

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
10. Mai 2013 (10.05.2013)



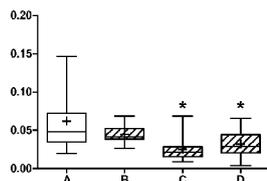
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2013/064620 A1

- (51) **Internationale Patentklassifikation:**
A61K 31/585 (2006.01) *A61P 5/46* (2006.01)
A61P 5/42 (2006.01)
- (21) **Internationales Aktenzeichen:** PCT/EP2012/071700
- (22) **Internationales Anmeldedatum:**
2. November 2012 (02.11.2012)
- (25) **Einreichungssprache:** Deutsch
- (26) **Veröffentlichungssprache:** Deutsch
- (30) **Angaben zur Priorität:**
PCT/EP2011/069464
4. November 2011 (04.11.2011) EP
10 2012 212 838.7 23. Juli 2012 (23.07.2012) DE
- (71) **Anmelder:** **BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; Müllerstr. 178, 13353 Berlin (DE). **BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH** [DE/DE]; Alfred-Nobel-Str. 10, 40789 Monheim (DE).
- (74) **Anwalt:** **BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH**; Alfred-Nobel-Str. 10, 40789 Monheim (DE).
- (81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) **Erfinder:** **HÜBNER, Jan**; Alice-und-Hella-Hirsch-Ring 14, 10317 Berlin (DE). **BOHLMANN, Rolf**; Kuehler Weg 6a, 14055 Berlin (DE). **GASHAW, Isabella**; 1220 Mills Street, Menlo Park, CA 94025 (US).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** 18-METHYL-6,7-METHYLENE-3-OXO-17-PREGN-4-ENE-21,17B-CARBOLACTONES, PHARMACEUTICAL PREPARATIONS COMPRISING SAID COMPOUNDS AND USE THEREOF IN THE TREATMENT OF ENDOMETRIOSIS

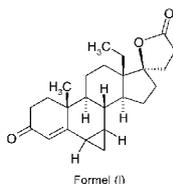
(54) **Bezeichnung:** 18-METHYL-6,7-METHYLEN-3-OXO-17-PREGN-4-EN-21,17 β -CARBOLACTONE, PHARMAZEUTISCHE PRÄPARATE ENTHALTEND DIE GENANNTE VERBINDUNGEN UND DEREN ANWENDUNG BEI DER THERAPIE DER ENDOMETRIOSE



Darstellung der Läsionsgrößen im Xenograft-Endometriosemodell nach Behandlung mit Testsubstanz 6

AA Y-Achse: Läsionsgewichte nach Behandlung in einem Xenograft-Endometriosemodell (Primatenendometrium auf SCID-Mäuse transplantiert)

X-Achse: Gruppen: A = Vehikel, B/C/D = Testsubstanz 6 0.3/1.0/3.0 mg/kg s.c. * p < 0,05 ANOVA, post-hoc Dunnett



Formel (I)

(57) **Abstract:** The present invention relates to 18-methyl-6,7-methylene-17-pregn-4-ene-21,17 β -carbolactones of the general formula (I) where the 6,7-methylene group may be in the α or β position, to pharmaceutical preparations comprising at least one isomer of the formula (I) and to the use thereof in the treatment of endometriosis.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft 18-Methyl-6,7-methylen-17-pregn-4-en-21, 17 β -carbolactone der allgemeinen Formel (I) wobei die 6,7-Methylengruppe α - oder β -ständig sein kann, pharmazeutische Präparate enthaltend mindestens ein Isomer der Formel (I) sowie deren Verwendung bei der Behandlung der Endometriose.

AA... Graph of the lesion sizes in the xenograft endometriosis model after treatment with test substance 6
Y-axis: Lesion weights after treatment in xenograft endometriosis model (primate endometrium transplanted onto SCID mice).
X-axis: Groups: A = vehicle, B/C/D = test substance 6 0.3/1.0/3.0 mg/kg s.c. * p < 0,05 ANOVA, post-hoc Dunnett

WO 2013/064620 A1

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— *hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)*

Veröffentlicht:

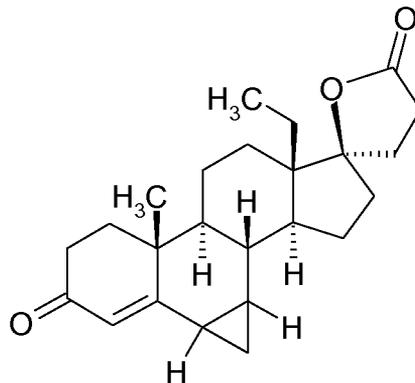
— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

18-METHYL-6,7-METHYLEN-3-OXO-17-PREGN-4-EN-21,17 β -CARBOLACTONE,
PHARMAZEUTISCHE PRÄPARATE ENTHALTEND DIE GENANNTEN VERBINDUNGEN UND
DEREN ANWENDUNG BEI DER THERAPIE DER ENDOMETRIOSE

5

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand, d.h. 18-Methyl-6,7-methylen-3-oxo-17-pregn-4-en-21,17 β -carbolactone (Formel I), wobei die Methylengruppe in der Position 6,7 des Steroidgerüsts α oder β ständig sein kann, pharmazeutische Präparate enthaltend mindestens eines der genannten Isomere sowie deren Anwendung bei der Therapie der Endometriose.



Formel I

15 **[0002]** Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung von neuen Verbindungen zur Behandlung der Endometriose, die ein besseres Wirkungs- bzw. Nebenwirkungsprofil zeigen als bisher verfügbare Behandlungstherapien. Insbesondere soll durch die erfindungsgemäßen Verbindungen eine dauerhafte bzw. langfristige Behandlung der Endometriose ermöglicht werden.

20

[0003] Des Weiteren sollen durch den neuen Therapieansatz Nebenwirkungen, wie sie bei der Verwendung von Gestagenen zur Behandlung der Endometriose vorkom-

men, wie beispielsweise Störungen des Blutungsverhaltens, vermieden werden.

[0004] Das Krankheitsbild der Endometriose ist umfassend untersucht und beschrieben, wenn auch die pathogenen Mechanismen noch nicht vollständig bekannt sind. Bei
5 der Endometriose handelt es sich um eine Absiedelung von Endometriumsgewebe außerhalb der Lokalisierung im luminalen Bereich des Uterus. Diese sogenannten endometriotischen Läsionen nisten sich entweder im muskulären Bereich des Uterus an (Endometriosis interna, Adenomyose) oder an verschiedenen Stellen des Bauchraums, z.B. den Ligamenten, am parietalen Peritoneum des Douglas Raumes (peritoneale Endometrie-
10 rose), der Darmwand, am Ovar (sogenannte Endometrioma) oder rektovaginal (rektovaginale, häufig auch tiefinfiltrierende, Endometriose) und behalten die Eigenschaften ihres Ursprungsgewebes bei.

[0005] Die Endometriose ist in allen ihren Ausprägungsformen hormonabhängig und zeigt im Wesentlichen einen entzündlichen Charakter. Sie befällt 10-20% der Frauen im
15 reproduktiven Alter. Die Erkrankung tritt nur in Ausnahmefällen in Frauen nach der Menopause auf. Kernsymptome der Endometriose sind chronische Unterleibsschmerzen, Dysmenorrhoe, Dyspareunie, Dysurie, Blutungsstörungen und Unfruchtbarkeit. Die Symptome treten zumeist kombiniert auf. Es wird vermutet, dass die Läsionen durch so genannte retrograde Menstruation über den Eileiter in den Peritonealraum gelangen und
20 sich dann dort einnisten.

[0006] Derzeitige Therapieansätze für die Behandlung einer diagnostizierten Endometriose sind sehr eingeschränkt.

[0007] So kann die Endometriose durch ein operatives Entfernen der endometriotischen Läsionen in einem laparoskopischen Eingriff behandelt werden. Dabei werden
25 Endometrioseherde operativ mit Hitze (Elektrokauterisation) oder durch Ausschneiden (Exstirpation) entfernt. Zusätzlich können hierbei eventuell vorhandene Verwachsungen gelöst, Endometriosezysten entfernt und bei Kinderwunsch die Durchgängigkeit der Eileiter mittels Chromopertubation geprüft werden. Die Rückfallquote nach einem solchen Eingriff ist allerdings sehr hoch (25-30%). Die Hysterektomie, also das komplette Entfernen des Uterus, besteht in solchen besonders hartnäckigen Fällen als finale Therapieop-
30 tion.

[0008] Bei besonders schweren Erkrankungen bringt manchmal erst die Entfernung beider Eierstöcke und Eileiter (beidseitige Salpingo-Oophorektomie, Adnexektomie) eine definitive Befreiung von Symptomen.

5 **[0009]** Die Regelschmerzen und verlängerte bzw. verstärkte Blutungen, die von einer Endometriose in der Gebärmuttermuskulatur (adenomyosis uteri) ausgehen, können auch mit einer Gebärmutterentfernung erfolgreich behandelt werden.

[0010] Diese Eingriffe führen jedoch zu Unfruchtbarkeit und einer verfrühten Menopause mit den damit verbundenen Problemen, weshalb der Nutzen gut gegen die Nachteile abgewogen werden muss.

10 **[0011]** Neben invasiven operativen Eingriffen kann auch eine medikamentöse Therapie in Betracht gezogen werden. Diese kommt häufig bei großflächigem, eventuell nicht komplett operablem Befall, in Betracht, kann aber auch bei leichter bis mittlerer Erkrankung angewendet werden. Neben der reinen Schmerztherapie mit nicht steroidal entzündungshemmern (NSAID), kommen hierfür im Prinzip vier Substanzgruppen in Betracht:

- 15 (a) kombinierte orale Kontrazeptiva (OC, bestehend aus Östrogen und Gestagen)
(b) Gestagene
(c) GnRH-Analoga (GnRH = Gonadotropin-Releasing-Hormone) und
20 (d) Danazol®

[0012] Die kombinierten oralen Kontrazeptiva (a) regulieren den Zyklusverlauf und reduzieren die Menstruationsstärke. Daraus folgt vermutlich deren Wirksamkeit in Endometriosepatientinnen. Allerdings nimmt man an, dass zum einen die Rückfallquote für die Schmerzsymptomatik recht hoch ist und zum anderen weisen neue Studien darauf hin, dass eine langjährige Verwendung dieser hormonellen Wirkstoffe mit erhöhter Rate an tiefinfiltrierender Endometriose¹ assoziiert ist, einer besonders schmerzhaften Endometrioseform.

25 **[0013]** Der Einsatz von OC's wird auch in der Patenliteratur beschrieben. So offenbart die EP 1257280, dass mikronisiertes Drospirenon zur Behandlung der Endometriose

¹ Chapron et al. Hum Reprod. 2011 Aug;26(8):2028-35

geeignet ist. Es wird dort in Absatz [0045] beschrieben, dass Zusammensetzungen von Drospirenon mit einem niedrigen Gehalt an Östrogen oder auch ohne jegliches Östrogen u.a. zur Behandlung der Endometriose geeignet sind. Dieses erklärt sich aus den gestagenen Eigenschaft des Drospirenon. In der EP1257280 werden Mengen von 0,5 bis 10 mg Drospirenon als wirksam beschrieben. Über die Dauer der Behandlung der Endometriose mit Drospirenon ist in dieser Schrift nichts offenbart.

[0014] In der WO2008/107373 A1 werden Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung der Endometriose beschrieben. Neben der Verwendung von Verbindungen mit reiner antimineralokortikoider Wirkung werden dort auch Verbindungen vorgeschlagen, die darüber hinaus auch eine Wirkung am Progesteron-Rezeptor, am Östrogen-Rezeptor, am Glucokortikoid-Rezeptor und/oder am Androgen-Rezeptor zeigen. Insbesondere die in der WO2008/107373 A1 offenbarten Verbindungen Spironolacton und das zuvor genannte Drospirenon weisen auch eine gestagene Wirkung auf.

[0015] Die in der WO2008/107373 A1 genannte Verbindung Eplerenon als reiner MR Antagonist zeigt eine relativ schwache *in vitro* Potenz (vgl. Tabelle 1). Bevorzugt sind MR Antagonisten, die in *in vitro* Transaktivierungsassays eine mindestens 10-fach geringere IC₅₀ verglichen mit Eplerenon aufweisen.

[0016] Neben Drospirenon [0013] werden auch weitere Gestagene (b) bei der Behandlung der Endometriose beschrieben. Ansatzpunkt ist hier zum einen die Unterdrückung der Funktion der Eierstöcke und zum anderen das Herbeiführen der terminalen Differenzierung des Endometriums, der Dezidualisierung, die letztlich zum Gewebsuntergang führt.

[0017] Die Gestagene täuschen dem Körper eine Schwangerschaft vor und schaffen so eine veränderte hormonelle Situation. Es findet kein Eisprung mehr statt und die Gebärmutter Schleimhaut bildet sich zurück. In der Regel lassen die Endometriosebeschwerden dann innerhalb von 6 bis 8 Wochen nach.

[0018] Depot-MPA (Medroxyprogesteronacetat) und Visanne[®] (Dienogest) sind für die Endometriosebehandlung zugelassen. Bei MPA kann es aufgrund der antiöstrogenen Wirkung der Verbindung bereits nach einer Anwendungsdauer von 6 Monaten zu einer Verringerung der Knochenmasse kommen. Es soll deshalb keinesfalls über einen längeren Zeitraum als von 2 Jahren angewendet werden². Unter Behandlung mit Gestagenen kann es zudem als häufige Nebenwirkungen zu Unregelmäßigkeiten im Blutungsprofil, Durchbruchblutungen sowie Brustverspannungen kommen³.

[0019] Gestagene beeinflussen im Allgemeinen neben dem Hormonzyklus auch das Blutungsprofil, mit Blutungsstörungen als einer häufigen Nebenwirkung von Gestagenen. Das betrifft auch Substanzen, die an anderen Hormonrezeptoren aktiv sind und gleichzeitig eine gestagene Aktivität aufweisen, wie beispielsweise Spironolacton. Durch eine fehlerhafte Angiogenese (Gefäßneubildung, ein Vorgang der zyklisch im Endometrium stattfindet) während der Dezidualisierung des Endometriums werden die Gefäßwände brüchig und es kommt zu den sogenannten Durchbruchblutungen, die unabhängig von einer Menstruationsblutung stattfinden und charakteristisch für die chronische Behandlung mit Gestagenen sind⁴.

[0020] Auch weisen Patientinnen mit Endometriose häufig sogenannte relative Progesteronresistenz⁵ auf. Es wird angenommen, dass das Progesteronsignalling in den endometriotischen Läsionen gestört sein kann, wo durch Progesteronresistenz eine komplette Transformation und Desquamation des Endometriums blockiert wird. So können die Persistenz der Läsionen sowie der chronische Verlauf der Erkrankung begünstigt werden. Therapeutische Ansätze, deren Wirkung nicht vom des Progesteronsignalling abhängt, sind notwendig, um die Erkrankung dauerhaft zu therapieren.

25

² Physician Information zu depo-subQ provera 104; Subcutaneous depot medroxyprogesterone acetate versus leuprolide acetate in the treatment of endometriosis-associated pain; P.G.Crosignani et al., Human Reproduction Vol. 21, No. 1 pp. 248 - 256, 2006

³ Brown et al., Cochrane Database Syst Rev. 2012 Mar 14;3:CD002122.; McCormack Drugs. 2010 Nov 12;70(16):2073-88

⁴ Lockwood , Menopause. 2011 Apr;18(4):408-11

⁵ Al-Sabbagh et al., Mol Cell Endocrinol. 2012 Jul 25;358(2):208-15

[0021] Die Gonadotropin-Releasing-Hormon Analoga (GnRH) (c) stellen derzeit den Goldstandard der zugelassenen Therapeutika gegen alle Stadien der Endometriose dar. GnRH-Analoga blockieren die Hirnanhangsdrüse vollständig. Der Menstruationszyklus findet nicht mehr statt. Diese Substanzen versetzen den Körper der Frau somit vorüber-

5 gehend künstlich in die Wechseljahre und das Endometriosegewebe kann daher auch nicht mehr mitbluten. Das Gewebe wird hypotroph.

[0022] Aufgrund des Nebenwirkungsprofils ist dieser Therapieansatz jedoch ebenfalls nur für den kurzfristigen Einsatz (bis zu 6 Monaten) geeignet. So induzieren GnRH-Agonisten postmenopausale Symptome, wie Hitzewallungen (80-90%), Schlafstörungen

10 (60-90%), Trockenheit der Scheide (30%), Kopfschmerzen (20-30%), Stimmungsveränderungen (10%) und Abnahme der Knochendichte mit einhergehendem erhöhtem Osteoporoserisiko.

[0023] Abgesehen von den genannten Nebenwirkungen stellt sich nach Beendigung der

15 Behandlung innerhalb von zwei bis drei Monaten der normale Zyklus wieder ein. Bei über 60% der betroffenen Frauen, kehren dann auch die Beschwerden der Endometriose zurück, so dass ein erneuter Behandlungszyklus erwogen werden muss.

[0024] Aufgrund der genannten Nachteile haben GnRH Analoga bislang keine breite

20 Anwendung bei der Behandlung der Endometriose erlangt, wenngleich diese, die in den 70er Jahren etablierte Standardtherapie mit Danazol[®], einem gestagenen Androgen, aufgrund des etwas besseren Nebenwirkungsprofil, verdrängt haben.

[0025] Danazol[®] (d) war das erste „klassische“ Therapeutikum der Endometriose und

25 bis in die 70er-Jahre der Goldstandard. Danazol[®] führt bei längerer Anwendung, ähnlich wie das männliche Geschlechtshormon Testosteron, zu einer Vermännlichung der Frau. Als weitere Nebenwirkungen treten die für Androgene bekannten Wirkungen, wie Akne, Hyperandrogenismus, Hirsutismus und (irreversible) Stimmlagenveränderung auf.

[0026] Danazol[®] wirkt, wie auch die GnRH-Agonisten, auf die Hirnanhangsdrüse, die für die Produktion von Hormonen verantwortlich ist, die die Eierstöcke stimulieren.

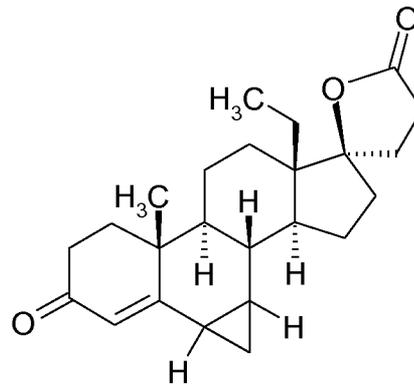
30 Dadurch wird die Produktion von Östrogenen in den Eierstöcken eingestellt.

[0027] Es besteht daher ein dringender Bedarf an alternativen Präparaten, die eine nicht invasive Behandlung der Endometriose erlauben und die nicht die Nachteile des Standes der Technik aufweisen.

[0028] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es somit, neue Substanzen bereitzustellen, die die Nachteile des Standes der Technik überwinden, insbesondere bei denen gestagen-verursachte Nebenwirkungen, wie z.B. Blutungsstörungen, oder die durch Östrogenmangel verursachte Erscheinungen wie Abbau der Knochenmasse und Depressionen, vermieden werden, d.h. es ist eine Aufgabe der Erfindung nicht gestagene Substanzen bereitzustellen.

[0029] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, durch ein verbessertes Nebenwirkungsprofil, Substanzen zur chronischen Therapie bereit zu stellen.

[0030] Es wurde gefunden dass, Verbindungen der Formel I



Formel I

die erfindungsgemäßen Aufgaben lösen und hervorragend zur Anwendung bei der Therapie der Endometriose geeignet sind. Besonders bevorzugt ist dabei das 6 β ,7 β -Methylen-Isomer. Die beiden Isomere werden erstmalig in der WO2012/059594 (Figuren 4 und 5) genannt, die am 4. November 2012 eingereicht wurde und deren Priorität in der vorliegenden Anmeldung in Anspruch genommen wird.

[0031] Die Erfindung betrifft somit Verbindungen der Formel I, pharmazeutische Präparate enthaltend mindestens ein Isomer der Formel I, sowie deren Anwendung bei der

Behandlung der Endometriose.

[0032] Überraschenderweise zeigen diese Verbindungen, sowohl das 6 β ,7 β -Isomer, welches in Beispiel 5, Tabelle 1, #1 näher beschrieben ist (*in vitro* Transaktivierungsdaten zu Mineralokortikoid- und Progesteronrezeptor, gestagene *in vivo* Wirkung), als auch
5 das 6 α ,7 α -Isomer, welches in Beispiel 5, Tabelle 1, #1A näher beschrieben ist, keinerlei gestagene Wirksamkeit in relevanten Tiermodellen, obgleich strukturell sehr ähnliche Verbindungen, wie sie z.B. von Muhn et al.⁶ bzw. von Kuhnz et al.⁷ offenbart werden, gestagene Eigenschaften aufweisen (siehe Beispiel 5 #2 & #3 in Tabelle 1). Insbesondere
10 re die dem Fachmann geläufige Steigerung der gestagene *in vivo*-Potenz beim Einfügen einer zusätzlichen Methylgruppe in Position 18 des steroidalen Gerüsts wird überraschend nicht beobachtet, wie der Vergleich der Einträge in Beispiel 5 #1 und #2 vs. #3 und #4 in Tabelle 1 zeigt.

[0033] Die oben genannten Verbindungen, darunter insbesondere das 6 β ,7 β -Isomer, zeigen ein besseres Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil als bisher verfügbare Behandlungsansätze und sind somit ein besseres therapeutisches Mittel gegen Endometriose.

[0034] Auch zeichnen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen, verglichen mit den
20 bekannten Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten (Eplerenon, Spironolacton, Drospirenolon), durch eine höhere Potenz und das Fehlen einer gestagene Wirkung aus.

[0035] Als potente Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten im Sinne der vorliegenden Erfindung werden solche Verbindungen bezeichnet, die *in vitro* Transaktivierungsassays eine 10-fach geringere IC₅₀ verglichen mit Eplerenon aufweisen.
25

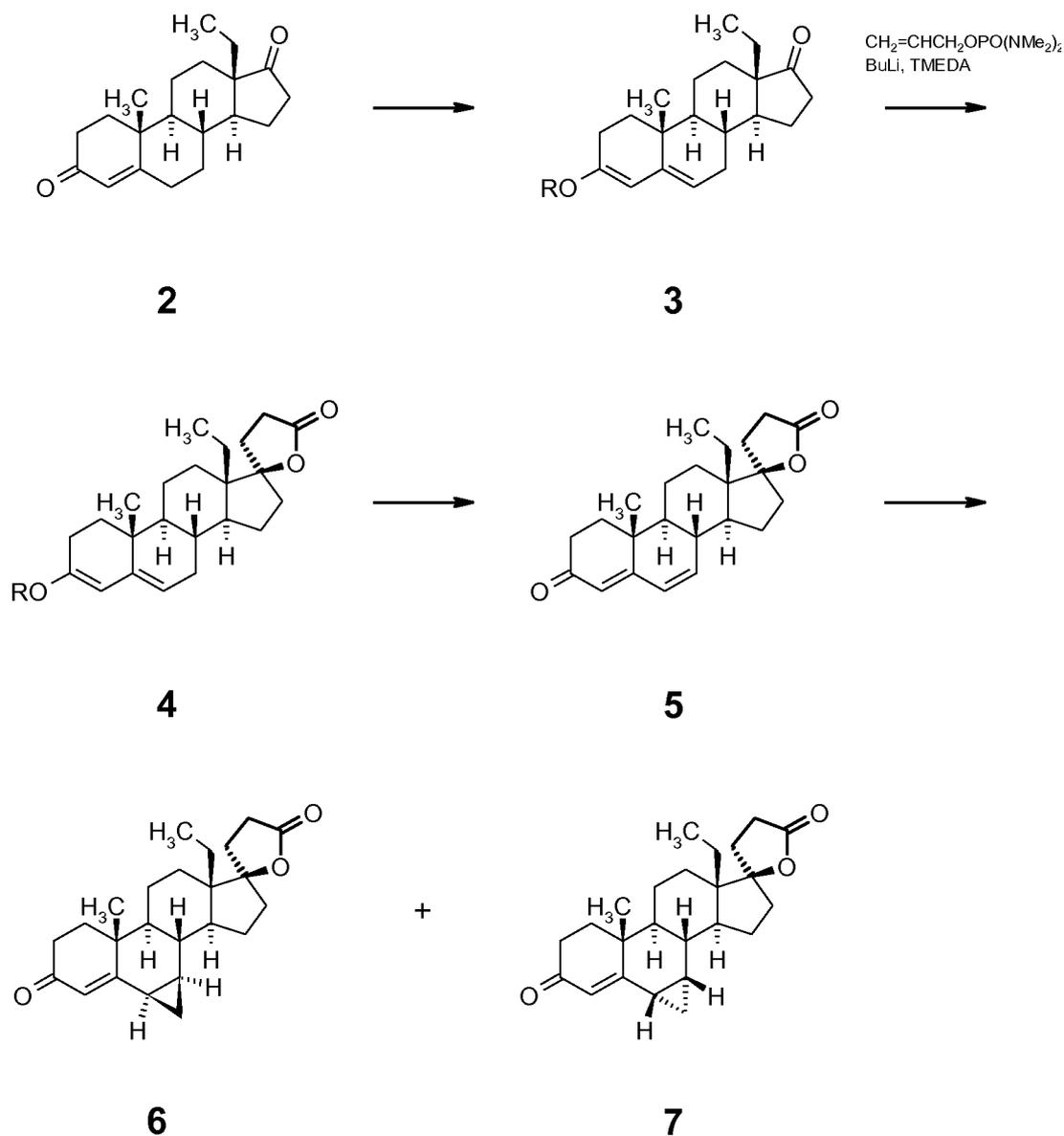
[0036] Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten ohne nennenswerte gestagene Aktivität sind solche Substanzen, die in *in vitro* Progesteron-Rezeptor Transaktivierungsassays und/oder in *in vivo* Assays (die gestagene sensitiven Schwangerschaftserhaltungsassays) keine Wirkung zeigen.
30

⁶ Muhn et al, Contraception 1994, 51:99-110

⁷ Kuhnz et al, Contraception 1995, 51(2):131-139

[0037] Die Herstellung der erfindungsgemäß einsetzbaren Verbindung erfolgt wie nachstehend beschrieben. Die Syntheseroute für die neuartigen 18-Methyl-6,7-methylen-3-oxo-17-pregn-4-en-21,17 β -carbolactone gemäß Schema 1 geht zum Beispiel von Endion⁸ **2** aus.

5



Schema 1

⁸ Kerb, *Ger. Offen.* (1970), DE 1921396, CAS [31320-40-8]

[0038] Der Dienolether **3** wird durch isomerisierende Veretherung des Endion **2** nach bekannten Verfahren zum Beispiel für R = -Methyl mit 2,2-Dimethoxypropan und Pyridinium-p-toluolsulfonat hergestellt und das Spirolacton **4** z.B. nach der Methode von Sturtz⁹ oder alternativ über bekannte Verfahren¹⁰ etabliert. Die Einführung der
5 6,7-Doppelbindung erfolgt über Bromierung des 3,5-Dienolethers **4** sowie anschließende Bromwasserstoffabspaltung¹¹.

[0039] Die Dienoletherbromierung kann z.B. analog der Vorschrift von J.A. Zderic, et. al.¹² erfolgen. Die Bromwasserstoffabspaltung gelingt durch Erhitzen der
10 6-Bromverbindung mit basischen Reagenzien, wie z. B. Lithiumbromid oder Lithiumcarbonat in aprotischen Lösungsmitteln wie Dimethylformamid bei Temperaturen von 50-120°C oder indem die 6-Bromverbindungen in einem Lösungsmittel wie Collidin oder Lutidin erhitzt werden zu Verbindung **5**¹³. Diese wird dann durch Cyclopropanierung der 6,7-Doppelbindung nach bekannten Verfahren z.B. mit Dimethylsulfoxoniummethylid [siehe z.B. DE-A 11 83 500, DE-A 29 22 500, EP-A 0 019 690, US-A 4,291, 029; E. J.
15 Corey und M. Chaykovsky, *J. Am. Chem. Soc.* 84, 867 (1962)] in die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I, d.h. die Stereoisomere der Formel **6** und **7** umgewandelt. Das Gemisch der 6,7- α - und β -Stereoisomeren kann z. B. durch Chromatographie in die einzelnen Isomere getrennt werden.

20 **[0040]** Der Wirkstoff/die Wirkstoffe kann/können dabei mit den üblichen pharmazeutischen Hilfsstoffen vermennt werden. Die Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten werden in einer dem Fachmann an sich bekannten Weise formuliert.

[0041] Die therapeutisch wirksame Dosis ist abhängig vom Körpergewicht, Applikationsweg, individuellem Verhalten, der Art der Zubereitung und Zeitpunkt bzw. Intervall, zu
25 welchem die Applikation erfolgt. Ein typischer Dosisbereich für eine Frau mit 70 kg Körpergewicht liegt zwischen 1-100 mg/Tag, vorzugsweise zwischen 5 und 20 mg/ Tag. Besonders bevorzugt ist eine Dosis von 10 mg/Tag.

⁹ Sturtz *Synthesis* **1980**, 289

¹⁰ Bittler *Angew. i.e.* 21 **1982**, 696; Laurent *J. Steroid Biochem.* 19 **1983**, 771

¹¹ J. Fried, J.A. Edwards, *Organic Reactions in Steroid Chemistry*, von Nostrand Reinhold Company **1972**, S. 265-374)

¹² J.A. Zderic, Humberto Carpio, A. Bowers und Carl Djerassi in *Steroids* 1, 233 (1963)

¹³ Strike in FR 1529949 (1968), CAS[23675-27-6]

[0042] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft Arzneimittel, enthaltend mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung und gegebenenfalls mindestens einen oder mehrere weitere Wirkstoffe, sowie deren Verwendung zur Behandlung der Endometriose. Als geeignete Kombinationswirkstoffe seien beispielhaft und vorzugsweise genannt: selektive Östrogen Rezeptor Modulatoren (SERMs), Östrogenrezeptor (ER) Antagonisten, Aromataseinhibitoren, 17 β -HSD1 Inhibitoren, Steroid-Sulfatase (STS)-Inhibitoren, geeignete GnRH-Agonisten (insbesondere Super-Agonisten) und – Antagonisten, Kisspeptin Rezeptor (KISSR)-Antagonisten, selektive Androgen Rezeptor Modulatoren (SARMs), 5 α -Reduktase Inhibitoren, selektive Progesteron Rezeptor Modulatoren (SPRMs), Gestagene, Antigestagene, orale Kontrazeptiva, Inhibitoren der Mitogen Aktivierten Protein (MAP) Kinasen sowie Inhibitoren der MAP Kinasen Kinasen (Mkk3/6, Mek1/2, Erk1/2), Inhibitoren der Proteinkinasen B (PKB α / β / γ ; Akt1/2/3), Inhibitoren der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK1/2), Inhibitoren des Hypoxie Induzierten Signalweges (HIF1alpha Inhibitoren, Aktivatoren der Prolylhydroxylasen), Histon Deacetylase (HDAC)-Inhibitoren, Prostaglandin F Rezeptor (FP) (PTGFR)-Antagonisten oder Nicht-steroidale Entzündungshemmer (NSAIDs).

[0043] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können systemisch und/oder lokal wirken. Zu diesem Zweck können sie auf geeignete Weise appliziert werden, wie z.B. oral, parenteral, pulmonal, nasal, sublingual, lingual, buccal, rectal, dermal, transdermal, conjunctival, topisch oder als Implantat.

[0044] Für diese Applikationswege können die erfindungsgemäß zu verwendenden Verbindungen in geeignete Applikationsformen überführt werden.

[0045] Sofern neben der erfindungsgemäßen Verbindung gemäß Formel I weitere Wirkstoffe enthalten sind, können diese in einer gemeinsamen Applikationsform formuliert sein oder gegebenenfalls auch als Kombinationspräparat verabreicht werden.

[0046] Für die orale Applikation eignen sich nach dem Stand der Technik funktionierende, die erfindungsgemäß zu verwendenden Verbindungen schnell und/oder modifi-

ziert abgebende Applikationsformen, die die erfindungsgemäßen Verbindungen in kristalliner und/oder amorphisierter und/oder gelöster Form enthalten, wie z.B. Tabletten (nicht-überzogene oder überzogene Tabletten, beispielsweise mit magensaftresistenten oder sich verzögert auflösenden oder unlöslichen Überzügen, die die Freisetzung der erfindungsgemäß zu verwendenden Verbindung kontrollieren), in der Mundhöhle schnell zerfallende Tabletten oder Filme/Oblaten (Wafer), Filme/Lyophilisate, Kapseln (beispielsweise Hart- oder Weichgelatine-kapseln), Dragees, Granulate, Pellets, Pulver, Emulsionen, Suspensionen, Aerosole oder Lösungen.

10 **[0047]** Die parenterale Applikation kann unter Umgehung eines Resorptionsschrittes geschehen (z.B. intravenös, intraarteriell, intrakardial, intraspinal oder intralumbal) oder unter Einschaltung einer Resorption (z.B. intramuskulär, subcutan, intracutan, percutan oder intraperitoneal). Für die parenterale Applikation eignen sich als Applikationsformen u.a. Injektions- und Infusionszubereitungen in Form von Lösungen, Suspensionen, 15 Emulsionen, Lyophilisaten oder sterilen Pulvern.

[0048] Für die sonstigen Applikationswege eignen sich z.B. Inhalationsarzneiformen (u.a. Pulverinhalatoren, Nebulizer), Nasentropfen, -lösungen oder -sprays, lingual, sublingual oder buccal zu applizierende Tabletten, Filme/Oblaten oder Kapseln, Suppositorien, Vaginalkapseln, wässrige Suspensionen (Lotionen, Schüttelmixturen), lipophile 20 Suspensionen, Salben, Cremes, transdermale therapeutische Systeme (z.B. Pflaster), Milch, Pasten, Schäume, Streupuder oder Implantate.

[0049] Bevorzugt sind die orale oder parenterale Applikation, insbesondere die orale 25 und die intravenöse Applikation.

[0050] Die erfindungsgemäß zu verwendenden Verbindungen können in die angeführten Applikationsformen überführt werden. Dies kann in an sich bekannter Weise durch Mischen mit inerten, nichttoxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoffen geschehen. 30 Zu diesen Hilfsstoffen zählen u.a. Trägerstoffe (beispielsweise mikrokristalline Cellulose, Lactose, Mannitol), Lösungsmittel (z.B. flüssige Polyethylenglycole), Emulgatoren und Dispergier- oder Netzmittel (beispielsweise Natriumdodecylsulfat, Polyoxysorbitanoleat), Bindemittel (beispielsweise Polyvinylpyrrolidon), synthetische und natürliche Polymere (beispielsweise Albumin), Stabilisatoren (z.B. Antioxidantien wie beispielsweise Ascor-

binsäure), Farbstoffe (z.B. anorganische Pigmente wie beispielsweise Eisenoxide) und Geschmacks- und/oder Geruchskorrigentien.

[0051] Trotzdem kann es gegebenenfalls erforderlich sein, von den genannten Mengen abzuweichen, und zwar in Abhängigkeit von Körpergewicht, Applikationsweg, individuellem Verhalten gegenüber dem Wirkstoff, Art der Zubereitung und Zeitpunkt bzw. Intervall, zu welchem die Applikation erfolgt. So kann es in einigen Fällen ausreichend sein, mit weniger als der vorgenannten Mindestmenge auszukommen, während in anderen Fällen die genannte obere Grenze überschritten werden muss. Im Falle der Applikation größerer Mengen kann es empfehlenswert sein, diese in mehreren Einzelgaben über den Tag zu verteilen.

[0052] Wie im Endometriose Tiermodell (Maus Beispiel 4) gefunden, ist bei der Anwendung der erfindungsgemäßen Verbindung im genannten Dosisbereich, eine Verkleinerung der endometrialen Läsionen *in vivo* zu beobachten.

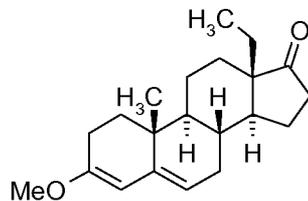
[0053] Überraschender Weise zeigen die erfindungsgemäßen Verbindungen bei hoher *in vitro* Potenz am MR keine gestagene Wirkungen (vgl. Tabelle 1, Bsp. 5).

Beispiele

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert, ohne dass diese Beispiele limitierend wirken sollen.

5 Beispiel 1 18-Methyl-3-oxo-17-pregna-4,6-dien-21,17 β -carbolacton

a) 3-Methoxy-18-methyl-androsta-3,5-dien-17-on

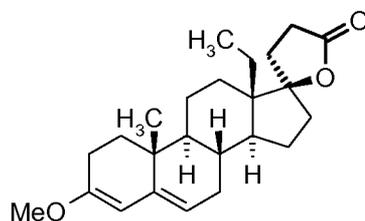


- 10 In eine Lösung von 27 g 18-Methyl-androsta-4,6-dien-3,17-dion (Kerb, *Ger. Offen.* (1970), DE 1921396, CAS [31320-40-8]) in 540 ml 2,2-Dimethoxypropan wurden 3.9 g Pyridiniumtosylat eingetragen. Dann wurde 8 h bei 100 °C Badtemperatur gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur gab man 5.3 ml Pyridin zu und engte im Vakuum zur Trockne ein. Der Rückstand wurde mit 80 ml Methanol ausgerührt und abgesaugt.
- 15 Man erhielt 24.8 g 3-Methoxy-18-methyl-androsta-3,5-dien-17-on als farblosen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 5.29 - 5.22 (m, 1H), 5.14 (s, 1H), 3.58 (s, 3H), 2.43 (dd, 1H), 2.36 - 2.20 (m, 2H), 2.16 - 2.03 (m, 3H), 1.99 - 1.57 (m, 8H), 1.49 - 1.04 (m, 7H), 1.00 (s, 3H), 0.80 (t, 3H) [ppm].

20

b) 3-Methoxy-18-methyl-17-pregna-3,5-dien-21,17 β -carbolacton

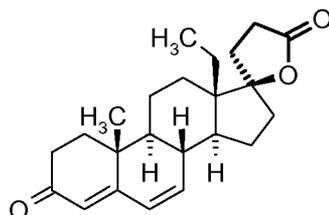


Es wurden 226 ml 1.6 M -Butyllitium-Lösung (in Hexan) bei - 55°C vorlegt und 36.5 g Allyl-tetramethylphosphorodiamidat, in 59 ml Tetrahydrofuran gelöst, zugetropft. Nach 1 h bei - 55°C Rühren erwärmte man auf -20 °C, es wurden 46 ml N,N,N,N-

5 Tetramethylethandiamin eintragen und man ließ auf Raumtemperatur erwärmen. Eine Lösung von 18.9 g 3-Methoxy-18-methyl-androsta-3,5-dien-17-on in 213 ml Tetrahydrofuran wurde zugegeben und 5 Stunden bei 80 °C nachgerührt. Anschließend gab man gesättigte wässrige Ammoniumchloridlösung zu und goss auf Wasser, extrahierte dreimal mit Ethylacetat, wusch mit Wasser und Kochsalzlösung neutral, trocknete über Natriumsulfat, und engte im Vakuum bei 40 °C ein. Man erhielt 22.3 g 3-Methoxy-18-methyl-10 17-pregna-3,5-dien-21,17β-carbolacton.

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-d): δ = 5.26 -5.20 (m, 1H), 5.13 (s, 1H), 3.58 (s, 3H), 2.54 - 2.25 (m, 5H), 2.19 (dt, 1H), 2.10 (dd, 1H), 1.97 - 1.77 (m, 5H), 1.73 - 1.51 (m, 6H), 15 1.42 (qd, 1H), 1.34 - 1.12 (m, 4H), 0.98 (s, 3H), 0.97 (t, 3H) [ppm].

c) 18-Methyl-3-oxo-17-pregna-4,6-dien-21,17β-carbolacton



20

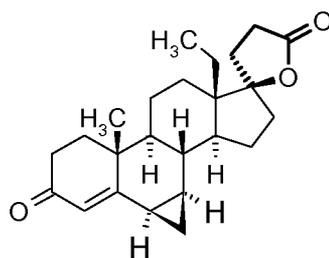
Eine Suspension von 22 g 3-Methoxy-18-methyl-17-pregna-3,5-dien-21,17β-carbolacton in 220 ml Dimethylformamid wurde nacheinander bei 0 °C mit 22 ml einer 10%igen Natriumacetatlösung sowie bei dieser Temperatur mit 8.84 g 1,3-Dibrom-5,5-dimethylhydantoin portionsweise versetzt, 0.5 Stunden bei 0°C (Eisbad) gerührt, mit 25 8.25 g Lithiumbromid sowie 7.24 g Lithiumcarbonat versetzt, und 5 Stunden bei 80 °C Badtemperatur gerührt. Anschließend rührte man in Eiswasser / Kochsalz ein, filtrierte den Niederschlag ab, wusch mit Wasser, und chromatographierte an Kieselgel mit Hexan / Ethylacetat. Man erhielt 10.7 g 18-Methyl-3-oxo-17-pregna-4,6-dien-21,17β-carbolacton.

30

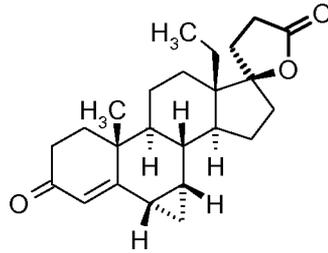
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Chloroform- d): δ = 6.17- 6.12 (m, 1H), 6.12 - 6.07 (m, 1H), 5.69 (s, 1H), 2.66 - 2.32 (m, 7H), 2.07 - 1.79 (m, 5H), 1.78 - 1.50 (m, 6H), 1.46 - 1.36 (m, 1H), 1.32 - 1.17 (m, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.01 (t, 3H) [ppm].

5

Beispiel 2 18-Methyl-6 β ,7 β -methylen-3-oxo-17-pregn-4-en-21,17 β -cabolacton (6)



- 10 Eine Suspension von 50 g Trimethylsulfoxoniumiodid in 750 ml Dimethylsulfoxid mit 9.73 g Natriumhydrid (55%ig in Öl) wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gelöst, mit 24.7 g 18-Methyl-3-oxo-17-pregna-4,6-dien-21,17 β -cabolacton (hergestellt wie in Beispiel 1 beschrieben) versetzt und weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend rührte man in 15 l Eiswasser / Kochsalz ein, filtrierte den Nieder-
- 15 schlag ab, wusch mit Wasser und trocknete im Vakuum bei 60 °C. Man erhielt 22.4 g Rohprodukt. Nach der Chromatographie an Kieselgel mit Hexan / Ethylacetat als Fraktion II 7.5 g 18-Methyl-6 β ,7 β -methylen-3-oxo-17-pregn-4-en-21,17 β -cabolacton. 210-211 °C, $[\alpha]_D -151.9^\circ \pm 0.05^\circ$ (Chloroform, c = 10 mg/ml)
- 20 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Chloroform- d): δ = 6.02 (s, 1H), 2.62 - 2.44 (m, 3H), 2.43 - 2.36 (m, 3H), 1.98 - 1.81 (m, 6H), 1.75 -1.65 (m, 2H), 1.65 -1.42 (m, 8H), 1.28 -1.11 (m, 4H), 1.09 (s, 3H), 1.08 -1.01 (m, 2H), 0.96 (t, 3H), 0.80 (q, 1H) [ppm].

Beispiel 3 18-Methyl-6 α ,7 α -methylen-3-oxo-17-pregn-4-en-21,17 β -cabolacton (7)

- 5 Nach der Methode des Beispiels 2 erhielt man nach der Chromatographie als Fraktion I 2.9 g 18-Methyl-6 α ,7 α -methylen-3-oxo-17-pregn-4-en-21,17 β -cabolacton als Feststoff vom Schmelzpunkt 230-231 °C, $[\alpha]_D = 102.6^\circ \pm 0.11^\circ$ (Chloroform, c = 10 mg/ml).

¹H-NMR (600 MHz, Chloroform-d): $\delta = 5.95$ (s, 1H), 2.58 - 2.44 (m, 3H), 2.43 - 2.34 (m, 3H), 2.21 - 2.15 (m, 2H), 1.98 - 1.86 (m, 5H), 1.81 - 1.74 (m, 2H), 1.65 - 1.48 (m, 6H), 1.34 - 1.26 (m, 2H), 1.17 - 1.07 (m, 2H), 1.14 (s, 3H), 0.98 (t, 3H), 0.89 - 0.84 (m, 1H), 0.77 - 0.71 (m, 1H), 0.47 (q, 1H) [ppm].

15 **Beispiel 4 Endometriosemodelle *in vivo***

Xenograft Endometriosemodell mit Primatenendometrium:

Um die Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindung auf das Wachstum endometriotischer Läsionen zu untersuchen, wurde ein Xenograft Endometriosemodell in immunodefizienten SCID Mäusen verwendet, denen Endometrium von Rhesus Makaken implantiert wurde.

Die ovariectomierten SCID Mäuse wurden mit Östradiol- und Progesteronkapseln hormonsubstituiert, um ein optimales Hormonmilieu für das Primatenendometrium zu schaffen. Donor-Affen wurden über 7 Tage mit Östradiol und Progesteron behandelt. Anschließend wurde das Endometrium der Tiere kürettiert und in 2x2x4 mm große Stücke geschnitten. Mittels einer Laparotomie wurde das Endometrium in die Bauchhöhle der Mäuse transplantiert bzw. subkutan implantiert. Die Läsionen wurden 14 Tage unter Östradiol- und Progesteronbehandlung anwachsen gelassen, gefolgt von 14 Tagen Östradiolbehandlung (entsprechend einem Menstruationszyklus). Die Behandlung begann mit

30 täglicher s.c. Gabe der erfindungsgemäßen Verbindung über einen Zeitraum von 28 Ta-

gen mit Dosierungen von 0.3, 1.0 und 3.0 mg/kg, wobei die Östradiol-supplementierung fortgesetzt wurde. Nach Ablauf der Behandlungszeit wurden die Tiere einer finalen Laparotomie unterzogen und das Gewicht der Läsionen pro Tier wurde ermittelt. Spironolacton wurde als Positivkontrolle mit einer Dosis von 10 mg/kg eingesetzt (Vehikel: Benzylbenzoat/Rizinusöl). Die erfindungsgemäße Verbindung **6** zeigte bei 1.0 und 3.0 mg/kg/d eine signifikante Wirkung auf das Läsionswachstum im Vergleich zu Vehikel (A) bzw. der niedrigsten Dosisgruppe (B = 0.3 mg/kg). Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 1/2 dargestellt.

10 *Syngenes Maus Endometriosemodell:*

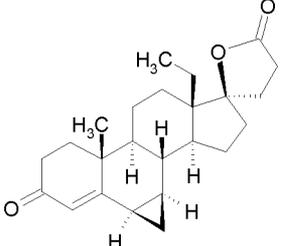
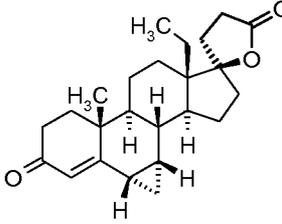
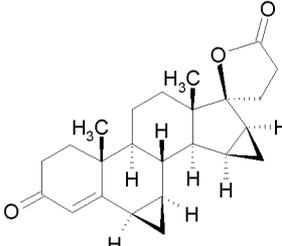
Die syngene Induktion der Endometriose in Mäusen stellt ein gängiges Tiermodell dar um die Wirksamkeit von Substanzen für die Therapie der Endometriose zu testen. Die Endometriose wird experimentell durch Transplantation von murinen Uterusfragmenten einer Spendermaus desselben Stammes in die Bauchhöhle der Empfänger-Maus induziert. Es wurden weibliche Tiere des balb/c Stammes verwendet. Mittels Vaginalabstrich wurde der Zyklus der Maus bestimmt. Es wurde ausschließlich Spendertiere verwendet die sich im Östrus befinden. Die Spendertiere wurden getötet und die Uterushörner wurden entnommen und anschließend longitudinal aufgeschnitten. Aus den Uteri wurden mit einer Stanze 2 mm Biopate ausgestanzt, die anschließend ins Empfängertier eingenäht. Die Empfängertiere wurden narkotisiert und einer Laparotomie unterzogen. Während des Eingriffs wurden 6 Uterusstanzen einer Donormaus an das parietale Peritoneum der Empfängermaus angenäht. Am Tag nach diesem Eingriff begann die 4-wöchige Behandlung mit den zu testenden Substanzen (Vehikel: Tween80/ Captex 200P). Nach 28 Tagen wurden die Tiere in einer finalen Laparotomie eröffnet und die Läsionsgrößen bestimmt. Die angewachsenen Läsionen wurden fotografisch festgehalten und die Fläche wurde mittels AxioVision Software vermessen. Pro Behandlungsgruppe wurden 14 Tiere eingesetzt.

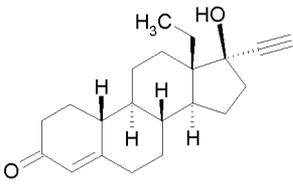
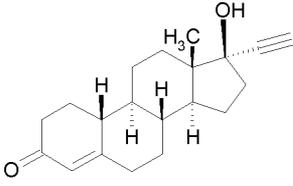
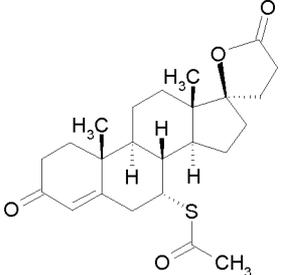
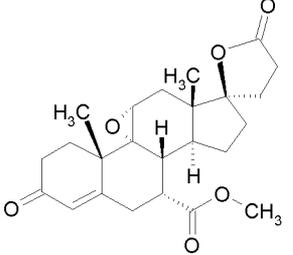
Hier wurde die Testsubstanz **6** in 3 verschiedenen Dosierungsschemata getestet und die Läsionsgröße im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten Tieren ausgewertet (Gruppe A). Folgende Dosierungen wurden getestet: 3, 10 und 30 mg/kg/Tag (Gruppen B, C, D). In der Abbildung 2/2 sind die mittleren Läsionsgrößen (in mm²) pro Tier dargestellt (y-Achse).

Beispiel 5 *In vitro/in vivo* Wirkung an MR und PR

In Tabelle 1 sind die *in vivo* Daten zur Gestagenität der Substanzen dargestellt. Die Gestagenität *in vivo* kann mittels zwei verschiedener Assays ermittelt werden, zum einen mit Hilfe des Schwangerschaftserhaltungstests in der Ratte, zum anderen mittels des McPhails Tests im Kaninchen (endometriale Transformation). Aufgeführt sind die verfügbaren Daten für die erfindungsgemäßen Verbindungen **6** und **7** (Tabelle 1 #1 und #1A) sowie zum Vergleich für Spironolacton. Um die Vergleichbarkeit über die Assays zu gewährleisten, sind die Gestagene Drospirenon und Levonorgestrel aufgeführt, zu denen Daten aus beiden Assays bekannt sind. Darüber hinaus ist das Norethisteron angeführt, um zusammen mit Levonorgestrel den Effekt einer 18-Methylgruppe auf die gestagene Potenz zu veranschaulichen.

Tabelle 1:

#	Struktur der Verbindung	Bezeichnung der Verbindung	IC ₅₀ (MR)	ED ₅₀ (PR)	<i>in vivo</i> PR
#1		18-Methyl-6β,7β-methylen-3-oxo-17-pregn-4-en-21,17β-carbolacton	0.71 nM	1.2 nM (50% efficacy)	keine Wirkung (höchste getestete Dosis: 30 mg/kg/d s.c., Schwangerschaftserhaltung in der Ratte)
#1 A		18-Methyl-6α,7α-methylen-3-oxo-17-pregn-4-en-21,17β-carbolacton	5.6 nM	100 nM (38.6% efficacy)	keine Wirkung (höchste getestete Dosis: 30 mg/kg/d s.c., Schwangerschaftserhaltung in der Ratte)
# 2-6 = Vergleichsbeispiele					
#2		Drospirenon (DRSP)	1.48 nM	3.6 nM (83% efficacy)	Schwangerschaftserhaltung: 12 mg/kg s.c. (80%) ⁶ McPhail Test im Kaninchen: ED _{min} ~0.2 mg/kg/d ⁶

#3		Levonorgestrel (LNG)	337 nM	1.6 nM (108% efficacy)	Schwangerschaftserhaltung: 1.2 mg/kg s.c. (80%) ⁷ McPhail Test im Kaninchen: EDmin ~0.02 mg/kg/d ⁶
#4		Norethisteron	nicht untersucht	4.1 nM (87.9% efficacy)	McPhail Test im Kaninchen: EDmin ~0.3 mg/kg/d ¹⁴
#5		Spironolacton	10.5 nM	666 nM (43% efficacy)	McPhail Test im Kaninchen: EDmin ~15 mg/kg/d s.c. ⁶
#6		Eplerenon	1.10 µM	> 1 µM	nicht untersucht

⁶ Muhn et al, Contraception 1994, 51:99-110⁷ Kuhnz et al, Contraception 1995, 51(2):131-139¹⁴ Phillips et al, Contraception 1987, 36(2):181-192

5

Die Bestimmung der *in vitro* Transaktivierungsdaten (IC₅₀ Werte) sowie der gestagenen *in vivo* Aktivität erfolgte wie nachfolgend beschrieben.

1. Zellulärer *in vitro*-Test zur Bestimmung der inhibitorischen MR-Aktivität und MR-Selektivität gegenüber anderen Steroidhormon-Rezeptoren

10

Die Identifizierung von Antagonisten des humanen Mineralokorticoid-Rezeptors (MR) sowie die Quantifizierung der Wirksamkeit der hier beschriebenen Verbindungen erfolgt

mit Hilfe einer rekombinanten Zelllinie. Die Zelle leitet sich ursprünglich von einer Ovar-epithelzelle des Hamsters ab (Chinese Hamster Ovary, CHO K1, ATCC: American Type Culture Collection, VA 20108, USA).

In dieser CHO K1-Zelllinie wird ein etabliertes Chimärensysteem verwendet, in dem die
5 Liganden-Bindungsdomänen humaner Steroidhormon-Rezeptoren an die DNA-Bindungsdomäne des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4 fusioniert werden. Die so entstehenden GAL4-Steroidhormonrezeptor-Chimären werden in den CHO-Zellen mit einem Reporterkonstrukt co-transfiziert und stabil exprimiert.

10 Klonierungen:

Zur Generierung der GAL4-Steroidhormonrezeptor-Chimären wird die GAL4-DNA-Bindungsdomäne (Aminosäuren 1-147) aus dem Vektor pFC2-dbd (Firma Stratagene) mit den PCR-amplifizierten Liganden-Bindungsdomänen des Mineralokorticoid-Rezeptors (MR, Aminosäuren 734-985) und des Progesteron-Rezeptors (PR, Aminosäuren
15 680-933) in den Vektor pIRES2 (Firma Clontech) kloniert. Das Reporterkonstrukt, welches fünf Kopien der GAL4-Bindestelle, vorgeschaltet vor einem Thymidinkinase-Promotor enthält, führt zur Expression der Firefly-Luciferase (*Photinus pyralis*) nach Aktivierung und Bindung der GAL4-Steroidhormonrezeptor-Chimären durch die jeweiligen spezifischen Agonisten Aldosteron (MR) und Progesteron (PR).

20

Testablauf:

Die MR- und PR-Zellen werden am Tag vor dem Test in Medium (Optimem, 2.5% FCS, 2 mM Glutamin, 10 mM HEPES) in 96- (oder 384- bzw. 1536-) Loch-Mikrotiterplatten
ausplattiert und in einem Zellinkubator (96% Luftfeuchtigkeit, 5% v/v CO₂, 37°C) gehalten. Am Testtag werden die zu prüfenden Substanzen in oben genanntem Medium aufgenommen und zu den Zellen hinzugegeben. Etwa 10 bis 30 Minuten nach Zugabe der
25 Testsubstanzen werden die jeweiligen spezifischen Agonisten der Steroidhormon-Rezeptoren hinzugesetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 5 bis 6 Stunden wird die Luciferaseaktivität mit Hilfe einer Videokamera gemessen. Die gemessenen relativen
30 Lichteinheiten ergeben in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration eine sigmoide Stimulationskurve. Die Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgt mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad PRISM (Version 3.02).

2. *Test auf gestagene Aktivität in vivo: Schwangerschaftserhaltung in der Ratte*

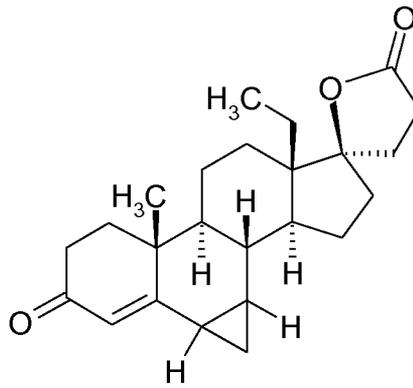
Der Schwangerschaftserhaltungstest stellt ein Model dar, in dem sehr sensitiv das AN-
sprechen des Endometriums auf ein Gestagen untersucht wird. Nur in Anwesenheit ei-
nes wirksamen Gestagens wird eine Schwangerschaft fortgesetzt. Trächtige Ratten
5 werden kastriert und mit Testsubstanz oder Positivkontrolle über einen Zeitraum von
7 Tagen behandelt. Am Ende der Behandlung wird die Anzahl der lebenden und toten
Föten bestimmt als Maß der gestagene, d.h. schwangerschaftserhaltenden Wirkung,
der Testsubstanz.

10 3. *Test auf gestagene Aktivität in vivo: McPhail Assay im Kaninchen*

Weibliche Kaninchen werden ovariectomiert. 7 Tage nach Ovariectomie erhalten die Tie-
re über 6 Tage Östradiol. Die Tiere werden über 5 Tage mit der Testsubstanz behandelt,
und anschliessend wird der Uterus herauspräpariert und histologisch aufgearbeitet. Als
Maß für die gestagene Wirkung wird die sekretorische Transformation des Endometri-
15 ums ausgewertet (Schwellendosis, ab der eine sekretorische Transformation einsetzt).

Patentansprüche

1. 18-Methyl-6,7-methylen-3-oxo-17-pregn-4-en-21,17 β -carbolactone der Formel I,
5 worin die 6,7- Methylengruppe α oder β -ständig sein kann

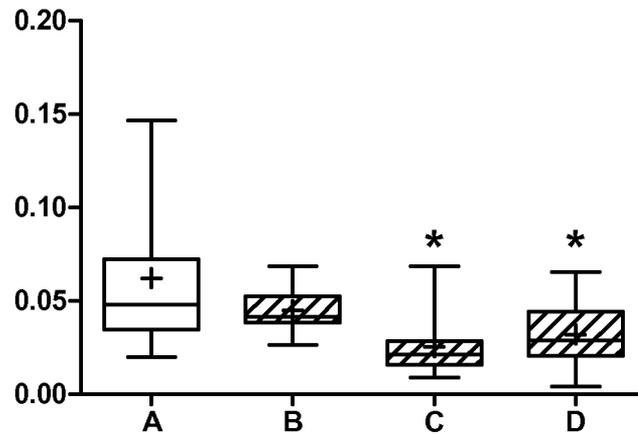


Formel I

2. Verbindung nach Anspruch 1, nämlich 18-Methyl-6 β ,7 β -methylen-3-oxo-17-
10 pregn-4-en-21,17 β -carbolacton.
3. 18-Methyl-6,7-methylen-3-oxo-17-pregn-4-en-21,17 β -carbolacton zur Anwen-
dung bei der Therapie der Endometriose.
4. 18-Methyl-6 β ,7 β -methylen-3-oxo-17-pregn-4-en-21,17 β -carbolacton zur Anwen-
dung bei der Therapie der Endometriose.
- 15 5. Pharmazeutische Präparate enthaltend mindestens eine Verbindung gemäß An-
spruch 1 oder 2 sowie mindestens einen pharmazeutisch unbedenklichen Träger.
6. Pharmazeutische Präparate nach Anspruch 5 enthaltend mindestens eine Ver-
bindung gemäß Anspruch 1 oder 2 sowie mindestens einen weiteren pharmazeu-
20 tischen Wirkstoff ausgewählt aus der Gruppe der selektiven Östrogen Rezeptor
Modulatoren (SERMs), Östrogenrezeptor (ER) Antagonisten, Aromataseinhibito-
ren, 17 β -HSD1 Inhibitoren, Steroid-Sulfatase (STS)-Inhibitoren, GnRH-

- 5 Agonisten und –Antagonisten, Kisspeptin Rezeptor (KISSR)-Antagonisten, selektive Androgen Rezeptor Modulatoren (SARMs), 5 α -Reduktase Inhibitoren, selektive Progesteron Rezeptor Modulatoren (SPRMs), Gestagene, Antigestagene, orale Kontrazeptiva, Inhibitoren der Mitogen Aktivierten Protein (MAP) Kinasen
10 sowie Inhibitoren der MAP Kinasen Kinasen (Mkk3/6, Mek1/2, Erk1/2), Inhibitoren der Proteinkinasen B (PKB α / β / γ ; Akt1/2/3), Inhibitoren der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK1/2), Inhibitoren des Hypoxie Induzierten Signalweges (HIF1alpha Inhibitoren, Aktivatoren der Prolylhydroxylasen), Histon Deacetylase (HDAC)-Inhibitoren, Prostaglandin F
15 Rezeptor (FP) (PTGFR)-Antagonisten oder Nicht-steroidale Entzündungshemmer (NSAIDs) in einen pharmazeutisch unbedenklichen Träger.
7. Pharmazeutische Präparate nach Anspruch 6 enthaltend eine Verbindung gemäß Anspruch 1 oder 2 sowie mindestens einen weiteren pharmazeutischen
15 Wirkstoff ausgewählt aus der Gruppe der ER-Antagonisten, Aromataseinhibitoren, Kinaseinhibitoren oder NSAIDs.

Abbildung 1/2



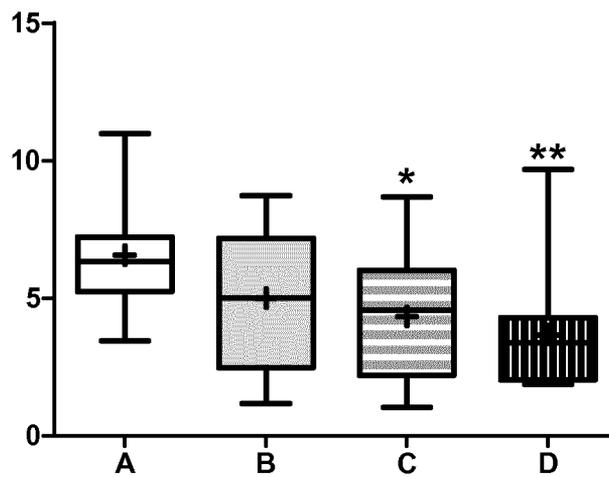
5

Darstellung der Läsionsgrößen im Xenograft-Endometriosemodell nach Behandlung mit Testsubstanz **6**

Y-Achse: Läsionsgewichte nach Behandlung in einem Xenograft-Endometriosemodell (Primatesendometrium auf SCID-Mäuse transplantiert).

10 **X-Achse:** Gruppen: A = Vehikel, B/C/D = Testsubstanz **6** 0.3/1.0/3.0 mg/kg s.c. *
 $p < 0.05$ ANOVA, post-hoc Dunnett

Abbildung 2/2



5

Darstellung der Läsionsgrößen im syngenem Mausmodell für Endometriose nach Behandlung mit Testsubstanz 6

Y-Achse: Mittlere Läsionsgrößen [mm²] pro Tier.

X-Achse: Gruppen: A = Vehikel, B/C/D = Testsubstanz 6 mit 3/10/30 mg/kg/Tag.

10 * p<0,05; ** p<0,01 ANOVA, post-hoc Dunnett

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/071700

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. A61K31/585 A61P5/42 A61P5/46
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/107373 A1 (BAYER SCHERING PHARMA AG [DE]; MOELLER CARSTEN [DE]; KAUFMANN ULRIKE []) 12 September 2008 (2008-09-12) cited in the application the whole document -----	1-7

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 29 January 2013	Date of mailing of the international search report 06/02/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Ansaldo, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/071700

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008107373	A1	12-09-2008	
		AR 065585 A1	17-06-2009
		AU 2008223859 A1	12-09-2008
		CA 2679520 A1	12-09-2008
		CN 101621995 A	06-01-2010
		DE 102007011105 A1	04-09-2008
		EP 2131825 A1	16-12-2009
		JP 2010520178 A	10-06-2010
		KR 20090119870 A	20-11-2009
		RU 2009136305 A	10-04-2011
		TW 200900080 A	01-01-2009
		US 2011003778 A1	06-01-2011
		WO 2008107373 A1	12-09-2008

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/071700

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. A61K31/585 A61P5/42 A61P5/46 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) A61K A61P		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 2008/107373 A1 (BAYER SCHERING PHARMA AG [DE]; MOELLER CARSTEN [DE]; KAUFMANN ULRIKE []) 12. September 2008 (2008-09-12) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-7
<input type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 29. Januar 2013		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 06/02/2013
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Ansaldo, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/071700

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2008107373 A1	12-09-2008	AR 065585 A1	17-06-2009
		AU 2008223859 A1	12-09-2008
		CA 2679520 A1	12-09-2008
		CN 101621995 A	06-01-2010
		DE 102007011105 A1	04-09-2008
		EP 2131825 A1	16-12-2009
		JP 2010520178 A	10-06-2010
		KR 20090119870 A	20-11-2009
		RU 2009136305 A	10-04-2011
		TW 200900080 A	01-01-2009
		US 2011003778 A1	06-01-2011
		WO 2008107373 A1	12-09-2008
