

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

**特表2004-511523**  
(P2004-511523A)

(43) 公表日 **平成16年4月15日(2004.4.15)**

|                            |               |             |
|----------------------------|---------------|-------------|
| (51) Int. Cl. <sup>7</sup> | F I           | テーマコード (参考) |
| <b>A 6 1 K 31/57</b>       | A 6 1 K 31/57 | 4 C O 8 6   |
| <b>A 6 1 P 35/00</b>       | A 6 1 P 35/00 | 4 C O 9 1   |
| <b>A 6 1 P 43/00</b>       | A 6 1 P 43/00 | 1 1 1       |
| <b>C O 7 J 7/00</b>        | C O 7 J 7/00  |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 50 頁)

|               |                              |          |                     |
|---------------|------------------------------|----------|---------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2002-535670 (P2002-535670) | (71) 出願人 | 300049958           |
| (86) (22) 出願日 | 平成13年10月17日 (2001.10.17)     |          | シエーリング アクチエンゲゼルシャフト |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成15年4月9日 (2003.4.9)         |          | ドイツ連邦共和国 デー-13353 ベ |
| (86) 国際出願番号   | PCT/EP2001/012006            |          | ルリン ミューラーシュトラッセ 178 |
| (87) 国際公開番号   | W02002/032432                | (74) 代理人 | 100077517           |
| (87) 国際公開日    | 平成14年4月25日 (2002.4.25)       |          | 弁理士 石田 敬            |
| (31) 優先権主張番号  | 00250342.3                   | (74) 代理人 | 100092624           |
| (32) 優先日      | 平成12年10月18日 (2000.10.18)     |          | 弁理士 鶴田 準一           |
| (33) 優先権主張国   | 欧州特許庁 (EP)                   | (74) 代理人 | 100087871           |
| (31) 優先権主張番号  | 60/240,991                   |          | 弁理士 福本 積            |
| (32) 優先日      | 平成12年10月18日 (2000.10.18)     | (74) 代理人 | 100082898           |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          | 弁理士 西山 雅也           |
|               |                              | (74) 代理人 | 100081330           |
|               |                              |          | 弁理士 樋口 外治           |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞におけるアポトシスの誘発のための抗黄体ホルモンの使用

(57) 【要約】

本発明は、抗黄体ホルモン、特に抗黄体ホルモン 11 - (4 - アセチルフェニル) - 17 - ヒドロキシ - 17 - (1, 1, 2, 2, 2 - ペンタフルオロエチル) - エストラ - 4, 9 - ジエン - 3 - オン又は医薬的許容できるその誘導体又は類似体の投与による、細胞、特に乳癌細胞におけるアポトシスの誘発のための方法及び使用に関する。本発明はさらに、高い危険性のインジケーターが細胞周期のS期における高められた量の腫瘍細胞であるタイプの癌の、抗黄体ホルモン、特に抗黄体ホルモン 11 - (4 - アセチルフェニル) - 17 - ヒドロキシ - 17 - (1, 1, 2, 2, 2 - ペンタフルオロエチル) - エストラ - 4, 9 - ジエン - 3 - オン又は医薬的許容できるその誘導体又は類似体による処理に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

細胞におけるアポトシスの誘発のためへの抗黄体ホルモン 11 - (4 - アセチルフェニル) - 17 - ヒドロキシ - 17 - (1, 1, 2, 2, 2 - ペンタフルオロエチル) - エストラ - 4, 9 - ジエン - 3 - オン又は医薬的許容できるその誘導体又は類似体の使用。

## 【請求項 2】

前記アポトシスの誘発が、末端分化の開始により引き起こされる請求項 1 記載の使用。

## 【請求項 3】

前記細胞が、哺乳類細胞である請求項 1 又は 2 記載の使用。

10

## 【請求項 4】

前記哺乳類細胞が、ヒト細胞である請求項 3 記載の使用。

## 【請求項 5】

前記細胞が、腫瘍細胞である請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の使用。

## 【請求項 6】

前記腫瘍が、乳癌である請求項 5 記載の使用。

## 【請求項 7】

前記薬剤がさらに、抗エストロゲンを含んで成る請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の使用。

## 【請求項 8】

高い危険性のインジケーターが細胞周期の S 期における高められた量の腫瘍細胞であるタイプの癌の処理のための薬剤の調製のためへの抗黄体ホルモン 11 - (4 - アセチルフェニル) - 17 - ヒドロキシ - 17 - (1, 1, 2, 2, 2 - ペンタフルオロエチル) - エストラ - 4, 9 - ジエン - 3 - オン又は医薬的許容できるその誘導体又は類似体の使用。

20

## 【請求項 9】

前記疾病が、乳癌である請求項 8 記載の使用。

## 【請求項 10】

有効量の抗黄体ホルモン 11 - (4 - アセチルフェニル) - 17 - ヒドロキシ - 17 - (1, 1, 2, 2, 2 - ペンタフルオロエチル) - エストラ - 4, 9 - ジエン - 3 -

30

オン又は医薬的許容できるその誘導体又は類似体を、インビトロでの細胞に投与することを含んで成る、細胞におけるアポトシスを誘発する方法。

## 【請求項 11】

前記細胞が、哺乳類腫瘍細胞である請求項 10 記載の方法。

## 【請求項 12】

前記細胞が、乳癌細胞である請求項 10 又は 11 記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 発明の分野：

本発明は、細胞におけるアポトシスの誘発のためへの抗黄体ホルモンの使用に関する。特に、本発明は、細胞におけるアポトシスの誘発のためへの抗黄体ホルモン 11 - (4 - アセチルフェニル) - 17 - ヒドロキシ - 17 - (1, 1, 2, 2, 2 - ペンタフルオロエチル) - エストラ - 4, 9 - ジエン - 3 - オン又は医薬的許容できるその誘導体又は類似体の使用に関する。本発明はさらに、高い危険性のインジケーターが細胞周期の S 期における高められた量の腫瘍細胞であるタイプの癌、例えば乳癌の処理のための薬剤の調製のためへの抗黄体ホルモンの使用を提供する。

40

## 【0002】

## 発明の背景：

抗黄体ホルモンは、ホルモン - 依存性腫瘍及び他の疾病に対して有意な衝撃を有する、比較的新規で且つ有望な種類の治療剤を提供する。抗黄体ホルモンは本来、妊娠の非手術的

50

な医薬的終結に関して創造されたが、一定の抗黄体ホルモンが、プロゲステロンに対する受容体を有するそれらの乳癌の内分泌治療において相当の重要性を増して来た (T. Maudelonde など., J. G. M. Klijjn など., Hormonal Manipulation of Cancer, peptides, Growth Factors and New (Anti) Steroidal Agents, Raven Press, New York, 1987, pp. 55 - 59)。

【0003】

内分泌治療におけるこの新規手段は、インビトロでのプロゲステロン受容体 - 陽性ヒト乳癌細胞系、及びインビボでのマウス又はラットのいくつかのホルモン - 依存性乳癌における抗黄体ホルモンの抗腫瘍活性に基づかれる。特に、抗黄体ホルモン オナプリストン及びミフェプリストン (RU486) の抗腫瘍機構が、マウスホルモン - 依存性 MXT 乳癌モデル、及びラットの DMBA - 及び NMU - 誘発された乳癌モデルを用いてすでに研究されている (M. R. Schneider など., Eur. J. Cancer Clin. Oncol., Vol. 25, No. 4, pp. 691 - 701, 1989; H. Michna など., Breast Cancer Research and Treatment 14: 275 - 288, 1989; H. Michna, J. Steroid. Biochem. Vol. 34, Nos 1 - 6, pp. 447 - 453, 1989)。

10

【0004】

しかしながら、例えばミフェプリストンに関する低い活性及び悪い副作用のために、この化合物は乳癌の治療において単一の剤として推薦され得ない (D. Perrault など., J. Clin. Oncol. 1996 Oct. 14 (10), pp. 2709 - 2712)。さらに、ミフェプリストンは、強い抗グルココルチコイド副作用を示す (L. M. Kettel など., Fertil. Steril. 1991 Sep, 56 (3), pp. 402 - 407; X. Bertagna, Psychoneuroendocrinology 1997, 22 suppl. 1, pp. 51 - 55)。

20

【0005】

細胞周期のそれぞれの期における腫瘍細胞の百分率の決定は、強力な DNA 流動細胞計測法により行われ得る (G. M. Clark など., N. Engl. J. Med. 320, 1989, March, pp. 627 - 633; L. G. Dressler など., Cancer 61 (3), 1988, pp. 420 - 427 及びそこに引用される文献を参照のこと)。従って、腫瘍細胞の細胞周期の段階、及び特に、細胞周期の一定の段階における腫瘍細胞の数が、疾病の進行及び治療の成功の重要な臨床学的予測体であり得ることが示されている。細胞周期の S - 期における細胞の数は、これに関して特に重要である。

30

【0006】

ヨーロッパ特許 0495825 B1 号は、高い危険因子であると思われる、細胞周期の S 期における高められた割合の腫瘍細胞を有する乳癌の処理のための薬剤の生成のためへの抗黄体ホルモン (競争プロゲステロンアンタゴニスト) の使用を開示する。これは、抗黄体ホルモンが、細胞周期の G<sub>0</sub> G<sub>1</sub> 期における腫瘍細胞の進行を阻止することができ、S 期における主用細胞の実質的な低下をもたらす観察に基づかれている。

40

【0007】

しかしながら、この効果は、標準の乳癌治療剤、タモキシフェン、エストロゲン療法又は卵巣摘出に関しては観察されていなかった。ヨーロッパ特許 0495825 B1 号において試験される抗黄体ホルモンは、11 - [4 - N, N - ジメチルアミノ - フェニル] - 17 - ヒドロキシ - 17 - (3 - ヒドロキシプロピル) - 13 - メチル - 4, 9 (10) - ゴナジン - 3 - オン及び 11 - (4 - アセチルフェニル) - 17 - ヒドロキシ - 17 - (プロパ - 1 - イニル) - 4, 9 (10) - エストラジエン - 3 - オンである。

50

## 【0008】

強い抗黄体ホルモン活性を有する17 - フルオロアルキルステロイド類、及びそれらの生成方法は、WO98/34947号に記載されている。WO98/34947号は、そこに開示される17 - フルオロアルキルステロイドが細胞アポトシス又は細胞周期阻止において演じ得る役割を論じても又は研究もしていない。

## 【0009】

腫瘍細胞の場合、G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>期における進行を阻止することによって、細胞におけるアポトシスを誘発する剤の可能性ある価値が与えられる場合、この特定の作用機構を有する追加の剤、例えば抗黄体ホルモンを同定することが所望される。そのような剤は、高い危険性のインジケータが細胞周期のS期における腫瘍細胞の高められた量である、一定の型の癌、例えば乳癌の処理及び予防への可能性ある用途を有する。

10

## 【0010】

発明の目的：

従って、ホルモン - 依存性疾病、例えば乳癌における抗黄体ホルモンの作用の形式をさらに調べ、そして細胞におけるアポトシスの標的化された誘発のための方法を提供することが本発明の目的である。

驚くべきことには、本発明者は、抗黄体ホルモン11 - (4 - アセチルフェニル) - 17 - ヒドロキシ - 17 - (1, 1, 2, 2, 2 - ペンタフルオロエチル) - エストラ - 4, 9 - ジエン - 3 - オン(又は医薬的許容できるその誘導体又は類似体)が、細胞におけるアポトシスの誘発のために使用され得ることを発見した。

20

## 【0011】

発明の要約：

本発明は、抗黄体ホルモン11 - (4 - アセチルフェニル) - 17 - ヒドロキシ - 17 - (1, 1, 2, 2, 2 - ペンタフルオロエチル) - エストラ - 4, 9 - ジエン - 3 - オン(この後、“抗黄体ホルモン(I)”として言及される)が、標準の乳癌腫瘍モデルの腫瘍細胞においてアポトシス及び細胞死を誘発する予測できない観察に基づかされている。抗黄体ホルモン(I)は、末端分化の開始を通して、細胞におけるアポトシスを誘発できることが見出された。

## 【0012】

従って、本発明は、細胞におけるアポトシスの誘発のための薬剤の調製のためへの抗黄体ホルモン(I)又は医薬的に許容できるその誘導体又は類似体の使用を提供する。好ましくは、アポトシスの誘発は、末端分化の開始により引き起こされる。細胞は好ましくは、哺乳類細胞、より好ましくはヒト細胞、及び最も好ましくは腫瘍細胞であり、ここで前記腫瘍は好ましくは、乳癌である。

30

本発明のもう一つの観点は、高い危険性のインジケータが細胞周期のS期における高められた量の腫瘍細胞であるタイプの癌の処理のための薬剤の調製のためへの抗黄体ホルモン(I)又は医薬的に許容できるその誘導体又は類似体の使用である。

## 【0013】

本発明のもう一つの観点は、インビトロでの細胞におけるアポトシスの誘発のためへの抗黄体ホルモン(I)又は医薬的に許容できるその誘導体又は類似体の使用である。好ましくは、前記細胞は、哺乳類、より好ましくはヒト細胞及び最も好ましくは腫瘍細胞であり、ここで前記腫瘍は好ましくは、乳癌である。

40

本発明のもう一つの観点は、細胞に有効量の抗黄体ホルモン(I)を投与することによって、細胞におけるアポトシスを誘発するための方法である。この方法は、インビトロ又はインビボで適用され得る。好ましくは、前記細胞は、哺乳類、より好ましくはヒト細胞及び最も好ましくは腫瘍細胞であり、ここで前記腫瘍は好ましくは、乳癌である。

## 【0014】

細胞アポトシスを誘発する能力のために、抗黄体ホルモン(I)又は医薬的に許容できるその誘発対又は類似体が、高い危険性のインジケータが細胞周期のS期における高められた量の腫瘍細胞である、一定のタイプの癌、例えば乳癌の処理のために使用され得る。

50

細胞アポトシスを誘発するその能力のために、抗黄体ホルモン（I）により影響され、そして処理され得る、他のタイプの癌又はホルモン - 依存性疾病は、例えば乳癌、卵巣癌、子宮内膜癌、骨髄腫、無排卵性不妊症、骨膜腫、すなわちホルモン受容体及び/又はホルモン - 依存性経路の存在に実質的に起因するか又はそれにより影響される疾病を包含する。

【0015】

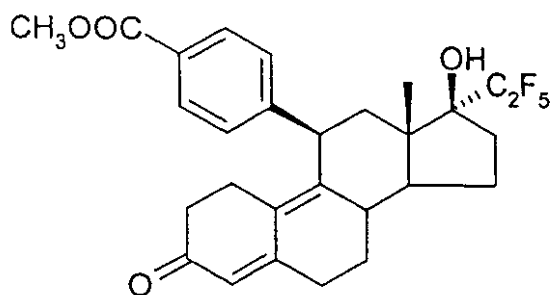
発明の特定の記載：

抗黄体ホルモン（I） - 11 - (4 - アセチルフェニル) - 17 - ヒドロキシ - 17 - (1, 1, 2, 2, 2 - ペンタフルオロエチル) - エストラ - 4, 9 - ジエン - 3 - オンは、下記式（I）：

10

【0016】

【化1】



(I)

20

により表される。

【0017】

抗黄体ホルモン（I）（又は医薬的に許容できるその誘導体又は類似体）は、強い抗黄体ホルモン活性を有する価値ある医薬剤である。抗黄体ホルモン（I）は、細胞におけるアポトシスの誘発のために本発明に従って使用され得る。

本発明における用語“抗黄体ホルモン”は、プロゲステロン受容体を競争的に阻害することができるすべての化合物を主に含んで成ることを意味する。しかしながら、それはまた、プロゲステロンの生合成を阻害できる化合物を包含するべきである。

30

本発明における抗黄体ホルモン（I）の医薬的に許容できる誘導体又は類似体は、例えばW098/34947号に開示される発明の化合物のいずれか1つを包含することができる。

【0018】

本発明において行われる研究は、種々のホルモン - 依存性腫瘍モデルにおける抗黄体ホルモン（I）の効果的な腫瘍阻害性質を示す（例1～6を参照のこと）。アポトシスの誘発の結果としての抗黄体ホルモン（I）の腫瘍阻害活性が従来の抗腫瘍剤、例えば抗エストロゲンタモキシフェンよりも強いことがさらに示されている。本発明に従って抗黄体ホルモン（I）を用いての乳癌の処理は、卵巣摘出よりも卓越している。

40

【0019】

下記例に示されているように種々の腫瘍モデルにおける抗黄体ホルモン（I）の適用は、細胞周期のS及びG<sub>2</sub>M期における細胞の数における有意な及び生物学的に適切な低下と共に、細胞周期のG<sub>0</sub>G<sub>1</sub>期における腫瘍細胞の蓄積を示した。それらの結果は、分化の誘発を示す。分化 - 特異的G<sub>1</sub>阻止は、他の幹細胞システムに関して、すでに提案されている（J. J. Wille Jr., Cancer Res. 1982, 42 (12) : 5139 - 46; R. E. Scott, J. Cell. Biol. 1982, 94 (2) : 400 - 405を参照のこと）。

【0020】

50

種々の腫瘍モデルにおいて得られる実験結果は、抗黄体ホルモン（I）による処理が、分泌生成物の多量の分離を伴って腺構造及び腺房、及び紡錘形状の生理的組織変性副集団への有糸分裂的活性多角形腫瘍細胞の分化を誘発すると思われる（例5及び特に図5A及び5Bを参照のこと）。腫瘍サイズ、有糸分裂指数及び悪性度の程度は明確に低下したが、腫瘍における腺構造の体積画分及びアポトシスの出現は、対照に比較して、3倍上昇した（例5、図5E及び5Fを参照のこと）。

【0021】

いずれかの理論にも制限されないが、それらの結果は、試験されたモデルにおける抗黄体ホルモン（I）の抗腫瘍作用の主用機構が、末端細胞死に関連する末端分化の誘発を通しての、腫瘍細胞のレベルでの直接的なプロゲステロン - 受容体 - 介在性抗増殖効果であることを示す。この態様においては、抗黄体ホルモン（I）は、プロゲステロン受容体 - 陽性腫瘍における悪性腫瘍細胞固有の末端分化における本質的な阻止を排除することができると思われる。抗黄体ホルモン（I）のこの抗増殖効果は、抗黄体ホルモン（I）の抗ホルモン（抗黄体ホルモン）活性から分離されると思われる。

10

【0022】

例えば、腫瘍細胞の場合、 $G_0$ 、 $G_1$  - 期における進行を阻止することによって、細胞におけるアポトシスを誘発する剤、例えば抗黄体ホルモン（I）は、多くの状態を処理し、そして予防するための可能性ある用途を有する。抗黄体ホルモン（I）を包含する、そのような剤は、高い危険性のインジケーターが細胞周期のS期における腫瘍細胞、例えば乳癌細胞の高められた量であるそれらの癌を処理するために使用され得る。

20

【0023】

従って、本発明の1つの観点は、細胞におけるアポトシスの誘発のための薬剤の調製のためへの抗黄体ホルモン（I）又は医薬的に許容できるその誘導体又は類似体の使用である。好ましい態様においては、抗黄体ホルモン（I）又は医薬的に許容できるその誘導体又は類似体の使用は、ヒトにおける腫瘍細胞、好ましくは乳癌細胞におけるアポトシスの誘発のための薬剤に関する。そのような薬剤は、高い危険性のインジケーターが細胞周期のS期における腫瘍細胞の高められた量である、ホルモン - 依存性疾病、例えば乳癌の処理において有益であり得る。

【0024】

薬剤の製造は、当業者に知られている方法に従って行われ得る。通常知られており、そして使用されるアジュバント、及びさらなる適切なキャリアー又は稀釈剤が使用され得る。適切なキャリアー及びアジュバントは、薬学、化粧品、及びUllmann's Encyclopedia of Technical Chemistry, vol. 4, (1953), pp. 1-36; Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 52 (1963), p. 918ff; H.v. Czetsch-Lindenwald, "Hilfssstoffe für Pharmazie and angrenzende Gebiete", Pharm. Ind. 2, 1961, p. 72ff; Dr. H. P. Fiedler, Lexikon der Hilfssstoffe für Pharmazie, Kosmetik and angrenzende Gebiete, Cantor KG, Aulendorf in Worttemberg, 1971における関連する分野のために推薦される通りである。

30

40

【0025】

本発明の目的のために適切な抗黄体ホルモン、好ましくは抗黄体ホルモン（I）、又は医薬的に許容できるその誘導体又は類似体は、経口又は非経口、例えば腹腔内、筋肉内、皮下又は経皮適用のための生薬を調製するための既知方法に従って、医薬組成物中に導入され得る。それらはまた、組織中に移植され得る。移植片は、不活性材料、例えば生物分解ポリマー又は合成シリコン、例えばシリコンゴムを含んで成ることができる。

【0026】

それらは、錠剤、ピル、糖剤、ゲルカプセル、顆粒、坐剤、移植片、注射可能な無菌水性

50

又は油状溶液、懸濁液又はエマルジョン、軟膏、クリーム、ゲルの形で、又は腔内（例えば、腔用リング）又は子宮内システム（例えば、隔膜、ループ）により投与され得る。

【0027】

経口投与のための薬剤の調製に関しては、上記で定義されたような本発明のために適切な抗黄体ホルモンは、通常知られており、そして使用されるアジュバント及びキャリアー、例えばアラビアガム、タルク、澱粉、糖、例えばマンニトース、メチルセルロース、ラクトース、ゼラチン、界面活性剤、ステアリン酸マグネシウム、水性又は非水性賦形剤、パラフィン誘導體、架橋剤、乳化剤、滑剤、保存剤及び風味剤（例えば、エーテル性油）と共に混合され得る。医薬組成物においては、抗黄体ホルモンは、微小粒子、例えば超微粒状組成物に分散され得る。

10

【0028】

活性剤の生物利用能をさらに増強するために、上記で定義されるような本発明のために適切な抗黄体ホルモンはまた、それらと -、 - 又は - シクロデキストリン又はその誘導體とを、PCT/EP95/02656号に開示されるような方法に従って反応せしめることによって、シクロデキストリン包接体として配合され得る。

非経口投与に関しては、上記で定義されるような本発明のために適切な抗ホルモンは、生理学的に許容できる稀釈剤、例えば油に、溶解剤、界面活性剤、分散剤又は乳化剤を伴って、又はそれを伴わないで溶解されるか又は懸濁され得る。油として、例えばオリーブ油、ピーナツ油、綿種子油、大豆油、ヒマシ油及ゴマ油（但し、それらだけには限定される）が使用され得る。

20

【0029】

投与されるべき量（すなわち、“医薬的有効量”）は、広い範囲内で変化し、そして処理される状態及び投与のモードに依存する。それは、意図される処理のために効果的ないずれかの量を満たすことができる。“医薬的有効量”の決定は、当業者の範囲内である。

1単位用量は、約0.1～100mgの活性剤を提供することができる。ヒトへの投与に関しては、活性剤の毎日の用量は、約0.1～400mg、好ましくは10～100mg、最も好ましくは50mgである。

【0030】

前記薬剤はまた、貯蔵物注入、又は移植片調製物を通して、任意には、活性剤の持効性供給のために投与され得る。

30

好ましい投与の態様は、経口投与である。本発明に従って使用のための抗黄体ホルモン、及び特に抗黄体ホルモン（I）は、経口投与のために特に適切である。

【0031】

本発明のすべての観点に従えば、上記で定義されるような少なくとも1つの抗黄体ホルモン、特に抗黄体ホルモン（I）又は医薬的に許容できるその誘導體又は類似体を、少なくとも1つの抗エストロゲンと共に組合すことも可能である。なぜならば、多くのホルモン-依存性疾病、特に乳癌はプロゲステロン受容体のみならず、またエストロゲン受容体も示すからである。抗エストロゲンは、抗黄体ホルモンと同時に又はそれに続いて、及び特に抗黄体ホルモン（I）又は医薬的に許容できるその誘導體又は類似体と同時に又はそれに続いて投与され得る。抗黄体ホルモン及び抗エストロゲンの量は、等しいか、又は1つの成分が他の成分よりもより卓越することができ、例えば抗黄体ホルモン：抗エストロゲンの比は、1：50～50：1、好ましくは1：30～30：1、及び最も好ましくは1：15～15：1である。

40

【0032】

本発明に従って使用するための適切な抗エストロゲンの例は、非ステロイド性抗エストロゲン、例えばタモキシフェン及びナフォキシジン、並びにラロキシフェン、ファスロデクス及びEM800、及びステロイド性抗エストロゲンファスロデキシンである。ステロイド性抗エストロゲンの例は、EPO348341A号に開示されるそれら、及びWO98/07740号に開示されるそれら、特に11 - フルオロ - 7 - {5 - [N - メチル - N - 3 - (4, 4, 5, 5, 5 - ペンタフルオロペンチルチオ - プロピル) アミノ] -

50

ペンチル} - エストラ - 1, 3, 5 (10) - トリエン - 3, 17 - ジオール、又は W099/33855 号に開示されるそれら、特に 11 - フルオロ - 7 - {5 - [メチル - (7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 10 - ノナフルオロ - デシル) - アミノ] - ペンチル} - エストラ - 1, 3, 5 (10) - トリエン - 3, 17 - ジオール又は医薬的に許容できるそれらの誘導体又は類似体を包含する。抗エストロゲン効果を有するアロマトーゼインヒビター、例えば EP0495825B1 の第 7 ~ 8 頁に開示されるそれらはまた、抗エストロゲンとして使用され得る。

#### 【0033】

本発明のもう 1 つの観点は、高い危険性のインジケータが細胞周期の S 期における高められた量の腫瘍細胞であるタイプの癌の処理のための薬剤の調製のためへの抗黄体ホルモン 11 - (4 - アセチルフェニル) - 17 - ヒドロキシ - 17 - (1, 1, 2, 2, 2 - ペンタフルオロエチル) - エストラ - 4, 9 - ジエン - 3 - オン又は医薬的に許容できるその誘導体又は類似体の使用に関する。

10

#### 【0034】

S 期における腫瘍細胞の数は、Dressler など、"DNA Flow Cytometry and Prognostic Factor in 1331 Ffrozen Breast Cancer Specimens", Cancer, Vol. 61 (3), 1988, pp. 420 - 427; McGuire & Dressler, "Emerging Impacy of Flow Cytometry in Predicting Recurrence and Survival in Breast Cancer Patients", JNCI, Vol. 75 (3), 1985, pp. 405 - 409 に記載のようにして、DNA 誘導細胞計測法により決定され得る。S 期における腫瘍細胞の高い危険性の量は、本発明への使用のための特に適切な候補体である。抗黄体ホルモン (I) の場合、利点は、標準の動物モデルにより明らかなるように (例 1 ~ 4 を参照のこと)、有力な抗腫瘍効果、及びアポトシス (特に例 5 を参照のこと) 及び細胞周期阻止を誘発するこの剤の作用構造の両者から生まれる。

20

#### 【0035】

他の観点においては、本発明は、細胞においてアポトシスを誘発するための方法を提供する。前記細胞は好ましくは、哺乳類細胞及び最も好ましくは、ヒト細胞であり、そして前記方法はインビトロ又はインビボで適用され得る。好ましくは、アポトシスは、例えば抗黄体ホルモン (I) 又は医薬的に許容できるその誘導体又は類似体の投与により、末端分化を開始する機構を通して誘発される。前記方法においては、有効量の抗黄体ホルモン (I) 又は医薬的に許容できるその誘導体又は類似体が、問題の細胞に適用され得る。

30

#### 【0036】

例えば、その増殖がエストラジオールの投与により刺激される T47D 乳癌細胞系においては、抗黄体ホルモン (I) は  $10^{-9}$  ~  $10^{-8}$  モルの有効限界濃度で細胞増殖の完全な阻害を誘発した (例 6 及び図 6 を参照のこと)。これは、既知抗黄体ホルモンがこの腫瘍モデルにおける細胞増殖に対する縮小効果を有さないもので、特に驚くべきことである。従って、抗黄体ホルモン (I) は、他の抗黄体ホルモン、例えばオナプリストン、及び抗エストロゲン、例えばタモキシフェン、並びに純粋な抗エストロゲン、例えば 11 - フルオロ - 7 - {5 - [N - メチル - N - 3 - (4, 4, 5, 5, 5 - ペンタフルオロペンチルチオ) - プロピルアミノ] - ペンチル} - エストラ - 1, 3, 5 (10) - トリエン - 3, 17 - ジオールよりも、効能及び効率に関して卓越する。

40

#### 【0037】

細胞におけるアポトシスの誘発における抗黄体ホルモン (I) の役割は、この抗黄体ホルモン (又は医薬的に許容できるその誘導体又は類似体) が、アポトシスの誘発が特に所望される場合、宿主の状態、特にホルモン - 依存性状態において有用であることを示す。特に、それは、乳癌、子宮内膜癌、骨髄腫、無排卵性不妊症、髄膜腫のような疾病、すなわちホルモン受容体及び / 又はホルモン - 依存性経路の存在に実質的に起因するか又はそれにより影響される疾病の処理に使用され得る。従って、抗黄体ホルモン、例えば抗黄体ホ

50

ルモン ( I ) はさらに、上記ですでに記載されたように、ホルモン - 依存性疾病の処理のためにアポトシス又は細胞死を誘発するための薬剤の調製に使用され得る。

本発明はさらに、例により例示される。次の例は本発明を制限するものではない。

#### 【 0 0 3 8 】

##### 実施例

##### 例 1 . D M B A - 誘発された腫瘍モデルにおける用量 - 応答研究

##### 材料及び方法 :

未成熟雌の Sprague - Dawley ラット ( 生後 4 9 ~ 5 1 日 ; 1 0 匹の動物 / グループ ) を、この研究に使用した。乳房腫瘍を、10 mg の 7 , 1 2 - ジメチルベンズ [ a ] アントラセン ( D M B A , Serva / Heidelberg ) の単一の経口に投与により誘発した。150 mm<sup>2</sup> 以上のサイズを有する少なくとも1つの確立された腫瘍を有するラットを、1) 溶媒対照、2) 処理開始での卵巣摘出、3) 抗黄体ホルモン ( I )、0 . 5 mg / kg , s . c . , 4) 抗黄体ホルモン ( I )、2 mg / kg , s . c . , 5) 抗黄体ホルモン ( I )、5 mg / kg , s . c . , 6) 抗黄体ホルモン ( I )、10 mg / kg , s . c . , 及び7) オナプリストン、5 mg / kg , s . c . により4週間、毎週、処理した。

10

#### 【 0 0 3 9 】

増殖阻害についてのパラメーターとして、毎週のカリパス測定により決定された腫瘍面積の変化率 ( 初期腫瘍サイズに対する % ) を用いた。平均値のグループ間差異の統計学的分析のために、Kruskal - Wallis - 試験を用いた。D M B A 予防モデルのさらなる記載及び評価については、R . G . Metha , European Journal of Cancer 3 6 ( 2 0 0 0 ) , p p . 1 2 7 5 - 1 2 8 2 を参照のこと。

20

#### 【 0 0 4 0 】

##### 結果 :

損なわれていない対照動物においては、進行性腫瘍の増殖が観察され、ところが卵巣摘出は動物の90%において相当の腫瘍後退を引き起こした。2 mg / kg 以上の用量での抗黄体ホルモン ( I ) による処理は、対照と比較して、腫瘍増殖の阻害をもたらすアポトシスの有意な誘発をもたらした ( 図 2 を参照のこと ) 。明確な用量 - 応答関係が存在した。0 . 5 mg / kg の抗黄体ホルモン ( I ) による処理は腫瘍の増殖を有意に妨げなかったが、2 mg / kg で、アポトシスの最大の誘発及び従って増殖阻害が観察された。このグループにおいては、完全な腫瘍後退は、ラットの50%において見出された。この実験において試験された抗黄体ホルモン ( I ) の最高の用量 ( 1 0 mg / kg ) の効果は、2 mg / kg の効果に比較できた。オナプリストン ( 5 mg / kg , s . c . ) は、比較できる用量で、抗黄体ホルモン ( I ) よりも明確に低い効果を有した。

30

#### 【 0 0 4 1 】

##### 結論 :

ラットにおける D M B A - 誘発された乳房腫瘍モデルにおいては、抗黄体ホルモン ( I ) は、腫瘍細胞におけるアポトシスを強く誘発し、そして従って、損なわれていない動物において腫瘍増殖を完全に抑制した。2 mg / kg の抗黄体ホルモン ( I ) が腫瘍細胞に対して最大のアポトシス効果を有することが見出された。抗黄体ホルモン ( I ) は明確に、腫瘍増殖の阻害に関して、オナプリストンよりも卓越した。

40

#### 【 0 0 4 2 】

##### 例 2 . ラットにおける N M U - 誘発された乳癌における腫瘍増殖阻害

##### 材料及び方法 :

腫瘍を、雌 Sprague - Dawley ラット ( Tierzucht Schonwald から得られた ; 生後 5 0 ~ 5 5 日 ) において、N M U ( ニトロソメチルウレア ; 5 0 mg / kg ) の単一の静脈内注入により誘発した。10日後に出発して、少なくとも1つの確立された腫瘍を有するラットを、1) 溶媒対照、2) 処理開始での卵巣摘出、3) 抗黄体ホルモン、1 . 0 mg / kg / 日、4) 抗黄体ホルモン ( I )、0 . 5 mg / kg / 日、及び5) オナプリストン、5 mg / kg / 日により4週間、処理した。増殖阻害に

50

ついでのパラメーターとして、毎週のカリパス測定により決定された腫瘍面積の変化率（初期腫瘍サイズに対する％）を用いた。平均値のグループ間差異の統計学的分析のために、Kruskal-Wallis-試験を用いた。

【0043】

結果：

損なわれていない対照動物においては、進行性腫瘍の増殖が観察され、ところが卵巣摘出は完全な腫瘍増殖阻害を引き起こした。0.5又は1.0mg/kgの用量での抗黄体ホルモン（I）による処理は、対照と比較して、アポトシスの誘発による腫瘍増殖の有意な阻害をもたらした（図2を参照のこと）。オナプリストン（5mg/kg）は、0.5mg/kgのより低い容量で、抗黄体ホルモン（I）よりも明確に効果を有した。

10

【0044】

結論：

ラットにおけるMNU-誘発された乳房腫瘍モデルにおいては、腫瘍細胞においてアポトシスを誘発するその有能な能力のために、抗黄体ホルモン（I）は、損なわれていない動物において腫瘍増殖を完全に抑制する。1.0mg/kg及び0.5mg/kgの用量での抗黄体ホルモン（I）は腫瘍細胞に対して有意なアポトシス効果を有する。

【0045】

例3. scidマウスにおけるヒトT47D乳癌異腫移植

材料及び方法：

雌Fox Chase scidマウス（M&B）を、エストラジオールペレット（Innovative Research of America）により補充した。細胞培養物から得られ、そしてマトリゲルに懸濁されたT47D乳癌細胞を、マウスの肩径領域に皮下移植した。腫瘍が約25mm<sup>2</sup>に達する場合、処理を開始した。処理は、腫瘍の進行まで続けられた。実験グループは次の通りであった：1）対照（ピークル）、2）卵巣摘出、3）抗黄体ホルモン（I）、10mg/kg, s.c.。腫瘍面積を、カリパス測定により決定した。Kruskal-Wallis試験を、平均値のグループ間差異の統計学的分析のために使用した。

20

【0046】

結果：

T47D乳癌モデルにおいては、卵巣摘出は、対照における急速な増殖と比較して、腫瘍増殖の相当の阻害をもたらした。図3は、10mg/kgの抗黄体ホルモン（I）の皮下適用が腫瘍細胞においてアポトシスを誘発することを示す。抗黄体ホルモン（I）の効果は、従来のエストロゲン消耗治療（卵巣摘出）の効果にほとんど匹敵できる。

30

【0047】

結論：

アポトシスを誘発し、そしてFox Chase scidマウスに異種移植されたヒトT47D乳癌の増殖を阻害する抗黄体ホルモン（I）の効果は、このモデルにおける乳癌の増殖を阻害する最大の効果的方法であると思われる標準のエストロゲン消耗療法（卵巣摘出）の効果に匹敵できる。

【0048】

例4. scidマウスにおけるヒトMCF-7乳癌異腫移植

材料及び方法：

雌Fox Chase scidマウス（M&B）を、エストラジオールペレット（Innovative Research of America）により補充した。細胞培養物から得られ、そしてマトリゲルに懸濁されたMCF-7乳癌細胞を、マウスの肩径領域に皮下移植した。腫瘍が約25mm<sup>2</sup>に達する場合、処理を開始した。処理は、腫瘍の進行まで続けられた。実験グループは次の通りであった：1）対照（ピークル）、2）卵巣摘出、3）抗黄体ホルモン（I）、10mg/kg, s.c.。腫瘍面積を、カリパス測定により決定した。Kruskal-Wallis試験を、平均値のグループ間差異の統計学的分析のために使用した。

40

50

## 【0049】

結果：

MCF-7 乳癌モデルにおいては、卵巣摘出は、対照における急速な増殖に比較して、腫瘍増殖の相当の阻害をもたらした。図3は、10 mg/kg の抗黄体ホルモン (I) の皮下適用が腫瘍細胞においてアポトシスを誘発することを示す。抗黄体ホルモン (I) の効果は、従来のエストロゲン消耗治療 (卵巣摘出) の効果にほとんど匹敵できる。

## 【0050】

結論：

アポトシスを誘発し、そして Fox Chase acid マウスに異種移植されたヒト MCF-7 乳癌の増殖を阻害する抗黄体ホルモン (I) の効果は、標準のエストロゲン消耗療法 (卵巣摘出) の効果に匹敵できる。

10

## 【0051】

例5. ラットにおける NMU - 誘発された乳癌 (組織、増殖指数及び TUNEL アッセイ)

材料及び方法：

腫瘍を、雌 Sprague - Dawley ラット (Tierzucht Schonwald e から得られた ; 生後 50 ~ 55 日) において、NMU (ニトロソメチルウレア ; 50 mg/kg) の単一の静脈内注入により誘発した。150 mm<sup>2</sup> 以上のサイズを有する少なくとも1つの確立された腫瘍を有するラットを、1) 溶媒対照、2) 処理開始での卵巣摘出、3) 抗黄体ホルモン (I)、3 mg/kg, s.c. により7日間、毎週、処理した。処理の最後で、腫瘍を切除し、ホルマリンに固定し、そしてパラフィンに包埋した。組織、増殖指数及びアポトシス誘発アッセイを、それらの切除された腫瘍に対して行った。

20

## 【0052】

組織：組織に関しては、組織スライドをヘマトキシリンにより染色し、そして顕微鏡により分析した。

増殖指数：増殖指数を決定するために、PCNA の発現を決定した。増殖する細胞核抗原 (PCNA) は、細胞周期に関連する 36 kD の核タンパク質である。核 PCNA 免疫反応性は、正常組織の増殖性区画に見出される。固定化及びプロセッシング耐性エピトープを認識するモノクローナル抗体を用いて、その組織を調べた。

30

## 【0053】

TUNEL (アポトシス試験)：アポトシスの生化学的特徴は、細胞死に起因する不可逆的現象であるゲノム DNA の分解である。この特徴的な DNA 断片化は、ヌクレオソーム単位間に位置する部位で DNA を選択的に切断する核エンドヌクレアーゼの活性化の結果である。それらの DNA 鎖の分裂を、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TUNEL, Terminal Deoxynucleotidyl Transferase - Mediated dUTP Nick End Labeling; Gavrieli など, J. Cell. Biol. 119, 493, 1992) を用いて、フルオロセイン - dUTP による 3' - OH 末端の酵素的ラベリングにより検出した。組み込まれたフルオロセインを、抗 - フルオロセイン抗体アルカリホスファターゼ接合体、続いてアルカリホスファターゼ基質反応を用いて検出した。

40

## 【0054】

結果：

組織：抗黄体ホルモン (I) による処理の後、NMU 腫瘍からの組織切断は、通常、分泌材料により満たされた、形式異常性管及び腺房形式を示した (図5A)。さらに、腫瘍における腺構造の体積画分は、対照に比較して、上昇した (図5B)。さらに、抗黄体ホルモン (I) により処理される動物の乳房腫瘍は、分化の形態学的特徴を示した。

## 【0055】

増殖指数：PCNA 免疫反応性は、処理されていない NMU - 誘発された乳癌組織において高い (図5C : 処理されていない対照)。PCNA 免疫反応性を有する細胞の数は、抗

50

黄体ホルモン（I）により処理されたラットからのNMU - 誘発された乳癌組織における分化の誘発により低められる（図5D）。これらのデータは、乳癌においては、抗黄体ホルモンによる処理が分化の誘発により増殖指数を低めることを示す。

【0056】

TUNEL（アポトシス）：図5Eは、処理されていない対照と比較して、NMU - 誘発された乳癌組織における抗黄体ホルモン（I）により誘発されたアポトシスの出現を示す（図5F）。抗黄体ホルモン（I）は単独で、NMU - 誘発された乳癌組織においてアポトシスを誘発でき、そして従って、それらの腫瘍の増殖を阻害したことは、明らかに明確である。

【0057】

例6. T47D細胞系におけるインビトロでの抗黄体ホルモン（I）の抗増殖活性

材料及び方法：

T47D細胞を、0.1nMのE2（エストラジオール）及び抗黄体ホルモン（I）により補充された木炭 - 処理された血清において6日間、1回の培地交換を伴って、増殖した。固定化及び結晶バイオレットによる続く染色に続いて、吸光度を記録し、そして値を、R. B. Lichtner, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 1999, 71: 181 - 189に記載のようにして、処理されていない対照の吸光度に対して標準化した。TUNELアッセイを、上記例5に類似して行う。但し、組織断片の代わりに、顕微鏡スライド上で培養される細胞をアッセイのために使用する。

【0058】

結果：

このT47D細胞系インビトロ試験においては、抗黄体ホルモン（I）は、 $10^{-9}$  ~  $10^{-8}$  モル/lほどの低い有効限界濃度で有能な腫瘍増殖阻害活性を示したが、ところが抗体ホルモンオナプリストンはいずれの阻害効果も示さなかった。純粋な抗エストロゲン11 - フルオロ - 7 - {5 - [N - メチル - N - 3 - (4, 4, 5, 5, 5 - ペンタフルオロペンチルチオ) - プロピルアミノ] - ペンチル} - エストラ - 1, 3, 5 (10) - トリエン - 3, 17 - ジオール (WO98/07740号) でさえ、抗黄体ホルモン（I）よりも明確に低い効果を有した（図6を参照のこと）。

【0059】

結論：

本発明の抗黄体ホルモン（I）は、非常に低い濃度で、エストラジオール - 刺激されたT47D細胞増殖の完全な阻害を誘発し、そして従って、試験される他の抗黄体ホルモン、例えばオナプリストン及び純粋な抗エストロゲン11 - フルオロ - 7 - {5 - [N - メチル - N - 3 - (4, 4, 5, 5, 5 - ペンタフルオロペンチルチオ) - プロピルアミノ] - ペンチル} - エストラ - 1, 3, 5 (10) - トリエン - 3, 17 - ジオールよりも、有能性及び効率性に関して、卓越する。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、対照、抗黄体ホルモンオナプリストン及び卵巣摘出に比較しての、ラットのDMBA - 誘発された乳癌における用量 - 応答研究における抗黄体ホルモン（I）によるアポトシスの誘発の結果としての腫瘍増殖阻害効果を示す。この研究は、0.5, 2.0, 5.0及び10.0 mg/kg, s.c. 用量（毎日）の抗黄体ホルモン（I）により行われた。

【図2】

図2は、対照及び卵巣摘出に比較しての、ラットのNMU - 誘発された乳癌における抗黄体ホルモン（I）によるアポトシスの誘発の結果としての腫瘍増殖阻害効果を示す。この研究は、0.5及び1.0 mg/kg, s.c. 用量（毎日）の抗黄体ホルモン（I）により行われた。

【図3】

図3は、対照及び卵巣摘出に比較しての、scidマウスにおける異種移植されたヒトT

10

20

30

40

50

47D腫瘍に対するアポトシスの誘発及び従って、10mg/kg, s.c. 用量の抗黄体ホルモン(I)の腫瘍増殖阻害効果を示す。

【図4】

図4は、対照及び卵巣摘出に比較しての、scidマウスにおけるMCF-7ヒト乳癌モデルにおけるアポトシスの誘発及び従って、10mg/kg, s.c. 用量の抗黄体ホルモン(I)の腫瘍増殖阻害効果を示す。

【図5】

図5A~5Fは、ラットにおけるNMU-誘発された乳癌モデルにおけるアポトシスの誘発に関する組織学的データを示す(図5を参照のこと)。特に、図5Aは、抗黄体ホルモン(I)により処理された腫瘍が、対照(図5B)に比較して、通常分泌材料により満たされた管及び腺房形成を示すことを示す。図5Cは、低いPCNA(増幅性細胞核抗原)免疫反応性を示す。抗黄体ホルモン(I)により処理されたNMU-誘発された乳がん組織(図5D)に比較しての、高いPCNA免疫反応性有する未処理のNMU-誘発された乳癌組織を示す。図5Eは、対照(図5E)に比較しての、抗黄体ホルモン(I)-処理されたNMU-誘発された乳癌組織におけるアポトシスの出現を示す。

10

【図6】

図6は、抗黄体ホルモンオナプリストン及び純粋な抗エストロゲン11-フルオロ-7-〔5-〔N-メチル-N-3-(4,4,5,5,5-ペンタフルオロペンチルチオ)-プロピルアミノ]-ペンチル}-エストラ-1,3,5(10)-トリエン-3,17-ジオール(WO98/07740号)に比較しての、10<sup>-9</sup>~10<sup>-8</sup>モル/lの有効限界濃度でのT47D乳癌細胞系(エストラジオールにより刺激された)における抗黄体ホルモン(I)の腫瘍増殖阻害効果を示す。

20

【図1】

【図2】

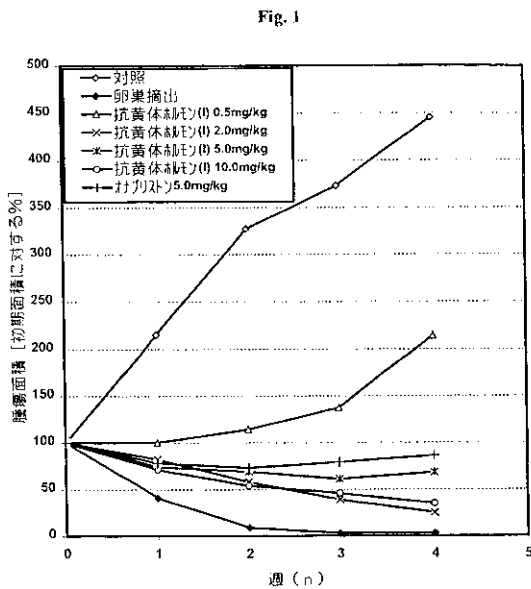
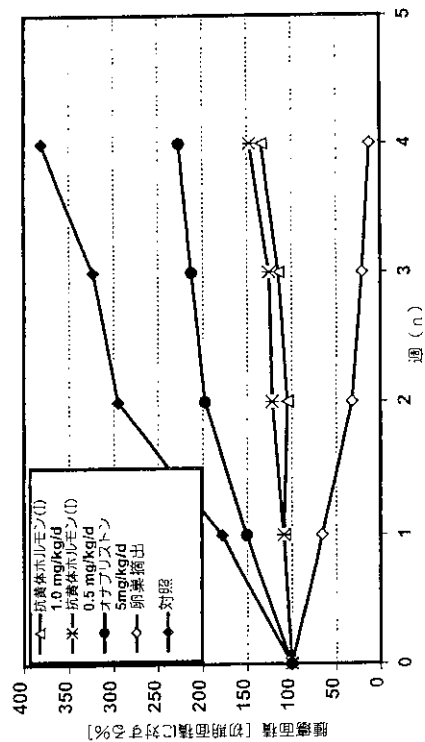
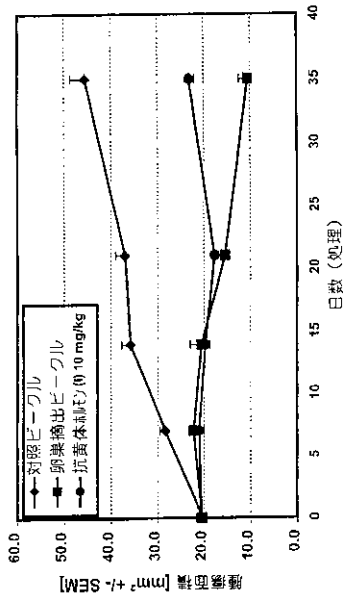


Fig. 2



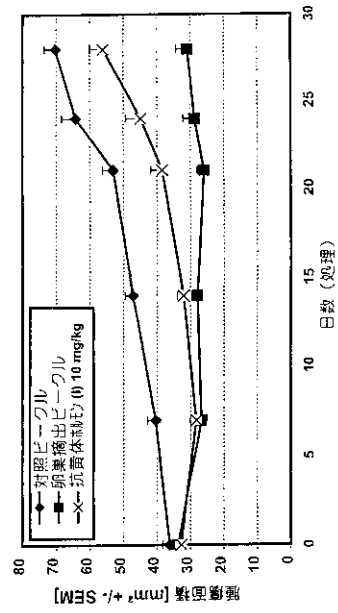
【 図 3 】

Fig. 3



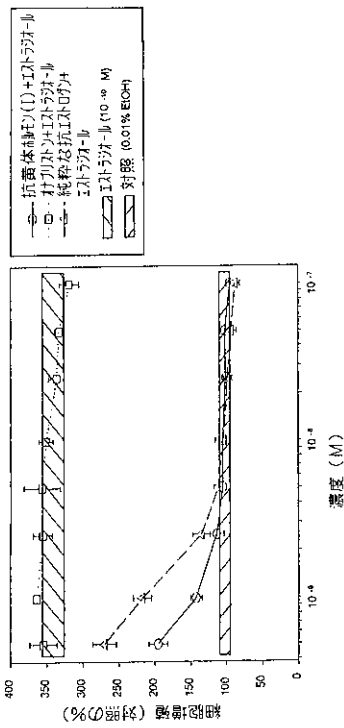
【 図 4 】

Fig. 4



【 図 6 】

Fig. 6



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
25 April 2002 (25.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/32432 A1

- (51) International Patent Classification: A61K 31/57 (74) Claim Representative: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT, Mollatstr. 178, 13353 Berlin (DE)
- (21) International Application Number: PCT/EP01/12006 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) International Filing Date: 17 October 2001 (17.10.2001) (84) Designated States (regional): AR(PO) patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AL, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
00250342.3 18 October 2000 (18.10.2000) EP  
90/240,991 18 October 2000 (18.10.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT (DE/DE); Mollatstr. 178, 13353 Berlin (DE).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): HOFFMANN, Jens (DE/DE), Gresselienfeld 27, 14567 Mühlentzsch (DE); LICHTNER, Rosemarie (DE/DE), Belziger Str. 39, 10823 Berlin (DE); SIEMEISTER, Gerd (DE/DE), Reimerswälder Steig 26, 13303 Berlin (DE); SCHNEIDER, Martin (DE/DE), Schluchsestr. 6a, 13469 Berlin (DE); FUHRMANN, Ulrike (DE/DE), Charottenburger Ufer 6a, 10587 Berlin (DE).

Published:

with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/32432 A1

(54) Title: USE OF ANTIPROGESTINS FOR THE INDUCTION OF APOPTOSIS IN A CELL.

(57) Abstract: The present invention relates to methods and uses for inducing apoptosis in a cell, in particular a breast cancer cell, by the administration of antiprogesterins, in particular the antiprogesterin 11 $\beta$ -(4-acetylphenyl)-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(1,1,2,2,2-pentafluoroethyl)-estra-4,9-dien-3-one or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof. The invention further relates to a treatment of cancer wherein an indicator of high risk is an increased amount of tumor cells in the S-phase of the cell cycle, said treatment comprising an antiprogesterin, in particular the antiprogesterin 11 $\beta$ -(4-acetylphenyl)-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(1,1,2,2,2-pentafluoroethyl)-estra-4,9-dien-3-one or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof.

WO 02/32432

PCT/EP01/12066

**USE OF ANTIPROGESTINS FOR THE INDUCTION OF  
APOPTOSIS IN A CELL**

Field of the Invention

The present invention relates to the use of antiproggestins for the induction of apoptosis in a cell. In particular, the invention relates to use of the antiproggestin 11 $\beta$ -(4-acetylphenyl)-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(1,1,2,2,2-pentafluoroethyl)-estra-4,9-dien-3-one or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof for the induction of apoptosis in a cell. The present invention further provides a use of antiproggestins for the preparation of a medicament for the treatment of a type of cancer, such as breast cancer, wherein an indicator of high risk is an increased amount of tumor cells in the S-phase of the cell cycle.

Background of the Invention

Antiproggestins represent a relatively new and promising class of therapeutic agents that could have significant impact on the treatment of hormone-dependent tumors and other diseases. Although antiproggestins were originally created with regard to medicinal non-surgical termination of pregnancy, certain antiproggestins have gained considerable importance, e.g., in the endocrine therapy of those breast cancers which possess receptors for progesterone (T. Maudelonde et al., in: J.G.M. Klijn et al., *Hormonal Manipulation of Cancer: Peptides, Growth Factors and New (Anti) Steroidal Agents*, Raven Press, New York, 1987, pp. 55-59).

This new strategy in endocrine therapy is based on the antitumor activity of antiproggestins in progesterone receptor positive human breast cancer cell lines *in vitro* and in several

WO 02/32432

PCT/EP01/12006

2

hormone-dependent mammary tumors of the mouse and rat *in vivo*. In particular, the antitumor mechanism of the antiprogestins onapristone and mifepristone (RU 486) has already been investigated using the hormone-dependent MXT mammary tumor model of the mouse as well as the DMBA- and the NMU-induced mammary tumor models of the rat (M. R. Schneider et al., *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, Vol. 25, No. 4, pp. 691-701, 1989; H. Michna et al., *Breast Cancer Research and Treatment* 14:275-288, 1989; H. Michna, *J. Steroid. Biochem.* Vol. 34, Nos 1-6, pp. 447-453, 1989). However, due to low activity and adverse side effects involved with e.g. mifepristone this compound could not be recommended as a single agent in the management of breast cancer (D. Perrault et al., *J. Clin. Oncol.* 1996 Oct, 14(10), pp.2709-2712). Furthermore, mifepristone exhibits strong antiglucoocorticoid side effects (cf. L.M. Kettel et al., *Fertil. Steril.* 1991 Sep, 55(3), pp. 402-407; X. Bertagna, *Psychoneuroendocrinology* 1997; 22 Suppl. 1, pp. 51-55).

15 The determination of the percentage of tumor cells in the respective phases of the cell cycle can be performed by the powerful DNA flow cytometry method (cf. G. M. Clark et al., *N. Engl. J. Med.* 320, 1989, March, pp.627-633; L. G. Dressler et al., *Cancer* 61(3), 1988, pp. 420-427 and literature cited therein). It has thus been shown that the stages of the cell cycle of a tumor cell, and specifically, the number of tumor cells in certain stages of the cycle, may be an important clinical predictor of disease progression and success of therapy. The number of cells in the S-phase of the cell cycle are particularly important in this regard.

25 TIP 0 495 825 B1 discloses the use of antiprogestins (competitive progesterone antagonists) for the production of medicaments for the treatment of mammary carcinomas having an increased content of tumor cells in the S-phase of the cell cycle, which is considered to be a high risk factor. This is based on the observation that antiprogestins are capable of blocking the progression of tumor cells in the G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>-phase of the cell cycle resulting in a substantial decrease of tumor cells in the S-phase. This effect was however not observed with the standard breast cancer therapy tamoxifen, estrogen therapy or 30 ovariectomy. The antiprogestins tested in EP 0 495 825 B1 are 11β-[4-N,N-

WO 02/32432

PCT/EP01/12006

3

dimethylamino)-phenyl]-17 $\alpha$ -hydroxy-17 $\beta$ -(3-hydroxypropyl)-13 $\alpha$ -methyl-4,9(10)-gonadien-3-one and 11 $\beta$ -(4-acetylphenyl)-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(prop-1-ynyl)-4,9(10)-estradien-3-one.

- 5 17 $\alpha$ -fluoroalkylsteroids having strong antiprogesterin activity as well as methods for producing them are described in WO 98/34947. WO 98/34947 does not discuss or investigate the role that the 17 $\alpha$ -fluoroalkylsteroids disclosed therein may play in cell apoptosis or cell cycle arrest.
- 10 Given the potential value of agents that induce apoptosis in cells, e.g., in the case of tumor cells, by blocking progression in the G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>-phase, it is desirable to identify further agents, e.g., antiprogesterins, having this specific mechanism of action. Such agents would have potential application in treating and preventing certain types of cancer, such as breast cancer, wherein an indicator of high risk is an increased amount of tumor cells in the S-
- 15 phase of the cell cycle.

#### Object of the Invention

It is thus an object of the present invention to further investigate the mode of action of antiprogesterins in inhibiting hormone-dependent diseases such as breast cancer and to

20 provide a method for the targeted induction of apoptosis in cells.

Surprisingly, the inventors have discovered that the antiprogesterin 11 $\beta$ -(4-acetylphenyl)-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(1,1,2,2,2-pentafluoroethyl)-estra-4,9-dien-3-one (or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof) may be used for the induction

25 of apoptosis in a cell.

#### Summary of the Invention

The present invention is based on the unexpected observation that the antiprogesterin 11 $\beta$ -(4-acetylphenyl)-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(1,1,2,2,2-pentafluoroethyl)-estra-4,9-dien-3-one

30 (hereinafter referred to as "antiprogesterin (I)") induces apoptosis and cell death in the

WO 02/32432

PCT/EP01/12006

4

tumor cells of standard breast cancer tumor models. It was found that antiprogesterin (I) is capable of inducing apoptosis in cells via the initiation of terminal differentiation.

Thus, the present invention provides the use of antiprogesterin (I) or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof for the preparation of a medicament for the induction of apoptosis in a cell. Preferably, the induction of apoptosis is caused by the initiation of terminal differentiation. The cell is preferably a mammalian cell, more preferably a human cell and most preferably a tumor cell, wherein the tumor is preferably breast cancer.

10

Another aspect of the present invention is the use of antiprogesterin (I) or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof for the preparation of a medicament for the treatment of types of cancer wherein an indicator of high risk is an increased amount of tumor cells in the S-phase of the cell cycle.

15

A further aspect of the present invention is the use of antiprogesterin (I) or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof for the induction of apoptosis in a cell *in vitro*. Preferably, the cell is a mammalian cell, more preferably a human cell and most preferably a tumor cell, wherein the tumor is preferably breast cancer.

20

Another aspect of the present invention is a method of inducing apoptosis in a cell by administering an effective amount of antiprogesterin (I) to the cell. This method may be applied *in vitro* or *in vivo*. Preferably, the cell is a mammalian cell, more preferably a human cell and most preferably a tumor cell, wherein the tumor is preferably breast

25

cancer. Due to the ability to induce cell apoptosis the antiprogesterin (I) or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof may be used for the treatment of certain types of cancer, such as breast cancer, wherein an indicator of high risk is an increased amount of tumor cells in the S-phase of the cell cycle. Other types of cancer or hormone-dependent diseases that may be affected and treated by antiprogesterin (I) due to its ability to induce

30

WO 02/32432

PCT/EP01/12006

5

cell apoptosis may include, e.g., breast cancer, ovarian cancer, endometrial cancer, myeloma, anovulatory infertility, meningoma, i.e. diseases which substantially originate or are influenced by the presence of hormone receptors and/or hormone-dependent pathways.

5

#### Brief Description of the Figures

Figure 1 shows the tumor growth inhibiting effect as a result of the induction of apoptosis by antiprogesterin (I) in a dose-response study in the DMBA-induced mammary carcinoma of the rat, compared with a control, the antiprogesterin onapristone as well as ovariectomy.

10 The study was performed with 0.5, 2.0, 5.0 and 10.0 mg/kg s.c. daily doses of antiprogesterin (I).

Figure 2 shows the tumor growth inhibiting effect as a result of the induction of apoptosis by antiprogesterin (I) in the NMU-induced mammary carcinoma of the rat, compared with a control and ovariectomy. The study was performed with 0.5 and 1.0 mg/kg s.c. daily doses of antiprogesterin (I).

15

Figure 3 shows the induction of apoptosis and thus the tumor growth inhibiting effect of antiprogesterin (I) in a 10 mg/kg s.c. dose on xenotransplanted human T47D tumors in scid mice, compared to a control and ovariectomy.

20

Figure 4 demonstrates the induction of apoptosis and thus the tumor growth inhibiting effect of a 10 mg/kg s.c. dose of antiprogesterin (I) in the MCF-7 human breast cancer model in scid mice, compared to a control and ovariectomy.

25

Figures 5A to 5F show histological data relating to the induction of apoptosis in the NMU-induced breast cancer model in rat (cf. Example 5). In particular, figure 5A shows that tumors treated with antiprogesterin (I) display ductal and acinous formations, usually filled with secretory material, compared to the control (figure 5B). Figure 5C shows untreated NMU-induced breast cancer tissue with high PCNA (proliferating cell nuclear antigen) immunoreactivity as compared to NMU-induced breast cancer tissue treated with

30

WO 02/32432

PCT/EP01/12006

6

antiprogesterin (I) (figure 5D), which exhibits low PCNA immunoreactivity. Figure 5E shows the appearance of apoptosis in antiprogesterin (I)-treated NMU-induced breast cancer tissue, compared to the control (figure 5B).

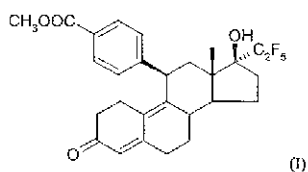
- 5 Figure 6 demonstrates the tumor growth inhibiting effect of antiprogesterin (I) in the T47D breast cancer cell line (stimulated by estradiol) with an effective threshold concentration of  $10^{-9}$  to  $10^{-8}$  mol/l, compared with the antiprogesterin onapristone and the pure anticestrogen 11 $\beta$ -fluoro-7 $\alpha$ -{5-[N-methyl-N-3-(4,4,5,5,5-pentafluoropentylthio)-propylamino]-pentyl}-estra-1,3,5(10)-trien-3,17 $\beta$ -diol (WO 98/07740).

10

#### Detailed Description of the Invention

Antiprogesterin (I) -- 11 $\beta$ -(4-acetylphenyl)-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(1,1,2,2,2-pentafluoroethyl)-estra-4,9-dien-3-one --- is represented below by formula (I):

15



20

Antiprogesterin (I) (or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof) is a valuable pharmaceutical agent having strong antiprogesterin activity. Antiprogesterin (I) can be used according to the present invention for the induction of apoptosis in cells.

25

The term "antiprogesterin" in the context of the present invention is intended to primarily comprise all compounds being capable of competitively inhibiting progesterone receptors.

WO 02/32432

PCT/EP01/12006

7

However, it should also encompass compounds capable of inhibiting the biosynthesis of progestins.

Pharmaceutically acceptable derivatives or analogues of antiprogestin (I) in the context of  
5 the present invention may include, for example, any one of the inventive compounds disclosed in WO 98/34947.

The studies performed in the context of the present invention show the potent tumor-inhibiting properties of the antiprogestin (I) in a variety of hormone-dependent tumor  
10 models (see Examples 1 to 6). It is further demonstrated that the tumor inhibiting activity of antiprogestin (I) as a result of the induction of apoptosis is stronger than conventional anti-tumor agents, such as, the antiestrogen tamoxifen. The treatment of breast cancer using the antiprogestin (I) according to the present invention is even superior to ovariectomy.

15 Application of antiprogestin (I) in the various tumor models as demonstrated below in the Examples revealed an accumulation of tumor cells in the G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> phase of the cell cycle together with a significant and biologically relevant reduction in the number of cells in the S and G<sub>2</sub>M phase of the cell cycle. These results indicate an induction of differentiation.  
20 Differentiation-specific G<sub>1</sub> arrest has already been proposed earlier for other stem cell systems (see J.J. Wille Jr., *Cancer Res.* 1982, 42(12):5139-46; R.E. Scott, *J. Cell. Biol.* 1982, 94(2):400-405).

The experimental results obtained in the various tumor models revealed that treatment  
25 with antiprogestin (I) seems to trigger differentiation of the mitotically active polygonal tumor cells towards glandular structures and acini with a massive sequestering of secretory products, as well as towards spindle-shaped necrobiotic subpopulations (see Example 5 and in particular figures 5A and 5B). Whereas tumor size, mitotic index and the grade of malignancy decreased distinctly, the volume fraction of glandular structures  
30 in the tumors as well as the appearance of apoptosis increased 3-fold compared to the controls (see Example 5, figures 5E and 5F).

WO 02/32432

PCT/EP01/12006

8

Without limitation to any theory, these results indicate that the main mechanism of the antitumor action of antiprogesterin (I) in the tested models is a direct progesterone-receptor-mediated antiproliferative effect at the level of the tumor cells, via the induction of terminal differentiation associated with terminal cell death. In this manner, antiprogesterin (I) appears to be capable of eliminating the intrinsic block in terminal differentiation inherent in malignant tumor cells in progesterone receptor-positive tumors. This antiproliferative effect of antiprogesterin (I) seems to be dissociated from the antihormone (antiprogesterin) activity of antiprogesterin (I).

Agents such as antiprogesterin (I) that induce apoptosis in cells, for example, in the case of tumor cells, by blocking progression in the G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>-phase, have potential applications for treating and preventing numerous conditions. Such agents, including antiprogesterin (I), may be used for treating those cancers where an indicator of high risk is an increased amount of tumor cells in the S-phase of the cell cycle, such as in breast cancer.

Thus one aspect of the present invention is the use of antiprogesterin (I) or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof for preparation of a medicament for the induction of apoptosis in a cell. In a preferred embodiment, the use of antiprogesterin (I) or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof relates to a medicament for the induction of apoptosis in a tumor cell, preferably a breast tumor cell, in a human. Such medicament could be beneficial in the treatment of hormone-dependent diseases such as breast cancer, wherein an indicator of high risk is an increased amount of tumor cells in the S-phase of the cell cycle.

The manufacture of the medicaments may be performed according to methods known in the art. Commonly known and used adjuvants as well as further suitable carriers or diluents may be used. Suitable carriers and adjuvants may be such as recommended for pharmacy, cosmetics and related fields in: *Ullmann's Encyclopedia of Technical Chemistry*, Vol. 4, (1953), pp. 1-39; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 52 (1963), p. 918ff; H.v.Czetsch-Lindenwald, "Hilfsstoffe für Pharmazie und angrenzende Gebiete";

WO 02/32432

PCT/EP01/12006

9

*Pharm. Ind.* 2, 1961, p.72ff; Dr. H.P. Fiedler, *Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete*, Cantor K.G, Aulendorf in Württemberg, 1971.

Antiprogesterins suitable for the purposes of the present invention, preferably antiprogesterin  
5 (I) or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof, can be incorporated  
into pharmaceutical compositions according to known methods of preparing galenics for  
oral or parenteral, e.g., intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous or percutaneous  
application. They can also be implanted into tissue. Implants can comprise as inert  
10 materials e.g. biologically degradable polymers or synthetic silicones such as e.g. silicone  
rubber.

They can be administered in the form of tablets, pills, dragees, gel capsules, granules,  
suppositories, implants, injectable sterile aqueous or oily solutions, suspensions or  
emulsions, ointments, creams, gels or by intravaginal (e.g., vaginal rings) or intrauterine  
15 systems (e.g., diaphragms, loops).

For the preparation of a medicament for oral administration, the antiprogesterins suitable for  
the purposes of the present invention as defined above can be admixed with commonly  
known and used adjuvants and carriers such as for example, gum arabic, talcum, starch,  
20 sugars such as, e.g., mannitose, methyl cellulose, lactose, gelatin, surface-active agents,  
magnesium stearate, aqueous or non-aqueous excipients, paraffin derivatives, cross-  
linking agents, dispersants, emulsifiers, lubricants, conserving agents and flavoring agents  
(e.g., ethereal oils). In a pharmaceutical composition, the antiprogesterin may be dispersed  
in a microparticle, e.g. a nanoparticulate, composition.

25 In order to further enhance the bioavailability of the active agent, the antiprogesterins  
suitable for the purposes of the present invention as defined above can also be formulated  
as cyclodextrin clathrates by reacting them with  $\alpha$ -,  $\beta$ - or  $\gamma$ -cyclodextrines or derivatives  
thereof according to the method as disclosed in PCT/EP95/02656.

30 For parenteral administration the antiprogesterins suitable for the purposes of the present  
invention as defined above can be dissolved or suspended in a physiologically acceptable

WO 02/32432

PCT/EP01/12066

10

diluent, such as, e.g., oils with or without solubilizers, surface-active agents, dispersants or emulsifiers. As oils for example and without limitation, olive oil, peanut oil, cottonseed oil, soybean oil, castor oil and sesame oil may be used.

5 The amount to be administered (i.e., a "pharmaceutically effective amount") varies within a broad range and depends on the condition to be treated and the mode of administration. It can cover any amount efficient for the intended treatment. Determining a "pharmaceutically effective amount" is within the purview of the person skilled in the art.

10 One unit dose may represent about 0.1 to 100 mg active agent(s). For administration to humans, the daily dose of the active agent(s) is about 0.1 to 400 mg, preferably 10 to 100 mg, most preferably 50 mg.

The medicaments can also be administered via a depot injection or an implant preparation,  
15 optionally for sustained delivery of the active agent(s).

The preferred mode of administration is oral administration. The antiprogestins for use according to the invention, and in particular, antiprogestin (I) are particularly suitable for oral administration.

20

According to all aspects of the present invention it is also possible to combine at least one antiprogestin as defined above, in particular antiprogestin (I) or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof, with at least one antiestrogen, because many hormone-dependent diseases, in particular breast cancer, exhibit not only progesterone

25

receptors, but also estrogen receptors. The antiestrogen may be administered either simultaneously with or sequentially to the antiprogestin, and in particular with/

30

antiprogestin (I) or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof. The amount of antiprogestin and antiestrogen may be equal or one component may be more predominant than the other, such as in an antiprogestin:antiestrogen ratio of 1:50 to 50:1, preferably 1:30 to 30:1, and most preferably 1:15 to 15:1.

WO 02/32432

PCT/EP01/12006

11

Examples of suitable antiestrogens for use according to the invention are non-steroidal antiestrogens, such as tamoxifen and nafoxidine as well as raloxifen, faslodex and EM800. Examples of steroidal antiestrogens include those disclosed in EP 0 348 341 A and those disclosed in WO 98/07740, in particular, 11 $\beta$ -flouro-7 $\alpha$ -{5-[N-methyl-N-3-(4,4,5,5,5-pentafluoropentyl(hio-propylamino)-pentyl)-estra-1,3,5(10)-trien-3,17 $\beta$ -diol, or those disclosed in WO 99/33855, in particular 11 $\beta$ -flouro-7 $\alpha$ -{5-[methyl-(7,7,8,8,9,9,10,10,10-nonafluoro-decyl)-amino]-pentyl)-estra-1,3,5(10)-trien-3,17 $\beta$ -diol or pharmaceutically acceptable derivatives or analogues thereof. Aromatase inhibitors having an antiestrogen effect, such as those disclosed on pages 7 to 8 of EP 0 495 825 B1 may also be used as antiestrogens.

Another aspect of the present invention is the use of antiprogesterin (I) or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof for the preparation of a medicament for the treatment of a type of cancer wherein an indicator of high risk is an increased amount of tumor cells in the S-phase of the cell cycle. The number of tumor cells in the S-phase may be determined by DNA flow cytometry as described in Dressler et al., "DNA Flow Cytometry and Prognostic Factors in 1331 Frozen Breast Cancer Specimens," *Cancer*, Vol. 61(3), 1988, pp. 420-427; see also McGuire & Dressler, "Emerging Impact of Flow Cytometry in Predicting Recurrence and Survival in Breast Cancer Patients," *JNCI*, Vol. 75(3), 1985, pp. 405-409. A high risk amount of tumor cells in the S-phase indicates a particularly suitable candidate for the use according to the invention. In the case of antiprogesterin (I), the advantage arises from both the potent anti-tumor effect, as evidenced by the standard animal models (see Examples 1 to 4), and the mechanism of action of this agent of inducing apoptosis (see in particular Example 5) and cell cycle arrest.

In an alternative aspect the present invention provides a method for inducing apoptosis in a cell. The cell is preferably a mammalian cell and most preferably a human cell, and the method may be applied *in vitro* or *in vivo*. Preferably, apoptosis is induced via the mechanism of initiating terminal differentiation, for example, by the administration of antiprogesterin (I) or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof. In the

WO 02/32432

PCT/EP01/12006

12

method, an effective amount of antiprogesterin (I) or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof may be applied to the cells in question. For example in the T47D breast cancer cell line, whose growth is stimulated by the administration of estradiol, antiprogesterin (I) induced a complete inhibition of cell growth with an effective threshold concentration of between  $10^{-9}$  and  $10^{-8}$  mol (see Example 6 and figure 6). This is especially surprising as the known antiprogesterin onapristone has no reducing effect on cell growth in this tumor model. Thus, antiprogesterin (I) is superior with regard to potency and efficacy to other antiprogesterins such as onapristone and to antiestrogens such as tamoxifen and even to pure antiestrogens such as 11 $\beta$ -fluoro-7 $\alpha$ -(5-[N-methyl-N-3-(4,4,5,5,5-pentafluoropentylthio)propylamino]-pentyl)-estra-1,3,5(10)-trien-3,17 $\beta$ -diol (WO 98/07740).

The role of antiprogesterin (I) in the induction of apoptosis in the cell indicates that this antiprogesterin (or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof) may be useful in a host of conditions, particularly hormone-dependent conditions, where induction of apoptosis is particularly desired. Specifically, it may be used in the treatment of such diseases as breast cancer, ovarian cancer, endometrial cancer, myeloma, anovulatory infertility, meningoma, i.e., diseases which substantially originate or are influenced by the presence of hormone receptors and/or hormone-dependent pathways. Antiprogesterins, such as antiprogesterin (I), may thus be further used for the preparation of medicaments for inducing apoptosis or cell death for the treatment of hormone-dependent diseases as already described above.

The invention is further illustrated in the examples. The following examples are not to be understood as a limitation.

#### Examples

30

##### Example 1:

WO 02/32432

PCT/EP01/12006

13

Dose-response study in the DMBA-induced tumor model

## Materials and Methods:

5 Immature female Sprague-Dawley rats (49 - 51 days old; 10 animals/group) were used in this study. Mammary tumors were induced by a single oral administration of 10 mg 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA, Serva/Heidelberg). Rats with at least one established tumor with a size of more than 150 mm<sup>2</sup> were treated for 4 weeks by: 1) solvent control, 2) ovariectomy at treatment start, 3) antiprogesterin (I), 0.5 mg/kg s.c., 4) antiprogesterin (I), 2  
10 mg/kg s.c., 5) antiprogesterin (I), 5 mg/kg s.c., 6) antiprogesterin (I), 10 mg/kg s.c., and 7) onapristone, 5 mg/kg, s.c., daily. As a parameter for growth inhibition the change of tumor area (in % with respect to initial tumor size) determined by weekly caliper measurements was used. For statistical analysis of intergroup differences of mean values the Kruskal-Wallis-test was used. For a further description and evaluation of the DMBA prevention  
15 model, see R.G. Mehta, *European Journal of Cancer* 36 (2000), pp. 1275-1282.

## Results:

In intact control animals, progressive tumor growth was observed, whereas ovariectomy  
20 caused a considerable tumor regression in 90% of the animals. Treatment with antiprogesterin (I) at doses of or above 2 mg/kg resulted in a significant induction of apoptosis resulting in inhibition of tumor growth compared with the control (see fig. 2). There was a clear dose-response relationship. Whereas treatment with 0.5 mg/kg antiprogesterin (I) did not significantly prevent the tumor from growing, at 2 mg/kg  
25 maximal induction of apoptosis and thus growth inhibition was observed. In this group a complete tumor regression was seen in 50% of the rats. The effect of the highest dose of antiprogesterin (I) tested in this experiment (10 mg/kg), was comparable to that of 2 mg/kg. Onapristone (5 mg/kg, s.c.) was distinctly less effective than antiprogesterin (I) at comparable doses.

30 Conclusion:

WO 02/32432

PCT/EP01/12006

14

In the DMBA-induced mammary tumor model in the rat, antiprogesterin (I) strongly induced apoptosis in the tumor cells and thus completely suppressed the tumor growth in intact animals. It was found that 2 mg/kg antiprogesterin (I) has a maximal apoptotic effect on tumor cells. Antiprogesterin (I) was distinctly superior to onapristone regarding the inhibition of tumor growth.

Example 2:

Tumor growth inhibition in NMU-induced breast cancer model in rat

10

Materials and Methods:

Tumors were induced by a single intravenous injection of NMU (nitrosomethylurea, 50 mg/kg) in female Sprague-Dawley rats (obtained from Tierzucht Schönwalde, age 50-55 days). Starting 10 days later, rats with at least one established tumor were treated for 4 weeks by: 1) solvent control, 2) ovariectomy at treatment start, 3) antiprogesterin (I), 1.0 mg/kg/day, 4) antiprogesterin (I), 0.5 mg/kg/day and 5) onapristone, 5 mg/kg/day. As a parameter for growth inhibition the change of tumor area (in % of initial tumor size) determined by weekly caliper measurements was used. For statistical analysis of intergroup differences of mean values the Kruskal-Wallis-test was used.

20

Results:

In intact control animals, progressive tumor growth was observed, whereas ovariectomy caused a complete tumor growth inhibition. Treatment with antiprogesterin (I) at doses of 0.5 or 1.0 mg/kg resulted in a significant inhibition of tumor growth due to the induction of apoptosis compared with the control (see fig. 2). Onapristone (5 mg/kg) was distinctly less effective than antiprogesterin (I) at the much lower dose of 0.5 mg/kg.

30

Conclusions:

WO 02/32432

PCT/EP01/12066

15

In the MNU-induced mammary tumor model in the rat, due to its potent ability to induce apoptosis in tumor cells, antiprogesterin (I) completely suppresses the tumor growth in intact animals. Both doses (1.0 mg/kg as well as 0.5 mg/kg) of antiprogesterin (I) have a significant apoptotic effect on tumor cells.

5

Example 3:

Human T47D breast cancer xenograft in scid mice

10 **Materials and Methods:**

Female Fox Chase scid mice (M&B) were supplemented with estradiol pellets (Innovative Research of America). T47D breast cancer cells, obtained from cell culture and suspended in matrigel, were implanted s.c. in the inguinal region of the mice. Treatment was started  
15 when the tumors were approximately 25 mm<sup>2</sup> in size. Treatment was continued until progression of the tumors. Experimental groups were: 1) control (vehicle), 2) ovariectomy, 3) antiprogesterin (I), 10 mg/kg s.c. Tumor area was determined by caliper measurements. The Kruskal Wallis test was used for statistical analysis of intergroup differences of mean values.

20

**Results:**

In the T47D breast cancer model, ovariectomy resulted in a considerable inhibition of  
25 tumor growth, compared with the rapid growth in the control. Fig. 3 clearly shows that the s.c. application of 10 mg/kg antiprogesterin (I) induces apoptosis in the tumor cells. The effect of antiprogesterin (I) is almost comparable to the effect of conventional estrogen deprivation therapy (ovariectomy).

30 **Conclusion:**

WO 02/32432

PCT/EP01/12006

16

The effect of antiprogesterin (I) in inducing apoptosis and thus inhibiting the growth of the human T47D breast cancer xenografted in Fox Chase scid mice is comparable to the effect of standard estrogen deprivation therapy (ovariectomy) which is considered to be the maximum effective method of inhibiting growth of breast cancer in this model.

5

Example 4:Human MCF-7 breast cancer xenograft in scid mice

## 10 Materials and Methods:

Female Fox Chase scid mice (M&B) were supplemented with estradiol pellets (Innovative Research of America). MCF7 breast cancer cells, obtained from cell culture and suspended in matrigel, were implanted s.c. in the inguinal region of the mice. Treatment was started when the tumors were approximately 25 mm<sup>2</sup> in size. Treatment was continued until progression of the tumors. Experimental groups were: 1) control (vehicle), 2) ovariectomy, 3) antiprogesterin (I), 10 mg/kg s.c. Tumor area was determined by caliper measurements. The Kruskal Wallis test was used for statistical analysis of intergroup differences of mean values.

15

## 20 Results:

In the MCF7 breast cancer model, ovariectomy resulted in a considerable inhibition of tumor growth, compared with the rapid growth in the control. Fig. 4 clearly shows that the s.c. application of 10 mg/kg antiprogesterin (I) induced apoptosis in the tumor cells. The effect of antiprogesterin (I) is comparable to the effect of conventional estrogen deprivation therapy (ovariectomy).

25

## 30 Conclusion:

WO 02/32432

PCT/EP01/12006

17

The effect of antiprogesterin (I) in inducing apoptosis and thus inhibiting the growth of the human MCF7 breast cancer xenografted in Fox Chase scid mice is comparable to the effect of standard estrogen deprivation therapy (ovariectomy).

5

Example 5:

NMU-induced breast cancer in rat (histology, proliferation index and TUNEL assay)

Materials and Methods:

10

Tumors were induced by a single intravenous injection of NMU (nitrosomethylurea, 50 mg/kg) in female Sprague-Dawley rats (obtained from Tierzucht Schönwalde, age 50-55 days). Rats with at least one established tumor with a size of more than 150 mm<sup>2</sup> were treated for 7 days by: 1) solvent control, 2) ovariectomy at treatment start, 3) antiprogesterin (I), 3 mg/kg s.c., daily. At the end of treatment tumors were excised, fixed in formalin and embedded in paraffin. Histology, proliferation index and apoptosis induction assays were performed on these resected tumors.

15

*Histology:* For histology tissue slides were stained with haematoxylin and analyzed by microscopy.

20

*Proliferation Index:* To determine the proliferation index the expression of PCNA was determined. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is a 36 kD nuclear protein associated with the cell cycle. Nuclear PCNA immunoreactivity is found in the proliferative compartment of normal tissues. A monoclonal antibody, that recognizes a fixation and processing resistant epitope has been used to investigate its tissue distribution.

25

*TUNEL (Apoptosis Test):* The biochemical hallmark of apoptosis is the degradation of the genomic DNA, an irreversible event that results in cell death. This characteristic DNA fragmentation is the result of the activation of nuclear endonucleases, which selectively cleave DNA at sites located between nucleosomal units. These DNA strand breaks were

30

WO 02/32432

PCT/EP01/12066

18

detected by enzymatic labeling of the 3'-OH termini with fluorescein-dUTP using terminal deoxynucleotidyl transferase (TUNEL, Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick End Labeling, cf. Gavrieli et al., J. Cell. Biol. 119, 493, 1992). Incorporated fluorescein was detected using the anti-fluorescein antibody alkaline phosphatase conjugate followed by alkaline phosphatase substrate reaction.

Results:

*Histology:* After treatment with antiprogesterin (I), the tissue sections from the NMU tumors displayed dysplastic ductal and acinous formations, usually filled with secretory material (Figure 5A). Moreover, the volume fraction of glandular structures in the tumors increased compared to controls (Figure 5B). In addition, the mammary tumors of antiprogesterin (I) treated animals showed the morphological features of differentiation.

*Proliferation Index:* PCNA immunoreactivity is high in untreated NMU-induced breast cancer tissue (Figure 5C: Untreated control). The number of cells with PCNA immunoreactivity is reduced by induction of differentiation in NMU-induced breast cancer tissue from rats treated with antiprogesterin (I) (Figure 5D). These data demonstrate that in breast cancer, treatment with antiprogesterin reduces the proliferation index by induction of differentiation.

*TUNEL (Apoptosis):* Figure 5E demonstrates the appearance of apoptosis induced by antiprogesterin (I) in NMU-induced breast cancer tissue in comparison with untreated control (Figure 5F). It is clearly evident that antiprogesterin (I) alone was capable of inducing apoptosis in the NMU-induced breast cancer tissue and thus inhibited the growth of these tumors.

Example 6:

Antiproliferative activity of antiprogesterin (I) *in vitro* in the T47D cell line

WO 02/32432

PCT/EP01/12066

19

## Materials and Methods:

T47D cells were grown in charcoal-treated serum supplemented with 0.1 nM E2  
5 (estradiol) plus antiprogesterin (I) for 6 days with one medium change. Following fixation  
and subsequent staining with crystal violet, the absorbance was recorded and values  
normalized to the absorbance of untreated controls as described in R.B. Lichtner, *J.*  
*Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1999, 71;181-189. The TUNEL assay is performed analogous  
to above Example 5 with the only difference that instead of tissue sections cells that are  
10 cultivated on microscopic slides are used for the assay.

## Results:

In this T47D cell line *in vitro* test, antiprogesterin (I) exhibited potent tumor growth  
15 inhibiting activity with an effective threshold concentration as low as  $10^{-9}$  to  $10^{-8}$  mol/l  
whereas the antiprogesterin onapristone did not show any inhibiting effect. Even the pure  
antiestrogen 1[ $\beta$ -fluoro-7 $\alpha$ -{5-[N-methyl-N-3-(4,4,5,5,5-pentafluoropentylthio)-  
propylamino]-pentyl}-estra-1,3,5(10)-trien-3,17 $\beta$ -diol (WO 98/07740) was distinctly less  
effective than antiprogesterin (I) (see figure 6).

20

## Conclusion:

Antiprogesterin (I) according to the present invention induces complete inhibition of  
estradiol-stimulated T47D cell growth at very low concentrations and is thus superior  
25 regarding potency and efficacy to other antiprogesterins tested such as onapristone and to  
the pure antiestrogen 1[ $\beta$ -fluoro-7 $\alpha$ -{5-[N-methyl-N-3-(4,4,5,5,5-pentafluoropentylthio)-  
propylamino]-pentyl}-estra-1,3,5(10)-trien-3,17 $\beta$ -diol.

WO 02/32432

PCT/EP01/12066

20

**CLAIMS**

- 5 1. Use of the antiprogestin 11 $\beta$ -(4-acetylphenyl)-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(1,1,2,2,2-pentafluoroethyl)-estra-4,9-dien-3-one or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof for the induction of apoptosis in a cell.
- 10 2. Use according to claim 1 wherein the induction of apoptosis is caused by the initiation of terminal differentiation.
3. Use according to any preceding claim wherein the cell is a mammalian cell.
4. Use according to claim 3 wherein the mammalian cell is a human cell.
- 15 5. Use according to any preceding claim wherein the cell is a tumor cell.
6. Use according to claim 5 wherein the tumor is breast cancer.
- 20 7. Use according to any preceding claims, wherein the medicament further comprises an antiestrogen.
- 25 8. Use of the antiprogestin 11 $\beta$ -(4-acetylphenyl)-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(1,1,2,2,2-pentafluoroethyl)-estra-4,9-dien-3-one or a pharmaceutically acceptable derivative or analogue thereof for the preparation of a medicament for the treatment of a type of cancer wherein an indicator of high risk is an increased amount of tumor cells in the S-phase of the cell cycle.
9. The use according to claim 8, where the disease is breast cancer.
- 30 10. Method of inducing apoptosis in a cell, comprising administering an effective amount of the antiprogestin 11 $\beta$ -(4-acetylphenyl)-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(1,1,2,2,2-

WO 02/32432

PCT/EP01/12006

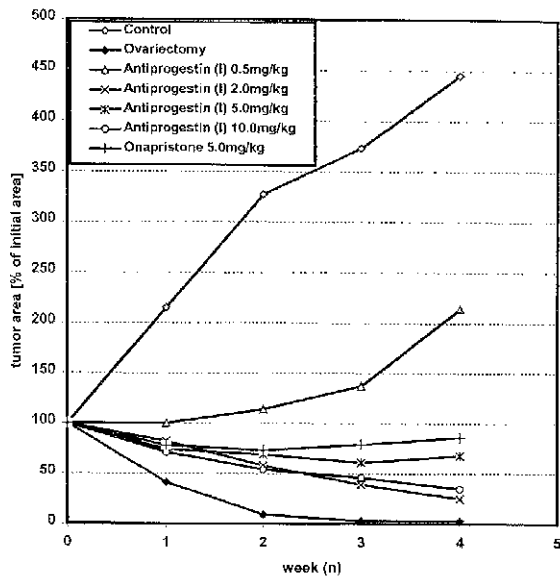
21

pentafluoroethyl)-estra-4,9-dien-3-one or a pharmaceutically acceptable analogue or derivative thereof to a cell *in vitro*.

11. The method according to claim 10, wherein the cell is a mammalian tumor cell.

5 12. The method according to claims 10 or 11, wherein the cell is a breast cancer cell.

Fig. 1

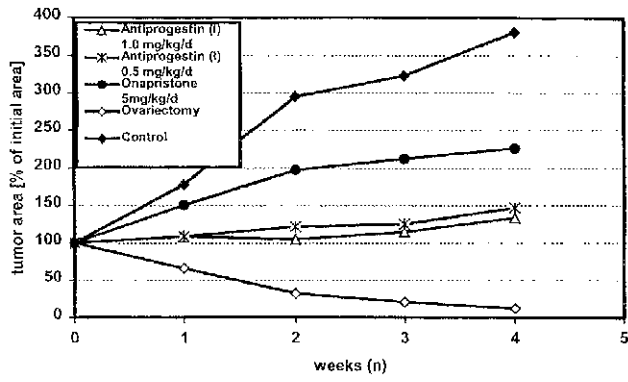


WO 02/32432

2/11

PCT/EP01/12066

Fig. 2

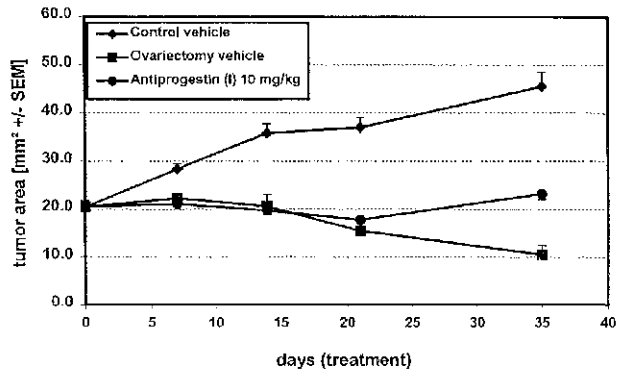


WO 02/32432

3/11

PCT/EP01/12066

Fig. 3



WO 02/32432

4/11

PCT/EP01/12006

Fig. 4

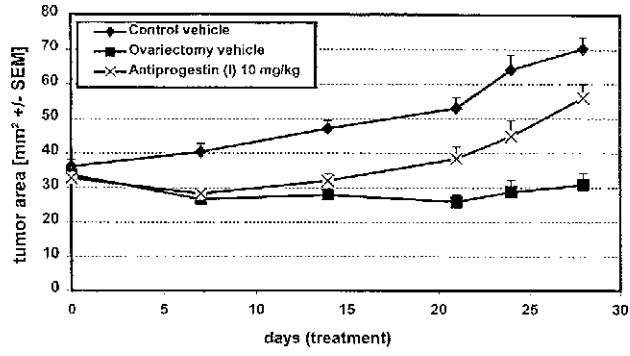


Fig. 5A

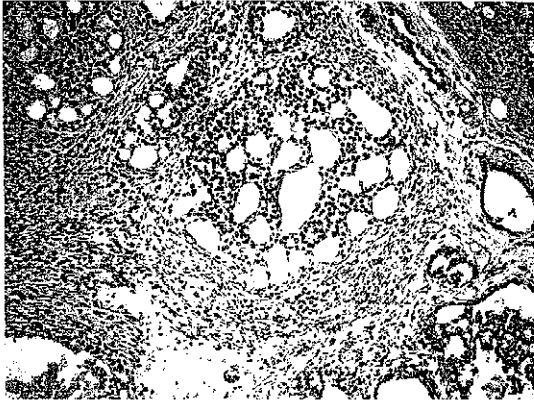


Fig. 5B

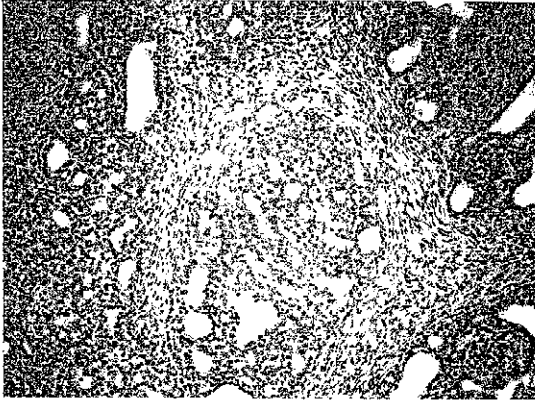


Fig. 5C

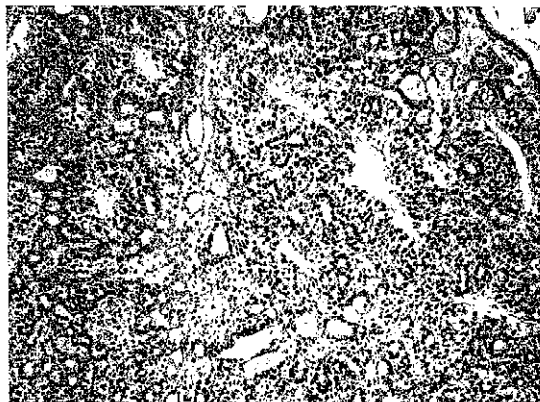


Fig. 5D

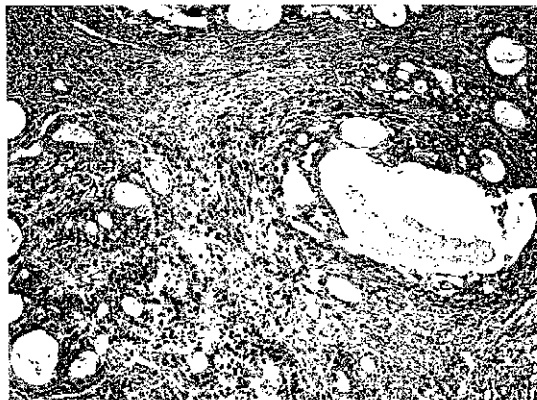


Fig. 5E

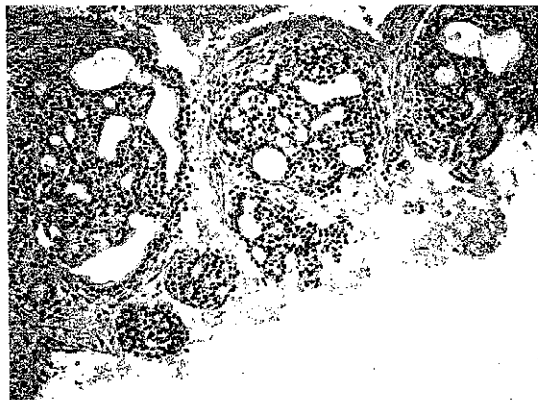


Fig. 5F

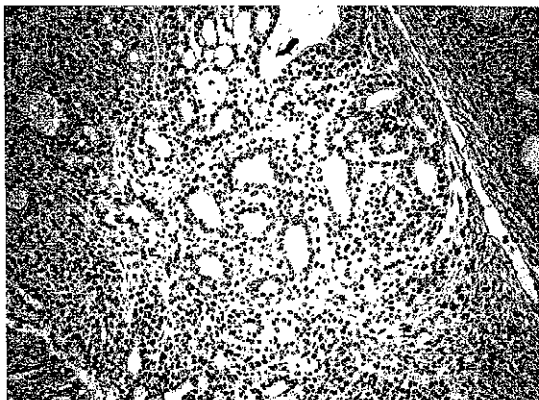
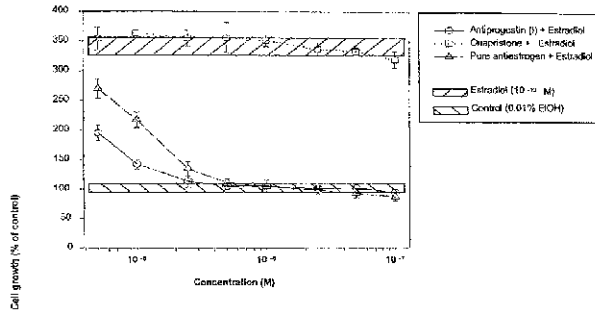


Fig. 6



【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  |   | International Application No.<br>PCT/JP 01/12006   |
|--|---|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC 7 A61K31/57<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |   |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched in classification system followed by classification symbols<br>IPC 7 A61K<br>Documents searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)<br>WPI Data, EPO-Internal, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, CANCERLIT   |   |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |   |  |
| Category*  | Location of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.                              |
| X  | DE 197 06 061 A (SCHERING AG)<br>13 August 1998 (1998-08-13)<br>cited in the application<br>page 3, line 30<br>page 4, line 56,57; claim 1<br>----- | 1-12   |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of text C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex   |   |  |
| * Special categories of cited documents:<br>(A) Document defining the general state of the art which is not intended to be of particular relevance<br>(B) Single document but published in or through international language<br>(C) Document which may have a claim not directly related or which is cited to illustrate the disclosure of another claim or other special reason as specified<br>(D) Document referred to in oral disclosure, use, exhibition or other means<br>(E) Document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>(F) Non-patent document cited in the international filing date but later than the priority date claimed<br>(G) Document published after the international filing date but earlier than the priority date claimed<br>(H) Document published in the same patent family |   |  |
| Date of the actual completion of the international search  |   | Date of mailing of the international search report |
| 18 March 2002  |   | 26/03/2002   |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.O. Box 6918, Frankfurt a.M. - 70304, Germany<br>Tel: +49 (0)591 900-1, Fax: +49 (0)591 900-1000<br>Fax: +49 (0)591 240-3010   |   | Authorized officer<br>Beys, E                      |

Form PCT/ISA/210 (September 2001) Rev. 09/03

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

P01/EP 01/12006

| Patent document<br>code in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date        |
|--|---------------------|----------------------------|----------------------------|
| DE 19706061                              | A                   | 13-08-1998                 | DE 19706061 A1 13-08-1998  |
|  |                     |                            | AU 742834 B2 10-01-2002    |
|  |                     |                            | AU 6100598 A 26-08-1998    |
|  |                     |                            | EG 103603 A 30-06-2000     |
|  |                     |                            | BR 9807667 A 15-02-2000    |
|  |                     |                            | CN 1324802 A 05-12-2001    |
|  |                     |                            | CN 1246865 T 08-03-2000    |
|  |                     |                            | EE 9900339 A 15-02-2000    |
|  |                     |                            | NO 9834947 A1 13-08-1998   |
|  |                     |                            | EP 0970103 A1 12-01-2000   |
|  |                     |                            | HU 0000968 A2 28-10-2000   |
|  |                     |                            | JP 2001510479 T 31-07-2001 |
|  |                     |                            | NO 993811 A 04-10-1999     |
|  |                     |                            | PL 334878 A1 27-03-2000    |
|  |                     |                            | SK 103899 A3 16-05-2000    |
|  |                     |                            | TR 9901855 T2 21-04-2000   |
|  |                     |                            | US 6316432 B1 13-11-2001   |
|  |                     |                            | ZA 9800985 A 03-08-1999    |

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ホフマン, イェンス

ドイツ連邦共和国, デー - 1 6 5 6 7 ミューレンベク, バルターシュトラッセ 1 3

(72)発明者 リヒトナー, ロゼマリー

ドイツ連邦共和国, 1 0 8 2 3 ベルリン, ベルツィガー シュトラッセ 3 9

(72)発明者 ジーマイスター, ゲルト

ドイツ連邦共和国, 1 3 5 0 3 ベルリン, ライメルスバルダー シュタイク 2 6

(72)発明者 シュナイダー, マルティン

ドイツ連邦共和国, 1 3 4 6 9 ベルリン, シュルヒゼーシュトラッセ 6 アー

(72)発明者 フールマン, ウルリケ

ドイツ連邦共和国, 1 0 5 8 7 ベルリン, シャルロッテンブルガー ウファー 6 アー

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 DA10 MA01 MA04 NA14 ZB21 ZB26

4C091 AA01 BB05 BB07 CC01 DD01 EE07 FF01 GG01 HH01 JJ01

KK05 LL01 MM03 NN01 PA03 PA05 PA09 PB02 QQ01