



(12) **Øversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2326332 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 31/58 (2006.01)
A61P 7/10 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Øversettelse publisert	2013.03.25
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.11.14
(86)	Europeisk søknadsnr	10792567.9
(86)	Europeisk innleveringsdag	2010.06.22
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.06.01
(30)	Prioritet	2009.06.22, US, 219185 P 2010.03.18, US, 315350 P
(84)	Utpekte stater	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
(73)	Innehaver	DMI Acquisition Corp., 8400 E. Crescent Parkway Suite 600, Greenwood Village, CO 80111, USA
(72)	Oppfinner	BAR-OR, David, 900 E. Oxford Lane, Englewood CO 80110, USA
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for behandling av sykdommer
(56)	Anførte publikasjoner	US-A1- 2007 173 538 US-A1- 2008 193 499 US-A1- 2008 214 614 US-A1- 2008 318 875 US-A1- 2009 105 152 WO-A2-2007/009087 HOEPFL F ET AL: "LONG-TERM DANAZOL THERAPY FOR HEREDITARY ANGIO-EDEMA", DMW (DEUTSCHE MEDIZINISCHE WOCHENSCHRIFT), vol. 115, no. 4, 1990, pages 133-138, XP001526011, ISSN: 0012-0472 TOMINO Y ET AL: "CLINICAL EFFECT OF DANAZOL IN PATIENTS WITH IGA NEPHROPATHY", JAPANESE JOURNAL OF MEDICINE, vol. 26, no. 2, 1987, pages 162-166, XP009152793, ISSN: 0021-5120

Beskrivelse**OPPFINNELSENS OMRÅDE**

5 **[0001]** Oppfinnelsen gjelder en forbindelse for anvendelse for behandling av makula-
ødem og andre uønskede virkninger som er en følge av makulaødem, hvor forbindelsen
er danazol eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

BAKGRUNN

10 **[0002]** Karendotelet kler innsiden av alle blodkar. Det virker som grenseflate mellom
blodet og vev og organer. Endotelet danner en semipermeabel barriere som opprett-
holder integriteten i blodvæskerommet, men som tillater passasje av vann, ioner, små
molekyler, makromolekyler og celler på en regulert måte. Feilregulering av denne
prosessen fører til lekkasje fra karet til de underliggende vev. Væskelekkasje til vev
fører til ødem, som kan ha alvorlige og livstruende konsekvenser i en rekke forskjellige
sykdommer. Det vil følgelig være svært ønskelig å ha en fremgangsmåte for reduksjon
15 av ødem, fortrinnsvis i det tidligste stadium, og for gjenopprettelse av endotelbarrieren
til fysiologisk funksjon.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

20 **[0003]** Oppfinnelsen tilveiebringer en forbindelse for anvendelse i en slik fremgangs-
måte. Nærmere bestemt tilveiebringer oppfinnelsen en vaskulær hyperpermeabilitet-
inhiberende mengde av en forbindelse utvalgt blant danazol og farmasøytisk akseptable
salter av danazol ifølge krav 1 og en farmasøytisk sammensetning ifølge krav 13. De
uselvstendige kravene inneholder fordelaktige utførelser av den foreliggende
oppfinnelse.

25 **[0004]** "Vaskulær hyperpermeabilitet" anvendes heri for å betegne en permeabilitet av
et karendotel som er forhøyet relativt til basalnivået. Som anvendt heri omfatter
"vaskulær hyperpermeabilitet" paracellulær hyperpermeabilitet og hyperpermeabilitet
grunnet transcytose.

30 **[0005]** "Paracellulær hyperpermeabilitet" anvendes heri for å betegne vaskulær hyper-
permeabilitet som skyldes en paracellulær transport som er forhøyet relativt til basal-
nivået. Andre egenskaper ved "paracellulær hyperpermeabilitet" beskrives nedenfor.

[0006] "Paracellulær transport" anvendes heri for å betegne bevegelse av ioner, mole-
kyler og fluider gjennom interendotelforbindelsene (IEJ, inter-endothel junctions)
mellom endotelcellene i et endotel.

35 **[0007]** "Hyperpermeabilitet grunnet transcytose" anvendes heri for å betegne vaskulær
hyperpermeabilitet som skyldes en transcytose som er forhøyet relativt til basalnivået.

[0008] Som anvendt heri betyr "transcytose" aktiv transport av makromolekyler og
ledsagende plasmabestanddeler i væskefase gjennom endotelcellene i endotelet. Andre
egenskaper ved "transcytose" beskrives nedenfor.

[0009] ”Basalnivå” anvendes heri for å vise til det nivå som foreligger i et normalt vev eller organ.

[0010] Som anvendt heri betyr ”inhiberende”, ”inhibere” og lignende begreper å redusere, forsinke eller forhindre.

5 **[0011]** Et dyr har ”behov for” behandling ifølge oppfinnelsen dersom dyret har en sykdom eller tilstand som formidles av vaskulær hyperpermeabilitet, viser tidlige tegn på en slik sykdom eller tilstand eller er predisponert for utvikling av en slik sykdom eller tilstand.

10 **[0012]** Som anvendt heri betyr ”formidlet av” og lignende begreper at noe skyldes, omfatter eller forverres av vaskulær hyperpermeabilitet.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

[0013]

15 Figur 1 viser OD-nivåene målt etter inkubering av HUVEC-celler med danazol, som et mål på forbindelsens evne til å forhindre begynnende proliferasjon av endotelceller.

Figur 2 viser fotografier av HUVEC-celler tatt etter inkubering med danazol, som et mål på forbindelsens evne til å forhindre rørdannelse av endotelceller. A = kontroll, B = 1 μ M danazol, C = 10 μ M danazol, D = 50 μ M danazol og E = 50 μ M LY294002.

20 Figur 3 viser fluorescensen målt etter behandling av HUVEC-celler med danazol som et mål på forbindelsens evne til å forhindre invasjon av endotelceller.

DETALJERT BESKRIVELSE AV DE FOR TIDEN FORETRUKNE UTFØRELSENE AV OPPFINNELSEN

25 **[0014]** Endotelet er en viktig kontrollør av utbytningen av molekyler fra blodet til vevenes parenkym. Endotelet kontrollerer i stor grad et gitt kars permeabilitet overfor blodbårne molekyler. Endotelcellebarrierens permeabilitet og selektivitet avhenger i stor grad av strukturen og typen av endotelet som kler mikrovaskulaturen i forskjellige kar. Endotelcellene som kler mikrovaskulaturen i forskjellige organer har en strukturell differensiering som kan grupperes i tre primære morfologiske grupper: sinusoidale, fenestrerte og kontinuerlige.

30 **[0015]** Sinusoidalt endotel (også betegnet ”diskontinuerlig endotel” har store inter-cellulære og intracellulære gap og ingen basalmembran, noe som tillater en minimalt begrenset transport av molekyler fra karlumen til vevet og omvendt. Sinusoidalt endotel forefinnes i lever, milt og benmarg.

35 **[0016]** Fenestrert endotel særpreges ved nærvær av et stort antall sirkulære, trans-cellulære åpninger som kalles fenestrae og som har en diameter på 60 til 80 nm. Fenestrert endotel finnes i vev og organer som krever hurtig utveksling av små molekyler, deriblant nyre (glomeruli, peritubulære kapillarer og den oppstigende vasa recta), bukspyttkjertel, binyrekjertler, endokrine kjertler og tarm. Fenestrae er dekket

av tynne diafragma, bortsett fra fenestrae i modne, friske glomeruli. Se Ichimura et al., J. Am. Soc. Nephrol., 19:1463-1471 (2008).

[0017] Kontinuerlig endotel inneholder ikke fenestrae eller store åpninger. I stedet særpreges kontinuerlig endotel av et uavbrutt éncellelag av endotelceller. De fleste
 5 endotel i kroppen er kontinuerlige endotel, og kontinuerlig endotel forefinnes i eller rundt hjernen (blod-hjerne-barrieren), mellomgulv, muskulaturen i tolvfingertarmen, fett, hjerte, noen områder i nyrene (papillær mikrovaskulatur, den nedgående vasa recta), store blodkar, lunger, mesenterium, nerver, netthinnen (blod-retina-barrieren), skjelettmuskel, testis og andre vev og organer i kroppen.

[0018] Endotelial transport i kontinuerlig endotel kan i generell forstand anses å skje ved paracellulære og transcellulære transportveier. Den paracellulære transportvei er veien mellom endotelcellene, gjennom interendotelforbindelsene (IEJ). I uforstyrret kontinuerlig endotel transporteres vann, ioner og små molekyler paracellulært ved diffusjon og konveksjon. En signifikant vannmengde (opp til 40 %) krysser også
 15 endotelcellebarrieren transcellulært gjennom vanntransporterende membrankanaler som kalles akvaporiner. En rekke forskjellige stimuli kan forstyrre organiseringen av IEJ, slik at det dannes brudd i endotelbarrieren. Dannelsen av disse intercellulære åpningene tillater passasje av fluid, ioner, makromolekyler (f.eks. proteiner) og andre plasmabestanddeler mellom endotelcellene på en uinnskrenket måte. Denne paracellulære hyperpermeabiliteten fører til dannelse av ødem og andre uheldige virkninger som
 20 til syvende og sist kan føre til skade på vev og organer.

[0019] Den transcellulære transportvei er ansvarlig for den aktive transport av makromolekyler som albumin og andre plasmaproteiner over endotelcellelaget, en prosess som betegnes ”transcytose”. Transporten av makromolekyler skjer i vesikler som
 25 betegnes kaveoler. Nesten alt kontinuerlig endotel er rikt på kaveoler, bortsett fra kontinuerlig endotel lokalisert i hjernen eller testis, som har få kaveoler. Transcytose er en flertrinns prosess som omfatter suksessiv knoppskyting og avsnøring av kaveoler fra plasmalemma og translokalisering gjennom cellen, fulgt av dokking til og fusjon med det motsatt plasserte plasmalemma, hvor kaveolene frigjør innholdet ved eksocytose
 30 inn i interstitium. Transcytose er en selektiv og nøye regulert prosess under normale fysiologiske betingelser.

[0020] Den fundamentale viktighet av den transcellulære transportvei blir stadig tydeligere. Transcytose av plasmaproteiner, særlig albumin, som utgjør 65 % av alt protein i plasma, er av spesiell interesse, grunnet prosessens evne til å regulere den
 35 transvaskulære kolloidosmotiske trykkgradient. Som man da vil forstå vill forhøyet transcytose av albumin og andre plasmaproteiner over basalnivået gi en økt protein-konsentrasjon i vevet, noe som i sin tur vil gjøre at vann forflyttes over endotelbarrieren, slik at det dannes ødem.

[0021] Lav-densitet-lipoproteiner (LDL) transporteres også gjennom endotelceller ved transcytose. I hyperlipemi har en signifikant økning av transcytosen av LDL blitt påvist som den innledende begivenhet i aterogenese. LDL akkumulerer i subendotelrommet, fanget i den utvidede basal-lamina og den ekstracellulære matriks. Den subendoteliale akkumuleringen av lipoprotein ved hyperlipemi følges av en kaskade av begivenheter som fører til dannelse av ateromatøst plakk. Fremskredne aterosklerotiske lesjoner rapporteres i blant å ledsages av åpning av IEJ og massiv, ukontrollert passasje av LDL og albumin.

[0022] Vaskulære komplikasjoner er et kjennetegn på diabetes. Når det gjelder store kar ser sykdommen ut til å uttrykkes som en akselerering av en aterosklerotisk prosess. Når det gjelder mikroangiopati fører endringer av mikrovaskulaturen i netthinnen, nyrens glomeruli og nerver til det største antall av kliniske komplikasjoner, men et stadig større antall undersøkelser viser at diabetes også påvirker mikrovaskulaturen i andre organer, for eksempel mesenterium, hud, skjelettmuskel, hjerte, hjerne og lunge, noe som fører til ytterligere kliniske komplikasjoner. I alle disse karsystemene ser endringer i karenes permeabilitet ut til å representere et kjennetegn på feilfunksjonen av endotel ved diabetes.

[0023] I kontinuerlig endotel forklares kapillær hyperpermeabilitet av makromolekyler i den tidlige fasen av diabetes ved en intensivering av transendotelial vesikkeltransport (dvs. ved forhøyet transcytose), og ikke ved en destabilisering av IEJ. I tillegg har endotelcellene hos diabetikere, deriblant endotelcellene i hjernen, blitt rapportert å inneholde et høyere antall kaveoler enn normale celler, og glykerte proteiner, særlig glykert albumin, tas opp av endotelceller og transcytoseres vesentlig raskere enn de native formene. Videre er transcytose av makromolekyler en prosess som fortsetter ut over den tidlige fasen av diabetes og ser ut til å være en årsak til ødem i diabetiske vev og organer gjennom hele sykdommen dersom den ikke behandles. Dette ødemet fører i sin tur til skader på vev og organer. En lignende økning av den transcellulære transporten av makromolekyler har blitt rapportert for hypertensjon.

[0024] Paracellulær hyperpermeabilitet er også en faktor i diabetes og de vaskulære komplikasjonene forbundet med diabetes. IEJ i den paracellulære transportveien omfatter adherente forbindelser (AJ - adherent junctions) og okkluderende celleforbindelser (TJ - tight junctions). Diabetes ender innholdet, fosforyleringen og lokaliseringen av visse proteiner i både AJ og TJ, noe som bidrar til forhøyet permeabilitet av endotelbarrieren.

[0025] For en understøttelse av diskusjonen ovenfor og for ytterligere informasjon, se Frank et al., Cell Tissue Res., 335:41-47 (2009), Simionescu et al., Cell Tissue Res., 335:27-40 (2009), van den Berg et al., J. Cyst. Fibros., 7(6): 515-519 (2008), Viazzi et al., Hypertens. Res., 31:873-879 (2008), Antonetti et al., kapittel 14, s. 340-342, i Diabetic Retinopathy (redigert av Elia J. Duh, Humana Press, 2008), Felinski et al.,

Current Eye Research, 30:949-957 (2005), Pascariu et al., Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 52(1):65-76 (2004), Bouchard et al., Diabetologia, 45:1017-1025 (2002), Arshi et al., Laboratory Investigation, 80(8):1171-1184 (2000), Viores et al., Documenta Ophthalmologica, 97:217-228 (1999), Oomen et al., European Journal of Clinical Investigation, 29:1035-1040 (1999), Viores et al., Pathol. Res. Pract., 194:497-505 (1998), Antonetti et al., Diabetes, 47:1953-1959 (1998), Popov et al., Acta Diabetol., 34:285-293 (1997), Yamaji et al., Circulation Research, 72:947-957 (1993), Viores et al., Histochemical Journal, 25:648-663 (1993), Beals et al., Microvascular Research, 45:11-19 (1993), Caldwell et al., Investigative Ophthalmol. Visual Sci., 33(5):1610-1619 (1992).

[0026] Endotelial transport i fenestrert endotel skjer også ved transcytose og den paracellulære transportveien. I tillegg skjer endotelial transport via fenestrae. Fenestrert endotel viser en bemerkelsesverdig høy permeabilitet for vann og små, hydrofile oppløste stoffer, grunnet nærværet av fenestrae.

[0027] Fenestrae kan, men må ikke være dekket av et diafragma. Lokaliseringen av endotel med fenestrae med diafragma omfatter endokrine vev (f.eks. pankreatiske øyer og binyrebark), gastrointestinale slimhinner og renale peritubulære kapillarer. Permeabiliteten for plasmaproteiner av fenestrert endotel med fenestrae med diafragma overskrider ikke permeabiliteten av kontinuerlig epitel.

[0028] Lokaliseringen av endotel med fenestrae uten diafragma omfatter nyrens glomeruli. Det glomerulære fenestrerte epitelet er dekket av en glykokalyks som strekker seg inn i fenestrae (og danner såkalte "silplugger") og av et løsere tilknyttet overflatelag av glykoproteiner på endotelcellene. Matematisk analyse av undersøkelser av funksjonell permselektivitet har konkludert med at glykokalyks på glomerulære endotelceller, innbefattet glykokalyks som foreligger i fenestrae, og det assosierte overflatelaget bidrar til tilbakeholdelse av opp til 95 % av plasmaproteinene i sirkulasjonen.

[0029] Tap av fenestrae i glomerulært epitel har blitt funnet å være forbundet med proteinuri i flere sykdommer, deriblant diabetisk nefropati, glomerulopati i transplantater, preeklampsi, diabetes, nyresvikt, nefropati grunnet syklosporin, serum-sykdom-nefritt og Thy-1-nefritt. Rearrangering av aktin, og særlig depolymerisering av stressfibere, har blitt funnet å være viktig for dannelsen og opprettholdelsen av fenestrae.

[0030] For understøttelse av diskusjonen ovenfor og for ytterligere informasjon, se Satchell et al., Am. J. Physiol. Renal Physiol., 296:F947-F956 (2009), Haraldsson et al., Curr. Opin. Nephrol. Hypertens., 18:331-335 (2009), Ichimura et al., J. Am. Soc. Nephrol., 19:1463-1471 (2008), Ballermann, Nephron Physiol., 106:19-25 (2007), Toyoda et al., Diabetes, 56:2155-2160 (2007), Stan, "Endothelial Structures Involved In Vascular Permeability," s. 679-688, Endothelial Biomedicine (red. Aird, Cambridge

University Press, Cambridge, 2007), Simionescu og Antohe, "Functional Ultrastructure of the Vascular Endothelium: Changes in Various Pathologies," s. 42-69, The Vascular Endothelium I (red. Moncada og Higgs, Springer-Verlag, Berlin, 2006).

[0031] Endotelial transport i sinusoidalt endotel skjer ved transcytose og gjennom de intercellulære åpningene (interendoteliale sprekker) og intracellulære åpninger (fenestrae). Behandling av sinusoidalt epitel med medikamenter som bryter opp aktin-filamenter kan indusere en omfattende og hurtig økning av antall åpninger, noe som indikerer en regulering av endotellagets porøsitet via aktin-cytoskjelettet. Andre medikamenter som endrer cytoskjelettet har blitt rapportert å endre diameteren av fenestrae. Følgelig kontrollerer trolig det fenestrae-assosierte cytoskjelettet den viktige endoteliale filtreringsfunksjonen i sinusoidalt endotel. I lever har defenestrering (tap av fenestrae), som fører til redusert permeabilitet av endotelet, blitt forbundet med patogenesen av flere sykdommer og tilstander, deriblant aldring, aterosklerose, arteriosklerose, cirrhose, fibrose, leversvikt og primær og metastatisk leverkreft. For understøttelse av diskusjonen ovenfor og for ytterligere informasjon, se Yokomori, Med. Mol. Morphol., 41:1-4 (2008), Stan, "Endothelial Structures Involved In Vascular Permeability," s. 679-688, Endothelial Biomedicine (red. Aird, Cambridge University Press, Cambridge, 2007), DeLeve, "The Hepatic Sinusoidal Endothelial Cell," s. 1226-1238, Endothelial Biomedicine (red. Aird, Cambridge University Press, Cambridge, 2007), Pries og Kuebler, "Normal Endothelium," s. 1-40, The Vascular Endothelium I (red. Moncada og Higgs, Springer-Verlag, Berlin, 2006), Simionescu og Antohe, "Functional Ultrastructure of the Vascular Endothelium: Changes in Various Pathologies," s. 42-69, The Vascular Endothelium I (red. Moncada og Higgs, Springer-Verlag, Berlin, 2006), Braet og Wisse, Comparative Hepatology, 1:1-17 (2002), Kanai et al, Anat. Rec, 244:175-181 (1996), Kempka et al., Exp. Cell Res., 176:38-48 (1988), Kishimoto et al., Am. J. Anat., 178:241-249 (1987).

[0032] Heri beskrives en fremgangsmåte for inhibering av vaskulær hyperpermeabilitet som opptrer i ethvert vev eller organ som inneholder eller er omgitt av kontinuerlig endotel. Som bemerket ovenfor foreligger kontinuerlig endotel i eller rundt hjernen (blod-hjerne-barrieren), diafragma, duodenal muskulatur, fett, hjerte, noen områder i nyrene (papillær mikrovaskulatur, nedadgående vasa recta), store blodkar, lunger, mesenterium, nerver, netthinnen (blod-retina-barrieren), skjelettmuskel, hud, testis, navlesnorvene og andre vev og organer i kroppen. Det kontinuerlige endotel er fortrinnsvis det kontinuerlige endotel som forefinnes i eller rundt hjernen, hjertet, lungene, nervene eller netthinnen.

[0033] Videre beskrives en fremgangsmåte for inhibering vaskulær hyperpermeabilitet som foreligger i ethvert vev eller organ som inneholder eller er omgitt av fenestrert endotel. Som bemerket ovenfor foreligger fenestrert endotel i eller rundt nyrene (glomeruli, peritubulære kapillarer og oppstigende vasa recta), bukspyttkjertel,

binyrekjertler, endokrine kjertler og tarm. Det fenestrerte endotel er fortrinnsvis det fenestrerte endotel som foreligger i nyrene, spesielt foretrukket det som foreligger i nyrenes glomeruli.

[0034] Videre kan enhver sykdom eller tilstand som formidles av vaskulær hyperpermeabilitet behandles ved hjelp av fremgangsmåten som beskrives heri. Slike sykdommer og tilstander omfatter diabetes, hypertensjon og aterosklerose.

[0035] Nærmere bestemt kan de vaskulære komplikasjonene forbundet med diabetes, innbefattet komplikasjoner i hjerne, hjerte, nyre, lunge, mesenterium, nerver, netthinne, skjelettmuskel, hud og andre vev eller organer som inneholder kontinuerlig eller fenestrert epitel, behandles ved hjelp av den foreliggende oppfinnelse. Disse vaskulære komplikasjonene omfatter ødem, akkumulering av LDL i subendotelrommet, akselerert aterosklerose og følgende: hjerne (akselerert aldring av karvegger), hjerte (myokardødem, myokardfibrose, diastolisk dysfunksjon, diabetisk kardiomyopati), nyre (diabetisk nefropati), lunge (retardert utvikling av lungene hos fostre i diabetiske mødre, endringer i flere fysiologiske pulmonale parametere og økt utsatthet for infeksjoner), mesenterium (vaskulær hyperplasi), nerver (diabetisk nevropati), netthinne (makulaødem og diabetisk retinopati) og hud (rødhet, misfarging, tørrhet og sårdannelse).

[0036] Diabetisk retinopati er en viktig årsak til blindhet og rammer tilnærmet 25 % av de anslagsvis 25 millioner amerikanere som har diabetes. Selv om forekomsten og sykdomsutviklingen kan reduseres ved intens glykemisk kontroll og kontroll av blodtrykket, utvikler neste alle pasienter med type 1 diabetes mellitus og over 60 % av dem med type 2 diabetes mellitus etter hvert diabetisk retinopati. Diabetisk retinopati utvikles i to stadier. Det første stadiet, ikke-proliferativ retinopati, er det tidlige stadium av sykdommen og særpreges ved forhøyet karpermeabilitet, mikroanevrismer, ødem og etter hvert tillukning av kar. Neovaskularisering opptrer ikke i den ikke-proliferative fasen. Tap av synet i dette stadium skyldes hovedsakelig væsken som akkumuleres i makula, det sentrale området i netthinnen. Denne væskeakkumuleringen kalles makulaødem og kan føre til midlertidig eller permanent redusert syn. Det andre stadiet av diabetisk retinopati betegnes proliferativ retinopati og særpreges ved en unormal dannelse av nye blodkar. Uheldigvis kan denne unormale neovaskulariseringen være svært skadelig, siden den kan føre til blødninger i øyet, arrvev i netthinnen, diabetisk netthinneavløsning eller glaukom, som alle kan føre til redusert syn eller blindhet. Makulaødem kan også opptre i den proliferative fasen.

[0037] Diabetisk nevropati er en vanlig og alvorlig komplikasjon ved diabetes. Det finnes fire hovedtyper av diabetisk nevropati: perifer nevropati, autonom nevropati, radikuloplexus nevropati og mononevropati. Tegnene og symptomene på perifer nevropati, den vanligste typen av diabetisk nevropati, omfatter nummenhet eller redusert evne til å føle smerte eller temperaturendringer (særlig i føtter og tær), en

kriblende eller brennende følelse, skarp smerte, smerte ved gange, ekstrem sensitivitet overfor den svakeste berøring, muskelsvakhet, vanskeligheter med å gå og alvorlige fotproblemer (som sår, infeksjoner, misdannelser og smerte i ben og ledd). Autonom nevropati rammer det autonome nervesystemet, som kontrollerer hjerte, urinblære, 5 lunger, mage, tarm, kjønnsorganer og øyne, og problemer kan opptre il alle disse områdene. Radikuloplexus nevropati (også betegnet diabetisk amyotrofi, femoral nevropati eller proksimal nevropati) rammer vanligvis nerver i hofte, skulder eller abdomen, vanligvis på én side av kroppen. Mononevropati betyr skade på kun én nerve, vanligvis i en arm, et bein eller i ansiktet. Vanlige komplikasjoner knyttet til 10 diabetisk nevropati omfatter tap av lemmer (f.eks. tær, føtter eller bein), Charcots ledd, urinveisinfeksjoner, urin-inkontinens, ”hypoglycemia unawareness” (som til og med kan føre til døden), lavt blodtrykk, fordøyelsesproblemer (f.eks. forstoppelse, diaré, kvalme og oppkast), seksuell dysfunksjon (f.eks. erektil dysfunksjon) og forhøyet eller redusert svette. Som man ser kan symptomene variere fra milde til smertefulle, 15 invalidiserende og til og med dødelige.

[0038] Diabetisk nefropati er den vanligste årsaken til terminal nyresvikt i De forente stater. Dette er en vaskulær komplikasjon forbundet med diabetes som rammer de glomerulære kapillærene i nyren og reduserer nyrens filtreringsevne. Det første tegnet på nefropati er opptreden av hyperfiltrasjon, og så mikroalbuminemi. Alvorlig protein- 20 uri og en gradvis reduksjon av nyrefunksjonen følges så av terminal nyresvikt. Før noen tegn på nefropati opptrer har retinopati vanligvis blitt diagnostisert. Nyretransplantasjon anbefales vanligvis for pasienter med terminal nyresvikt grunnet diabetes. Pasienter som mottar et transplantat har en overlevelse etter 5 år på 60 %, sammenlignet med kun 2 % for pasienter på dialyse.

[0039] Hypertensjon utvikles typisk over et tidsrom på mange år og rammer til 25 syvende og sist nær sagt alle. Ukontrollert hypertensjon øker risikoen for alvorlige helseproblemer, deriblant hjerteanfall, kongestiv hjertesvikt, slag, perifer arteriesykdom, nyresvikt, aneurismer, øyeskader og problemer med hukommelse eller dømmekraft.

[0040] Aterosklerose utvikles også gradvis. Aterosklerose kan ramme kransarteriene, halsarterien, de perifere arteriene eller mikrovaskulaturen, og komplikasjoner knyttet til 30 aterosklerose omfatter kransarteriesykdom (som kan føre til angina eller hjerteanfall), koronar mikrovaskulær sykdom, halsarteriesykdom (som kan føre til et transient iskemisk anfall eller slag), perifer arteriesykdom (som kan føre til tap av sensitivitet overfor varme og kulde eller til og med til død av vev), og aneurismer. 35

[0041] Andre sykdommer og tilstander som kan behandles omfatter akutt lungeskade, lungesviktsyndrom (ARDS, acute respiratory distress syndrome), aldersrelatert makuladegenerasjon, hjerneødem, koroidalt ødem, korioiditt, koronar mikrovaskulær sykdom, cerebral mikrovaskulær sykdom, Eales sykdom, ødem grunnet skade (f.eks.

traume eller brannskader), ødem knyttet til hypertensjon, glomerulær vaskulær lekkasje, hemoragisk sjokk, Irvine Gass-syndrom, iskemi, makulaødem (f.eks. grunnet karokklusjoner, etter intraokulære kirurgiske inngrep (f.eks. kirurgisk behandling av katarakt), uveitt eller retinitis pigmentosa, i tillegg til ødem grunnet diabetes), nefritt (f.eks. glomerulonefritt, serumsykdom-nefritt og Thy-1-nefritt), nefropatier, nefrotisk ødem, nefrotisk syndrom, nevropatier, organsvikt grunnet vevsødem (f.eks. ved sepsis eller grunnet traume), preeklampsi, lungeødem, pulmonal hypertensjon, nyresvikt, retinaødem, blødning i netthinnen, okklusjoner i netthinnevenen (f. eks okklusjoner i grener eller den sentrale del av venen), retinitt, retinopatier (f.eks. arterosklerotisk retinopati, hypertensiv retinopati, stråleindusert retinopati, sigdcelle-retinopati og retinopati hos for tidlig fødte, i tillegg til diabetisk retinopati), ”stille” hjerneinfarkt, systemiske inflammasjonssyndromer (SIRS), glomerulopati i transplantater, uveitt, karlekkasjesyndrom, glasslegemeblødning og von Hippie Lindau-sykdom. I tillegg er det kjent at visse medikamenter, innbefattet slike som anvendes for behandling av multippel sklerose, kan forårsake vaskulær hyperpermeabilitet, og danazol kan anvendes for å redusere denne uønskede bivirkningen ved anvendelse av disse medikamentene. Arvelig og ervervet angioødem er uttrykkelig utelatt fra de sykdommer og tilstander som kan behandles ifølge oppfinnelsen.

[0042] Som uttrykkene benyttes heri betyr ”behandle” eller ”behandling” en (fullstendig eller delvis) reduksjon av symptomene på, varigheten av eller omfanget av en sykdom eller tilstand, innbefattet kurering av sykdommen, eller å forhindre sykdommen eller tilstanden.

[0043] Nyere materiale tyder på at hyperpermeabilitet grunnet transcytose er det første trinnet i en prosess som til syvende og sist fører til skade på vev og organer i mange sykdommer og tilstander. Følgelig tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse et middel for tidlig inngripen i disse sykdommene, noe som kan redusere, forsinke eller til og med kanskje forhindre vevs- og organskaden som man kan se i dem. For eksempel kan et dyr behandles umiddelbart etter diagnose av en av de sykdommene eller tilstandene som kan behandles ifølge oppfinnelsen (sykdommene og tilstandene som er beskrevet ovenfor). Alternativt foretrekkes behandling av dyr som har tidlige tegn på eller en predisposisjon for å utvikle en slik sykdom eller tilstand, før det foreligger symptomer. Tidlige tegn på og risikofaktorer for diabetes, hypertensjon og aterosklerose er velkjente, og behandlingen av et dyr som viser disse tidlige tegnene eller risikofaktorene kan startes før det foreligger symptomer på sykdommen eller tilstanden (dvs. profylaktisk).

[0044] For eksempel kan behandlingen av en pasient som har fått diagnosen diabetes startes umiddelbart etter diagnosen. Nærmere bestemt bør diabetes fortrinnsvis behandles med en danazol-forbindelse før det foreligger noen symptomer på karkomplikasjoner, selv om dette vanligvis ikke er mulig, siden de fleste diabetikere

har slike symptomer når de får diagnosen (se nedenfor). Alternativt bør diabetes behandles mens den ikke-proliferative diabetiske retinopati er mild (dvs. et lavt nivå av mikroaneurismer og intraretinal blødning). Se Diabetic Retinopathy, s. 9 (red. Elia Duh, M.D., Human Press, 2008). Slik tidlig behandling vil gi den beste sjanse for å forhindre makulaødem og utvikling av retinopati til proliferativ diabetisk retinopati. Videre anses forekomst av diabetisk retinopati som et tegn på at andre mikrovaskulære komplikasjon knyttet til diabetes foreligger eller vil utvikles (se *Id.*, s. 474,477), og tidlig behandling kan også forhindre eller redusere disse ekstra komplikasjonene. Naturligvis kan mer utviklede sykdommer og tilstander som er vaskulære komplikasjoner knyttet til diabetes også behandles med gunstige resultater.

[0045] Som bemerkt ovenfor vil imidlertid vaskulære komplikasjoner ofte allerede foreligge på det tidspunkt da diagnosen diabetes stilles. Det er følgelig fordelaktig med profylaktisk behandling av en pasient som viser tidlige tegn på eller som er predisponert til å utvikle diabetes. Disse tidlige tegnene og risikofaktorene omfatter høyt fastende glukosenivå, men ikke så høyt at det vil klassifiseres som diabetes ("prediabetes"), hyperinsulinemi, hypertensjon, dyslipemi (høyt kolesterol, høyt nivå av triglyserider, høyt nivå av lav-densitet-lipoprotein og/eller lavt nivå av høy-densitet-lipoprotein), fedme (kroppsmasseindeks høyere enn 25), inaktivitet, alder over 45 år, utilstrekkelig søvn, en familiehistorie med diabetes, tilhører en minoritetsgruppe, historie med gestasjonell diabetes og en historie med polycystisk ovariesyndrom.

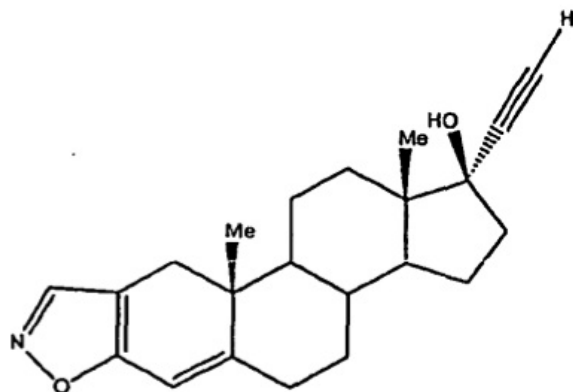
[0046] På tilsvarende måte kan behandlingen av en pasient med diagnosen hypertensjon startes umiddelbart etter diagnosen. Hypertensjon fører typisk ikke til symptomer, men forebyggende behandling kan påbegynnes for en pasient som har en predisposisjon for utvikling av hypertensjon. Risikofaktorer for hypertensjon omfatter alder, rase (hypertensjon er vanligere hos mørke), familiehistorie (hypertensjon ligger til slekten), overvekt eller fedme, manglende aktivitet, tobakksrøyking, for mye salt i kosten, for lite kalium i kosten, for lite vitamin D i kosten, for høyt alkoholforbruk, høyt stressnivå, visse kroniske tilstander (f.eks. høyt kolesterol, diabetes, nyresykdom og søvnapné), og bruk av visse medikamenter (f.eks. prevensjon i pilleform, amfetaminer, slankepiller og noen medikamenter mot forkjølelse og allergi).

[0047] Behandlingen av en pasient som har fått diagnosen aterosklerose kan startes umiddelbart etter diagnosen. Det foretrekkes imidlertid å behandle profylaktisk en pasient som viser tidlige tegn på eller som er predisponert for å utvikle aterosklerose. Tidlige tegn på og risikofaktorer for aterosklerose omfatter alder, en familiehistorie med aneurisme og tidlig hjertesykdom, hypertensjon, høyt kolesterol, høyt triglyserid-nivå, insulinresistens, diabetes, fedme, røyking, manglende fysisk aktivitet, usunt kosthold og høyt nivå av C-reaktivt protein.

[0048] Fremgangsmåten for inhibering av vaskulær hyperpermeabilitet omfatter tilførsel av en effektiv mengde av en danazol-forbindelse til et dyr med behov for dette

for å inhibere den vaskulære hyperpermeabiliteten. Som anvendt heri betyr "en danazol-forbindelse) danazol, promedikamenter av danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol og promedikamenter av danazol.

[0049] Danazol (17[alfa]-pregna-2,4-dien-20 yno[2,3-d]-isoksazol-17[beta]-ol) er et kjent, syntetisk steroidhormon. Strukturen er:



Danazol

[0050] Fremgangsmåter for fremstilling av danazol er kjente innen faget. Se f.eks. U.S. Patentskrift nr. 3135743 og G.B. Patentskrift nr. 905844. Videre er danazol kommersielt tilgjengelig fra mange kilder, deriblant Barr Pharmaceuticals, Inc., Lannett Co., Inc., sanofi-aventis Canada, Sigma-Aldrich og Parchem Trading Ltd.

[0051] "Promedikament" betyr enhver forbindelse som frigjør et aktivt utgangsmedikament (i dette tilfelle danazol) *in vivo* når et slik promedikament tilføres til et dyr. Promedikamenter av danazol omfatter danazol hvor hydroksylgruppen er bundet til hvilken som helst annen gruppe som kan avspaltes *in vivo*, slik at den frie hydroksylgruppen gjendannes. Eksempler på danazol-promedikamenter omfatter estere (f.eks. acetat-, format- og benzoat-derivater) av danazol.

[0052] De farmasøytisk akseptable saltene av danazol og promedikamenter av danazol omfatter konvensjonelle, ikke-toksiske salter, som salter avledet fra uorganiske syrer (for eksempel saltsyre, hydrogenbromid, svovelsyre, fosforsyre, salpetersyre og lignende), organiske syrer (som eddiksyre, propionsyre, ravsyre, glykolsyre, stearinsyre, melkesyre, eplesyre, vinsyre, sitronsyre, glutaminsyre, asparaginsyre, benzosyre, salisylsyre, oksalsyre, askorbinsyre og lignende) eller baser (for eksempel hydroksidet, karbonatet eller bikarbonatet av et farmasøytisk akseptabelt metallkation eller uorganiske kationer avledet fra N,N-dibenzyletylendiamin, D-glukosamin eller etylendiamin). Saltene fremstilles på konvensjonell måte, f.eks. ved å nøytralisere den frie baseformen av forbindelsen med en syre. Nærmere bestemt er isoksazoler, for eksempel danazol, svakt basiske forbindelser og vil danne syreaddisjonssalter ved tilsetning av sterke syrer og kvaternære ammoniumsalter etter tilsetning av estere av sterke syrer (f.eks. en ester av en sterk uorganisk eller organisk sulfonsyre, fortrinnsvis

en lavere alkylester, lavere alkenylester eller lavere alkynylester, for eksempel metyljodid, etyljodid, etylbromid, propylbromid, butylbromid, allylbromid, metylsulfat, metylbenzensulfonat, metyl-p-toluensulfonat, benzylklorid og lignende). Se U.S. Patentskrift nr. 3135743.

5 **[0053]** Som bemerket ovenfor kan en danazol-forbindelse anvendes for inhibering av vaskulær hyperpermeabilitet og for behandling av en sykdom eller tilstand som formidles av vaskulær hyperpermeabilitet. For å gjøre dette tilføres danazol-forbindelsen til et dyr med behov for behandling. Dyret er fortrinnsvis et pattedyr, for eksempel kanin, geit, hund, katt, hest eller menneske. Dyret er mest foretrukket et

10 menneske.

[0054] Effektive doseringsformer, tilførselsveier og dosemengder av forbindelsene ifølge oppfinnelsen (dvs. danazol, et promedikament av danazol eller et farmasøytisk akseptabelt salt av en av disse) kan fastsettes empirisk ved anvendelse av retningslinjene som tilveiebringes heri. Fagfolk vil forstå at dosemengden vil variere med

15 hvilken sykdom eller tilstand som skal behandles, omfanget av sykdommen eller tilstanden, tilførselsveien(e), behandlingens varighet, hvilke andre medikamenter som eventuelt tilføres til dyret, dyrets alder, størrelse og art, og lignende faktorer som er kjente innen medisinen og veterinærmedisinen. Generelt vil en egnet daglig dose av en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse være den mengden av forbindelsen som er

20 den laveste dosen som effektivt gir en terapeutisk virkning. Imidlertid vil den daglige dosen fastsettes av den behandlende lege eller veterinær innen området som omfatter sunn medisinsk vurdering. Om ønskelig kan den effektive daglige dosen tilføres som to, tre, fire, fem, seks eller flere underdoser som tilføres separat med egnede intervaller i løpet av dagen. Tilførselen av forbindelsen bør fortsettes inntil det oppnås en

25 akseptabel respons.

[0055] Danazol-forbindelser har tidligere blitt rapportert å inhibere angiogenese. Se PCT-patentsøknad WO 2007/009087. Overraskende og helt uventet har det blitt funnet at danazol-forbindelser kan anvendes i utførelsen av den foreliggende oppfinnelse i optimale doser som er tilnærmet 100-1000 ganger lavere enn dem som tidligere har blitt

30 rapportert for inhibering av angiogenese og betydelig lavere enn de mengder som for tiden tilføres til pasienter for behandling av andre sykdommer og tilstander (typisk 200-800 mg/dag for et voksent menneske). Anvendelse av disse lavere dosene av danazol-forbindelser bør gjøre at man unngår alle signifikante bivirkninger, kanskje alle bivirkninger, noe som vil være spesielt fordelaktig for tidlig eller forebyggende

35 behandling av sykdommer og tilstander ifølge den foreliggende oppfinnelse.

[0056] Nærmere bestemt vil en effektiv dosemengde av en danazol-forbindelse for inhibering av vaskulær hyperpermeabilitet være fra 0,1 ng/kg/dag til 35 mg/kg/dag, fortrinnsvis fra 40 ng/kg/dag til 5,0 mg/kg/dag, mest foretrukket fra 100 ng/kg/dag til 1,5 mg/kg/dag. En effektiv dosemengde vil også være den mengde som vil føre til en

konsentrasjon i en relevant væske (f.eks. blod) fra 0,0001 μM til 5 μM , fortrinnsvis fra 0,1 μM til 1,0 μM , mer foretrukket fra 0,1 μM til 0,5 μM , mest foretrukket tilnærmet 0,1 μM . En effektiv dosemengde vil også være den mengde som vil føre til en konsentrasjon i vevet eller organet som behandles på tilnærmet 0,17 % (vekt/vekt) eller lavere, fortrinnsvis fra 0,00034 % til 0,17 %, mest foretrukket fra 0,0034 % til 0,017 %. Tilført topisk eller oralt vil danazol-forbindelsen fortrinnsvis tilføres i en konsentrasjon fra 0,0001 μM til 5 μM , fortrinnsvis fra 0,1 μM til 1,0 μM , mer foretrukket fra 0,1 μM til 0,5 μM , mest foretrukket tilnærmet 0,1 μM , eller i en konsentrasjon på tilnærmet 0,17 % (vekt/vekt) eller lavere, fortrinnsvis fra 0,00034 % til 0,17 %, mest foretrukket fra 0,0034 % til 0,017 %. Tilført oralt til et voksent menneske vil dosen fortrinnsvis være fra tilnærmet 1 ng/dag til tilnærmet 100 mg/dag, mer foretrukket vil dosen være fra tilnærmet 1 mg/dag til tilnærmet 100 mg/dag, mest foretrukket vil dosen være fra tilnærmet 10 mg/dag til tilnærmet 90 mg/dag, fortrinnsvis gitt i to like doser daglig. Videre forventes danazol å akkumuleres i celler og vev, slik at en innledende dose (støtdose) (f.eks. 100 mg/dag) kan reduseres etter en tid (f.eks. 2-4 uker) til en lavere vedlikeholdsdose (f.eks. 1 mg/dag), som kan gis i ubegrenset tid uten signifikante bivirkninger, kanskje uten noen bivirkninger. Som avendt heri er en "vaskulær hyperpermeabilitet-inhiberende mengde" av en danazol-forbindelse definert til å bety de mengder som er beskrevet ovenfor i dette avsnittet.

[0057] Videre beskrives en fremgangsmåte for modulering av cytoskjelettet i endotelceller i et dyr. Denne fremgangsmåten bygger på de oppdagelser av danazol inhiberer dannelsen av F-aktin-stressfibre, fører til dannelse av kortikale aktinringer, forsterker og forlenger den dannelse av kortikale aktinringer som induseres av sfingosin-1-fosfat (SIP), inhiberer RhoA, gir forhøyet fosforylering av VE-kadherin, ser ut til å aktivere barriere-stabiliserende GTPaser og ser ut til å stabilisere mikrotubuli. Modulering av cytoskjelettet kan redusere vaskulær hyperpermeabilitet og forhøye vaskulær hypopermeabilitet (dvs. en permeabilitet som er lavere enn basalnivået), slik at endotelet kan vende tilbake til homeostase. Følgelig kan de sykdommer og tilstander som formidles av vaskulær hyperpermeabilitet behandles (se ovenfor), og de sykdommer og tilstander som formidles av vaskulær hypopermeabilitet kan også behandles. Denne siste gruppen av sykdommer omfatter aldrende lever, aterogenese, aterosklerose, cirrhose, leverfibrose, leversvikt og primær og metastatisk leverkreft.

[0058] Fremgangsmåten for modulering av cytoskjelettet til endotelceller omfatter tilførsel av en effektiv mengde av en danazol-forbindelse til dyret. "Danazol-forbindelse" og "dyr" har samme betydning som er angitt ovenfor.

[0059] Effektive doseringsformer, tilførselsmåter og dosemengder for forbindelsene (dvs. danazol, et promedikament av danazol eller et farmasøytisk akseptabelt salt av en av disse) for modulering av cytoskjelettet kan fastsettes empirisk ved hjelp av retningslinjene som tilveiebringes heri. Fagfolk vil forstå at dosemengden vil variere med

hvilken sykdom eller tilstand som skal behandles, omfanget av sykdommen eller tilstanden, tilførselsveien(e), behandlingens varighet, hvilke andre medikamenter som eventuelt tilføres til dyret, dyrets alder, størrelse og art, og lignende faktorer som er kjente innen medisinen og veterinærmedisinen. Generelt vil en egnet daglig dose av en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse være den mengden av forbindelsen som er den laveste dosen som effektivt gir en terapeutisk virkning.

[0060] Imidlertid vil den daglige dosen fastsettes av den behandlende lege eller veterinær innen området som omfatter sunn medisinsk vurdering. Om ønskelig kan den effektive daglige dosen tilføres som to, tre, fire, fem, seks eller flere underdoser som tilføres separat med egnede intervaller i løpet av dagen. Tilførselen av forbindelsen bør fortsettes inntil det oppnås en akseptabel respons.

[0061] Nærmere bestemt vil en effektiv dosemengde av en danazol-forbindelse for modulering av cytoskjelettet i endotelceller være fra 0,1 ng/kg/dag til 35 mg/kg/dag, fortrinnsvis fra 40 ng/kg/dag til 5,0 mg/kg/dag, mest foretrukket fra 100 ng/kg/dag til 1,5 mg/kg/dag. En effektiv dosemengde vil også være den mengde som vil føre til en konsentrasjon i en relevant væske (f.eks. blod) fra 0,0001 μM til 5 μM , fortrinnsvis fra 0,1 μM til 1,0 μM , mer foretrukket fra 0,1 μM til 0,5 μM , mest foretrukket tilnærmet 0,1 μM . En effektiv dosemengde vil også være den mengde som vil føre til en konsentrasjon i vevet eller organet som behandles på tilnærmet 0,17 % (vekt/vekt) eller lavere, fortrinnsvis fra 0,00034 % til 0,17 %, mest foretrukket fra 0,0034 % til 0,017 %. Tilført topisk eller oralt vil danazol-forbindelsen fortrinnsvis tilføres i en konsentrasjon fra 0,0001 μM til 5 μM , fortrinnsvis fra 0,1 μM til 1,0 μM , mer foretrukket fra 0,1 μM til 0,5 μM , mest foretrukket tilnærmet 0,1 μM , eller i en konsentrasjon på tilnærmet 0,17 % (vekt/vekt) eller lavere, fortrinnsvis fra 0,00034 % til 0,17 %, mest foretrukket fra 0,0034 % til 0,017 %. Tilført oralt til et voksent menneske vil dosen fortrinnsvis være fra tilnærmet 1 ng/dag til tilnærmet 100 mg/dag, mer foretrukket vil dosen være fra tilnærmet 1 mg/dag til tilnærmet 100 mg/dag, mest foretrukket vil dosen være fra tilnærmet 10 mg/dag til tilnærmet 90 mg/dag, fortrinnsvis gitt i to like doser daglig. Videre forventes danazol å akkumuleres i celler og vev, slik at en innledende dose (støtdose) (f.eks. 100 mg/dag) kan reduseres etter en tid (f.eks. 2-4 uker) til en lavere vedlikeholdsdose (f.eks. 1 mg/dag), som kan gis i ubegrenset tid uten signifikante bivirkninger, kanskje uten noen bivirkninger.

[0062] Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse (dvs. danazol, promedikamenter av danazol og farmasøytisk akseptable salter av en av disse) kan tilføres til en pasient for behandling via hvilken som helst egnet tilførselsvei, deriblant oralt, nasalt, parenteralt (f.eks. intravenøst, intraperitonealt, subkuttant eller intramuskulært), transdermalt, intraokulært og topisk (deriblant bukkalt og sublingvalt). Generelt foretrekkes oral tilførsel for alle sykdommer og tilstander som kan behandles ifølge oppfinnelsen. De foretrukne tilførselsveiene for behandling av sykdommer og tilstander i øyet er oralt,

intraokulært og topisk. Oral tilførsel foretrekkes. Det er temmelig uventet og overraskende at sykdommer i øyet kan behandles ved oral tilførsel av en danazol-forbindelse, siden vellykket behandling av slike sykdommer og tilstander ved oral tilførsel av et medikament ikke har blitt rapportert tidligere. De foretrukne tilførsels-
 5 veier for behandling av sykdommer og tilstander i hjernen er oralt og parenteralt. Oral tilførsel foretrekkes.

[0063] Selv om det er mulig å tilføre en forbindelse ifølge oppfinnelsen alene, foretrekkes det å tilføre den som en farmasøytisk utforming (farmasøytisk sammensetning). De farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen omfatter en eller flere forbin-
 10 deler ifølge oppfinnelsen som aktiv bestanddel, i blanding med et eller flere farmasøytisk akseptable bærestoffer og om ønskelig med en eller flere andre forbindelser, et eller flere andre medikamenter eller andre materialer. Hvert bærestoff må være "akseptabelt" i den forstand at det må være forenlig med de andre bestanddelene i sammensetningen og ikke skadelig for dyret. Farmasøytisk akseptable bærestoffer er
 15 velkjente innen faget. Uavhengig av den valgte tilførselsvei utformes forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse til farmasøytisk akseptable doseringsformer ved hjelp av konvensjonelle fremgangsmåter som er kjente blant fagfolk. Se f.eks.

Remington's Pharmaceutical Sciences.

[0064] Utforminger ifølge oppfinnelsen som er egnede for oral tilførsel kan foreligge i
 20 form av kapsler, flate kapsler, piller, tabletter, pulvere, partikler eller som en løsning eller suspensjon i en vandig eller ikke-vandig væske, som flytende olje-i-vann- eller vann-i-olje-emulsjoner, som en eliksir eller sirup eller som pastiller (ved anvendelse av en inert basis, for eksempel gelatin og glyserol eller sukrose og akasie) og lignende, som hver inneholder en på forhånd bestemt mengde av en eller flere forbindelser ifølge
 25 den foreliggende oppfinnelsen som en aktiv bestanddel. En eller flere forbindelser ifølge oppfinnelsen kan også tilføres som en bolus, blandet med honning eller et annet søtstoff eller som en grøt.

[0065] I faste doseringsformer ifølge oppfinnelsen for oral tilførsel (kapsler, tabletter, piller, drageer, pulvere, partikler og lignende) foreligger den aktive bestanddel (dvs.
 30 danazol, et promedikament av danazol, et farmasøytisk akseptabelt salt av en av disse eller kombinasjoner av disse) i sammenblanding med et eller flere farmasøytisk akseptable bærestoffer, for eksempel natriumcitrat eller dikalsiumfosfat, og/eller en eller flere av følgende: (1) fyllstoffer eller ekstendere, for eksempel stivelser, laktose, sukrose, glukose, mannitol og/eller kiselsyre, (2) bindemidler, for eksempel karboksy-
 35 metylcellulose, alginater, gelatin, polyvinylpyrrolidon, sukrose og/eller akasie, (3) fuktbevarende midler, for eksempel glyserol, (4) desintegrasjonsmidler, for eksempel agar-agar, kalsiumkarbonat, potetstivelse eller tapiokastivelse, alginat, visse silikater og natriumkarbonat, (5) oppløsningsforsinkende midler, for eksempel parafin, (6) absorpsjonsakselererende midler, for eksempel kvaternære ammoniumforbindelser, (7)

fuktemidler, for eksempel cetylalkohol og glyserolmonostearat, (8) absorpsjonsmidler, for eksempel kaolin og bentonittleire, (9) smøremidler, for eksempel talkum, kalsiumstearat, magnesiumstearat, faste polyetylenglykoler, natriumlaurylsulfat og blandinger av disse, og (10) fargestoffer. Når det gjelder kapsler, tabletter og piller kan de farmasøytiske sammensetningene også inneholde bufringsmidler, Faste sammensetninger av tilsvarende type kan benyttes som fyllstoffer i myke og harde, fylte gelatinkapsler ved anvendelse av eksipienser som laktose eller melkesukker, så vel som høymolekylære polyetylenglykoler og lignende.

[0066] En tablett kan fremstilles ved sammenpressing eller støping, om ønskelig med en eller flere tilleggsbestanddeler. Sammenpressede tabletter kan fremstilles ved anvendelse av bindemiddel (for eksempel gelatin eller hydroksypropylmetylcellulose), smøremiddel, inert fortynningsmiddel, konserveringsmiddel, desintegrasjonsmiddel (for eksempel natriumstivelsesglykolat eller kryssbundet natriumkarboksymetylcellulose), overflateaktivt middel eller dispergeringsmiddel. Støpte tabletter kan fremstilles ved forming av en blanding av den pulveriserte forbindelsen fuktet med et inert, flytende fortynningsmiddel i en egnet maskin.

[0067] Tablettene og andre faste doseringsformer av de farmasøytiske sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse, for eksempel dragéer, kapsler, piller og partikler, kan om ønskelig utstyres med furer for oppdeling eller fremstilles med belegg og skall, for eksempel enteriske belegg og andre belegg som er velkjente innen faget farmasøytisk utforming. De kan også utformes slik at de gir en langsom eller kontrollert frigjøring av den aktive bestanddelen ved anvendelse av f.eks. hydroksypropylmetylcellulose i varierende mengder for å oppnå den ønskede frigjøringsprofil, andre polymere støttemidler, liposomer og/eller mikrokuler. De kan steriliseres ved for eksempel filtrering gjennom et filter som holder bakterier tilbake. Disse sammensetningene kan også om ønskelig inneholde midler som gjør dem ugjennomsiktige, og de kan ha en sammensetning som gjør at den aktive bestanddelen kun eller fortrinnsvis frigjøres i et visst område i mage-tarmkanalen, om ønskelig på en forsinket måte. Eksempler på innstøpningsmidler som kan anvendes omfatter polymere forbindelser og vokser. Den aktive bestanddelen kan også foreligge i mikroinnkapslet form.

[0068] Flytende doseringsformer for oral tilførsel av forbindelsene ifølge oppfinnelsen omfatter farmasøytisk akseptable emulsjoner, mikroemulsjoner, løsninger, suspensjoner, siruper og eliksirer. I tillegg til den aktive bestanddel kan de flytende doseringsformene inneholde inerte fortynningsmidler som sedvanlig anvendes innen faget, for eksempel vann eller andre løsemidler, løsningshjelpemidler, og emulgeringsmidler, for eksempel etylalkohol, isopropylalkohol, etylkarbonat, etylacetat, benzylalkohol, benzylbenzoat, propylenglykol, 1,3-butylenglykol, oljer (nærmere bestemt bomullsfrøolje, jordnøttolje, maisolje, kimolje, olivenolje, lakserolje og sesamolje), glyserol,

tetrahydrofurylalkohol, polyetylenglykoler og fettsyreestere av sorbitan, samt blandinger av disse.

[0069] I tillegg til inerte fortynningsmidler kan de orale sammensetningene også inneholde adjuvanter, for eksempel fuktemidler, emulgerings- og suspenderingsmidler, søtstoffer, smaksstoffer, fargestoffer, duftstoffer og konserveringsmidler.

[0070] Suspensjoner kan i tillegg til den aktive bestanddel inneholde suspenderingsmidler, for eksempel etoksylerede isostearylalkoholer, polyoksyetylenorbitol og sorbitanestere, mikrokrySTALLinsk cellulose, aluminiummetahydroksid, bentonitt, agar-agar og tragant, samt blandinger av disse.

[0071] Oppfinnelsen tilveiebringer også farmasøytiske produkter som er egnede for behandling av øyet. Slike farmasøytiske produkter omfatter farmasøytiske sammensetninger, innretninger og implantater (som kan være sammensetninger eller innretninger).

[0072] Farmasøytiske utforminger (sammensetninger) for intraokulær injeksjon av en eller flere forbindelser ifølge oppfinnelsen inn i øyeeplet omfatter løsninger, emulsjoner, suspensjoner, partikler, kapsler, mikrokuler, liposomer, støttemidler osv. Se f.eks. U.S. Patentskrift nr. 6060463, U.S. Patentsøknad nr. 2005/0101582 og PCT-patentsøknad WO 2004/043480, hvis beskrivelser inkorporeres heri ved referanse i sin helhet. For eksempel kan en farmasøytisk utforming for intraokulær injeksjon omfatte en eller flere forbindelser ifølge oppfinnelsen i kombinasjon med en eller flere farmasøytisk akseptable, sterile, isotone, vandige eller ikke-vandige løsninger, suspensjoner eller emulsjoner, som kan inneholde antioksidanter, buffere, suspenderingsmidler, tykningsmidler, eller viskositetsøkende midler (for eksempel en hyaluronsyre-polymer). Eksempler på egnede vandige og ikke-vandige bærestoffer omfatter vann, saltvann (fortrinnsvis 0,9 %), dekstrose i vann (fortrinnsvis 5 %), buffere, dimetyl-sulfoksid, alkoholer og polyoler (for eksempel glyserol, propylenglykol, polyetylen-glykol og lignende). Disse sammensetningene kan også inneholde adjuvanter som fuktemidler, emulgeringsmidler og dispergeringsmidler. I tillegg kan forlenget absorpsjon av den injiserbare farmasøytiske formen oppnås ved å inkludere midler som forsinker absorpsjonen, for eksempel polymerer og gelatin. Injiserbare depotformer kan fremstilles ved å innføre medikamentet i mikrokapsler eller mikrokuler fremstilt av biologisk nedbrytbare polymerer, for eksempel polylaktid-polyglykolid. Eksempler på andre biologisk nedbrytbare polymerer omfatter poly(ortoestere), poly(glykol)syre, poly(melke)syre, polykaprolakton og poly(anhydrider). Injiserbare depotutforminger fremstilles også ved å innfange medikamentet i liposomer (sammensatt av de vandlige bestanddelene, for eksempel dipalmitoylfosfatidylkolin) eller mikroemulsjoner som er forenlige med øyevæv. Avhengig av forholdet mellom medikament og polymer eller lipid, egenskapene til de angjeldende polymer- eller lipid-bestanddeler, typen av liposom som benyttes og hvorvidt mikrokapslene eller mikrokulene er belagte eller

ikke belagte kan hastigheten som medikamentet frigjøres fra mikrokapsler, mikrokuler og liposomer kontrolleres.

[0073] Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan også tilføres kirurgisk som et okulært implantat. For eksempel kan en reservoarbeholder som har en diffunderbar vegg av polyvinylalkohol eller polyvinylacetat og som inneholder en eller flere forbindelser ifølge oppfinnelsen implanteres i eller på senehinnen. Som et annet eksempel kan en eller flere forbindelser ifølge oppfinnelsen innføres i et polymert støttemiddel fremstilt av en polymer, for eksempel polykaprolakton, poly(glykol)syre, poly(melke)syre, poly(anhydrid) eller et lipid, for eksempel sebasinsyre, og implanteres på senehinnen eller inne i øyet. Dette oppnås vanligvis ved at dyret gis et topisk eller lokalt bedøvende middel og det innføres et lite snitt bak hornhinnen. Støttemiddelet føres så gjennom snittet og sys fast til senehinnen.

[0074] Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan også tilføres topisk til øyet, og en foretrukket utførelse av oppfinnelsen er en topisk farmasøytisk sammensetning som er egnet for tilførsel til øyet. Topiske farmasøytiske sammensetninger som er egnede for tilførsel til øyet omfatter løsninger, suspensjoner, dispersjoner, dråper, geler, hydrogeler og salver. Se f.eks. U.S. Patentskrift nr. 5407926 og PCT-patentsøknadene WO 2004/058289, WO 01/30337 og WO 01/68053, hvis beskrivelser inkorporeres heri ved referanse i sin helhet.

[0075] Topiske utforminger som er egnede for tilførsel til øyet omfatter en eller flere forbindelser ifølge oppfinnelsen i en vandig eller ikke-vandig basis. De topiske utformingene kan også omfatte absorpsjonsfremmende midler, permeasjonsfremmende midler, tykningsmidler, viskositetsøkende midler, midler for justering av bevaring av pH, midler for justering av det osmotiske trykk, konserveringsmidler, surfaktanter, buffere, salter (fortrinnsvis natriumklorid), suspenderingsmidler, dispergeringsmidler, løsningshjelpemidler, stabilisatorer og/eller tonisitetsmidler. Topiske utforminger som er egnede for tilførsel til øyet vil fortrinnsvis omfatte et absorpsjons- eller permeasjonsfremmende middel for å fremme absorpsjon eller permeasjon av forbindelsen eller forbindelsene ifølge oppfinnelsen inn i øyet og/eller et tykningsmiddel eller viskositetsøkende middel som kan forlenge residenstiden av en forbindelse ifølge oppfinnelsen i øyet. Se PCT-søknadene WO 2004/058289, WO 01/30337 og WO 01/68053.

Eksempler på absorpsjons/permeasjons-fremmende midler omfatter metylsulfonfylmetan, alene eller i kombinasjon med dimetylsulfoksid, karboksylsyrer og surfaktanter. Eksempler på tykningsmidler og viskositetsøkende midler omfatter dekstraner, polyetylenglykoler, polyvinylpyrrolidon, polysakkaridgeler, "Gelrite", cellulose-baserte polymerer (for eksempel hydroksypropylmetylcellulose), karboksylholdige polymerer (for eksempel polymerer eller kopolymerer av akrylsyre), polyvinylalkohol og hyaluronsyre eller et salt derav.

[0076] Flytende doseringsformer (f.eks. løsninger, suspensjoner, dispersjoner og dråper) som er egnede for behandling av øyet kan for eksempel fremstilles ved å løse, dispergere, suspendere osv. en eller flere forbindelser ifølge oppfinnelsen i en bærer, for eksempel vann, saltvann, vandig dekstrose, glyserol, etanol og lignende, slik at det dannes en løsning, dispersjon eller suspensjon. Om ønskelig kan den farmasøytiske utformingen også inneholde mindre mengder av ikke-toksiske tilleggsforbindelser, for eksempel fuktemidler eller emulgeringsmidler, pH-bufrende midler og lignende, for eksempel natriumacetat, sorbitanmonolaurat, trietanolamin natriumacetat, trietanolamin-oleat osv.

[0077] Vandige løsninger og suspensjoner som er egnede for behandling av øyet kan i tillegg til en eller flere forbindelser ifølge oppfinnelsen inneholde konserveringsmidler, surfaktanter, buffere, salter (fortrinnsvis natriumklorid), tonisitetmidler og vann. Dersom det anvendes suspensjoner bør partikkelstørrelsen ikke være større enn 10 µl, slik at det unngås irritasjon av øyet. Dersom det anvendes løsninger eller suspensjoner bør mengden som tilføres øyet ikke være større enn 50 µl, for å unngå overdrevent spill fra øyet.

[0078] Kolloidale suspensjoner som er egnede for behandling av øyet er vanligvis utformet fra mikropartikler (dvs. mikrokuler, nanokuler, mikrokapsler eller nanokapsler, hvor mikrokuler og nanokuler generelt er homogene partikler av et polymert støttemiddel i hvilket utformingen er innfanget, adsorbert eller på annen måte inkludert, mens utformingen faktisk er innkapslet i mikrokapsler og nanokapsler). Den øvre grensen for størrelsen av disse mikropartiklene er fra tilnærmet 5 µ til tilnærmet 10 µ.

[0079] Oftalmiske salver som er egnede for behandling av øyet omfatter en eller flere forbindelser ifølge oppfinnelsen i en egnet basis, for eksempel mineralolje, flytende lanolin, hvit vaselin, en kombinasjon av to eller alle tre av de foran nevnte, eller en polyetylen-mineralolje-gel. Et konserveringsmiddel kan om ønskelig inngå.

[0080] Oftalmiske geler som er egnede for behandling av øyet omfatter en eller flere forbindelser ifølge oppfinnelsen suspendert i en hydrofil bases, for eksempel Carbopol-940 eller en kombinasjon av etanol, vann og propylenglykol (f.eks. i forholdet 40:40:20). Et gelatineringsmiddel, for eksempel hydroksyletylcellulose, hydroksypropylcellulose, hydroksypropylmetylcellulose eller glycyrrhizinat tilsatt ammoniakk, anvendes. Et konserveringsmiddel og/eller et tonisitetmiddel kan om ønskelig inngå.

[0081] Hydrogeler som er egnede for behandling av øyet dannes ved innføring av en svellbar, geldannende polymer, for eksempel dem som er opplistet ovenfor som tykningsmidler eller viskositetsøkende midler, bortsett fra at en utforming som innen faget kalles en "hydrogel" typisk har en høyere viskositet enn en utforming som vises til som en "tyknet" løsning eller suspensjon. I motsetning til slike ferdig dannede hydrogeler kan en utforming også fremstilles slik at den danner en hydrogel *in situ* etter tilførsel til øyet. Slike geler er flytende ved romtemperatur, men stivner ved høyere

temperaturer (de betegnes derfor som "termoreversible" hydrogeler), for eksempel når de plasseres i kontakt med kroppsvæsker. Biokompatible polymerer som gir denne egenskaper omfatter akrylsyrepolymerer og -kopolymerer, N-isopropylakrylamid-derivater og ABA-blokk-kopolymerer av etylenoksid og propylenoksid (konvensjonelt betegnet "poloksamerer" og tilgjengelige under varemerket "Pluronic" fra BASF-Wayndotte).

[0082] Foretrukne dispersjoner er liposomale, det vil si at utformingen er innelukket i liposomer (mikroskopiske vesikler som består av alternerende vandige avdelinger og lipid-dobbeltskikt).

[0083] Øyedråper kan utformes med en vandig eller ikke-vandig basis som også omfatter et eller flere dispergeringsmidler, løsningshjelpemidler eller suspenderingsmidler. Dråper kan tilføres ved hjelp av en enkel flaske med øyedrypper i korken eller ved hjelp av en plastflaske som er tilpasset dråpevis levering av flytende innhold ved hjelp av en spesialutformet åpning.

[0084] Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan også tilføres topisk ved hjelp av et fast bærestoff impregnert med medikament som innføres i øyet. Medikamentfrigjøringen skjer generelt ved oppløsning eller bioerosjon av polymeren, osmose eller kombinasjoner av disse. Flere tilførselssystemer av støttemiddeltipe kan anvendes. Slike systemer omfatter hydrofile, myke kontaktlinser som er impregnert eller bløtet med den ønskede forbindelse ifølge oppfinnelsen, så vel som biologisk nedbrytbare eller løselige innretninger som ikke må fjernes etter plassering i øyet. Disse løselige okulære innleggene kan være oppbygd av hvilken som helst nedbrytbar forbindelse som kan tolereres av øyet om som er forenlig med forbindelsen ifølge oppfinnelsen som skal tilføres. Slike forbindelser omfatter, men er ikke begrenset til, poly(vinylalkohol), polymerer og kopolymerer av polyakrylamid, etylakrylat og vinylpyrrolidon, så vel som kryssbundne polypeptider eller polysakkarider, for eksempel kitin.

[0085] Doseringsformer for de andre typene av topisk tilførsel (dvs. ikke til øyet) eller for transdermal tilførsel av forbindelser ifølge oppfinnelsen omfatter pulvere, sprayer, salver, grøter, kremer, lotioner, geler, løsninger, plastre, dråper og inhalasjonsmidler.

Den aktive bestanddelen kan under sterile betingelser sammenblandes med et farmasøytisk akseptabelt bærestoff og eventuelle buffere, eller med nødvendige drivgasser. Slavene, grøtene, kremene og gelene kan i tillegg til den aktive bestanddel inneholde eksipienser, for eksempel dyrefett og vegetabilsk fett, oljer, vokser, parafiner, stivelse, tragant, cellulosederivater, polyetylenglykoler, silikoner, bentonitter, kiselsyre, talkum og sinkoksid, eller blandinger av disse. Pulvere og sprayer kan i tillegg til den aktive bestanddel inneholde eksipienser som laktose, talkum, kiselsyre, aluminiumhydroksid, kalsiumsilikater og polyamidpulver eller blandinger av disse forbindelsene. Sprayer kan i tillegg inneholde alminnelige drivgasser, som klorfluorhydrokarboner og flyktige, usubstituerte hydrokarboner, for

eksempel butan og propan. Transdermale plastre har den ekstra fordel at de gir en kontrollert tilførsel av forbindelsen ifølge oppfinnelsen til kroppen. Slike doseringsformer kan fremstilles ved å løse, dispergere eller på annet vis innføre en eller flere forbindelser ifølge oppfinnelsen i et egnet medium, for eksempel et elastisk polymerisasjonsprodukt. Absorpsjonsfremmende midler kan også anvendes for å øke flyten av forbindelsen gjennom huden. Hastigheten av denne flyten kan kontrolleres ved enten å benytte en hastighetskontrollerende membran eller ved å dispergere forbindelsen i et polymert støttemiddel eller en gel. Et fast bærestoff impregnerert med medikament (f.eks. en bandasje) kan også anvendes for topisk tilførsel.

[0086] Farmasøytiske utforminger omfatter utforminger som er egnede for tilførsel ved inhalering eller insufflasjon eller for nasal tilførsel. For tilførsel til de øvre (nasale) eller nedre luftveier ved inhalering leveres forbindelsene ifølge oppfinnelsen fortrinnsvis fra et pusteapparat, en nebulisator eller en trykkbeholder, eller hvilket som helst annet middel som er egnet for tilførsel av en aerosolspray. Trykkbeholdere kan omfatte en egnet drivgass, for eksempel diklordifluormetan, triklorfluormetan, diklortetrafluoretan, karbondioksid eller en annen egnet gass. Når det gjelder en aerosol under trykk kan doseringsenheten fastsettes ved at det foreligger en ventil som leverer en utmålt mengde.

[0087] For tilførsel ved inhalering eller insufflasjon kan sammensetningen alternativt være utformet til et tørt pulver, for eksempel en pulverblanding av en eller flere forbindelser ifølge oppfinnelsen og en egnet pulverbasis, for eksempel laktose eller stivelse. Pulverblandingen kan foreligge i enhetsdoseform i for eksempel kapsler eller patroner, eller f.eks. gelatinbobler eller bobleplast som pulveret kan tilføres fra ved hjelp av en inhalator, et pusteapparat eller en inhalator for utmålte doser.

[0088] For intranasal tilførsel kan forbindelser ifølge oppfinnelsen tilføres ved hjelp av nesedråper eller en flytende spray, for eksempel ved hjelp av en sprayflaske av plast eller en inhalator for utmålte doser. Flytende sprayer tilføres enkelt fra trykkbeholdere. Typiske forstøvere er Mistometer (Wintrop) og Medihaler (Riker).

[0089] Nesedråper kan utformes med en vandig eller ikke-vandig basis som også omfatter et eller flere dispergeringsmidler, løsningshjelpemidler eller suspenderingsmidler. Dråper kan tilføres ved hjelp av en enkel flaske med øyedrypper i korken eller ved hjelp av en plastflaske som er tilpasset dråpevis levering av flytende innhold ved hjelp av en spesialutformet åpning.

[0090] Farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen som er egnede for parenteral tilførsel omfatter en eller flere forbindelser ifølge oppfinnelsen i kombinasjon med en eller flere farmasøytisk akseptable, sterile, isotone vandige eller ikke-vandige løsninger, dispersjoner, suspensjoner eller emulsjoner, eller sterile pulvere som kan rekonstitueres til sterile, injiserbare løsninger eller dispersjoner like før bruk, som kan inneholde antioksidanter, buffere, oppløste stoffer som gjør utformingen isoton

med blodet til den påtenkte mottaker, eller suspenderings- eller tykningsmidler. Videre kan stent belagt med medikament anvendes.

[0091] Eksempler på egnede vandige og ikke-vandige bærestoffer som kan benyttes i de farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen omfatter vann, etanol, polyoler (for eksempel glyserol, propylenglykol, polyetylenglykol og lignende) og egnede blandinger av disse, vegetabilske oljer, for eksempel olivenolje, og injiserbare organiske estere, for eksempel etyloleat. Riktig fluiditet kan opprettholdes ved for eksempel anvendelse av belegg, for eksempel lecitin, ved å opprettholde den nødvendige partikkelstørrelse når det gjelder dispersjoner og ved bruk av surfaktanter.

[0092] Disse sammensetningene kan også inneholde adjuvanter som fuktemidler, emulgeringsmidler og dispergeringsmidler. Det kan også være ønskelig å innbefatte isotonisitetsmidler, for eksempel sukkere, natriumklorid og lignende, i sammensetningene. I tillegg kan forlenget absorpsjon av den injiserbare farmasøytiske formen oppnås ved å innbefatte midler som forsinker absorpsjonen, for eksempel aluminium-monostearat og gelatin.

[0093] I noen tilfeller er det for å forlenge virkningen av et medikament ønskelig å redusere absorpsjonen av medikamentet fra en subkutan eller intramuskulær injeksjon. Dette kan oppnås ved anvendelse av en flytende suspensjon av krystallinsk eller amorf materiale med lav løselighet i vann. Hastigheten som medikamentet absorberes med vil da avhenge av oppløsningshastigheten, som i sin tur kan avhenge av krystallstørrelsen og krystallformen. Alternativt kan forsinket absorpsjon av et parenteralt tilført medikament oppnås ved å løse eller suspendere medikamentet i en oljebasert bærer.

[0094] Injiserbare depotformer fremstilles ved å danne mikroinnkapslende støttemidler av medikamentet i biologisk nedbrytbare polymerer, for eksempel polylaktid-polyglykolid. Avhengig av forholdet mellom medikament og polymer og egenskapene til den benyttede polymer kan medikamentets frigjøringshastighet kontrolleres.

Eksempler på andre biologisk nedbrytbare polymerer omfatter poly(ortoestere) og poly(anhydrider). Injiserbare depot-utforminger kan også fremstilles ved å innfange medikamentet i liposomer eller mikroemulsjoner som er forenlige med kroppens vev.

De injiserbare materialene kan for eksempel steriliseres ved filtrering gjennom et filter som holder bakterier tilbake.

[0095] Utformingene kan foreligge i lukkede beholdere for enkeltdoser eller flere doser, for eksempel ampuller eller medisinflasker, og kan lagres i frysetørret tilstand, som kun krever tilsetning av det flytende, sterile bærestoff, for eksempel vann for injeksjon, umiddelbart før bruk. Improviserte injeksjonsløsninger og –suspensjoner kan fremstilles fra sterile pulvere, partikler og tabletter av de typer som er beskrevet ovenfor.

[0096] En danazol-forbindelse kan tilføres alene for behandling av en sykdom eller tilstand som omfatter vaskulær hyperpermeabilitet eller dysfunksjon av cytoskjelettet.

Alternativt kan danazol-forbindelsen gis i kombinasjon med en eller flere behandlingsformer eller et eller flere andre medikamenter som er egnede for behandling av sykdommen eller tilstanden. For eksempel kan danazol-forbindelsen tilføres før, sammen med (deriblant samtidig med) eller etter den andre behandlingen eller det andre medikamentet. Når det gjelder et annet medikament kan medikamentet og danazol-forbindelsen tilføres i separate farmasøytiske sammensetninger eller som deler av den samme farmasøytiske sammensetningen. Egnede medikamenter beskrives i U.S. Patentsøknad nr. 12/820325, hvis innhold inkorporeres heri ved referanse i sin helhet.

[0097] Som anvendt heri betyr "en" eller "et" en eller flere.

[0098] Andre formål, fordeler og nye egenskaper ved den foreliggende oppfinnelse vil bli åpenbare for fagpersonen ved betraktning av de påfølgende, ikkebegrensede eksemplene.

EKSEMPLER

Eksempel 1: virkningene av danazol på angiogenese (sammenlignende)

A. Proliferasjon av HUVEC-celler

Fremgangsmåte:

[0099] Primære humane endotelceller fra navlesnor (HUVEC) og EGM-2-dyrkningsmedium ble erholdt fra Cambrex (Walkersville, MD). Cellene ble dyrket i medium tilsatt 2 & føtalt kalveserum (FCS) i vevsdyrkningsflasker ved 37 °C og 5 % CO₂. Subkulturer ble satt opp ved anvendelse av trypsin når cellene var 60-80 % konfluente, som angitt av leverandøren.

[0100] Nedfrosne ampuller med HUVEC fra passasje 2 ble opptint og utsådd i 96-brønners vevsdyrkningsplater ved en tetthet på 5000 celler/cm². En 50 mM lagerløsning av danazol ble fremstilt i etanol, og FCS i mediet ble økt til 5 % for å holde danazol i løsning. Cellene ble behandlet med medium som inneholdt en sluttkonsentrasjon av danazol i området fra 0,1 til 100 µM i triplikat. Cellene ble inkubert i 24, 48 og 72 timer, og celleproliferasjonen ble målt ved anvendelse av Celltiter 96 AQueous One solution Cell Proliferation Assay fra Promega (Madison, WI).

Kort beskrevet ble mediet sugd ut av brønnene og cellene vasket med 200 µl /brønn Hepes-bufret saltvann (HBSS) fra Cambrex oppvarmet til 37 °C. 100 µl fortynnet celltiter-løsning (15 µl lagerløsning + 85 µl EGM-2 tilsatt 0,1 % FCS) ble tilsatt til hver brønn og inkubert i ytterligere 4 timer. Den optiske tettheten ble bestemt i en plateleser ved anvendelse av et 530 nm filter etter subtraksjon av nullprøve og resultatene gitt som OD ± standardavvik. Sluttkonsentrasjonen av etanol i brønnene var lavere enn 0,2 % og hadde ingen virkning på celleproliferasjon eller levedyktighet.

[0101] Alle resultater presenteres som representative eksperimenter utført i triplikat. Forskjellene mellom undergruppene ble analysert ved anvendelse av Students t-test i Microsoft Excel. P < 0,05 ble ansett som statistisk signifikant.

Resultater, observasjoner og diskusjon:

[0102] Dyrking av primære HUVEC i nærvær av danazol reduserte den OD som erholdes fra Promega celltiter-proliferasjonsanalysen på en tids- og dose-avhengig måte (Figur 1). Celltiter-analysen bygger på reduksjon av analyseløsningen via dehydrogenaseenzymer til et formazan-fargestoff som direkte korrelerer med celletallet.

[0103] Danazol-behandlingen ser ved 24 timer ut til kun å være effektiv i svært høye doser. En signifikant reduksjon ($p\text{-verdi} < 0,05$) av den analyserte OD ble observert ved konsentrasjoner av danazol på 10 μM eller høyere. OD påvist i null-brønnene var $0,414 \pm 0,06$, og behandling med 10 μM danazol reduserte OD til $0,288 \pm 0,037$ mens 100 μM ga en reduksjon til $0,162 \pm 0,017$, noe som tilsvarer 30 % henholdsvis 65 % inhibering.

[0104] Ved 48 timer var den observerte inhibering signifikant selv ved et nivå på 1 μM . Null-avlesningen erholdt etter 48 timer i kultur økte til $0,629 \pm 0,095$ og ble redusert til $0,378 \pm 0,037$ ved 1 μM , $0,241 \pm 0,012$ ved 10 μM og $0,19 \pm 0,033$ ved 100 μM (eller 40%, 61 % henholdsvis 70 % inhibering).

[0105] Etter 72 timer ga alle de analyserte danazol-behandlingene en signifikant reduksjon av proliferasjonen av HUVEC. OD erholdt i null-brønnene var $1,113 \pm 0,054$, som etter behandling med 0,1 μM falt til $0,798 \pm 0,037$, med 1 μM til $0,484 \pm 0,022$, med 10 μM til $0,229 \pm 0,016$ og 100 μM til $0,156 \pm 0,018$ (28 %, 57 %, 80 % henholdsvis 86 % inhibering).

[0106] En undersøkelse av OD erholdt fra alle 100 μM danazol-doser var i samsvar ved alle tidspunkter, noe som indikerer en fullstendig stans av celleproliferasjonen ved denne konsentrasjonen.

[0107] I oppsummering viste danazol en kraftig inhibering av proliferasjonen av endotelceller.

B. HUVEC-rørdannelse

[0108] For å undersøke dannelsen av kapillarlignende strukturer av HUVEC ble angiogenesesystemet: Endothelial Cell Tube Formation Assay erholdt fra BD Biosciences (San Jose, CA) og anvendt ifølge produsentens fremgangsmåte. Kort beskrevet ble 100000 HUVEC utsådd på rehydrerte matrigel-plugger i 96-brønners vevsdyrkningsplater i nærvær av 5 % FCS for induksjon av rørdannelse. Danazol ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 1 μM , 10 μM eller 50 μM , og LY294002 (positiv kontroll) ble tilsatt i en konsentrasjon på 50 μM . Etter 18 timer ble brønnene fotografert ved anvendelse av et Kodak DCS Pro SLR/N digitalkamera (Rochester, NY) montert på et invertert mikroskop. Etanolbehandlede brønner inngikk for å fastslå hvorvidt bærestoffet hadde noen virkning på celledifferensieringen.

Resultater, observasjoner og diskusjon:

[0109] For å avsløre hvorvidt danazol kan forhindre dannelsen av rør lignende strukturer av HUVEC ble 96-brønners plater som inneholdt matrigel-plugger anvendt. Endotelceller vil når de dyrkes i nærvær av angiogene forbindelser og tilført et støttemiddel for ekstracellulær matriks differensiere til strukturer som har en viss likhet med kapillarkar. HUVEC dyrket med danazol viste færre organiserte strukturer med tynne og mindre definerte sammenkoblinger enn kontrollene (se Figur 2, hvor A = kontroll, B = 1 μ M danazol, C = 10 μ M danazol, D = 50 μ M danazol og E = 50 μ M LY294002). Behandling med 50 μ M danazol førte til isolerte kolonier av HUVEC lokalisert i pluggen, med svært få, tynne sammenkoblinger eller karlumen-rom. Virkningen av danazol lignet svært mye på virkningen av den positive kontrollforbindelsen LY294002. For å sikre at det anvendte bærestoff ikke hadde noen virkning ble brønner behandlet med etanol i konsentrasjoner som tilsvarer den høyeste anvendte dosen av danazol, og ingen virkning på rørdannelsen ble observert (resultater ikke vist). Disse resultatene viser at danazol er en effektiv inhibitor av rørdannelsen ved en konsentrasjon på 50 μ M. Danazol hadde ingen virkning på rørdannelsen i en konsentrasjon på 1 μ M eller 10 μ M.

C. HUVEC-invasjon

Fremgangsmåte:

[0110] BioCoat Matrigel Invasion Chambers ble erholdt fra BD Biosciences (San Jose, CA). Innleggene ble rehydrert med 500 μ l HBSS i 2 timer før anvendelse i en fuktgjort inkubator. Trypsinbehandlede HUVEC ble vasket to ganger med varm EGM-2-tilsatt 0,1 % FCS og overført til det øvre kammeret i invasjoninnlegget med 100000 celler i et totalvolum på 250 μ l. Danazol og kontrollforbindelser ble tilsatt til det øvre reservoaret i sluttkonsentrasjoner på 10 μ M og 100 μ M. 750 μ l EGM-2-tilsatt 5 % FCS ble tilsatt til nedre kammer for å utløse invasjon, og platene ble inkubert i 24 timer. Ikke-invasive celler ble fjernet fra øvre kammer med fuktete bomullspinner, hvoretter innleggene ble vasket to ganger med HBSS. Innleggene ble så dyppet i 10 μ M kalsein AM fremstilt i HBSS og inkubert i 4 timer. Fluorescens ble målt i en mikrotiterplateleser ved eksitasjon ved 485 nm og emisjon ved 595 nm. LY294002 og den strukturelt lignende, men inaktive forbindelsen LY303511 fungerte som positiv henholdsvis negativ kontroll i dette eksperimentet.

Resultater:

[0111] Resultatene vises i Figur 3. Alle resultater presenteres som representativt eksperiment utført i triplikat. Forskjeller mellom undergrupper ble analysert ved anvendelse av Students t-test i Microsoft Excel. $P < 0,05$ ble ansett som statistisk signifikant.

[0112] Porøse, matrigel-belagte innlegg ble anvendt for å avgjøre hvorvidt danazol kan interferere med invasjon eller migrasjon av endotelceller (Figur 3). I systemet som ble anvendt i undersøkelsen ble en signifikant økning av celletallet påvist ved hjelp av et fluorescerende fargestoff etter tilsetning av FCS til kammeret som sto rett overfor endotelcellene ($5674 \text{ FU} \pm 77$ til 7243 ± 516). Danazol i en konsentrasjon på $10 \text{ } \mu\text{M}$ og $100 \text{ } \mu\text{M}$ hadde ingen virkning, mens LY294002 viste tilnærmet fullstendig svekking av celleinvasjonen (5814 ± 153). Disse resultatene viser at faktorer som foreligger i FCS induserer HUVEC til å danne proteaser som bryter ned ekstracellulær matriks, fulgt av migrasjon langs en kjemotaktisk gradient. Danazol hadde ingen åpenbar inhiberende virkning på invasjon og migrasjon av HUVEC i denne modellen.

D. Migrasjon av HUVEC

Fremgangsmåte:

[0113] Analyser ble utført for å bestemme virkningen av danazol på migrasjon av HUVEC i en "skrape"-migrasjonsanalyse. HUVEC fra passasje 8, parti nummer 8750 (erholdt fra Lonza) ble utsådd i 6-brønners plater (ICS BioExpress) i endotelvekst-medium 2 (EGM-2) komplett medium (erholdt fra Lonza). Platene ble dyrket i en 37°C inkubator med $5\% \text{ CO}_2$ i 48-72 timer for å oppnå sammenhengende éncellelag. Éncellelagene ble så "oppskrapet" med en $1000 \text{ } \mu\text{l}$ pipettespiss og vasket to ganger med varmt EGM-2-medium. Det siste vaskemediet ble sugd av og erstattet med friskt EGM-2-medium eller friskt EGM-2-medium tilsatt en rekke konsentrasjoner av danazol-konsentrasjoner (Sigma, nr. D8399). Det ble tatt fotografier av de ødelagte éncellelagene, og platene ble inkubert i en 37°C inkubator med $5\% \text{ CO}_2$ i ytterligere 24 timer. Brønnene ble fotografert på ny. Gapene ble målt i hvert fotografi ved anvendelse av Adobe Photoshop programvare, og gap-målingene gis som antall piksler i gapet.

Resultater:

[0114] Resultatene fra tre separate eksperimenter gis i Tabell 1 nedenfor. Som Tabell 1 viser ble danazol i konsentrasjoner på $50 \text{ } \mu\text{M}$, $75 \text{ } \mu\text{M}$ og $100 \text{ } \mu\text{M}$ funnet å signifikant inhibere HUVEC-migrasjon i denne analysen. EGM-2-dyrkningsmediet som ble anvendt i denne analysen inneholder en blanding av vekstfaktorer, sammenlignet med FCS anvendt i Matrigel-modellen som er beskrevet i seksjon C ovenfor. Forskjellen når det gjelder vekstfaktorer kan være grunnen til de forskjellige resultatene som erholdes ved anvendelse av de to modellene.

TABELL 1

Forbindelse(r)	Danazol-konsentrasjon	Gjennomsnittlig antall piksler	Gjennomsnittlig % inhibering	STD	SEM
Fortynningskontroll (etanol)		1264,00			
Danazol	10 µM	1004,00	21,14	14,87	8,59
Danazol	25 µM	1184,00	5,50	8,80	5,08
Danazol	50 µM	895,33	27,64	17,63	10,18
Danazol	75 µM	317,33	74,62	6,80	3,93
Danazol	100 µM	178,67	85,90	0,92	0,53

Eksempel 2: Virkning av danazol på vaskulær permeabilitet av HUVEC-éncellelag

5 Fremgangsmåte:

- [0115]** Analyser ble utført for å bestemme virkningen av danazol på permeabiliteten av HUVEC-éncellelag. HUVEC fra passasje 5-10, parti nummer 7016 (erholdt fra Lonza) ble utsådd på innlegg med 1 mikrometer porestørrelse plassert i brønnene i en 24-brønners plate (Greiner BioOne 24-brønners Thincert celledyrkningsinnlegg, nr. 662610, eller ISC BioExpress, nr. T-3300-15) ved anvendelse av endotelvekstmedium 2 (EGM-2) (erholdt fra Lonza). Platene ble dyrket i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂ i 48-72 timer for å oppnå sammenhengende og tette éncellelag. Mediet ble så fjernet og erstattet med friskt medium eller friskt medium tilsatt en rekke forskjellige danazol-konsentrasjoner (Sigma, nr. D8399). Tumornekrosefaktor α (TNFα, Pierce
- 15 Biotechnology, nr. RTNFAI) og interleukin 1β (IL-1, Sigma, nr. I-9401) ble tilsatt til passende brønner i en sluttkonsentrasjon på 10 ng/ml av hver. TNFα og IL-1β induserer permeabilitet og kan gi en opp til ti gangers økning av permeabiliteten. Endelig ble streptavidin konjugert til pepperrot-peroksidase (HRP - horseradish peroxidase) (PierceBiotechnology, nr. N100, 1,25 mg/ml) tilsatt til hver brønn i en
- 20 sluttfortynning på 1:250. HRP er et stort molekyl med en molekylvekt på tilnærmet 44000. Sluttvolumet var 300 µl i de øvre kamrene og 700 µl i de nedre kamrene i hver brønn. Platene ble inkubert i ytterligere 24 timer i 37 °C-inkubatoren med 5 % CO₂. Etter denne inkubasjonen ble innleggene fjernet og kastet. Visuell undersøkelse av cellene på innleggene viste at alle éncellelag fortsatt var intakte.
- 25 **[0116]** For evaluering av gjennomstrømning av HRP ble 15 µl av de resulterende løsningene i de nedre kamrene overført til 96-brønners ELISA-plater (hver reaksjon utført i triplikat). Så ble 100 µl tetrametylbenzidin (TMB)-løsning (Pierce) tilsatt til hver brønn og fargen fremkalt i 5 minutter ved romtemperatur. Fargeutviklingen ble stanset ved tilsetning av 100 µl 0,18 N sur løsning. OD ble bestemt for hver brønn ved
- 30 anvendelse av en mikroplateleser innstilt til 450 nm minus 530 nm. Prosent inhibering

av permeabiliteten ble beregnet og sammenlignet med kontrollene, og middelverdiene for tre separate eksperimenter vises i Tabell 2.

[0117] Som Tabell 2 viser ga danazol i en konsentrasjon på 25,0 μM eller høyere faktisk høyere permeabilitet. En konsentrasjon på 10,0 μM hadde liten eller ingen
 5 virkning på den vaskulære permeabilitet. Danazol i en konsentrasjon på 0,1 til 5,0 μM , hvor 0,1 til 0,5 μM var optimalt, reduserte den vaskulære permeabilitet. Dose-responskurven er svært interessant, siden det er en andre topp med inhibering ved konsentrasjoner fra 0,001 μM (eller kanskje enda lavere) til 0,005 μM . Følgelig viser danazol en svært overraskende og uventet dose-respons-kurve for vaskulær permeabilitet.

[0118] Som eksempel 1 viser ville det være nødvendig med en konsentrasjon fra 50 μM til 100 μM for å oppnå inhibering av HUVEC-proliferasjon, -migrasjon og -
 10 rørdannelse etter 18-24 timers inkubering med danazol. Som dette eksempel 2 viser ville disse optimale konsentrasjonene for inhibering av angiogenese gi en dramatisk økning av den vaskulære permeabilitet etter 24 timer (se Tabell 2). Omvendt har
 15 optimale konsentrasjoner for anvendelse for inhibering av vaskulær permeabilitet (0,1 μM til 0,5 μM) ikke signifikante virkninger på angiogenesen etter 24 timer.

TABELL 2

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

Eksempel 3: Virkning av danazol på vaskulær permeabilitet

[0119] Humane retinale endotelceller fra passasje 9 (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA) ble dyrket i EGM-2-medium (Lonza, Walkersville, MD) til 80 % konfluens ble oppnådd. Cellene ble så frigjort fra dyrkningsflasken ved anvendelse av trypsin-EDTA, og cellene i den resulterende suspensjonen ble telt for å bestemme både levedyktighet og celletall. Cellesuspensjonens levedyktighet var høyere enn 90 % i dette eksperimentet.

[0120] Cellene ble så utsådd på innlegg (1 mikrometer porestørrelse) plassert i brønnene i en 24-brønners plate (Greiner BioOne 24-brønners Thincert celledyrkningsinnlegg, nr. 662610) i 300 µl EGM-2 komplett medium (erholdt fra Lonza). Så ble 700 µl EGM-2-plassert i nedre kammer, og platene ble dyrket i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂ i 48 timer for å oppnå sammenhengende éncellelag. Målinger av den transendoteliale elektriske resistens (TER) ble utført ved anvendelse av en STX 100-elektrode festet til EVOM² voltohmmeter (begge fra World Precision Instruments) for alle innlegg for å bekrefte at det var etablert en semipermeable barriere. For utførelse av målingene ble en probe plassert i hver brønn, med en elektrode i øvre kammer og en elektrode i nedre kammer.

[0121] Cellene ble så behandlet i duplikat som følger: EGM-2-medium ble forsiktig dekantert fra innleggene og erstattet med IMDM-medium tilsatt 0,5 % føtalt bovint serum og EGM-2-tilsetninger, bortsett fra VEGF og hydrokortison (alle fra Lonza). I noen brønner inneholdt IMDM-mediet danazol (Sigma, nr. D8399) i ti gangers seriefortynning. Platene ble inkubert i en 37 °C inkubator ved 5 % CO₂ i fire timer før 30 µl av en løsning som inneholdt 4 % fluorescensmerket humant serumalbumin ble tilsatt til øvre kammer i hver brønn. Platene ble inkubert i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂ i ytterligere 18 timer.

[0122] Etter denne inkubasjonen ble innleggene fjernet og kastet, og 200 µl av mediet fra nedre kammer ble overført til 96-brønners sorte fluor-plater (Falcon) i triplikat. Fluorescensen i hver brønn ble så målt ved en eksitasjonsbølgelengde på 340 nm og en emisjonsbølgelengde på 470 nm. Gjennomsnittlige fluorescensenheter (FU) ble så beregnet for hvert innlegg og middelveiden beregnet for avlesninger i duplikat. Resultatene vises i Tabell 3.

TABELL 3

Danazol-konsentrasjon	Gjennomsnittlig FU	STD
Intet	767,13	8,38
0,01 µM	688,50	14,94
0,1 µM	743,90	8,95
1,0 µM	783,39	14,59
10,0 µM	768,99	18,85

[0123] Man kan se at den laveste konsentrasjonen av danazol ga den sterkeste inhiberingen (tilnærmet 10 %). Kontrollbrønner uten celler ga mer enn 4000 FU i nedre kammer, noe som viser at éncellelagene av retinale endotelceller var selektivt permeable.

5

Eksempel 4: Virkning av danazol på TER i tre forskjellige éncellelag av endotelceller

[0124] Det ble utført analyser for å bestemme virkningen av danazol på den transendoteliale elektriske resistans (TER) av humane retinale endotelceller (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA). For dette ble 150000 humane retinale endotelceller fra passasje 14 utsådd på innlegg (1 mikrometer porestørrelse) plassert i brønnene i en 24-brønners plate ((Greiner BioOne 24-brønners Thincert celledyrkningsinnlegg, nr. 662610) i 300 µl EGM-2 komplett medium (erholdt fra Lonza). Platene ble så dyrket i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂ i 24 timer. Etter inkuberingen ble dyrkingsmediet forsiktig dekantert av og erstattet med enten friskt EGM-2-medium eller med friskt EGM-2-tilsatt danazol i en sluttkonsentrasjon på 1 µM. Platene ble plassert tilbake i inkubatoren og dyrket i ytterligere 144 timer. Analyser ble også utført på samme måte med humane endotelceller fra hjerne fra passasje 8 og humane endotelceller fra navlesnorvene fra passasje 8.

[0125] En innledende TER-måling ble gjort for hvert innlegg ved anvendelse av et EVOM2 voltohmmeter koblet til en STX100-elektrode (begge fra World Precision Instruments). Målinger ble også utført etter 24, 48, 72 og 144 timer. Resultatene vises i Tabellene 4, 5 og 6 nedenfor. Alle resultater er gitt som TER-måling/cm² av innskuddet minus TER av tomme innlegg.

25

TABELL 4

Humane retinale endotelceller					
Danazol-konsentrasjon	0 timer	24 timer	48 timer	72 timer	144 timer
Intet	32,3	96,0	144,4	148,0	219,7
1,0 µM	21,7	132,3	182,3	217,7	234,8

TABELL 5

Humane endotelceller fra hjerne					
Danazol-konsentrasjon	0 timer	24 timer	48 timer	72 timer	144 timer
Intet	41,4	115,7	176,3	154,0	151,5
1,0 µM	32,3	139,9	188,4	149,5	125,8

TABELL 6

Humane endotelceller fra navlesnorvene					
Danazol-konsentrasjon	0 timer	24 timer	48 timer	72 timer	144 timer
Intet	82,3	217,2	276,3	226,8	227,3
1,0 μ M	70,2	246,0	363,1	270,7	286,4

[0126] Man kan se at danazol ga høyere TER-målinger (reduerte permeabiliteten av ioner) i éncellelag av endotelceller fra netthinne og navlesnorvene. Danazol hadde ingen vesentlig virkning på TER for éncellelag av endotelceller fra hjerne, bortsett fra på det tidligste tidspunktet. TER er et mål på den elektriske resistans over éncellelag. Den er et mål på integriteten av barrieren og korrelerer med ionepermeabiliteten.

Eksempel 5: Virkning av danazol på Akt-fosforylering

[0127] Analyser ble utført for å bestemme virkningen av danazol på fosforylering av Akt i humane retinale endotelceller (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA). Cellene ble dyrket i en 25 cm² flaske til nær konfluens i EGM-2-medium (Lonza, Walkersville, MD) tilsatt 2 % føtalt kalveserum (Lonza). Cellene ble så løsnet fra dyrkningsflasken ved anvendelse av trypsin/EDTA. Cellene i den resulterende suspensjonen ble telt og sådd ut i en 96-brønners plate med 1 x 10⁴ celler/brønn i EGM-2-medium. Platen ble inkubert ved 37 °C med 5 % CO₂ i 24 timer. Så ble 200 μ l av enten EGM-2-medium (kontroll) eller forskjellige konsentrasjoner av danazol tilsatt, og platene ble inkubert i ytterligere 2 timer. Etter denne inkuberingen ble cellene umiddelbart fiksert med 4 % formaldehyd og plassert i kjøleskap, og graden av fosforylering av Akt bestemt ved anvendelse av Akt Cellular Activation of Signalling ELISA Kit ("CASE" Kit for AKT S473, SABiosciences, Frederick, MD) ifølge produsentens fremgangsmåter. "CASE" Kit for AKT S473 kvantifiserer mengden av aktivert (fosforylert) Akt-protein relativt til totalt Akt-protein i parallelle analyser ved anvendelse av et konvensjonelt ELISA-format med kolorimetrisk deteksjon. Akt-fosforyleringssetet er serin 473 og gjenkjennes av et av antistoffene som anvendes i den ene av de to parallelle analysene for å gi et mål på aktivert Akt-protein. Det andre antistoffet, som anvendes i den andre parallelle analysen, gjenkjenner Akt og gir et mål på totalt Akt-protein. De to primærantistoffene påvises ved anvendelse av et sekundært antistoff merket med pepperrot-peroksidase. Tilsetning av produsentens Developing Solution i 10 minutter, fulgt av tilsetning av produsentens Stop Solution, gir resultatet, som kan måles kolorimetrisk.

[0128] Resultatene vises i Tabell 7 nedenfor. Som tabellen viser ga alle konsentrasjoner av danazol en økt Akt-fosforylering (aktivering).

TABELL 7

BEHANDLING	PROSENT ØKNING AV AKT-FOSFORYLERING SAMMENLIGNET MED KONTROLL	STANDARDVARIASJON
0,5 μ M danazol	73,8 %	92,9 %
1,0 μ M danazol	66,7 %	11,7 %
2,0 μ M danazol	101,6 %	9,1 %
5,0 μ M danazol	40,5 %	17,7 %
10,0 μ M danazol	115,3 %	112,9 %
20,0 μ M danazol	161,3 %	128,7 %
50,0 μ M danazol	98,6 %	61,2 %

[0129] Det antas at disse resultatene gir en mulig forklaring på dose-respons-kurven for vaskulær permeabilitet erholdt i Eksempel 2. Som Eksempel 2 viser reduserte lave doser av danazol permeabiliteten mens høye doser ga høyere permeabilitet. Det antas at et visst fosforyleringsnivå av Akt i S473 reduserer permeabiliteten (konsentrasjonene 0,5-5,0 μ M i dette eksperimentet), mens hyperfosforylering av Akt i S473 fører til forhøyet permeabilitet (konsentrasjonene 10-50 μ M i dette eksperimentet).

Eksempel 6: Virkning av danazol og steroidreseptorantagonister på TER i éncellelag av retinale endotelceller

[0130] Analyser ble utført for å bestemme virkningen av danazol og steroidreseptorantagonister på transendotelial elektrisk resistans (TER) i humane retinale endotelceller (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA). For dette ble Greiner innlegg i vevsdyrkningsbrønner (Greiner BioOne 24-brønners Thincert celledyrkningsinnlegg, nr. 662610) belagt med 5 μ g/cm² fibronektin (Sigma). Så ble humane retinale endotelceller fra passasje 12 utsådd i øvre kammer i brønnene med 120000 celler/innlegg i et volum på 300 μ l av EGM-2-medium (Lonza). Volumet for nedre kammer var 700 μ l EGM-2-medium (Lonza) Platene ble så dyrket i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂ i 48 timer for etablering av intakte éncellelag. Etter inkuberingen ble TER-målinger utført ved anvendelse av en STX100-elektrode koblet til et EVOM² voltohmmeter (begge fra World Precision Instruments) for alle innlegg, for å bekrefte endotelbarrierens integritet. Alle innlegg viste høyere resistans enn innlegg uten celler.

[0131] Så ble dyrkningsmediet forsiktig dekantert av og erstattet med friskt EGM-2 med eller uten forskjellige tilsetninger. Tilsetningsstoffene var danazol, hydroksyflutamid (androgenreseptorantagonist), fluvestrant (østrogenreseptorantagonist) og PI3-kinaseinhibitor LY 294002 (kontroll). Lagerløsninger av alle tilsetningsstoffer bortsett fra danazol ble fremstilt som 10 mM løsninger i DMSO. Lagerløsningen av danazol var

10 mM i etanol. 200 µM arbeidsløsninger av alle tilsetningsstoffer ble tilsatt til brønnene i de kombinasjoner og sluttkonsentrasjoner som er vist i tabellen nedenfor. Platene ble så igjen plassert i inkubatoren, og TER-målinger ble utført som beskrevet ovenfor for hvert innlegg etter 30 minutter, 60 minutter, 120 minutter og 24 timer. TER ble beregnet ved å subtrahere bakgrunnsmålingen (tomt innlegg) fra avlesningen for et innlegg og dividere med innleggets overflateareal (0,33 cm²). Resultatene gis i Tabell 8 nedenfor.

TABELL 8

Behandling	TER etter 30 minutter	TER etter 60 minutter	TER etter 120 minutter	TER etter 24 timer
Ingen	216,22	249,25	234,23	312,31
0,1 µM danazol	255,26	267,27	249,35	366,37
0,1 µM hydroksyflutamid	177,18	186,19	201,20	297,30
0,1 µM fluvestrant	228,23	270,27	258,26	336,34
0,1 µM hydroksyflutamid fulgt av 0,1 µM danazol	237,24	276,28	240,24	363,36
0,1 µM fluvestrant fulgt av 0,1 µM danazol	195,20	309,31	255,26	393,39
10,0 µM LY294002	297,30	354,35	276,28	345,35
10,0 µM LY294002 fulgt av 0,1 µM danazol	243,24	342,34	270,27	336,34

[0132] Som Tabell 8 viser ga danazol og fluvestrant forhøyede TER-målinger (reduisert permeabilitet), mens hydroksyflutamid ga lavere avlesninger (økt permeabilitet) sammenlignet med kontrollene (ingen behandling). Danazol forhindret reduksjonen som hydroksyflutamid ga. Dette kan tyde på at danazol bindes til androgenreseptoren i disse cellene. Danazol og fluvestrant viste additive reaksjoner ved noen tidspunkter.

Eksempel 7: Virkningen av danazol på dannelse av aktin-stressfibre

[0133] IEJ i den paracellulære transportveien omfatter AJ og TJ. Aktin-cytoskjelettet er bundet til hver forbindelse og kontrollerer forbindelsens integritet ved remodelisering av aktin. Reorganisering av aktin-filamentene til stressfibre fører til at celle-celleforbindelsene utsettes for mekaniske krefter som trekker dem fra hverandre og som fører til kontraksjon av cellen og endret morfologi. Aktin-polymeriseringsprosessen er svært dynamisk, noe som tillater hurtig reorganisering av aktin-strukturer og overgang fra den hvilende fenotypen, som særpreges av en tykk, kortikal aktin-ring og fravær av stressfibre, til den aktiverte cellefenotypen, som har tynt eller intet kortikalt aktin og store mengder stressfibre. Aktin-cytoskjelettet ser også ut til å delta i transcytose, kanskje ved å regulere bevegelsen av kaveoler.

[0134] Humane retinale endotelceller (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA) ble utsådd i Falcon Optilux analyseplater (BD Biosciences) med 1000 celler pr. brønn i et totalvolum på 200 µl EGM-2-medium (Lonza). Platene ble dyrket i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂ i 48 timer. Så ble mediet fjernet og erstattet med 200 µl IMDM-medium tilsatt 0,1 % føtalt bovint serum (begge fra Lonza), og cellene ble dyrket under disse betingelsene med mangel på vekstfaktorer og serum i en time for å undertrykke aktin-polymeriseringen. Så ble danazol (0,1 µM eller 10 µM sluttkonsentrasjon) eller PI3-kinaseinhibitoren LY294002 (10 µM sluttkonsentrasjon) (positiv kontroll) tilsatt. Umiddelbart etter tilsetning av disse forbindelsene ble TNFα (sluttkonsentrasjon 50 ng/ml) tilsatt. Etter inkubering i 30 minutter i 3n 37 °C inkubator med 5 % CO₂ ble mediet sugd av og cellene fiksert med 3,6 % formaldehyd i fosfatbufret saltvann (PBS) i ti minutter ved romtemperatur. Alle brønner ble så vasket to ganger med 100 µl PBS. Cellene ble permeabilisert ved anvendelse av 0,1 % Triton X-100 i PBS i 5 minutter. Alle brønner ble så vasket to ganger med 100 µl PBS, og 50 µl av en 1:40 fortynning av rhodamin-falloidin (Invitrogen) i PBS ble tilsatt til cellene for farging av F-aktin og inkubert i 20 minutter ved romtemperatur. Alle brønner ble så vasket to ganger med 100 µl PBS. Så ble 100 µl PBS tilsatt til hver brønn, og cellene ble observert og fotografert ved anvendelse av et invertert mikroskop med rhodamin-filtre (eks530/em590).

[0135] Resultatene viste at danazol påvirket evnen til å danne stressfibre. Celler behandlet med danazol viste forskjellige fargingsmønstre avhengig av dosen. Ved den laveste danazol-konsentrasjonen (0,1 µM) ble det observert en diffus farging i hele cytoplasma som muligens viste en stabiliserende begivenhet eller en hvilende fenotype. Ved den høyeste danazol-dosen (10 µM) ble stressfibre med flere fokuspunkter observert. Disse funnene korrelerer med tidligere resultater (se eksemplene ovenfor) som viste at lavere danazol-doser inhiberer permeabiliteten mens høyere danazol-doser øker permeabiliteten. TNFα stimulerte cellene og førte til kraftig utvikling av stressfibre med fokuspunkter med intens farging. Danazol og LY294002 reduserte antall celler som viste utvikling av stressfibre med TNFα.

Eksempel 8: Virkning av danazol på dannelse av aktin-stressfibre

[0136] Humane retinale endotelceller (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA) ble utsådd i Falcon Optilux analyseplater (BD Biosciences) belagt med 1 µg/cm² fibronektin med 3000 celler pr. brønn i et totalvolum på 200 µl av EGM-2-medium (Lonza). Platene ble dyrket i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂ i 48 timer. Så ble mediet fjernet og erstattet med 200 µl Ultraculture-medium tilsatt 2,0 % føtalt bovint serum (begge fra Lonza), og cellene ble dyrket under disse betingelsene med mangel på vekstfaktorer og serum over natten for å undertrykke aktin-polymerisering. Så ble mediet fjernet og erstattet med friskt Ultraculture-medium med 2,0 %

føtalt bovint serum tilsatt danazol (0,1 μ M, 1 μ M eller 10 μ M) eller PI3-kinaseinhibitoren LY294002 (10 μ M) (positiv kontroll). Etter inkubering med disse forbindelsene i 30 minutter i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂ ble mediet sugd av og cellene fiksert ved anvendelse av 3,6 % formaldehyd i fosfatbufret saltvann (PBS) i 10 minutter ved romtemperatur. Alle brønner ble så vasket to ganger med 100 μ l PBS. Cellene ble permeabilisert ved anvendelse av 0,1 % Triton X-100 i PBS i 5 minutter. Alle brønner ble så vasket to ganger med 100 μ l PBS, og 50 μ l av en 1:40 fortynning av rhodamin-falloidin (Invitrogen) i PBS ble tilsatt til cellene for farging av F-aktin og inkubert med cellene i 20 minutter ved romtemperatur. Alle brønner ble så vasket to ganger med 100 μ l PBS. For kontrafarging av kjerner ble 100 μ l 3 μ M DAPI (4,6-damidino-2-fenyl-indol, dilaktat (Invitrogen)) tilsatt til hver brønn. Etter 5 minutter ble cellene vasket to ganger med 100 μ l PBS. Så ble 100 μ l PBS tilsatt til hver brønn, og cellene ble observert og fotografert ved anvendelse av et invertert mikroskop og rhodamin-filtre (ekw530/em590) og DAPI-filtre (eks3501em460).

[0137] Resultatene viste at danazol påvirket evnen til dannelsen av stressfibre. Celler behandlet med danazol viste forskjellige mønstre for dannelsen av stressfibre avhengig av den tilsatte dosen. Ved den laveste danazol-dosen (0,1 μ M) ble en diffus farging av F-aktin observert i hele cytoplasma. Ved 1,0 μ M danazol vedvarte den diffuse farging, med stressfibre og fokuspunkter rundt perimeteren av de fleste cellene var synlige. Ved den høyeste danazol-dosen (10,0 μ M) var det ikke lenger noen diffus farging, og utvikling av stressfibre og fokuspunkter kunne observeres. Fargingen observert med de laveste dosene av danazol viste et perinukleært fargingsmønster, noe som tyder på en tilsvarende stabilisering av mikrotubuli som observeres med paklitaksel (en taksol-forbindelse som vites å stabilisere og polymerisere mikrotubuli). Med VEGF var det en kraftig utvikling av stressfibre. Danazol endret VEGF-mønsteret på en doseavhengig måte: (i) den laveste danazol-dosen på 0,1 μ M gjorde stressfibrene mindre uttalte, og noe diffus farging forelå, (ii) dosen på 1,0 μ M viste færre tykke stressfibre, men fokuspunkter ble observert på kontaktoverflater, og (iii) den høyeste danazol-dosen på 10,0 μ M viste kraftig fiberdannelse med fokuspunkter. LY294002 forhindret den kraftige dannelsen av stressfibre som ble observert med VEGF og ga diffus farging.

Eksempel 9: Virkning av danazol på fosforylering av vaskulært endotel-kadherin (VE-kadherin)

[0138] Humane retinale endotelceller (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA) fra passasje 12 ble dyrket til konfluens på fibronektin-belagte (1 μ g/cm²) 10 cm² vevsdyrknings-skåler ved anvendelse av EGM-2-dyrkningsmedium (Lonza) i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂. Etter at fullstendig konfluens var oppnådd ble mediet erstattet med Ultraculture-medium tilsatt 0,5 % føtalt bovint serum og L-

glutamin (alle fra Lonza), og cellene ble dyrket under disse betingelsene med mangel p vekstfaktorer og serum i 24 timer. Så ble mediet fjernet og erstattet med friskt Ultraculture-medium med 0,5 % føtalt bovint serum og L-glutamin tilsatt danazol (0,1 µM, 1,0 µM eller 10,0 µM) eller etanol (bærestoff-kontroll). Etter inkubering i 15 minutter i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂ ble vaskulær endotelvekstfaktor (VEGF) (sluttkonsentrasjon 50 ng/ml) tilsatt, og skålene ble inkubert i ytterligere 15 minutter i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂.

[0139] Platene ble umiddelbart etter behandlet for lysering av cellene som følger: PBS og lyseringsbuffer (PBS tilsatt 1 % Triton X-100 tilsatt fosfataseinhibitorløsning 1 og 2 (Sigma), proteaseinhibitor (Sigma) og natriumortovanadat i en sluttkonsentrasjon på 2 mM) ble avkjølt til 4 °C. Cellene ble vasket to ganger med 5 ml av den iskalde PBS og så lysert i 500 µl iskald lyseringsbuffer. De resulterende proteinekstraktene ble overført til 1,7 ml mikrosentrifugerør, og cellerester ble fjernet ved sentrifugering ved 4 °C ved 10000 rpm i 10 minutter. Så ble 450 µl av den klarnede løsningen overført til rør som inneholdt 25 µl Protein Dynabeads (Invitrogen) belagt med 10 µl av det polyklonale anti-VE-kadherin-antistoff C 19 (Santa Cruz Biotechnology) (belegningen utført ifølge produsentens oppskrift). Ekstraktene og kulene ble så inkubert over natten ved 4 °C i en orbital rystemaskin for innfangning av VE-kadherin fra ekstraktene. Kulene ble så vasket fire ganger med iskald lyseringsbuffer. For frigjøring av proteinet fra kulene ble de oppvarmet i 10 minutter ved 75 °C i SDS-påsetningsløsning tilsatt 20 % reduserende fargestoff (Invitrogen).

[0140] De frigjorte proteinene ble separert i 4-20 % polyakrylamidgeler (Invitrogen) ved 120 volt i 1 time. For bestemmelse av fosforylering og totalprotein i gelene ble Pro-Q diamond (Invitrogen)- og SYPRO ruby (Invitrogen)-proteinfarging utført etter hverandre ifølge produsentens oppskrift. Gelene ble fotografert og densitometri utført ved anvendelse av en Kodak bildeanalysestasjon. Resultatene vises i Tabell 9 nedenfor.

TABELL 9

VE-kadherin				
	Null (etanol- kontroll)	0,1 µM danazol	VEGF	0,1 µM danazol fulgt av VEGF
Relativ intensitet - ProQ-resultater (fosforylert protein)	1,00	1,51	1,89	1,38
Relativ intensitet - SYPRO-resultater (totalprotein)	1,00	0,89	0,84	0,83
Forhold fosforylert protein: totalprotein	0,215	0,365 (1,70 gangers økning)	0,481 (2,24 gangers økning)	0,358 (1,66 gangers økning)

[0141] Som man kan se førte danazol til økt fosforylering av VE-kadherin. VEGF førte til en enda kraftigere økning av fosforyleringen av VE-kadherin (hyperfosforylering), som ble reversert av danazol. VE-kadherin er en bestanddel av AJ, og fosforylering av VE-kadherin kan ha en rekke forskjellige virkninger, avhengig av hvilken rest som fosforyleres. Generelt fører tyrosin-fosforylering av VE-kadherin til nedbygging av AJ og økt permeabilitet. Serin 665-fosforylering fører derimot til en hurtig, men reversibel internalisering av VE-kadherin, forbundet med redusert barrierefunksjon. En tilbakekoblingssløyfe ser ut til å foreligge, hvor internalisert VE-kadherin driver en økning av cytoplasmatisk p 120, et støtteprotein som danner komplekser med AJ. Denne oppreguleringen induserer en reduksjon av aktivt RhoA forbundet med en økning av barriere-stabiliserende GTPaser, som Rac1, Rap-1 og Cdc42. Det antas at økningen av fosforylering av VE-kadherin som ble observert i dette eksperimentet etter behandling med lave doser av danazol fører til aktivering av barriere-stabiliserende GTPaser. I tillegg kan danazol kanskje forhindre de destabiliserende fosforyleringene som induseres av VEGF.

Eksempel 10: Virkning av danazol og steroidreseptorantagonister på TER i éncellelag av retinale endotelceller

[0142] Analyser ble utført for å bestemme virkningen av danazol og steroidreseptorantagonister på transendotelial elektrisk resistans (TER) i humane retinale endotelceller (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA). For dette ble Greiner innlegg i vevsdyrkningsbrønner (Greiner BioOne 24-brønners Thincert celledyrkningsinnlegg, nr. 662610) belagt med 5 µg/cm² fibronektin (Sigma). Så ble humane retinale endotelceller fra passasje 13 utsådd i øvre kammer i brønnene med 120000 celler/innlegg i et volum på 300 µl av EGM-2-medium (Lonza). Volumet for nedre kammer var 700 µl EGM-2-medium (Lonza) Platene ble dyrket i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂ i 48 timer for etablering av intakte éncellelag. Etter inkuberingen ble TER-målinger utført ved anvendelse av en STX 2-probe koblet til et EVOM² voltohmmeter (begge fra World Precision Instrument) for alle innlegg for å bekrefte integriteten av endotelbarrieren. Alle innlegg viste forhøyet resistans, sammenlignet med innlegg uten celler.

[0143] Så ble dyrkningsmediet forsiktig dekantert av og erstattet med friskt EGM-2 med eller uten forskjellige tilsetninger. Tilsetningsstoffene var danazol, hydroksyflutamid (androgenreseptorantagonist), fluvestrant (østrogenreseptorantagonist), testosteron, østradiol og PI3-kinaseinhibitor LY 294002 (kontroll). Lagerløsninger av alle tilsetningsstoffer bortsett fra danazol ble fremstilt i en konsentrasjon på 10 mM i DMSO. Lagerløsningen av danazol var 10 mM i etanol. 200 µM arbeidsløsninger av alle tilsetningsstoffer ble fremstilt i de samme løsemidlene. Så ble 200 nM fortynninger av hvert tilsetningsstoff og tilsvarende fortynninger av DMSO og etanol (kontroller)

fremstilt i EGM-2-medium, og danazol, de andre tilsetningsstoffene eller medium (kontroll) ble tilsatt til brønnene i de kombinasjoner og sluttkonsentrasjoner som er vist i tabellen nedenfor. Platene ble så ført tilbake til inkubatoren, og TER-målinger ble utført som beskrevet ovenfor for hvert innlegg etter 5 minutter, 30 minutter, 60

5 minutter og 24 timer. TER ble beregnet ved å subtrahere bakgrunnsmålingen (tomme innlegg) fra avlesningen for et innlegg og dividere med innleggets overflateareal ($0,33 \text{ cm}^2$). Resultatene gis i Tabell 10 nedenfor.

[0144] Som Tabell 10 viser ga danazol en økning av TER-målingene, hydroksyflutamid reduserte målingene, testosteron ga en svært svak reduksjon av målingene og fluvestrant hadde i det vesentlige ingen virkning sammenlignet med kontrollen (ingen

10 behandling). Danazol forhindret reduksjonen som hydroksyflutamid førte til og den svært svake reduksjonen observert med testosteron. Som for resultatene i Eksempel 6 kan dette tyde på at danazol bindes til androgenreseptoren i disse cellene.

TABELL 10

Behandling	TER etter 5 minutter	TER etter 30 minutter	TER etter 60 minutter	TER etter 24 timer
Ingen	250,30	262,31	251,00	287,09
0,1 μM danazol	280,03	311,56	313,06	348,35
0,1 μM hydroksyflutamid	190,44	207,46	215,97	267,27
0,1 μM hydroksyflutamid fulgt av 0,1 μM danazol	230,48	275,53	262,01	312,31
0,1 μM fluvestrant	223,47	251,50	243,99	279,28
0,1 μM fluvestrant fulgt av 0,1 μM danazol	219,47	279,53	273,02	343,34
10 nM testosteron	257,51	240,49	225,98	267,27
100 nM testosteron fulgt av 0,1 μM danazol	273,52	287,54	259,01	283,28
10 nM østradiol	246,50	245,50	250,00	328,33
10 nM østradiol fulgt av 10 μM danazol	276,53	307,56	282,03	363,36

Eksempel 11: Virkning av danazol på dannelse av aktin-stressfibre

[0145] Humane mikrovaskulære endotelceller fra nyreglomeruli fra passasje 6 (ACBRI 128, Cell Systems Corporation (eneforhandler for Applied Cell Biology

20 Research Institute), Kirkland, WA) og humane retinale endotelceller fra passasje 12 (ACBRI 181, Cell Systems Corporation (eneforhandler for Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA) ble utsådd i objektglass med 16 kamre belagt med $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronektin med 2000 celler pr. brønn i et totalvolum på 200 μl av EGM-2-medium (Lonza). Platene ble dyrket i en 37°C inkubator med 5 % CO_2 i 48 timer med

25 daglig skifte av medium. Så ble analyseforbindelsene (danazol, $\text{TNF}\alpha$ og S1P) fortynnet i Hanks balanserte saltløsning (HBSS, Lonza) tilsatt til følgende slutt-

konsentrasjoner: danazol (1 μ M) (Sigma), TNF α (1 ng/ml) (Sigma) og S1P (1 μ M) (Sigma). Objektglassene ble inkubert med analyseforbindelsene i 15 minutter, 30 minutter eller 24 timer i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂. Etter denne inkuberingen ble mediet sugd av og cellene fiksert ved anvendelse av 3,6 % formaldehyd i fosfat-
 5 bufret saltvann (PBS) i ti minutter ved romtemperatur. Alle brønner ble så vasket to ganger med 100 μ l PBS. Cellene ble permeabilisert ved anvendelse av 0,1 % Triton X-100 i PBS i 10 minutter. Alle brønner ble så vasket to ganger med 100 μ l PBS, og 50 μ l av en 1:40 fortynning av rhodamin-falloidin i PBS ble tilsatt til brønnene for farging av F-aktin og inkubert på cellene i 20 minutter ved romtemperatur. Alle brønner ble så
 10 vasket to ganger med 100 μ l PBS. Så ble 100 μ l PBS tilsatt til hver brønn, og cellene ble observert og fotografert ved anvendelse av et invertert mikroskop og et rhodamin-filter (eks530/em590).

[0146] Resultatene viste at danazol påvirket evnen til dannelsen av stressfibre i de mikrovaskulære endotelcellene fra nyreglomeruli. Behandlet med danazol alene viste
 15 cellene perinukleær farging etter 15 minutter, diffus farging av hele cellen med foldede kanter etter 3 timer og farging tilsvarende som for de ubehandlede kontrollene etter 24 timer. Med TNF α alene ble stressfibre observert på alle tidspunkter, med et økende antall celler med stressfibre og økende tykkelse av fibre med tiden. Danazol reduserte dannelsen av stressfibre og/eller fibrenes tykkelse på alle tidspunkter. Diffus
 20 farging ble observert etter 15 minutter og 24 timer, og kortikale aktin-ringer var synlige etter 3 timer. Celler behandlet med S1P alene viste kortikale aktin-ringer, med begynnende utvikling etter 15 minutter og sterkest etter 3 timer. Cellene hadde vendt tilbake til en morfologi som lignet den til de ubehandlede kontrollene etter 24 timer. Danazol så ut til å forsterke de kortikale ringene etter 3 timer. Videre ble diffus farging
 25 observert, særlig etter 15 minutter og 24 timer.

[0147] For de retinale endotelcellene som ble behandlet med danazol alene viste cellene perinukleær farging etter 15 minutter, diffus farging i hele cellen med foldede kanter på mange celler etter 3 timer og farging som tilsvarte fargingen av ubehandlede
 30 kontroller etter 24 timer. Med TNF α alene ble stressfibre observert på alle tidspunkter, med et økende antall celler med stressfibre og økende tykkelse av fibre fra 15 minutter til 3 timer og redusert antall og tykkelse etter 24 timers inkubering. Danazol reduserte dannelsen av stressfibre og/eller fibrenes tykkelse på alle tidspunkter. Diffus farging ble observert etter 15 minutter og 24 timer, og kortikale aktin-ringer var synlige etter 3 timer. Celler behandlet med S1P alene viste kortikale aktin-ringer, med
 35 begynnende utvikling etter 15 minutter og sterkest etter 3 timer. Cellene hadde vendt tilbake til en morfologi som lignet den til de ubehandlede kontrollene etter 24 timer. Danazol så ut til å forsterke de kortikale ringene etter 3 timer. Videre ble diffus farging observert, særlig etter 15 minutter og 24 timer.

[0148] S1P (sfingosin-1-fosfat) spiller en svært viktig rolle i dannelsen og opprettholdelsen av vaskulært epitel. S1P er et konstitutivt signal som fremmer organiseringen og barrierefunksjonen til det vaskulære endotel via virkningene på aktin-cytoskjelettet. Fjerning av S1P fører til karlekkasje og ødem, og S1P kan reversere dysfunksjon av endotelet og gi gjenvinning av barrierefunksjonen.

[0149] I dette eksperimentet viste danazol en evne til å forsterke de beskyttende virkningene av S1P, både i retinale og glomerulære endotelceller. Danazol reverserte også den dannelsen av stressfibre som TNF α induverte i begge disse typene av endotelceller. Diffus perinukleær farging observeres i celler som er behandlet med danazol alene.

Eksempel 12: Virkningen av danazol på ECIS

[0150] Analyser ble utført for å bestemme virkningen av danazol på den trans-endoteliale elektriske resistans (TER) i humane mikrovaskulære endotelceller fra nyreglomeruli (ACBRI 128, Cell Systems Corporation (eneforhandler for Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA) eller humane retinale endotelceller (ACBRI 181, Cell Systems Corporation (eneforhandler for Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA). Den elektriske resistans ble målt ved anvendelse av det elektriske celle-substrat-impedanssensende (ECIS)-systemet (ECISZ0, erholdt fra Applied Biosystems) med 8-brønners plater med flere elektroder (8W10E). Hver brønn i platene ble belagt med 5 μ g/ml fibronektin i HBSS ved å tilsette fibronektinet i et volum på 100 μ l pr. brønn og inkubere platene i 30 minutter i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂. Fibronektinløsningen ble fjernet og 400 μ l EGM-2-dyrkningsmedium (Lonza) tilsatt til hver brønn. Platene ble koblet til ECISZ0-systemet og elektrisk stabilisert. EGM-2-mediet ble sugd av og erstattet med 200 μ l EGM-2-dyrkningsmedium med 100000 celler pr. brønn. Platene ble igjen koblet til ECISZ0-systemet og inkubert i 24 timer i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂. EGM-2-mediet ble sugd av og erstattet med 400 μ l friskt EGM-2-medium pr. brønn. Platene ble igjen koblet til ECISZ0-systemet og inkubert i 6 timer i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂. Konsentrerte løsninger av analyseforbindelsene i HBSS ble fremstilt og plassert i inkubatoren for ekvilibriering. Analyseforbindelsene ble så tilsatt til utvalgte brønner i følgende sluttkonsentrasjoner: danazol (1 μ M) (Sigma) og S1P (1 μ M) (Sigma). ECIS (resistans) ble målt over 90 timer.

[0151] I de retinale endotelcellene viste 1,0 μ M danazol alene en økning av ECIS sammenlignet med ubehandlede celler, med start tilnærmet 1,5-2,0 timer etter behandlingen og en varighet på 5 timer. S1P alene viste en økning av ECIS sammenlignet med ubehandlede celler, med start i løpet av de første 15 minuttene etter behandlingen og en varighet på tilnærmet 3 timer. Danazol og S1P i kombinasjon ga en økning av ECIS sammenlignet med S1P alene og ubehandlede celler, og denne

forhøyede ECIS varte i tilnærmet 90 timer. Danazol viste således en evne til å forsterke de tidlige virkningene av S1P og til å opprettholde en høyere resistans gjennom hele forsøket dersom S1P var til stede.

[0152] Glomerulære endotelceller viste et annet mønster. Danazol alene hadde ingen virkning på ECIS før tilnærmet 30 timer etter behandlingen. Danazol alene ga høyere ECIS enn for ubehandlede celler fra tilnærmet 30 til tilnærmet 90 timer, med den største økningen mellom tilnærmet 60-90 timer. S1P alene hadde heller ingen virkning på ECIS før tilnærmet 30 timer etter behandlingen. S1P alene ga høyere ECIS enn for ubehandlede celler fra tilnærmet 30 til tilnærmet 60 timer. Kombinasjonen av danazol og S1P hadde ingen virkning på ECIS før tilnærmet 30 timer etter behandlingen. Denne kombinasjonen ga høyere ECIS enn ubehandlede celler, S1P alene og danazol alene. Nærmere bestemt ga kombinasjonen høyere ECIS enn i ubehandlede celler fra tilnærmet 30 til tilnærmet 70 timer, høyere ECIS enn S1P alene fra tilnærmet 30 til 75 timer og høyere ECIS enn danazol alene fra tilnærmet 30 til tilnærmet 50 timer.

Eksempel 13: Virkningen av danazol på ECIS

[0153] Eksperimenter ble utført for å bestemme virkningen av danazol på den transendoteliale elektriske resistans (TER) i humane mikrovaskulære endotelceller fra nyreglomeruli (ACBRI 128, Cell Systems Corporation (eneforhandler for Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA). Den elektriske resistans ble målt ved anvendelse av det elektriske celle-substrat-impedanssensende (ECIS)-systemet (ECISZ0, erholdt fra Applied Biosystems) med 8-brønners plater med flere elektroder (8W10E). Hver brønn i platene ble belagt med 5 µg/ml fibronektin i HBSS ved å tilsette fibronektinet i et volum på 50 µl pr. brønn og inkubere platene i 30 minutter i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂. Fibronektinløsningen ble fjernet og 200 µl EGM-2-dyrkningsmedium (Lonza) tilsatt til hver brønn. Platene ble koblet til ECISZ0-systemet og elektrisk stabilisert. EGM-2-mediet ble sugd av og erstattet med 200 µl EGM-2-dyrkningsmedium med 40000 celler fra passasje 6 pr. brønn. Platene ble igjen koblet til ECISZ0-systemet og inkubert i 24 timer i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂. EGM-2-mediet ble sugd av og erstattet med 200 µl friskt EGM-2-medium pr. brønn. Platene ble igjen koblet til ECISZ0-systemet og inkubert i ytterligere 24 timer i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂. EGM-2-mediet ble sugd av og erstattet med 200 µl friskt EGM-2-medium uten dexametason pr. brønn. Platene ble igjen koblet til ECISZ0-systemet og inkubert natten over i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂. Endelig ble EGM-2-mediet sugd av og erstattet med 200 µl friskt EGM-2-medium uten dexametason pr. brønn. Platene ble igjen koblet til ECISZ0-systemet og inkubert i 2 timer i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂. Konsentrerte løsninger av analyseforbindelsene i HBSS ble fremstilt og plassert i inkubatoren for ekvilibrering. Analyseforbindelsene ble så tilsatt til utvalgte

brønner i følgende sluttkonsentrasjoner: danazol (1 μM) (Sigma) og dexametason (1 μM) (Sigma). ECIS (resistans) ble målt over 90 timer.

[0154] Danazol alene ga høyere ECIS enn i ubehandlede celler, med begynnelse etter tilnærmet 3 timer og en varighet på tilnærmet 90 timer. Økningen var høyest fra tilnærmet 12 til tilnærmet 15 timer. Sammenlignet med dexametason viste danazol et lignende mønster, men økningen av ECIS var ikke så stor.

Eksempel 14: Virkningen av danazol på RhoA

[0155] Remodellering av endotelcellenes cytoskjelett er sentralt for mange av endotelets funksjoner. Rho-familien av små GTP-bindende proteiner har blitt vist å være viktige regulatorer av dynamikken av F-aktin-cytoskjelettet. Rho-familien består av tre isoformer, RhoA, RhoB og RhoC. Aktiveringen av RhoA-aktivitet fører til en betydelig dannelse av stressfibre i endotelceller. Stimulering av endotelceller med trombin gir økning av Rho GTP og fosforylering av myosin, i samsvar med økt kontraktile beskaftenhet av cellene. Inhibering av RhoA blokkerer denne responsen og tapet av barrierefunksjon, noe som viser en avgjørende rolle for Rho i vaskulær permeabilitet.

[0156] Dette eksperimentet ble utført ved anvendelse av en kommersielt tilgjengelig Rho-aktiveringsanalyse (GLISA) erholdt fra Cytoskeleton, Denver, Colorado, ifølge produsentens oppskrift. Kort beskrevet ble humane retinale endotelceller fra passasje 8 eller 12 (AACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA) dyrket på fibronektin-belagte (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 6-brønners vevsdyrkningsplater ved anvendelse av EGM-2-dyrkningsmedium (Lonza) i 24 timer i en 37 °C inkubator med 5 % CO_2 (30000 celler/brønn i et totalvolum på 3 ml). Så ble mediet sugd av og erstattet med Ultraculture-medium tilsatt 0,1 % føtalt bovint serum, L-glutamin, natriumpyruvat, penicillin/streptomycin og ITSS (insulin, transferrin natrium selen) (alle fra Lonza) for serum-sulting av cellene og reduksjon av bakgrunnsnivået av RhoA. Cellene ble dyrket i 24 timer i en 37 °C inkubator med 5 % CO_2 . Analyseforbindelser fortynnet i HBSS ble plassert i inkubatoren for ekvibrering før tilsetning til cellene. Så ble 150 μl av hver analyseforbindelse tilsatt til de utvalgte dyrkningsbrønnene, og platene ble inkubert i inkubatoren i ytterligere 15 minutter. Så ble trombin tilsatt til utvalgte brønner. Etter 1 minutt ble cellene vasket en gang med 1,5 ml fosfatbufret saltvann og så lysert med 100 μl GLISA-lyseringsbuffer tilsatt proteaseinhibitorer. Ekstraktene ble skrapet ut, overført til mikrosentrifugerør og satt på is for å bevare den aktive formen av RhoA. Cellerester ble så fjernet fra alle ekstrakter ved sentrifugering ved 10000 rpm i 2 minutter ved 4 °C. Supernatantene ble overført til nye rør og satt på is. Uttak ble tatt ut av hvert ekstrakt for GLISA-analysen og for proteinbestemmelse. Alle proteinkonsentrasjoner lå innenfor 10 %, og ekstraktene ble anvendt i de erholdte konsentrasjoner

(tilsvarer 15 µg totalprotein pr. brønn). GLISA-analysen ble utført ved anvendelse av reagensene som ble levert i settet.

[0157] Resultatene for retinale endotelceller fra passasje 12 gis i Tabell 11 nedenfor.

Som forventet var nivået av aktivt RhoA induert av trombin svært høyt. Alle

5 analyseforbindelser inhiberte den trombininduserte aktiveringen av RhoA.

[0158] Resultatene for de retinale endotelcellene fra passasje 8 gis i Tabell 12

nedenfor. Som forventet var nivået av aktivt RhoA induert av trombin svært høyt. Alle

analyseforbindelser inhiberte den trombininduserte aktiveringen av RhoA.

10

TABELL 11

Behandling	Gjennomsnittlig OD	Prosent inhibering sammenlignet med ubehandlet kontroll	Prosent inhibering sammenlignet med trombin
Ubehandlet	0,455	---	---
1,0 µM danazol	0,424	6,82	---
1,0 µM dexametason	0,428	5,83	---
10,0 µM PI3-kinaseinhibitor LY294002	0,370	18,70	---
1,0 µM Src-1-inhibitor*	0,349	23,21	---
0,1 U/ml trombin	1,013	---	---
0,1 U/ml trombin + 1,0 µM danazol	0,859	---	27,57
0,1 U/ml trombin + 1,0 µM dexametason	0,826	---	33,48
0,1 U/ml trombin + 10,0 µM P13-kinaseinhibitor LY294002	0,685	---	58,73
0,1 U/ml trombin + 1,0 µM Src-1-inhibitor	0,534	---	85,85
* Erholdt fra Sigma			

TABELL 12

Behandling	Gjennomsnittlig OD	Prosent inhibering sammenlignet med ubehandlet kontroll	Prosent inhibering sammenlignet med trombin
Ubehandlet	0,102	---	---
1,0 μ M danazol	0,027	73,89	---
10,0 μ M PI3-kinaseinhibitor LY294002	0,056	45,32	---
0,1 U/ml trombin	0,561	---	---
0,1 U/ml trombin + 1,0 μ M danazol	0,373	---	41,02
0,1 U/ml trombin + 10,0 μ M PI3-kinaseinhibitor LY294002	0,433	---	27,86

Eksempel 15: Dyremodell for vaskulær hyperpermeabilitet

[0159] New Zealand White-kaniner ble oralt tilført 0,215 mg/kg danazol to ganger om dagen i 7 dager. Kaninene ble så injisert én gang intravitrealt med vaskulær endotelvektfaktor A (VEGF-A) for å frembringe karlekkasje i netthinnen. 24 timer senere ble natrium-fluorescein injisert, og fluorescensen i øyet ble målet med anvendelse av et Fluorotron-instrument (Ocumetrics) (gjennomsnitt av fem målinger). En enkelt kontrollkanin (placebo) hadde 250 fluorescensenheter i netthinnen, noe som viser karlekkasje der. En enkelt danazol-behandlet kanin ga 16 fluorescensenheter, noe som representerer en 94 % reduksjon av karlekkasjen grunnet danazol.

P a t e n t k r a v

1. En vaskulær hyperpermeabilitet-inhiberende mengde av en forbindelse utvalgt
blant danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol, for anvendelse for behan-
5 dling av makulaødem i et dyr med behov for dette.

2. En vaskulær hyperpermeabilitet-inhiberende mengde av en forbindelse utvalgt
blant danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol for anvendelse ifølge krav
1, hvor makulaødemet er diabetisk makulaødem.

10 3. En vaskulær hyperpermeabilitet-inhiberende mengde av en forbindelse utvalgt
blant danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol for anvendelse ifølge krav
1, for anvendelse for behandling av makulaødem når et eller flere tidlige tegn på
makulaødem eller en predisposisjon for utvikling av makulaødem opptrer.

15 4. En vaskulær hyperpermeabilitet-inhiberende mengde av en forbindelse utvalgt
blant danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol for anvendelse ifølge krav
1, for anvendelse for behandling av makulaødem umiddelbart etter diagnose av
makulaødem.

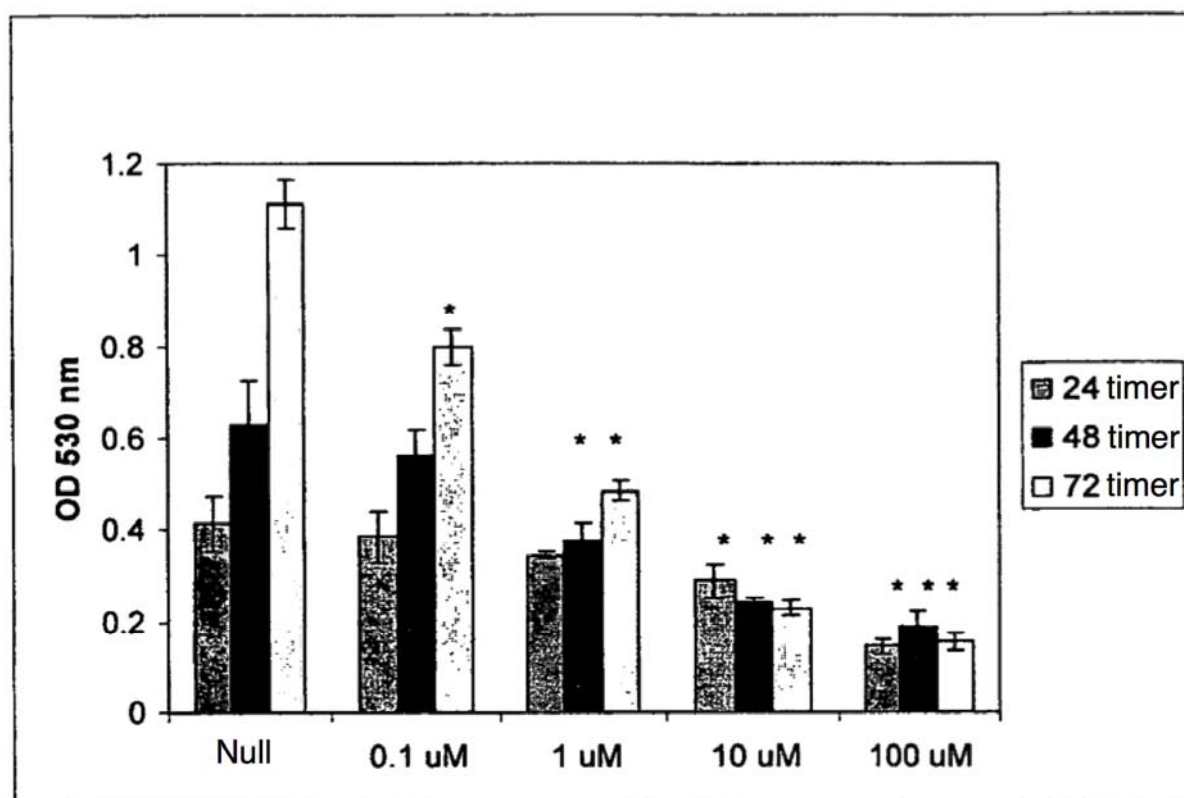
20 5. En vaskulær hyperpermeabilitet-inhiberende mengde av en forbindelse utvalgt
blant danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol for anvendelse ifølge krav
1, hvor den vaskulære hyperpermeabilitet er vaskulær hyperpermeabilitet i et
kontinuerlig endotel som forefinnes i eller rundt en netthinne.

25 6. En vaskulær hyperpermeabilitet-inhiberende mengde av en forbindelse utvalgt
blant danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol for anvendelse ifølge
ethvert av kravene 1-5, hvor forbindelsen er danazol.

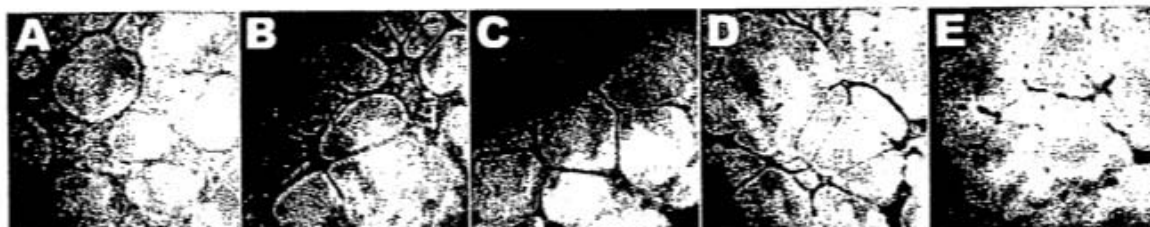
30 7. En vaskulær hyperpermeabilitet-inhiberende mengde av en forbindelse utvalgt
blant danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol for anvendelse ifølge
ethvert av kravene 1-6, hvor forbindelsen tilføres oralt.

35 8. En vaskulær hyperpermeabilitet-inhiberende mengde av en forbindelse utvalgt
blant danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol for anvendelse ifølge
ethvert av kravene 1-7, hvor dyret er et menneske.

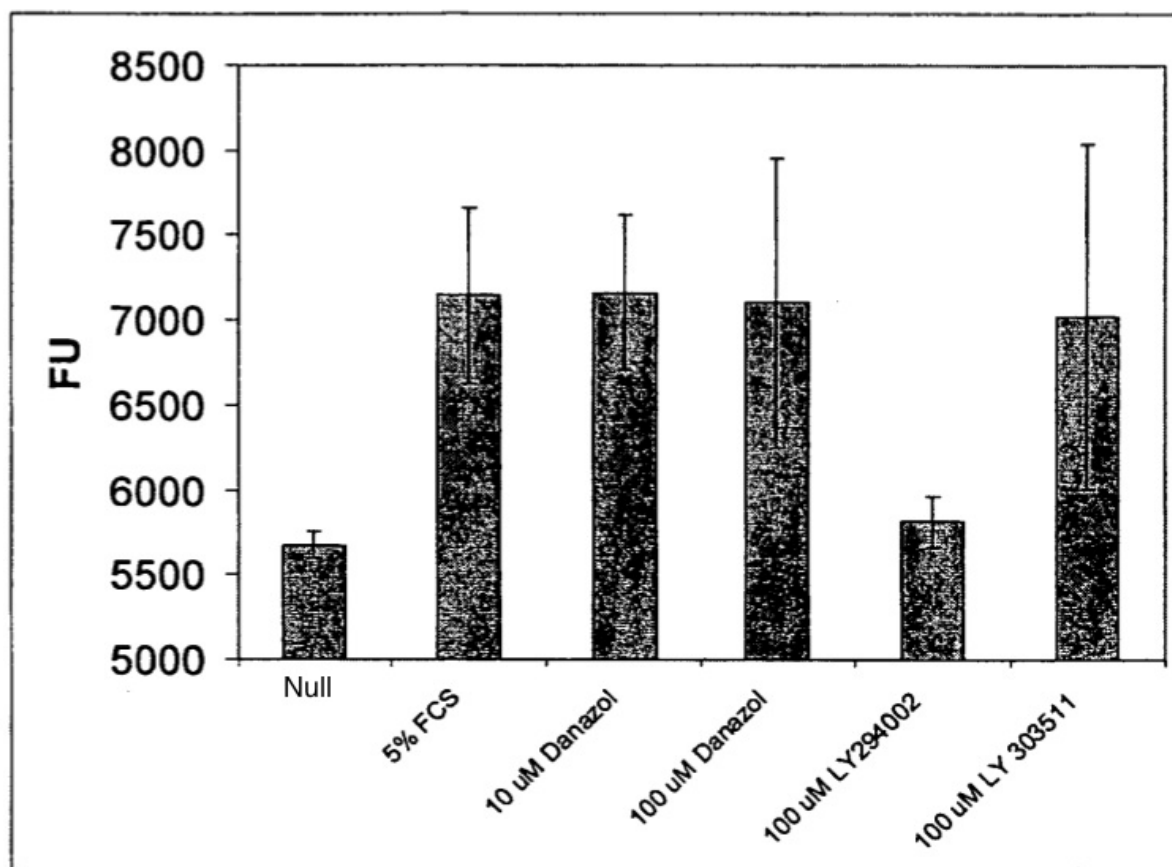
9. En vaskulær hyperpermeabilitet-inhiberende mengde av en forbindelse utvalgt blant danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol for anvendelse ifølge krav 8, hvor den vaskulær hyperpermeabilitet-inhiberende mengde er fra 1 ng til 100 mg av forbindelsen pr. dag, fortrinnsvis fra 1 mg til 100 mg av forbindelsen pr. dag, og mer foretrukket fra 10 mg til 90 mg av forbindelsen pr. dag.
10. En vaskulær hyperpermeabilitet-inhiberende mengde av en forbindelse utvalgt blant danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol for anvendelse ifølge krav 9, hvor den vaskulær hyperpermeabilitet-inhiberende mengde er fra 10 mg til 90 mg av forbindelsen pr. dag.
11. Farmasøytisk sammensetning som omfatter en effektiv mengde av en forbindelse utvalgt blant danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol for anvendelse ifølge ethvert av kravene 1 til 10.



FIGUR 1



FIGUR 2



FIGUR 3