

Даний винахід стосується застосування антипрогестинів для індукції апоптозу клітини. Зокрема, винахід стосується застосування антипрогестину, тобто 11 $\beta$ -(4-ацетилфеніл)-17 $\beta$ -гідрокси-17 $\alpha$ -(1,1,2,2,2-пентафторетил)естра-4,9-дієн-3-ону, або його фармацевтично прийнятного похідного або аналога для індукції апоптозу в клітині. Крім того, даний винахід стосується застосування антипрогестинів для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування певного типу раку, такого як рак молочної залози, індикатором високого ризику виникнення якого є підвищена кількість пухлинних клітин на S-фазі клітинного циклу.

Антипрогестини являють собою відносно новий і перспективний клас терапевтичних агентів, які можуть мати велике значення для лікування залежних від гормонів пухлин і інших захворювань. Хоча антипрогестини спочатку були розроблені для медичного нехірургічного припинення вагітності, виявилось, що деякі антипрогестини мають велике значення, наприклад, для ендокринної терапії таких типів раку молочної залози, які відрізняються тим, що пухлинні клітини мають рецептори прогестерону [T. Maudelonde і ін., у: J.G.M. Klijn і ін., *Hormonal Manipulation of Cancer: Peptides, Growth Factors and New (Anti) Steroidal Agents*, вид-во Raven Press, New York, 1987, стор.55-59].

Ця нова стратегія ендокринної терапії заснована на даних про те, що антипрогестини мають протипухлинну активність *in vitro* у відношенні ліній клітин пухлини молочної залози, які мають рецептор прогестерону, і *in vivo* у відношенні деяких типів залежних від гормонів пухлин молочної залози мишей і щурів. Зокрема, механізм протипухлинної активності таких антипрогестинів, як онапристон і міфепристон (RU 486) уже був вивчений з використанням моделі залежної від гормонів пухлини молочної залози миші MXT, а також на моделях пухлини молочної залози, індукованої канцерогеном ДМБА (7,12-диметилбенз(а)антрацен) і НММ (нітрозометилсечовина) у щурів [M. R. Schneider і ін., *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* т.25, №4, стор.691-701, 1989; H. Michna і ін., *Breast Cancer Research and Treatment* 14:275-288, 1989; H. Michna, J. Steroid. Biochem. т.34, №№1-6, стор.447-453, 1989]. Однак внаслідок низької активності і побічних впливів, наприклад, міфепристону, цю сполуку не можна рекомендувати як індивідуальний агент для лікування раку молочної залози [D. Perrault і ін., *J. Clin. Oncol* 1996 Oct, 14(10), стор.2709-2712]. Крім того, міфепристон має виражені антиглюкокортикоїдні побічні дії [див. L.M. Kettel і ін., *Fertil. Steril.* 1991 Sep, 56(3), стор.402-407; X. Bertagna, *Psychoneuroendocrinology* 1997; 22 додат. I, стор.51-55].

Відсоток пухлинних клітин, які знаходяться на відповідних фазах клітинного циклу, можна оцінювати шляхом визначення ДНК за допомогою ефективного методу проточної цитометрії [див. G.M. Clark і ін., *N. Engl. J. Med.* 320, 1989, March, стор.627-633; L.G. Dressier і ін., *Cancer* 61(3), 1988, стор.420-427 і процитовану в цих роботах літературу]. Було встановлено, що стадії клітинного циклу пухлинних клітин і насамперед кількість пухлинних клітин, які знаходяться на певних стадіях циклу, можуть служити важливим джерелом інформації для клінічного прогнозування розвитку хвороби й успіху терапії. У цьому відношенні найбільш важлива кількість клітин, які знаходяться на S-фазі клітинного циклу.

У EP 0495825 B1 описане застосування антипрогестинів (конкурентних антагоністів прогестерону) для приготування лікарських засобів, призначених для лікування карцином молочної залози, які відрізняються підвищеним вмістом пухлинних клітин, які знаходяться на S-фазі клітинного циклу, що розглядається як високий фактор ризику. Це ґрунтується на даних про те, що антипрогестини мають здатність блокувати розвиток пухлинних клітин, які знаходяться на G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>-фазі клітинного циклу, що приводить до істотного зменшення кількості пухлинних клітин, які знаходяться на S-фазі. Однак такий вплив не був виявлений при стандартній терапії раку молочної залози з використанням тамоксифену, естрогену або при овариєктомії. Антипрогестини, протестовані в EP 0495825 B1, являли собою 11 $\beta$ -[4-N,N-диметиламіно)феніл]-17 $\alpha$ -гідрокси-17 $\beta$ -(3-гідроксипропіл)-13 $\alpha$ -метил-4,9(10)-гонадієн-3-он і 11 $\beta$ -(4-ацетилфеніл)-17 $\beta$ -гідрокси-17 $\alpha$ -(проп-1-ініл)-4,9(10)естрадієн-3-он.

17 $\alpha$ -фторалкілстероїди, які мають виражену антипрогестинну активність, а також методи їх одержання, описані в WO 98/34947. У WO 98/34947 не наведене обговорення або результати дослідження ролі, яку описані в цій заявці 17 $\alpha$ -фторалкілстероїди можуть відігравати в апоптозі клітин або припиненні клітинного циклу.

З урахуванням потенційного значення агентів, які індукують апоптоз клітин, наприклад, у випадку пухлинних клітин шляхом блокади їх розвитку на G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>-фазі, доцільним є виявлення також інших агентів, наприклад, антипрогестини, які мають такий специфічний механізм дії. Такі агенти можна застосовувати при лікуванні і попередженні певних типів раку, наприклад, раку молочної залози, індикатором високого ступеня ризику виникнення якого є підвищена кількість пухлинних клітин, які знаходяться на S-фазі клітинного циклу.

Таким чином, в основу даного винаходу була покладена задача подальшого дослідження механізму дії антипрогестинів, що приводить до інгібування залежних від гормонів захворювань, таких як рак молочної залози, і розробка способу спрямованої індукції апоптозу клітин.

При створенні винаходу несподівано було встановлено, що антипрогестин 11 $\beta$ -(4-ацетилфеніл)-17 $\beta$ -гідрокси-17 $\alpha$ -(1,1,2,2,2-пентафторетил)естра-4,9-дієн-3-он (або його фармацевтично прийнятне похідне або аналог) можна застосовувати для індукції апоптозу клітини.

При створенні винаходу несподівано було встановлено, що антипрогестин 11 $\beta$ -(4-ацетилфеніл)-17 $\beta$ -гідрокси-17 $\alpha$ -(1,1,2,2,2-пентафторетил)естра-4,9-дієн-3-он (нижче в даному описі позначений як "антипрогестин (I)") індукує апоптоз і загибель пухлинних клітин у дослідах з використанням стандартних моделей пухлин раку молочної залози. Було встановлено, що антипрогестин (I) має здатність індукувати апоптоз клітин шляхом ініціації термінального диференціювання.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є застосування антипрогестину (I) або його фармацевтично прийнятного похідного або аналога для приготування лікарського засобу, призначеного для індукції апоптозу клітини. Переважно індукцію апоптозу викликають шляхом ініціації термінального диференціювання. Клітина переважно являє собою клітину ссавця, більш переважно клітину людини і найбільш переважно пухлинну клітину, причому пухлина переважно являє собою рак молочної залози.

Наступним об'єктом даного винаходу є застосування антипрогестину (I) або його фармацевтично прийнятного похідного або аналога для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування різних типів раку, індикатором високого ступеня ризику виникнення якого є підвищена кількість пухлинних

клітин, які знаходяться на S-фазі клітинного циклу.

Ще одним об'єктом даного винаходу є застосування антипрогестину (I) або його фармацевтично прийняттого похідного або аналога для індукції апоптозу клітини *in vitro*. Клітина переважно являє собою клітину ссавця, більш переважно клітину людини і найбільш переважно пухлинну клітину, причому пухлина переважно являє собою рак молочної залози.

Наступним об'єктом даного винаходу є спосіб індукції апоптозу клітини шляхом введення в клітину ефективної кількості антипрогестину (I). Цей спосіб можна застосовувати *in vitro* або *in vivo*. Клітина переважно являє собою клітину ссавця, більш переважно клітину людини і найбільш переважно пухлинну клітину, причому пухлина переважно являє собою рак молочної залози.

Завдяки здатності індукувати апоптоз клітини антипрогестин (I) або його фармацевтично прийнятне похідне або аналог можна застосовувати для лікування певних типів раку, наприклад, раку молочної залози, індикатором високого ступеня ризику виникнення якого є підвищена кількість пухлинних клітин, які знаходяться на S-фазі клітинного циклу. Інші типи раку або залежні від гормонів захворювання, на які можна впливати і які можна лікувати за допомогою антипрогестину (I) завдяки його здатності індукувати клітинний апоптоз, можуть включати, наприклад, рак молочної залози, рак яєчника, рак ендометрію, мієлому, ановуляторну безплідність, менінгому, тобто захворювання, які в основному зумовлені або на які впливає наявність рецепторів гормонів і/або залежних від гормонів шляхів метаболізму.

На кресленнях представлено:

на Фіг.1 - порівняння даних про інгібуючу ріст пухлини дію, зумовлену індукцією апоптозу антипрогестином (I), які отримані при вивченні залежності реакції від дози в досліді з використанням індукованої ДМБА карциноми молочної залози щура, з даними, отриманими в контрольних досліді з використанням антипрогестину онапристону, а також з даними, отриманими після оварієктомії. Дослід проводили з використанням добових доз антипрогестину (I), які вводяться підшкірно (s.c.), що становлять 0,5, 2,0, 5,0 і 10,0 мг/кг;

на Фіг.2 - порівняння даних про інгібуючу ріст пухлини дію, зумовлену індукцією апоптозу антипрогестином (I), які отримані в досліді з використанням індукованої НММ карциноми молочної залози щурів, з даними, отриманими в контрольних досліді, і з даними, отриманими після оварієктомії. Дослід проводили з використанням добових доз антипрогестину (I), які вводяться підшкірно (s.c.), що становлять 0,5 і 1,0 мг/кг;

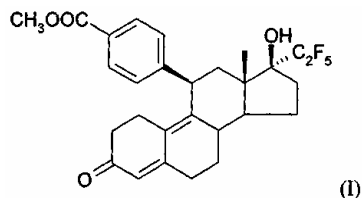
на Фіг.3 - порівняння даних про індукцію апоптозу й зумовлену ним інгібуючу ріст пухлини дію антипрогестину (I), який застосовується в дозі 10 мг/кг s.c, отриманих у досліді на безтимусних мишах, яким вводили ксенотрансплантати людських пухлин лінії T47D, з даними, отриманими в контрольних досліді, і після оварієктомії;

на Фіг.4 - порівняння даних про індукцію апоптозу й зумовлену ним інгібуючу ріст пухлини дію антипрогестину (I), який застосовується в дозі 10 мг/кг s.c, отриманих у досліді на безтимусних мишах на моделі раку молочної залози людини (клітини лінії MCF-7), з даними, отриманими в контрольних досліді, і після оварієктомії;

на Фіг.5A-5E - дані гістологічного аналізу, які стосуються індукції апоптозу в досліді на щурах з використанням моделі раку молочної залози, індукованого НММ (див. приклад 5). Зокрема, на Фіг.5A видно, що в пухлинах, оброблених антипрогестином (I), на відміну від контролю присутні утворення у вигляді проток і гронаподібні утворення, як правило заповнені секреторним продуктом (Фіг.5B). Для порівняння на Фіг.5B представлено зображення необробленої тканини індукованого НММ раку молочної залози, яка має високу імунореактивність у відношенні ЯАПК (ядерний антиген проліферуючих клітин), а на Фіг.5Г - зображення тканини індукованої НММ пухлини, обробленої антипрогестином (I), яка має низьку імунореактивність у відношенні ЯАПК. На Фіг.5Д представлено зображення тканини індукованої НММ пухлини молочної залози, обробленої антипрогестином (I), а на Фіг.5Е - зображення, отримане для контролю;

на Фіг.6 - порівняння даних про інгібуючу ріст пухлини дію антипрогестину (I) на клітини пухлини молочної залози лінії T47D (стимульованої естрадіолом) при використанні ефективної граничної концентрації  $10^{-9}$ - $10^{-8}$  моля/л, з дією антипрогестину онапристону і чистого антиестрогену 11 $\beta$ -фтор-7 $\alpha$ -[N-метил-N-3-(4,4,5,5,5-пентафторпентилтіо)пропіламіно]пентил]естра-1,3,5(10)-триєн-3,17 $\beta$ -діолу (WO 98/07740).

Антипрогестин (I), тобто 11 $\beta$ -(4-ацетилфеніл)-17 $\beta$ -гідрокси-17 $\alpha$ -(1,1,2,2,2-пентафторетил)естра-4,9-дієн-3-он, представлений нижче формулою (I):



Антипрогестин (I) (або його фармацевтично прийнятне похідне або аналог) являє собою фармацевтичний агент, що має велике значення, який має виражену антипрогестиніву активність. Антипрогестин (I) можна застосовувати відповідно до даного винаходу для індукції апоптозу клітин.

У контексті даного винаходу поняття "антипрогестин" стосується насамперед всіх сполук, які мають здатність конкурувати інгібувати рецептори прогестерону. Однак воно включає також сполуки, які мають здатність інгібувати біосинтез прогестинів.

У контексті даного опису фармацевтично прийнятні похідні або аналоги антипрогестину (I) можуть включати, наприклад, будь-яку зі сполук, заявлених у WO 98/34947.

Дослідження, виконані при створенні даного винаходу, свідчать про те, що антипрогестин (I) має

виражену активність у відношенні інгібування пухлини, що продемонстровано на різних моделях залежних від гормонів пухлин (див. приклади 1-6). Крім того, встановлено, що активність антипрогестину (I) у відношенні інгібування пухлини внаслідок індукції апоптозу перевищує відповідну активність звичайних протипухлинних агентів, таких як антиестроген тамоксифен. Ефективність лікування раку молочної залози з використанням антипрогестину (I) за даним винаходом перевищує навіть ефективність оварієктомії.

Як продемонстровано нижче в прикладах з використанням різних моделей пухлин, застосування антипрогестину (I) приводить до збільшення кількості пухлинних клітин, які знаходяться у фазі  $G_0G_1$  клітинного циклу, що супроводжується істотним зменшенням кількості клітин, які знаходяться у фазах S і  $G_2M$  клітинного циклу, що має біологічне значення. Ці дані свідчать про індукцію диференціювання. Раніше вже пропонувалося використання припинення специфічної для фази  $G_1$  диференціювання для інших систем стовбурових клітин [див. J.J. Wille Jr., *Cancer Res.* 1982, 42(12):5139-46; R.E. Scott, *J. Cell. Biol.* 1982, 94(2):400-405].

Експериментальні дані, отримані з використанням різних моделей пухлини, свідчать про те, що лікування за допомогою антипрогестину (I), очевидно, ініціює диференціювання полігональних пухлинних клітин, які мають мітотичну активність, що приводить до утворення гландулярних структур і грон, що супроводжується інтенсивним зменшенням продуктів секреції, а також до утворення веретеноподібних некробіотичних (некротичних) субпопуляцій (див. приклад 5 і, зокрема, Фіг.5А і 5Б). У той час як розмір пухлини, мітотичний індекс і рівень розвитку злоякісної пухлини помітно зменшуються, об'ємна частка гландулярних структур у пухлинах, а також симптоми апоптозу збільшуються в 3 рази в порівнянні з контролем (див. приклад 5, Фіг.5Д і 5Е).

Не обмежуючись якою-небудь окремою теорією, можна вважати, що ці результати свідчать про те, що основний механізм протипухлинної дії антипрогестину (I) у вивчених моделях полягає в безпосередній антипроліферативній дії, яка опосередковується рецептором прогестерону, на кількість пухлинних клітин, яка полягає в індукції термінального диференціювання, що супроводжується термінальною загибеллю клітин. Таким чином, антипрогестин (I), очевидно, має здатність елімінувати блокування термінального диференціювання, що має важливе значення, властиве клітинам злоякісних пухлин, що мають рецептори прогестерону. Така антипроліферативна дія антипрогестину (I), очевидно, обумовлена антигормональною (антипрогестинною) активністю антипрогестину (I).

Такі агенти, як антипрогестин (I), які індукують апоптоз клітин, наприклад, у випадку пухлинних клітин шляхом блокування їх розвитку в  $G_0G_1$ -фазі, можна застосовувати для лікування і попередження різних станів. Такі агенти, включаючи антипрогестин (I), можна застосовувати для лікування тих типів раку, наприклад, раку молочної залози, індикатором високого ступеня ризику виникнення яких є підвищена кількість пухлинних клітин, які знаходяться на S-фазі клітинного циклу.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є застосування антипрогестину (I) або його фармацевтично прийняттого похідного або аналога для приготування лікарського засобу, призначеного для індукції апоптозу клітини. У переважному варіанті здійснення антипрогестин (I) або його фармацевтично прийнятне похідне або аналог застосовують як лікарський засіб для індукції апоптозу пухлинних клітин, переважно клітин раку молочної залози людини. Такий лікарський засіб можна застосовувати для лікування залежних від гормонів захворювань, таких як рак молочної залози, індикатором високого ступеня ризику виникнення яких є підвищена кількість пухлинних клітин, які знаходяться на S-фазі клітинного циклу.

Приготування лікарських засобів можна здійснювати за допомогою методів, відомих у даній галузі. Можна застосовувати широко відомі і загальноприйняті допоміжні речовини, а також прийнятні носії і розріджувачі. Як прийнятні носії і допоміжні речовини можна використовувати сполуки, рекомендовані для застосування у фармацевтиці, косметичі і споріднених галузях, які описані в: [Ullmann's Encyclopedia of Technical Chemistry, т.4, (1953), стор.1-39; Journal of Pharmaceutical Sciences, т.52 (1963), стор.918 і далі; H.v.Czetsch-Lindenwald, "Hilfsstoffe für Pharmazie und angrenzende Gebiete"; Pharm. Ind. 2, 1961, стор.72 і далі; Dr. H.P. Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, вид-во Cantor KG, Aulendorf in Württemberg, 1971].

Антипрогестини, які можна застосовувати для цілей даного винаходу, переважно антипрогестин (I) або його фармацевтично прийнятне похідне або аналог, можна включати до складу фармацевтичних композицій за допомогою відомих методів приготування галенових форм для перорального або парентерального, наприклад, внутрішньочеревинного, внутрішньом'язового, підшкірного або черезшкірного введення. Їх можна також імплантувати у тканину. Імпланти можуть являти собою інертні матеріали, наприклад, біорозкладні полімери і синтетичні силікони, такі, наприклад, як силіконовий каучук.

Їх можна вводити у формі таблеток, пігулок, драже, желатинових капсул, гранул, супозиторіїв, імплантатів, ін'єктованих стерильних водних або масляних розчинів, суспензій або емульсій, мазей, кремів, гелів або інтравагінальних (наприклад, вагінальних кілець) або внутрішньоматкових систем (наприклад, діафрагм, петель).

Для приготування лікарського засобу, призначеного для перорального введення, описані вище антипрогестини, придатні для застосування згідно із даним винаходом, можна змішувати із широко відомими і загальноприйнятими допоміжними речовинами і носіями, такими, наприклад, як гуміарабік, тальк, крохмаль, цукри, такі, наприклад, як маніт, метилцелюлоза, лактоза, желатин, поверхнево-активними речовинами, стеаратом магнію, водними або неводними ексципієнтами, похідними парафіну, зшиваючими агентами, розпушувачами, емульгаторами, замаслювачами, консервантами і коригентами (наприклад, ефірними оліями). У фармацевтичній композиції антипрогестин може знаходитися в диспергованому стані у вигляді мікрочастинок, наприклад, у вигляді наночастинок.

Для додаткового підвищення біологічної доступності діючої речовини описані вище антипрогестини, придатні для застосування згідно із даним винаходом, можна включати також у вигляді циклодекстринових клатратів до складу препаративної форми, піддаючи їх взаємодії з  $\alpha$ -,  $\beta$ - або  $\gamma$ -циклодекстринами або їх похідними відповідно до методу, описаному в РСТ/EP95/02656.

Для парентерального введення описані вище антипрогестини, придатні для застосування згідно із даним винаходом, можна розчиняти або суспендувати у фізіологічно прийнятному розріджувачі, такому, наприклад, як олії разом із солюбілізаторами, поверхнево-активними агентами, диспергувальними агентами

або емульгаторами або без них. Прикладами олій, які можна застосовувати (але не обмежуючись ними), є маслинова олія, арахісова олія, бавовняна олія, соєва олія, рицинова олія і кунжутна олія.

Призначена для введення кількість (тобто «фармацевтично ефективна кількість») змінюється в широких межах і залежить від стану, який підлягає лікуванню, і шляху введення. Вона може являти собою будь-яку кількість, яка є ефективною для здійснення потрібного лікування. Визначення «фармацевтично ефективної кількості» знаходиться в компетенції фахівця в даній галузі.

Одна стандартна доза може містити приблизно від 0,1 до 100мг діючих(ої) речовин(и). Для введення людині добова доза діючих(ої) речовин(и) становить приблизно від 0,1 до 400мг, переважно від 10 до 100мг, найбільш переважно 50мг.

Лікарські засоби можна вводити також шляхом ін'єкції депо або імплантату, що необов'язково забезпечує уповільнене вивільнення діючих(ої) речовин(и).

Переважає шляхом введення є пероральне введення. Антипрогестини, придатні для застосування відповідно до винаходу, зокрема, антипрогестин (I), найбільш переважно вводять пероральним шляхом.

Згідно з всіма об'єктами даного винаходу принаймні один з описаних вище антипрогестинів, зокрема, антипрогестин (I) або його фармацевтично прийнятне похідне або аналог, можна застосовувати в сполученні з принаймні одним антиестрогеном, оскільки для багатьох залежних від гормону захворювань, зокрема для раку молочної залози, характерна наявність не тільки рецепторів прогестерону, але також і рецепторів естрогену. Антиестроген можна вводити як одночасно, так і послідовно з антипрогестином, і, зокрема, з антипрогестином (I) або його фармацевтично прийнятним похідним або аналогом. Кількість антипрогестину й антиестрогену можуть бути однаковими або один з компонентів може бути присутнім у більшій кількості, ніж інший, наприклад, співвідношення антипрогестин:антиестроген може становити від 1:50 до 50:1, переважно від 1:30 до 30:1, і найбільш переважно від 1:15 до 15:1.

Прикладами антиестрогенів, які можна застосовувати відповідно до винаходу, є нестероїдні антиестрогени, такі як тамоксифен і нафоксифен, а також ралоксифен, фаслодекс і EM800. Прикладами стероїдних антиестрогенів є сполуки, описані в EP 0348341 A і сполуки, описані в WO 98/07740, зокрема, 11 $\beta$ -фтор-7 $\alpha$ -{5-[N-метил-N-3-(4,4,5,5,5-пентафторпентилтіо)пропіламіно]пентил}естра-1,3,5(10)-триєн-3,17 $\beta$ -діол, або сполуки, описані в WO 99/33855, зокрема, 11 $\beta$ -фтор-7 $\alpha$ -{5-[метил-(7,7,8,8,9,9,10,10,10-нонафтордецил)аміно]пентил}естра-1,3,5(10)-триєн-3,17 $\beta$ -діол або їх фармацевтично прийнятні або похідні аналоги. Як антиестрогени можна застосовувати також інгібітори ароматази, які мають антиестрогенну активність, такі, наприклад, що описані на стор.7-8 EP 0495825 B1.

Ще одним об'єктом даного винаходу є застосування антипрогестину (I) або його фармацевтично прийнятного похідного або аналога для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування раку такого типу, індикатором високого ризику виникнення якого є підвищення кількості пухлинних клітин у S-фазі клітинного циклу. Кількість пухлинних клітин, які знаходяться в S-фазі можна оцінювати шляхом визначення ДНК за допомогою методу проточної цитометрії, описаного в [Dressier і ін., "DNA Flow Cytometry and Prognostic Factors in 1331 Frozen Breast Cancer Specimens," Cancer, т.61(3), 1988, стор.420-427; див. також McGuire і Dressier, "Emerging Impact of Flow Cytometry in Predicting Recurrence and Survival in Breast Cancer Patients," JNCI, т.75(3), 1985, стор.405-409]. Кількість пухлинних клітин, які знаходяться в S-фазі, що зумовлює високий ризик захворювання, являє собою найбільш переважну мішень для застосування сполук за винаходом. У випадку антипрогестину (I), перевага його застосування зумовлена як сильною протипухлинною дією, що продемонстровано на стандартних моделях з використанням тварин (див. приклади 1-4), так і механізмом дії цього агента, пов'язаного з індукцією апоптозу (див., зокрема приклад 5) і припиненням клітинного циклу.

Іншим об'єктом даного винаходу є спосіб індукції апоптозу клітини. Клітина переважно являє собою клітину ссавця і найбільш переважно клітину людини, причому спосіб можна здійснювати як *in vitro*, так і *in vivo*. Переважно апоптоз індукують за допомогою механізму ініціації термінального диференціювання, наприклад, шляхом введення антипрогестину (I) або його фармацевтично прийнятного похідного або аналога. Відповідно до даного способу розглянуту клітину піддають впливу ефективної кількості антипрогестину (I) або його фармацевтично прийнятного похідного або аналога. Наприклад, у клітин раку молочної залози лінії T47D, ріст яких стимулювали шляхом введення естрадіолу, антипрогестин (I) індукував повне інгібування росту клітин при використанні ефективної граничної концентрації від 10<sup>-9</sup> до 10<sup>-8</sup> молів (див. приклад 6 і Фіг.6). Це є найбільш несподіваним, оскільки відомий антипрогестин онапристон не викликав впливу, що викликає зменшення росту клітин при дослідженні на даній моделі пухлини. Таким чином, антипрогестин (I) є більш переважним з погляду сили дії й ефективності в порівнянні з іншими антипрогестинами, такими як онапристон, і антиестрогенами, такими як тамоксифен, і навіть з багатьма антиестрогенами, такими як 11 $\beta$ -фтор-7 $\alpha$ -{5-[N-метил-N-3-(4,4,5,5,5-пентафторпентилтіо)пропіламіно]пентил}естра-1,3,5(10)-триєн-3,17 $\beta$ -діол (WO 98/07740).

Той факт, що антипрогестин (I) має здатність індукувати апоптоз клітини, свідчить про те, що вказаний антипрогестин (або його фармацевтично прийнятне похідне або аналог) можна застосовувати для лікування різноманітних станів, насамперед залежних від гормонів станів, при яких найбільш бажано індукувати апоптоз. Конкретно його можна застосовувати для лікування таких захворювань, як рак молочної залози, рак яєчника, рак ендометрію, мієлома, ановуляторна безплідність, менінгома, тобто захворювань, які в основному зумовлені або на які впливає наявність рецепторів гормону і/або залежних від гормонів шляхів метаболізму. Крім того, антипрогестини, такі як антипрогестин (I), можна застосовувати для приготування лікарських засобів, які індукують апоптоз або загибель клітин, призначених для лікування вже описаних вище залежних від гормонів захворювань.

Нижче винахід проілюстрований на прикладах. Слід мати на увазі, що наведені нижче приклади не обмежують обсяг винаходу.

Приклади

Приклад 1:

Дослідження залежності реакції від дози на моделі пухлини, індукованої ДМБА

Матеріали і методи:

Дане дослідження проводили на статевонезрілих самках щурів лінії Sprague-Dawley (віком 49-51 день; 10 тварин/групу). Пухлини молочної залози індукували шляхом однократного перорального введення 10мг 7,12-диметилбенз[а]антрацену (ДМБА, фірма Serva, Гейдельберг). Щурів, у яких була виявлена принаймні одна пухлина, що має розмір, який перевищує 150мм<sup>2</sup>, протягом 4 тижнів піддавали наступним обробкам: 1) вводили розчинник (контроль), 2) піддавали оварієктомії перед початком дослідження, вводили щодня 3) антипрогестин (I), 0,5мг/кг s.c, 4) антипрогестин (I), 2мг/кг s.c, 5) антипрогестин (I), 5мг/кг s.c, 6) антипрогестин (I), 10мг/кг s.c. і 7) онапристон, 5мг/кг, s.c. Як параметр для оцінки інгібування росту використовували зміну площі пухлини (у % по відношенню вихідного розміру пухлини), яку оцінювали шляхом щотижневого вимірювання за допомогою циркуля. Для статистичного аналізу відмінностей середніх значень між групами використовували критерій Крускала-Уолліса. Більш докладний опис і оцінка моделі, призначеної для вивчення запобігання розвитку індукованої ДМБА пухлини, наведені в [R.G. Metha, European Journal of Cancer 36 (2000), стор.1275-1282].

#### Результати:

У інтактних контрольних тварин спостерігався прогресивний ріст пухлини, у той час як у 90% підданих оварієктомії тварин спостерігалася істотний регрес пухлини. Лікування антипрогестином (I) у дозах, що дорівнюють або перевищують 2мг/кг, викликало виражену індукцію апоптозу, що приводило до інгібування росту пухлини в порівнянні з контролем (див. Фіг.2). У цьому випадку спостерігалася залежність реакції від дози. У той час як лікування з використанням 0,5мг/кг антипрогестину (I) не приводило до істотного інгібування росту пухлини, при використанні дози 2мг/кг спостерігалися максимальна індукція апоптозу й обумовлене цим інгібування росту. У цій групі в 50% щурів був виявлений повний регрес пухлини. Вплив максимальної вивченої в даному експерименті дози антипрогестину (I) (10мг/кг), виявилось порівнянною із впливом дози 2мг/кг. Онапристон (5мг/кг, s.c.) виявився істотно менш ефективним, ніж антипрогестин (I), при застосуванні в порівнюваних дозах.

#### Висновки:

У дослідях на моделі індукованої ДМБА пухлини молочної залози в щурів встановлено, що антипрогестин (I) сильно індукував апоптоз клітин пухлини й у результаті цього повністю пригнічував ріст пухлини в інтактних тварин. Встановлено, що доза 2мг/кг антипрогестину (I) виявляла максимальну апоптозну дію на пухлинні клітини. Антипрогестин (I) мав істотно більшу ефективність у відношенні інгібування росту пухлини, ніж онапристон.

#### Приклад 2:

Вивчення інгібування росту пухлини на моделі індукованого НММ раку молочної залози в щурів

#### Матеріали і методи:

Пухлини індукували шляхом однократної внутрішньовенної ін'єкції НММ (нітрозометилсечовина, 50мг/кг) самкам щурів лінії Sprague-Dawley (отриманих від фірми Tierzucht Schönwalde, вік 50-55 днів). Через 10 днів щурів, у яких була виявлена принаймні одна пухлина, піддавали протягом 4 тижнів наступним обробкам: 1) вводили розчинник (контроль), 2) піддавали оварієктомії перед початком дослідження, вводили щодня 3) антипрогестин (I), 1,0мг/кг/день, 4) антипрогестин (I), 0,5мг/кг/день і 5) онапристон, 5мг/кг/день. Як параметр для оцінки інгібування росту використовували зміну площі пухлини (у % по відношенню до вихідного розміру пухлини), яку оцінювали шляхом щотижневого вимірювання за допомогою циркуля. Для статистичного аналізу відмінностей середніх значень між групами використовували критерій Крускала-Уолліса.

#### Результати:

У інтактних тварин спостерігався прогресивний ріст пухлини, у той час як оварієктомія приводила до повного інгібування росту пухлини. Введення антипрогестину (I) у дозах 0,5 або 1,0мг/кг приводило до істотного інгібування росту пухлини, зумовленого індукцією апоптозу, у порівнянні з контролем (див. Фіг.2). Онапристон (5мг/кг) виявився помітно менш ефективним, ніж антипрогестин (I), що вводиться в істотно меншій дозі 0,5мг/кг.

#### Висновки:

У дослідях на моделі індукованої НММ пухлини молочної залози в щурів встановлено, що антипрогестин (I) завдяки його вираженій здатності індукувати апоптоз пухлинних клітин повністю пригнічував ріст пухлини в інтактних тварин. Обидві дози (1,0мг/кг, також як і 0,5мг/кг) антипрогестину (I) викликали істотну апоптозну дію на пухлинні клітини.

#### Приклад 3:

Ксенотрансплантат пухлини лінії T47D молочної залози людини, імплантований безтимусним мишам

#### Матеріали і методи:

Самкам безтимусних мишей лінії Fox Chase (фірма M&B) вводили пелети естрадіолу (фірма Innovative Research of America). Клітини лінії T47D раку молочної залози, отримані з клітинної культури і суспендовані в матригелі, імплантували s.c. у пахвинну ділянку мишей. Обробку починали після того, як пухлини досягали розміру приблизно 25мм<sup>2</sup>. Обробку продовжували доти, поки продовжувався розвиток пухлини. В експерименті використовували наступні групи тварин: 1) контрольна група (оброблена носієм), 2) група, піддана оварієктомії, 3) група, яка оброблена антипрогестином (I), 10мг/кг s.c. Площу пухлини визначали за допомогою циркуля. Для статистичного аналізу відмінностей середніх значень між групами використовували критерій Крускала-Уолліса.

#### Результати:

У дослідях з використанням моделі раку молочної залози T47D оварієктомія приводила до істотного інгібування росту пухлини в порівнянні зі швидким ростом у контролі. Дані, наведені на Фіг.3, переконливо свідчать про те, що введення антипрогестину (I) у дозі 10мг/кг s.c. індукувало апоптоз пухлинних клітин. Дія антипрогестину (I) практично порівнянна з дією звичайної терапії, призначеної для депривації естрогену (оварієктомії).

#### Висновки:

Дія антипрогестину (I) у відношенні індукції апоптозу й зумовлене нею інгібування росту клітин T47D раку молочної залози людини, ксенотрансплантованих безтимусним мишам лінії Fox Chas, виявилася порівнянною з дією звичайної терапії, призначеної для депривації естрогену (оварієктомії), яка у даний час

вважається методом інгібування росту пухлини молочної залози при використанні даної моделі, який має максимальну ефективність.

#### Приклад 4:

Ксенотрансплантат пухлини лінії MCF-7 молочної залози людини, імплантований безтимусним мишам

#### Матеріали і методи:

Самкам безтимусних мишей лінії Fox Chase (фірма M&B) вводили пелети естрадіолу (фірма Innovative Research of America). Клітини лінії MCF7 раку молочної залози, отримані з клітинної культури і суспендовані в матригелі, імплантували s.c. у пахвинну ділянку мишей. Обробку починали після того, як пухлини досягали розміру приблизно 25мм<sup>2</sup>. Обробку продовжували доти, поки продовжувався розвиток пухлини. В експерименті використовували наступні групи тварин: 1) контрольну групу (яку обробляли носієм), 2) групу, піддану оваріектомії, 3) групу, яку обробляли антипрогестином (I), 10мг/кг s.c. Площа пухлини визначали за допомогою циркуля. Для статистичного аналізу відмінностей середніх значень між групами використовували критерій Крускала-Уолліса.

#### Результати:

У дослідях з використанням моделі раку молочної залози лінії MCF7 овариєктомія приводила до істотного інгібування росту пухлини в порівнянні зі швидким ростом у контролі. Дані, наведені на Фіг.4, переконливо свідчать про те, що введення антипрогестину (I) s.c. у дозі 10мг/кг індукувало апоптоз пухлинних клітин. Дія антипрогестину (I) практично порівнянна з дією звичайної терапії, призначеної для депривації естрогену (овариєктомії).

#### Висновки:

Дія антипрогестину (I) у відношенні індукції апоптозу й зумовлене нею інгібування росту клітин лінії MCF7 раку молочної залози людини, ксенотрансплантованих безтимусним мишам лінії Fox Chas, виявилася порівнянною з дією звичайної терапії, призначеної для депривації естрогену (овариєктомії).

#### Приклад 5:

Вивчення індукованого HMM раку молочної залози в щурів (гістологія, індекс проліферації і TUNEL-аналіз)

#### Матеріали і методи:

Пухлини індукували шляхом внутрішньовенної ін'єкції HMM (нітрозометилсечовина, 50мг/мл) самкам щурів лінії Sprague-Dawley (отриманим від фірми Tierzucht Schönwalde, віком 50-55 днів). Щурів, у яких була виявлена принаймні одна пухлина розміром більше 150мм<sup>2</sup>, піддавали протягом 7 днів наступним видам обробки: 1) вводили розчинник (контроль), 2) здійснювали овариєктомію перед початком досліду, 3) вводили антипрогестин (I), 3мг/кг s.c., щодня. Після завершення обробки пухлини вирізали, фіксували у формаліні і занурювали в парафін. На цих виділених пухлинах проводили гістологічний аналіз, оцінку індексу проліферації й аналіз індукції апоптозу. Гістологія: Для здійснення гістологічного аналізу зрізи тканини фарбували гематоксиліном і досліджували за допомогою мікроскопа.

Індекс проліферації: Для визначення індексу проліферації оцінювали експресію ЯАПК (ядерний антиген проліферуючих клітин). Ядерний антиген проліферуючих клітин (ЯАПК) являє собою ядерний протеїн, який має молекулярну масу 36кДа, що бере участь у клітинному циклі. Було встановлено, що ЯАПК має імунореактивність в компартменті здорових тканин, які характеризуються проліферацією. Для вивчення його розподілу в тканині використовували моноклональне антитіло, яке розпізнає епітоп, стійкий у відношенні фіксації і процесінгу.

TUNEL (Тест для оцінки апоптозу): Біохімічним критерієм апоптозу є деградація геномної ДНК, що являє собою необоротний процес, який приводить до загибелі клітин. Він характеризується фрагментацією ДНК, що відбувається внаслідок активації ядерних ендонуклеаз, які вибірно розщеплюють ДНК у сайтах, розташованих між нуклеосомними ланками. Такі розриви ланцюга ДНК виявляли за допомогою ферментного мічення 3'-ОН-кінців за допомогою флуоресцин-дУТФ із використанням термінальної дезоксиінуклеотидил-трансферази [TUNEL, Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick End Labeling, див. у Gavrieli і ін., J. Cell. Biol. 119, 493, 1992]. Включений флуоресцин виявляли за допомогою кон'югата антитіла до флуоресцину і лужної фосфатази і наступної взаємодії із субстратом лужної фосфатази.

#### Результати:

Гістологія: На зрізах тканини індукованих HMM пухлин, оброблених антипрогестином (I), видні диспластичні утворення у вигляді проток і гронепоподібні утворення, як правило заповнені секреторним продуктом (Фіг.5А). Крім того, спостерігається збільшення об'ємної частки гранулярних структур у порівнянні з контрольними (Фіг.5Б). Крім того, у пухлинах молочної залози тварин, оброблених антипрогестином (I), видні морфологічні ознаки диференціювання.

Індекс проліферації: імунореактивність у відношенні ЯАПК виявилася найбільш високою в необробленій тканині раку молочної залози, індукованого HMM (Фіг.5В: необроблений контроль). Кількість клітин, які мають імунореактивність у відношенні ЯАПК, зменшувалася в результаті індукції диференціювання в тканині раку молочної залози щура, індукованого HMM, при обробці антипрогестином (I) (Фіг.5Г). Ці дані свідчать про те, що у випадку раку молочної залози обробка антипрогестином зменшувала індекс проліферації внаслідок індукції диференціювання.

TUNEL (Апоптоз): На Фіг.5Д продемонстровано, що на відміну від необробленого контролю в тканині раку молочної залози, індукованого HMM, обробка антипрогестином (I) викликала апоптоз (Фіг.5Е). Зовсім очевидно, що введення лише одного антипрогестину (I) індукувало апоптоз у тканинах раку молочної залози, індукованого HMM, і тим самим інгібувало ріст цих пухлин.

#### Приклад 6:

Антипроліферативна активність антипрогестину (I) in vitro у клітинах лінії T47D

#### Матеріали і методи:

Клітини лінії T47D вирощували в обробленій активованим вугіллем сироватці, доповненій 0,1нМ Е2 (естрадіол) і антипрогестином (I), протягом 6 днів, протягом яких один раз здійснювали заміну середовища. Після здійснення фіксації і наступного фарбування кристалічним фіолетовим вимірювали абсорбцію й отримані значення стандартизували по відношенню до рівня абсорбції необроблених контролів відповідно до

методу, описаному в [R.B. Lichtner, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 1999, 71;181-189]. TUNEL-аналіз проводили аналогічно до методу, описаному вище в прикладі 5 з єдиною відмінною, яка полягає в тому, що для аналізу замість зрізів тканини використовували клітини, які культивували на предметних стеклах для мікроскопічного аналізу.

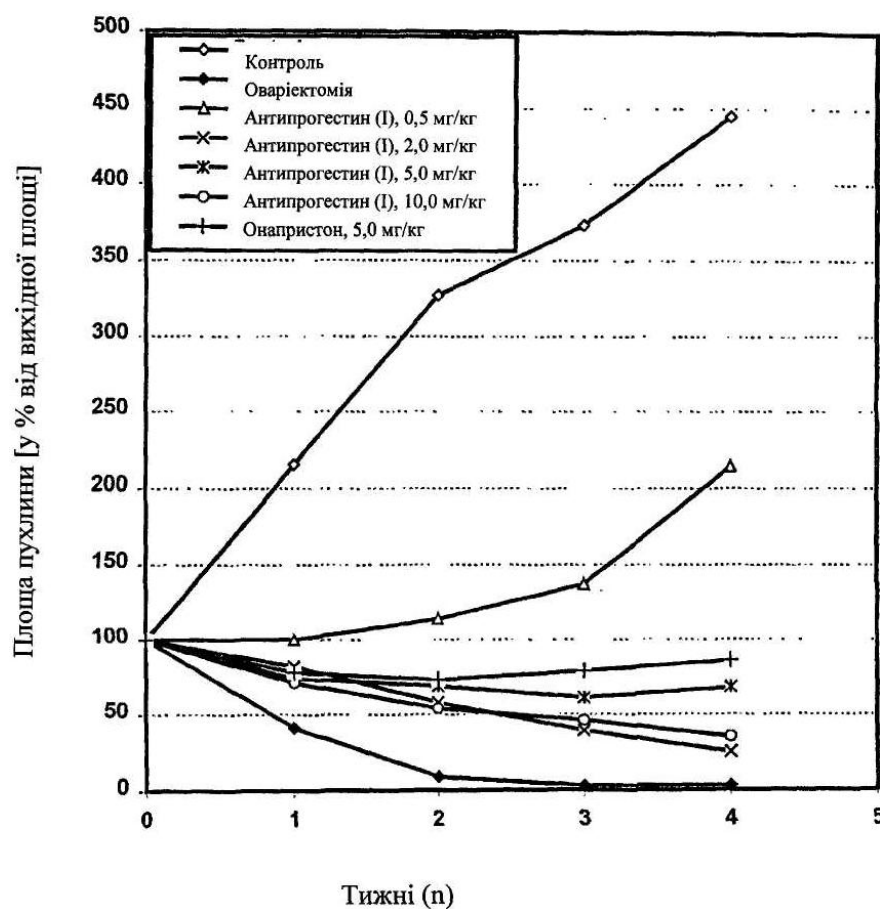
#### Результати:

У цьому досліді *in vitro* на клітинах лінії T47D встановлено, що антипрогестин (I) мав виражену інгібуючу ріст пухлини активність при використанні ефективних граничних концентрацій від  $10^{-9}$  до  $10^{-8}$  молів/л, у той час як антипрогестин онапристон не робив якої-небудь помітної інгібуючої дії. Навіть застосування чистого антиестрогену 11 $\beta$ -фтор- $\alpha$ -{5-[N-мтил-N-3-(4,4,5,5,5-пентафторпентилтіо)пропіламіно]пентил}естра-1,3,5(10)-триєн-3,17 $\beta$ -діолу (WO 98/07740) виявилось істотно менш ефективним, ніж антипрогестину (I) (див. Фіг.6).

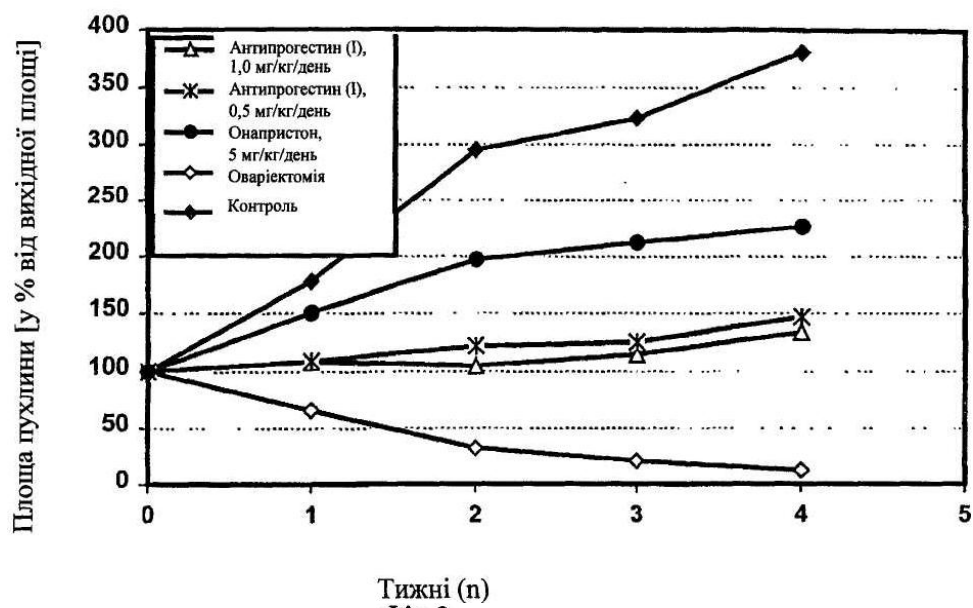
#### Висновки:

Антипрогестин (I) за даним винаходом індукував повне інгібування стимульованого естрадіолом росту клітин лінії T47D при його застосуванні в дуже малих концентраціях і тому істотно перевищував у відношенні сили дії й ефективності інші досліджені антипрогестини, такі як онапристон і чистий антиестроген 11 $\beta$ -фтор- $\alpha$ -{5-[N-мтил-N-3-(4,4,5,5,5-пентафторпентилтіо)пропіламіно]пентил}естра-1,3,5(10)-триєн-3,17 $\beta$ -діол.

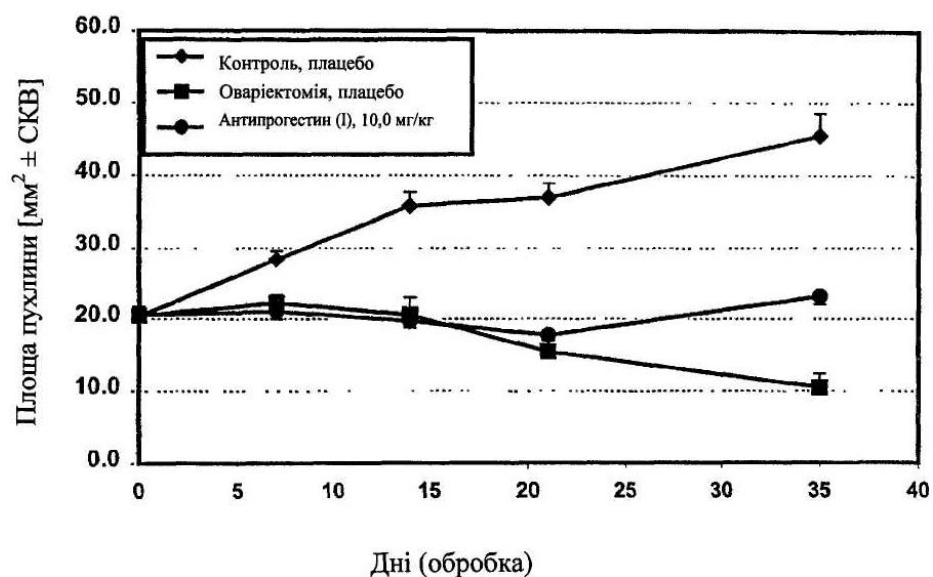
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

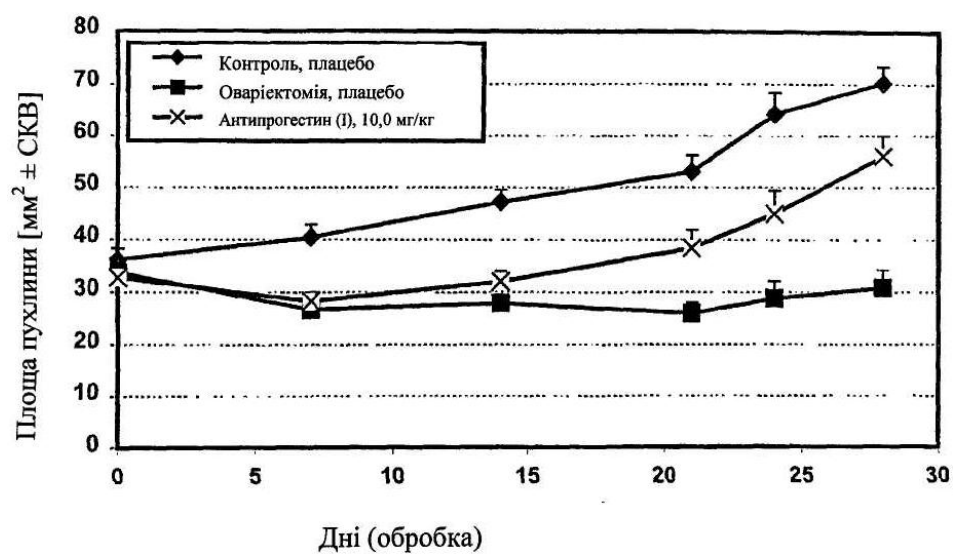




Fig. 5A

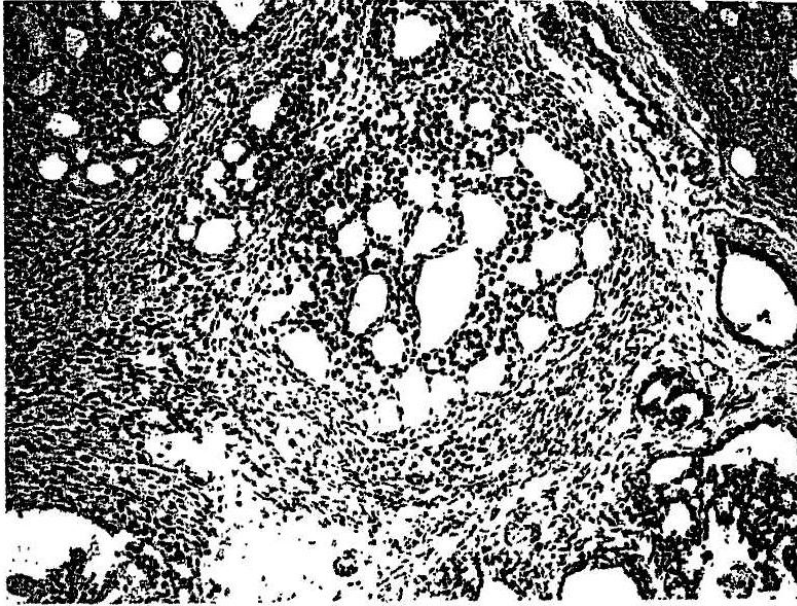


Fig. 5B

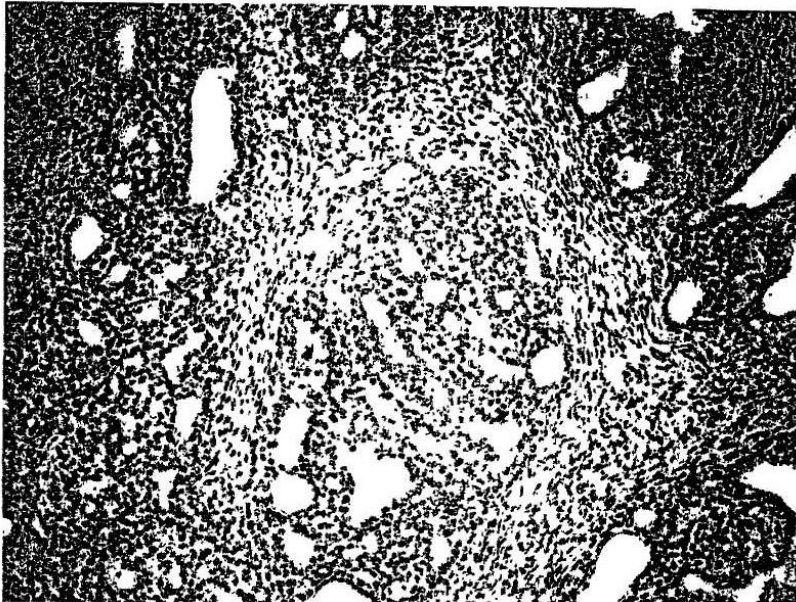


Fig. 5C

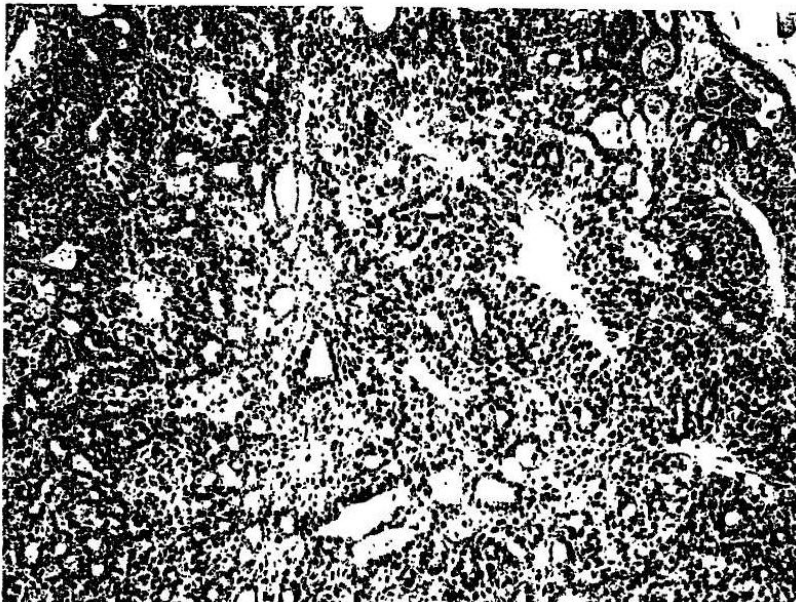


Fig. 5D

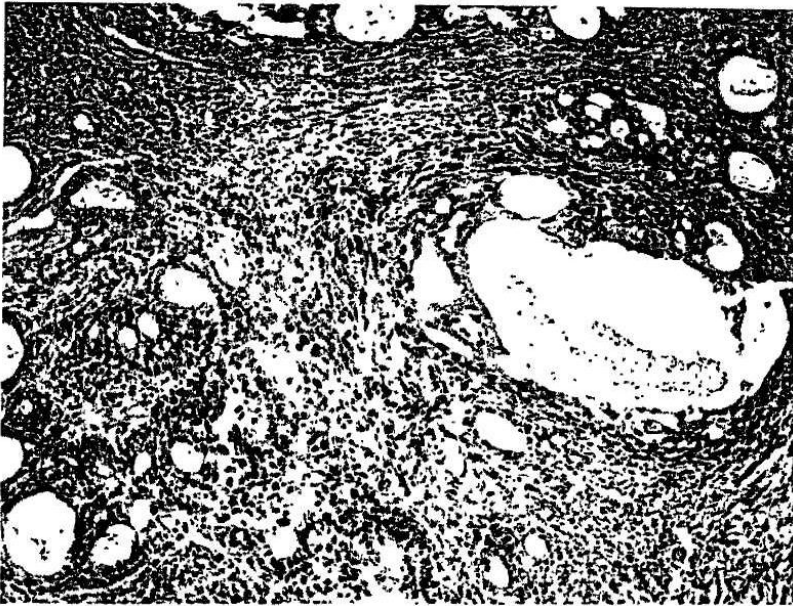


Fig. 5E

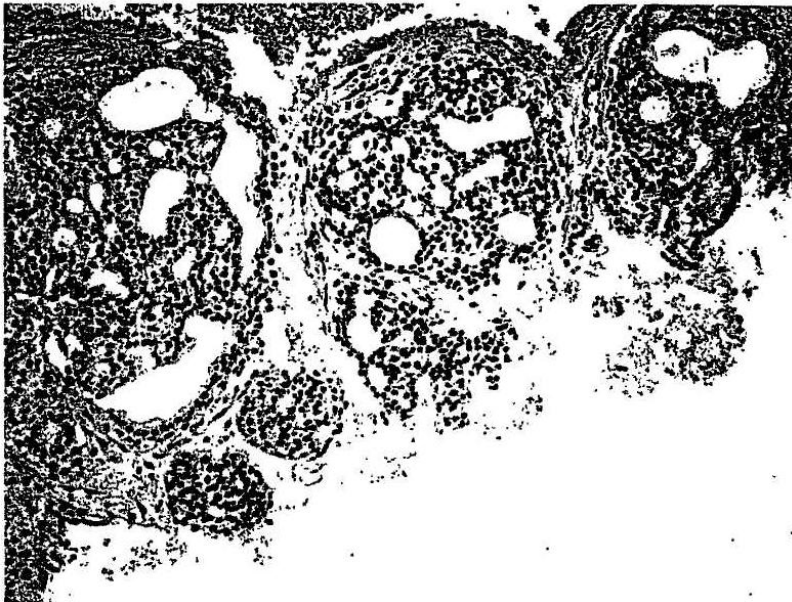


Fig. 5F



Фиг. 6

