



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2425839 B1**

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

A61K 31/58 (2006.01)

A61P 7/10 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2015.01.05
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.08.13
(86)	Europeisk søknadsnr	11009239.2
(86)	Europeisk innleveringsdag	2010.06.22
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2012.03.07
(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
(62)	Avdelt fra	EP2326332, med inndato 2010.06.22
(73)	Innehaver	Ampio Pharmaceuticals, Inc., 373 Inverness Parkway, Suite 200, Englewood, CO 80112, US-USA
(72)	Oppfinner	Bar-Or, David, 900 E. Oxford Lane, EnglewoodColorado 80110, US-USA
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for behandling av sykdommer
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A2-2007/009087 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 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

Beskrivelse

OPPFINNELSENS OMRÅDE

Oppfinnelsen angår en vaskulær hyperpermeabilitetsprosesser-inhiberende mengde av en forbindelse valgt fra danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol for
5 anvendelse for behandling av diabetisk nefropati.

BAKGRUNN

Vaskulært endotel kler innsiden av alle blodkar. Det fungerer som grensesnitt mellom blodet og vevene og organene. Endotelet danner en semipermeabel barriere som holder integriteten for blodstrømrommet, men tillater passering av vann, ioner, små molekyler,
10 makromolekyler og celler på en regulert måte. Feilregulering av denne prosessen gir vaskulær lekkasje til de underliggende vevene. Lekkasje av fluid inn i vev som fører til ødem kan ha alvorlige og livstruende konsekvenser i en rekke sykdommer. Følgelig ville det være svært ønsket å ha en fremgangsmåte for å redusere ødem, foretrukket i dets tidligste steg, og gjenopprette den endoteliale barrieren til fysiologisk.

15 WO 2007/009087 A2 beskriver anvendelse av danazol som en anti-angiogen forbindelse for å behandle sykdommer som forårsakes av angiogenese. Slike sykdommer kan omfatte stadier av diabetisk retinopati kjennetegnet ved neovaskularisering (dvs. proliferativ diabetisk retinopati).

Tomino, Y., et al, "Clinical Effect of Danazol in Patients with IgA Nephropathy",
20 Japanese Journal of Medicine.; vol. 26, nr. 2, 1987, sidene 162-166 beskriver på side 165 at vellykket behandling av IgA-nefropati med danazol ble oppnådd ved danazols økte oppløseliggjøringseffekt på intraglomerulære avleiringer.

Hoepfl, F., et al., "Long-term Danazol Therapy For Hereditary Angio-Edema", DMW;
vol. 115, nr. 4, 1990, sidene 133-138, beskriver anvendelse av 400 mg per uke med
25 danazol for behandling av arvelig angioødem, hvor arvelig ved angioødem er forårsaket av mangel på plasmaprotein C1-esterase-inhibitor.

KORT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Oppfinnelsen tilveiebringer en vaskulær hyperpermeabilitets-inhiberende mengde av en forbindelse valgt fra danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol ifølge
30 krav 1 og en farmasøytisk sammensetning ifølge krav 8. Videre beskrevet men ikke del av oppfinnelsen er en fremgangsmåte for å hemme vaskulær hyperpermeabilitet og ødemet og andre bivirkninger som resultat fra det. Fremgangsmåten omfatter å administrere en vaskulær hyperpermeabilitetshemmende mengde av en

danazolforbindelse til et dyr med behov derav. Hemming av vaskulær hyperpermeabilitet ifølge oppfinnelsen inkluderer hemming av paracellulærforårsaket hyperpermeabilitet og transcytoseforårsaket hyperpermeabilitet. Nylige bevis indikerer at transcytoseforårsaket hyperpermeabilitet er det første steget av en prosess som til sist fører til vevs- og organskade i mange sykdommer og tilstander. Følgelig blir midler for tidlig intervensjon i disse sykdommene og tilstandene som kan redusere, forsinke eller også potensielt hindre vevs- og organskade sett i dem, omtalt.

Videre beskrevet men ikke del av oppfinnelsen, er en fremgangsmåte for å modulere cytoskjelettet av endoteliale celler i et dyr. Fremgangsmåten omfatter administrering av en effektiv mengde av en danazolforbindelse til dyret.

"Vaskulær hyperpermeabilitet" er anvendt heri for å bety permeabilitet av et vaskulært endotel som blir økt sammenlignet med basalnivåer. "Vaskulær hyperpermeabilitet," som anvendt heri, inkluderer paracellulærforårsaket hyperpermeabilitet og transcytoseforårsaket hyperpermeabilitet.

"Paracellulærforårsaket hyperpermeabilitet" er anvendt heri for å bety vaskulær hyperpermeabilitet forårsaket ved paracellulær transport som blir økt sammenlignet med basalnivåer. Andre trekk for "paracellulærforårsaket hyperpermeabilitet" er beskrevet nedenfor.

"Paracellulær transport" blir anvendt heri å bety bevegelsen av ioner, molekyler og fluider gjennom de interendoteliale forbindelsene (IEJs) mellom de endoteliale cellene av et endotel.

"Transcytoseforårsaket hyperpermeabilitet" er anvendt heri for å bety vaskulær hyperpermeabilitet forårsaket ved transcytose som blir økt sammenlignet med basalnivåer.

"Transcytose" som anvendt heri for å bety den aktive transporten av makromolekyler og medfølgende fluid-fase plasmabestanddeler over endotelets endoteliale celler. Andre trekk for "transcytose" er beskrevet nedenfor.

"Basalnivå" blir anvendt heri for å vise til nivået funnet i et normalt vev eller organ.

"Hemming, "hemme" og lignende begrep er anvendt heri for å bety å redusere, forsinke eller hindre.

Et dyr har "behov for" behandling ifølge oppfinnelsen hvis dyret for øyeblikket har en sykdom eller tilstand mediert ved vaskulær hyperpermeabilitet, viser tidlige tegn på en

slik sykdom eller tilstand eller har en predisposisjon til å utvikle en slik sykdom eller tilstand.

"Mediert." og lignende begrep blir anvendt heri for å bety forårsaket av, å forårsake, involvere eller forverret av, vaskulær hyperpermeabilitet.

5 **KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE**

Figur 1 viser OD-nivåene målt etter inkubering av HUVEC-celler med danazol som et mål for dens evne til å hindre begynnende formering av endoteliale celler.

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

Figur 3 viser fluorescens målt etter behandling av HUVEC-celler med danazol som et mål for dens evne til å hindre invasjon av endoteliale celler.

15 **DETALJERT BESKRIVELSE AV UTFØRELSESFORMER AV OPPFINNELSEN SOM FORETREKKES I ØYEBLIKKET**

Endotelet er en nøkkelkontrollør som kontrollerer utvekslingen av molekyler fra blodet til vevets parenkym. Det kontrollerer hovedsakelig permeabiliteten av et spesielt vaskulært lag for blodbårne molekyler. Permeabiliteten og selektiviteten til den
20 endoteliale cellebarrieren er svært avhengig av strukturen og typen endotel som kler mikrovaskulaturen i forskjellige vaskulære lag. Endoteliale celler som kler mikrovaskulærlagene av forskjellige organer viser strukturell differensiering som kan bli inndelt i tre primære morfologiske kategorier: sinusoidal, fenestrert og kontinuerlig.

25 Sinusoidalt endotel (også henvist til som "diskontinuerlig endotel") har store intercellulære og intracellulære hull og ingen basalmembran, tillater minimalt begrenset transport av molekyler fra kapillærrommet inn i vevet og omvendt. Sinusoidalt endotel finnes i lever, milt og benmarg.

30 Fenestrert endotel er karakterisert ved nærværet av et stort antall sirkulære transcellulære åpninger kalt fenestre med en diameter på 60 til 80 nm. Fenestrert endotel finnes i vev og organer som krever rask utveksling av små molekyler, inkludert nyre (glomeruli, peritubulære kapillærer og stigende vasa recta), pankreas, binyrene, indresekretoriske kjertler og innvoller. Fenestrene er dekket av en tynne hinner, bortsett

fra de i utviklet, friske glomeruli. Se Ichimura et al., J. Am. Soc. Nephrol., 19:1463-1471 (2008).

Kontinuerlig endotel inneholder ikke fenestre eller store hull. I stedet er kontinuierlig endotel karakterisert av et uavbrutt endotelt celleskikt. Det meste av kroppens endotel er kontinuierlig endotel, og kontinuierlig endotel finnes i, eller rundt, hjernen (blod-hjerne-barriere), mellomgulv, duodenal muskulatur, fett, hjerte, enkelte områder av nyrene (papillær mikrovaskulatur, synkende vasa recta), store blodkar, lunger, mesenterium, nerver, netthinne (blod-netthinne-barriere), skjelettmuskler, testikler og andre vev og organer i kroppen.

Endotelial transport i kontinuierlig endotel kan bli tenkt på i en generell forstand som å finnes ved paracellulære og transcellulære baner. De paracellulære banene er baner mellom endoteliale celler, gjennom de interendoteliale forbindelsene (IEJer). I upåvirket kontinuierlig endotel blir vann, ioner og små molekyler transportert paracellulært ved diffusjon og konveksjon. En betydelig mengde vann (opp til 40 %) krysser også den endoteliale cellebarrieren transcellulært gjennom vanntransporterende membrankanaler kalt vannporer. Mange stimuli kan forstyrre organiseringen av IEJer, og dermed åpne hull i den endoteliale barrieren. Dannelsen av disse intercellulære hullene tillater overføring av fluid, ioner, makromolekyler (*f.eks.* proteiner) og andre plasmabestanddeler mellom de endoteliale cellene på en uhindret måte. Denne paracellulærforårsakede hyperpermeabiliteten gir ødem og andre bivirkninger som eventuelt kan føre til skade på vev og organer.

Den transcellulære banen er ansvarlig for den aktive transporten av makromolekyler, slik som albumin og andre plasmaproteiner, over de endoteliale cellene, en prosess omtalt som "transcytose." Transporten av makromolekyler oppstår i vesikler kalt caveoler. Nesten alt kontinuierlig endotel har rikelig med caveoler, bortsett fra kontinuierlig endotel som finnes i hjerne og testikler som har få caveoler. Transcytose er en multi-stegprosess som involverer etterfølgende caveolecelleavsnøring og fisjon fra plasmalemma and translocation across the cell, followed by docking and fusion with the opposite plasmalemma, der caveolene frisetter sitt innhold ved eksocytose inn i interstitium. Transcytose er selektiv og tett regulert under normale fysiologiske tilstander.

Det er en voksende forståelse for den fundamentale viktigheten av den transcellulære banen. Transcytose av plasmaproteiner, spesielt albumin som representerer 65 % av plasmaproteiner, er av særlig interesse fordi dets evne til å regulere den transvaskulære onkotiske trykkgradienten. Det kan bli verdsatt, da økt transcytose av albumin og andre

plasmaproteiner over basalnivåer vil øke vevets proteinkonsentrasjon av dem som, i sin tur vil føre til at vann beveger seg over den endoteliale barriæren, og dermed gir ødem.

Lavdensitetslipoproteiner (LDL) blir også transportert over endoteliale celler ved transcytose. Ved hyperlipidemi har en betydelig økning i transcytose av LDL blitt
5 påvist som den første hendelsen ved aterogenese. LDL akkumulerer i det subendoteliale rommet, fanget inne i den ekspanderte basalhinnen og ekstracellulære matrisen. Den subendoteliale lipoproteinakkumuleringen i hyperlipidemi fulgt av en kaskade av hendelser som medfører ateromatøs plakkdannelse. Fremskredede aterosklerotiske lesjoner er rapportert iblant å være fulgt av åpningen av IEJ-er og massiv ukontrollert
10 overføring av LDL og albumin.

Vaskulære komplikasjoner er et kjennetegn ved diabetes. Ved nivået av store kar, synes sykdommen å bli uttrykt som en akselerasjon av en aterosklerotisk prosess. Med hensyn til mikroangiopati, medfører endringer i mikrovaskulaturen til netthinnen, nyreglomerulus og nerver det største antallet kliniske komplikasjoner, men en
15 kontinuerlig økt antall undersøkelser viser at diabetes også påvirker andre organers mikrovaskulatur, slik som mesenterium, hud, skjelettmuskel, hjerte, hjerne og lunge, på grunn av ytterligere kliniske komplikasjoner. I alle disse vaskulære lagene, synes endringer i vaskulær permeabilitet å representere et kjennetegn på den diabetiske endoteliale dysfunksjonen.

I kontinuerlig endotel, blir kapillær hyperpermeabilitet til plasmamakromolekyler i den tidlige fasen av diabetes forklart ved en intensivering av transendotelial vesikulær transport (dvs. ved økt transcytose) og ikke ved destabilisering av IEJ-er. I tillegg har de endoteliale cellene av diabetiske, inkludert de til hjernen, blitt rapportert å inneholde et økt antall caveoler sammenlignet med normale, og glykerte proteiner, særlig glykert
25 albumin, blir tatt opp av endoteliale celler og transcytosert ved vesentlig større rater enn deres naturlige former. Videre er økt transcytose av makromolekyler en prosess som fortsetter utover den tidlige fasen av diabetes og synes å være en følge av ødem i diabetisk vev og organer gjennom sykdommen hvis ubehandlet. Dette ødemet fører i sin tur til vevs- og organskade. Lignende økning i transcellulær transport av
30 makromolekyler har blitt rapportert ved hypertensjon.

Paracellulærforårsaket hyperpermeabilitet er også en faktor i diabetes og de vaskulære komplikasjonene ved diabetes. IEJ-er av den paracellulære banen inkludert klebeforbindelser (AJ-er) og tette forbindelser (TJ-er). Diabetes endrer innholdet, fosforyleringen og plasseringen av visse proteiner i både AJ-er og TJ-er, og derved
35 bidrar til å øke endotelial barriærepermeabilitet.

Til støtte for den foregående diskusjonen og til 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., Chapter 14, pages 340-342, in
 5 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
 10 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.
 15 Visual Sci., 33(5):16101619 (1992).

Endotelial transport i fenestrert endotel skjer også ved transcytose og den paracellulære banen. I tillegg skjer endotelial transport ved hjelp av fenestrene. Fenestrert endotel viser en påfallende høy permeabilitet for vann og små hydrofile stoffer på grunn avnærværet av fenestrene.

20 Fenestrene kan eller bør ikke være dekket av et diafragma. Plasseringene av endotel med difragmerte fenestre inkluderer endokrint vev (*f.eks.* Langerhanske øyer og binyrebark), gastrointestinale slimhinner og renale peritubulære kapillærer. Permeabiliteten til plasmaproteiner av fenestrert endotel med diafragmerte fenestre overgår ikke det med kontinuerlig endotel.

25 Plasseringen av endotel med ikke-diafragmerte fenestre inkluderer nyrenes glomeruli. Det glomerulære fenestrerte endotelet er dekket av en glykokalykse som utvides i fenestret (danner såkalte "silpluggen") og av et mer løst forbundet endotelial celleoverflatelag av glykoproteiner. Matematiske analyser av funksjonelle perm-selektivitetsstudier har konkludert at det glomerulære endoteliale celleglykokalykset,
 30 inkludert det som finnes i fenestrene, og dets tilknyttede overflatelag står for retensjonen av opp til 95 % av plasmaproteiner som er i sirkulasjonen.

Tap av fenestere i det glomerulære endotelet har blitt funnet å være forbundet med proteinuri i flere sykdommer, inkludert diabetisk nefropati, transplantasjons-glomerulopati, pre-eklamsi, diabetes, nyresvikt, cyklosporinnefropati, serumsykdoms-
 35 nefritt og Thy-1-nefritt. Actinomplassering og, særlig, depolymerisasjon av stressfibre har blitt funnet å være viktig for dannelsen og opprettholdelse av fenestere.

Til støtte for den foregående diskusjonen av fenestrert endotel 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," sidene 679-688, *Endothelial Biomedicine* (red. Aird, Cambridge University Press, Cambridge, 2007); Simionescu og Antohe, "Functional Ultrastructure of the Vascular Endothelium: Changes in Various Pathologies," sidene 42-69, *The Vascular Endothelium I* (red. Moncada og Higgs, Springer-Verlag, Berlin, 2006).

Endotelial transport i sinusoidalt endotel skjer ved transcytose og gjennom de intercellulære hullene (interendoteliale snitt) og intracellulære hull (fenestere). Behandling av sinusoidalt endotel med aktin filamentsplittende legemidler kan fremkalle en betydelig og rask økning i antallet hull, som indikerer reguleringen av porøsiteten av endoteliale kledningen ved actincytoskjelettet. Andre cytoskjelett-
 endrende legemidler har blitt rapportert å endre diameterne til fenestrene. Derfor kontrollerer fenesterforbundet cytoskjelett sannsynligvis den viktige endotelial-filtreringsfunksjonen i sinusoidalt endotel. I lever har defenestrering (tap av fenestre), som fører til en reduksjon i permeabilitet av endotelet blitt forbundet med patogenesen for flere sykdommer og tilstander, inkludert aldring, aterogenese, aterosklerose, cirrhose, fibrose, leversvikt og primær og metastatisk leverkreft. Til støtte for den foregående og for ytterligere informasjon, se Yokomori, *Med. Mol. Morphol.*, 41:1-4 (2008); Stan, "Endothelial Structures Involved In Vascular Permeability," sidene 679-688, *Endothelial Biomedicine* (red. Aird, Cambridge University Press, Cambridge, 2007); DeLeve, "The Hepatic Sinusoidal Endothelial Cell," sidene 1226-1238, *Endothelial Biomedicine* (red. Aird, Cambridge University Press, Cambridge, 2007); Pries og Kuebler, "Normal Endothelium," sidene 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," sidene 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).

Beskrevet heri er en fremgangsmåte for å hemme vaskulær hyperpermeabilitet som finnes i ethvert vev eller organ som inneholder eller er omgitt av kontinuerlig endotel. Som nevnt ovenfor finnes kontinuerlig endotel i eller rundt hjernen (blod-hjernebarriere), mellomgulv, duodenal muskulatur, fett, hjerte, enkelte områder av nyrene (papillær mikrovaskulatur, synkende vasa recta), store blodkar, lunger, mesenterium,

nerver, netthinne (blod-netthinne-barriere), skjelettmuskler, hud, testikler, navlestrengsvener og andre vev og organer i kroppen. Foretrukket er det kontinuerlige endotelet som finnes i eller rundt hjernen, hjertet, lungene, nervene eller netthinnen.

Videre beskrevet heri er en fremgangsmåte for å hemme vaskulær hyperpermeabilitet som finnes i ethvert vev eller organ som inneholder eller er omgitt av fenestrert endotel. Som nevnt ovenfor finnes fenestrert endotel i eller rundt nyren (glomeruli, peritubulære kapillærer og stigende vasa recta), pankreas, binyrene, indresekretoriske kjertler og innvoller. Foretrukket er det fenestrerte endotelet som finnes i nyrene, spesielt det som finnes i nyrenes glomeruli.

Videre kan en hvilken som helst sykdom eller tilstand mediert av vaskulær hyperpermeabilitet bli behandlet ved hjelp av nevnte fremgangsmåte. Slike sykdommer og tilstander inkluderer diabetes, hypertensjon og aterosklerose.

Spesielt kan de vaskulære komplikasjoner ved diabetes, inkludert de i hjerne, hjerte, nyrer, lunge, mesenterium, nerver, retina, skjelettmuskler, huden og andre vev og organer inneholdende kontinuerlig eller fenestrert endotel, behandles ved den foreliggende oppfinnelse. Disse vaskulære komplikasjonene inkluderer ødem, akkumulering av LDL i det subendoteliale rommet, akselerert aterosklerose og følgende: hjerne (akselerert aldring av karvegger), hjerte (myokardialt ødem, myokardial fibrose, diastolisk dysfunksjon, diabetisk kardiomyopati), nyrer (diabetisk nefropati), lunge (retardasjon av lungeutvikling hos fostre av diabetiske mødre, endringer av flere pulmonære fysiologiske parametere og økt mottakelighet for infeksjoner), mesenterium (vaskulær hyperplasi), nerver (diabetisk nevropati), netthinne (makulært ødem og diabetisk retinopati) og hud (rødhet, missfarging, tørrhet og sår dannelse).

Diabetisk retinopati er en ledende årsak til blindhet som påvirker ca. 25 % av de anslåtte 21 millioner amerikanerne med diabetes. Selv om dens forekomst og progresjon kan bli redusert ved intensiv kontroll av glykemi og blodtrykk, utvikler nær alle pasienter med diabetes mellitus type 1 og mer enn 60 % av disse med diabetes mellitus type 2 diabetes mellitus til slutt diabetisk retinopati. Det er to steg av diabetisk retinopati. Den første, non-proliferativ retinopati, er det tidlige steget av sykdommen og blir karakterisert av økt vaskulær permeabilitet, mikroaneurismer, ødem og til slutt tetting av kar. Neovaskulærisasjon er ikke en komponent av den non-proliferative fasen. Mest synstap under dette steget skyldes fluidakkumulering i makula, netthinnens sentrale område. Denne akkumulasjonen av fluid blir kalt makulært ødem og kan medføre midlertidig eller permanent redusert syn. Det andre steget av diabetisk retinopati blir kalt proliferativ retinopati og blir karakterisert av abnormal ny kar-

dannelse. Dessverre kan denne unormale neovaskulærisasjonen være svært skadende fordi den kan medføre blødning i øyet, netthinnearrvev, diabetisk netthinne­løsning eller grønn stær, og alle av disse kan medføre redusert syn eller blindhet. Makulært ødem kan også inntreffe i den proliferative fasen.

5 Diabetisk nevropati er en vanlig alvorlig komplikasjon ved diabetes. Det er fire hovedtyper diabetisk nevropati: perifer nevropati, autonom nevropati, radikuloplexus nevropati og mononevropati. Tegnene og symptomene på perifer nevropati, den vanligste typen diabetisk nevropati, inkluderer nummenhet eller redusert evne til å føle smerte eller endringer i temperatur (spesielt i føttene og tærne), en prikkende eller
10 brennende følelse, skarp smerte, smerte ved gange, ekstrem sensitivitet for den letteste berøring, muskelsvakhet, vanskelighet med å gå, og alvorlige fotproblemer (slik som sår, infeksjoner, deformiteter og smerte i bein og ledd). Autonom nevropati påvirker det autonome nervesystemet som kontrollerer hjertet, blæren, lungene, magen, innvollene, kjønnsorganene og øynene, og problemer i alle disse områdene kan
15 inntreffe. Radikuloplexus nevropati (også kalt diabetisk amyotrofi, femoral nevropati eller proksimal nevropati) påvirker vanligvis nervene i hoftene, skuldrene eller abdomen, vanligvis på kroppens ene side. Mononevropati betyr skade på bare en nerve, normalt i en arm, bein eller ansiktet. Vanlige komplikasjoner ved diabetisk nevropati inkluderer tap av lemmer (*f.eks.* tær, føtter eller ben), charcot-ledd, urinveisinfeksjoner,
20 urininkontinens, ubevisst hypoglykemi (kan også være dødelig), lavt blodtrykk, fordøyelsesproblemer (*f.eks.* forstoppelse, diaré, kvalme og oppkast), seksuell dysfunksjon (*f.eks.* erektil dysfunksjon), og økt eller redusert svetting. Som det fremgår, kan symptomer dekke fra svak til smertefull, invalidiserende og også dødelig.

Diabetisk nefropati er den vanligste årsaken terminal nyresykdom i USA. Det er en
25 vaskulær komplikasjon av diabetes som rammer nyrenes glomerulærkapillærer og reduserer nyrenes filtrasjonsevne. Nefropati blir først indikert ved forekomsten av hyperfiltrasjon og deretter mikroalbuminuri. Alvorlig proteinuri og en progressiv reduksjon i nyrefunksjon kommer før terminal nyresykdom. Normalt før noen tegn på nefropati vises, har retinopati vanligvis blitt diagnostisert. Nyretransplantasjon blir
30 vanligvis anbefalt til pasienter med terminal nyresykdom forårsaket av diabetes. Overlevelseshastighet etter 5 år for pasienter som får et transplantat er ca. 60 % sammen­lignet med kun 2 % for de på dialyse.

Hypertensjon utvikles normalt over mange år, og det rammer til slutt nesten alle. Ukontrollert hypertensjon øker risikoen for alvorlige helseproblemer, inkludert
35 hjerteanfall, kongestiv hjertesvikt, slag, perifer arteriesykdom, nyresvikt, aneurismer, øyeskade og problemer med minne og forstand.

Aterosklerose utvikles også gradvis. Aterosklerose kan ramme koronararteriene, karotidarterien, de perifere arteriene eller mikrovaskulaturee, og komplikasjoner fra aterosklerose inkluderer koronararteriesykdom (som kan forårsake angina eller et hjerteanfall), koronarmikrovaskulær sykdom, karotid arteriesykdom (som kan
 5 forårsake et transient iskemisk anfall eller slag), perifer arteriesykdom (som kan forårsake tap av sensitivitet til hjertet og ufølsomt eller også dødt vev), og aneurysmer.

Ytterligere sykdommer og tilstander som kan bli behandlet inkluderer akutt lungeskade, akutt lungenesviktsyndrom (ARDS), aldersrelatert makulær degenerasjon, cerebralt ødem, choroidalt ødem, choroiditt, koronar mikrovaskulær sykdom, cerebral
 10 mikrovaskulær sykdom, Eals sykdom, ødem forårsaket av skade (*f.eks.* traume eller brannskår), ødem forbundet med hypertensjon, glomerulær vaskulær lekkasje, hemorragisk sjokk, Irvine Gass syndrom, iskemi, makulært ødem (*f.eks.* forårsaket av vaskulære okklusjoner, post-intraokulær kirurgi (*f.eks.* kataraktkirurgi), uveitt eller retinitis pigmentosa, i tillegg til den forårsaket av diabetes), nefritt (*f.eks.* glomerulo-
 15 nefritt, serumsykdomnefritt og Thy-1 nefritt), nefropatier, nefrotisk ødem, nefrotisk syndrom, neuropatier, organsvikt på grunn av vevsødem (*f.eks.* ved sepsiss eller på grunn av trauma), preeklampsi, lungeødem, lungehypertensjon, nyresvikt, netthinne-ødem, netthinneblødning, netthinneveneokklusjoner (*f.eks.* grenet eller sentral veneokklusjoner), retinitt, retinopatier (*f.eks.* aterosklerotisk retinopati, hypertensiv
 20 retinopati, stråleretinopati, sigdselleretinopati og retinopati ved tidlig utvikling, i tillegg til diabetisk retinopati), stille cerebralt infarkt, systemisk inflammatorisk respons-syndromer (SIRS), transplantasjonsglomerulopati, uveitt, vaskulært lekkasjesyndrom, glassaktig blødning og Von Hippel Lindaus sykdom. I tillegg er noen legemidler, inkludert de anvendt for å behandle multippel sklerose kjent for å forårsake vaskulær
 25 hyperpermeabilitet og danazol kan bli anvendt for å redusere denne bivirkningen ved anvendelse av disse legemidlene. Medfødt og ervervet angioødem er uttrykkelig utelatt fra disse sykdommene og tilstandene som videre kan bli behandlet.

"Behandle," "behandler" eller "behandling" er anvendt heri for å bety å redusere (helt eller delvis) symptomene, varigheten eller alvorligheten av en sykdom eller tilstand,
 30 inkludert å helbrede sykdommen, eller p hindre sykdommen eller tilstanden.

Nylige bevis indikerer at transcytoseforårsaket hyperpermeabilitet er det første steget av en prosess som til sist fører til vevs- og organskade i mange sykdommer og tilstander. Følgelig tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen et middel for tidlig
 35 intervensjon i disse sykdommene og tilstandene som kan redusere, forsinke eller også potensielt hindre vevs- og organskade sett i dem. F.eks. kan et dyr bli behandlet umiddelbart etter diagnostisering av en av sykdommene eller tilstandene som kan behandles ifølge oppfinnelsen (disse sykdommer og tilstander beskrevet over).

Alternativt er foretrukket behandlingen av dyr som har tidlige tegn på, eller en predisposisjon til å utvikle en slik sykdom eller tilstand før symptomene finnes. Tidlige tegn på, og risikofaktorer for, diabetes, hypertensjon og aterosklerose er godt kjent, og behandling av et dyr som viser disse tidlige tegnene eller risikofaktorene kan bli startet
5 før nærværet av symptomer på sykdommen eller tilstanden (*dvs.* profylaktisk).

F.eks. kan behandling av en pasient som er diagnostisert med diabetes bli startet umiddelbart ved diagnostisering. Spesielt skulle diabetikere foretrukket bli behandlet med en danazolforbindelse før noen symptomer på en vaskulær komplikasjon finnes, selv om dette vanligvis ikke er mulig, siden de fleste diabetikere viser slike symptomer
10 når de blir diagnostisert (se under). Alternativt skal diabetikere bli behandlet mens nonproliferative diabetisk retinopati er svak (*dvs.* lavt nivå av mikroaneurismer og intraretinal blødning). Se Diabetic Retinopathy, side 9 (Ed. Elia Duh, M.D., Human Press, 2008). Slik tidlig behandling vil tilveiebringe den beste muligheten for å hindre makulært ødem og progresjon av retinopatien til proliferativ diabetisk retinopati.

Nærværet av diabetisk retinopati er også ansett som et tegn på at andre mikrovaskulære komplikasjoner av diabetes finnes eller vil utvikles (se *Id.*, side 474-477), og tidlig
15 behandling kan også hindre eller redusere disse ytterligere komplikasjonene. Naturligvis kan mer fremskredne sykdommer og tilstander som er vaskulære komplikasjoner av diabetes også bli behandlet med fordelaktige resultater.

Som nevnt ovenfor er imidlertid ofte vaskulære komplikasjoner allerede nærværende på tidspunktet da diabetes blir diagnostisert. Følgelig er det foretrukket å profylaktisk behandle en pasient som har tidlige tegn på, eller en predisposisjon til å utvikle diabetes. Disse tidlige tegnene og risikofaktorene inkluderer fastende glukose som er høy, men ikke høy nok til å bli klassifisert som diabetes ("prediabetes"),
20 hyperinsulinemi, hypertensjon, dyslipidemi (høy kolesterol, høye triglycider, høy lavdensitetslipoprotein, og/eller lavt nivå av høydensitetslipoprotein), fedme (kroppsmasseindeks over 25), inaktivitet, eldre enn 45 år, utilstrekkelig søvn, familært disponert for diabetes, minoritetsrase, tidligere svangerskapsdiabetes og tidligere polycystisk ovariesyndrom.

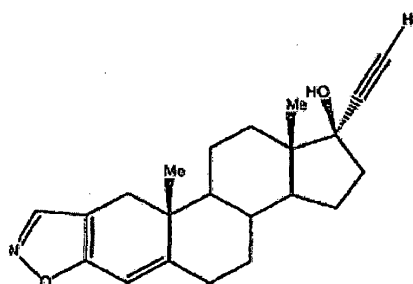
Likeledes kan behandling av en pasient som er diagnostisert med hypertensjon bli startet umiddelbart ved diagnostisering. Hypertensjon forårsaker normalt ikke noen symptomer, men profylaktisk behandling kan bli startet hos en pasient som har en predisposisjon til å utvikle hypertensjon. Risikofaktorer for hypertensjon inkluderer alder, rase (hypertensjon er mer vanlig hos svarte), familiært (hypertensjon finnes i
30 familien), overvekt eller fedme, mangel på aktivitet, røyke tobakk, for mye salt i maten, for lite kalium i maten, for lite vitamin D i maten, drikke for mye alkohol, høyt stressnivå, noen kroniske tilstander (*f.eks.* høyt kolesterol, diabetes, nyresykdom og

søvnapné) og anvendelse av noen legemidler (*f.eks.* orale prevensjonsmidler, amfetaminer, slankepiller og noen forkjølelses og allergiske medikasjoner).

Behandling av en pasient som er diagnostisert med aterosklerose kan bli startet umiddelbart ved diagnostisering. Det er imidlertid foretrukket å profylaktisk behandle en pasient som har tidlige tegn på, eller en predisposisjon til å utvikle aterosklerose. Tidlige tegn og risikofaktorer for aterosklerose inkluderer alder, familiær aneurisme eller tidlig hjertesykdom, hypertensjon, høy kolesterol, høye triglycerider, insulin resistans, diabetes, fedme, røyking, mangel på fysisk aktivitet, usunn mat og høyt nivå C-reaktivt protein.

Fremgangsmåten for å hemme vaskulær hyperpermeabilitet omfatter å administrere en effektiv mengde av en danazolforbindelse til et dyr med behov derav for å hemme den vaskulære hyperpermeabiliteten. Som anvendt her, betyr "en danazolforbindelse" danazol, prodroger av danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol og dens prodroger.

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



Danazol

Fremgangsmåter for å fremstille danazol er kjent i faget. Se *f.eks.* U.S. patent nr. 3 135 743 og GB patent nr. 905 844. Danazol er også tilgjengelig kommersielt fra mange kilder, inkludert Barr Pharmaceuticals, Inc., Lannett Co., Inc., sanofi-aventis Canada, Sigma-Aldrich og Parchem Trading Ltd.

"Prodroge" betyr enhver forbindelse som frigir et aktivt opphavslegemiddel (danazol i dette tilfellet) *in vivo* når slik prodroge blir administrert til et dyr. Prodroger av danazol inkluderer danazol hvori hydroksylgruppen er bundet til enhver gruppe som kan bli spaltet *in vivo* for å generere det frie hydroksylet. Eksempler på danazolprodroger inkluderer estere (*f.eks.* acetat-, format- og benzoatederivater) av danazol.

De farmasøytiske akseptable saltene av danazol og dens prodroger inkluderer konvensjonelle ikke-toksiske salter, slik som salter avleder fra uorganiske syrer (slik som salt, hydrobromid, svovel, fosfor, salpeter og lignende), organiske syrer (slik som eddik-, propion-, rav-, glykol-, stearin-, melke-, eple-, vin-, sitron-, glutam-, asparagin-, benzo-, salicyl-, oksal-, askorbinsyre og lignende) eller baser (slik som hydroksid, karbonat eller bikarbonat av et farmasøytisk akseptabelt metallkation eller organiske kationer avledet fra N,N-dibenzyletylenediamin, D-glukosamin eller etylenediamin). Saltene blir fremstilt på en konvensjonell måte, *f.eks.* ved nøytralisering av den frie baseformen av forbindelsen med en syre. Spesielt er isoksazoler, slik som danazol svakt basiske substanser og vil danne syreaddisjonssalter ved tilsetning av sterke syrer og kvartære ammoniumsalter ved tilsetning av estere av sterke syrer (*f.eks.* en ester av en sterk uorganisk eller organisk sulfonsyre, foretrukket en lavere alkyl-, lavere alkenyl- eller lavere aralkylester, slik som metyljodid, etyljodid, etylbromid, propylbromid, butylbromid, allylbromid, metylsulfat, metylbenzenesulfonat, metyl-p-toluensulfonat, benzylklorid og lignende). Se U.S. patent nr. 3 135 743.

Som nevnt ovenfor kan en danazolforbindelse bli anvendt til å hemme vaskulær hyperpermeabilitet og å behandle en sykdom eller tilstand mediert ved vaskulær hyperpermeabilitet. For å gjøre det blir danazolforbindelsen administrert til et dyr med behov for behandling. Foretrukket er dyret et pattedyr, slik som en kanin, geit, hund, katt, hest eller menneske. Mest foretrukket er pattedyret et menneske.

Effektive doseringsformer, administrasjonsmåter og doseringsmengder for forbindelsen ifølge oppfinnelsen (*dvs.* danazol, en prodroge av danazol eller et farmasøytisk akseptabelt salt av hver av dem) kan bli bestemt empirisk ved å anvende anvisningen tilveiebrakt heri. Det skal forstås av fagfolk at doseringsmengden vil variere med den særlige sykdommen eller tilstanden til som skal behandles, alvorligheten av sykdommen eller tilstanden, administrasjonsmåten(e), varigheten av behandlingen, identiteten av alle andre legemidler som blir administrert til dyret, alderen, størrelsen og dyrets art og lignende faktorer kjent innen medisin og veterinærmedisin. Generelt vil en egnet daglig dose av en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen være den mengden av forbindelsen som er den laveste dosen effektiv til å gi en terapeutisk effekt. Den daglige dosen vil imidlertid bli bestemt av en behandlende lege eller veterinær innen området sunn medisinsk bedømmelse. Om ønsket kan den effektive daglige dosen bli administrert som to, tre, fire, fem, seks eller flere sub-doser, administrert separat med egnede intervaller i løpet av dagen. Administrasjon av forbindelsen må bli fortsatt til en akseptabel respons er oppnådd.

Danazolforbindelser har tidligere blitt rapportert å hemme angiogenese. Se PCT søknad WO 2007/009087. Overraskende og ganske uventet er det blitt funnet at

danazolforbindelser kan bli anvendt i praktiseringen av den foreliggende oppfinnelsen ved optimale doser som er ca. 100-1000 ganger lavere enn de tidligere rapporterte for å hemme angiogenese og vesentlig mindre enn de mengden som for tiden administreres til pasienter for behandlingen av andre sykdommer og tilstander (normalt 200-800 mg/dag for et voksent menneske). Anvendelser av disse lavere dosene danazolforbindelser bør unngå noen betydelige bivirkninger, kanskje alle bivirkninger som vil være spesielt fordelaktig for tidlig eller profylaktisk behandling av sykdommer og tilstander ifølge den foreliggende oppfinnelsen.

Spesielt vil en effektiv doseringsmengde av en danazolforbindelse for å hemme vaskulær hyperpermeabilitet være fra 0,1 ng/kg/dag til 35 mg/kg/dag, foretrukket 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 doseringsmengde vil også være den mengden som vil føre til en konsentrasjon i et relevant fluid (*f.eks.* blod) fra 0,0001 μM til 5 μM , foretrukket fra 0,1 μM til 1,0 μM , mer foretrukket fra 0,1 μM til 0,5 μM , mest foretrukket ca. 0,1 μM . En effektiv doseringsmende vil også være den mengden som vil føre til en konsentrasjon i vevet eller organet som skal behandles på ca. 0,17 % (vekt/vekt) eller mindre, foretrukket fra 0,00034 % til 0,17 %, mest foretrukket 0,0034 % til 0,017 %. Når gitt topisk eller lokalt vil danazolforbindelsen foretrukket bli administrert ved en konsentrasjon fra 0,0001 μM til 5 μM , foretrukket fra 0,1 μM til 1,0 μM , mer foretrukket fra 0,1 μM til 0,5 μM , mest foretrukket ca. 0,1 μM eller ved en konsentrasjon på ca. 0,17 % (vekt/vekt) eller mindre, foretrukket fra 0,00034 % til 0,17 %, mest foretrukket 0,0034 % til 0,017 %. Når gitt oralt til et voksent menneske vil dosen foretrukket være fra ca. 1 ng/dag til ca. 100 mg/dag, mer foretrukket vil dosen være fra ca. 1 mg/dag til ca. 100 mg/dag, mest foretrukket vil dosen være fra ca. 10 mg/dag til ca. 90 mg/dag, foretrukket gitt i to like doser per dag. Videre er danazol forventet å akkumulere i celler og vev, slik at en begynnende (start) dose (*f.eks.* 100 mg per dag) kan bli redusert etter en tidsperiode (*f.eks.* 2-4 uker) til en lavere vedlikeholdsdose (*f.eks.* 1 mg per dag) som kan bli gitt ubegrenset uten betydelige bivirkninger, kanskje uten noen bivirkninger. Som anvendt heri, er "vaskulær-hyperpermeabilitetshemmende mengde" av en danazolforbindelse definert å bety de mengdene fastsatt over i dette avsnittet.

Videre beskrevet men ikke del av oppfinnelsen, er en fremgangsmåte for å modulere cytoskjelettet av endoteliale celler i et dyr. Denne fremgangsmåten er basert på oppdagelsene at danazol hemmer F-aktin stressfiberdannelse, forårsaker dannelsen av kortikale aktinringer, forbedrer og forlenger dannelsen av kortikale aktinringer ved sfigosin-1 fosfat (SIP), hemmer RhoA, øker fosforylering av VE-kadherin, synes å aktivere barrierestabiliserende GTPases og synes å stabilisere mikrotubulus. Modulering av cytoskjelettet kan redusere vaskulær hyperpermeabilitet og øke vaskulær hypopermeabilitet (*dvs.* permeabilitet under basalnivåer), og dermed returnere

endoelet til homeostase. Følgelig kan disse sykdommene og tilstandene mediert ved vaskulær hyperpermeabilitet bli behandlet (se over) og disse sykdommene og tilstandene mediert ved vaskulær hypopermeabilitet kan også bli behandlet. Den siste typen sykdommer og tilstander inkludert aldrende lever, aterogenese, aterosklerose, cirrhose, leverfibrose, leversvikt og primær og metastatisk leverkreft.

Fremgangsmåten for å modulere endoteliale cellers cytoskjelett omfatter administrering av en effektiv mengde av en danazolforbindelse til dyret. "Danazolforbindelse" og "dyr" har de samme betydningene som nevnt ovenfor.

Effektive doseringsformer, administrasjonsmåter og doseringsmengder for forbindelsen (dvs. danazol, en prodroge av danazol eller et farmasøytisk akseptabelt salt av hver av dem) for å modulere cytoskjelettet kan bli bestemt empirisk ved å anvende anvisningen tilveiebrakt heri. Det skal forstås av fagfolk at doseringsmengden vil variere med den særlige sykdommen eller tilstanden som skal behandles, sykdommens alvorlighet eller tilstanden, administrasjonsmåten(e), behandlingens varighet, identiteten av alle andre legemidler som blir administrert til dyret, alderen, dyrets størrelse og art, og lignende faktorer kjent innen medisin og veterinærmedisin. Generelt vil en egnet daglig dose av en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen være den mengden av forbindelsen som er den laveste dosen effektiv til å gi en terapeutisk effekt. Den daglige dosen vil imidlertid bli bestemt av en behandlende lege eller veterinær innen området sunn medisinsk bedømmelse. Om ønsket kan den effektive daglige dosen bli administrert som to, tre, fire, fem, seks eller flere sub-doser, administrert separat med egnede intervaller i løpet av dagen. Administrasjon av forbindelsen må bli fortsatt til en akseptabel respons er oppnådd.

Spesielt vil en effektiv doseringsmengde av en danazolforbindelse for å modulere de endoteliale cellenes cytoskjelett være fra 0,1 ng/kg/dag til 35 mg/kg/dag, foretrukket 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 doseringsmengde vil også være den mengden som vil føre til en konsentrasjon i en relevant fluid (f.eks. blod) fra 0,0001 μM til 5 μM , foretrukket fra 0,1 μM til 1,0 μM , mer foretrukket fra 0,1 μM til 0,5 μM , mest foretrukket ca. 0,1 μM . En effektiv doseringsmengde vil også være den mengden som vil føre til en konsentrasjon i vevet eller organet som skal behandles på ca. 0,17 % (vekt/vekt) eller mindre, foretrukket fra 0,00034 % til 0,17 %, mest foretrukket 0,0034 % til 0,017 %. Når gitt topisk eller lokalt vil danazolforbindelsen foretrukket bli administrert ved en konsentrasjon fra 0,0001 μM til 5 μM , foretrukket fra 0,1 μM til 1,0 μM , mer foretrukket fra 0,1 μM til 0,5 μM , mest foretrukket ca. 0,1 μM eller ved en konsentrasjon på ca. 0,17 % (vekt/vekt) eller mindre, foretrukket fra 0,00034 % til 0,17 %, mest foretrukket 0,0034 % til 0,017 %. Når gitt oralt til et voksent menneske vil dosen

foretrukket være fra ca. 1 ng/dag til ca. 100 mg/dag, mer foretrukket vil dosen være fra ca. 1 mg/dag til ca. 100 mg/dag, mest foretrukket vil dosen være fra ca. 10 mg/dag til ca. 90 mg/dag, foretrukket gitt i to like doser per dag. Videre er danazol forventet å akkumulere i celler og vev, slik at en begynnende (start) dose (*f.eks.* 100 mg per dag) kan bli redusert etter en tidsperiode (*f.eks.* 2-4 uker) til en lavere vedlikeholdsdose (*f.eks.* 1 mg per dag) som kan bli gitt ubegrenset uten betydelige bivirkninger, kanskje uten noen bivirkninger.

Forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelsen (dvs. danazol, prodrug derav og farmasøytisk akseptable salter av hvilke som helst av dem) kan bli administrert til et pasientdyr for terapi ved enhver egnet administrasjonsvei, inkludert oralt, nasalt, parenteralt (*f.eks.* intravenøst, intraperitonealt, subkuttant eller intramuskulært), transdermalt, intraokulært og topisk (inkludert bukkalt og sublinguallt). Generelt foretrukket er oral administrasjon for enhver sykdom eller tilstand behandlingsbar ifølge oppfinnelsen. Den foretrukne administrasjonsveien for behandling av sykdommer og tilstander for øyet, er oralt, intraokulært og topisk. Mest foretrukket er oralt. Det er ganske uventet og overraskende at øyesykdommer kan bli behandlet ved oral administrasjon av en danazolforbindelse siden vellykket behandling av slike sykdommer og tilstander ved oral administrasjon av et legemiddel ikke tidligere har blitt rapportert. Den foretrukne administrasjonsveien for behandling av sykdommer og tilstander for hjernen er oralt og parenteralt. Mest foretrukket er oralt.

Selv om det er mulig for en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen å bli administrert alene, er det foretrukket å administrere forbindelsen som en farmasøytisk formulering (sammensetning). De farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen omfatter en forbindelse eller forbindelser ifølge oppfinnelsen som en aktiv ingrediens i tilsetning med en eller flere farmasøytisk akseptable bærere og eventuelt med en eller flere andre forbindelser, legemidler eller andre materialer. Hver bærer må være "akseptabel" i forstanden å være kompatibel med de andre ingrediensene ifølge formuleringen og ikke skadelig for dyret. Farmasøytisk akseptable bærere er velkjent i faget. Uavhengig av valgt administrasjonsmåte, er forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelsen formulert i farmasøytisk akseptable doseringsformer ved konvensjonelle fremgangsmåter kjent av fagfolk. Se, *f.eks.* *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Formuleringer ifølge oppfinnelsen egnet for oral administrasjon kan være i formen av hylser, kapsler, piller, tabletter, puddere, granula eller som en løsning eller en suspensjon i en vandig eller ikke-vandig væske, eller en olje-i-vann eller vann-i-olje væskeemulsjon, eller som en eliksir eller sirup, eller som pastiller (ved å anvende en inert base, slik som gelatin og glyserin, eller sukkrose og akasie), og lignende, hver

inneholdende en forhåndsbestemt mengde av en forbindelse eller forbindelser ifølge den foreliggende oppfinnelsen som en aktiv ingrediens. En forbindelse eller forbindelser ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan også bli administrert som bolus, legemiddel blandet med honning eller annet søtstoff eller pasta.

- 5 I faste doseringsformer ifølge oppfinnelsen for oral administrasjon (kapsler, tabletter, piller, dragéer, puddere, granula og lignende), blir den aktive ingrediensen (dvs. danazol, en prodroge av danazol, et farmasøytisk akseptabelt salt av hver av dem, eller kombinasjoner av de foregående) blandet med en eller flere farmasøytisk akseptable bærere, slik som natriumcitrat eller dikalsiumfosfat, og/eller enhver av følgende: (1)
- 10 fyllstoffer eller utvidere slik som stivelse, laktose, sukkrose, glukose, mannitol, og/eller kiseltsyre; (2) bindere slik som f.eks. karboksymetylcellulose, alginater, gelatin, polyvinylpyrrolidon, sukkrose og/eller akasie; (3) fuktmidler slik som glyserol; (4) oppløsende midler slik som agar-agar, kalsiumkarbonat, potet- eller tapiokastivelse, alginsyre, visse silikater, og natriumkarbonat; (5) løsningshemmende midler slik som
- 15 parafin; (6) absorpsjonsakseleratorer slik som fireverdige ammoniumforbindelser; (7) fuktighetsmidler slik som f.eks. cetylalkohol og glyserolmonostearat; (8) absorberende midler slik som kaolin og bentonitleire; (9) smøremidler slik som talkum, kalsiumstearat, magnesiumstearat, faste polyetylenglykoler, natriumlaurylsulfat, og blandinger derav; og (10) fargemidler. I tilfellet kapsler, tabletter og piller, kan
- 20 farmasøytiske sammensetninger også omfatte buffermidler. Faste sammensetninger av en lignende type kan også anvendes som fyllere i myke og harde fylte gelatinkapsler med slike eksipienser som laktose eller melkesukre samt polyetylenglykoler med høy molekylvekt og lignende.

- En tablett kan bli laget ved kompressjon eller støping eventuelt med en eller flere
- 25 tilleggsingredienser. Komprimerte tabletter kan bli fremstilt ved å anvende bindemiddel (f.eks. gelatin eller hydroksypropylmetylcellulose), smøremiddel, inert fortynningsvæske, konserveringsmiddel, disintegranter (f.eks. natriumstivelseglykolat eller krysskoblet natriumkarboksymetylcellulose), overflateaktive eller dispergeringsmiddel. Støpte tabletter kan bli laget ved å støpe i en egnet anordning en blanding av
- 30 den pudrede forbindelsen fuktet med en inert flytende fortynningsvæske.

- Tablettene og andre faste doseringsformer av de farmasøytiske sammensetningene av den foreliggende oppfinnelsen, slik som droger, kapsler, piller og granula, kan eventuelt bli merket eller fremstilt med belegg og skall, slik som enteriske belegg og andre belegg velkjent innen det farmasøytisk-formulerende faget. De kan også bli
- 35 formulert for slik å tilveiebringe sakte eller kontrollert frisetting av den aktive ingrediensen deri ved å anvende f.eks. hydroksypropylmetylcellulose i varierende forhold for å tilveiebringe den ønskede frisettingsprofilen, andre polymermatriser,

liposomer og/eller mikrosfærer. De kan bli sterilisert ved, f.eks. filtrasjon gjennom et bakteriefjernende filter. Disse sammensetningene kan også eventuelt inneholde opasiferende midler og kan også være av en sammensetning slik at de frsetter kun den aktive ingrediensen kun, eller fortrinnsvis, i en viss del av magetarmkanalen, eventuelt, på en forsinket måte. Eksempler på lagrende sammensetninger som kan bli anvendt inkluderer polymeriske substanser og vokser. Den aktive ingrediensen kan også bli i mikroinnkapslet form.

Flytende doseringsformer for oral administrasjon av forbindelsene ifølge oppfinnelsen inkluderer farmasøytisk akseptable emulsjoner, mikroemulsjoner, løsninger, suspensjoner, sirup og eliksirer. I tillegg til de aktive ingrediensene, kan de flytende doseringsformene inneholde inerte fortynningsvæsker, hovedsakelig anvendt i faget, slik som f.eks. vann eller andre løsningsmidler, løsende midler og emulgatorer slik som etanol, isopropanol, etylkarbonat, etylacetat, benzylalkohol, benzylbenzoat, propylenglykol, 1,3-butylenglykol, oljer (særlig, bommulsfrø-, jordnøtt-, mais-, kim-, oliven-, lakser-, og sesamoljer), glyserol, tetrahydrofurylalkohol, polyetylenglykoler og fettsyreestere av sorbitan, og blandinger derav.

I tillegg til inerte fortynningsvæsker, kan også sammensetningene inkludere hjelpestoffer slik som fuktemidler, emulgerende og suspenderende midler, søtnings-, smaks-, farge-, lukt- og konserveringsmidler.

Suspensjoner, i tillegg til den aktive ingrediensen, kan inneholde suspenderende midler som f.eks. etoksylerte isostearylalkoholer, polyoksyetylensorbitol og sorbitanestere, mikrocrystallincellulose, aluminiummetahydroksid, bentonitt, agar-agar og tragant og blandinger derav.

Videre beskrevet, men ikke del av oppfinnelsen er farmasøytiske produkter egnet for øyebehandling. Slike farmasøytiske produkter inkluderer farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen, anordninger og implantater (som kan være sammensetninger eller anordninger).

Farmasøytiske formuleringer (sammensetninger) for intraokulær injeksjon av en forbindelse eller forbindelser i øyeeplet inkludert løsninger, emulsjoner, suspensjoner, partikler, kapsler, mikrosfærer, liposomer, matriser etc. Se f.eks. U.S. patent nr. 6 060 463, U.S. patentsøknadpublikasjon nr. 2005/0101582, og PCT søknad WO 2004/043480. En farmasøytisk formulering for intraokulær injeksjon kan f.eks. 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, suspensjonsmidler, tykningsmidler eller viskositetsforbedrende midler (slik som en hyaluronsyre-

polymer). Eksempler på egnede vandige og ikke-vandige bærere inkluderer vann, saltvann (foretrukket 0,9 %), dekstrose i vann (foretrukket 5 %), buffere, dimetyl-sulfoksid, alkoholer og polyoler (slik som glyserol, propylenglykol, polyetylenglykol, og lignende). Disse sammensetningene kan også inneholde adjuvanser slik som

5 fuktemidler og emulgerende midler og dispergerende midler. I tillegg kan forlenget absorpsjon av den injiserbare farmasøytiske formen bli brakt rundt av inklusjonen av midler som utsetter absorpsjon slik som polymerer og gelatin. Injiserbare depotformer kan bli laget ved å innlemme legemidlet i mikrokapsler eller mikrosfærer laget av bionedbrytbare polymerer slik som polylaktid-polyglykolid. Eksempler på andre

10 bionedbrytbare polymerer inkluderer poly(ortoestere), poly(glykol) syre, poly(melke) syre, polykaprolakton og poly(anhydrider). Depotinjiserbare formuleringer blir også fremstilt ved å fordele legemidlet i liposomer (sammensatt av de vanlige ingrediensene, slik som dipalmitoylfosfatidylcholin) eller mikroemulsjoner som er kompatible med øyevæv. Avhengig av forholdet av legemiddel til polymer eller lipid, typen av de

15 særlige polymer- eller lipidkomponentene, typen anvendt liposom, og om mikrokapslene eller mikrosfærene er belagt eller ubelagt, forholdet av legemiddelfrisetting fra mikrokapsler, mikrosfærer og liposomer kan bli kontrollert.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan også bli administrert kirurgisk som et okulært implantat. En reservoarbeholder med en diffuserbar vegg av polyvinylalkohol eller

20 polyvinylacetat og inneholdende en forbindelse eller forbindelser ifølge oppfinnelsen kan f.eks. bli implantert i eller på sklera. Som et annet eksempel, kan en forbindelse eller forbindelser ifølge oppfinnelsen bli innlemmet i en polymerisk matrise laget av en polymer, slik som polykaprolakton, poly(glykol) syre, poly(melke) syre, poly(anhydrid) eller et lipid, slik som sebasinsyre og kan bli implantert på sklera eller i

25 øyet. Dette blir vanligvis fullført med at dyret mottar et topisk eller lokalt anestetikum og å anvende et lite snitt laget bak hornhinnen. Matrisen blir deretter satt inn gjennom innskjæringen og sydd fast til sklera.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan også bli administrert topisk til øyet, og en foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelse er en topisk farmasøytisk sammensetning

30 egnet for applikasjon til øyet. Topiske farmasøytiske sammensetninger egnet for applikasjon til øyet inkluderer løsninger, suspensjoner, dispersjoner, dråper, geler, hydrogeler og salver. Se f.eks. U.S. patent nr. 5 407 926 og PCT-søknader WO 2004/058289, WO 01/30337 og WO 01/68053.

Topiske formuleringer egnet for applikasjon til øyet omfatter en eller flere forbindelser

35 ifølge oppfinnelsen i en vandig eller ikke-vandig base. De topiske formuleringene kan også inkludere absorpsjonsforbedrere, gjennomtrengingsforbedrere, tykningsmidler, viskositetsforbedrere, midler for å justere og/eller vedlikeholde pH, midler for å justere

det osmotiske trykket, konserveringsmidler, surfaktanter, buffere, salter (foretrukket natriumklorid), suspensjonsmidler, dispergerende midler, løslighetsmidler, stabilisatorer og/eller tonesitetsmidler. Topiske formuleringer egnet for applikasjon til øyet vil foretrukket omfatte en absorpsjons- eller gjennomtrengingsforbeder for å fremme absorpsjonen eller gjennomtrengeligheten for forbindelsen eller forbindelsene ifølge oppfinnelsen inn i øyet og/eller et tykningsmiddel eller viskositetsforbedrer som kan øke oppholdstiden i øyet for en forbindelse eller forbindelser ifølge oppfinnelsen. Se PCT-søknader WO 2004/058289, WO 01/30337 og WO 01/68053.

Absorpsjons/gegjennomtrengelighetsforbedrere inkluderer som eksempler metysulfonylmetan, alene eller i kombinasjon med dimetylsulfoksid, karboksylsyre og surfaktanter. Eksempler på tykningsmidler og viskositetsforbedrere inkluderer dekstraner, polyetylenglykoler, polyvinylpyrrolidon, polysakkaridgeler, Gelrite®, cellulosiske polymerer (slik som hydroksypropylmetylcellulose), karboksyl-inneholdende polymerer (slik som polymerer eller kopolymerer av akrylsyre), polyvinylalkohol og hyaluronsyre eller et salt derav.

Flytende doseringsformer (f.eks. løsninger, suspensjoner, dispersjoner og dråper) egnet for behandling av øyet kan bli fremstilt, f.eks. ved å løse, dispergere, suspendere osv. en forbindelse eller forbindelser ifølge oppfinnelsen i et bindemiddel, slik som f.eks. vann, saltløsning, vandig dekstrose, glyserol, etanol og lignende for å danne en løsning, dispersjon eller suspensjon. Om ønsket kan også den farmasøytiske formuleringen inneholde mindre mengder ikke toksiske hjelpestoffer, slik som fukt- eller emulgerende midler, pH bufrende midler og lignende, f.eks. natriumacetat, sorbitanmonolaurat, trietanolaminnatriumacetat, trietanolaminoleat osv.

Vandige løsninger og suspensjoner egnet for behandling av øyet kan inkludere, i tillegg til en forbindelse eller forbindelser ifølge oppfinnelsen, konserveringsmidler, surfaktanter, buffere, salter (foretrukket natriumklorid), tonisitettsmidler og vann. Hvis suspensjoner blir anvendt, bør partikkelstørrelsen være mindre enn 10 µm for å minimere øyeirritasjon. Hvis løsninger eller suspensjoner blir anvendt, bør mengden levert til øyet ikke overskride 50 µl for å unngå for stort søl fra øyet.

Kolloidale suspensjoner egnet for behandling av øyet blir generelt dannet fra mikropartikler (dvs. mikrosfærer, nanosfærer, mikrokapsler eller nanokapsler, der mikrosfærer og nanosfærer generelt er ensrettede partikler av en polymermatrise i hvilken formuleringen blir fanget, adsorbent eller på annen måte holdt, mens med mikrokapsler og nanokapsler blir formuleringen egentlig innkapslet). Den øvre grensen for størrelsen av disse mikropartiklene er ca. 5 µ til ca. 10 µ.

Øyesalver egnet for behandling av øyet inkluderer en forbindelse eller forbindelser ifølge oppfinnelsen i en egnet base, slik som mineralolje, flytende lanolin, hvit vaselin, en kombinasjon av to eller alle tre av de foregående eller polyetylenmineraloljegel. Et konserveringsmiddel kan eventuelt bli inkludert.

- 5 Øyegeler egnet for behandling av øyet inkluderer en forbindelse eller forbindelser av oppfinnelsen suspendert i en hydrofil base, slik som Carpobol-940 eller en kombinasjon av etanol, vann og propylenglykol (*f.eks.* i et forhold på 40:40:20). Et gelstoff slik som hydroksyletylcellulose, hydroksypropylcellulose, hydroksypropylmetylcellulose eller ammoniert glykyrrizinat blir anvendt. Et konserveringsmiddel
10 og/eller et tonisitmiddel kan eventuelt bli inkludert.

- Hydrogeler egnet for behandling sv øyet blir dannet ved innlemming av en svellende, gelformende polymer, slik som disse listet over som tykningsmidler eller viskositetsforbedrere, unntatt at en formulering henvist til i faget som en "hydrogel" normalt har en høyere viskositet enn en formulering henvist til som en "tyknende"
15 løsnings eller suspensjon. I motsetning til slike foretrukne hydrogeler, kan en formulering også bli fremstilt slik for å danne en hydrogel *in situ* etter påføring på øyet. Slike geler er flytende ved romtemperatur men gel ved høyere temperaturer (og blir dermed kalt "termoreversible" hydrogeler), slik som når plassert i kontakt med kroppsvæsker. Biokompatible polymerer som gir denne egenskapen inkludert
20 akrylsyrepolymerer og kopolymerer, N-isopropylakrylamidderivater og ABA blokkopolymerer av etylenoksid og propylenoksid (konvensjonelt henvist til som "poloksamer" og tilgjengelig under merkenavnet Pluronic[®] fra BASF-Wayndotte).

Foretrukne dispersjoner er liposomale, i hvilket tilfelle formuleringene er lukket inne i liposomer (mikroskopiske bærer sammensatt av vekslende vandige rom og lipidbilag).

- 25 Øyedråper kan bli formulert med en vandig eller ikke-vandig base også omfattende et eller flere dispergerende midler, løselighetsmidler eller suspensjonsmidler. Dråper kan bli levert ved hjelp av en enkel lukkbar øyedråpeflaske eller ved hjelp av en plastflaske festet til leveringsvæskeinnholdet dråpevis ved hjelp av en spesialformet lukking.

- Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan også bli påført topisk ved hjelp av legemiddel-
30 impregnert fast bærer som blir satt inn i øyet. Legemiddelfrisetting blir generelt utført ved oppløsning eller bioerosjon av polymeren, osmose eller kombinasjoner derav. Flere matrisetypeleveringssystemer kan bli anvendt. Slike systemer inkluderer hydrofile myke kontaktlinser impregnert eller innsatt med den ønskede forbindelsen ifølge oppfinnelsen, samt bionedbrytbare eller løselige anordninger som ikke trenger å bli
35 fjernet etter at de er plassert i øyet. Disse løselige øyeinnsettingene kan bli sammensatt av enhver nedbrytbar substans som kan bli tolerert av øyet og som er kompatibel med

forbindelsen ifølge oppfinnelsen som skal administreres. Slike substanser inkluderer, men er ikke begrenset til, poly(vinylalkohol), polymerer og kopolymerer av polyakrylamid, etylakrylat og vinylpyrrolidon, samt krysskoblede polypeptider eller polysakkarider, slik som kitin.

- 5 Doseringsformer for de andre topiske administrasjonstypene (*dvs.* ikke til øyet) eller for transdermal administrasjon av forbindelser ifølge oppfinnelsen inkludert puddere, sprayer, salver, pastaer, kremer, lotions, geler, løsninger, plastre, dråper og inhalasjonsmidler. Den aktive ingrediensen kan bli blandet under sterile tilstander med en farmasøytisk akseptabel bærer og enhver buffer eller drivemiddel som kan bli krevd.
- 10 Salvene, pastaene, kremene og gelene kan inneholde, i tillegg til den aktive ingrediensen, eksipienser, slik som dyre- og plantefett, oljer, vokser, parafiner, stivelser, tragant, cellulosederivater, polyetylenglykoler, silikoner, bentonitter, kiselsyre, talkum og sinkoksid eller blandinger derav. Puddere og sprayer kan, i tillegg til den aktive ingrediensen, inneholde, eksipienser slik som laktose, talkum, kiselsyre,
- 15 aluminiumhydroksid, kalsiumsilikater og polyamidpudder eller blandinger av disse substansene. Sprayer kan videre inneholde vanlige drivemidler slik som klorfluorhydrokarboner og flyktige uerstattede hydrokarboner, slik som butan og propan. Transdermale plastre har tilleggsfordelen av å tilveiebringe kontrollert levering av forbindelser ifølge oppfinnelsen, til kroppen. Slike doseringsformer kan bli lagd ved å
- 20 løse, dispergere eller på annen måte innlemme en eller flere forbindelser ifølge oppfinnelsen i et egnet medium, slik som et elastomerisk matrisemateriale. Absorpsjonsforbedrere kan også bli anvendt for å øke strømmen av forbindelsen gjennom huden. Hastigheten av slik strøm kan kontrolleres ved enten å tilveiebringe en hastighetskontrollerende membran eller å dispergere forbindelsen i en polymermatriks eller gel. En legemiddelimpregnert fast bærer (*f.eks.* et belegg) kan også bli anvendt for
- 25 topisk administrasjon.

- Farmasøytiske formuleringer inkluderer de som er egnet for administrasjon ved inhalasjon eller insufflasjon eller for nasal administrasjon. For administrasjon til det øvre (nasale) eller nedre åndedrettssystemet ved inhalering, blir forbindelsene ifølge
- 30 oppfinnelsen enkelt levert fra et pusteapparat, forstøver eller en trykkpakning eller andre enkle midler for å levere en aerosolspray. Trykkpakninger kan omfatte et egnet drivemiddel slik som diklordifluormetan, triklorfluormetan, diklortetrafluoretan, karbondioksid eller andre egnede gasser. Ved en trykkaerosol, kan doseringsenheten bli bestemt ved å tilveiebringe en ventil som leverer en målt mengde.

- 35 Alternativt kan sammensetningen for administrasjon ved inhalasjon eller insufflasjon, bestå av et tørt pudder, *f.eks.* en pudderblanding av en eller flere forbindelser ifølge oppfinnelsen og en egnet pudderbase, slik som laktose eller stivelse.

Puddersammensetningen kan være tilstede i enhetsdoseringsform i, f.eks. kapsler eller beholdere, eller, *f.eks.* gelatin eller blisterpakker fra hvilke pudderet kan bli administrert med hjelpen av en inhalator, pusteapparat eller en målt-dose inhalator.

5 For intranasal administrasjon, kan forbindelser ifølge oppfinnelsen bli administrert ved hjelp av nesesdråper eller en flytende spray, slik som ved hjelp av en plastsprayflaske eller målt-dose innhalator. Flytende sprayer blir enkelt levert fra trykkipakninger. Vanlige sprayflasker er Mistometer (Wintrop) og Medihaler (Riker).

10 Nesesdråper kan bli formulert med en vandig eller ikke-vandig base også omfattende et eller flere dispergerende midler, løselighetsmidler eller suspensjonsmidler. Dråper kan bli levert ved hjelp av en enkel lukkbar øyedråpeflaske eller ved hjelp av en plastflaske festet til leveringsvæskeinnholdet dråpevis ved hjelp av en spesialformet lukking.

15 Farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen som er egnet for parenterale administrasjoner 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 puddere som kan bli rekonstituert i sterile injiserbare løsninger eller dispersjoner rett før anvendelse som kan inneholde antioksidanter, bufre, oppløste stoffer som gjør formuleringen isoton med den tiltenkte mottakerens blod eller suspenderende eller tyknende midler. Legemiddelbelagte stenter kan også bli anvendt.

20 Eksempler på egnede vandige og ikke-vandige bærere som kan bli anvendt i de farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen inkluderer vann, etanol, polyoler (slik som glyserol, propylenglykol, polyetylglykol, og lignende), og egnede blandinger derav, planteoljer, slik som olivenolje og injiserbare organiske estere, slik som etyloleat. Egnert viskositet kan bli vedlikeholdt, f.eks. ved anvendelsen av beleggsmaterialer, slik som lecitin, ved vedlikehold av den krevde partikkelstørrelsen i 25 tilfellet dispersjoner, og ved anvendelsen av surfaktanter.

Disse sammensetningene kan også inneholde adjuvanter slik som fuktemidler, emulgerende midler og dispergerende midler. Det kan også være ønsket å inkludere isotone midler, slik som sukre, natriumklorid, og lignende i sammensetningene. I 30 tillegg kan forlenget absorpsjon av den injiserbare farmasøytiske formen bli brakt rundt av inklusjonen av midler som utsetter absorpsjon slik som aluminiummonostearat og gelatin.

For å forlenge effekten av et legemiddel, er det i enkelte tilfeller ønskelig å saktne legemidlets absorpsjonen fra subkutan eller intramuskulær injeksjon. Dette kan bli 35 oppnådd ved bruken av en flytende suspensjon av krystallinsk eller amorft materiale

med dårlig oppløsning i vann. Hastigheten av legemiddelabsorpsjonen avhenger da av dens oppløsningshastighet som, i sin tur kan avhenge av krystallstørrelse og krystallform. Alternativt, blir forlenget absorpsjon av et parenteralt administrert legemiddel oppnådd ved å løse opp eller suspendere forbindelsen i et oljebindemiddel.

- 5 Injiserbare depotformer blir gjort ved å forme mikroinnkapslende matrikser av legemidlet i bionedbrytbare polymerer slik som polylaktidpolyglykolid. Avhengig av hastigheten av legemiddel til polymer og egenskapene av den særlige anvendte polymeren, kan hastigheten av legemiddelfrisetting kontrolleres. Eksempler på andre bionedbrytbare polymerer inkluderer poly(ortoestere) og poly(anhydrider). Injiserbare depotformuleringer blir også fremstilt ved å fordele legemidlet i liposomer eller
10 mikroemulsjoner som er compatible med kroppsvev. De injiserbare materialene kan bli sterilisert ved, f.eks. filtrasjon gjennom et bakteriefjernende filter.

- Formuleringene kan være tilstede i enhetsdose eller multidose forseglede beholdere, f.eks. ampuller og flasker, og kan bli oppbevart i en frysetørket tilstand som kun krever
15 tilsettingen av den sterile væskebæreren, f.eks. vann for injeksjon, umiddelbart før anvendelse. Improviserte injeksjonsløsninger og suspensjoner kan bli fremstilt fra sterile puddere, granula og tabletter av typen beskrevet ovenfor.

- En danazolforbindelse kan bli gitt alene for å behandle en sykdom eller tilstand som involverer vaskulær hyperpermeabilitet eller dysfunksjon av cytoskjelettet. Alternativt
20 kan danazolforbindelsen bli gitt i kombinasjon med en eller flere andre behandlinger eller legemidler egnet for å behandle sykdommen eller tilstanden. Danazolforbindelsen kan f.eks. bli administrert før, sammen med (inkludert samtidig med), eller etter den andre behandlingen eller legemidlet. I tilfellet et annet legemiddel, kan legemidlet og danazolforbindelsen bli administrert i forskjellige farmasøytiske sammensetninger eller
25 som del av den samme farmasøytiske sammensetningen. Egnede legemidler blir beskrevet i U.S. patentsøknadsnummer 12/820 325.

Som anvendt heri betyr “en”, “ei” eller “et” en eller flere.

- Ytterligere hensikter, fordeler og nye funksjoner ifølge den foreliggende oppfinnelsen vil være tydelig for fagfolk ved vurdering av de følgende ikke-begrensede
30 eksemplene.

EKSEMPLER

Eksempel 1: Danazols effekter på angiogenese (Sammenlignende)

A. HUVEC celleformering

Protokoll:

Primære humane endoteliale celler fra navlestrengsvene (HUVECs) og EGM-2 vekstmedium ble skaffet fra Cambrex (Walkersville, MD). Cellene ble passert i medium supplert med 2 % serum fra kalvefoster (FCS) i vevskulturflasker ved 37 °C og 5 % CO₂. Subkulturering ble utført ved å anvende trypsin når 60-80 % sammen-

løpning var oppnådd som spesifisert av leverandøren.

Cryobevarte ampuller for passering av 2 HUVECer ble tint og plassert i 96 brønners vevskulturplater med 5000 celler/cm². En 50 mM stamløsning 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 inneholder sluttkonsentrasjonene av danazol i området fra 0,1 til 100 µM i triplikater. 24, 48 og 72 timers inkubasjoner ble utført og celleformeringen ble bestemt ved å benytte Celltiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation-analysen fra Promega (Madison, WI). Kort sagt ble mediet aspirert fra hver brønn og cellene ble vasket med 200 µl Hepes bufret saltvann (HBSS) fra Cambrex varmet til 37 °C. 100 µl fortynnet celletiterløsning (15 µl stam + 85 µl EGM-2 som inneholder 0,1 % FCS) ble satt til hver brønn og inkubert i ytterligere 4 timer. Optisk tetthet ble bestemt med mikroplateleser ved å anvende et 530 nm filter etter fratrekking av blank og data vist som OD ± standardavvik. Sluttkonsentrasjonen av etanol i brønnene var mindre enn 0,2 % og hadde ingen effekt på celleformeringen eller levedyktigheten.

Alle data er vist som representative eksperimenter utført i triplikat. Forskjeller mellom delmengder ble analysert ved å anvende student t-test i Microsoft Excel. P < 0,05 ble ansett statistisk signifikant.

Resultater, observasjoner og diskusjon:

Å kulture primære HUVECer i nærværet av danazol reduserte det oppnådde OD fra Promega celletiterformeringanalysen på en tids og doseavhengig måte (figur 1). Celletiteranalysen er basert på reduksjonen av analyseløsningen med dehydrogenaseenzymer til en formazanfarge som direkte korrelerer til celleantall.

Danazolbehandling ved 24 timer synes å være effektivt kun ved svært høye doser. Signifikant reduksjon (p-verdi < 0,05) i analyse OD ble sett ved 10 µM eller større konsentrasjoner av danazol. Den påviste OD i nullbrønnene ble 0,414 ± 0,06 og behandling med 10 µM danazol reduserte OD til 0,288 ± 0,037 mens 100 µM til 0,162 ± 0,017, tilsvarende prosent hemming på henholdsvis 30 % og 65 %.

Ved 48 timer var den observerte hemmingen signifikant selv ved nivåer på 1 μM . Den oppnådde nullavlesningen etter 48 timer i kultur økte til $0,629 \pm 0,095$ og ble redusert til $0,378 \pm 0,037$ by 1 μM , $0,241 \pm 0,012$ ved 10 μM og $0,19 \pm 0,033$ ved 100 μM (eller prosent hemming på henholdsvis 40 %, 61 % og 70 %).

- 5 Etter 72 timer viste alle testede danazolbehandlinger signifikant reduksjon i HUVEC-formering. Oppnådd OD i nullbrønnene var $1,113 \pm 0,054$ og etter 0,1 μM behandling falt til $0,798 \pm 0,037$, 1 μM til $0,484 \pm 0,022$, 10 μM til $0,229 \pm 0,016$ og 100 μM til $0,156 \pm 0,018$ (hemming på henholdsvis 28 %, 57 %, 80 % og 86 %).

- 10 Undersøkelse av oppnådd OD fra alle 100 μM danazoldoser var konstant ved alle tidspunkter og indikerer en fullstendig stopp av celleformering ved denne konsentrasjonen.

Sammenfattet viste danazol sterk hemming av endotelial celleformering.

B. HUVEC rørdannelse

Protokoll:

- 15 For å undersøke dannelsen av kapillærlignende strukturer av HUVECer, ble angiogenesesystemet: Endothelial Cell Tube Formation Assay kjøpt fra BD Biosciences (San Jose, CA) og anvendt ifølge produsentens protokoll. Kort sagt ble 100 000 HUVECer sådd på rehydrerte matrigelplugger i 96 brønners vevskulturplater i nærværet av 5 % FCS for å indusere rørdannelse. Danazol ble tilsatt til sluttkonsentra-
- 20 sjoner på 1 μM , 10 μM eller 50 μM og LY294002 (positiv kontroll) ble tilsatt med 50 μM . Etter 18 timer ble brønnene fotografert ved å anvende et Kodak DCS Pro SLR/N digitalt kamera (Rochester, NY) montert på et omvendt mikroskop. Etanolbehandlede brønner ble inkludert til å bestemme om bindemidlet hadde noen effekter på celledifferensiering.

- 25 **Resultater, observasjoner og diskusjon:**

- For å belyse om danazol kan hindre dannelsen av rørlignende strukturer av HUVEC, ble 96 brønns plater som inneholder matrigelplugger anvendt. Endoteliale celler vil differensiere i strukturer som ligner litt på kapillærrør når de blir dyrket i nærværet av angiogene substanser og forsynt med et ekstracellulært matriseskjelett. HUVECer
- 30 dyrket med danazol viste færre organiserte strukturer med tynne og mindre definerte sammenkoblinger enn kontroller (se figur 2, i hvilken A = kontroll, B = 1 μM danazol, C = 10 μM danazol, D = 50 μM danazol og E = 50 μM LY294002). Behandling med 50 μM danazol førte til isolerte kolonier av HUVEC plassert i pluggen med svært få, tynne forbindelser eller rørhulromavstander. Effekten av danazol var svært lik den

positive kontrollforbindelsen LY294002. For å sikre at det anvendte bindemidlet ikke hadde effekt, ble brønner behandlet med etanol ved konsentrasjoner tilsvarende den høyeste dosen danazol anvendt og ingen effekt på rørdannelsen ble observert (data ikke vist). Disse data indikerer at danazol er en effektiv hemmer av rørdannelse ved 50 μM .

5 Danazol hadde ingen effekt på rørdannelse ved 1 μM eller 10 μM .

C. HUVEC-invasjon

Protokoll:

BioCoat Matrigel Invasion Chambers ble kjøpt fra BD Biosciences (San Jose, CA). Innlegg ble rehydrert ved 37 °C med 500 μl HBSS i 2 timer før å anvende i fuktet inkubator. Trypsiniserter HUVECs ble vasket to ganger med varm EGM-2 inne-
10 holdende 0,1 % FCS og satt til det øvre kammeret av invasjoninnlegget ved 100 000 celler i et totalt volum på 250 μl . Danazol og kontrollforbindelser ble satt til det øvre reservoaret til sluttkonsentrasjoner på 10 μM og 100 μM . 750 μl EGM-2 supplert med 5 % FCS ble satt til bunnkammeret for å initiere invasjon og platene ble inkubert i 24
15 timer. Ikke-invaderende celler ble fjernet fra det øvre kammeret med fuktede bomullspinner og så ble innleggene vasket to ganger med HBSS. Innleggene ble så blandet i 10 μM kalcein AM fremstilt i HBSS og inkubert i 4 timer. Fluorescens ble bestemt i en mikroplateleser ved 485 nm eksitasjon og 595 nm emisjon. LY294002 og den strukturelt like men inaktive forbindelsen LY303511 tjente henholdsvis som
20 positive og negative kontroller for dette eksperimentet.

Resultater:

Resultatene blir vist i figur 3. Alle data er presentert som representativt eksperiment utført i triplikat. Forskjeller mellom delmengder ble analysert ved å anvende student t-test i Microsoft Excel. $P < 0,05$ ble ansett statistisk signifikant.

25 Porøse, matrigelbelagte innlegg ble anvendt for å bestemme om danazol kan interferere med invasjonen eller migrasjonen av endoteliale celler (figur 3). I systemet som ble anvendt for studien, ble en signifikant økning i celler påvist av fluorescerende farge etter tilsetningen av FCS til kammeret motsatt de endoteliale cellene ($5674 \text{ FU} \pm 77$ til 7143 ± 516). Danazol ved konsentrasjoner på 10 μM og 100 μM hadde ingen effekt,
30 mens LY294002 viste nesten fullstendig demping av celleinvasjon (5814 ± 153). Disse data indikerer at faktorer som finnes i FCS induserer produksjonen av HUVECs av protease som fordøyer ekstracellulær matrise fulgt av migrering langs en kjemotaktisk gradient. Danazol har ingen tydelig hemmingseffekt på invasjon og migrasjon av HUVECs i denne modellen.

D. HUVEC-migrasjon

Protokoll:

Analyser ble utført for å bestemme effekten av danazol på migreringen av HUVECer i en rispemigreringsanalyse. Passering 8 HUVECer, lotnummer 8750 (skaffet fra
 5 Lonza), ble plassert i 6-brønns plater (ICS BioExpress) i endotelialt vekstmedium-2 (EGM-2) komplett medium (skaffet fra Lonza). Platene ble dyrket i en 37 °C inkubator med og 5 % CO₂ i 48-72 timer for å oppnå sammenløpende monolag. Monolagene ble så ”rispet” med en 1000 µl pipettespiss og vasket to ganger med varmt EGM-2-medium. Det siste vaskemediet ble aspirert og byttet ut med friskt EGM-2-medium
 10 eller friskt EGM-2-medium som inneholder et område konsentrasjoner av danazolkonsentrasjoner (Sigma, # D8399). Fotografier av de skadde monolagene ble tatt og platene ble inkubert i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂ for nye 24 timer. Brønnene ble fotografert på nytt. Rommene ble målt i hvert fotografi med Adobe Photoshop-programvare og rommålingene er vist som antallet piksler i rommet.

Resultater:

Resultatene av tre separate eksperimenter blir presentert i tabell 1 nedenfor. Som det fremgår fra tabell 1, ble danazol, ved 50 µM, 75 µM og 100 µM funnet å signifikant
 20 hemme HUVEC-migrering i denne analysen. EGM-2-kulturmediet anvendt i denne analysen inneholder en cocktail av vekstfaktorer sammenlignet med FCS anvendt i Matrigel-modellen beskrevet i del C over. Denne forskjellen i vekstfaktorene kan stå for forskjellen i resultatene oppnådd ved å anvende de to modellene.

Tabell 1

Forbindelse(r)	Danazol konsentrasjon	Gjennomsnitt piksler	Gjennomsnitt % hemming	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

Forbindelse(r)	Danazol konsentrasjon	Gjennomsnitt piksler	Gjennomsnitt % hemming	STD	SEM
Danazol	75 μ M	317,33	74,62	6,80	3,93
Danazol	100 μ M	178,67	85,90	0,92	0,53

Eksempel 2: Danazoleffekt på vaskulær permeabilitet av HUVEC monolag

Protokoll:

Analysen ble utført for å bestemme effekten av danazol på permeabilitet av HUVEC monolag. Passering 5-10 HUVECer, lotnummer 7016 (skafet fra Lonza), ble sådd på 1-mikron porestørrelseinnlegg plassert i brønnene på en 24-brønns plate (Greiner BioOne 24-well Thincert cellekulturinnlegg, #662610 eller ISC BioExpress, # T-3300-15) ved å anvende endotelialt vekstmedium-2 (EGM-2) (kaffet fra Lonza). Platene ble kultureret i en inkubator med 37 °C og 5 % CO₂ i 48-72 timer for å oppnå konfluens og utvikle tette monolag. Mediet ble så fjernet og byttet ut med friskt medium eller friskt medium som inneholder et område danazolkonsentrasjoner (Sigma, # D8399).

Tumornekrosefaktor α (TNF α ; Pierce Biotechnology, # RTNFA1) og interleukin-1 β (IL-1 β ; Sigma, # I-9401) ble satt til egnede brønner med sluttkonsentrasjoner på 10 ng/ml hver. TNF α og IL-1 β induserer permeabilitet; de kan føre til opp til ti ganger økning i permeabilitet. Til slutt ble streptavidin konjugert til pepperrotperoksidase (HRP) (Pierce Biotechnology, # N100, 1,25 mg/ml) satt til hver brønn ved en sluttfortynning på 1:250. HRP er et stort molekyl med en molekylvekt på ca. 44 000. Sluttvolumene var 300 μ l i de over kamrene og 700 μ l i bunnkamrene til hver brønn. Platene ble inkubert i ytterligere 24 timer i inkubatoren med 37 °C og 5 % CO₂. Etter denne inkuberingen ble innleggene fjernet og kassert. Visuell undersøkelse av cellene på innleggene indikerte at alle monolagene fortsatt var intakt.

For å evaluere HRP gjennomstrøm ble 15 μ l av de resulterende løsningene i bunnkamrene overført til 96-brønns ELISA-plater (hver reaksjon utført i triplikat). Så ble 100 μ l tetrametylbenzidin (TMB)-løsning (Pierce) satt til hver brønn og fargen ble utviklet i 5 minutter ved romtemperatur. Fargeutvikling ble stoppet ved å sette til 100 μ l 0,18 N syreløsning. OD ble bestemt for hver brønn ved å anvende en mikroplateleser innstilt på 450 nm minus 530 nm. Den foreliggende hemmingen av permeabilitet ble beregnet mot kontroller og gjennomsnittene for tre separate eksperimenter er presentert i tabell 2.

Som det fremgår av tabell 2, økte faktisk danazol ved konsentrasjoner på 25,0 μM eller høyere vaskulær permeabilitet. En konsentrasjon på 10,0 μM hadde liten eller ingen effekt på vaskulær permeabilitet. Danazol ved konsentrasjoner fra 0,1 μM til 5,0 μM med 0,1 μM til 0,5 μM var optimalt, reduserte vaskulær permeabilitet.

5 Doseresponskurven er svært interessant da det er en andre hemmingstopp ved konsentrasjoner fra 0,001 μM (eller kanskje også lavere) til 0,005 μM . Derfor viser danazol en svært overraskende og uventet doseresponskurve for vaskulær permeabilitet.

10 Som vist i eksempel 1, vil en konsentrasjon fra 50 μM til 100 μM være nødvendig for å oppnå hemming av HUVEC-formering, migrering og rørdannelse etter 18-24 timer inkubasjon med danazol. Som vist i dette eksempel 2, vil disse optimale konsentrasjonene av hemmende angiogenese dramatisk øke vaskulær permeabilitet etter 24 timer (se tabell 2). Omvendt har optimale konsentrasjoner for anvendelse for å hemme vaskulær permeabilitet (0,1 μM til 0,5 μM) ubetydelige effekter på
15 angiogenese ved 24 timer.

Tabell 2

Forbindelse(r)	Danazolkonsentrasjon	Gjennomsnitt % hemming	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

Forbindelse(r)	Danazolkonsentrasjon	Gjennomsnitt % hemming	STD	SEM
Danazol	25,0 μ M	-1,06	22,60	11,30
Danazol	50,0 μ M	-377,36	384,50	171,95
TNF α + IL-1 β + Danazol	0,1 μ M	31,30	25,26	12,63
TNF α + IL-1 β + Danazol	1,0 μ M	29,22	16,17	7,23
TNF α + IL-1 β + Danazol	10,0 μ M	8,47	20,45	9,14
TNF α + IL-1 β + Danazol	25,0 μ M	-39,93	15,53	7,76
TNF α + IL-1 β + Danazol	50,0 μ M	-117,16	29,20	14,60

Eksempel 3: Danazoleffekt på vaskulær permeabilitet

Passering 9 humane endoteliale celler fra netthinnen (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA) ble passert i EGM-2 medium (Lonza, Walckersville, MD) til 80 % sammenløpning ble oppnådd. Cellene ble så frisatt fra
 5 passeringsflasken ved å anvende Trypsin-EDTA, og cellene i den resulterende suspensjonen ble talt for å bestemme både levedyktighet og celleantall. Levedyktighet for cellesuspensjonen var større enn 90 % i dette eksperimentet.

Cellene ble så sådd på innlegg (1 mikron porestørrelse) plassert i brønnene på en 24-brønns plate (Greiner BioOne 24-well Thincert cellekulturinnlegg, #662610) i 300 μ l
 10 EGM-2 komplett medium (skaffet fra Lonza). Så ble 700 μ l EGM-2 plassert i bunnkammeret og platene ble dyrket i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂ i 48 timer for å oppnå sammenløpende monolag. Transendotelial elektrisk resistans (TER)-målinger ble tatt med en STX 100 elektrode festet til EVOM² voltohmmeter (begge fra World Precision Instruments) for alle innlegg for å bekrefte etablering av en semipermeabel

barriere. For å utføre målingene ble en probe plassert i hver brønn med en elektrode i det øvre kammeret og en i det nedre kammeret.

Så ble cellene behandlet i duplikat som følger. EGM-2 medium ble forsiktig dekantert fra innleggene og byttet med IMDM-medium som inneholder 0,5 % serum fra

5 storfoster og EGM-2-tilskudd, bortsett fra VEGF og hydrokortison (alle fra Lonza). I noen brønner inneholdt IMDM-medium danazol (Sigma, # D8399) i en ti ganger seriefortynning. Platene ble inkubert i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂ i fire timer før 30 µl av en løsning som inneholder 4 % fluorescensmerket humant serumalbumin ble satt til det øvre kammeret til hver brønn. Platene ble inkubert i en 37 °C inkubator med

10 Etter denne inkubasjonen, ble innleggene fjernet og kassert og 200 µl av mediet fra bunnkammeret ble overført til 96-brønns svarte fluorplater (Falcon) i triplikat.

Fluorescensen fra hver brønn ble så målt ved en eksitasjonsbølgelengde på 340 nm og en emisjonsbølgelengde på 470 nm. Gjennomsnittlig fluorescensenhet (FU) for hvert

15 innlegg ble så beregnet og duplikate avlesinger ble gjennomsnittsberegnet. Resultatene vises i tabell 3.

Tabell 3

Danazolkonsentrasjon	Gjennomsnittlig FU	STD
Ingen	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

Som det fremgår ga den laveste konsentrasjonen danazol (0,01 µM) den største hemmingen (ca. 10 %). Kontrollbrønner utført uten celler ga over 4000 FU i det nedre

20 kammeret og viser at de endoteliale monolagene fra netthinnen var selektivt permeable.

Eksempel 4: Effekt av Danazol på TER av tre forskjellige endoteliale cellemonolag

Analysen ble utført for å bestemme effekten av danazol på transendotelial elektrisk resistans (TER) på humane endoteliale celler fra netthinne (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA). For å gjøre det ble 150 000 passering 14 humane endoteliale celler fra netthinne sådd på innlegg (1 mikron porestørrelse) plassert i brønnene på en 24-brønns plate (Greiner BioOne 24-well Thincert cellekulturinnlegg, #662610) i 300 µl EGM-2 komplett medium (skaffet fra Lonza). Så ble platene kulturert i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂ i 24 timer. Etter inkubasjonen ble kulturmediet forsiktig dekantert og byttet med enten frisk EGM-2 eller frisk EGM-2 som inneholder danazol ved en sluttkonsentrasjon på 1 µM. Platene ble plassert tilbake i inkubatoren og kulturert i ytterligere 144 timer. Analyser ble også utført på samme måte ved å anvende passering 8 humane endoteliale celler fra hjerne og passering 8 humane endoteliale celler fra navlestrengene.

En første TER-måling ble tatt for hvert innlegg ved å anvende EVOM² voltohmmeter koblet til en STX100 elektrode (begge fra World Precision Instruments). Målinger ble også utført ved 24, 48, 72 og 144 timer. Resultatene vises i tabell 4, 5 og 6 nedenfor. Alle data er vist som TER målinger/cm² av innlegg med TER av blankinnlegg trukket fra.

Tabell 4

Humane endoteliale celler fra netthinne					
Danazolkonsentrasjon	0 timer	24 timer	48 timer	72 timer	144 timer
Ingen	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 endoteliale celler fra hjerne					
Danazolkonsentrasjon	0 timer	24 timer	48 timer	72 timer	144 timer
Ingen	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 endoteliale celler fra navlestrengvene					
Danazolkonsentrasjon	0 timer	24 timer	48 timer	72 timer	144 timer
Ingen	82,3	217,2	276,3	226,8	227,3
1,0 μ M	70,2	246,0	364,1	270,7	286,4

Som det fremgår forbedret danazol TER målinger (reduisert ionepermeabilitet) i endoteliale cellemonolag fra netthinnen og navlestrengvenen. Danazol viste å ikke ha stor effekt på TER for endoteliale cellemonolag fra hjernen bortsett fra ved det tidligste tidspunktet. TER er en måling av den elektriske resistansen over cellulære monolag. Det er en indikasjon på barriereintegritet og korrelerer med ionepermeabilitet.

Eksempel 5: Danazoleffekt på Akt fosforylering

Analyser ble utført for å bestemme effekten av danazol på fosforylering av Akt på humane endoteliale celler fra netthinne (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA). Cellene ble dyrket i en 25 cm² flaske til nær sammenføyning i EGM-2 medium (Lonza, Walkersville, MD) som inneholder 2 % serum fra kalvefoster (Lonza). Cellene ble så frisatt fra passeringsflasken ved å anvende Trypsin/EDTA. Cellene i den resulterende suspensjonen ble talt og sådd på en 96-brønns plate ved 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 danazol tilsatt og platene ble inkubert i ytterligere 2 timer. Etter denne inkubasjonen ble cellene umiddelbart fiksert med 4 % formaldehyd, nedkjølt, og graden fosforylering av Akt bestemt ved å anvende Akt Cellular Activation of Signaling ELISA Kit (CASE™ Kit for AKT S473; SABiosciences, Frederick, MD) ved å følge produsentens protokoller. CASE™ Kit for AKT S473 kvantifiserer mengden aktivert (fosforylert) Akt protein i forhold til total Akt-protein i parallellanalyser ved å benytte et konvensjonelt ELISA format med kolorimetrisk påvisning. Akt-fosforyleringsstedet er serine 473 og ble gjenkjent av et av antisoffene som ble anvendt i en av de to parallellanalysene for å tilveiebringe en måling av aktivert Akt-protein. Det andre antistoffet som ble anvendt i den andre parallellanalysen gjenkjenner Akt for å tilveiebringe en måling av totalt Akt-protein. Begge primære antistoffer blir påvist ved å anvende et pepperrotperoksidasemerke sekundært

antistoff. Tilsetting av produsentens utviklingsløsning i 10 minutter fulgt av tilsetting av produsentens stoppløsning, fremstiller resultatet som kan bli målt kolorimetrisk.

Resultatene blir vist i tabell 7 nedenfor. Som det fremgår medførte alle konsentrasjonene av danazol en økning i Akt fosforylering (aktivering).

5

Tabell 7

BEHANDLING	PROSENT ØKNING I AKT FOSFORYLERING MOT KONTROLL	STANDARDVARIASJON
0,5 µM danazol	73,8 %	92,9 %
1,0 µM danazol	66,7 %	11,7 %
2,0 µM danazol	101,6 %	9,1 %
5,0 µM danazol	40,5 %	17,7 %
10,0 µM danazol	115,3 %	112,9 %
20,0 µM danazol	161,3 %	128,7 %
50,0 µM danazol	98,6 %	61,2 %

Man tror at disse resultatene tilveiebringer en mulig forklaring for den vaskulære permeabilitetsdose responskurven oppnådd i eksempel 2. Som vist i eksempel 2, reduserer lave doser danazol permeabilitet, mens høye doser øker permeabilitet. Man tror at et visst fosforyleringsnivå av Akt ved S473 reduserer permeabilitet (0,5-5,0 µM konsentrasjonene i dette eksperimentet), mens hyperfosforylering av Akt ved S473 medfører økt permeabilitet (10-50 µM konsentrasjonene i dette eksperimentet).

Eksempel 6: Effek av danazol og steroide reseptorantagonister på TER av endoteliale cellemonolag fra netthinne

Analyser ble utført for å bestemme effekten av danazol og steroidreseptorantagonister på transendotelial elektrisk resistans (TER) på humane endoteliale celler fra netthinne (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA). For å gjøre det, ble Greiner vevskultur brønninnlegg (Greiner BioOne 24-well Thincert cellekulturinnlegg, #662610) belagt med 5 µg/cm² fibronektin (Sigma). Så ble

passering 12 humane endoteliale celler fra netthinne sådd i brønnenes øvre kammer ved 120 000 celler per innlegg i et volum på 300 µl av EGM-2-medium (Lonza). Volumet for det nedre kammeret var 700 µl EGM-2-medium (Lonza). Platene ble dyrket i en 37 °C inkubator med og 5 % CO₂ i 48 timer for å etablere intakte monolag. På slutten av inkubasjonen ble TER-målinger tatt ved å anvende en STX 2 probe festet til EVOM² voltohmmeter (begge fra World Precision Instruments) for alle innlegg for å bekrefte integritet av den endoteliale barrieren. Alle innlegg viste forhøyet resistans sammenlignet med innlegg uten celler.

så ble kulturmediet forsiktig dekantert og byttet med frisk EGM-2, med og uten noen tilsetninger. Tilsetningene var danazol, hydroksyflutamid (androgen reseptorantagonist), fluvestrant (østrogenantagonist) og PI3 kinasehemmer LY 294002 (kontroll). Stam-løsninger av alle tilsetningene, bortsett fra danazol, ble laget ved 10 mM i DMSO. Danazolstamløsningen var 10 mM i etanol. 200 µM arbeidsfortynninger av alle tilsetninger ble laget i samme løsningsmiddel. Så ble 200 nM-fortynninger av hver tilsetning og av like fortynninger av etanol og DMSO (kontroller), laget i EGM-2-medium, og danazol og hver av de andre tilsetningene eller medium (kontroll) ble tilsatt brønnene i kombinasjonene og sluttkonsentrasjonene vist i tabellen nedenfor. Platene ble så plassert tilbake i inkubatoren og TER-målinger ble tatt som beskrevet over for hvert innlegg ved 30 minutter, 60 minutter, 120 minutter og 24 timer. TER ble beregnet ved å trekke fra bakgrunnsmålingen (tomt innlegg) fra avlesningen av et innlegg og dividere med overflaten for hvert innlegg (0,33 cm²). Resultatene blir vist i tabell 8 nedenfor.

Tabell 8

Behandling	TER ved 30 minutter	TER ved 60 minutter	TER ved 120 minutter	TER ved 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

Behandling	TER ved 30 minutter	TER ved 60 minutter	TER ved 120 minutter	TER ved 24 timer
0,1 μ M fluvestrant fulgt av 0,1 μ M danazol	195,20	309,31	255,26	393,39
10,0 μ M LY294002	297,30	354,35	276,28	345,35
10,0 μ M LY294002 fulgt av 0,1 μ M danazol	243,24	342,34	270,27	336,34

Som det fremgår av tabell 8, økte danazol og fluvestrant TER-målingene (reduisert permeabilitet), mens hydroksyflutamid reduserte avlesningene (økt permeabilitet), sammenlignet med kontrollen (ingen behandling). Danazol forhindret reduksjonen forårsaket av hydroksyflutamid. Dette kunne være beviset på at danazol okkuperer androgenreseptoren i disse cellene. Danazol og fluvestrant viste additive resultater ved enkelte tidspunkter.

Eksempel 7: Effekt av danazol på aktin stressfiberdannelse

IEJer for den særlige banen inkluderer AJer og TJer. Aktincytoskjelettet er bundet til hver forbindelse og kontrollerer integriteten for forbindelsene gjennom aktinomforming. Reorganisering av aktinfilamenter til stressfibre resulterer i påføring av mekaniske krefter til forbindelsene som drar den fra hverandre, medfører cellulær kontraksjon og endringer i morfologi. Prosessen for aktinpolymerisering er svært dynamisk, som tillater den raske reorganiseringen av aktinstrukturer og overgang fra den urørlige fenotypen, kjennetegnet av tykk kortikal aktinring og fraværet av stressfibre til den aktiverte cellefenotypen med tynn eller ingen kortikal aktin og rikelig stressfibre. Aktincytoskjelettet viser også å være involvert i transcytose, kanskje ved å regulere bevegelsen av caveoler.

Humane endoteliale celler fra netthinne (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA) ble sådd i Falcon Optilux analyseplater (BD Biosciences) ved 1000 celler per brønn i et totalt volum på 200 μ l EGM-2-medium (Lonza). Platene ble kulturert i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂ i 48 timer. Så ble mediet fjernet og byttet med 200 μ l IMDM-medium supplert med 0,1 % serum fra storfefoster (alle fra Lonza), og cellene ble kulturert under disse vekstfaktor- og serumsultne tilstandene i en time for å undertrykke aktinpolymerisering. Så ble danazol (0,1 μ M eller 10 μ M sluttkonsentrasjoner) eller PI3 kinasehemmer LY294002 (10 μ M sluttkonsentrasjon)

(positiv kontroll) tilsatt. Umiddelbart etter tilsetning av disse forbindelsene ble TNF α (sluttkonsentrasjon på 50 ng/ml) tilsatt. Etter inkubering i 30 minutter i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂, ble mediet aspirert og cellene ble fiksert med 3,6 % formaldehyd i fosfatbufret saltvann (PBS) i ti minutter ved romtemperatur. Alle
 5 brønnene ble så vasket to ganger med 100 μ l PBS. Cellene ble permeabilisert ved å anvende 0,1 % Triton X-100 i PBS i 5 minutter. Alle brønnene 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 å farge for F-aktin og forble på cellene i 20 minutter ved romtemperatur. Alle brønnene ble så vasket to ganger med 100 μ l PBS. Så ble 100 μ l
 10 PBS tilsatt hver brønn og cellene ble observert og fotografert ved anvendelse av et omvendt mikroskop med rhodaminfiltre (ex530/em590).

Resultatene viste at danazol påvirket stressfibrenes evne til å utvikles. Når behandlet med danazol viste cellene forskjellige fargemønstre, avhengig av doseringen. Ved den lavere danazoldosen (0,1 μ M), ble diffus farging gjennom cytoplasmet observert, mulig
 15 indikativ for en stabiliseringshendelse eller en hvilende fenotype. Ved den høye danazoldosen (10,0 μ M), ble stressfibere med mange fokalpunkter påvist. Disse funnene korrelerer med tidligere resultater (se tidligere eksempler) at lavere danazoldoser hemmer permeabilitet og høyere danazoldoser øker permeabilitet. TNF α stimulerte cellene og førte til sterk stressfiberutvikling med intenst fargede fokale
 20 punkter. Danazol og LY294002 reduserte antallet celler som viser stressfiberutvikling med TNF α .

Eksempel 8: Effekt av danazol på aktin stressfiberdannelse

Humane endoteliale celler fra netthinne (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA) ble sådd i Falcon Optilux analyseplater (BD Biosciences)
 25 belagt med 1 μ g/cm² fibronektin ved 3000 celler per brønn i et totalt volum på 200 μ l EGM-2-medium (Lonza). Platene ble kulturert i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂ i 48 timer. Så ble mediet fjernet og byttet med 200 μ l Ultraculture-medium supplert med 2,0 % serum fra storfeoster (alle fra Lonza), og cellene ble kulturert under disse vekstfaktor- og serumsultne tilstandene over natten for å undertrykke
 30 aktinpolymerisering. Så ble mediet fjernet og byttet med friskt Ultraculture-medium supplert med 2,0 % serum fra storfeoster som inneholder danazol (0,1 μ M, 1 μ M eller 10 μ M) eller PI3 kinasehemmeren LY294002 (10 μ M) (positiv kontroll). Etter inkubasjon med disse forbindelsene i 30 minutter i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂, ble vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF) (sluttkonsentrasjon på 25 ng/ml) tilsatt.
 35 Etter inkubering i ytterligere 30 minutter i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂, ble mediet aspirert og cellene ble fiksert ved anvendelse av 3,6 % formaldehyd i fosfatbufret saltvann (PBS) i ti minutter ved romtemperatur. Alle brønnene ble så

vasket to ganger med 100 µl PBS. Cellene ble permeabilisert ved å anvende 0,1 % Triton X-100 i PBS i 5 minutter. Alle brønnene 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 å farge for F-aktin og forble på cellene i 20 minutter ved romtemperatur.

Alle brønnene ble så vasket to ganger med 100 µl PBS. For å telle-farge for kjerner, ble 100 µl av en 3 µM DAPI (4,6-diamidin-2-fenylindol, dilaktat (Invitrogen))-løsning tilsatt hver brønn. Etter 5 minutter ble cellene vasket to ganger med 100 µl PBS. Så ble 100 µl PBS tilsatt hver brønn og cellene ble observert og fotografert ved anvendelse av et omvendt mikroskop med rhodaminfiltre (ex530/em590) og DAPI (ex350/em460) filtre.

Resultatene viste at danazol påvirket stressfibrenes evne til å utvikles. Når behandlet med danazol viste cellene forskjellige stressfiberdanningsmønstre, avhengig av den tilførte doseringen. Ved den laveste danazoldosen (0,1 µM), ble farging av diffus F-aktin gjennom cytoplasmaet observert. Ved 1,0 µM danazol fortsatte den diffuse fargingen, men stressfibre og fokalpunkter rundt de fleste cellenes perimetere ble synlige. Ved den høyeste danazoldosen (10,0 µM) var det ikke lenger noen diffus farging og utvikling av stressfibre og fokalpunkter ble sett. Fargingen som ble sett ved de lave danazoldosene viste et perinukleært fargingsmønster, som indikerer mikrorørstabilisering lik den som er observert med paklitaksel (en Taxol-forbindelse kjent for å stabilisere og polymerisere mikrorør). Med VEGF var det sterk stressfiberutvikling. Danazol endret VEGF-mønsteret på en doseavhengig måte: (i) den laveste 0,1 µM danazoldosen gjorde stressfibrene mindre tydelige og noe diffus farging viste; (ii) 1,0 µM dosen viste færre tykke stressfibre, men fokalpunkter ble sett på kontaktoverflater; og (iii) den høyeste 10,0 µM danazoldosen viste sterk stressfiberutvikling med fokalpunkter. LY294002 hindret den sterke stressfiberutviklingen sett med VEGF og viste diffus farging.

Eksempel 9: Effekt av danazol på vaskulær endotelial kadherin (VE-kadherin) fosforylering

Passering 12 humane endoteliale celler fra netthinne (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA) ble dyrket til sammenslåing på fibronektinbelagt (1 µg/cm²) 10 cm² vevskulturplates ved å anvende EGM-2 kulturmedium (Lonza) i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂. Når fullført sammenslåing var utført, ble mediet byttet med Ultraculture-medium supplert med 0,5 % serum fra storfeoster og L-glutamin (alle fra Lonza), og cellene ble kulturert under disse vekstfaktor- og serumsultne tilstandene i 24 timer. Så ble mediet fjernet og byttet med friskt Ultraculture-medium supplert med 0,5 % serum fra storfeoster og L-glutamin som inneholder danazol (0,1 µM, 1 µM eller 10 µM) eller etanol (bindmiddelkontroll).

Etter inkubasjon i 15 minutter i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂, ble vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF) (sluttkonsentrasjon på 50 ng/ml) tilsatt og platene inkubert i ytterligere 15 minutter i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂.

Platene ble umiddelbart behandlet for å lysere cellene som følger. PBS og lyseringsbufferen (PBS som inneholder 1 % Triton X-100 supplert med fosfatase-hemmende løsninger 1 og 2 (Sigma), proteasehemmer (Sigma) og natriumortovanadat med en sluttkonsentrasjon på 2 mM) ble kjølt til 4 °C. Cellene ble vasket to ganger med 5 ml av den iskalde PBS og så lysert i 500 µl av den iskalde lyseringsbufferen. De resulterende proteinekstraktene ble overført til 1,7 ml mikrosentrifugerør, og cellerester ble fjernet ved sentrifugering ved 4 °C ved 10 000 opm i 10 minutter. Så ble 450 µl av den klarede løsningen overført til rør som inneholder 25 µl Protein Dynabeads (Invitrogen) belagt med 10 µl C19 anti-VE kadherin polyklonalt antistoff (Santa Cruz Biotechnology) (belegging utført etter produsentens protokoll). Ekstraktene og perlene ble så inkubert over natten ved 4 °C på en roterende blande for å fange VE-kadherin fra ekstraktene. Perlene ble så vasket fire ganger med iskald lyseringsbuffer. For å frisette proteinet fra perlene, ble de varmet i 10 minutter ved 75 °C i SDS lastingsfarge som inneholder 20 % reduserende farge (Invitrogen).

De frisatte proteinene ble separert i 4-20 % polyakrylamidgeler (Invitrogen) ved 120 volts i 1 time. For å bestemme fosforylering og totalt protein i gelene, ble Pro-Q diamond (Invitrogen) og SYPRO ruby (Invitrogen) proteinfarging fortløpende utført etter produsentens protokoll. Gelene ble fotografert og densitometri utført med en Kodak avbildingsetasjon. Resultatene blir vist i tabell 9 nedenfor.

Tabell 9

VE-kadherin				
	Null (etanolkontroll)	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	1,00	0,89	0,84	0,83

VE-kadherin				
	Null (etanolkontroll)	0,1 µM danazol	VEGF	0,1 µM danazol fulgt av VEGF
(totalt protein)				
Forhold fosforylert: totalt protein	0,215	0,365 (1,70 ganger økning)	0,481 (2,24 ganger økning)	0,358 (1,66 ganger økning)

Som det fremgår medførte danazol en økning i VE-kadherinfosforylering. VEGF medførte en enda større økning i VE-kadherinfosforylering (hyperfosforylering), som ble reversert av danazol. VE-kadherin er en komponent av AJer, og fosforylering av VE-kadherin kan ha forskjellige effekter avhengig av residuet. Normalt fører tyrosinfosforylering av VE-kadherin til AJ-frakobling og økt permeabilitet. Serine 665 fosforylering medfører imidlertid en rask, men reversibel internalisering av VE-kadherin forbundet med redusert barrierefunksjon. En feedbackloop vises å finnes i hvilken internalisert VE-kadherin driver en økning i cytoplasmisk p120, et skjelettprotein som komplekser til AJer. Denne oppreguleringen induser en reduksjon i aktiv RhoA i forbindelse med en økning i barrierestabiliserende GTPases som Rac1, Rap-1 og Cdc42. Man tror at økningen i VE-kadherinfosforylering observert i dette eksperimentet etter lav dose danazolbehandling fører til aktiveringen av barrierestabiliserende GTPases. I tillegg kan danazol hindre de destabiliserende fosforyleringshandlingene indusert av VEGF.

Eksempel 10: Effek av danazol og steroidreseptorantagonister på TER av endoteliale cellemonolag fra netthinne

Analyser ble utført for å bestemme effekten av danazol og steroidreseptorantagonister på transendotelial elektrisk resistans (TER) på humane endoteliale celler fra netthinne (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA). For å gjøre det, ble Greiner vevskultur brønninnlegg (Greiner BioOne 24-well Thincert cellekulturinnlegg, #662610) belagt med 5 µg/cm² fibronektin. Så ble passering 13 humane endoteliale celler fra netthinne sådd i brønnenes øvre kammer ved 120 000 celler per innlegg i et volum på 300 µl EGM-2-medium (Lonza). Volumet for det nedre kammeret var 700 µl EGM-2-medium (Lonza). Platene ble dyrket i en 37 °C inkubator med og 5 % CO₂ i 48 timer for å etablere intakte monolag. På slutten av inkubasjonen

ble TER-målinger tatt ved å anvende en STX 2 probe festet til EVOM² voltohmmeter (begge fra World Precision Instruments) for alle innlegg for å bekrefte integritet av den endoteliale barrieren. Alle innlegg viste forhøyet resistans sammenlignet med innlegg uten celler.

- 5 så ble kulturmediet forsiktig dekantert og byttet med frisk EGM-2, med og uten noen tilsetninger. Tilsetningene var danazol, hydroksyflutamid (androgen reseptorantagonist), fluvestrant (østrogenantagonist) testosteron, østradiol og PI3 kinasehemmer LY 294002 (kontroll). Stamsløsninger av alle tilsetningene, bortsett fra danazol, ble laget ved 10 mM i DMSO. Danazolstamløsningen var 10 mM i etanol. 200 µM
- 10 arbeidsfortynninger av alle tilsetninger ble laget i samme løsningsmiddel. Så ble 200 nM-fortynninger av hver tilsetning og av like fortynninger av etanol og DMSO (kontroller), laget i EGM-2-medium, og danazol og hver av de andre tilsetningene eller medium (kontroll) ble tilsatt brønnene i kombinasjonene og sluttkonsentrasjonene vist i tabellen nedenfor. Platene ble så plassert tilbake i inkubatoren og TER-målinger ble tatt
- 15 som beskrevet over for hvert innlegg ved 5 minutter, 30 minutter, 60 minutter og 24 timer. TER ble beregnet ved å trekke fra bakgrunnsmålingen (tomt innlegg) fra avlesningen av et innlegg og dividere med overflaten for hvert innlegg (0,33 cm²). Resultatene blir vist i tabell 10 nedenfor.

- Som det fremgår av tabell 10, økte danazol TER-målingene, hydroksyflutamid
- 20 reduserte avlesningene testosteron reduserte avlesningen svært lite og fluvestrant hadde ingen vesentlig effekt, sammenlignet med kontrollen (ingen behandling). Danazol forhindret reduksjonen påført av hydroksyflutamid og den svært svake reduksjonen sett med testosteron. Som med resultatene i eksempel 6, kunne dette være beviset på at danazol okkuperer androgenreseptoren i disse cellene.

25

Tabell 10

Behandling	TER ved 5 minutter	TER ved 30 minutter	TER ved 60 minutter	TER ved 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	230,48	275,53	262,01	312,31

Behandling	TER ved 5 minutter	TER ved 30 minutter	TER ved 60 minutter	TER ved 24 timer
av 0,1 μ M danazol				
0,1 μ M fluvestrant	223,47	251,50	243,99	279,28
0,1 μ M fluvestrant fulgt av 0,1 μ M 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 μ M 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 0,1 μ M danazol	276,53	307,56	282,03	363,36

Eksempel 11: Effekt av danazol på aktin stressfiberdannelse

Passering 6 humane renale glomerulære mikrovaskulære endotelialceller (ACBRI 128, Cell Systems Corporation (eksklusiv distributør for Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA) og passering 12 humane endoteliale celler fra netthinne (ACBRI 181, Cell Systems Corporation (eksklusiv distributør for Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA) ble sådd i 16-kammers glassobjektglass belagt med 5 μ g/cm² fibronektin ved 2000 celler per brønn i et totalt volum på 200 μ l EGM-2 medium (Lonza). Platene ble kulturert i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂ i 48 timer med daglig bytte av medium. Så ble testforbindelsene (danazol, TNF α og SIP), fortynnet i Hanks Balanced Salt Solution (HBSS; Lonza) tilsatt for å gi de følgende sluttkonsentrasjonene: danazol (1 μ M) (Sigma), TNF α (1 ng/ml) (Sigma) og SIP (1 μ M) (Sigma). Objektglassene ble inkubert med testforbindelsene i 15 minutter, 30 minutter eller 24 timer i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂. Etter denne inkuberingen ble mediet aspirert og cellene ble fiksert med 3,6 % formaldehyd i fosfatbufret saltvann (PBS) i ti minutter ved romtemperatur. Alle brønnene ble så vasket to ganger med 100 μ l PBS. Cellene ble permeabilisert ved å anvende 0,1 % Triton X-100 i PBS i 5 minutter. Alle brønnene 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 å farge for

F-aktin og forble på cellene i 20 minutter ved romtemperatur. Alle brønnene ble så vasket to ganger med 100 µl PBS. Så ble 100 µl PBS tilsatt hver brønn og cellene ble observert og fotografert ved anvendelse av et omvendt mikroskop med et rhodamin-filter (ex530/em590).

- 5 Resultatene viste at danazol påvirket stressfibrenes evne til å utvikles i de renale glomerulære mikrovaskulære endoteliale cellene. Når behandlet med danazol alene viste cellene perinukleær farging ved 15 minutter, diffus farging gjennom cellene med rufset kant på mange av cellene ved 3 timer og farging lik ubehandlede kontroller ved 24 timer. Med TNF α alene ble stressfibre sett på alle tidspunkter, med antallet celler som viser stressfibre og tykkelsen på fibrene økte med tiden. Danazol reduserte stressfiberdannelsen og tykkelsen på fibrene på alle tidspunkter og kortikale aktinringer og rufsete kanter var synlige etter 3 timer. Celler behandlet med S1P alene viste aktinkortikale ringer, med utvikling som starter ved 15 minutter og sterkest ved 3 timer. Cellene returnerte til morforlogi lik ubehandlede kontroller ved 24 timer.
- 15 Danazol syntes å forbedre de kortikala ringene. Diffus farging ble også observert, spesielt ved 15 minutter og 24 timer.

- For endoteliale celler fra netthinnen behandlet med danazol alene viste cellene perinukleær farging ved 15 minutter, diffus farging gjennom cellene med rufset kant på mange av cellene ved 3 timer og farging lik ubehandlede kontroller ved 24 timer. Med
- 20 TNF α alene ble stressfibre sett på alle tidspunkter, med antallet celler som viser stressfibre og tykkelsen på fibrene økende fra 15 minutter til 3 timer og blir redusert etter 24 timers inkubasjon. Danazol reduserte stressfiberdannelsen og/eller tykkelsen på fibrene på alle tidspunkter. Diffus farging ble observert ved 15 minutter og 24 timer, og kortikale aktinringer ble synlige ved 3 timer. Celler behandlet med S1P alene viste
- 25 aktinkortikale ringer, med utvikling som starter ved 15 minutter og sterkest ved 3 timer. Cellene returnerte til morforlogi lik ubehandlede kontroller ved 24 timer. Danazol syntes å forbedre de kortikala ringene ved 3 timer. Diffus farging ble også observert, spesielt ved 15 minutter og 24 timer.

- S1P (sfingosin-1 fosfat) spiller en svært viktig funksjon i dannelsen og vedlikehold av
- 30 vaskulært endotel. S1P er en vesentlig signaliserende tilførsel som forenkler organiseringen og barrierefunksjonen for det vaskulære endotelet gjennom dets effekter på aktincytoskjelettet. Særlig er S1P involvert i dannelsen av kortikale aktinfibre og organisering av klebeforbindelsene. Tømming av S1P fører til vaskulær lekkasje og ødem, og S1P kan reversere endotelial dysfunksjon og gjenopprette barrierefunksjon.

- 35 I dette eksperimentet viste danazol en evne til å styrke de beskyttende effektene av S1P i endoteliale celler fra både netthinnen og glomerulus. Danazol reverserte også

dannelsen av stressfibre induisert av TNF α i begge disse typene endoteliale celler. Diffus perinukleær farging blir sett i celler behandlet med danazol alene.

Eksempel 12: Effekt av danazol på ECIS

Analyser ble utført for å bestemme effekten av danazol på transendotelial elektrisk resistans (TER) for humane renale glomerulære mikrovaskulære endoteliale celler (ACBRI 128, Cell Systems Corporation (eksklusiv distributør for Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA) eller humane endoteliale celler fra netthinne (ACBRI 181, Cell Systems Corporation (eksklusiv distributør for Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA). Elektrisk resistans ble nålt ved å anvende det elektriske cellesubstrat impedansfølende (ECIS) systemet (ECISZè, skaffet fra Applied Biophysics) med 8-brønns multiple elektrodeplater (8W10E). Hver platebrønn ble belagt med 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronektin i HBSS ved å tilsette fibronektinet i et volum på 100 μl per brønn og å inkubere platene i 30 minutter i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂. Fibronektinløsningen ble fjernet og 400 μl EGM-2 kulturmedium (Lonza) ble satt til hver brønn. Platene ble koblet til ECISZ α -systemet og ble elektrisk stabilisert. EGM-2-mediet ble aspirert og byttet med 200 μl EGM-2 kulturmedium som inneholder 100 000 celler per brønn. Platene ble koblet til ECISZ α -systemet og inkubert i 24 timer i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂. EGM-2-mediet ble aspirert og byttet med 400 μl friskt EGM-2 kulturmedium per brønn. Platene ble koblet til ECISZ α -systemet og inkubert i 6 timer i en 37 °C inkubator med 5 % CO₂. Konsentrerte løsninger av testforbindelsene i HBSS ble fremstilt og plassert i inkubatoren for å få likevekt. Testforbindelsene ble så tilsatt til egnede brønner i de følgende sluttkonsentrasjonene: danazol (1 μM) (Sigma) og S1P (1 μM) (Sigma). ECIS (resistanse) ble overvåket i 90 timer.

I de endoteliale cellene fra netthinne viste 1,0 μM danazol alene en økning av ECIS sammenlignet med ubehandlede celler å starte ca. 1,5-2,0 timer etter behandling og fortsatt i 5 timer. S1P alene viste en økning av ECIS sammenlignet med ubehandlede celler som startet innen de første 15 minuttene etter behandling og fortsatte i ca. 3 timer. Danazol og S1P i kombinasjon økte ECIS sammenlignet med S1P alene og ubehandlede celler, og dette økte ECIS fortsatte i ca. 90 timer. Derfor viste danazol en evne til å forbedre de tidlige effektene av S1P og å vedlikeholde en høyere resistans gjennom eksperimentet når S1P var tilstede.

Glomerulære endoteliale celler viste et forskjellig mønster. Danazol alene hadde ingen effekt på ECIS før ca. 30 timer etter behandling. Danazol alene økte ECIS sammenlignet med ubehandlede celler fra ca. 30 til ca. 90 timer, med den største økningen finnes mellom ca. 60 og 90 timer. S1P alene hadde heller ingen effekt på

ECIS før ca. 30 timer etter behandling. S1P alene økte ECIS sammenlignet med ubehandlede celler fra ca. 30 til ca. 60 timer. Kombinasjonen av danazol og S1P hadde ingen effekt på ECIS før ca. 30 timer etter behandling. Denne kombinasjonen økte ECIS sammenlignet med ubehandlede celler, S1P alene og danazol alene.

- 5 Kombinasjonen økte særlig ECIS sammenlignet med ubehandlede celler fra ca. 30 til ca. 70 timer, økte ECIS sammenlignet med S1P alene fra ca. 30 til 75 timer og økte ECIS sammenlignet med danazol alene fra ca. 30 til ca. 50 timer.

Eksempel 13: Effekt av danazol på ECIS

Analysen ble utført for å bestemme effekten av danazol på transendotelial elektrisk motstand (TER) på humane renale glomerulære mikrovaskulære endoteliale celler (ACBRI 128, Cell Systems Corporation (eksklusiv distributør for Applied Cell Biology Research Institute), Kirkland, WA). Elektrisk motstand ble målt ved å anvende det elektriske cellesubstratimpedansfølende (ECIS) systemet (ECISZ0, skaffet fra Applied Biophysics) med 8-brønns multiple elektrodeplater (8W10E). Hver platebrønn ble
 15 belagt med 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronektin i HBSS ved å tilsette fibronektinet i et volum på 50 μl per brønn og å inkubere platene i 30 minutter i en 37 °C inkubator med 5 % CO_2 . Fibronektinløsningen ble fjernet og 200 μl EGM-2 kulturmedium (Lonza) ble satt til hver brønn. Platene ble koblet til ECISZ0-systemet og ble elektrisk stabilisert. EGM-2-mediet ble aspirert og byttet med 200 μl EGM-2 kulturmedium som inneholder 40 000
 20 passering-6-celler per brønn. Platene ble koblet til ECISZ0-systemet og inkubert i 24 timer i en 37 °C inkubator med 5 % CO_2 . EGM-2-mediet ble aspirert og byttet med 200 μl friskt EGM-2 kulturmedium per brønn. Platene ble koblet til ECISZ0-systemet og inkubert i ytterligere 24 timer i en 37 °C inkubator med 5 % CO_2 . EGM-2-mediet ble aspirert og byttet med 200 μl friskt EGM-2 kulturmedium uten deksametason per
 25 brønn. Platene ble koblet til ECISZ0-systemet og inkubert over natten i en 37 °C inkubator med 5 % CO_2 . Til slutt ble EGM-2-mediet aspirert og byttet med 200 μl friskt EGM-2 kulturmedium uten deksametason per brønn. Platene ble koblet til ECISZ0-systemet og inkubert 2 timer i en 37 °C inkubator med 5 % CO_2 . Konsentrerte løsninger av testforbindelsene i HBSS ble fremstilt og plassert i inkubatoren for å få
 30 likevekt. Testforbindelsene ble så satt til egnede brønner i de følgende sluttkonsentrasjonene: danazol (1 μM) (Sigma) og deksametason (1 μM) (Sigma). ECIS (motstand) ble overvåket i 90 timer.

Danazol alene økte ECIS sammenlignet med ubehandlede celler, begynnende etter ca. 3 timer og fortsatte i ca. 90 timer. Økningen var størst fra ca. 12 til ca. 15 timer. Når sammenlignet med deksametason, viste danazol et lignende mønster, men forbedringen
 35 av ECIS (TER) ble ikke så stor.

Eksempel 14: Effekt av danazol på RhoA

Omforming av det endoteliale cellecytoskjelettet er sentralt for mange funksjoner for endotelet. Rho-serien av små GTP-bindende proteiner har blitt identifisert som nøkkelregulatorer av F-aktin cytoskjelettdynamikk. Rho-serien består av tre isoformer, RhoA, RhoB og RhoC. Aktiveringen av RhoA-aktivitet fører til alvorlig stressfiberdannelse i endoteliale celler. Stimulering av endoteliale celler med trombin øker Rho GTP og myosinfosforylering, samsvarende med økt cellekontraktilitet. Hemming av RhoA blokkerer denne responsen og tapet av barrierefunksjon, og viser en kritisk rolle for Rho i vaskulær permeabilitet.

Dette eksperimentet ble utført med en kommersielt tilgjengelig Rho-aktiveringsanalyse (GLISA) kjøpt fra Cytoskeleton, Denver, Colorado, ved å følge produsentens protokoll. Kort sagt, passering 8 eller 12 humane endoteliale celler fra netthinne (ACBRI 181, Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA) ble dyrket på fibronektinbelagt ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 6-brønns vevskulturplater med EGM-2 kulturmedium (Lonza) i 24 timer i en 37°C inkubator med 5 % CO_2 (30 000 celler /brønn i et totalvolum på 3 ml). Så ble mediet aspirert og byttet med Ultraculture-medium supplert med 0,1 % serum fra storfoster, L-glutamin, natriumpyruvat, penicillin/streptomycin og ITSS (insulin, transferrin natriumselen) (alle fra Lonza) for å serumulte cellene og redusere bakgrunnsnivået av RhoA. Cellene ble kultureret i 24 timer i en 37°C inkubator med 5 % CO_2 . Testforbindelser fortynnet i HBSS ble plassert i inkubatoren for å få likevekt før tilsetning til cellene. Så ble 150 μl av hver testforbindelse satt til de egnede kulturbrønnene og platene ble inkubert i inkubatoren i ytterligere 15 minutter. Så ble trombin satt til egnede brønner. Etter 1 minutt ble cellene vasket en gang med 1,5 ml fosfatbufret saltvann og ble så lysert med 100 μl GLISA lyseringsbuffer supplert med proteasehemmere. Ekstraktene ble rispet, overført til mikrosentrifugerør og overført til is for å konservere den aktive formen av RhoA. Alle ekstrakter ble så klaret for rester ved å sentrifugere med 10 000 opm i 2 minutter ved 4°C . Supernatantene ble overført til nye rør og plassert tilbake på is. Alikvoter av hvert ekstrakt ble fjernet for GLISA-analysen og for proteinbestemmelser. Alle proteinkonsentrasjoner ble innen 10 %, og ekstraktene ble anvendt ved de utførte konsentrasjonene (utlignet til 15 μg totalt protein per brønn). GLISA-analysen ble utført med reagensene som følger settet.

Resultatene for pasering 12 endoteliale celler fra netthinnen er vist i tabell 11 nedenfor. Som forventet ble de aktive Rho A-nivåene induert av trombin, svært høye. Alle testforbindelsene hemmet den trombininduserte aktiveringen av Rho A.

Resultatene for pasering 8 endoteliale celler fra netthinnen er vist i tabell 12 nedenfor. Som forventet ble de aktive Rho A-nivåene induisert av trombin, svært høye. Alle testforbindelsene hemmet den trombininduserte aktiveringen av Rho A.

Tabell 11

Behandling	Gjennomsnitt OD	Prosent hemming mot ubehandlet kontroll	Prosent hemming mot trombin
Ubehandlet	0,455	---	---
1,0 μ M danazol	0,424	6,82	---
1,0 μ M deksametason	0,428	5,83	---
10,0 μ M PI3 kinasehemmer LY 294002	0,370	18,70	---
1,0 μ M Src-1 hemmer*	0,349	23,21	---
0,1 E/ml trombin	1,013	---	---
0,1 E/ml trombin + 1,0 μ M danazol	0,859	---	27,57
0,1 E/ml trombin + 1,0 μ M deksametason	0,826	---	33,48
0,1 E/ml trombin + 10,0 μ M PI3 kinasehemmer LY294002	0,685	---	58,73
0,1 E/ml trombin + 1,0 μ M Src-1 hemmer	0,534	---	85,85
* Skaffet fra Sigma.			

Tabell 12

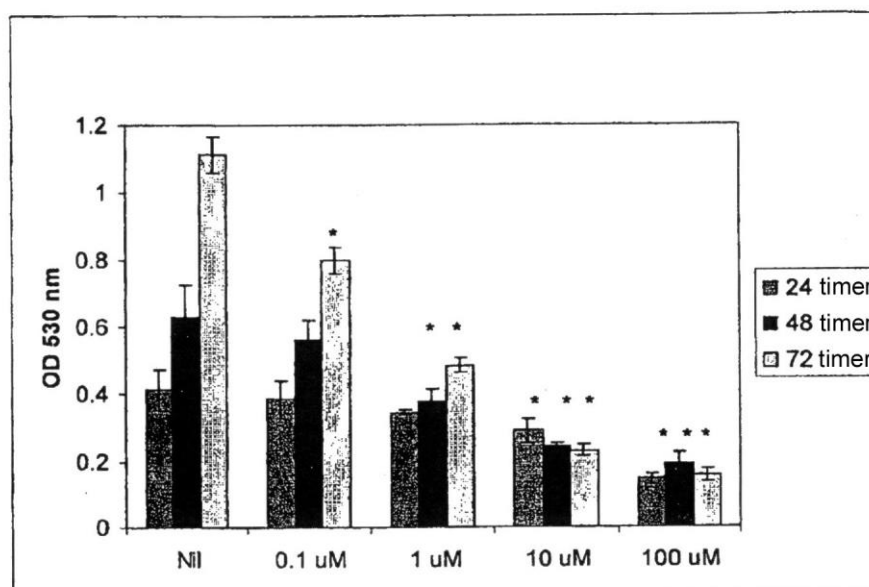
Behandling	Gjennomsnitt OD	Prosent hemming mot ubehandlet kontroll	Prosent hemming mot trombin
Ubehandlet	0,102	---	---
1,0 μ M danazol	0,027	73,89	---
10,0 μ M PI3 kinasehemmer LY 294002	0,056	45,32	---
0,1 E/ml trombin	0,561	---	---
0,1 E/ml trombin + 1,0 μ M danazol	0,373	---	41,02
0,1 E/ml trombin + 10,0 μ M PI3 kinasehemmer LY294002	0,433	---	27,86

Eksempel 15: Dyremodell av vaskulær hyperpermeabilitet

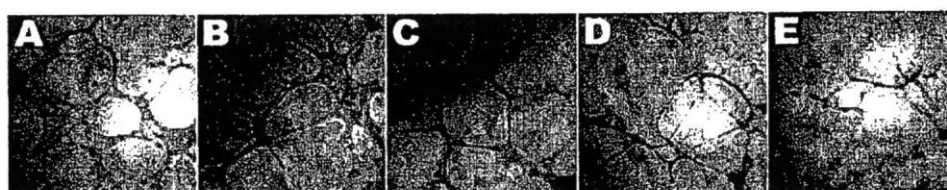
New Zealand hvite kaniner mottok 0,215 mg/kg danazol oralt to ganger per døgn i 7 døgn. Kaninene ble så injisert en gang intravitrealt med vaskulær endotelial vekstfaktor A (VEGF-A) for å fremstille vaskulær lekkasje i netthinnen. Så, 24 timer senere, ble fluoresceinnatrium injisert, og fluorescensen fra øynene ble målt med en Fluorotron (Ocumetrics) (gjennomsnitt fra fem målinger). En enkelt kontroll (placebo) kanin hadde 250 fluorescensenheter i netthinnen, som indikerer den vaskulære lekkasjen der. En enkelt danazolbehandler kanin ga 16 fluorescensenheter, som representerte en 94 % reduksjon i vaskulær lekkasje forårsaket an danazolet.

Patentkrav

1. Vaskulær hyperpermeabilitetshemmende mengde av en forbindelse valgt fra danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol, for anvendelse ved behandling av diabetisk nefropati, hvor den vaskulær- hyperpermeabilitetsinhiberende mengde er
5 fra 1 mg til 100 mg av forbindelsen per dag.
2. Vaskulær hyperpermeabilitetshemmende mengde av en forbindelse valgt fra danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol, for anvendelsen ifølge krav 1 for anvendelse ved behandling av diabetisk nefropati ved fremkomsten av én eller flere tidlige tegn på, eller en predisposisjon for å utvikle, diabetisk nefropati.
- 10 3. Vaskulær hyperpermeabilitetshemmende mengde av en forbindelse valgt fra danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol, for anvendelsen ifølge krav 1 for anvendelse ved behandling av diabetisk nefropati umiddelbart etter diagnostisering av diabetisk nefropati.
- 15 4. Vaskulær hyperpermeabilitetshemmende mengde av en forbindelse valgt fra danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol, for anvendelsen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvori forbindelsen er danazol.
5. Vaskulær hyperpermeabilitetshemmende mengde av en forbindelse valgt fra danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol, for anvendelsen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, hvori forbindelsen blir administrert oralt.
- 20 6. Vaskulær hyperpermeabilitetshemmende mengde av en forbindelse valgt fra danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol, for anvendelsen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, hvori dyret er et menneske.
7. Vaskulær hyperpermeabilitetshemmende mengde av en forbindelse valgt fra danazol og farmasøytisk akseptable salter av danazol, for anvendelsen ifølge krav 1,
25 hvori den vaskulære hyperpermeabilitetshemmende mengden er fra 10 mg til 90 mg av forbindelsen per døgn.
8. Farmasøytisk sammensetning omfattende en effektiv mengde av en forbindelse valgt fra danazol og farmasøytisk godkjente salter av danazol for anvendelsen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7.

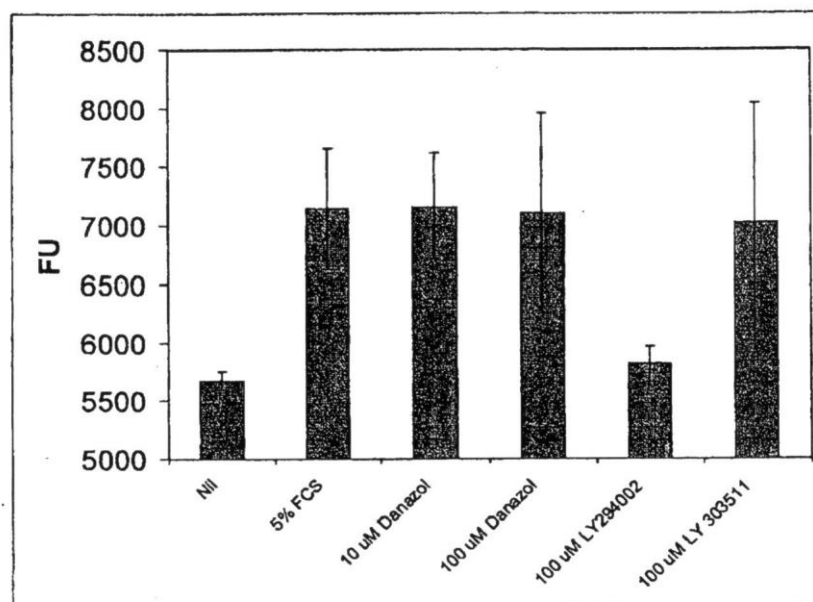
Tegning

FIGUR 1



FIGUR 2

5



FIGUR 3