

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 769**

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 11009239 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2425839**

54 Título: **Procedimiento de tratamiento de enfermedades**

30 Prioridad:

**22.06.2009 US 219185 P**

**18.03.2010 US 315350 P**

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

**01.12.2014**

73 Titular/es:

**AMPIO PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**

**373 Inverness Parkway, Suite 200**

**Englewood, CO 80112, US**

72 Inventor/es:

**BAR-OR, DAVID**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 523 769 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

Procedimiento de tratamiento de enfermedades

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a una cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado entre danazol y sales farmacéuticamente aceptables de danazol para el uso en el tratamiento de nefropatía diabética.

10

**Antecedentes**

El endotelio vascular reviste el interior de todos los vasos sanguíneos. Actúa de superficie de separación 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, sería muy deseable tener un procedimiento para reducir el edema, preferentemente en su etapa más temprana, y restaurar la barrera endotelial a la fisiológica.

15

20

El documento WO 2007/009087 A2 se refiere al uso de danazol como un compuesto antiangiogénico para tratar enfermedades causadas por la angiogénesis. Tales enfermedades pueden incluir etapas de la retinopatía diabética caracterizadas por la neovascularización (es decir, retinopatía diabética proliferativa).

25

Tomino, Y., *et al.*, "Clinical Effect of Danazol in Patients with IgA Nephropathy", *Japanese Journal of Medicine*; vol. 26, N.º 2, 1987, páginas 162-166 describe en la página 165 que se logró el tratamiento satisfactorio de la nefropatía por IgA con danazol mediante el efecto de danazol en forma de una mayor solubilización de los depósitos intraglomerulares.

30

Hoepfl, F., *et al.*, "Long-term Danazol Therapy For Hereditary Angio-Edema", *DMW*; vol. 115, N.º 4, 1990, páginas 133-138, se refiere al uso de 400 mg a la semana de danazol para el tratamiento del angioedema hereditario, donde el angioedema hereditario está causado por una deficiencia del inhibidor de la esterasa de la proteína C1 plasmática.

35

**Sumario de la invención**

La invención proporciona una cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado entre danazol y sales farmacéuticamente aceptables de danazol según la reivindicación 1 y una composición farmacéutica según la reivindicación 8. Adicionalmente se describe, pero no es parte de la invención, un procedimiento de inhibición de hiperpermeabilidad vascular y edema y otros efectos adversos que resultan de ellos. El procedimiento comprende administrar una cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto de danazol a un animal en necesidad del mismo. La inhibición de la hiperpermeabilidad vascular según la invención incluye la inhibición de la hiperpermeabilidad causada por paracelular e hiperpermeabilidad causada por transcitosis. Pruebas evidentes indican que la hiperpermeabilidad causada por transcitosis es la primera etapa de un proceso que conduce por último lugar a daño a tejidos y órganos en muchas enfermedades y afecciones. Por consiguiente, se desvelan medios de intervención tempranos en estas enfermedades y afecciones que pueden reducir, retardar o incluso prevenir posiblemente el daño a tejidos y órganos observado en ellos.

40

45

50

Adicionalmente se describe, pero no es parte de la invención, un procedimiento de modulación del citoesqueleto de células endoteliales en un animal. El procedimiento comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de danazol al animal.

55

"Hiperpermeabilidad vascular" se usa en el presente documento para indicar la permeabilidad de un endotelio vascular que está aumentada en comparación con los niveles basales. "Hiperpermeabilidad vascular", como se usa en el presente documento, incluye la hiperpermeabilidad causada por paracelular y la hiperpermeabilidad causada por transcitosis.

60

"Hiperpermeabilidad causada por paracelular" se usa en el presente documento para indicar la hiperpermeabilidad vascular causada por el transporte paracelular que está aumentada en comparación con los niveles basales. A continuación se describen otras características de la "hiperpermeabilidad causada por paracelular".

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

65

"Hiperpermeabilidad causada por transcitosis" se usa en el presente documento para indicar la hiperpermeabilidad vascular causada por transcitosis que está aumentada en comparación con los niveles basales.

“Transcitosis” se usa en el presente documento para indicar el transporte activo de macromoléculas y constituyentes plasmáticos de fase fluida acompañantes a través de las células endoteliales del endotelio. A continuación se describen otras características de la “transcitosis”.

5 “Nivel basal” se usa en el presente documento para indicar el nivel encontrado en un tejido u órgano normal.

“Inhibir”, “que inhibe” y términos similares se usan en el presente documento para indicar reducir, retardar o prevenir.

10 Un animal está “en necesidad de” tratamiento según la invención si el animal tiene actualmente una enfermedad o afección mediada por hiperpermeabilidad vascular, presenta los primeros indicios de una enfermedad o afección tal o tiene una predisposición a desarrollar una enfermedad o afección tal.

15 “Mediado” y términos similares se usan en el presente documento para indicar causado por, que causa, que participa o agravado por, hiperpermeabilidad vascular.

### Breve descripción de los dibujos

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

25 La figura 2 muestra fotografías de las células HUVEC tomadas después de la incubación con danazol como una medida de su capacidad para prevenir la formación de tubos de las células endoteliales. A = control; B = danazol 1  $\mu$ M, C = danazol 10  $\mu$ M, D = danazol 50  $\mu$ M y E = LY294002 50  $\mu$ M.

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

### Descripción detallada de las realizaciones presentemente preferidas de la invención

30 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 particular a las moléculas transportadas por la sangre. La permeabilidad y la selectividad de la barrera celular endotelial son fuertemente dependientes de la estructura y tipo de endotelio que reviste la microvasculatura en los diferentes lechos vasculares.

35 Las células endoteliales que revisten los lechos microvasculares de diferentes órganos presentan una diferenciación estructural que puede agruparse en tres categorías morfológicas principales: sinusoidal, fenestrada y continua.

40 El endotelio sinusoidal (también denominado “endotelio discontinuo”) tiene grandes huecos intercelulares e intracelulares y no tiene membrana basal, permitiendo un transporte mínimamente restringido de moléculas de la luz capilar al tejido y viceversa. El endotelio sinusoidal se encuentra en hígado, bazo y médula ósea.

45 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 el 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, excepto aquellos glomérulos sanos maduros. Véase Ichimura y col., J. Am. Soc. Nephrol., 19:1463-1471 (2008).

50 Los endotelios continuos no contienen fenestraciones o grandes huecos. En su lugar, los endotelios continuos se caracterizan por una monocapa de células endoteliales sin interrupciones. La mayoría de los endotelios en el 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 áreas de los riñones (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 órganos y tejidos del

55 cuerpo.

60 Se puede considerar, en un sentido general, que el transporte endotelial en el endotelio continuo se produce por las vías paracelular y transcelular. La vía paracelular es la vía entre las células endoteliales, a través de las uniones interendoteliales (UIE). En 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 de células endoteliales transcelularmente a través de los canales de membrana de transporte de agua llamados acuaporinas. Una variedad de estímulos puede alterar la organización de las UIE, abriéndose así huecos en la barrera endotelial. La formación de estos huecos intercelulares permite de manera no restringida el paso de fluido, iones, macromoléculas (por ejemplo, proteínas) y otros componentes plasmáticos entre las células

65 endoteliales. Esta hiperpermeabilidad causada por paracelular produce edema y otros efectos adversos que con el tiempo pueden producir daño a tejidos y órganos.

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 denominado “transcitosis”. El transporte de macromoléculas se produce en vesículas llamadas caveolas. Casi todos los endotelios continuos tienen abundantes caveolas, excepto los endotelios continuos localizados en el cerebro y 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, en la que las caveolas liberan su contenido por exocitosis al intersticio. La transcitosis es selectiva y está bien regulada en condiciones fisiológicas normales.

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 puede apreciarse 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 así edema.

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son también transportadas a través de las células endoteliales por transcitosis. En hiperlipidemia se ha detectado un aumento significativo en la transcitosis de LDL como acontecimiento inicial en la aterogénesis. La LDL se acumula en el espacio subendotelial, atrapadas dentro de la lámina basal expandida y la matriz extracelular. La acumulación subendotelial de lipoproteínas en la hiperlipidemia va seguida de una cascada de acontecimientos que producen la formación de placas ateromatosas. Se informa que las lesiones ateroscleróticas avanzadas van ocasionalmente acompañadas de la apertura de las UIE y el paso incontrolado masivo de LDL y albúmina.

Las complicaciones vasculares son una característica distintiva de la diabetes. Al 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 investigaciones muestra que la diabetes también afecta 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 una intensificación del transporte vesicular transendotelial (es decir, por el aumento de la transcitosis) y no por la desestabilización de las UIE. Además, se ha informado que las células endoteliales de los diabéticos, incluyendo las del cerebro, contienen un elevado número de caveolas en comparación con las normales, y las proteínas glicosiladas, particularmente la albúmina glicosilada, son absorbidas por células endoteliales y transportadas por transcitosis a velocidades sustancialmente 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 de edema en los tejidos y órganos diabéticos durante toda la enfermedad si no se trata. Este edema, a su vez, conduce a daño a tejidos y órganos. Se ha informado de aumentos similares en el transporte transcelular de macromoléculas en hipertensión.

La hiperpermeabilidad causada por paracelular también es un factor en la diabetes y las complicaciones vasculares de la diabetes. Las UIE de la vía paracelular incluyen las uniones adherentes (UA) y las uniones estrechas (UE). La diabetes altera el contenido, fosforilación y localización de ciertas proteínas en las UA y en las UE, contribuyendo así al aumento de la permeabilidad de la barrera endotelial.

En apoyo de la discusión anterior y para mayor información, véanse Frank y col., *Cell Tissue Res.*, 335:41-47 (2009), Simionescu y col., *Cell Tissue Res.*, 335:27-40 (2009); van den Berg y col., *J. Cyst. Fibros.*, 7(6): 515-519 (2008); Viazzi y col., *Hypertens. Res.*, 31:873-879 (2008); Antonetti y col., Capítulo 14, páginas 340-342, en *Diabetic Retinopathy* (editado por Elia J. Duh, Humana Press, 2008), Felinski y col., *Current Eye Research*, 30:949-957 (2005), Pascariu y col., *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(1):65-76 (2004); Bouchard y col., *Diabetologia*, 45:1017-1025 (2002); Arshi y col., *Laboratory Investigation*, 80(8):1171-1184 (2000); Vinos y col., *Documenta Ophthalmologica*, 97:217-228 (1999); Oomen y col., *European Journal of Clinical Investigation*, 29:1035-1040 (1999); Vinos y col., *Pathol. Res. Pract.*, 194:497-505 (1998); Antonetti y col., *Diabetes*, 47:1953-1959 (1998), Popov y col., *Acta Diabetol.*, 34:285-293 (1997); Yamaji y col., *Circulation Research*, 72:947-957 (1993); Vinos y col., *Histochemical Journal*, 25:648-663 (1993); Beals y col., *Microvascular Research*, 45:11-19 (1993); Caldwell y col., *Investigative Ophthalmol. Visual Sci.*, 33(5):1610-1619 (1992).

El transporte endotelial en 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 muestran una permeabilidad sorprendentemente alta al agua y solutos hidrófilos pequeños debido a la presencia de las fenestraciones.

Las fenestraciones pueden o pueden no estar cubiertas por un diafragma. Las localizaciones de endotelio con fenestraciones con diafragma incluyen tejido endocrino (por ejemplo, islotes pancreáticos y corteza suprarrenal), mucosa gastrointestinal y capilares peritubulares renales. La permeabilidad a las proteínas plasmáticas del endotelio con fenestraciones con diafragma no supera la del endotelio continuo.

Las localizaciones de endotelio con fenestraciones sin diafragma incluyen los glomérulos de los riñones. El endotelio glomerular fenestrado está cubierto por un glicocáliz que se extiende al interior de las fenestraciones (formando los llamados "tapones de criba") y por una capa de glicoproteínas superficial de células endoteliales más libremente 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, representan la retención de hasta el 95 % de las proteínas plasmáticas dentro de la circulación.

Se ha encontrado que la pérdida de fenestraciones en el endotelio glomerular está asociada con proteinuria en varias enfermedades, que incluyen nefropatía diabética, glomerulopatía del trasplante, preeclampsia, diabetes, insuficiencia renal, nefropatía por ciclosporina, nefritis por enfermedad del suero y nefritis por Thy-1. Se ha encontrado que el reordenamiento de actina y, en particular, la despolimerización de las fibras de estrés es importante para la formación y el mantenimiento de las fenestraciones.

En apoyo de la anterior discusión de endotelios fenestrados y para información adicional, véanse Satchell y col., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 296:F947-F956 (2009); Haraldsson y col., *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 18:331-335 (2009); Ichimura y col., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 19:1463-1471 (2008); Ballermann, *Nephron Physiol.*, 106:19-25 (2007); Toyoda y col., *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, Berlin, 2006).

El transporte endotelial en el endotelio sinusoidal se produce por transcitosis y a través de los huecos intercelulares (hendiduras interendoteliales) y los huecos intracelulares (fenestraciones). El tratamiento del endotelio sinusoidal con fármacos que alteran los filamentos de actina puede inducir un aumento rápido y sustancial del número de huecos, que indica regulación de la porosidad del revestimiento endotelial por el citoesqueleto de actina. Se ha informado que otros fármacos que alteran el citoesqueleto cambian los diámetros de las fenestraciones. Por tanto, el citoesqueleto asociado a las fenestraciones probablemente controla la importante función de filtración endotelial en el endotelio sinusoidal. En el hígado, la defenestración (pérdida de fenestraciones), que provoca una reducción de la permeabilidad del endotelio, se ha asociado a la patogénesis de varias enfermedades y afecciones, que incluyen envejecimiento, aterogénesis, aterosclerosis, cirrosis, fibrosis, insuficiencia hepática y cánceres hepáticos primario y metastásico. En apoyo de lo anterior y para 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 y Kuebler, "Normal Endothelium", páginas 1-40, *The Vascular Endothelium I* (eds. Moncada and Higgs, Springer-Verlag, Berlin, 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, Berlin, 2006); Braet y Wisse, *Comparative Hepatology*, 1:1-17 (2002); Kanai y col., *Anat. Rec.*, 244:175-181 (1996); Kempka y col., *Exp. Cell Res.*, 176:38-48 (1988); Kishimoto y col., *Am. J. Anat.*, 178:241-249 (1987).

En el presente documento se describe un procedimiento de inhibición de la hiperpermeabilidad vascular presente en cualquier tejido u órgano que contiene o que está rodeado por 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 áreas del riñón (microvasculatura papilar, vasos rectos descendentes), los vasos sanguíneos grandes, los pulmones, el mesenterio, los nervios, la retina (barrera hematorretiniana), el 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 procedimiento 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 de los riñones.

Además, puede tratarse, con dicho procedimiento, cualquier enfermedad o afección mediada por hiperpermeabilidad vascular. Tales enfermedades y afecciones incluyen diabetes, hipertensión y aterosclerosis.

En particular, pueden tratarse, con la presente invención, las complicaciones vasculares de 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 edema, acumulación de LDL en el espacio subendotelial, aterosclerosis acelerada, y las siguientes: cerebro (envejecimiento acelerado de las paredes vasculares), corazón (edema de miocardio, fibrosis del miocardio, disfunción diastólica, cardiomiopatía diabética), riñones (nefropatía diabética), pulmón (retraso del desarrollo pulmonar en los fetos de madres diabéticas, alteraciones de varios parámetros fisiológicos pulmonares y aumento de la susceptibilidad a infecciones), mesenterio (hiperplasia vascular), nervios (neuropatía diabética), retina (edema macular y retinopatía diabética) y piel (enrojecimiento, discromías, sequedad y ulceraciones).

10 La retinopatía diabética es la causa principal de ceguera que afecta a aproximadamente el 25 % de los aproximadamente 21 millones de estadounidenses con diabetes. Aunque su incidencia y progresión pueden reducirse mediante el control intensivo de la glucemia y la tensión 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 de retinopatía diabética. La primera, la retinopatía no proliferativa, es la etapa más temprana de la enfermedad y se caracteriza por aumento de la permeabilidad vascular, microaneurismas, edema y, con el tiempo, oclusiones vasculares. La neovascularización no es un componente de la fase no proliferativa. La mayor parte de la pérdida visual durante esta etapa es debida a la acumulación de líquido en la mácula, el área 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 llama retinopatía proliferativa y se caracteriza por formación anormal de nuevos vasos. Desafortunadamente, esta neovascularización anormal puede ser muy perjudicial, debido a que puede provocar hemorragia en el ojo, tejido cicatricial en la retina, desprendimientos de retina diabética o glaucoma, cualquiera de los cuales puede provocar una disminución de la visión o ceguera. El edema macular también puede producirse en la fase proliferativa.

25 La neuropatía diabética es una complicación grave común de la diabetes. Existen cuatro tipos principales de neuropatía diabética: neuropatía periférica, neuropatía autonómica, radiculoplexopatía y mononeuropatía. Los signos 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 en las 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 pueden producirse problemas en cualquiera de estas áreas. La radiculoplexopatía (también llamada amiotrofia diabética, neuropatía femoral o neuropatía proximal) normalmente afectan los nervios en las caderas, hombros o abdomen, normalmente en un lado del cuerpo. Mononeuropatía significa daño a un solo nervio, normalmente en un brazo, una pierna o la cara. Complicaciones comunes de la neuropatía diabética incluyen la pérdida de miembros (por ejemplo, dedos de los pies, pies o piernas), articulaciones de Charcot, infecciones urinarias, incontinencia urinaria, hipoglucemia asintomática (incluso puede ser mortal), hipotensión arterial, problemas digestivos (por ejemplo, estreñimiento, diarrea, náuseas y vómitos), disfunción sexual (por ejemplo, disfunción eréctil) y aumento o disminución de la sudoración. Como puede verse, los síntomas pueden variar de leves a dolorosos, incapacitantes e incluso mortales.

La nefropatía diabética es la causa más común de insuficiencia renal terminal en los Estados Unidos. Es una complicación vascular de la diabetes que afecta los capilares glomerulares del riñón y reduce la capacidad de filtración del riñón. La nefropatía se indica primero por la aparición de hiperfiltración y luego microalbuminuria. La proteinuria masiva y un deterioro progresivo de la función renal preceden a la insuficiencia renal terminal. Normalmente, antes de que aparezca cualquier signo de nefropatía, normalmente se ha diagnosticado retinopatía. Normalmente se recomienda trasplante renal a los pacientes con insuficiencia renal 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 aquellos en diálisis.

La hipertensión normalmente se desarrolla 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, accidente cerebrovascular, enfermedad arterial periférica, insuficiencia renal, aneurismas, daño ocular y problemas de memoria o comprensión.

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

Enfermedades y afecciones adicionales que pueden ser tratadas incluyen lesión pulmonar aguda, síndrome disneico agudo (SDA), degeneración macular senil, edema cerebral, edema coroideo, coroiditis, enfermedad microvascular coronaria, enfermedad microvascular cerebral, enfermedad de Eals, edema producido por lesión (por ejemplo, traumatismo o quemaduras), edema asociado a la hipertensión, fuga vascular glomerular, choque hemorrágico,

síndrome de Irvine Gass, isquemia, edema macular (por ejemplo, producido por oclusiones vasculares, después de una cirugía intraocular (por ejemplo, cirugía de cataratas), uveítis o retinitis pigmentosa, además de la causada por la diabetes), nefritis (por ejemplo, glomerulonefritis, nefritis por enfermedad del suero y nefritis por Thy-1), nefropatías, edema nefrótico, síndrome nefrótico, neuropatías, insuficiencia orgánica debida a edema tisular (por ejemplo, en la septicemia o debido a un trauma), preeclampsia, edema pulmonar, hipertensión pulmonar, insuficiencia renal, edema retiniano, hemorragia retiniana, oclusiones de la vena retiniana (por ejemplo, oclusiones de la vena central o de una de sus ramas), retinitis, retinopatías (por ejemplo, retinopatía arteriosclerótica, retinopatía hipertensiva, retinopatía por radiación, retinopatía de células falciformes y retinopatía del prematuro, además de la retinopatía diabética), infarto cerebral silencioso, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), glomerulopatía del trasplante, uveítis, síndrome de fuga vascular, hemorragia vítrea y enfermedad de Von Hippel Lindau. Además, se sabe que ciertos fármacos, que incluyen aquellos usados para tratar esclerosis múltiple, provocan hiperpermeabilidad vascular, y puede usarse danazol para reducir este efecto secundario no deseado cuando se usan estos fármacos. El angioedema hereditario y el adquirido están expresamente excluidos de aquellas enfermedades y afecciones que pueden tratarse adicionalmente.

“Tratar”, “tratando” o “tratamiento” se usan en el presente documento para indicar 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 la prevención de la enfermedad o afección.

Pruebas recientes indican que la hiperpermeabilidad causada por transcitosis es la primera etapa de un proceso que, con el tiempo, conduce a daño a 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, retardar o incluso posiblemente prevenir el daño a tejidos y órganos observados en ellos. Por ejemplo, un animal puede tratarse inmediatamente tras el diagnóstico de una de las enfermedades o afecciones tratables según la invención (las enfermedades y afecciones descritas anteriormente). Alternativamente, se prefiere el tratamiento de animales que tienen signos tempranos de, o una predisposición a desarrollar, una enfermedad o afección tal antes de la existencia de los síntomas. Los signos tempranos 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 signos tempranos o factores de riesgo puede iniciarse antes de la presencia de los síntomas de la enfermedad o afección (es decir, profilácticamente).

Por ejemplo, puede iniciarse el tratamiento de un paciente al que se le ha diagnosticado diabetes inmediatamente tras el diagnóstico. En particular, los diabéticos deben ser tratados preferentemente con un compuesto de danazol antes de que se presente cualquier síntoma de una complicación vascular, aunque esto no es normalmente posible, ya que la mayoría de los diabéticos muestran tales síntomas cuando son diagnosticados (véase más adelante). Alternativamente, 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 prevenir edema macular y la progresión de la retinopatía a retinopatía diabética proliferativa. Por tanto, la presencia de retinopatía diabética se considera un signo de que existen o se desarrollarán otras complicaciones microvasculares de la diabetes (véase arriba, páginas 474-477), y el tratamiento precoz también puede prevenir o reducir estas complicaciones adicionales. Por supuesto, también pueden tratarse con resultados beneficiosos enfermedades y afecciones más avanzadas que son complicaciones vasculares de la diabetes.

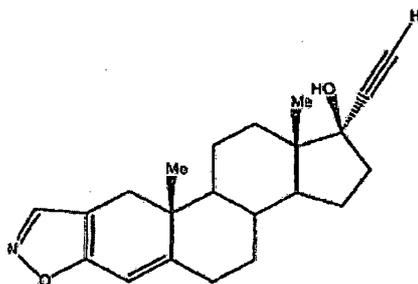
Sin embargo, como se ha señalado anteriormente, las complicaciones vasculares a menudo ya están presentes en el momento en que se diagnostica la diabetes. Por consiguiente, es preferible tratar profilácticamente a un paciente que tiene signos tempranos de, o una predisposición a desarrollar, diabetes. Estos signos tempranos y factores de riesgo incluyen glucosa en ayunas que es alta, pero no lo suficientemente alta como para clasificarse como diabetes (“prediabetes”), hiperinsulinemia, hipertensión, dislipidemia (colesterol alto, triglicéridos altos, lipoproteínas de baja densidad altas 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, raza minoritaria, antecedentes de diabetes gestacional y antecedentes de síndrome de ovario poliquístico.

Similarmente, puede iniciarse el tratamiento de un paciente al que se le ha diagnosticado hipertensión inmediatamente tras el diagnóstico. La hipertensión normalmente no produce ningún síntoma, pero puede iniciarse tratamiento profiláctico en un paciente que tiene predisposición a desarrollar hipertensión. Los factores de riesgo para la hipertensión incluyen edad, raza (la hipertensión es más común en la raza negra), antecedentes familiares (la hipertensión es hereditaria), sobrepeso u obesidad, falta de actividad, 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, ciertas afecciones crónicas (por ejemplo, colesterol alto, diabetes, enfermedad renal y apnea del sueño) y el uso de ciertos fármacos (por ejemplo, anticonceptivos orales, anfetaminas, pastillas para adelgazar y algunas medicaciones para el resfriado y para la alergia).

Puede iniciarse el tratamiento de un paciente al que se le ha diagnosticado aterosclerosis inmediatamente tras el diagnóstico. Sin embargo, es preferible tratar profilácticamente a un paciente que tiene signos tempranos de, o una predisposición a desarrollar, aterosclerosis. Los signos tempranos y factores de riesgo para la aterosclerosis

incluyen edad, antecedentes familiares de aneurisma o enfermedad cardiaca precoz, hipertensión, colesterol alto, triglicéridos altos, resistencia a la insulina, diabetes, obesidad, tabaquismo, falta de actividad física, dieta poco saludable y alto nivel de proteína C reactiva.

- 5 El procedimiento de inhibición de la hiperpermeabilidad vascular comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de danazol a un animal en necesidad del mismo para inhibir la hiperpermeabilidad vascular. Como se usa en el presente documento, "un compuesto de danazol" significa danazol, profármacos de danazol y sales farmacéuticamente aceptables de danazol y sus profármacos.
- 10 El danazol (17[alpha]-pregna-2,4-dien-20-ino-[2,3-d]-isoxazol-17[beta]-ol) es una hormona esteroidea sintética conocida. Su estructura es:



Danazol

- 15 Los procedimientos de preparación del danazol son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 3.135.743 y la patente de GB nº 905.844. Por tanto, el danazol está disponible comercialmente de muchas fuentes, incluyendo Barr Pharmaceuticals, Inc., Lannett Co., Inc., Sanofi-Aventis Canada, Sigma-Aldrich y Parchem Trading Ltd.
- 20 "Profármaco" significa cualquier compuesto que libera un fármaco parental 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.
- 25 Las sales farmacéuticamente aceptables del 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 ácido acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, glutámico, aspártico, benzoico, salicílico, oxálico, 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 particular, los isoxazoles, tales como danazol, son sustancias débilmente básicas y formarán sales de adición de ácido tras la adición de ácidos fuertes y sales de amonio cuaternario tras la adición de ésteres de ácidos fuertes (por ejemplo, un éster de un ácido sulfónico inorgánico u orgánico fuerte, preferentemente un alquilo inferior, alqueno inferior o 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, benzenosulfonato de metilo, sulfonato de metil-p-tolueno, cloruro de bencilo y similares). Véase la patente de EE.UU. nº 3.135.743.

40 Como se ha señalado anteriormente, un compuesto de danazol puede usarse 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 en necesidad de 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.

45 Las formas de dosificación, los modos de administración y las cantidades de dosificación eficaces para los compuestos de la invención (es decir, danazol, un profármaco de danazol o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de ellos) pueden determinarse empíricamente usando la orientación proporcionada en el presente documento. Los expertos en la materia entenderán que la cantidad de dosificación variará con la enfermedad o afección particular a tratarse, la gravedad de la enfermedad o afección, la(s) vía(s) de administración, la duración del tratamiento, la identidad de cualquier otro fármaco que se administre 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 un médico adjunto o

veterinario dentro del alcance criterio médico sensato. Si se desea, la dosis diaria eficaz puede administrarse 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.

- 5 Se ha informado previamente de que los compuestos de danazol inhiben la angiogénesis. Véase la solicitud PCT WO 2007/009087. Sorprendente y bastante inesperadamente, se ha encontrado que los compuestos de danazol pueden usarse en la práctica de la presente invención a dosis óptimas que son aproximadamente de 100-1000 veces menores que las previamente informadas para inhibir la angiogénesis y considerablemente más bajas que aquellas cantidades actualmente administradas a pacientes para el tratamiento de otras enfermedades y afecciones (normalmente 200-800 mg/día para un ser humano adulto). Los usos de estas dosis más bajas de compuestos de danazol deberían evitar cualquier efecto secundario significativo, tal vez todos los efectos secundarios, que será especialmente ventajoso para el tratamiento temprano o profiláctico de las enfermedades y afecciones según la presente invención.
- 10
- 15 En particular, una cantidad de dosificación eficaz de un compuesto de danazol para inhibir la hiperpermeabilidad vascular 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 cantidad de dosificación eficaz también será aquella cantidad que dé una concentración en un fluido relevante (por ejemplo, sangre) de 0,0001  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$ , preferentemente de 0,1  $\mu\text{M}$  a 1,0  $\mu\text{M}$ , más preferentemente de 0,1  $\mu\text{M}$  a 0,5  $\mu\text{M}$ , lo más preferentemente de aproximadamente 0,1  $\mu\text{M}$ . Una cantidad de dosificación eficaz también será aquella cantidad que dé una concentración en el tejido u órgano que va a tratarse 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  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$ , preferentemente de 0,1  $\mu\text{M}$  a 1,0  $\mu\text{M}$ , más preferentemente de 0,1  $\mu\text{M}$  a 0,5  $\mu\text{M}$ , lo más preferentemente de aproximadamente 0,1  $\mu\text{M}$ , 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 administrada en dos dosis iguales al día. Además, se espera que el danazol se acumule en las células y tejidos, de manera que una dosis (de carga) inicial (por ejemplo, 100 mg al día) pueda reducirse después de un período de tiempo (por ejemplo, 2-4 semanas) a una dosis de mantenimiento más baja (por ejemplo, 1 mg al día) que puede administrarse indefinidamente sin efectos secundarios significativos, tal vez sin efectos secundarios. Como se usa en el presente documento, una "cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular" de un compuesto de danazol se define que indica aquellas cantidades expuestas anteriormente en este párrafo.
- 20
- 25
- 30
- 35

Adicionalmente se describe, pero no es parte de la invención, un procedimiento de modulación del citoesqueleto de células endoteliales en un animal. Este procedimiento 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 esfingosina-1-fosfato (S1P), 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 así el endotelio a la homeostasis. Por consiguiente, pueden tratarse aquellas enfermedades y afecciones mediadas por hiperpermeabilidad vascular (véase más arriba) y también pueden tratarse aquellas enfermedades y afecciones mediadas por hipopermeabilidad vascular. El último tipo de enfermedades y afecciones incluye envejecimiento hepático, aterogénesis, aterosclerosis, cirrosis, fibrosis del hígado, insuficiencia hepática y cánceres hepáticos primario y metastásico.

- 40
- 45
- 50 El procedimiento de modulación del citoesqueleto de células endoteliales comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de danazol al animal. "Compuesto de danazol" y "animal" tienen los mismos significados expuestos anteriormente.

- 55 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 pueden determinarse empíricamente usando la orientación proporcionada en el presente documento. Los expertos en la materia entenderán que la cantidad de dosificación variará con la enfermedad o afección particular que va a tratarse, la gravedad de la enfermedad o afección, la(s) vía(s) de administración, la duración del tratamiento, la identidad de cualquier otro fármaco que se administre 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 dosificación diaria será determinada por el médico adjunto o veterinario dentro del alcance del criterio médico sensato. Si se desea, la dosis diaria eficaz puede administrarse 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.
- 60
- 65

En particular, una cantidad de dosificación eficaz de un compuesto de danazol para modular el citoesqueleto de 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 cantidad de dosificación eficaz también será aquella cantidad que dé una concentración en un fluido relevante (por ejemplo, sangre) de 0,0001  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$ , preferentemente de 0,1  $\mu\text{M}$  a 1,0  $\mu\text{M}$ , más preferentemente de 0,1  $\mu\text{M}$  a 0,5  $\mu\text{M}$ , lo más preferentemente aproximadamente 0,1  $\mu\text{M}$ . Una cantidad de dosificación eficaz también será aquella cantidad que dé una concentración en el tejido u órgano que va a tratarse 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  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$ , preferentemente de 0,1  $\mu\text{M}$  a 1,0  $\mu\text{M}$ , más preferentemente de 0,1  $\mu\text{M}$  a 0,5  $\mu\text{M}$ , lo más preferentemente aproximadamente 0,1  $\mu\text{M}$ , 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 administrada en dos dosis iguales al día. Además, se espera que el danazol se acumule en las células y tejidos, de manera que una dosis (de carga) inicial (por ejemplo, 100 mg al día) pueda reducirse después de un período de tiempo (por ejemplo, 2-4 semanas) a una dosis de mantenimiento más baja (por ejemplo, 1 mg al día) que puede administrarse indefinidamente sin efectos secundarios significativos, tal vez sin efectos secundarios.

Los compuestos de la presente invención (es decir, danazol, profármacos del mismo y sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de ellos) pueden administrarse a un paciente animal para terapia mediante cualquier vía de administración adecuada, que incluye la vía oral, nasalmente, parenteralmente (por ejemplo, intravenosamente, intraperitonealmente, subcutáneamente o intramuscularmente), transdérmicamente, intraocularmente y tópicamente (incluyendo bucalmente y sublingualmente). Generalmente se prefiere la administración por vía oral para cualquier enfermedad o afección tratable según la invención. Las vías preferidas de administración para el tratamiento de enfermedades y afecciones del ojo son por vía oral, intraocularmente y tópicamente. La más preferida es por vía oral. Es bastante inesperado y sorprendente que las enfermedades del ojo puedan tratarse por administración por vía oral de un compuesto de danazol, ya que previamente no se ha informado del tratamiento satisfactorio de tales enfermedades y afecciones mediante administración por vía oral de un fármaco. Las vías preferidas de administración para el tratamiento de enfermedades y afecciones del cerebro son por vía oral y parenteralmente. La más preferida es por vía oral.

Aunque es que un compuesto de la presente invención se administre solo, es preferible 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 de otros compuestos, fármacos u otros materiales. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la formulación y no perjudiciales para el animal. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son muy 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 procedimientos convencionales conocidos para aquellos expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences.

Las formulaciones de la invención adecuadas para administración por vía oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, polvos, gránulos o como una disolución 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 (usando 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 pueden administrarse como bolo, electuario o pasta.

En las formas de dosificación sólidas de la invención para administración por vía oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, 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 de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: (i) sustancias de relleno o sustancias de carga o sustancias de relleno, 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, ciertos silicatos, y carbonato sódico; (5) agentes retardantes de la disolución, 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 caolín y arcilla de bentonita; (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 cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes de tamponamiento. Pueden emplearse como

sustancias de carga composiciones sólidas de tipo similar en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, además de polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

5 Puede prepararse un comprimido por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes accesorios. Los comprimidos pueden prepararse usando 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 pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

10 Los comprimidos, y otras formas de dosificación sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden opcionalmente ranurarse o prepararse con recubrimientos y vainas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos muy conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. También pueden formularse de manera que proporcionen liberación lenta o controlada del principio activo en su interior usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Pueden esterilizarse, 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 cierta porción del tubo gastrointestinal, opcionalmente de manera retardada. Ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El principio activo también puede estar en forma microencapsulada.

25 Las formas de dosificación líquidas para administración por vía oral de los compuestos de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados 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 particular, aceites de semilla de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos.

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

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

40 Adicionalmente se describen, pero no es parte invención, productos farmacéuticos adecuados para el tratamiento del ojo. Tales productos farmacéuticos incluyen composiciones farmacéuticas de la invención, dispositivos e implantes (que pueden ser composiciones o dispositivos).

45 Las formulaciones farmacéuticas (composiciones) para la inyección intraocular de un compuesto o compuestos en el globo ocular incluyen disoluciones, 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. Por ejemplo, una formulación farmacéutica para inyección intraocular puede comprender uno o más compuestos de la invención en combinación con una o más disoluciones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes de suspensión, espesantes o agentes que potencian la viscosidad (tal como un polímero de ácido hialurónico). Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos incluyen agua, solución salina (preferentemente al 0,9 %), dextrosa en agua (preferentemente al 5 %), tampones, sulfóxido de dimetilo, alcoholes y polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares). Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como humectantes y emulsionantes y dispersantes. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse por la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como polímeros y gelatina. Las formas de liberación prolongada inyectables pueden prepararse incorporando el fármaco en microcápsulas o microesferas hechas de polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. 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 atrapando el fármaco en liposomas (compuestos por los componentes usuales, tales como fosfatidilcolina de dipalmitoilo) o microemulsiones que sean compatibles con el tejido ocular. Dependiendo de la relación del fármaco con respecto al polímero o lípido, la naturaleza de los componentes de polímero o lípido particular, el tipo de liposoma empleado, y si las microcápsulas o microesferas están recubiertas o sin recubrimiento, puede controlarse la velocidad de liberación del fármaco de las microcápsulas, microesferas y liposomas.

65

- Los compuestos de la invención también pueden administrarse quirúrgicamente como un implante ocular. Por ejemplo, puede implantarse en o sobre la esclerótica un recipiente con depósito que tiene una pared de difusión de poli(alcohol vinílico) o poli(acetato de vinilo) y que contiene un compuesto o compuestos de la invención. Como otro ejemplo, puede incorporarse 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 puede implantarse en la esclerótica o en el ojo. Esto se realiza normalmente recibiendo al animal una anestesia tópica o local y usando una pequeña incisión hecha detrás de la córnea. Entonces, la matriz se inserta a través de la incisión y se sutura a la esclerótica.
- Los compuestos de la invención también pueden administrarse tópicamente al ojo, y una realización preferida de la invención es una composición farmacéutica tópica adecuada para administración al ojo. Las composiciones farmacéuticas tópicas adecuadas para administración al ojo incluyen disoluciones, 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.
- Formulaciones tópicas adecuadas para administración al ojo comprenden uno o más compuestos de la invención en una base acuosa o no acuosa. Las formulaciones tópicas también pueden incluir potenciadores de la absorción, potenciadores de la permeación, 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, dispersantes, solubilizantes, estabilizantes y/o agentes de tonicidad. Formulaciones tópicas adecuadas para administración al ojo comprenderán preferentemente un potenciador de la absorción o de la permeación para promover la absorción o permeación del compuesto o compuestos de la invención en el ojo y/o un 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.
- Potenciadores de la absorción/permeación a modo de ejemplo incluyen metilsulfonilmetano, solo o en combinación con sulfóxido de dimetilo, ácidos carboxílicos y tensioactivos. Espesantes y potenciadores de la viscosidad a modo de ejemplo incluyen dextranos, polietilenglicoles, polivinilpirrolidona, geles de polisacáridos, Gelrite®, polímeros celulósicos (tales como hidroxipropilmetilcelulosa), polímeros que contienen carboxilo (tales como polímeros o copolímeros de ácido acrílico), poli(alcohol vinílico) y ácido hialurónico o una sal del mismo.
- Las formas de dosificación líquidas (por ejemplo, disoluciones, suspensiones, dispersiones y gotas) adecuadas para el tratamiento del ojo pueden prepararse, 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 disolución, dispersión o suspensión. Si se desea, la formulación farmacéutica también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH y similares, por ejemplo, acetato sódico, monolaurato de sorbitano, acetato sódico de trietanolamina, oleato de trietanolamina, etc.
- Las suspensiones y disoluciones 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 usan suspensiones, los tamaños de partícula deben ser inferiores a 10 µm para minimizar la irritación del ojo. Si se usan disoluciones o suspensiones, la cantidad administrada al ojo no debe superar 50 µl para evitar el derrame excesivo 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 las nanoesferas son generalmente partículas monolíticas de una matriz de polímero en la que la formulación está atrapada, adsorbida, o contenida de otro modo, mientras que con las microcápsulas y las nanocápsulas la formulación está realmente encapsulada). El límite superior para el tamaño de estas micropartículas es de aproximadamente 5 µ a aproximadamente 10 µ.
- 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 filante, una combinación de dos o tres de los anteriores, o gel de polietileno-aceite mineral. Opcionalmente puede incluirse 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 Carbopol-940 o una combinación de etanol, agua y propilenglicol (por ejemplo, en una relación de 40:40:20). Se usa un gelificante, tal como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o glicirricinato amoniacal. Opcionalmente puede incluirse 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 espesantes o potenciadores de la viscosidad, excepto que una formulación denominada en la técnica "hidrogel" tiene por lo general una viscosidad superior a una formulación denominada disolución o suspensión "espesada". A diferencia de tales hidrogeles preformados, también puede prepararse una formulación de manera que forme un hidrogel in situ tras la administración al ojo. Tales geles son

líquidos a temperatura ambiente, pero gelifican a mayores temperaturas (y así se llaman hidrogeles “termorreversibles”), tal como cuando se ponen en contacto con fluidos corporales. Polímeros biocompatibles que confieren esta propiedad incluyen polímeros y copolímeros de ácido acrílico, derivados de N-isopropilacrilamida y copolímeros de bloques de ABA de óxido de etileno y óxido de propileno (denominados convencionalmente “poloxámeros” y disponibles con el nombre comercial Pluronic® de BASF-Wayndotte).

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

10 También pueden formularse colirios con una base acuosa o no acuosa que comprende uno o más dispersantes, solubilizantes o agentes de suspensión. Las gotas pueden administrarse 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.

15 Los compuestos de la invención también pueden administrarse 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, osmosis, o combinaciones de los mismos. Pueden usarse 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, además de dispositivos biodegradables o solubles que no necesitan 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 va a administrarse. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, poli(alcohol vinílico), polímeros y copolímeros de poliacrilamida, acrilato de etilo y vinilpirrolidona, además de polipéptidos o polisacáridos reticulados, tales como quitina.

25 Las formas de dosificación para los otros tipos de administración tópica (es decir, no al ojo) o para administración transdérmica de los compuestos de la invención incluyen polvos, esprays, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, disoluciones, parches, gotas e inhaladores. El principio activo puede mezclarse en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier tampón, o propulsor que pueda requerirse. Las pomadas, 30 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, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos. Los polvos y esprays 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 esprays pueden contener adicionalmente 35 propulsores 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 pueden prepararse disolviendo, dispersando o incorporando de otro modo uno o más compuestos de la invención en un medio apropiado, tal como un material de matriz elastomérica. También pueden usarse potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a 40 través de la piel. La velocidad de tal flujo puede controlarse tanto proporcionando una membrana de control de la velocidad como dispersando el compuesto en una matriz o gel polimérico. También puede usarse un vehículo sólido impregnado con el fármaco (por ejemplo, un apósito) para administración tópica.

45 Las formulaciones farmacéuticas incluyen aquellas adecuadas para administración por inhalación o insuflación, o para administración nasal. Para administración a las vías respiratorias superiores (nasales) o inferiores por inhalación, los compuestos de la invención se administran convenientemente desde un insuflador, nebulizador o un envase presurizado u otros medios convenientes de administración de un spray de aerosol. Los envases presurizados pueden comprender un propulsor apropiado tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida.

50 Alternativamente, para administración por inhalación o insuflación, la composición puede adoptar la forma de un 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 puede presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en cápsulas o cartuchos, o, por ejemplo, gelatina o envases alveolados de los que puede administrarse el polvo con la ayuda de un inhalador, insuflador o un inhalador de dosis medida.

60 Para administración intranasal, los compuestos de la invención pueden administrarse por medio de gotas nasales o un spray líquido, tal como por medio de un frasco atomizador de plástico o un inhalador de dosis medida. Los spray líquidos se administran convenientemente de envases presurizados. Son típicos los atomizadores Mistometer (Wintrop) y Medihaler (Riker).

65 Pueden formularse gotas nasales con una base acuosa o no acuosa que también comprende uno o más dispersantes, solubilizantes o agentes de suspensión. Las gotas pueden administrarse 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 administraciones parenterales comprenden uno o más compuestos de la invención en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles, o polvos estériles farmacéuticamente aceptables, que pueden reconstituirse en disoluciones 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 previsto o agentes de suspensión o espesantes. También pueden usarse prótesis endovasculares recubiertas de fármaco.

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, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como humectantes, emulsionantes y dispersantes. También puede desearse incluir en las composiciones agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse 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, se desea ralentizar la absorción del fármaco de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede llevarse a cabo mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tiene poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de un fármaco parenteralmente administrado se lleva a cabo disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo de aceite.

Las formas de liberación prolongada inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación del fármaco con respecto al polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación del fármaco. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones de liberación prolongada inyectables también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal. Los materiales inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias.

Las formulaciones pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitarias o de dosis múltiples, por ejemplo, ampollas y viales, y pueden almacenarse en una condición liofilizada que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes de uso. Las disoluciones y suspensiones para inyección extemporánea pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

Un compuesto de danazol puede administrarse solo para tratar una enfermedad o afección que implica hiperpermeabilidad vascular o disfunción del citoesqueleto. Alternativamente, el compuesto de danazol puede administrarse en combinación con uno o varios de otros tratamientos o fármacos adecuados para tratar la enfermedad o afección. Por ejemplo, el compuesto del danazol puede administrarse antes de, conjuntamente con (incluyendo simultáneamente con) o después del otro tratamiento o fármaco. En el caso de otro fármaco, el fármaco y el compuesto de danazol pueden administrarse 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.

Como se usa en el presente documento, "un" o "una" significan uno o más.

Los objetos, ventajas y características novedosas adicionales de la presente invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia considerando los siguientes ejemplos no limitativos.

## Ejemplos

Ejemplo 1: efectos del danazol sobre la angiogénesis (comparativo)

A. Proliferación de células HUVEC

*Protocolo:*

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 2 % de suero bovino fetal (SBF) en matraces de cultivo de tejido a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. El subcultivo se realizó usando tripsina cuando se

obtuvo el 60 %-80 % de confluencia como se especifica por el proveedor.

Se descongelaron las ampollas crioconservadas de las HUVEC del pase 2 y se sembraron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos a 5.000 células/cm<sup>2</sup>. Se preparó una disolución madre de danazol 50 mM en etanol y el SBF en el medio se aumentó al 5 % para mantener el danazol en disolución. Se trataron las células con medio que contenía concentraciones finales de danazol que oscilan 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 Hepes (HBSS) de Cambrex calentada a 37 °C. Se añadieron a cada pocillo 100 µl de disolución CellTiter diluida (15 µl de disolución madre + 85 µl de EGM-2 que contenía 0,1 % de SBF) y se incubaron durante 4 horas adicionales. Se determinó la densidad óptica mediante un lector de microplacas usando un filtro de 530 nm después de restar el blanco y los datos se presentaron como 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.

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

#### Resultados, observaciones y discusión:

El cultivo de HUVEC primarias en presencia de danazol disminuyó 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 disolución de ensayo por enzimas deshidrogenasa a un colorante de formazano que se correlaciona directamente con el número de células.

El tratamiento con danazol a las 24 horas pareció ser eficaz solo a dosis muy altas. Se observaron 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 ± 0,06 y el tratamiento con danazol 10 µM disminuyó la DO a 0,288 ± 0,037 mientras que 100 µM a 0,162 ± 0,017, que equivale a inhibiciones en porcentaje del 30 % y del 65 %, respectivamente.

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 en cultivo aumentó a 0,629 ± 0,095 y se redujo a 0,378 ± 0,037 por 1 µM, 0,241 ± 0,012 por 10 µM y 0,19 ± 0,033 por 100 µM (o inhibiciones en porcentaje del 40 %, 61 % y 70 %, respectivamente).

Después de 72 horas, todos los tratamientos con danazol probados mostraron una reducción significativa en 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 ± 0,037, 1 µM a 0,484 ± 0,022, 10 µM a 0,229 ± 0,016 y 100 µM a 0,156 ± 0,018 (inhibiciones del 28 %, 57 %, 80 % y 86 %, respectivamente).

El examen de la DO obtenida a partir de todas las dosis de danazol 100 µM fue coherente en todos los momentos de tiempo, indicando una detención completa de la proliferación celular a esta concentración.

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

#### B. Formación de tubos por HUVEC

##### *Protocolo:*

Para investigar la formación de estructuras similares a capilares por HUVEC, se adquirió el ensayo Angiogenesis System: Endothelial Cell Tube Formation de BD Biosciences (San Jose, CA) y se usó según el protocolo del fabricante. En resumen, se sembraron 100.000 HUVEC sobre soportes Matrigel rehidratados en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos en presencia de 5 % de SBF para inducir la formación de tubos. Se añadió danazol a concentraciones finales de 1 µM, 10 µM o 50 µM y se añadió LY294002 (control positivo) a 50 µM. Después de 18 horas, los pocillos se fotografiaron usando 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.

##### *Resultados, observaciones y discusión:*

Para esclarecer si el danazol puede prevenir la formación de estructuras similares a tubos por HUVEC se usaron placas de 96 pocillos que contenían soportes Matrigel. Las células endoteliales, cuando se cultivan en presencia de sustancias angiogénicas y se les proporciona un armazón de matriz extracelular, se diferenciarán en estructuras vagamente parecidas a vasos capilares. Las HUVEC cultivadas con danazol mostraron menos estructuras organizadas con interconexiones delgadas y menos definidas que los controles (véase la figura 2, en la que A =

control, B = danazol 1  $\mu\text{M}$ , C = danazol 10  $\mu\text{M}$ , D = danazol 50  $\mu\text{M}$  y E = LY294002 50  $\mu\text{M}$ ). El tratamiento con danazol 50  $\mu\text{M}$  condujo a colonias aisladas de HUVEC localizadas en el soporte con muy pocas conexiones delgadas o separaciones de la luz del vaso. El efecto del danazol fue muy similar al del compuesto de control positivo LY294002. Para garantizar que el vehículo usado no tenía ningún efecto, los pocillos se trataron con etanol a concentraciones correspondientes a la máxima dosis de danazol usado y no se observó 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 50  $\mu\text{M}$ . El danazol no tuvo efecto sobre la formación de tubos a 1  $\mu\text{M}$  o 10  $\mu\text{M}$ .

### C. Invasión de HUVEC

#### Protocolo:

Se adquirieron cámaras de invasión de BioCoat Matrigel de BD Biosciences (San Jose, CA). Se rehidrataron los insertos a 37 °C con 500  $\mu\text{l}$  de HBSS durante 2 horas antes de su uso en una estufa de incubación humidificada. Las HUVEC tratadas con tripsina se lavaron dos veces con EGM-2 caliente que contenía 0,1 % de SBF y se añadieron a la cámara superior del inserto de invasión a 100.000 células en un volumen total de 250  $\mu\text{l}$ . Se añadieron danazol y compuestos de control al depósito superior a concentraciones finales de 10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ . Se añadieron a la cámara inferior 750  $\mu\text{l}$  de EGM-2 complementado con 5 % de SBF 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 los insertos se lavaron dos veces con HBSS. Se sumergieron los insertos en calceína AM 10  $\mu\text{M}$  preparada en HBSS y se incubaron durante 4 horas. Se determinó la fluorescencia en un lector de microplacas a 485 nm de excitación y 595 nm de emisión. LY294002 y el compuesto estructuralmente similar pero inactivo LY303511 sirvieron de controles positivo y negativo, respectivamente, para este experimento.

#### Resultados:

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 usando la prueba de la t de Student en Microsoft Excel.  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

Se usaron insertos porosos recubiertos con Matrigel para determinar si el danazol podía interferir con la invasión o migración de células endoteliales (figura 3). En el sistema usado para el estudio se detectó un aumento significativo en las células mediante un colorante fluorescente después de la adición de SBF a la cámara opuesta a las células endoteliales ( $5674 \text{ UF} \pm 77$  a  $7143 \pm 516$ ). El danazol a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  no tuvo efecto, mientras que LY294002 mostró atenuación casi completa de la invasión de células ( $5814 \pm 153$ ). Estos datos indican que los factores presentes en el SBF inducen la producción por HUVEC de proteasas que digieren la matriz extracelular, seguido de la migración a lo largo de un gradiente quimiotáctico. El danazol no tiene efecto inhibitorio aparente sobre la invasión y la migración de HUVEC en este modelo.

### D. Migración de HUVEC

#### Protocolo:

Se realizaron ensayos para determinar el efecto del danazol sobre la migración de 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 estufa de incubación a 37 °C con 5 % de  $\text{CO}_2$  durante 48-72 horas para conseguir monocapas confluentes. A continuación, se "rasparon" las monocapas con una punta de pipeta de 1000  $\mu\text{l}$  y se lavaron dos veces con medio EGM-2 caliente. Se aspiró el medio de lavado final y se sustituyó con medio EGM-2 fresco o medio EGM-2 fresco que contenía un intervalo de concentraciones de las concentraciones de danazol (Sigma, nº D8399). Se sacaron fotografías de las monocapas dañadas y se incubaron las placas en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de  $\text{CO}_2$  durante otras 24 horas. Se fotografiaron de nuevo los pocillos. Se midieron los huecos en cada fotografía usando el software Adobe Photoshop, y las mediciones de los huecos se presentan como el número de píxeles en el hueco.

#### Resultados:

Los resultados de tres experimentos separados se presentan en la Tabla 1 a continuación. Como puede apreciarse de la Tabla 1, se encontró que el danazol, a concentraciones de 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ , inhibe significativamente la migración de HUVEC en este ensayo. El medio de cultivo EGM-2 usado en este ensayo contiene una mezcla de factores de crecimiento en comparación con el SBF usado en el modelo de Matrigel descrito en la sección C anterior. Esta diferencia en los factores de crecimiento puede explicar la diferencia de los resultados obtenidos usando los dos modelos.

TABLA 1

Compuesto(s)	Concentración	Píxeles	% de inhibición	DE	EEM
--------------	---------------	---------	-----------------	----	-----

	de danazol	medios	medio		
Diluyente de control (etanol)		1264,00			
Danazol	10 $\mu$ M	1004,00	21,14	14,87	8,59
Danazol	25 $\mu$ M	1184,00	5,50	8,80	5,08
Danazol	50 $\mu$ M	895,33	27,64	17,63	10,18
Danazol	75 $\mu$ M	317,33	74,62	6,80	3,93
Danazol	100 $\mu$ M	178,67	85,90	0,92	0,53

*Ejemplo 2: efecto del danazol sobre la permeabilidad vascular de monocapas de HUVEC*

*Protocolo:*

5

Se realizaron ensayos para determinar el efecto del danazol sobre la permeabilidad de monocapas de HUVEC. Se sembraron HUVEC del pase 5-10, número de lote 7016 (obtenidas de Lonza), sobre insertos de tamaño de poro de 1 micrómetro localizados en los pocillos de una placa de 24 pocillos (insertos de cultivo celular Thincert de 24 pocillos de Greiner BioOne, nº 662610, o ISC BioExpress, nº T-3300-15) usando medio de crecimiento endotelial-2 (EGM-2) (obtenido de Lonza). Se cultivaron las placas en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 48-72 horas para conseguir la confluencia y desarrollar monocapas firmes. A continuación se retiró el medio y se sustituyó con medio fresco o medio fresco que contenía un intervalo de concentraciones de danazol (Sigma, nº D8399). Se añadieron a los pocillos apropiados factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ; Pierce Biotechnology, nº RTNFAI) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1P; Sigma, nº I-9401) a concentraciones finales de 10 ng/ml cada uno. TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  inducen la permeabilidad; pueden producir un aumento de la permeabilidad de hasta diez veces. Finalmente, se añadió a cada pocillo estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Pierce Biotechnology, nº N100, 1,25 mg/ml) a una dilución final de 1:250. La HRP es una molécula grande que tiene un peso molecular de aproximadamente 44.000. Los volúmenes finales fueron 300  $\mu$ l en las cámaras superiores y 700  $\mu$ l en las cámaras inferiores de cada pocillo. Se incubaron las placas durante 24 horas adicionales en la estufa de incubación a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de esta incubación, se retiraron y se desecharon los insertos. El examen visual de las células sobre los insertos indicó que todas las monocapas estaban todavía intactas.

10

15

20

Para evaluar el flujo continuo de HRP, se transfirieron 15  $\mu$ l de las disoluciones 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  $\mu$ l de disolución de tetrametilbencidina (TMB) (Pierce), y se desarrolló el color durante 5 minutos a temperatura ambiente. El desarrollo del color se detuvo añadiendo 100  $\mu$ l de solución ácida 0,18 N. Se determinó para cada pocillo la DO usando 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 separados se presentan en la Tabla 2.

30

Como se puede apreciarse de la Tabla 2, el danazol a concentraciones de 25,0  $\mu$ M o superiores aumentó realmente la permeabilidad vascular. Una concentración de 10,0  $\mu$ M tuvo poco o ningún efecto sobre la permeabilidad vascular. El danazol a concentraciones de 0,1  $\mu$ M a 5,0  $\mu$ M, siendo las óptimas de 0,1  $\mu$ M a 0,5  $\mu$ M, disminuyó 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  $\mu$ M (o quizás incluso inferiores) a 0,005  $\mu$ M. Así, el danazol presenta una curva de respuesta a la dosis muy sorprendente e inesperada para la permeabilidad vascular.

35

Como se muestra en el Ejemplo 1, se requeriría una concentración de 50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M para obtener una inhibición de la proliferación, migración y formación de tubos de 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 espectacularmente la permeabilidad vascular después de 24 horas (véase la Tabla 2). En cambio, las concentraciones óptimas de uso para inhibir la permeabilidad vascular (0,1  $\mu$ M a 0,5  $\mu$ M) tienen efectos insignificantes sobre la angiogénesis a las 24 horas.

45

TABLA 2

Compuesto(s)	Concentración de danazol	% de inhibición media	DE	EEM
Danazol	0,001 $\mu$ M	19,35	5,39	3,11
Danazol	0,005 $\mu$ M	16,37	8,04	4,64
Danazol	0,01 $\mu$ M	-2,74	14,56	8,40
Danazol	0,05 $\mu$ M	7,67	8,83	5,10
Danazol	0,1 $\mu$ M	35,59	23,08	11,54
Danazol	0,5 $\mu$ M	30,95	12,01	6,01
Danazol	1,0 $\mu$ M	21,20	31,13	13,92
Danazol	5,0 $\mu$ M	14,63	15,30	7,65
Danazol	10,0 $\mu$ M	14,29	36,85	13,03
Danazol	25,0 $\mu$ M	-1,06	22,60	11,30
Danazol	50,0 $\mu$ M	-377,36	384,50	171,95

TNF $\alpha$ + IL-1 $\beta$ + danazol	0,1 $\mu$ M	31,30	25,26	12,63
TNF $\alpha$ + IL-1 $\beta$ + danazol	1,0 $\mu$ M	29,22	16,17	7,23
TNF $\alpha$ + IL-1 $\beta$ + danazol	10,0 $\mu$ M	8,47	20,45	9,14
TNF $\alpha$ + IL-1 $\beta$ + danazol	25,0 $\mu$ M	-39,93	15,53	7,76
TNF $\alpha$ + IL-1 $\beta$ + danazol	50,0 $\mu$ M	-117,16	29,20	14,60

*Ejemplo 3: efecto del danazol sobre la permeabilidad vascular*

5 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 del matraz de pases usando tripsina-EDTA, y se contaron las células en la suspensión resultante para determinar tanto la viabilidad como el número de células. La viabilidad de la suspensión de células fue superior al 90 % en este experimento.

10 A continuación, se sembraron las células sobre insertos (tamaño de poro de 1 micrómetro) localizados en los pocillos de una placa de 24 pocillos (insertos de cultivo celular Thincert de 24 pocillos de Greiner BioOne, n° 662610) en 300  $\mu$ l de medio completo EGM-2 (obtenido de Lonza). A continuación, se colocaron 700  $\mu$ l de EGM-2 en la cámara inferior, y se cultivaron las placas en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 48 horas para conseguir monocapas confluentes. Las mediciones de resistencia eléctrica transendotelial (TER) se tomaron  
15 usando un electrodo STX 100 unido a un voltio-ohmímetro EVOM<sup>2</sup> (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.

20 A continuación, se trataron las células por duplicado del siguiente modo. Se decantó cuidadosamente medio EGM-2 de los insertos y se substituyó con medio IMDM que contenía 0,5 % de suero bovino fetal y suplementos de EGM-2, excepto por VEGF e hidrocortisona (todos de Lonza). En algunos pocillos, el medio IMDM contenía danazol (Sigma, n° D8399) en una dilución en serie de 10 veces. Se incubaron las placas en una estufa de incubación a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> durante cuatro horas antes de añadir a la cámara superior de cada pocillo 30  $\mu$ l de una disolución que contenía 4 % de albúmina de suero humano marcada con fluorescencia. Se incubaron las placas en una estufa de  
25 incubación a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 18 horas adicionales.

Después de esta incubación, se retiraron y se desecharon los insertos, y se transfirieron 200  $\mu$ l 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 una longitud de onda de emisión de  
30 470 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	UF media	DE
Ninguna	767,13	8,38
0,01 $\mu$ M	688,50	14,94
0,1 $\mu$ M	743,90	8,95
1,0 $\mu$ M	783,39	14,59
10,0 $\mu$ M	768,99	18,85

35 Como puede apreciarse, la concentración más baja de danazol (0,01  $\mu$ M) dio la mayor inhibición (aproximadamente el 10 %). Los pocillos de control ejecutados sin células dieron más de 4000 UF en la cámara inferior, que muestra que las monocapas endoteliales retinianas eran selectivamente permeables.

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

40 Se realizaron ensayos 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 sobre insertos (tamaño de poro de 1 micrómetro) localizados en los pocillos de una placa de 24 pocillos (insertos de cultivo celular Thincert de  
45 24 pocillos de Greiner BioOne, n° 662610) en 300  $\mu$ l de medio completo EGM- 2 (obtenido de Lonza). A continuación, se cultivaron las placas en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Después de la incubación, se decantó cuidadosamente el medio de cultivo y se substituyó con tanto EGM-2 fresco como EGM-2 fresco que contenía danazol a una concentración final de 1  $\mu$ M. Las placas se colocaron de nuevo en la estufa de incubación y se cultivaron durante 144 horas adicionales. Los ensayos también se realizaron del mismo  
50 modo usando 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 usando un voltio-ohmímetro EVOM<sup>2</sup> 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 a continuación. Todos los datos se presentan como mediciones de TER/cm<sup>2</sup> de 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

5

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

10 Como puede apreciarse, el danazol potenció 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 momento 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.

15

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 cm<sup>2</sup> hasta casi confluencia en medio EGM-2 (Lonza, Walkersville, MD) que contenía 2 % de suero bovino fetal (Lonza). A continuación, se liberaron las células del matraz de pases usando Tripsina/EDTA. Se contaron las células en la suspensión resultante y se sembraron en una placa de 96 pocillos a 1 x 10<sup>4</sup> células/pocillo en medio EGM-2. Se incubó la placa a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. A continuación, se añadieron 200 µl de medio EGM-2 (control) o diversas concentraciones de danazol, y se incubaron las placas durante 2 horas adicionales. Después de esta incubación, se fijaron inmediatamente las células con 4 % de formaldehído, refrigerado, y se determinó el grado de fosforilación de Akt usando 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 Akt activada (fosforilada) con respecto a proteína Akt total en ensayos paralelos usando 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 usados en uno de los dos ensayos paralelos para proporcionar una medida de la proteína Akt activada. El otro anticuerpo usado en el otro ensayo paralelo reconoce la Akt para proporcionar una medida de la proteína Akt total. Ambos anticuerpos primarios se detectan usando un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano picante. La adición de disolución de desarrollo del fabricante durante 10 minutos, seguida de la adición de disolución de parada del fabricante, produce el resultado que puede medirse coloriméricamente.

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

40

TABLA 7

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DE AUMENTO EN LA FOSFORILACIÓN DE 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 redujeron la permeabilidad, mientras que las dosis altas aumentaron la permeabilidad. Se cree que un cierto nivel de

fosforilación de la Akt en S473 reduce la permeabilidad (las concentraciones de 0,5-5,0  $\mu\text{M}$  en este experimento), mientras que la hiperfosforilación de la Akt en S473 produce el aumento de la permeabilidad (las concentraciones de 10-50  $\mu\text{M}$  en este experimento).

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

10 Se realizaron ensayos para determinar el efecto del danazol y 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 de cultivo celular Thincert de 24 pocillos de Greiner BioOne, nº 662610) con 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectina (Sigma). A continuación, se sembraron células endoteliales retinianas humanas del pase 12 en la cámara superior de los pocillos a 120.000 células por inserto en un volumen de 300  $\mu\text{l}$  de medio EGM-2 (Lonza). El volumen para la cámara inferior fue 700  $\mu\text{l}$  de medio EGM-2 (Lonza). Se cultivaron las placas en una estufa de incubación a 37  $^{\circ}\text{C}$  con 5 % de  $\text{CO}_2$  durante 48 horas para constituir las monocapas intactas. Al final de la incubación, se realizaron las mediciones de TER para todos los insertos usando una sonda STX2 unida a un voltio-ohmímetro EVOM<sup>2</sup> (ambos de World Precision Instruments) para confirmar la integridad de la barrera endotelial. Todos los insertos mostraron resistencia elevada en comparación con los insertos sin células.

20 A continuación, se decantó cuidadosamente el medio de cultivo y se substituyó con EGM-2 fresco, con y sin varios aditivos. Los aditivos fueron danazol, hidroxiflutamida (antagonista del receptor de andrógenos), fluevestrant (antagonista de estrógenos) y el inhibidor de la PI3 quinasa LY 294002 (control). Las disoluciones madre de todos los aditivos, excepto del danazol, se prepararon a 10 mM en DMSO. La disolución madre de danazol fue 10 mM en etanol. Se prepararon diluciones 200  $\mu\text{M}$  de trabajo de todos los aditivos en los mismos disolventes. A continuación, se prepararon 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 otros aditivos o medio (control) en las combinaciones y concentraciones finales mostradas en la tabla más adelante. A continuación, se colocaron de nuevo las placas en la estufa de incubación, 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 entre el área superficial del inserto (0,33  $\text{cm}^2$ ). Los resultados se presentan en la Tabla 8 a continuación.

TABLA 8

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

35 Como puede apreciarse de la Tabla 8, el danazol y el fluevestrant aumentaron las mediciones de TER (permeabilidad reducida), mientras que la hidroxiflutamida redujo las lecturas (permeabilidad aumentada), en comparación con el control (sin tratamiento). El danazol previno la reducción producida por la hidroxiflutamida. Esto podría ser una prueba de que el danazol está ocupando el receptor de andrógenos en estas células. El danazol y el fluevestrant mostraron resultados aditivos en algunos momentos de tiempo.

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

45 Las UIE de la vía paracelular incluyen UA y UE. 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 produce 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, 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 transcitosis, tal vez mediante la regulación del movimiento de caveolas.

50 Se sembraron células endoteliales retinianas humanas (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA) en placas de ensayo Falcon Optilux (BD Biosciences) a 1000 células por pocillo en un volumen total de 200  $\mu\text{l}$  de medio EGM-2 (Lonza). Se cultivaron las placas en una estufa de incubación a 37  $^{\circ}\text{C}$  con 5 % de  $\text{CO}_2$  durante 48 horas. A continuación, se retiró el medio y se substituyó con 200  $\mu\text{l}$  de medio IMDM complementado con

0,1 % de suero bovino fetal (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  $\mu\text{M}$  o 10  $\mu\text{M}$ ) o el inhibidor de la PI3 quinasa LY294002 (concentración final de 10  $\mu\text{M}$ ) (control positivo). Inmediatamente después de la adición de estos compuestos, se añadió TNF $\alpha$  (concentración final de 50 ng/ml). Después de la incubación durante 30 minutos en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>, se aspiró el medio y se fijaron las células con 3,6 % de formaldehído en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante diez minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron todos los pocillos dos veces con 100  $\mu\text{l}$  de PBS. Se permeabilizaron las células usando 0,1 % de Triton X-100 en PBS durante 5 minutos. A continuación, se lavaron todos los pocillos dos veces con 100  $\mu\text{l}$  de PBS, y se añadieron a las células 50  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  de PBS. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100  $\mu\text{l}$  de PBS y se observaron y fotografiaron las células usando un microscopio invertido con filtros de rodamina (ex530/em590).

Los resultados mostraron que el danazol afectó la capacidad de desarrollo de las fibras de estrés. Cuando se trataron con danazol, las células mostraron diferentes patrones de tinción, en función de la dosificación. A la dosis más baja de danazol (0,1  $\mu\text{M}$ ) se observó tinción difusa por todo el citoplasma, posiblemente indicativo de un acontecimiento de estabilización o de un fenotipo de reposo. A la dosis más alta de danazol (10,0  $\mu\text{M}$ ), se detectaron fibras de estrés con puntos focales múltiples. Estos hallazgos se correlacionan con los resultados previos (véanse los ejemplos previos) de que las dosis más bajas de danazol inhiben la permeabilidad y las dosis más altas de danazol aumentan la permeabilidad. El TNF $\alpha$  estimuló las células y condujo a un fuerte desarrollo de fibras de estrés con puntos focales de tinción intensa. El danazol y LY294002 disminuyeron el número de células que presentaron desarrollo de fibras de estrés con el TNF $\alpha$ .

#### 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 3000 células por pocillo en un volumen total de 200  $\mu\text{l}$  de medio EGM-2 (Lonza). Se cultivaron las placas en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. A continuación, se retiró el medio y se sustituyó con 200  $\mu\text{l}$  de medio Ultraculture complementado con 2,0 % de suero bovino fetal (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 sustituyó con medio Ultraculture fresco complementado con 2,0 % de suero bovino fetal que contenía danazol (0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  o 10  $\mu\text{M}$ ) o el inhibidor de la PI3 quinasa LY294002 (10  $\mu\text{M}$ ) (control positivo). Después de la incubación con estos compuestos durante 30 minutos en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>, se añadió factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (concentración final de 25 ng/ml). Después de la incubación durante 30 minutos adicionales en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>, se aspiró el medio y se fijaron las células usando 3,6 % de formaldehído en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante diez minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron todos los pocillos dos veces con 100  $\mu\text{l}$  de PBS. Se permeabilizaron las células usando 0,1 % de Triton X-100 en PBS durante 5 minutos. A continuación, se lavaron todos los pocillos dos veces con 100  $\mu\text{l}$  de PBS, y se añadieron a las células 50  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  de PBS. Para la tinción de contraste de los núcleos, se añadieron a cada pocillo 100  $\mu\text{l}$  de una disolución de DAPI 3  $\mu\text{M}$  (4,6-diamino-2-fenilindol, dilactato (Invitrogen)). Después de 5 minutos, se lavaron las células dos veces con 100  $\mu\text{l}$  de PBS. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100  $\mu\text{l}$  de PBS y se observaron y fotografiaron las células usando un microscopio invertido usando rodamina (ex530/em590) y filtros para DAPI (ex350/em460).

Los resultados mostraron que el danazol afectó la capacidad de desarrollo de las fibras de estrés. Cuando se trataron con danazol, las células mostraron diferentes patrones de formación de fibras de estrés, en función de la dosificación aplicada. A la dosis más baja de danazol (0,1  $\mu\text{M}$ ), se observó tinción difusa de la F-actina por todo el citoplasma. A una concentración de danazol 1,0  $\mu\text{M}$ , la tinción difusa persistía, pero fueron visibles fibras de estrés y puntos focales alrededor del perímetro de la mayoría de las células. A la dosis más alta de danazol (10,0  $\mu\text{M}$ ), no existía ya ninguna tinción difusa, y se veían el desarrollo de fibras de estrés y puntos focales. La tinción vista con las dosis más bajas de danazol mostró un patrón de tinción perinuclear, que indica una estabilización de microtúbulos similar a la observada con el paclitaxel (un compuesto de taxol conocido por estabilizar y polimerizar microtúbulos). Con VEGF hubo un fuerte desarrollo de fibras de estrés. El danazol cambió el patrón del VEGF de un modo dependiente de la dosis: (i) la dosis más baja de danazol de 0,1  $\mu\text{M}$  hizo las fibras de estrés menos pronunciadas y apareció cierta tinción difusa; (ii) la dosis de 1,0  $\mu\text{M}$  mostró menos 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  $\mu\text{M}$  mostró un fuerte desarrollo de fibras de estrés con puntos focales. LY294002 previno el fuerte desarrollo de fibras de estrés visto con VEGF y mostró tinción difusa.

#### Ejemplo 9: Efecto del danazol sobre la fosforilación de 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 de tejido de 10 cm<sup>2</sup> recubiertas de fibronectina (1 µg/cm<sup>2</sup>) usando medio de cultivo EGM-2 (Lonza) en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Cuando se consiguió la confluencia completa, se sustituyó el medio con medio Ultraculture complementado con 0,5 % de suero bovino fetal 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 sustituyó con medio Ultraculture fresco complementado con 0,5 % de suero bovino fetal y L-glutamina que contenía danazol (0,1 µM, 1 µM o 10 µM) o etanol (vehículo de control). Después de la incubación durante 15 minutos en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>, se añadió factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (concentración final de 50 ng/ml), y se incubaron las placas durante 15 minutos adicionales en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>.

Se trataron inmediatamente las placas para lisar las células del siguiente modo. Se enfriaron, a 4 °C, PBS y tampón de lisis (PBS que contenía 1 % de Triton X-100 complementado con las disoluciones 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 disolución 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 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 20 % de colorante reductor (Invitrogen).

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 densitometría usando un puesto de formación de imágenes Kodak. Los resultados se presentan en la Tabla 9 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 de ProQ (proteína fosforilada)	1,00	1,51	1,89	1,38
Intensidad relativa - resultados de SYPRO (proteína total)	1,00	0,89	0,84	0,83
Relación proteína fosforilada:total	0,215	0,365 (aumento de 1,70 veces)	0,481 (aumento de 2,24 veces)	0,358 (aumento de 1,66 veces)

Como puede apreciarse, el danazol produjo un aumento en la fosforilación de la VE-cadherina. El VEGF produjo un aumento aún mayor en la fosforilación de la VE-cadherina (hiperfosforilación), que fue invertido por el danazol. La VE-cadherina es un componente de las UA, 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 UA 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. Parece existir un bucle de retroalimentación en el que la VE-cadherina internalizada impulsa un aumento de la p120 citoplásmica, una proteína de armazón que forma complejos con las UA. Esta regulación por incremento 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 tras un tratamiento con una dosis baja de danazol conduce a la activación de las GTPasas estabilizadoras de barrera. Además, el danazol puede prevenir los acontecimientos de fosforilación desestabilizadores inducidos por el VEGF.

Ejemplo 10: Efecto del danazol y antagonistas del receptor de esteroides sobre la TER de 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 de cultivo celular Thincert de 24 pocillos de Greiner BioOne, nº 662610) con 5 µg/cm<sup>2</sup> de fibronectina. A continuación, se sembraron células endoteliales retinianas humanas del pase 13 en la cámara superior de los pocillos a 120.000 células por inserto en un volumen de 300 µl de medio EGM-2 (Lonza). El volumen para la cámara inferior fue 700 µl de medio EGM-2 (Lonza). Se cultivaron las placas en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 48 horas para constituir las monocapas intactas. Al final de la incubación, se

realizaron las mediciones de TER para todos los insertos usando una sonda STX 2 conectada a un voltio-ohmímetro EVOM<sup>2</sup> (ambos de World Precision Instruments) para confirmar la integridad de la barrera endotelial. Todos los insertos mostraron resistencia elevada en comparación con los insertos sin células.

5 A continuación, se decantó cuidadosamente el medio de cultivo y se sustituyó con EGM-2 fresco, 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 disoluciones madre de todos los aditivos, excepto danazol, se prepararon a 10 mM en DMSO. La disolución madre de danazol fue 10 mM en etanol. Se prepararon diluciones de trabajo 200 µM de todos los aditivos en los mismos disolventes. A continuación, se prepararon 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 otros aditivos o medio (control) en las combinaciones y concentraciones finales mostradas en la tabla más abajo. A continuación, se colocaron de nuevo las placas en la estufa de incubación, 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) de la lectura de un inserto y dividiendo entre el área superficial del inserto (0,33 cm<sup>2</sup>). Los resultados se presentan en la Tabla 10 más adelante.

20 Como puede apreciarse en la Tabla 10, el danazol aumentó las mediciones de TER, la hidroxiflutamida redujo las lecturas, la testosterona redujo las lecturas muy ligeramente, y el fluevestrant no tuvo esencialmente ningún efecto, en comparación con el control (sin tratamiento). El danazol previno la reducción producida por 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 5 minutos	TER a 30 minutos	TER a 60 minutos	TER a 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
Fluevestrant 0,1 µM	223,47	251,50	243,99	279,28
Fluevestrant 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

25

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

30 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/cm<sup>2</sup> de fibronectina a 2000 células por pocillo en un volumen total de 200 µl de medio EGM-2 (Lonza). Se cultivaron las placas en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 48 horas con cambios diarios de medio. A continuación, se añadieron los compuestos de prueba (danazol, TNFα y S1P), diluidos en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS; Lonza), para dar las siguientes concentraciones finales: danazol (1 µM) (Sigma), TNFα (1 ng/ml) (Sigma) y S1P (1 µM) (Sigma). Se incubaron los portaobjetos con los compuestos de prueba durante 15 minutos, 30 minutos o 24 horas en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de esta incubación, se aspiró el medio y se fijaron las células usando 3,6 % de formaldehído 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 usando 0,1 % de Triton X-100 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-faloídina (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 usando un microscopio invertido usando un filtro para rodamina (ex530/em590).

50 Los resultados mostraron que el danazol afectó la capacidad de desarrollo de las fibras de estrés en las células endoteliales microvasculares de glomérulo renal. Cuando se trataron con danazol solo, las células mostraron 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 TNFα solo, se vieron en todo momento fibras de estrés, aumentando con el tiempo el número de células que mostraban fibras de estrés y el grosor de las fibras. El danazol disminuyó 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 sola mostraron 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 pareció potenciar los anillos corticales. Además, se observó tinción difusa, especialmente a los 15 minutos y a las 24 horas.

5 Para las células endoteliales retinianas tratadas con danazol solo, las células mostraron 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 TNF $\alpha$  solo, se vieron en todo momento fibras de estrés, aumentando el número de células que mostraron fibras de estrés y el grosor de las fibras de 15 minutos a 3 horas y reduciéndose después de 24 horas de incubación. El danazol disminuyó 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 sola mostraron 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 pareció potenciar 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 particular, la S1P participa en la formación de fibras de actina cortical y en la organización de las uniones adherentes. El agotamiento de S1P conduce a fuga vascular y edema, y la S1P puede invertir la disfunción endotelial y restaurar la función de barrera.

En este experimento, el danazol mostró la capacidad de fortalecer los efectos protectores de la S1P en tanto células endoteliales glomerulares como retinianas. El danazol también invirtió la formación de fibras de estrés inducidas por TNF $\alpha$  en estos dos tipos de células endoteliales. Se ve tinción perinuclear difusa en las células tratadas con danazol solo.

#### Ejemplo 12: Efecto del danazol sobre la ECIS

30 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 usando el sistema de detección por impedancia eléctrica célula-sustrato (ECIS) (ECISZ $\theta$ , 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  $\mu\text{l}$  por pocillo e incubando las placas durante 30 minutos en una estufa de incubación a 37  $^{\circ}\text{C}$  con 5 % de CO $_2$ . Se eliminó la disolución de fibronectina, y se añadieron a cada pocillo 400  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo EGM-2 (Lonza). Se conectaron las placas al sistema ECISZ $\theta$  y se estabilizaron eléctricamente. Se aspiró el medio EGM-2 y se sustituyó con 200  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo EGM-2 que contenía 100.000 células por pocillo. Se volvieron a conectar las placas al sistema ECISZ $\theta$  y se incubaron durante 24 horas en una estufa de incubación a 37  $^{\circ}\text{C}$  con 5 % de CO $_2$ . Se aspiró el medio EGM-2 y se sustituyó con 400  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo EGM-2 fresco por pocillo. Se volvieron a conectar las placas al sistema ECISZ $\theta$  y se incubaron durante 6 horas en una estufa de incubación a 37  $^{\circ}\text{C}$  con 5 % de CO $_2$ . Se prepararon disoluciones concentradas de los compuestos de prueba en HBSS y se colocaron en la estufa de incubación para equilibrarlas. A continuación, se añadieron los compuestos de prueba a los pocillos apropiados a las siguientes concentraciones finales: danazol (1  $\mu\text{M}$ ) (Sigma) y S1P (1  $\mu\text{M}$ ) (Sigma). Se monitorizó la ECIS (resistencia) durante 90 horas.

En las células endoteliales retinianas, el danazol 1,0  $\mu\text{M}$  solo mostró 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 sola mostró 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 S1P sola y células no tratadas, y este aumento de la ECIS persistió durante aproximadamente 90 horas. Por tanto, el danazol mostró la capacidad de potenciar los efectos tempranos de la S1P y de mantener una mayor resistencia durante todo el experimento cuando estaba presente S1P.

Las células endoteliales glomerulares mostraron un patrón diferente. El danazol solo no tuvo efecto sobre la ECIS hasta aproximadamente 30 horas después del tratamiento. El danazol solo aumentó la ECIS en comparación con células no tratadas desde aproximadamente las 30 hasta aproximadamente las 90 horas, produciéndose el mayor aumento entre aproximadamente 60-90 horas. La S1P sola tampoco tuvo ningún efecto sobre la ECIS hasta aproximadamente 30 horas después del tratamiento. La S1P sola aumentó la ECIS en comparación con 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 30 horas después del tratamiento. Esta combinación aumentaba la ECIS en comparación con las células no tratadas, la S1P solo y el danazol solo. En particular, la combinación aumentó la ECIS en comparación con las células no tratadas desde aproximadamente las 30 hasta

aproximadamente las 70 horas, aumentó la ECIS en comparación con la S1P solo desde aproximadamente las 30 hasta las 75 horas y aumentó la ECIS en comparación con el danazol solo desde aproximadamente las 30 hasta aproximadamente las 50 horas.

#### 5 Ejemplo 13: Efecto del danazol sobre la ECIS

Se realizaron ensayos para determinar el efecto del danazol sobre la resistencia eléctrica transendotelial (TER) de 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 usando 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  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fibronectina en HBSS añadiendo la fibronectina en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  por pocillo e incubando las placas durante 30 minutos en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de  $\text{CO}_2$ . Se eliminó la disolución de fibronectina, y se añadieron a cada pocillo 200  $\mu\text{l}$  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 sustituyó con 200  $\mu\text{l}$  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 estufa de incubación a 37 °C con 5 % de  $\text{CO}_2$ . Se aspiró el medio EGM-2 y se sustituyó con 200  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo EGM-2 fresco por pocillo. Se volvieron a conectar las placas al sistema ECISZ0 y se incubaron durante 24 horas adicionales en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de  $\text{CO}_2$ . Se aspiró el medio EGM-2 y se sustituyó con 200  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo EGM-2 fresco sin dexametasona por pocillo. Se volvieron a conectar las placas al sistema ECISZ0 y se incubaron durante la noche en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de  $\text{CO}_2$ . Por último, se aspiró el medio EGM-2 y se sustituyó con 200  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo EGM-2 fresco sin dexametasona por pocillo. Se volvieron a conectar las placas al sistema ECISZ0 y se incubaron 2 horas en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de  $\text{CO}_2$ . Se prepararon disoluciones concentradas de los compuestos de prueba en HBSS y se colocaron en la estufa de incubación para equilibrarlas. A continuación, se añadieron los compuestos de prueba a los pocillos apropiados a las siguientes concentraciones finales: danazol (1  $\mu\text{M}$ ) (Sigma) y dexametasona (1  $\mu\text{M}$ ) (Sigma). Se monitorizó la ECIS (resistencia) durante 90 horas.

El danazol solo aumentó 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. Cuando se comparó con la dexametasona, el danazol mostró un patrón similar, pero la potenciación de la ECIS (TER) no fue tan grande.

#### 35 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 Rho GTP y de miosina, de acuerdo con la contractilidad celular aumentada. La inhibición de RhoA bloquea esta respuesta y la pérdida de la función de barrera, que demuestra una función crítica de la Rho en la permeabilidad vascular.

Este experimento se realizó usando un ensayo de activación de Rho comercialmente disponible (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 de tejido de 6 pocillos recubiertas de fibronectina (1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) usando medio de cultivo EGM-2 (Lonza) durante 24 horas en una estufa de incubación a 37 °C con 5 % de  $\text{CO}_2$  (30.000 células/pocillo en un volumen total de 3 ml). A continuación, se aspiró el medio y se sustituyó con medio Ultraculture complementado con 0,1 % de suero bovino fetal, L-glutamina, piruvato sódico, penicilina/estreptomina 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 estufa de incubación a 37 °C con 5 % de  $\text{CO}_2$ . Se colocaron los compuestos de prueba diluidos en HBSS en la estufa de incubación para equilibrarlos antes de añadirse a las células. A continuación, se añadieron a los pocillos de cultivo apropiados 150  $\mu\text{l}$  de cada compuesto de prueba, y se incubaron las placas en la estufa de incubación durante 15 minutos adicionales. 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  $\mu\text{l}$  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 las determinaciones de proteínas. Todas las concentraciones de proteínas estuvieron dentro del 10 %, y se usaron los extractos a las concentraciones conseguidas (equivalente a 15  $\mu\text{g}$  de proteína total por pocillo). El ensayo de GLISA se realizó usando los reactivos suministrados en el kit.

65 Los resultados para las células endoteliales retinianas del pase 12 se presentan en la Tabla 11 a continuación.

Como era de esperar, los niveles de Rho A activa inducidos por la trombina fueron muy altos. Todos los compuestos de prueba inhibieron la activación de la Rho A inducida por trombina.

- 5 Los resultados para las células endoteliales retinianas del pase 8 se presentan en la Tabla 12 a continuación. Como era de esperar, los niveles de Rho A activa inducidos por la trombina fueron muy altos. Todos los compuestos de prueba inhibieron la activación de la Rho A inducida por trombina.

TABLA 11

Tratamiento	DO media	Porcentaje de inhibición frente a control sin tratar	Porcentaje de inhibición frente a trombina
No tratado	0,455	---	---
Danazol 1,0 µM	0,424	6,82	---
Dexametasona 1,0 µM	0,428	5,83	---
Inhibidor de PI3 cinasa 10,0 µM LY 294002	0,370	18,70	---
Inhibidor de Src-1* 1,0 µM	0,349	23,21	---
0,1 U/ml de trombina	1,013	---	---
0,1 U/ml de trombina + danazol 1,0 µM	0,859	---	27,57
0,1 U/ml de trombina + dexametasona 1,0 µM	0,826	---	33,48
0,1 U/ml de trombina + inhibidor de PI3 cinasa 10,0 µM LY294002	0,685	---	58,73
0,1 U/ml de trombina + inhibidor de Src-1 1,0 µM	0,534	---	85,85

\* Obtenido de Sigma.

10

TABLA 12

Tratamiento	DO media	Porcentaje de inhibición frente a control sin tratar	Porcentaje de inhibición frente a trombina
No tratado	0,102	---	---
Danazol 1,0 µM	0,027	73,89	---
Inhibidor de PI3 cinasa 10,0 µM LY 294002	0,056	45,32	---
0,1 U/ml de trombina	0,561	---	---
0,1 U/ml de trombina + danazol 1,0 µM	0,373	---	41,02
0,1 U/ml de trombina + inhibidor de PI3 cinasa 10,0 µM LY294002	0,433	---	27,86

*Ejemplo 15: Modelo animal de hiperpermeabilidad vascular*

- 15 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 endotelial vascular A (VEGF-A) para producir fuga vascular en la retina. A continuación, 24 horas después, se les inyectó fluoresceína sódica, y se midió la fluorescencia de los ojos usando un Fluorotron (Ocumetrics) (promedio de cinco mediciones). Un solo conejo de control (placebo) tuvo 250 unidades de fluorescencia en la retina, que indica fuga vascular aquí.
- 20 Un único conejo tratado con danazol dio 16 unidades de fluorescencia, que representa una reducción del 94 % en la fuga vascular producida por el danazol.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Una cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado entre danazol y sales farmacéuticamente aceptables de danazol para el uso en el tratamiento de nefropatía diabética, en la que la cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular es de 1 mg a 100 mg del compuesto por día.
- 10 2.- Una cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado entre danazol y sales farmacéuticamente aceptables de danazol para el uso según la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento de nefropatía diabética en la aparición de uno o más signos tempranos de, o una predisposición para desarrollar, nefropatía diabética.
- 15 3.- Una cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado entre danazol y sales farmacéuticamente aceptables de danazol para el uso según la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento de nefropatía diabética inmediatamente tras el diagnóstico de nefropatía diabética.
- 20 4.- Una cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado entre danazol y sales farmacéuticamente aceptables de danazol para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el compuesto es danazol.
- 25 5.- Una cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado entre danazol y sales farmacéuticamente aceptables de danazol para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el compuesto se administra por vía oral.
- 30 6.- Una cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado entre danazol y sales farmacéuticamente aceptables de danazol para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el animal es un ser humano.
- 7.- Una cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular de un compuesto seleccionado entre danazol y sales farmacéuticamente aceptables de danazol para el uso según la reivindicación 1, en la que la cantidad inhibidora de la hiperpermeabilidad vascular es de 10 mg a 90 mg del compuesto por día.
- 8.- Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto seleccionado entre danazol y sales farmacéuticamente aceptables de danazol para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

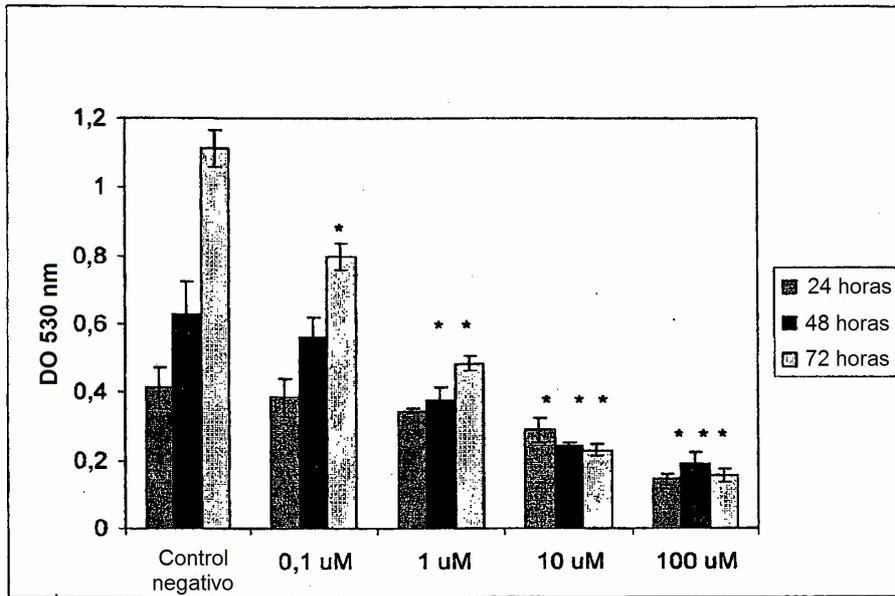


FIGURA 1

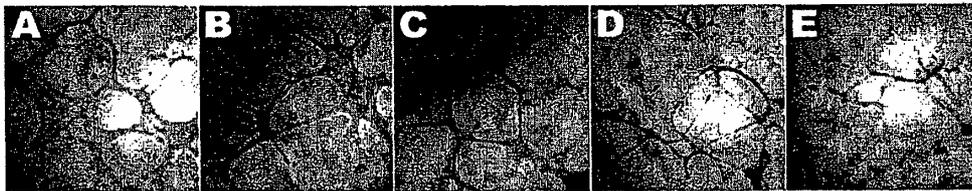


FIGURA 2

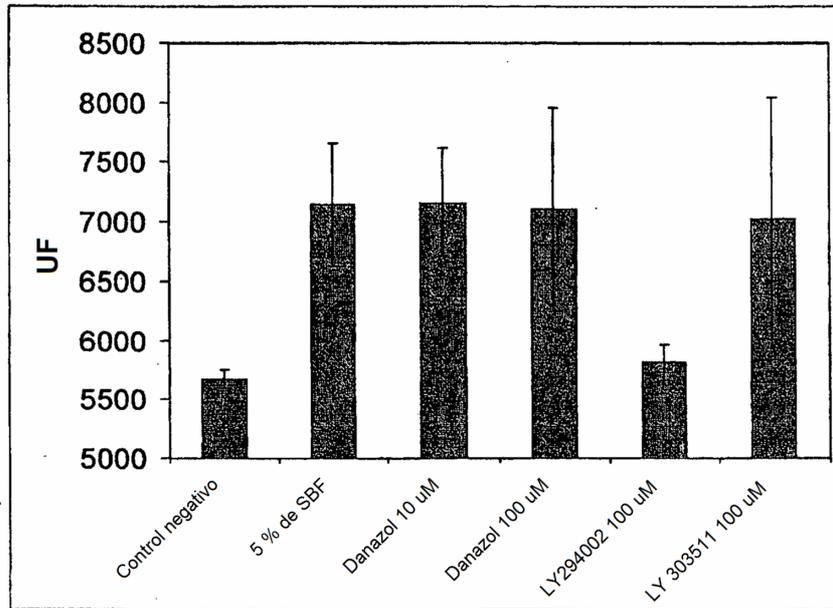


FIGURA 3