillo. Se volvieron a conectar las placas al sistema ECISZ0 y se incubaron durante toda la noche en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5%. Por último, se aspiró el medio EGM-2 y se reemplazó con 200 µl de medio de cultivo EGM-2 de nueva aportación sin dexametasona por pocillo. Se volvieron a conectar las placas al sistema ECISZ0 y se incubaron 2 horas en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5%. Se prepararon soluciones concentradas de los compuestos de ensayo en HBSS y se colocaron en la incubadora para equilibrarlas. A continuación, se añadieron los compuestos de ensayo a los pocillos apropiados a las siguientes concentraciones finales: danazol (1 µM) (Sigma) y dexametasona (1 µM) (Sigma). Se monitorizó la ECIS (resistencia) durante 90 horas.

El danazol en solitario aumentaba la ECIS en comparación con las células no tratadas a partir de aproximadamente las 3 horas y persistiendo durante aproximadamente 90 horas. El mayor aumento fue de aproximadamente las 12 a aproximadamente las 15 horas. En comparación con la dexametasona, el danazol presentó un patrón similar, pero la mejora de la ECIS (TER) no fue tan grande.

25 Ejemplo 14: Efecto del danazol sobre la RhoA

La remodelación del citoesqueleto de las células endoteliales es fundamental para muchas funciones del endotelio. La familia Rho de proteínas pequeñas de unión a GTP ha sido identificada como la reguladora clave de la dinámica del citoesqueleto de F-actina. La familia Rho consiste en tres isoformas, RhoA, RhoB y RhoC. La activación de la actividad de RhoA conduce a la formación de fibras de estrés prominentes en las células endoteliales. La estimulación de las células endoteliales con trombina aumenta la fosforilación de la miosina y la Rho GTP, coherente con la contractilidad celular aumentada. La inhibición de RhoA bloquea esta respuesta y la pérdida de la función de barrera, lo que demuestra el papel crítico de la Rho en la permeabilidad vascular.

Este experimento se realizó utilizando un ensayo de activación de Rho disponible en el mercado (GLISA) adquirido de Cytoskeleton, Denver, Colorado, siguiendo el protocolo del fabricante. En resumen, se cultivaron células endoteliales retinianas humanas del pase 8 ó 12 (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA) en placas de cultivo para tejidos de 6 pocillos recubiertas de fibronectina (1 µg/cm²) utilizando medio de cultivo EGM-2 (Lonza) durante 24 horas en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5%. (30.000 células/pocillo en un volumen total de 3 ml). A continuación, se aspiró el medio y se reemplazó con medio Ultraculture complementado con suero bovino fetal al 0,1%, L-glutamina, piruvato sódico, penicilina/estreptomycina e ITSS (insulina, transferrina selenio sodio) (todos de Lonza) para privar a las células de suero y reducir el nivel basal de RhoA. Se cultivaron las células durante 24 horas en una incubadora a 37°C con CO₂ al 5%. Se colocaron los compuestos de ensayo diluidos en HBSS en la incubadora para equilibrarlos antes de añadirse a las células. A continuación, se añadieron a los pocillos de cultivo apropiados 150 µl de cada compuesto de ensayo, y se incubaron las placas en la incubadora durante 15 minutos más. A continuación, se añadió trombina a los pocillos apropiados. Después de 1 minuto, se lavaron las células una vez con 1,5 ml de solución salina tamponada con fosfato y a continuación se lisaron con 100 µl de tampón de lisis GLISA complementado con inhibidores de proteasas. Se rasparon los extractos, se transfirieron a tubos de microcentrífuga y se transfirieron a hielo para conservar la forma activa de la RhoA. A continuación, se eliminan los residuos de todos los extractos por centrifugación a 10.000 rpm durante 2 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos y se colocaron de nuevo en hielo. Se retiraron alícuotas de cada extracto para el ensayo GLISA y para la determinación de proteínas. Todas las concentraciones de proteínas estaban dentro del 10%, y se utilizaron los extractos a las concentraciones conseguidas (equivalente a 15 µg de proteína total por pocillo). El ensayo de GLISA se realizó utilizando los reactivos suministrados con el kit.

Los resultados para las células endoteliales retinianas del pase 12 se presentan en la Tabla 11 que aparece más adelante. Como era de esperar, los niveles de Rho A activa inducidos por la trombina eran muy altos. Todos los compuestos de ensayo inhibían la activación de la Rho A inducida por trombina.

Los resultados para las células endoteliales retinianas del pase 8 se presentan en la Tabla 12 que aparece más adelante. Como era de esperar, los niveles de Rho A activa inducidos por la trombina eran muy altos. Todos los compuestos de ensayo inhibían la activación de la Rho A inducida por trombina.

TABLA 11

Tratamiento	Media de la DO	Porcentaje de inhibición frente al control no tratado	Porcentaje de inhibición frente a la trombina
No tratado	0,455	---	---
Danazol 0,1 µM	0,424	6,82	---
Dexametasona 0,1 µM	0,428	5,83	---
Inhibidor de la PI3 quinasa LY294002 10,0 µM	0,370	18,70	---
Inhibidor* de Src-1 1,0 µM	0,349	23,21	---
Trombina 0,1 U/ml	1,013	---	---
Trombina 0,1 U/ml + Danazol 0,1 µM	0,859	---	27,57
Trombina 0,1 U/ml + Dexametasona 0,1 µM	0,826	---	33,48
Trombina 0,1 U/ml + Inhibidor de la PI3 quinasa LY294002 10,0 µM	0,685	---	58,73
Trombina 0,1 U/ml + Inhibidor de Src-1 1,0 µM	0,534	---	85,85

* Obtenido de Sigma

TABLA 12

Tratamiento	Media de la DO	Porcentaje de inhibición frente al control no tratado	Porcentaje de inhibición frente a la trombina
No tratado	0,102	---	---
Danazol 0,1 µM	0,027	73,89	---
Inhibidor de la PI3 quinasa LY294002 10,0 µM	0,056	45,32	---
Trombina 0,1 U/ml	0,561	---	---
Trombina 0,1 U/ml + Danazol 0,1 µM	0,373	---	41,02
Trombina 0,1 U/ml + Inhibidor de la PI3 quinasa LY294002 10,0 µM	0,433	---	27,86

5 Ejemplo 15: Modelo Animal de hiperpermeabilidad vascular

Conejos blancos de Nueva Zelanda recibieron 0,215 mg/kg de danazol por vía oral dos veces al día durante 7 días. A continuación, se inyectó a los conejos por vía intravítrea, una vez, factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGF-A) para producir fuga vascular en la retina. A continuación, 24 horas más tarde, se les inyectó fluoresceína sódica, y se midió la fluorescencia de los ojos utilizando un Fluorotron (Ocumetrics) (promedio de cinco mediciones). Un solo conejo de control (placebo) tenía 250 unidades de fluorescencia en la retina, lo que indica fuga vascular en esa zona. Un único conejo tratado con danazol dio 16 unidades de fluorescencia, lo que representa una reducción del 94% de la fuga vascular debida al danazol.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado de entre danazol y las sales farmacéuticamente aceptables de danazol para su uso en el tratamiento del edema macular en un animal que lo necesite.
- 10 2. Cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado de entre danazol y las sales farmacéuticamente aceptables de danazol para su uso según la reivindicación 1, en la que el edema macular es edema macular diabético.
- 15 3. Cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado de entre danazol y las sales farmacéuticamente aceptables de danazol para su uso según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento del edema macular en el momento de la aparición de un primer indicio (o más) de, o una predisposición a desarrollar, edema macular.
- 20 4. Cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado de entre danazol y las sales farmacéuticamente aceptables de danazol para su uso según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento del edema macular inmediatamente después del diagnóstico de edema macular.
- 25 5. Cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado de entre danazol y las sales farmacéuticamente aceptables de danazol para su uso según la reivindicación 1, en la que la hiperpermeabilidad vascular es hiperpermeabilidad vascular de un endotelio continuo que se encuentra en, o alrededor de, una retina.
- 30 6. Cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado de entre danazol y las sales farmacéuticamente aceptables de danazol para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el compuesto es danazol.
- 35 7. Cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado de entre danazol y las sales farmacéuticamente aceptables de danazol para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el compuesto se administra por vía oral.
- 40 8. Cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado de entre danazol y las sales farmacéuticamente aceptables de danazol para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el animal es un ser humano.
- 45 9. Cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado de entre danazol y las sales farmacéuticamente aceptables de danazol para su uso según la reivindicación 8, en la que la cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular es de 1 ng a 100 mg del compuesto al día, preferentemente de 1 mg a 100 mg del compuesto al día, y más preferentemente de 10 mg a 90 mg del compuesto al día.
10. Cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado de entre danazol y las sales farmacéuticamente aceptables de danazol para su uso según la reivindicación 9, en la que la cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular es de 10 mg a 90 mg del compuesto al día.
11. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto seleccionado de entre danazol y las sales farmacéuticamente aceptables de danazol, para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

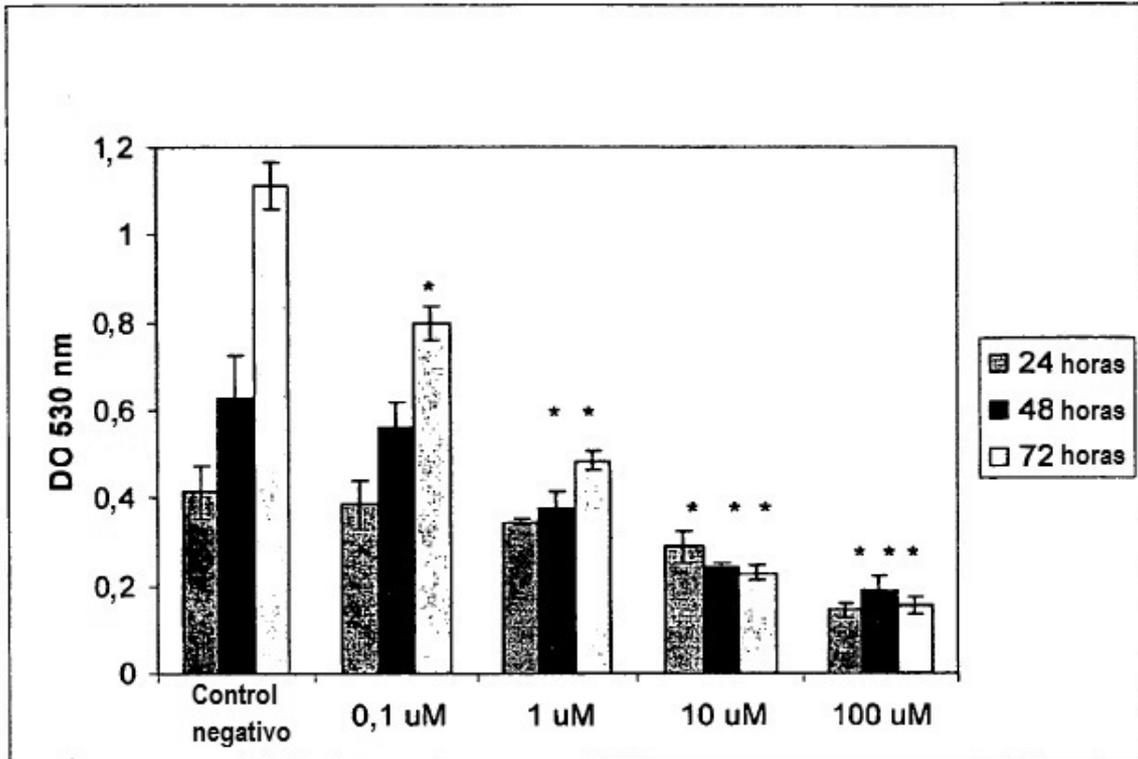


FIGURA 1



FIGURA 2

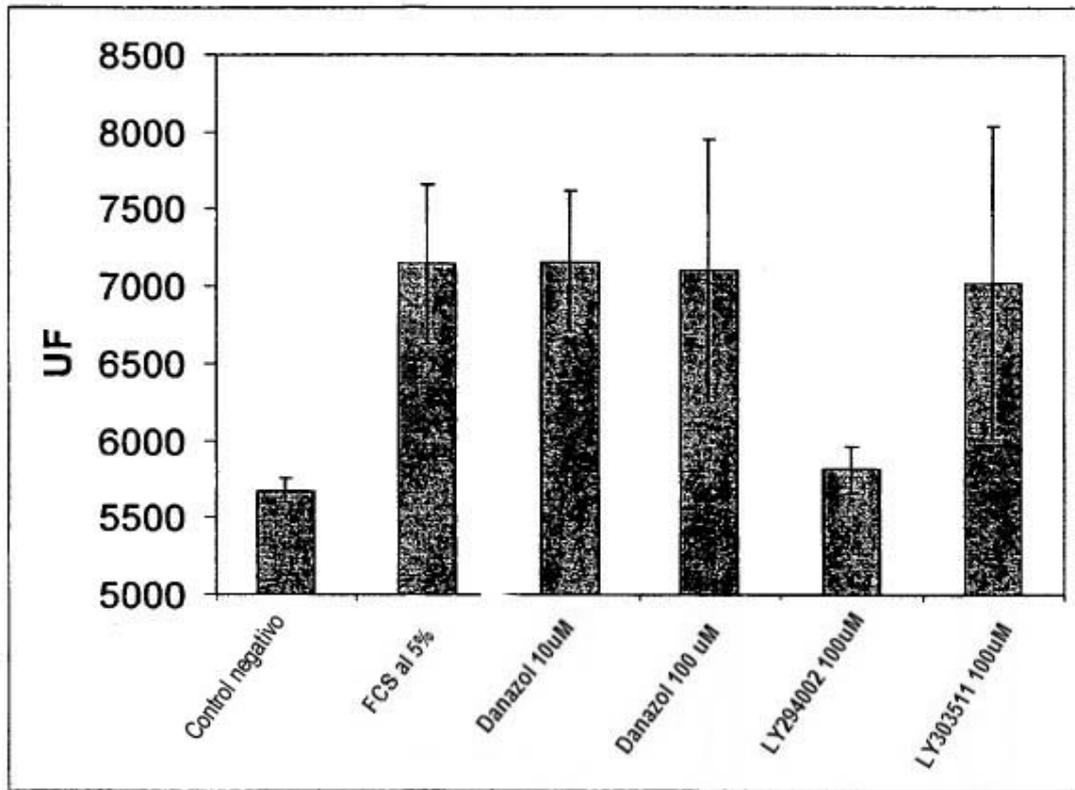


FIGURA 3