



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 603 08 679 T2 2007.08.16**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 511 496 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 08 679.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/NL03/00422**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 741 634.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/103684**

(86) PCT-Anmeldetag: **11.06.2003**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **18.12.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.03.2005**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **27.09.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.08.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 31/565 (2006.01)**

**A61P 19/02 (2006.01)**

**A61P 17/06 (2006.01)**

**A61P 37/00 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

**02077272 11.06.2002 EP**

(73) Patentinhaber:

**Pantarhei Bioscience B.V., Zeist, NL**

(74) Vertreter:

**ABACUS Patentanwälte, Klocke, Späth, Barth,  
72160 Horb**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR**

(72) Erfinder:

**BUNSCHOTEN, Johannes, Evert, NL-5384 EV  
Heesch, NL; COELINGH BENNINK, Jan, Herman,  
NL-3971 BE Driebergen, NL; HOLINKA, Franz,  
Christian, New York, NY 10014, US**

(54) Bezeichnung: **METHODE ZUR BEHANDLUNG ODER PRÄVENTION IMMUNOLOGISCHER ERKRANKUNGEN  
UND PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNG ZUR SOLCHEN ANWENDUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## TECHNISCHES GEBIET DER ERFINDUNG

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung oder Prävention immunvermittelter krankhafter Störungen bei einem Säuger durch Verabreichen dem Säuger einer wirksamen Menge einer östrogenen Komponente. Das Verfahren ist für die Behandlung oder Prävention von durch T-Lymphozyten vermittelten krankhaften Störungen und/oder chronischen Entzündungserkrankungen, einschließlich, jedoch nicht darauf beschränkt, Autoimmunkrankheiten wie Multiple Sklerose, rheumatoider Arthritis, Osteoarthritis, insullinabhängiger Diabetes (Typ-I-Diabetes), systemischem Lupus erythematosus und Schuppenflechte, Immunpathologien, die durch infektiöse Mittel wie beispielsweise Helminthin (z.B. Leishmaniose) und gewisse Virusinfektionen induziert werden, einschließlich HIV, und Bakterieninfektionen, wie beispielsweise Lyme-Krankheit, Tuberkulose und lepromatöse Lepra, Transplantatabstoßung, Transplantat-Wirt-Reaktion und atopischer Zustände wie Asthma und Allergie, einschließlich allergischer Rhinitis, Magen-Darm-Allergien, einschließlich Nahrungsmittelallergien, Eosinophilie, Bindehautentzündung und Glomerulonephritis besonders geeignet.

**[0002]** Eine andere Ausgestaltung der Erfindung betrifft eine pharmazeutische Formulierung zur Verwendung bei dem oben erwähnten Verfahren, wobei die Formulierung eine östrogene Komponente, ein immuntherapeutisches Mittel und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfasst.

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0003]** Die Rolle weiblicher Geschlechtshormone bei verschiedenen immunvermittelten krankhaften Störungen ist das Thema verschiedener wissenschaftlicher Veröffentlichungen gewesen. Es ist erkannt worden, dass Autoimmunkrankheiten wie Multiple Sklerose und rheumatoide Arthritis vor allem bei Frauen auftreten (Jansson et al., *Inflamm Res* 1998, Juli 1998; 47(7):290–301). Außerdem ist die Beobachtung gemacht worden, dass während der Schwangerschaft, wenn die Spiegel weiblicher Geschlechtshormone hoch sind, klinische vorübergehende Besserungen zellvermittelter Autoimmunkrankheiten häufig vorkommen, wobei eine Verschlimmerung der Krankheit oft postpartal zu beobachten sind, wenn die Geschlechtshormonspiegel niedrig liegen (Kim et al., *Neurology*, 12. April 1999; 52(6) 1230–1238). Des Weiteren ist berichtet worden, dass ein ungewöhnlich hoher Bruchteil von Patienten mit Multipler Sklerose reduzierte Gonadotropin- und Östrogenwerte im Urin aufweisen (Poser et al., *Geburtshilfe Frauenheilkunde*, Mai 1981; 41(5):353–358).

**[0004]** Des Weiteren haben Studien an kastrierten Mäusen gezeigt, dass die Verabreichung von Östradiol und Östriol in einer Menge, die die Serumspiegel induziert, die im Spätstadium der Trächtigkeit zu sehen sind, das Einsetzen experimenteller Autoimmunenzephalomyelitis (EAE), einer von Th1-Zellen abhängigen Autoimmunerkrankung, die als Modell für Multiple Sklerose benutzt wird, verzögert (Jansson et al., *Inflamm Res* Juli 1998; 47(7):290–301). Die Ergebnisse einer Beurteilung der Wirkung von 17 $\beta$ -Östradiol auf die Genexpression in EAE unter Anwendung von DNA-Mikroarray impliziert eine begrenzte Gruppe bekannter und vorher nicht verdächtiger für Östradiol empfindlicher Gene, die für das Inhibieren von EAE und potentiell der menschlichen Krankheit der Multiplen Sklerose äußerst wichtig sein können (Matejuk et al., *Endocrinology* Januar 2002; 143(1):313–319).

**[0005]** WO 01/185154 betrifft ein Verfahren zum Verbessern einer durch Th1 vermittelten Immunpathologie bei einem Säuger durch Verabreichen dem Säuger einer geringen Dosis von Östrogen, insbesondere einer geringen Dosis von 17 $\beta$ -Östradiol, Östriol oder Östron. Geringe Dosen dieser Östrogene werden als notwendig betrachtet, um die potentiellen nachteiligen Wirkungen hoher Östrogenspiegel auf die Fortsetzungs- und Kreislaufsysteme zu vermeiden und auch um ungewünschte Nebenwirkungen bei männlichen Individuen zu verhindern. DE19917930 beschreibt die Verwendung von Steroiden mit einer 8 $\alpha$ -H-, 9 $\beta$ -H-, 10 $\alpha$ -H-, 13 $\alpha$ -H-, 14 $\beta$ -H-Konfiguration in pharmazeutischen Zusammenhängen.

**[0006]** Die oben erwähnten Östrogene 17 $\beta$ -Östradiol, Östriol und Östron haben gemeinsam, dass sie dem weiblichen Körper endogen sind, d.h. sie sind biogene Östrogene. Diese biogenen Östrogene weisen schwerwiegende pharmakokinetische Mängel auf. Ihre orale Bioverfügbarkeit ist sehr gering und variiert stark von einer Person zur anderen, was bedeutet, dass allgemeine Dosierempfehlungen nicht erfolgen können. Die schnelle Eliminierung dieser Östrogene aus dem Blut ist ein anderes damit verbundenes Problem. Beispielsweise liegt die Halbwertszeit beim menschlichen Biogenen Hauptöstrogen 17 $\beta$ -Östradiol bei etwa 1 Stunde. Aus diesem Grund neigen Blutserumspiegel derartiger biogener Östrogene zwischen einzelnen (täglich) Verabreichungsfällen stark zu schwanken. So ist die Serumkonzentration kurz nach der Verabreichung gewöhnlich

um ein Mehrfaches höher als die optimale Konzentration. Außerdem fallen Serumkonzentrationen schnell auf ein Niveau ab, wenn der nächste Verabreichungsfall verzögert ist, wo das Östrogen nicht mehr physiologisch aktiv ist.

**[0007]** Außer pharmakokinetischen Problemen weisen bekannte Östrogene auch pharmakodynamische Mängel auf. Nach der Resorption aus dem Darmlumen gehen oral verabreichte aktive Bestandteile durch die Leber in den Organismus. Diese Tatsache ist von spezifischer Wichtigkeit für östrogene Mittel, da die Leber ein Zielorgan für Östrogene ist; die orale Einnahme von Östrogenen führt zu starken östrogenen Wirkungen in der Leber. Die Absonderungsaktivität, die durch Östrogene in der menschlichen Leber reguliert wird, umfasst eine erhöhte Synthese der Transportproteine CBG, SHBG, TBG, mehrerer Faktoren, die für die Physiologie der Blutgerinnung wichtig sind, und Lipoproteine. Wenn biogene Östrogene in den weiblichen Organismus eingeführt werden, während der Durchgang durch die Leber vermieden wird (z.B. durch transdermales Einbringen), so bleiben die oben erwähnten Leberfunktionen weitgehend unverändert.

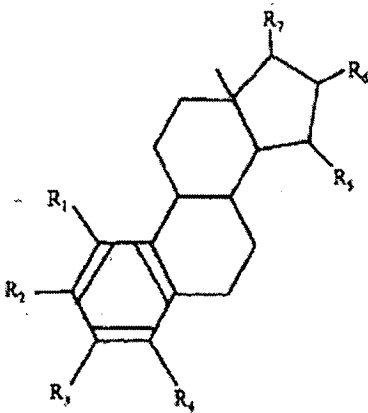
**[0008]** Therapeutisch äquivalente Dosen allgemein bekannter biogener Östrogene, werden sie oral verabreicht, führen zu einer klaren Reaktion hepatischer Parameter wie beispielsweise einer Erhöhung von SHBG, CBG, Angiotensinogen und HDL (Lipoprotein hoher Dichte).

**[0009]** Aus diesem Grund besteht ein Bedarf für östrogene Substanzen, die:

- (a) bei einem Verfahren zum Behandeln von vom Immunsystem vermittelten Krankheiten wirksamer sind, wie beispielsweise die oben erwähnten biogenen Östrogene und/oder
- (b) bedeutend längere Halbwertszeiten aufweisen als die oben erwähnten biogenen Östrogene und/oder
- (c) oral verabreichbar sind, ohne wesentliche hepatische Auswirkungen zu verursachen und/oder
- (d) weniger unerwünschte Nebenwirkungen herbeiführen als die oben erwähnten biogenen Östrogene.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0010]** Die Erfinder haben erstaunlicherweise entdeckt, dass diese Erfordernisse durch östrogene Substanzen erfüllt werden, die durch die folgende Formel dargestellt sind:



in welchen Formel  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  unabhängig ein Wasserstoffatom, eine Hydroxylgruppe oder eine Alkoxygruppe mit 1–5 Kohlenstoffatomen sind; jedes von  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  eine Hydroxylgruppe ist; und nicht mehr als 3 von  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  Wasserstoffatome sind; wobei die Substanzen eine  $8\beta$ -,  $9\alpha$ -,  $10\alpha$ -H-,  $13\beta$ -,  $14\alpha$ -Konfiguration aufweisen.

**[0011]** Ein bekannter Repräsentant dieser Gruppe östrogenen Substanzen ist 1,3,5(10)-Östratrien-3,15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol, das auch unter den Namen Östetrol, Östetrol und 15 $\alpha$ -Hydroxyöstriol bekannt ist. Östetrol ist ein Östrogen, das durch die fetale Leber während der menschlichen Schwangerschaft gebildet wird. Die Spiegel von unkonjugiertem Östetrol im mütterlichen Plasma erreichen bei etwa 1,2 ng/ml am Ende der Schwangerschaft ihren Höhepunkt und sind ungefähr 12mal höher im fetalen als im mütterlichen Plasma (Tulichinsky et al., 1975, J. Clin. Endocrinol. Metab., 40, 560–567).

**[0012]** Im Jahre 1970 berichteten Fishman et al. in „Fate of 15 $\alpha$ hydroxyestriol- $^3$ H in Adult Man (Das Schicksal von 15 $\alpha$ -Hydroxyöstriol- $^3$ H im erwachsenen Mann), J Clin Endocrinol Metab (1970) 31, 436–438, von den Ergebnissen einer Studie, bei der mit Tritium gelabeltes 15 $\alpha$ -Hydroxyöstriol (Östetrol) zwei erwachsenen Frauen intravenös verabreicht wurde. Es erwies sich, dass das Östetrol schnell und vollständig als Glucosiduronat im Urin ausgeschieden wurde und das praktisch kaum ein Stoffwechsel mit Ausnahme der Konjugation stattfand.

**[0013]** Zwischen 1975 und 1985 untersuchten mehrere Forscher die Eigenschaften von Östetrol und berichteten über seine östrogene Potenz und uterotrope Aktivität. Die relevantesten Veröffentlichungen, die während dieser Zeit herausgegeben wurden, sind wie folgt aufgeführt:

- Levine et al., 1984. Uterine vascular effects of Östetrol in nonpregnant ewes (Vaskuläre Auswirkungen von Östetrol in der Gebärmutter in nicht-trächtigen Schafen). *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 148:73, 735–738: „Wenn intravenös nicht trächtigen Schafen verabreicht, ist Östetrol 15 bis 30mal weniger potent als Östriol und 17 $\beta$ -Östradiol bezüglich der Gebärmuttervasodilatation“;
- Jozan et al., 1981. Different effects of oestradiol, oestriol, oestetrol and of oestrone on human breast cancer cells (MCF-7) in long term tissue culture (Verschiedene Auswirkungen von Östradiol, Östriol, Östetrol und von Östron auf menschliche Brustkrebszellen (MCF-7) bei der Langzeitgewebekultur). *Acta Endocrinologica*, 98, 73–80: „Die agonistische Potenz von Östetrol beträgt 2 % der Stärke, die bei 17 $\beta$ -Östradiol bei der in vitro Zellproliferation beobachtet worden ist“;
- Holinka et al., 1980. Comparison of effects of estetrol and tamoxifen with those of estriol and estradiol on the immature rat uterus (Vergleich der Auswirkungen von Östetrol und Tamoxifen mit denjenigen von Östriol und Östradiol in der Gebärmutter nicht erwachsener Ratten). *Biol. Reprod.* 22, 913–926: „Subkutan verabreichtes Östetrol hatte eine sehr schwache uterotrope Aktivität und ist wesentlich weniger potent als 17 $\beta$ -Östradiol und Östriol“;
- Holinka et al., 1979. In vivo effects of estetrol on the immature rat uterus (In vivo Auswirkungen von Östetrol auf die Gebärmutter nicht erwachsener Ratten). *Biol. Reprod.* 20, 242–246: „Subkutan verabreichtes Östetrol hatte eine sehr schwache uterotrope Aktivität und ist wesentlich weniger potent als 17 $\beta$ -Östradiol und Östriol“;
- Tseng et al., 1978. Heterogeneity of saturable estradiol binding sites in nuclei of human endometrium (Heterogenität sättigbarer Östradiolbindungsstellen in den Kernen des menschlichen Endometriums). *Estetrol studies. J. Steroid Biochem.* 9, 1145–1148: „Das relative Binden von Östetrol an Östrogenrezeptoren im menschlichen Endometrium beträgt 1,5 % von 17 $\beta$ -Östradiol“.
- Martucci et al., 1977. Direction of estradiol metabolism as a control of its hormonal action – uterotrophic activity of estradiol metabolites (Die Ausrichtung des Östradiolmetabolismus als Regler seiner Hormonwirkung – uterotrope Aktivität von Östradiolmetaboliten). *Endocrin.* 101, 1709–1715: „Die kontinuierliche Verabreichung von Östetrol aus einer subkutanen Ablagerung weist eine sehr schwache uterotrope Aktivität auf und ist wesentlich weniger potent als 17 $\beta$ -Östradiol und Östriol“.
- Tseng et al., 1976. Competition of estetrol and ethynylestradiol with estradiol for nuclear binding in human endometrium (Wettbewerb zwischen Östetrol und Ethynylöstradiol mit Östradiol bezüglich der Kernbindung im menschlichen Endometrium). *J. Steroid Biochem.* 7, 817–822: „Die relative Bindungskonstante des Bindens von Östetrol an den Östrogenrezeptor im menschlichen Endometrium beträgt 6,25 % im Vergleich mit 17 $\beta$ -Östradiol (100 %)“.
- Martucci et al., 1976. Uterine estrogen receptor binding of catecholöstrogens and of estetrol (1,3,5(10)-Östratriene-3,15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol) (Östrogenrezeptorbindung von Catecholöstrogenen und Östetrol (1,3,5(10)-Östratrien-3,15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol) in der Gebärmutter). *Steroids*, 27, 325–333: „Die relative Bindungsaffinität von Östetrol zum Cytosolöstrogenrezeptor in der Gebärmutter von Ratten beträgt 0,5 % von 17 $\beta$ -Östradiol (100 %). Des Weiteren beträgt die relative Bindungsaffinität von Östetrol zum Kernöstrogenrezeptor in der Gebärmutter von Ratten 0,3 % von 17 $\beta$ -Östradiol (100 %)“.

**[0014]** Allen obigen Veröffentlichungen ist gemeinsam, dass die Verfasser die östrogene Potenz von Östetrol untersucht haben. Ohne Ausnahme kamen sie alle zum Schluss, dass Östetrol ein schwaches Östrogen ist. In einigen der angeführten Artikel hat sich die östrogene Potenz von Östetrol als viel geringer erwiesen als diejenige des weltweit verbreitet verwendeten und relativ schwachen Östrogens 17 $\beta$ -Östradiol. Angesichts dieser Ergebnisse ist es nicht erstaunlich, dass das Interesse an Östetrol seit den frühen Achtzigerjahren abgenommen hat und dass keine Veröffentlichungen über die Eigenschaften von Östetrol seither erschienen sind.

**[0015]** Erstaunlicherweise haben die Erfinder entdeckt, dass trotz seiner geringen Potenz Östetrol sowie die damit verbundenen östrogenen Substanzen vorteilhaft bei einem Verfahren zum Behandeln immunvermittelten krankhaften Störungen verwendet werden kann/können. Obwohl die Erfinder nicht durch die Theorie beschränkt sein möchten, glaubt man, dass die unerwartete Wirksamkeit der vorliegenden östetrolähnlichen Substanzen aus der Kombination der unerwarteten vorteilhaften pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften dieser Substanzen sowie ihrer relativ hohen Affinität für den Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) im Vergleich mit dem Östrogenrezeptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) herrührt. Letztere charakteristische Eigenschaft ist ein einzigartiges Merkmal der östrogenen Substanzen, die bei dem vorliegenden Verfahren verwendet werden.

**[0016]** Mit Bezug auf die pharmakokinetischen Eigenschaften der vorliegenden östrogenen Substanzen haben die Erfinder entdeckt, dass ihre in vivo Halbwertszeit beträchtlich länger ist als diejenige anderer biogener

Östrogene. So können Östetrol und östetrolähnliche Substanzen, obwohl sie eine relativ geringe östrogene Potenz aufweisen, wirksam bei einem Verfahren zum Behandeln immunvermittelter krankhafter Störungen verwendet werden, weil ihre geringe Potenz durch eine relativ hohe Stoffwechselstabilität ausgeglichen wird, wie durch eine lange Halbwertszeit bewiesen wird.

**[0017]** Die relativ hohe Affinität der vorliegenden östrogenen Substanzen für den ER $\alpha$ -Rezeptor oder umgekehrt, die relativ geringe Affinität für den ER $\beta$ -Rezeptor, wird als irgendwie mit der hohen Wirksamkeit der vorliegenden Substanzen bei der Behandlung von immunvermittelten krankhaften Störungen in Verbindung gebracht. Jedoch ist, wie weiter unten offensichtlich werden wird, das Verständnis der Mechanismen, die die ER-Signalwege regulieren, die für diese Wirksamkeit verantwortlich sind, noch gering trotz der beträchtlichen wissenschaftlichen Bemühungen, die in diesem Bereich erfolgen.

**[0018]** Es ist bekannt, dass die meisten Östrogene an beide ER binden, die in Gegenwart gewebespezifischer Coaktivatoren und/oder Corepressoren an ein Östrogenreaktionselement in der Regulationsregion von Genen oder anderen Transkriptionsfaktoren binden. Angesichts der Komplexität der ER-Signalisierung in Verbindung mit der gewebespezifischen Expression von ER $\alpha$  und ER $\beta$  und deren Cofaktoren wird nun anerkannt, dass ER-Liganden als Östrogenagonisten oder sogar als Östrogenantagonisten auf gewebespezifische Art und Weise wirken können.

**[0019]** Es ist auch bekannt, dass die ER $\alpha$ - und ER $\beta$ -Rezeptoren signifikant unterschiedliche Aminosäuresequenzen in der Ligandenbindungsdomäne und carboxyterminierenden Transaktivationsdomänen (etwa 56 % Aminosäureidentität) und nur 20 Homologie in ihrer aminoterminalen Transaktivationsdomäne aufweisen. Das erklärt, warum manche Liganden eine höhere Affinität zu einem Rezeptor im Vergleich mit dem anderen aufweisen. Außerdem kann die Wechselwirkung mit Cofaktoren zu sehr verschiedenen biologischen Wirkungen eines einzigen Liganden führen. Anders ausgedrückt ist ein Ligand, der auf ER $\alpha$  als Agonist wirkt, nicht unbedingt auch ein Agonist für ER $\beta$  und umgekehrt.

**[0020]** Des Weiteren ist nun bekannt, dass Östrogen die Zellpharmakologie durch Genexpression moduliert, und dass die Östrogenwirkung durch die Östrogenrezeptoren vermittelt wird. Die Wirkung des Östrogenrezeptors auf die Genregulierung kann durch ein direktes Binden von ER an das Östrogenreaktionselement, Binden von ER an andere Transkriptionsfaktoren wie NF-kB, C/EBP $\beta$  und durch nicht genomische Wirkungen, die Ionenkanalrezeptoren involvieren, vermittelt werden. Der Fortschritt im Laufe der letzten paar Jahre hat gezeigt, dass ER sich mit Coaktivatoren (z.B. SRC-1, CBP und SRA) und Corepressoren (z.B. SMRT und N-CoR) assoziiert, die ebenfalls die Transkriptionsaktivität von ER auf gewebespezifische und ligandenspezifische Weise modulieren. Außerdem liegen nun Anhaltspunkte vor, dass die Mehrzahl östrogenregulierter Gene kein klassisches Östrogenreaktionselement aufweisen. In derartigen Fällen tritt ER in Wechselwirkung mit den Transkriptionsfaktoren, die für das Regulieren dieser Gene kritisch sind. Die Transkriptionsfaktoren, von denen bekannt ist, dass sie bezüglich ihrer Aktivität durch ER moduliert werden, umfassen beispielsweise AP-1, NF-kB, C/EBP und Sp-1.

**[0021]** Angesichts der Komplexität der ER-Signalisierung sowie der verschiedenen Typen von Gewebe, die ER und seine Cofaktoren exprimieren, glaubt man im Allgemeinen, dass ER-Liganden nicht mehr einfach als entweder reine Antagonisten oder Agonisten klassifiziert werden können. Diese Ansicht wird durch die Ergebnisse von Paech et al. (Science 277, 1508–1510, 1997) unterstützt, die berichtet haben, dass 17 $\beta$ -Östradiol eine AP-1-Stelle in Gegenwart von ER $\alpha$  aktiviert, jedoch die gleiche Stelle in Gegenwart von ER $\beta$  inhibiert. Im Gegensatz dazu stimulieren die ER-Liganden Raloxifen (Eli Lilly & Co.) und Tamoxifen und ICI-182,780 (Zeneca Pharmaceuticals) die AP-1-Stelle durch ER $\beta$ , inhibieren diese Stelle jedoch in Gegenwart von ER $\alpha$ .

**[0022]** Von ER $\alpha$  und ER $\beta$  ist bekannt, dass sie überlappende und verschiedene Gewebeverteilungen aufweisen, wie hauptsächlich durch RT-PCR oder in-situ Hybridisierung analysiert. Sehr oft exprimieren Gewebe sowohl ER $\alpha$  als auch ER $\beta$ , die Rezeptoren befinden sich jedoch in verschiedenen Zelltypen. Außerdem enthalten einige Gewebe (wie beispielsweise die Niere) ausschließlich ER $\alpha$ , während andere Gewebe (wie die Gebärmutter, Hirnanhangdrüse und Epididymis) ein stärkeres Vorherrschen von ER $\alpha$  (Couse et al., Endocrinology 138, 4613–4621, 1997; Kuiper et al., Endocrinology 138, 863–870, 1997) aufweisen. Die Entwicklung von ER $\alpha$  (Korach, Science 266, 1524–1527, 1994) und ER $\beta$ - (Krege et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 15677–82, 1998) Knock-out-Mäusen hat weitere Beweise erbracht, dass jeder der ER in verschiedenen Geweben verschiedene Funktionen ausübt.

**[0023]** Zusammenfassend ist es offensichtlich, dass diese Substanzen, obwohl die Mechanismen, durch welche die vorliegenden östrogenen Substanzen ihre vorteilhafte Wirkung ausüben, noch nicht bekannt sind, sie

von anderen biogenen Östrogenen in mindestens zwei relevanten Hinsichten verschieden sind. Erstens weisen die vorliegenden östrogenen Substanzen eine erstaunlich lange in vivo Halbwertszeit auf. Zweitens ist die Affinität dieser Substanzen für den ER $\alpha$ -Rezeptor im Vergleich mit dem ER $\beta$ -Rezeptor viel höher als für andere (biogene) Östrogene beobachtet worden ist.

**[0024]** Ein anderer Vorteil der vorliegenden östrogenen Substanzen liegt in der Tatsache, dass das Geschlechtshormon bindende Globulin (SHBG) diese östrogenen Substanzen kaum bindet, was bedeutet, dass im Gegensatz zu den meisten bekannten Östrogenen die Serumspiegel für die Bioaktivität repräsentativ und von den SHBG-Spiegeln unabhängig sind.

**[0025]** Noch ein anderer wichtiger Vorteil der vorliegenden östrogenen Substanzen leitet sich aus ihrer relativen Unempfindlichkeit gegen Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln (Wechselwirkungen zwischen Arzneimitteln) ab. Es ist allgemein bekannt, dass gewisse Arzneimittel die Wirksamkeit von Östrogenen wie beispielsweise Ethinylöstradiol reduzieren und andere Arzneimittel ihre Aktivität erhöhen können, was zu möglichen erhöhten Nebenwirkungen führt. Auf die gleiche Weise können Östrogene den Metabolismus anderer Arzneimittel stören. Im Allgemeinen ist die Wirkung anderer Arzneimittel auf Östrogene der Störung der Absorption, des Stoffwechsels oder der Ausscheidung dieser Östrogene zuzuschreiben, während die Wirkung von Östrogenen auf andere Arzneimittel der Konkurrenz bezüglich Stoffwechselfpfaden zuzuschreiben ist.

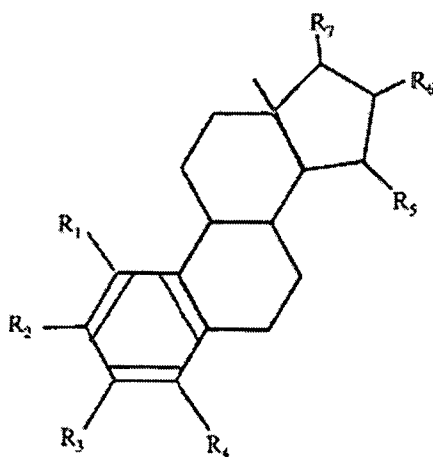
**[0026]** Die klinisch signifikanteste Gruppe von Wechselwirkungen zwischen Östrogenen und Arzneimitteln erfolgt bei Arzneimitteln, die hepatische mikrosomale Enzyme induzieren können, die die Östrogenplasmaspiegel unter das therapeutische Niveau senken können (beispielsweise Antikonvulsiva, Phenytoin, Primidon, Barbiturate, Carbamazepin, Ethosuximid und Methosuximid; antituberkulöse Arzneimittel wie beispielsweise Rifampin; antifungale Arzneimittel wie Griseofulvin). Die vorliegenden östrogenen Substanzen sind weniger von der Auf- und Abregulierung mikrosomaler Leberenzyme (z.B. P450) abhängig und auch weniger empfindlich gegen Konkurrenz mit anderen P450-Substraten. Gleicherweise stören sie den Metabolismus anderer Arzneimittel nicht signifikant.

**[0027]** Die Konjugate der meisten Östrogene, wie sie in der Leber gebildet werden, werden in der Galle ausgeschieden und können durch Darmbakterien im Dickdarm unter Freisetzung aktiver Hormone abgebaut werden, die dann wieder absorbiert werden (enterohepatischer Kreislauf). Es gibt klinische Berichte, die die Ansicht verstärken, dass der enterohepatische Kreislauf von Östrogenen bei Frauen abnimmt, die Antibiotika wie Ampicillin, Tetracyclin usw. einnehmen. Konjugierte Formen der vorliegenden östrogenen Substanzen werden in der Galle kaum ausgeschieden, was bedeutet, dass sie im Wesentlichen gegen Arzneimittel unempfindlich sind, die den enterohepatischen Kreislauf anderer Östrogene beeinflussen.

**[0028]** Die obigen Beobachtungen dienen dazu, zu erklären, warum die erfindungsgemäßen östrogenen Substanzen kaum negativ von Wechselwirkungen zwischen Arzneimitteln betroffen sind und deshalb eine sehr konsistente, d.h. voraussagbare Auswirkung hervorrufen.

#### GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0029]** Eine Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung oder Prävention einer immunvermittelten krankhaften Störung bei einem Säuger, wobei das Verfahren das Verabreichen dem Säuger einer therapeutisch wirksamen Menge einer östrogenen Komponente umfasst, wobei die östrogene Komponente aus der Gruppe ausgewählt wird bestehend aus:  
Substanzen, die durch die folgende Formel dargestellt sind:



in welcher Formel  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  unabhängig ein Wasserstoffatom, eine Hydroxylgruppe oder eine Alkoxygruppe mit 1–5 Kohlenstoffatomen sind, wobei die Substanzen eine  $8\beta$ -,  $9\alpha$ -,  $10\alpha$ -H-,  $13\beta$ -,  $14\alpha$ -Konfiguration aufweisen; jedes von  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  eine Hydroxylgruppe ist; nicht mehr als 3 von  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  Wasserstoffatome; Vorläufer, die in der Lage sind, eine Substanz der oben erwähnten Formel gemäß freizusetzen, wenn sie bei dem vorliegenden Verfahren verwendet wird, und Mischungen einer oder mehrerer der oben erwähnten Substanzen und/oder Vorläufer sind.

**[0030]** Die vorliegenden Östrogensubstanzen sind von den biogenen und synthetischen Östrogenen dahingehend verschieden, dass sie allgemein in pharmazeutischen Formulierungen angewendet werden, indem sie mindestens 4 Hydroxylgruppen enthalten. Die vorliegenden Substanzen sind insbesondere deshalb besonders, weil der 5-gliedrige Ring im Steroidskelett 3 Hydroxylsubstituenten anstatt 0–2 enthält. Beispiele im Handel erhältlicher Östrogene, die mindestens 4 Hydroxylgruppen enthalten, und ihre Vorläufer, sind:

1,3,5(10)-Östratrien-2,3, 15 $\alpha$ , 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ -pentol-2-methylether

1,3,5(10)-Östratrien-2,3, 15 $\beta$ , 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ -Pentol-2-Methylether

1,3,5(10)-Östratrien-2,3, 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ -tetrol

1,3,5(10)-Östratrien-2,3, 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ -tetrol-4-methylether

1,3,5(10)-Östratrien-2,3, 15 $\alpha$ , 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ -tetrol

1,3,5(10)-Östratrien-2,3, 15 $\alpha$ , 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ -tetroltetraacetat

1,3,5(10)-Östratrien-2,3, 15 $\beta$ , 16 $\beta$ , 17 $\beta$ -tetroltetraacetat

**[0031]** Bevorzugt ist die östrogene Komponente, die bei der vorliegenden Zusammensetzung als aktive Komponente angewendet wird, ein sogenanntes biogenes Östrogen, d.h. ein Östrogen, dass auf natürliche Weise im menschlichen Körper vorkommt, ein Vorläufer eines biogenen Östrogens oder eine Mischung derselben. Weil biogene Östrogene auf natürliche Weise im fetalen und weiblichen Körper vorkommen, sind Nebenwirkungen nicht zu erwarten, insbesondere dann nicht, wenn die Serumspiegel, die durch die exogene Verabreichung derartiger Östrogene hervorgerufen werden, die natürlich vorkommenden Konzentrationen nicht wesentlich übersteigen. Natürlich vorkommende östrogene Komponenten weisen typischerweise eine  $8\beta$ -,  $9\alpha$ -,  $13\beta$ -,  $14\alpha$ -Konfiguration des Steroidskeletts auf.

**[0032]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung enthält die östrogene Substanz 4 Hydroxylgruppen. Auch stellt in der oben erwähnten Formel  $R_1$  bevorzugt ein Wasserstoffatom dar. In der Formel stellen bevorzugt mindestens 2, noch bevorzugter mindestens 3 der Gruppen  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  und  $R_9$  ein Wasserstoffatom dar.

**[0033]** Die östrogenen, der Formel entsprechenden Substanzen umfassen verschiedene Enantiomere, da die Kohlenstoffatome, die die Hydroxylsubstituenten  $R_5$ ,  $R_6$  und  $R_7$  tragen, chiral aktiv sind. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist die vorliegende östrogene Substanz durch 15 $\alpha$ -Hydroxy substituiert. Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist die Substanz durch 16 $\alpha$ -Hydroxy substituiert. Bei noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist die Substanz durch 17 $\beta$ -Hydroxy substituiert. Am bevorzugtesten sind die östrogenen Substanzen durch 15 $\alpha$ , 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ -Trihydroxy substituiert.

**[0034]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt  $R_3$  eine Hydroxylgruppe oder eine Alkoxygruppe dar. Bei einer anderen Ausführungsform stellen die Gruppen  $R_1$ ,  $R_2$  und  $R_4$  Wasserstoffatome dar, in welchem Fall die Substanz, wenn  $R_3$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  und  $R_7$ , Hydroxylgruppen sind, 1,3,5(10)-Östratrien-3,15,16,17-tetrol ist. Ein bevorzugtes Isomer letzterer Substanz ist 1,3,5(10)-Östratrien-3,15 $\alpha$ , 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ -tet-

rol (Östetrol).

**[0035]** Die Erfindung umfasst auch die Verwendung von Vorläufern der Östrogensubstanzen, die die aktive Komponente bei dem vorliegenden Verfahren darstellen. Diese Vorläufer sind in der Lage, wenn sie bei dem vorliegenden Verfahren verwendet werden, die oben erwähnten Östrogensubstanzen z.B. durch Stoffwechsellumwandlung, freizusetzen und werden aus der Gruppe von Derivaten der vorliegenden Östrogensubstanzen ausgewählt, wobei das Wasserstoffatom von mindestens einer der Hydroxylgruppen durch ein Acylradikal einer Kohlenwasserstoffcarbon-, -sulfonsäure oder -sulfaminsäure mit 1–25 Kohlenstoffatomen; Tetrahydrofuran-yl; Tetrahydropyran-yl; oder einem geradkettigen oder verzweigt-kettigen glycosydischen Rest, der 1–20 glycosydische Einheiten pro Rest enthält, substituiert ist ausgewählt. Typische Beispiele von Vorläufern, die geeigneterweise erfindungsgemäß verwendet werden können, sind Ester, die durch Reagieren der Hydroxylgruppen der Östrogensubstanzen mit Substanzen erhalten werden können, die eine oder mehrere Carboxy-(M<sup>+</sup> OOC-)Gruppen enthalten, wobei M<sup>+</sup> ein Wasserstoff- oder (Alkali-) Metallkation darstellt. Daher sind bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform die Vorläufer Derivate von Östrogensubstanzen, wobei das Wasserstoffatom mindestens einer der Hydroxylgruppen in der Formel durch -CO-R substituiert worden ist, wobei R ein Kohlenwasserstoffradikal ist, das 1–25 Kohlenstoffatome umfasst. Bevorzugt ist R Wasserstoff oder ein Alkyl-, Alkenyl- oder Arylradikal, das 1–20 Kohlenstoffatome umfasst.

**[0036]** Das vorliegende Verfahren ist besonders effektiv, wenn es bei der Behandlung oder Prävention chronischer immunvermittelter krankhafter Störungen verwendet wird. Aus diesem Grund umfasst das Verfahren in einer bevorzugten Ausführungsform die ununterbrochene Verabreichung der östrogenen Komponente während einer Zeitspanne von mindestens 5 Tagen, bevorzugt mindestens 30 Tagen.

**[0037]** Bei der vorliegenden Erfindung kann geeigneterweise eine enterale oder parenterale Verabreichung der östrogenen Komponente angewendet werden. Der Begriff „parenterale Verabreichung“, wie er hier verwendet wird, umfasst die transdermale, intravenöse, intranasale, intravaginale, pulmonale, bukkale, subkutane, intramuskuläre oder intrauterine Verabreichung. Der Begriff „enterale Verabreichung“ umfasst die orale sowie die rektale Verabreichung.

**[0038]** Bevorzugt wird der Verabreichungsmodus aus der Gruppe ausgewählt bestehend aus oraler, transdermaler, intravenöser, intranasaler, intravaginale, pulmonarer, rektaler, bukkaler, subkutaner, intramuskuläre oder intrauteriner Verabreichung. Noch bevorzugter wird der Verabreichungsmodus aus der Gruppe ausgewählt bestehend aus oraler, transdermaler, intravenöser, subkutaner, intranasaler, pulmonarer und vaginaler Verabreichung. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird bei dem vorliegenden Verfahren eine orale, transdermale, intranasale oder subkutane Verabreichung angewendet. Selbst noch bevorzugter wird bei dem vorliegenden Verfahren eine orale oder subkutane Verabreichung angewendet.

**[0039]** Die orale, intravenöse, subkutane, intramuskuläre, intranasale, rektale, bukkale und pulmonare Verabreichungen sind ideal für die (mindestens) einmal tägliche Verabreichung geeignet. Die transdermale Verabreichung wird vorteilhafterweise mit Häufigkeiten zwischen einmal am Tag und einmal pro Monat angewendet. Die intravaginalen und intrauterinen Verabreichungen werden vorteilhafterweise mit Verabreichungshäufigkeiten zwischen einmal wöchentlich und einmal pro Monat durchgeführt. Die subkutane und intramuskuläre Verabreichung kann auch geeigneterweise in Form von Depotinjektionen in Abständen von 1 Woche bis 6 Monaten, bevorzugt in Abständen von 4 Wochen bis 3 Monaten durchgeführt werden.

**[0040]** Aus Bequemlichkeitsgründen werden bei dem vorliegenden Verfahren Verabreichungsabstände von 1 Tag, 1 Woche oder 1 Monat angewendet. Behandlungsweisen, wobei eine einmal tägliche orale, subkutane, intravenöse oder intranasale Verabreichung, einmal wöchentliche transdermale oder einmal monatliche intravaginale oder subkutane Verabreichung angewendet wird, sind besonders bevorzugt.

**[0041]** Gleichgültig, welcher Verabreichungsmodus angewendet wird, wird die östrogene Komponente bevorzugt in einer Menge verabreicht, die wirksam ist, um eine Blutserumkonzentration von mindestens 5 Nanogramm pro Liter, noch bevorzugter mindestens 50 Nanogramm pro Liter, am bevorzugtesten mindestens 500 Nanogramm pro Liter zu erreichen. Im Allgemeinen übersteigt die dabei erhaltene Blutserumkonzentration der östrogenen Komponente 200 µg pro Liter nicht, bevorzugt übersteigt sie 10 µg pro Liter nicht, noch bevorzugter übersteigt sie 50 µg pro Liter nicht.

**[0042]** Dem vorliegenden Verfahren gemäß wird die östrogene Komponente gewöhnlich in einer Menge von weniger als 2 mg pro kg Körpergewicht pro Tag, bevorzugt weniger als 0,8 mg pro kg Körpergewicht pro Tag verabreicht. Um eine signifikante Auswirkung aus der Verabreichung der östrogenen Komponente zu errei-



chen, ist es ratsam, eine Menge von mindestens 5 µg pro kg Körpergewicht pro Tag zu verabreichen. Bevorzugt beträgt die verabreichte Menge mindestens 25 µg pro kg Körpergewicht pro Tag.

**[0043]** Die orale Verabreichung der aktiven Komponente erfolgt bevorzugt in einer Menge von weniger als 800 µg pro kg Körpergewicht pro Tag, bevorzugt von weniger als 400 µg pro kg Körpergewicht pro Tag. Um eine signifikante Auswirkung der Verabreichung der aktiven Komponente zu erreichen, ist es ratsam, die Verabreichung oral in einer Menge von mindestens 10 µg pro kg Körpergewicht pro Tag durchzuführen. Bevorzugt beträgt die oral verabreichte Menge mindestens 25 µg pro kg Körpergewicht pro Tag. Bei dem vorliegenden Verfahren wird die östrogene Komponente besonders dann, wenn sie bei Menschen verwendet wird, gewöhnlich in einer Durchschnittsdosis von mindestens 0,25 mg pro Tag, bevorzugt von mindestens 0,5 mg pro Tag verabreicht. Die maximale Dosis wird normalerweise unter 80 mg pro Tag, bevorzugt unter 40 mg pro Tag gehalten.

**[0044]** Das vorliegende Behandlungsverfahren umfasst bevorzugt das Verabreichen einer Person, die eine derartige Therapie benötigt, einer wirksamen Menge der östrogenen Komponente. Die Mengen, die erforderlich sind, um wirksam zu sein, werden von einem Individuum zu einem anderen verschieden sein und durch Faktoren wie das Niveau des Östrogenmangels des Individuums, dem Körpergewicht, dem Verabreichungsweg und der Wirksamkeit der spezifischen verwendeten östrogenen Substanz bestimmt.

**[0045]** Bei dem vorliegenden Verfahren wird die östrogene Komponente insbesondere dann, wenn sie bei Menschen angewendet wird, gewöhnlich oral in Durchschnittsdosen zwischen 0,05 und 40 mg pro Tag, bevorzugt zwischen 0,25 und 20 mg pro Tag verabreicht. Desgleichen beträgt die parenterale Dosis bevorzugt mindestens 0,25, bevorzugt mindestens 0,5 mg pro Tag. Die durchschnittliche maximale parenterale Dosis wird normalerweise unter 80 mg pro Tag, bevorzugt unter 40 mg pro Tag gehalten.

**[0046]** Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird bei dem Verfahren die orale Verabreichung der aktiven östrogenen Komponente angewendet. Der Begriff orale Verabreichung, wie er hier verwendet wird, umfasst auch die orale Sondenverabreichung. Erstaunlicherweise haben die Erfinder festgestellt, dass Östetrol und damit verwandte östrogene Substanzen trotz ihrer geringen Potenz vorteilhafterweise oral verabreicht werden können. Obwohl die Erfinder nicht durch die Theorie gebunden sein möchten, glaubt man, dass die unerwartete Wirksamkeit oral verabreichter östetrolähnlicher Substanzen aus der Kombination spezieller pharmakokinetischer (ADME) und pharmakodynamischer Eigenschaften dieser Substanzen herührt.

**[0047]** Die Erfinder haben entdeckt, dass die orale Bioverfügbarkeit östetrolähnlicher Substanzen erstaunlich hoch ist und dass ihre in vivo Halbwertszeit beträchtlich länger ist als diejenige allgemein verwendeter biogener Östrogene. So können Östetrol und östetrolähnliche Substanzen, obwohl sie eine relativ niedrige östrogene Potenz aufweisen, wirksam oral verabreicht werden.

**[0048]** Ein weiterer wichtiger Vorteil der oralen Verabreichung von Östetrol und östetrolähnlichen Substanzen liegt in der Tatsache, dass die hepatischen Auswirkungen dieser Substanzen als minimal betrachtet werden, da sie während dem sogenannten „ersten Durchgang“ kaum metabolisiert werden. Der Effekt des ersten Durchgangs von Arzneimitteln, die oral verabreicht werden, bezieht sich auf den Vorgang des Arzneimittelabbaus durch die Leber während des Übergangs des Arzneimittels von der anfänglichen Einnahme bis zur Zirkulation im Blutstrom. Nach der Resorption aus dem Darmlumen gehen oral angewendete aktive Bestandteile über die Leber in den Organismus. Diese Tatsache ist von spezifischer Wichtigkeit für östrogene Mittel, da die Leber das Zielorgan für Östrogene ist; die orale Einnahme von Östrogenen führt zu starken östrogenen Wirkungen in der Leber.

**[0049]** Therapeutisch äquivalente Dosen allgemein verwendeter biogener Östrogene, werden sie oral angewendet, führen zu einer deutlichen Reaktion hepatischer Parameter wie beispielsweise einer Erhöhung von SHBG, CBG, Angiotensinogen und HDL (Lipoprotein hoher Dichte).

**[0050]** Das vorliegende Verfahren kann vorteilhafterweise bei der (vorbeugenden) Behandlung einer umfangreichen Reihe verschiedener immunvermittelter krankhafter Störungen verwendet werden. Der Begriff „immunvermittelte krankhafte Störung“, wie er hier verwendet wird, betrifft eine unerwünschte Immunreaktion oder Pathologie, die vollständig oder teilweise durch eine Zelle des Lymphsystems (einschließlich T-Lymphozyten, B-Lymphozyten) oder Knochenmarksystems (einschließlich Granulozyten, Makrophagen und Monozyten) vermittelt wird und die für den Säuger, in dem sie erfolgt, schädlich ist. Derartige unerwünschte Immunreaktionen oder Pathologien können durch T-Lymphozyten vermittelt werden oder sind multifaktorielle, z.B. chronische In-

flammationskrankheiten einschließlich Autoimmunkrankheiten, Immunpathologien, die durch infektiöse Agenten induziert werden, Immunreaktionen durch oder gegen Allotransplantate, atopische Reaktionen, allergische Reaktionen und immunproliferative Störungen.

**[0051]** Das vorliegende Verfahren ist für die Behandlung von durch T-Lymphozyten vermittelten und/oder chronischen Inflammationskrankheiten besonders geeignet, einschließlich, jedoch nicht darauf beschränkt, Autoimmunkrankheiten wie Multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Osteoarthritis, insulinabhängige Diabetes (Typ-1-Diabetes), systemischer Lupus Erythematosus und Schuppenflechte, Immunpathologien, die durch infektiöse Agenten wie Helminthin induziert werden (z.B. Leishmaniose) und gewisse Virusinfektionen, einschließlich HIV und bakterielle Infektionen, einschließlich Lyme-Krankheit, Tuberkulose und lepromatöse Lepra, Transplantatabstoßung, Transplantat-Wirt-Reaktion und atopische Zustände wie Asthma und Allergie, einschließlich allergischer Rhinitis, gastrointestinaler Allergien, einschließlich Nahrungsmittelallergien, Eosinophilie, Bindehautentzündung und Glomerulonephritis.

**[0052]** Viele immunvermittelte krankhafte Störungen sind multifaktorielle, durch die Aktivierung multipler Typen von Entzündungszellen charakterisiert, insbesondere Zellen des Lymphsystems (einschließlich Th1-Lymphozyten, Th2-Lymphozyten, B-Lymphozyten) und des Knochenmarksystems (einschließlich Granulozyten, Makrophagen und Monozyten). (Pro)entzündliche Vermittler, einschließlich Zytokine, wie Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin-1 (IL-1) werden durch diese aktivierten Zellen gebildet und Antikörper- und komplementäre Reaktionen sind häufig. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das vorliegende Verfahren zum Behandeln durch Th1 vermittelter immunvermittelter krankhafter Störungen („Th1-vermittelter krankhafter Störungen“) verwendet. Th1-vermittelte krankhafte Störungen sind Pathologien, bei denen die negative Immunantwort hauptsächlich oder teilweise eine Immunantwort vom T-Helfer 1-(Th1-) Typ ist. Die Th1-Immunantwort ist durch das Abscheiden von (pro)entzündlichen Zytokinen wie IL-12, INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  gekennzeichnet. Th1-vermittelte krankhafte Störungen umfassen die meisten Autoimmunkrankheiten, viele alloimmunvermittelte krankhafte Störungen, gewisse allergische Reaktionen, gewisse chronische Entzündungszustände und gewisse Immunpathologien, die durch infektiöse Agenten induziert werden. Eine immunvermittelte krankhafte Störungen kann alternativ durch eine Th2-Immunantwort vermittelt werden. Im Gegensatz zu einer Th1-vermittelten Reaktion ist eine Th2-vermittelte Reaktion durch Abscheiden antientzündlicher Zytokine wie IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- $\beta$  gekennzeichnet.

**[0053]** Das vorliegende Verfahren ist besonders geeignet für die Behandlung oder Prävention von immunvermittelten krankhaften Störungen, die aus der Gruppe ausgewählt sind bestehend aus Autoimmunpathologien und chronischen Entzündungsreaktionen. Beispiele von Autoimmunpathologien, die auf wirksame Weise behandelt werden können, umfassen Multiple Sklerose (Nervenzellen), rheumatoide Arthritis (Knorpelgewebe, Gelenkumkleidung), Osteoarthritis (Knorpelgewebe), Typ-1-Diabetes (Bauchspeicheldrüse), systemischer Lupus Erythematosus (viele Gewebe), Schuppenflechte (Haut), Alzheimer-Krankheit (Zentralnervensystem), Erb-Goldflam-Syndrom (neuromuskuläre Verbindungsstelle), Crohn-Krankheit (Darm), Epididymitis (Nebenhoden), Glomerulonephritis (Nieren), Basedow-Krankheit (Schilddrüse), Guillain-Barre-Syndrom (Nervenzellen), Hashimoto-Krankheit (Schilddrüse), hämolytische Anämie (rote Blutzellen), Blasensucht (hauptsächlich Haut), rheumatisches Fieber (Herz und Gelenke), Sarkoidose (multiple Gewebe und Organe), Dermatomyositis (multiple Gewebe und Organe), Skleroderma (Haut und Bindegewebe), Sjogren-Syndrom (exokrine Drüsen und andere Gewebe), Spondyloarthropatien (axiales Skelett und andere Gewebe), Schilddrüsenentzündung (Schilddrüse), Gefäßentzündung (Blutgefäße), Weißflecken-Krankheit (Haut), Addison-Krankheit (Nebenniere). Beispiele chronischer Entzündungsreaktionen, die auf geeignete Weise mit dem vorliegenden Verfahren behandelt werden können, umfassen Entzündungsreaktionen, die mit Herzkreislauferkrankungen, Herzkrankheit, Zirrhose, arthritischen Erkrankungen, Gallenstauung, Tuberkulose, Lepra, Syphilis, Periodontitis, Fibrose, Glomerulonephritis und gewissen Krebsarten assoziiert sind sowie chronische Entzündungsreaktionen auf infektiöse Agenten wie Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen, Helminthe und Prionen.

**[0054]** Das erfindungsgemäße Verfahren wird als für die Behandlung von immunvermittelten krankhaften Störungen besonders geeignet betrachtet, die zu neurologischen Pathologien führen, z.B. Multipler Sklerose, Alzheimer Krankheit, Myasthenia gravis, Guillain-Barre-Syndrom, amyotrophische Lateralsklerose.

**[0055]** Das vorliegende Verfahren wird auch als für die Behandlung immunvermittelter krankhafter Störung sehr geeignet betrachtet, die zu Muskelskelettpathologien führen, z.B. rheumatoider Arthritis, Osteoarthritis und damit verbundener rheumatoider Arthritis-Erkrankungen umfassend Gicht, Spondylarthropathie, Bechterew-Krankheit, Reiter-Syndrom, Arthropathia psoriatica, enteropathrische Spondylitis, juvenile Arthropathie oder juvenile Bechterew-Krankheit, reaktive Arthropathie, infektiöse oder postinfektiöse Arthritis, Gonokken-Arthritis, tuberkulöse Arthritis, Virusarthritis, Gelenkfungus, luetische Arthritis, Lyme-Krankheit, mit „vasku-

litischen Syndromen" assoziierte Arthritis, Polyarteritis nodosa, Überempfindlichkeitsvaskulitis, Luegenec-Granulomatose, Polymyalgin rheumatica, Gelenkzellenarthritis, C Calciumkristallablagerungsarthropathris, Pseudogicht, Nichtgelenkrheuma, Schleimbeutelentzündung, Tenosynovitis, Epicondylitis, Karpaltunnelsyndrom, überlastungsbedingte Bewegungseinschränkung, verschiedene Formen von Arthritis, neuropathische Gelenkerkrankung (Charcot und Gelenk), Hämarthrose (hämarthrosisch), Schoenlein-Henoch-Syndrom, hypertrophe Osteoarthropathie, multizentrische Reticulohistiozytose, mit gewissen Krankheiten assoziierte Arthritis wie beispielsweise Surcoilose, Hämochromatose, Sichelzellerkrankung und andere Hämoglobinopathrien, Hyperlipoproteinämie, Hypogammaglobulinämie, Hyperparathyroidismus, Akromegalie, familiäres Mittelmeerfieber, Behat-Krankheit, systemischer Lupus Erythrematosus oder rezidivierende Polychondritis.

**[0056]** Das erfindungsgemäße Verfahren wird als dann besonders vorteilhaft betrachtet, wenn es zur (vorbeugenden) Behandlung einer immunvermittelten krankhaften Störung verwendet wird, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, Osteoarthrose, insulinabhängiger Diabetes (Typ-I-Diabetes), systemischem Lupus Erythrematosus und Schuppenflechte. Am vorteilhaftesten wird das vorliegende Verfahren bei der Behandlung von Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis oder Osteoarthrose angewendet.

**[0057]** Um die Wirkung der östrogenen Komponente zu verstärken, kann es vorteilhaft sein, gleichzeitig ein immuntherapeutisches Mittel zu verabreichen, das in der Lage ist, vorbeugend oder therapeutisch eine Immunantwort zu hemmen und/oder die Immunpathologie zu verbessern. Derartige Mittel sind im Stand der Technik bekannt und umfassen Immunsuppressiva, immunmodulierende und immunblockierende und/oder entzündungshemmende Mittel und können in Kombination mit der östrogenen Komponente, d.h. als Dosierform einer einzigen Einheit verabreicht werden oder als Alternative können diese aktiven Prinzipien getrennt verabreicht werden, besonders dann, wenn die Verabreichungsmodi verschieden sind.

**[0058]** Bei einer spezifischen Ausführungsform wird die erfindungsgemäße östrogene Komponente in Kombination mit einem oder mehreren immuntherapeutischen Arzneimitteln einem Säuger verabreicht, der an Multipler Sklerose leidet oder deren verdächtigt wird. Die Verabreichung der erfindungsgemäßen östrogenen Komponente in Kombination mit einem oder mehreren immuntherapeutischen Arzneimitteln kann die Wirksamkeit der Behandlung verbessern. Außerdem kann eine derartige Kombination weniger oder weniger ausgeprägte Nebenwirkungen hervorrufen und/oder es möglich machen, eine geringere Dosis des bekannten immuntherapeutischen Arzneimittels oder der östrogenen Komponente unter Erzielung der gleichen Wirkung wie bei einer wesentlich höheren Dosis einer der Komponenten allein zu verabreichen. Das immuntherapeutische Arzneimittel zur Verwendung bei der Behandlung Multipler Sklerose kann geeigneterweise Folgendes sein: (1) ein steroidales entzündungshemmendes Mittel wie Cortisol oder Dexamethason; (2) ein nichtsteroidales entzündungshemmendes Mittel wie Acetylsalicylsäure (Aspirin), Ibuprofen oder Naproxen; (3) D-Pencillamin; (4) ein 4-Aminochinolinmittel wie beispielsweise Hydroxychloroquin; (5) Azathioprin; (6) Methotrexat; (7) Cyclosporin; (8) monoklonale Antikörper zu T-Lymphozyten; (9) monoklonale Antikörper zu Adhäsionsmolekülen; (10) monoklonale Antikörper zu Zytokinen und Wachstumsfaktoren; (11) Tumornekrosefaktor-Rezeptor- (TNFR-)IgG; (12) IL-1-Rezeptorantagonisten; (13) ICE-Inhibitoren; (14) Betaferon und/oder (15) Vitamin D, 1 $\alpha$ , 15-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> und 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D<sub>2</sub>; (16) Mittel, die spezifisch ein Molekül binden, das aus der Gruppe ausgewählt ist bestehend aus einem T-Zellrezeptor, einem Antigen und einem HLA-Molekül.

**[0059]** Bei einer anderen spezifischen Ausführungsform wird die erfindungsgemäße östrogene Komponente in Kombination mit einem oder mehreren immuntherapeutischen Arzneimitteln einem Säuger verabreicht, der an rheumatoider Arthritis leidet oder derselben verdächtigt wird. Die Verabreichung der erfindungsgemäßen östrogenen Komponente in Kombination mit einem oder mehreren immuntherapeutischen Arzneimitteln kann die Wirksamkeit der Behandlung arthritischer Krankheiten wie rheumatoider Arthritis und Osteoarthrose verbessern. Außerdem kann eine derartige Kombination weniger Nebenwirkungen hervorrufen und/oder die Verabreichung einer geringeren Dosis des immuntherapeutischen Arzneimittels oder der östrogenen Komponente ermöglichen, während sie die gleiche Wirkung wie eine wesentlich höhere Dosis einer der Komponenten allein erzeugt. Das immuntherapeutische Arzneimittel zur Verwendung bei der Behandlung rheumatoider Arthritis kann Folgendes sein: (1) ein steroidales entzündungshemmendes Mittel wie Cortisol oder Dexamethason; (2) ein nichtsteroidales entzündungshemmendes Mittel wie Acetylsalicylsäure (Aspirin), Ibuprofen oder Naproxen; (3) ein organisches Goldderivat wie beispielsweise Goldnatriumthiomalat, Aurothioglukose oder Auranofin; (4) D-Pencillamin; (5) ein 4-Aminochinolinmittel wie beispielsweise Hydroxychloroquin; (6) Azathioprin; (7) Methotrexat; (8) Cyclosporin; (9) ein Angiogeneseinhibitor wie AGM-1470 (Ingber et al., 1990, Nature 348, 555); (10) monoklonale Antikörper zu T-Lymphozyten; (11) monoklonale Antikörper zu Adhäsionsmolekülen; (12) monoklonale Antikörper zu Zytokinen und Wachstumsfaktoren; (13) Tumornekrosefaktor-Rezeptor-(TNFR)IgG; (14) IL-1-Rezeptorantagonisten; (15) ICE-Inhibitoren und/oder (16) Mittel, die spezifisch ein Molekül binden, das

aus der Gruppe ausgewählt ist bestehend aus einem T-Zellrezeptor, einem Antigen und einem HLA-Molekül.

**[0060]** Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst das vorliegende Verfahren die gleichzeitige Verabreichung eines Progestagens, insbesondere, wenn das Verfahren bei der Behandlung weiblicher Säuger verwendet wird. Die Verabreichung von Östrogenen ist mit Endometriumproliferation bei Frauen in Verbindung gebracht worden und es ist nun weit verbreitet akzeptiert, dass die „uneingeschränkte“ Östrogenverabreichung während einer langen Zeitspanne (Östrogentherapie) das Risiko von Gebärmutterkrebs wesentlich erhöht (Cushing et al., 1998, Obstet. Gynecol. 91, 35–39; Tavani et al., 1999, Drugs Aging, 14, 347–357). Es bestehen auch Beweise einer signifikanten Erhöhung von Brustkrebs bei der Langzeitanwendung (10–15 Jahren) der Östrogentherapie (Tavani et al., 1999, Drugs Aging, 14, 347–357; Pike et al., 2000, Steroids, 65, 659–664).

**[0061]** Um den negativen Auswirkungen der Langzeitöstrogentherapie ohne Entgegenwirkung entgegenzuwirken, wird heutzutage allgemein eine zusätzliche Progestagenbehandlung bei der Hormonersatztherapie bei peri- und postmenopausalen Frauen angewendet. Man glaubt, dass die regelmäßige Verabreichung von Progestagen die kontinuierliche Östrogenstimulierung der Gebärmutter durch antiproliferative Wirkung hemmt und das Auftreten von Gebärmutterkarzinomen bei postmenopausalen Frauen, die eine Östrogensersatztherapie erhalten, zu reduzieren scheint (Beral et al., 1999, J. Epidemiol. Biostat., 4, 191–210). Um irgendwelchen potentiell negativen Auswirkungen der Östrogenverabreichung bei dem vorliegenden Verfahren, besonders im Falle kontinuierlicher Verabreichung, entgegenzuwirken, wird es vorgezogen, gleichzeitig eine progestagene Komponente zum Hemmen der Östrogenstimulierung der Gebärmutter zu verabreichen und eine progestagene Komponente zumindest während einer Zeitspanne von zehn Tagen mindestens alle drei Monate zu verabreichen.

**[0062]** Eine andere Ausgestaltung der Erfindung betrifft eine pharmazeutische Formulierung umfassend die östrogene Komponente und das immuntherapeutische Mittel, wie oben definiert, und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger. Die vorliegende pharmazeutische Formulierung enthält bevorzugt mindestens 10 µg der östrogenen Komponente, noch bevorzugter mindestens 25 µg der östrogenen Komponente. Selbst noch bevorzugter beträgt die Menge der östrogenen Komponente in der Formulierung mindestens 50 µg, am bevorzugtesten beträgt sie mindestens 150 µg. Die Menge der östrogenen Komponente innerhalb der Formulierung übersteigt normalerweise 1000 mg nicht. Bevorzugt übersteigt die Menge 600 mg nicht, am bevorzugtesten übersteigt sie 400 mg nicht.

**[0063]** Das immuntherapeutische Mittel liegt in der Formulierung geeigneterweise in einer Menge von mindestens 1 µg, bevorzugt mindestens 10 µg vor. Gewöhnlich übersteigt die Menge des immuntherapeutischen Mittels in der Formulierung 50 mg nicht, bevorzugt übersteigt sie 25 mg nicht.

**[0064]** Die erfindungsgemäße pharmazeutische Formulierung kann geeigneterweise in fester oder halbfester Dosierform wie beispielsweise als Tabletten, Kapseln, Oblatenkapseln, Kügelchen, Pillen, Pulver und Granulaten sowie als flüssige Dosierformen wie Lösungen, Emulsionen, Suspensionen, Salben, Pasten, Cremes, Gele, Gelees und Schäume vorliegen.

**[0065]** Die erfindungsgemäße orale Dosiereinheit ist bevorzugt eine feste oder halbfeste Dosierart wie beispielsweise Tabletten, Kapseln, Oblatenkapseln, Kügelchen, Pillen, Pulver und Granulate. Der Ausdruck „feste oder halbfeste Dosierform“ umfasst auch Kapseln, die eine Flüssigkeit, z.B. ein Öl, enthalten, in der die vorliegende östrogene Komponente gelöst oder dispergiert ist. Tabletten und äquivalente feste und halbfeste Dosierformen können geeigneterweise Materialien wie Bindemitteln (z.B. Hydroxypropylmethylcellulose, Polyvinylpyrrolidin, andere Cellulosematerialien und Stärke), Verdünnungsmittel (z.B. Lactose oder andere Zucker, Stärke, Dicalciumphosphat und Cellulosematerialien), Sprengmittel (z.B. Stärkepolymere und Cellulosematerialien) und Gleitmittel (z.B. Stearate und Talk) enthalten.

**[0066]** Transdermale Abgabesysteme umfassen Pflaster, Gele, Bänder und Cremes und können Träger wie Löslichmacher, Permeationsverbesserer (z.B. Fettsäuren, Fettsäureester, Fettalkohole und Aminosäuren), hydrophile Polymere (z.B. Polycarbophil und Polyvinylpyrrolidin) und Klebstoffe und Klebrigmacher (z.B. Polyisobutylene, Klebstoffe auf Silicnbasis, Acrylate und Polybuten) enthalten.

**[0067]** Transmukosale (insbesondere rektale und intravaginale) Abgabesysteme umfassen Pflaster, Tabletten, Zäpfchen, Vaginalzäpfchen, Gele und Cremes und können Träger wie Löslichmacher und Verbesserungsmittel (z.B. Propylenglycol, Gallensalze und Aminosäuren) und andere Vehikel (z.B. Polyethylenglycol, Fettsäureester und -derivate und hydrophile Polymere wie Hydroxypropylmethylcellulose und Hyaluronsäure) enthal-

ten.

**[0068]** Injizierbare oder implantierbare Depotzubereitungen umfassen injizierbare Fluide und Implantations-tabletten. Geeignete Fluidträgerkomponenten sind physiologisch verträgliche Verdünnungsmittel, wobei die aktiven Mittel gelöst, suspendiert werden können. Ein Beispiel eines Verdünnungsmittels ist Wasser mit oder ohne Zusatz von Elektrolytsalzen oder Verdickungsmitteln. So kann die Depotformulierung beispielsweise eine wässrige mikrokristalline Suspension sein. Öle sind als Verdünnungsmittel mit oder ohne Zusatz eines Löslich-machers, eines Tensids oder eines Suspensions- oder Emulgiermittels besonders geeignet. Beispiele geeig-neter Öle umfassen Arachisöl, Olivenöl, Erdnussöl, Baumwollsamensöl, Sojabohnenöl, Rizinusöl oder Sesam-öl. Beispiele von Löslichmachern umfassen Benzylalkohol und Benzylbenzoat. Depotzubereitungen bieten den Vorteil, dass eine einzige Injektion oder Implantation einen oder mehrere Monate lang genügt. Die Dauer der Depotwirkung hängt von der Natur der östrogenen Komponente (wobei Estervorläufer bevorzugt werden, da sie eine langsamere Freisetzung aufzeigen), der Menge der östrogenen Komponente sowie dem Typ der Trägersubstanz, die das aktive Mittel freisetzt, ab. Im Allgemeinen liegt die Dauer im Bereich von 10–30 Tagen, längere oder kürzere Zeitspannen können jedoch ebenfalls erreicht werden.

**[0069]** Andere Abgabesysteme, die zur Verabreichung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusam-mensetzung verwendet werden können, umfassen intranasale und pulmonare Abgabesysteme wie Sprays und Mikroteilchen.

**[0070]** Eine andere spezifisch bevorzugte Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung betrifft eine aus einer oralen Einheit bestehenden Dosierform umfassend mindestens 50 µg, bevorzugt mindestens 250 µg der öst-rogenen Komponente und mindestens 1 µg eines immuntherapeutischen Mittels, wie oben definiert, und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

**[0071]** Die vorliegende Erfindung wird durch folgende Beispiele noch weiter veranschaulicht, die jedoch nicht als einschränkend aufgefasst werden dürfen. Die in der obigen Beschreibung, in den folgenden Beispielen und in den Ansprüchen offenbarten Merkmale können sowohl einzeln als auch in Kombination derselben Material für die praktische Durchführung der Erfindung in verschiedenen Formen derselben sein.

## BEISPIELE

### Beispiel 1

**[0072]** Die vaginale Verhornung wurde als gewebespezifischer und östrogenempfindlicher Endpunkt gewählt, um die Östrogenizität von Östetrol (Ö4) sowohl nach der oralen als auch der subkutanen Verabreichung bei hypoöstrogenen Ratten zu bestimmen. 17α-Ethinylöstradiol (EÖ), 17β-Östradiol (Ö2) und Vehikel (10 %-iges Ethanol/Sesamöl) diente als Kontrollen bei diesen Bioassays.

**[0073]** Die Erhöhung des Gebärmuttergewichts bei der Ratte wird allgemeiner als Maß der Östrogenizität ver-wendet. Jedoch spricht das Gebärmuttergewicht auch auf Progesteron, Testosteron und andere Mittel an, die charakteristischerweise nicht als Östrogene betrachtet werden. In den frühen 1920er Jahren wurde entdeckt, dass das Follikelfluid aus der Schweinsgebärmutter einen Faktor (Faktoren) enthielt, der bzw. die die Verhor-nung/Keratinisierung des Vaginalepithels in Ratten verursachte (Allen and Doisy, 1923, JAMA, 81, 819–821; Allen and Doisy, 1924, Am. J. Physiol., 69, 577–588). Die sogenannte Vaginalverhornungsreaktion in Ratten bot daraufhin einen Bioassay zum Prüfen der Östrogenizität. Die Vaginalapithelverhornung/-keratinisierung in ovariumektomierten Ratten kann daher nur durch Verbindungen erzeugt werden, die als wirkliche Östrogene betrachtet werden (Jones et al., 1973, Fert. Steril. 24, 284–291). Die Vaginalepithelverhornung/-keratinisierung stellt deshalb einen äußerst selektiven Endpunkt zum Bestimmen der Potenz von Östrogenen dar (Reel et al., 1996, Fund. Appli. Toxicol. 34, 288–305).

**[0074]** Intakte erwachsene weibliche CD-Ratten wurden ovariumektomiert, um einen Östrogenmangel zu in-duzieren. Es wurden sieben Tage lang Vaginalspülungen durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Ratten Kastrationsvaginalabstriche (Vorherrschen von Leukozyten im Vaginalabstrich und im Aussehen einem diöst-rosen Vaginalabstrich ähnlich) aufwiesen. Die Kastratvaginalabstriche lassen darauf schließen, dass eine voll-ständige Ovariumektomie erreicht wurde. Die Behandlung begann auf das Abschließen der 7-tägigen Abstrich-nahme hin (Tag 0 = erster Tag der Dosierung). Die Tiere wurden einmal täglich für 7 aufeinanderfolgende Tage dosiert. Die täglichen Vaginalspülungen wurden 7 Tage lang weiterhin erhalten, nachdem die Dosierung be-gonnen worden war, um die Vaginalverhornung als Anzeichen einer östrogenen Antwort zu erfassen. Ein Tropfen der Vaginalwaschlösungen wurde auf einen Objektträger aus Glas aufgebracht und durch Lichtmikroskopie

untersucht, um das Vorliegen oder die Abwesenheit von verhornten Epithelzellen zu erfassen. Die Vaginalspülungen wurden vor dem Dosieren an den Tagen 0–6 und vor der Nekropsie am siebten Tag erhalten.

**[0075]** Der Vaginalverhornungsbioassay wurde durchgeführt, um das Östrogenprofil von Ö4 zu bestimmen, wenn es subkutan (sk) ovariectomierten erwachsenen Ratten verabreicht wird. Ö2 wurde als positive Kontrolle verwendet. Das Vehikel (10 Ethanol/Sesamöl) diente als negative Kontrolle. Steroide wurden in absolutem Ethanol gelöst und daraufhin mit Sesamöl (10 % Ethanol in Sesamöl) auf die Endkonzentration gebracht. Eine östrogene Vaginalantwort erfolgte in 8/8 Ratten bis zum 2. Tag und hielt bis zum 7. Tag bei Ratten an, die sk mit 50 µg/kg/Tag Ö2 7 Tage lang injiziert wurden (Tabelle 1). Tiere, die mit dem Vehikel behandelt wurden, wiesen keine Vaginalepithelverhornung auf (Tabelle 1). Das Einsetzen der Vaginalepithelverhornung war bei Ratten, die sk mit 0,1, 0,3, 1,0 und 3,0 mg/kg/Tag Ö4 injiziert worden waren, dosisabhängig und begann am gleichen Tag der Behandlung (Tag 2) wie für Ö2 beobachtet wurde (Tabelle 1). Bei 0,1 mg/kg/Tag Ö4 zeigten schon 4/8 Ratten und bei 0,3 mg/kg/Tag Ö4 sogar 7/8 Ratten bis zum 7. Tag eine Vaginalöstrogenreaktion auf. Bei 1,0 und 3,0 mg/kg/Tag Ö4 zeigten alle Ratten bis zum 7. Tag eine Vaginalöstrogenreaktion auf (Tabelle 1)

Tabelle 1: Vaginalöstrogenreaktion in ovariectomierten Ratten, die subkutan (sk) mit 17β-Östradiol (Ö2) oder Östetrol (Ö4) behandelt worden waren. Die Daten sind als Anzahl von Ratten ausgedrückt, die im Vergleich mit der Anzahl der behandelten Ratten (Verhältnis) eine Vaginalverhornung aufwiesen.

Behandlungsgruppe	Dosierungsweg	Anzahl von Ratten, die eine östrogene Reaktion aufwiesen/Anzahl von behandelten Ratten							
		Tag der Studie							
		Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7
0,05 mg/kg/Tag Ö2	sc	0/8	0/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
Vehikelkontrolle	sc	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
0,1 mg/kg/Tag Ö4	sc	0/8	0/8	0/8	1/8	1/8	4/8	3/8	4/8
0,3 mg/kg/Tag Ö4	sc	0/8	0/8	1/8	5/8	7/8	6/8	7/8	7/8
1,0 mg/kg/Tag Ö4	sc	0/8	0/8	1/8	6/8	8/8	7/8	8/8	8/8
3,0 mg/kg/Tag Ö4	sc	0/8	0/8	3/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8

**[0076]** Der Vaginalverhornungsbioassay wurde durchgeführt, um das Östrogenprofil von Ö4 zu bestimmen, wenn es oral (po) ovariectomierten erwachsenen Ratten verabreicht wird. ÖÖ wurde als positive Kontrolle verwendet. Das Vehikel (10 Ethanol/Sesamöl) diente als negative Kontrolle. Steroide wurden in absolutem Ethanol gelöst und daraufhin mit Sesamöl (10 % Ethanol in Sesamöl) auf die Endkonzentration gebracht. Eine östrogene Vaginalreaktion fand bei allen Ratten (8/8) bis zum 7. Tag statt, denen 50 µg/kg/Tag ÖÖ po verabreicht wurde (Tabelle 2). Auf ähnliche Weise wurde eine Vaginalepithelverhornung bei allen Ratten (8/8) bis zum 7. Tag beobachtet, die po entweder mit 0,1, 0,3, 1,0 oder 3,0 mg/kg/Tag Ö4 behandelt wurden (Tabelle 2),

während Tiere, die mit dem Vehikel behandelt wurden, keine Vaginalepithelverhornung aufwiesen (0/8). Erstaunlicherweise erfolgte selbst bei Ratten, denen relativ geringe Dosen von Ö4 (z.B. 0,1 mg/kg/Tag) verabreicht wurden, das Einsetzen der Vaginalepithelverhornung (die als Anzahl von Tieren, die an den Tagen 1–3 der Studie reagieren, definiert wird) schneller bei po behandelten als bei sk behandelten Tieren, was die hervorragende Bioverfügbarkeitsmerkmale von Östetrol nach der oralen Verabreichung beweist.

Tabelle 2: Vaginalöstrogenreaktion in ovariumektomierten Ratten, die oral (po) mit 17 $\alpha$ -Ethinylöstradiol (ÖÖ) oder Östetrol (Ö4) behandelt worden waren. Die Daten sind als Anzahl von Ratten ausgedrückt, die im Vergleich mit der Anzahl der behandelten Ratten (Verhältnis) eine Vaginalverhornung aufwiesen.

Behandlungsgruppe	Dosisweg	Anzahl von Ratten, die eine östrogene Reaktion aufwiesen/Anzahl von behandelten Ratten							
		Tag der Studie							
		Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7
0,05 mg/kg/Tag	po	0/8	1/8	3/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8

ÖÖ									
Vehikelkontrolle	po	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
0,1 mg/kg/Tag Ö4	po	0/8	0/8	1/8	7/8	8/8	8/8	8/8	8/8
0,3 mg/kg/Tag Ö4	po	0/8	0/8	1/8	5/8	7/8	6/8	7/8	7/8
1,0 mg/kg/Tag Ö4	po	0/8	1/8	7/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
3,0 mg/kg/Tag Ö4	po	0/8	0/8	6/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8

#### Beispiel 2

**[0077]** Um die orale (po) und subkutane (sk) Bioverfügbarkeit von Östetrol (Ö4) zu beurteilen und die Eliminationshalbwertszeit zu bestimmen, wurden Eindosenstudien bei weiblichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt, gefolgt von häufiger Blutprobenahme im Laufe einer Zeitspanne von 24 Stunden.

**[0078]** Weiblichen Sprague-Dawley-Ratten wurden mit einem permanenten silatischen Herzkatheter, wie von Kuipers et al. (1985, Gastroenterology, 88, 403–411) beschrieben, ausgestattet. Man ließ die Ratten sich 5 Tage lang nach dem chirurgischen Eingriff erholen und dann wurde ihnen 0,05, 0,5 oder 5 mg/kg Ö4 in 0,5 ml Arachisöl verabreicht. Zur sk-Verabreichung wurde Ö4 in den Nackenbereich unter Anwendung einer Spritze von 1 ml und einer Nadel von 20 g injiziert. Zur po-Verabreichung von Ö4 wurden die Ratten leicht mit Halothan/N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> betäubt und Ö4 wurde unter Anwendung eines Magenintubators aus Kunststoff direkt intragastral angewendet. Daraufhin wurden durch den Herzkatheter in heparinisierten Röhren nach 0,5, 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden Blutproben genommen. Erythrozyten wurden durch Zentrifugieren mit 5000 xg für 10 Minuten bei 4°C

entfernt und das Blutplasma wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach dem Auftauen der Plasmaproben wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion (Hexan und Diethylether) zum Zubereiten der Ö4-haltigen Plasmaproben für die HPLC-Analyse (Perkin Elmer 200) und Tandemmassenspektrometrie unter Anwendung eines PE Sciex 3000 Tandemmassenspektrometers und einer APCI-Grenzfläche angewendet. Bei jeder Probencharge wurde eine Kalibrationskurve mit 6 Kalibratoren aufgezeichnet. Die Kalibrationskurve wurde unter Zuhilfenahme der linearen Regression (Korrelationskoeffizient  $> 0,98$ ) berechnet, was die Quantifizierung von Plasmakonzentration erlaubt. Es wurden die Daten für jedes Rattenplasma, von dem in verschiedenen Zeitabständen Proben genommen wurden, gesammelt.

**[0079]** Die Plasma-Ö4-Konzentrationsdaten wurden mit „WinNonLin, Ausgabe 3.1“ analysiert und involvierten pharmakokinetische Parameter für  $C_{\text{max}}$ , Halbwertszeit und  $\text{AUC}_{0-24}$ . Insbesondere bei Anwendung der niedrigen und mittleren Dosisniveaus von 0,05, 0,5 mg/kg zeigte Ö4 eine orale Bioverfügbarkeit, die der Bioverfügbarkeit entsprach, die bei der sk-Verabreichung (80–100 %) erhalten wird. Bei dem höchsten geprüften Dosisniveau, nämlich 5,0 mg/kg Ö4, führte die Absorptionskinetik zu einer oralen Bioverfügbarkeit von circa 30–60 des sk-verabreichten Ö4. Interessanterweise zeigte Ö4 eine relativ lange Halbwertszeit von 2–3 Stunden, was die Erfassung von bioaktiven Niveaus unkonjugierter Ö4 bei allen Zeitpunkten im Laufe einer Zeitspanne von 24 Stunden in den sk- und po-Dosiersversuchen ermöglichte.

### Beispiel 3

**[0080]** Um die Bioverfügbarkeit und die Eliminationshalbwertszeit von Östetrol nach dem oralen Dosieren bei Menschen zu bestimmen, wurde eine Studie einer einzigen steigenden Dosis bei gesunden postmenopausalen Freiwilligen durchgeführt. Die Freiwilligen ( $n = 6$ ) wurden willkürlich 0,1, 1 oder 10 mg Östetrol zugeordnet und Blutproben (18 pro Freiwillige) wurden im Laufe einer Zeitspanne von 72 Stunden abgenommen.

**[0081]** Nach dem Auftauen der Plasmaproben wurde die Flüssig-Flüssig-Extraktion (Hexan und Diethylether) zum Zubereiten der östetrolhaltigen Plasmaproben für die HPLC-Analyse (Perkin Elmer 200) und Tandemmassenspektrometrie unter Anwendung eines PE Sciex 4000 Tandemmassenspektrometer und APCI-Grenzfläche angewendet. Bei jeder Probencharge wurde eine Kalibrationskurve mit 6 Kalibratoren aufgezeichnet. Die Kalibrationskurve wurde unter Anwendung der linearen Regression (Korrelationskoeffizient  $> 0,98$ ) berechnet, was die Quantifizierung von Plasmakonzentrationen erlaubt.

**[0082]** Eine gute Verträglichkeit wurde beobachtet, als die oralen Östetrol Dosen von 0,1 auf 1 und weiter auf 10 mg erhöht wurden. Die AUC-Werte bewiesen eine gute Dosislinearität, was anzeigt, dass über den gesamten Dosisbereich oral verabreichtes Östetrol gut absorbiert wurde. Interessanterweise zeigte Östetrol eine lange Eliminationshalbwertszeit von mehr als 15 Stunden, d.h. 15–50 Stunden bei menschlichen postmenopausalen Versuchspersonen.

### Beispiel 4

**[0083]** Gut eingeführte kompetitive Steroidbindungsassays wurden zum Bestimmen der relativen Bindungsaffinität von Östetrol (Ö4) im Vergleich mit  $17\alpha$ -Ethinylöstradiol (EÖ) und  $17\beta$ -Östradiol (Ö2) für menschliche Östrogenrezeptor (ÖR)  $\alpha$ - und  $\beta$ -Formen verwendet

**[0084]** Das verwendete Verfahren wurde aus der wissenschaftlichen Literatur und wie von Osbourn et al. im Einzelnen beschrieben (1993, Biochemistry, 32, 6229–6236) adaptiert. Rekombinante menschliche ÖR $\alpha$ - und ÖR $\beta$ -Proteine wurden aus transfizierten Sf9-Zellen gereinigt. Die in vitro-Assays involvierten die Verwendung entweder von ÖR $\alpha$ - oder ÖR $\beta$ -Proteinen und [ $^3\text{H}$ ]Ö2 in festgelegten Konzentrationen von 0,5 nM als gelabeltem Ligand. Rekombinante menschliche ÖR $\alpha$ - oder ÖR $\beta$ -Proteine wurden in Bindungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 % Glycerin, 1 mM DTT, 1 mg/ml RSA) gelöst und doppelte aliquote Anteile wurden dann mit [ $^3\text{H}$ ]Ö2 als Endkonzentration von 0,5 nM zusammen mit einer Vehikelkontrolle (0,4 % DMSO) oder der gleichen Menge Vehikel, die steigende Konzentrationen von ungelabelten Steroidliganden als Konkurrenten enthielten, inkubiert. Nach der 2 h langen Inkubation bei  $25^{\circ}\text{C}$  wurden ungebundene Liganden entfernt und Mengen an [ $^3\text{H}$ ]Ö2, die entweder an ÖR $\alpha$ - oder ÖR $\beta$ -Proteine gebunden waren, wurden gemessen. Die Durchschnittsmengen von [ $^3\text{H}$ ] Ö2, die entweder an ÖR $\alpha$ - oder ÖR $\beta$ -Proteine bei jeder Konkurrentkonzentration gebunden sind, wurden zum Herstellen von Inhibitionskurven verwendet. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte wurden daraufhin durch nicht-lineare Kleinstquadratregionalanalyse bestimmt. Die Inhibitionskonstanten (Ki) wurden unter Anwendung der Gleichung von Cheng und Prusoff (Cheng et al., 1973, Biochem. Pharmakol., 22, 3099–3108) unter Anwendung des gemessenen  $\text{IC}_{50}$ -Werts der geprüften Verbindungen, der Konzentration des bei dem Assay verwendeten Radioliganden und der historischen Werte für  $K_d$  des Radioliganden berechnet, die als 0,2 nM und 0,13



nm für ÖR $\alpha$  bzw. ÖR $\beta$  bestimmt wurden.

**[0085]** Die biochemischen Assayergebnisse für Ö4 sind als Prozentsatz der Inhibition der spezifischen Bindung in drei getrennten Versuchen aufgeführt (Tabelle 3). Zum Vergleichen der Bindungsaffinitäten von Ö4, EÖ und Ö2 mit menschlichen ÖR $\alpha$ - und ÖR $\beta$ -Proteine sind durch Versuche beobachtete Ki-Werte in Tabelle 4 gezeigt. Im Vergleich mit EÖ und Ö2 zeigt Ö4 ein einzigartiges Bindungsprofil mit einer starken Präferenz (400 %) für das Binden an das ÖR $\alpha$ -Protein (Tabelle 4). Im Gegensatz dazu sind die Ki-Werte für ÖR $\beta$ -Protein für EÖ- und Ö2-Steroidliganden deutlicher (Tabelle 4).

Tabelle 3: Prozentsatz der Inhibition spezifischer Bindung an ÖR $\alpha$ - und ÖR $\beta$ -Proteine unter Anwendung von Ö4 als ungelabeltem Steroidligand und 0,5 nM [<sup>3</sup>H] als gelabeltem Konkurrent. Die Ergebnisse drei verschiedener Versuche sind gezeigt.

End- konzentration von Ö4	Prozentsatz der Inhibition spezifischer Bindung im					
	ÖR $\alpha$ -Steroidbindungsassay			ÖR $\beta$ -Steroidbindungsassay		
	Test 1	Test 2	Test 3	Test 1	Test 2	Test 3
1 $\mu$ M	98	nb	nb	87	90	95
0,3 $\mu$ M	92	94	101	74	74	77
0,1 $\mu$ M	83	85	86	56	54	50
0,03 $\mu$ M	64	66	63	19	25	30
10 nM	43	32	28	nb	nb	nb
3 nM	26	17	11	nb	nb	nb

nb: Nicht bestimmt

Tabelle 4: Durch Versuche bestimmte Inhibitionskonstanten (Ki) für Östetrol (Ö4), 17 $\alpha$ -Ethinylöstradiol (EÖ) und 17 $\beta$ -Östradiol (Ö2) gegen menschliche ÖR $\alpha$ - und ÖR $\beta$ -Proteine. Die relative Präferenz für das Binden an ÖR $\alpha$ -Protein ist ebenfalls gezeigt.

Steroid- liganden	Ki ÖR $\alpha$ (nM)	Ki ÖR $\beta$ (nM)	Relative ÖR $\alpha$ - /ÖR $\beta$ - Präfe- renz (%)
EÖ	0,23	0,025	11
Ö2	0,21	0,015	7
Ö4	4,9	19	400

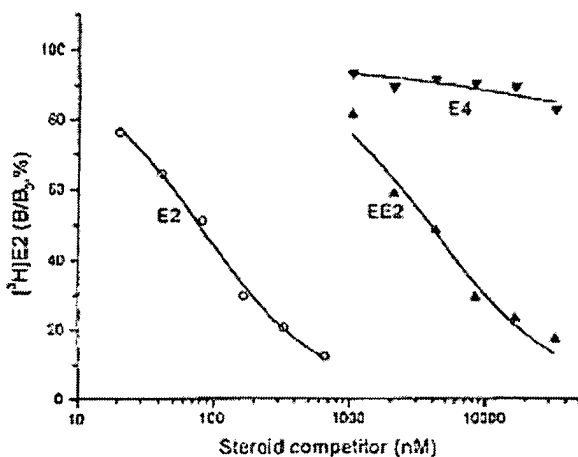
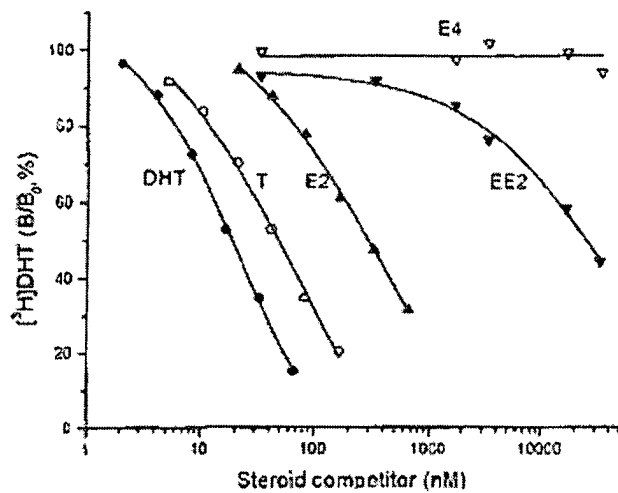
#### Beispiel 5

**[0086]** Ein gut eingeführter kompetitiver Steroidbindungsassay (Hammond und Lahtenmaki, 1983, Clin Chem Acta 132:101–110) wurde zum Bestimmen der relativen Bindungsaffinität von Östetrol (Ö4), 17 $\alpha$ -Ethinylöstradiol (EÖ2), 17 $\beta$ -Östradiol (Ö2), Testosteron (T) und 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) für das menschliche Geschlechtshormonbindungsglobulin (GHBG) verwendet.

**[0087]** Menschliches SHBG wurde aus transgenem Mausserum, wie oben beschrieben, gereinigt (Avvakumov GV et al., 2000. J Biol Chem 275:25920–25925). Das auf diese Weise zubereitete menschliche SHBG wurde durch Polyacrylamidelektrophorese unter Denaturierungsbedingungen als > 99 % rein beurteilt. Seine Steroidbindungscharakteristiken sind von SHBG in menschlichem Serum nicht zu unterscheiden (Avvakumov GV et al., 2000. J Biol Chem 275:25920–25925). Der in vitro-Assay involvierte die Verwendung des gereinigten menschlichen SHBG und von [<sup>3</sup>H]DHT oder [<sup>3</sup>H]Östradiol als gelabelte Liganden. Menschliches SHBG wurde 30 min lang bei Raumtemperatur mit einer Suspension von mit Dextran beschichteter künstlicher Kohle (DCC)

in mit Phosphat gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) zum Entfernen irgendeines Steroidliganden behandelt. Nach dem Zentrifugieren ( $2.000 \times g$  für 10 min) zum Sedimentieren der DCC wurde die das menschliche SHBG enthaltende überstehende Substanz in PBS auf eine Konzentration von 1 nM, auf der Basis seines Steroidbindungsvermögens, verdünnt.

**[0088]** Doppelte aliquote Anteile (100  $\mu$ l) dieser menschlichen SHBG-Lösung wurden dann mit dem gleichen Volumen entweder von [ $^3$ H] DHT oder [ $^3$ H] Östradiol in 10 nM zusammen mit 100  $\mu$ l PBS als solcher oder der gleichen Menge PBS, die steigende Konzentrationen ungelabelter Steroidliganden enthielt, als Konkurrenten in Polystyrolreagenzgläsern inkubiert. Nach der Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur wurden die Reaktionsmischungen für weitere 15 min in ein Eisbad eingebracht. Aliquote Teile (600  $\mu$ l) einer eiskalten Suspension von DCC wurden dann in jedes Reagenzglas eingegeben und nach kurzem 2 Sekunden langem Mischen wurde jede Röhre in einem Eisbad entweder 10 min oder 5 min lang, je nachdem, ob [ $^3$ H]DHT oder [ $^3$ H]Östradiol als gelabelte Liganden verwendet wurden, inkubiert. Die ungebundenen, an DCC adsorbierten Liganden wurden dann durch Zentrifugieren ( $2.000 \times g$  für 15 min bei  $4^\circ\text{C}$ ) entfernt und die Mengen an [ $^3$ H]-gelabelten Liganden, die an SHBG gebunden waren, wurden in 2 ml ACS-Szintillationscocktail unter Anwendung eines Flüssigszintillationsspektrofotometers gezählt. Die Durchschnittsmengen der [ $^3$ H]-gelabelten Liganden, die bei jedem Konkurrentkonzentration (B) an SHBG gebunden waren, wurden als Prozentsatz der Durchschnittsmengen von [ $^3$ H]-gelabelten Liganden, die an SHBG in Abwesenheit eines Konkurrenten ( $B_0$ ) gebunden sind, ausgedrückt und gegen die Konkurrentkonzentration in jedem Assayreagenzglas aufgezeichnet. Die Ergebnisse der kompetitiven Bindungsassays sind in Figur 1 gezeigt.



FIGUR

Abszisse: Steroidkonkurrent (nM)

Figur 1: Kompetitive Verschiebung von [ $^3$ H]DHT (Bild A) und [ $^3$ H]Östradiol (Bild B) der menschlichen Geschlechtshormonbindungsprotein-Steroidbindungsstelle. Die ungelabelten Steroidliganden, die als Konkur-

renten verwendet werden, waren wie folgt: Östetrol (Ö4), 17 $\alpha$ -Ethinylöstradiol (EÖ2), 17 $\beta$ -Östradiol (Ö2), Testosteron (T) und 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT).

**[0089]** Wie aus diesen kompetitiven Bindungsassays klar ersichtlich ist, bindet Östetrol überhaupt nicht an menschliches SHBG, wenn es entweder mit [<sup>3</sup>H] DHT oder [<sup>3</sup>H] Östradiol als gelabelte Liganden geprüft wird. Dies steht in starkem Gegensatz zu den Steroiden Ethinylöstradiol, 17 $\beta$ -Östradiol, Testosteron und 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron, die in dieser Reihenfolge eine erhöhte relative Bindungsaffinität für menschliches SHBG aufweisen. Wichtig ist, dass die Östetrolbindung an SHBG im Vergleich mit den anderen geprüften Östrogenen Ethinylöstradiol und 17 $\beta$ -Östradiol vernachlässigbar gering war.

#### Beispiel 6

**[0090]** Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) findet weitverbreitete Anwendung als Tiermodell für Multiple Sklerose (MS), eine Krankheit, die durch Entzündungsprozesse innerhalb des Zentralnervensystems gekennzeichnet ist. Von ihrem Wert, die Therapie für Multiple Sklerose zu identifizieren, abgesehen, ist sie als Modell von Entzündung im Allgemeinen nützlich. Der Vorteil besteht darin, dass die Entzündungsreaktion innerhalb des Zentralnervensystems lokalisiert ist, was eine richtige Abschätzung des Ausmaßes der Entzündungsreaktion mit Bezug auf klinische Symptome erlaubt. Außerdem ist die Auslösung der Krankheit genau gesteuert, weil sie durch Immunisierung mit einem Protein oder einem synthetischen Peptid eingeführt wird. Die klinische Überwachung der Tiere ist für eine Zeitspanne von nicht mehr als 4 bis 6 Wochen erforderlich und ein schnelles Screenen potentiell antientzündlich wirkender Verbindungen ist daher möglich.

**[0091]** Die Multiple Sklerose ist durch zunehmende Behinderung aufgrund von Störung der das Axon umgebenden Myelinhülle und den dadurch hervorgerufenen Verlust von Nervenleitfähigkeit gekennzeichnet. Entzündungsläsionen zeigen eine Involvierung von Lymphozyten und Makrophagen an, die für die Gewebezerstörung durch Absonderung einer Reihe von Entzündungsvermittlern verantwortlich sind.

**[0092]** Die EAE kann in anfälligen Tierstämmen durch Immunisieren mit ganzem Myelin oder von Myelin derivierten Proteinen und Peptiden erzeugt werden. In der SJL/J-Maus kann die EAE reproduzierbar durch subkutanes Immunisieren mit einem Peptid aus Proteolipidprotein, d.h. PLP<sub>139-151</sub> in komplettem Freund-Adjuvans induziert werden. Nach 3 Tagen erhielten die Mäuse 10<sup>9</sup> hitzeabgetötete Bordetella pertussis-Organismen (i.v.) zum Erhöhen der Durchlässigkeit der Blut-Gehirn-Sperre. Dies führt zur Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen, die proinflammatorische Zytokine wie Lymphotoxin und Interferon- $\gamma$  absondern. Von der Entwicklung der Krankheit ist bekannt, dass sie folgende Stufen umfasst:

1. Aktivierung von T-Zellen durch Makrophagen und dendritischen Zellen, die PLP<sub>139-151</sub> darstellen.
2. Verstärkte Expression von Interleukin-12 in Makrophagen und dendritischen Zellen.
3. Differenzierung von T-Zellen in Effektorzellen, die proinflammatorische Zellen absondern und einzige chemokine Rezeptoren exprimieren.
4. Erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Gehirn-Sperre.
5. Migration von Effektorzellen und Monozyten in Gehirnparenchyme gegen einen Gradienten von Chemokinen.
6. Lokale (Re-)Aktivierung von inflammatorischen Zellen.
7. Freisetzung von Vermittlern von Reizung und Zerstörung von Oligodendrozyten und Myelin.

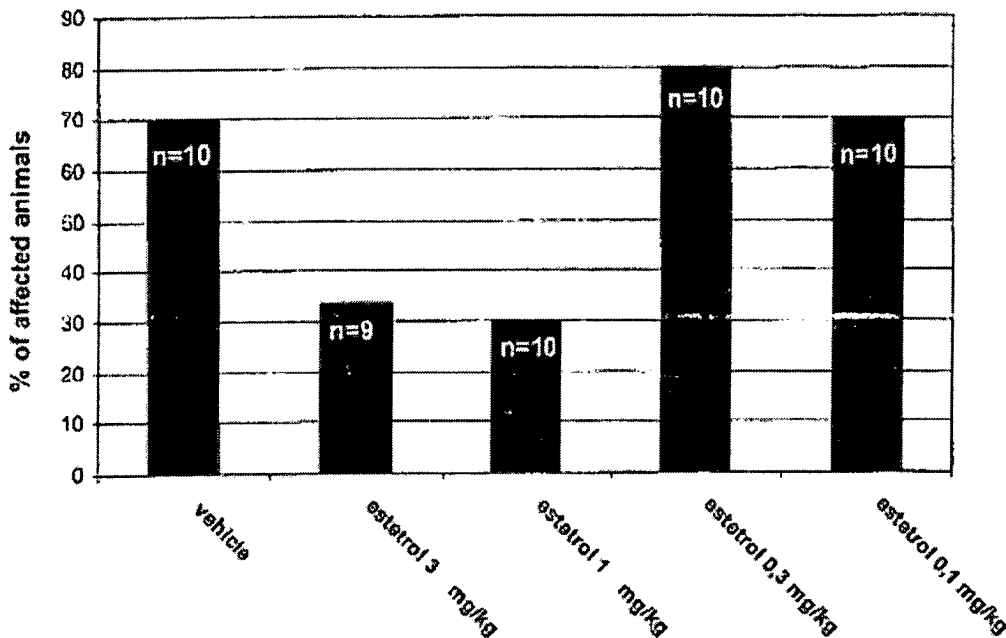
**[0093]** Typischerweise entwickeln 70 bis 90 % der mit Vehikel behandelten SJL/J-Mäuse eine erste Episode der Krankheit zwischen dem 10. und 20. Tag nach der Immunisierung mit PLP<sub>139-151</sub>. Interessanterweise entwickeln etwa 50 % der betroffenen Tiere auch eine zweite EAE-Episode (Rückfall) zwischen dem 28. und 42. Tag.

**[0094]** Die Wirkung der oralen Behandlung mit Östetrol auf EAE wurde in einem 42 Tage langen Studienentwurf unter Anwendung der klinischen Ernsthaftigkeit von EAE (Behinderungs-Score) als Ergebnisparameter beurteilt. Das klinische Score-System, das von Kono et al. entwickelt worden ist (J Exp Med 168, 213–227, 1988) wurde zum Überwachen des Behinderungsgrads im SJL/J-EAE-Modell verwendet: 0 keine Krankheit; 0,5: Schwanzparese oder teilweise -paralyse; 1 vollständige Schwanzparalyse; 2: Paraparese, Gliedmaßen-schwäche und Schwanzparalyse; 2,5: teilweise Gliedmaßenparalyse; 3: vollständige Hinter- oder Vorderbeinparalyse; 3,5: Paraplegie; 4 Quadriplegie, sterbend; 5: Tod aufgrund von EAE. Gruppen, die aus 9 bis 10 weiblichen SJL/J-Mäusen bestanden, wurden einmal täglich oral mit vier verschiedenen Dosen von Östetrol von 3 mg/kg, 1 mg/kg, 0,3 mg/kg und 0,1 mg/kg nach der Krankheitsinduktion durch subkutane Immunisierung mit PLP<sub>139-151</sub> und weiterhin für die gesamte Überwachungsperiode von 42 Tagen behandelt. Eine mit Vehikel behandelte Gruppe (Cavasol; Hydroxypropylbetacyclodextrin) diente als negative Kontrolle.

**[0095]** Weibliche 7 Wochen alte SJL/J-Mäuse wurden von Harlan (Frankreich) erhalten. Vor Beginn der Studie wurden die Mäuse für eine Zeitspanne von zwei Wochen gehandhabt und akklimatisiert und bezüglich der Behandlungsgruppen randomisiert. Die Mäuse wurden durch subkutane Spritzung von 50 µg eines synthetischen Peptids von Proteolipidprotein, d.h. PLP<sub>139-151</sub> (Isogen Bioscience B.V.), das in komplettem Freund-Adjuvans (CFA, H37Ra Charge 2116643, Difco Laboratories, USA) emulgiert worden war, immunisiert. Die Emulsion wurde in den Flanken über 4 Stellen verteilt. Am 3. Tag erhielten die Mäuse eine intravenöse Einspritzung von 109 Bordetella pertussis-Bakterien (National Institute for Public Health, Bilthoven, Niederlande). Von Tag 0 (nach der Immunisierung mit PLP<sub>139-151</sub>) bis zum 42. Tag wurden die Mäuse oral (durch Magensonde) mit 0,2 ml Östetrolösung oder Vehikel (Hydroxypropylbetacyclodextrin in einer Lösung von 20 Gew./Vol.-% in Wasser) folgendem Plan gemäß behandelt: Gruppe A: Vehikel (n = 10); Gruppe B: Östetrol, 3 mg/kg/Tag (n = 9); Gruppe C: Östetrol, 1 mg/kg/Tag (n = 10); Gruppe D: Östetrol, 0,3 mg/kg/Tag (n = 10) und Gruppe E: Östetrol, 0,1 mg/kg/Tag (n = 10). Wo erforderlich, wurde die Dosis auf das Gewicht der Tiere eingestellt, das täglich bestimmt wurde. Für einzelne Mäuse wurde das EAE-Behinderungsscore täglich durchgeführt. Am Ende der Behandlungs- und Überwachungsperiode wurden die Mäuse getötet.

**[0096]** Statistische Analysen wurden durch Analyse der Varianz (ANOVA) durchgeführt, um die Bedeutung der Unterschiede zwischen Behandlungsgruppen und der Vehikelgruppe bezüglich der Behinderungsergebnisparameter zu überprüfen. Jeder Parameter, der durch ANOVA einen signifikanten Unterschied aufzeigte, wurde daraufhin durch post-hoc-LSD- (am wenigsten signifikanter Unterschied) Test überprüft, um zu bestimmen, welche Gruppen verschieden waren ( $P \leq 0,05$  zeigte statistisch signifikante Unterschiede an;  $P > 0,05$  wurde als nicht signifikant betrachtet). Alle statistischen Analysen wurden unter Anwendung eines statistischen Software-Programms SPSS 11.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

**[0097]** Keine klinischen Symptome außer denjenigen, die mit der EAE verbunden waren, wurden bei der Studie beobachtet, was anzeigt, dass Östetrol keine signifikanten Nebenwirkungen verursachte. Die Mäuse wurden dann als von EAE betroffen angesehen, wenn ein kumulatives Score von mindestens 3 innerhalb einer Zeitspanne von 3 aufeinanderfolgenden Tagen erreicht wurde. Dementsprechend entwickelten 70 % der mit Vehikel behandelten Mäuse EAE (Figur 2). Die Behandlung mit 3 mg/kg und 1 mg/kg Östetrol unterdrückte das Auftreten der EAE und führte zu EAE bei 40 % bzw. 33 % der Mäuse (Figur 2). Von den mit 0,3 und 0,1 mg/kg behandelten Mäusen entwickelten 80 % bzw. 70 % EAE.



Figur 2

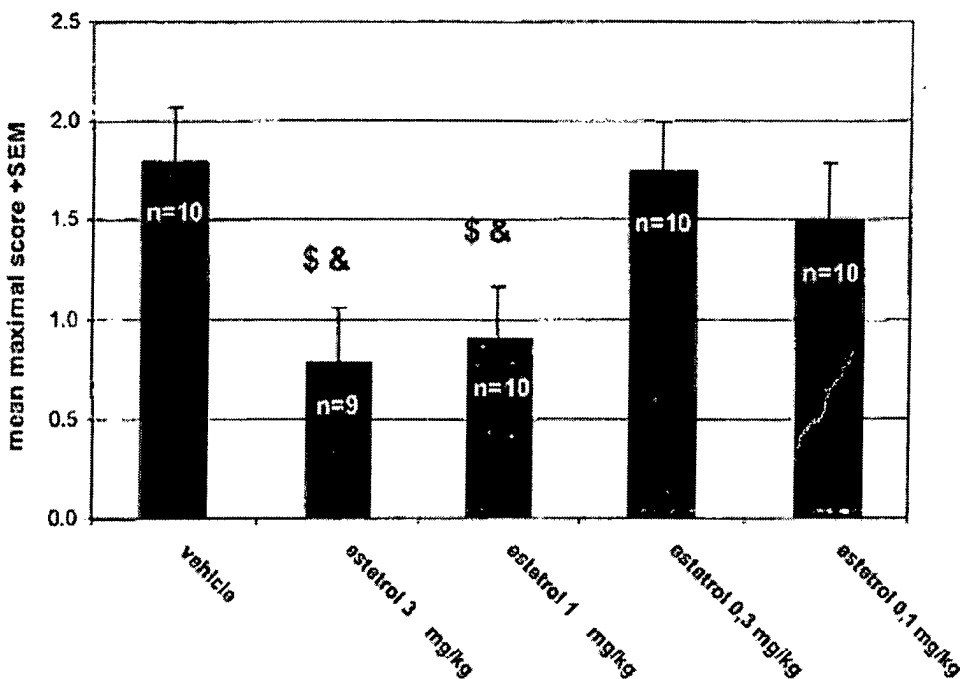
Vehicle = Vehikel  
 Östetrol = Östetrol

Ordinate: % betroffener Tiere

Figur 2: Wirkung der Behandlung mit Östetrol auf das Auftreten von EAE bei SJL/J-Mäusen.

**[0098]** Klinische FAE-Symptome traten am 12. Tag nach der Immunisierung bei mit Vehikel behandelten Mäusen auf. Von den mit den höchsten Dosen von Östetrol (3 und 1 mg/kg) behandelten Mäusen war der durchschnittliche Tag des Einsetzens jeweils um 15,7 bzw. 14,7 Tage verzögert. Die Behandlung mit den beiden niedrigsten Östetrol Dosen (0,3 und 0,1 mg/kg) zeigte ebenfalls einen Trend zum verzögerten Einsetzen der Krankheit im Vergleich mit mit Vehikel behandelten Mäusen auf, dies war jedoch nicht statistisch signifikant.

**[0099]** Bei jeder einzelnen Maus wurde das klinische Maximalscore während der gesamten Überwachungsperiode beurteilt, woraufhin die einzelnen Daten in den Durchschnittswert der Gruppe eingerechnet wurden (Figur 3). Das durchschnittliche maximale klinische Score für mit Vehikel behandelte Mäuse betrug  $1,8 \pm 0,3$ . Die Behandlung mit 3 und 1 mg/kg Östetrol unterdrückte das durchschnittliche maximale Behinderungsscore und führte zu Scores von  $0,8 \pm 0,3$  bzw.  $0,9 \pm 0,3$ . Die Behandlung mit den beiden niedrigsten Dosen von Östetrol (0,3 und 0,1 mg/kg) zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich mit mit Vehikel behandelten Mäusen auf. Auf der Basis des ANOVA-Vergleichs zwischen Behandlungsgruppen und der post-hoc-LSD-Analyse wird daher der Schluss gezogen, dass die orale Behandlung mit Östetrol zu einer statistisch signifikanten Hemmung des maximalen Behinderungsscores der EAE auf dosisabhängige Weise im Vergleich mit mit Vehikel behandelten Mäusen ( $P = 0,011$  und  $P = 0,021$  bei 3 mg/kg bzw. 1 mg/kg Östetrol) führt.



Figur 3

Vehicle = Vehikel  
Östetrol = Östetrol

Abszisse: durchschnittliches maximales Score + SEM

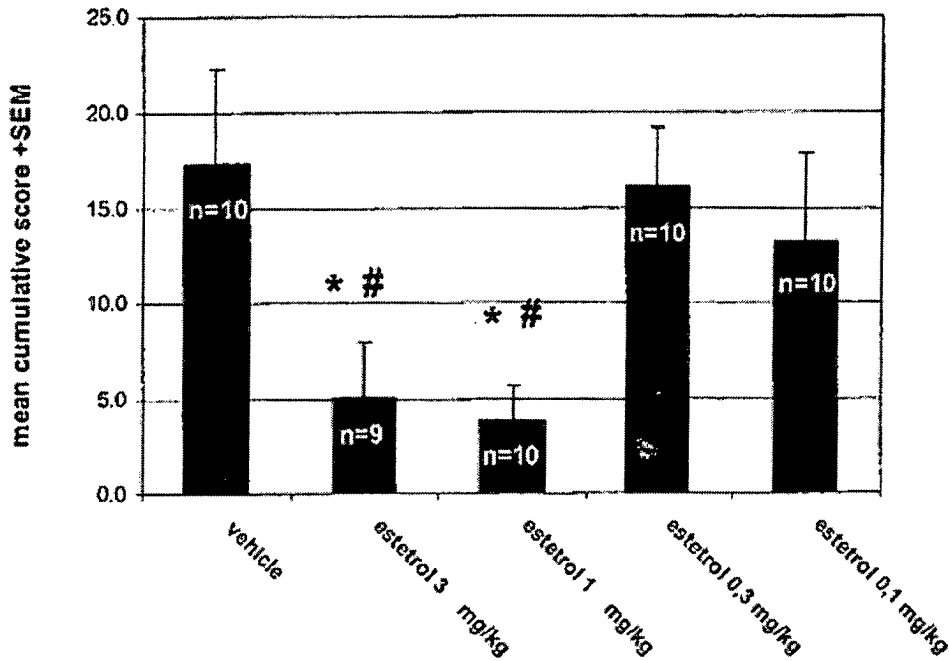
Figur 3: Wirkung der Behandlung mit Östetrol auf das maximale EAE-Score bei SJL/J-Mäusen.

\$  $P = 0,011$  (Östetrol 3 mg/kg) und  $P = 0,021$  (Östetrol 1 mg/kg im Vergleich mit Vehikel

&  $P = 0,016$  (Östetrol 3 mg/kg) und  $P = 0,029$  (Östetrol 1 mg/kg) im Vergleich mit 0,3 mg/kg Östetrol

**[0100]** Das relevanteste klinische Ergebnis der Studie, d.h. die kumulativen Behinderungsscores einzelner Mäuse, sind als Gruppenschnittwerte in Figur 4 für die vollständige Überwachungszeitspanne (Tag 0–42) dargestellt. Beim Analysieren wird klar, dass mit Vehikel behandelte Mäuse über die gesamte Behandlungs- und Überwachungszeitspanne eine durchschnittliche kumulative EAE von  $17,4 \pm 5,0$  entwickelten, während die Behandlung mit 3 und 1 mg/kg Östetrol das durchschnittliche kumulative EAE-Score auf  $5,8 \pm 2,9$  bzw.  $3,9 \pm 1,8$  reduzierte (Figur 3). Die Behandlung mit den beiden niedrigsten Dosen von Östetrol (0,3 und 0,1 mg/kg) zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich mit mit Vehikel behandelten Mäusen auf. Auf der Basis des ANOVA-Vergleichs zwischen Behandlungsgruppen und der post-hoc-LSD-Analyse wird daher der Schluss gezogen, dass die orale Behandlung mit Östetrol eine statistisch signifikante Hemmung des kumulativen Behinderungsscores von EAE auf dosisabhängige Art und Weise im Vergleich mit mit Vehikel behandel-

ten Mäusen ( $P = 0,025$  und  $P = 0,012$  für 3 mg/kg bzw. 1 mg/kg Östetrol) aufzeigt.



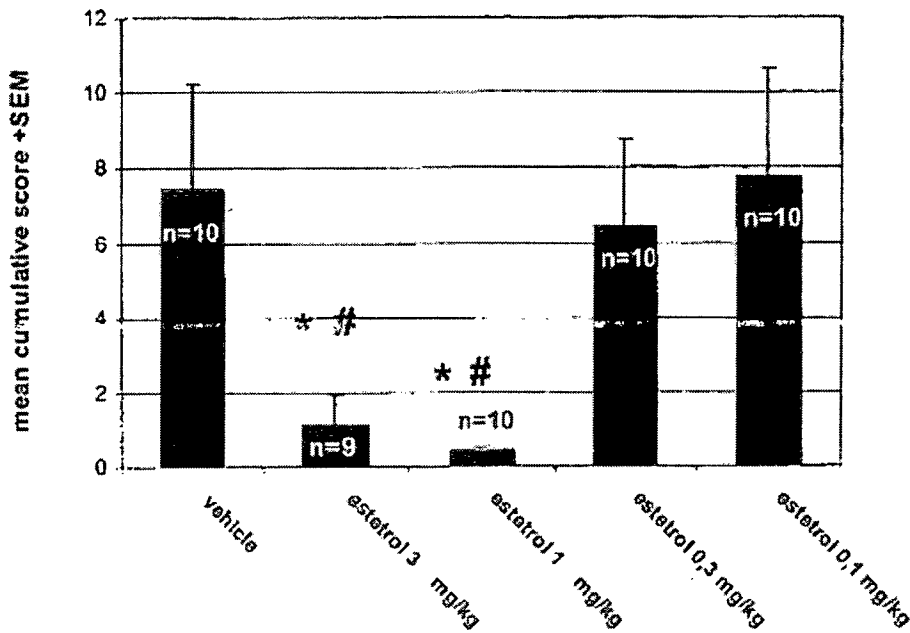
Figur 4

Vehicle = Vehikel  
Östetrol = Östetrol

Ordinate: durchschnittliches maximales Score + SEM

Figur 4: Wirkung der Behandlung mit Östetrol auf das maximale EAE-Score (0–41. Tag) bei SJL/J-Mäusen. \$  $P = 0,025$  (Östetrol 3 mg/kg) und  $P = 0,012$  (Östetrol 1 mg/kg im Vergleich mit Vehikel &  $P = 0,042$  (Östetrol 3 mg/kg) und  $P = 0,022$  (Östetrol 1 mg/kg) im Vergleich mit 0,3 mg/kg Östetrol

**[0101]** Wie für das PLP<sub>139-151</sub>-EAE-Modell bei SJL/J-Mäusen typisch ist, entwickelte eine beträchtliche Anzahl von Kontrollmäusen, die nur mit Vehikel behandelt wurden, eine zweite Krankheitsepisode (Rückfall). Die Beurteilung der zweiten Phase der Krankheitsaktivität, d.h. das klinische EAE-Score vom 26. Tag bis zum 42. Tag, zeigte, dass Mäuse, die mit 3 mg/kg und 1 mg/kg Östetrol behandelt wurden, kaum Anzeichen einer Krankheitsaktivität aufwiesen im Gegensatz zu mit Vehikel behandelten Mäusen und den anderen Behandlungsgruppen (Figur 5). Auf der Basis des ANOVA-Vergleichs zwischen Behandlungsgruppen und der post-hoc-LSD-Analyse wird daher der Schluss gezogen, dass die orale Behandlung mit Östetrol eine statistisch signifikante Hemmung von EAE-Rückfällen auf dosisabhängige Art und Weise im Vergleich mit mit Vehikel behandelten Mäusen ( $P = 0,045$  und  $P = 0,023$  für 3 mg/kg bzw. 1 mg/kg Östetrol) aufzeigt.



Figur 5

Vehicle = Vehikel

Östetrol = Östetrol

Ordinate: durchschnittliches maximales Score + SEM

Figur 5: Wirkung der Behandlung mit Östetrol auf das kumulative klinische EAE-Score während der Rückfallphase (26.–42. Tag) bei SJL/J-Mäusen.

\$ P = 0,045 (Östetrol 3 mg/kg) und P = 0,023 (Östetrol 1 mg/kg im Vergleich mit Vehikel

& P = 0,050 (Östetrol 3 mg/kg) und P = 0,018 (Östetrol 1 mg/kg) im Vergleich mit 0,3 mg/kg Östetrol

**[0102]** Diese Daten zeigen, dass Östetrol, wenn es oral in einer Menge verabreicht wird, die wirksam ist, um auch endokrine Parameter (insbesondere die Vaginalverhornung) zu modifizieren, erstaunlicherweise die klinische Entwicklung der EAE unterdrückt. Außerdem mildert Östetrol die Symptome bei Tieren, die von der EAE betroffen sind und verhindert, dass die Tiere einen Krankheitsrückfall mit schweren Krankheitssymptomen entwickeln.

#### Beispiel 7

**[0103]** Die Fähigkeit von Östetrol (Ö4), die Symptome und Ernsthaftigkeit von immunvermittelten krankhaften Störungen zu mildern, wird in B10.PL-Mäusen mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE), einer Entzündungskrankheit, die durch Induktion von autoreaktiven T-Lymphozyten ausgelöst wird und als Modell der Multiplen Sklerose (MS) beim Menschen in großem Umfang studiert worden ist, beurteilt.

**[0104]** 8–12 Wochen alte weibliche B10.PL-Mäuse werden von Jackson Laboratories (Bar Harbor, Me.) erhalten und in Behandlungsgruppen von 12 Mäusen geteilt. Drei Tage vor der Induktion der EAE-Krankheit werden die Tiere mit Hilfe von Ketamin/Xylazin-Betäubungsmischung betäubt und ovariumektomiert. Die Ovarien werden nach einem einzigen Einschnitt durch die Rückenhaut und einen bilateralen Flankeneinschnitt durch die Gebärmutter entfernt.

**[0105]** Myelinbasenprotein (MBP) wird aus dem Rückenmark von Meerschweinchen der Vorgehensweise von Deibler et al. (Deibler, G.E. et al., Prep. Biochem. 2:139, 1972) isoliert. MBP wird im lyophilisierten Zustand bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und vor der Verwendung in 0,1 M Essigsäure in einer Konzentration von 8 mg/ml gelöst. Für Immunisierungen wird MBP in einem gleichen Volumen von komplettem Freund-Adjuvans (CFA), das Mycobacterium tuberculosis H.sub.37 Ra (4 mg/ml) enthält, emulgiert.

**[0106]** Zum Induzieren der EAE werden die Mäuse durch die Haut unten am Schwanz mit 400  $\mu\text{g}$  MBP in einer Emulsion von CFA (0,1 ml), die Mycobacterium tuberculosis H.sub.37 Ra enthält, immunisiert. Sofort nach der MBP-Immunisierung und 48 Stunden später werden die Mäuse zusätzlich intraperitoneal mit 200 ng Pertussistoxin (Sigma, St. Louis, MO) injiziert. Die Mäuse werden täglich auf klinische Anzeichen von EAE 40 Tage

lang untersucht und die Krankheitssymptome werden Clayton et al. (J. Exp. Med. 169:1681, 1989) entsprechend gescored: 0 keine Paralyse, 1 Schwanz schlaff/langsam/trübe Augen, 2: teilweise Hinterbeinparalyse oder Schwäche der Beine, 3: Schwierigkeit beim Umdrehen, starke Schwäche der Beine oder milde Paralyse, 4 starke bis totale Paralyse, 5: moribund/tot.

**[0107]** Die Studie umfasst ein kombiniertes Präventions/Therapeutikprotokoll, bei dem den Mäusen verschiedene Mengen Ö4 von Tag 1 der Studie (Tag der MBP-Immunsierung) bis zu und einschließlich Tag 40 verabreicht werden. Vier Gruppen von Mäusen werden oral einmal täglich mit Ö4 (0, 1, 0, 3, 0, 0 oder 3, 0 mg/kg/Tag) behandelt und eine Gruppe von Mäusen, die einmal täglich eine orale Behandlung mit Vehikel (20 Gew./Vol.-% Hydroxypropylbetacyclodextrin) erhalten, dient als negative Kontrolle. Gleichermaßen umfasst die Studie des Weiteren vier Gruppen von Mäusen, die einmal täglich subkutan mit Ö4 (0, 1, 0, 3, 1, 0 oder 3, 0 mg/kg/Tag) behandelt werden und eine Gruppe von Mäusen, die einmal täglich eine subkutane Behandlung mit Vehikel (20 Gew./Vol.-% Hydroxypropylbetacyclodextrin) erhalten, als negative Kontrolle.

**[0108]** Weder die orale noch die subkutane Behandlung mit Vehikel ist wirksam, die Entwicklung der EAE-Krankheit bei mit MBP-immunisierten Mäusen zu verhindern. Typischerweise weisen die Tiere ein schnelles Einsetzen der Krankheitssymptome auf und entwickeln zunehmend weitere Anzeichen der Autoimmunkrankheit im Laufe der Beurteilungszeitspanne. Am 40. Tag leiden die meisten Tiere an schweren Formen von EAE (typischerweise einer Einstufung von 3 oder mehr). Interessanterweise zeigt die subkutane und orale Behandlung mit Ö4 dosisabhängige Auswirkungen bezüglich des Verzögerns des Einsetzens von EAE-Krankheitssymptomen auf und verhindert eine ernsthafte Entwicklung der Autoimmunkrankheit im Laufe einer 40-tägigen Beurteilungszeitspanne. Der Vergleich der Behandlungsgruppen mit den Kontrollgruppen bringt zum Vorschein, dass die Anzahl befallener Tiere und/oder die Schwere der EAE-Symptome über den bei mit Ö4 behandelten Mäusen untersuchten Dosisbereich dosisabhängig reduziert werden.

**[0109]** Die Studie wird getrennt mit nichtkastrierten weiblichen B10.PL- und männlichen B10.PL-Mäusen wiederholt, wodurch wiederum die Fähigkeit von Ö4 bewiesen wird, die Symptome und Ernsthaftigkeit der EAE nach täglicher subkutaner und/oder oraler Verabreichung dosisabhängig zu mildern.

#### Beispiel 8

**[0110]** Die Fähigkeit von Östetrol, die Ernsthaftigkeit von immunvermittelten krankhaften Störungen zu mildern, und seine möglichen Nebenwirkungen wurden beurteilt und mit Dexamethason bei Mäusen verglichen, die durch collageninduzierte Arthritis (CIA) entwickelten, was ein anderes experimentelles System einer chronischen inflammatorischen Autoimmunkrankheit ist, die menschliche Arthritiskrankheiten, insbesondere rheumatoide Arthritis (RA), darstellt.

**[0111]** Arthritis wurde durch Anwendung eines Zweistufenimmunisierungsprotokolls (Joosten et al., „Dual role of IL-12 in early and late stages of murine Collagen type II arthritis (Die Doppelrolle von IL-12 in den Früh- und Spätstadien der murinen Collagen Typ II-Arthritis)". J Immunol 1997;159:4094–4102; Joosten et al., „IL-1 $\beta$  blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF $\alpha$  blockade only ameliorates joint inflammation (Die IL-1 $\beta$ -Blockade verhindert die Knorpelgewebe- und Knochenzerstörung bei durch murines Collagen vom Typ II induzierter Arthritis, während die TNF $\alpha$ -Blockade nur die Gelenkentzündung verbessert)". J Immunol 1999;163:5049–55) in männlichen DBA/1-Mäusen induziert. Dieser Stamm ist für CIA, die durch Rindercollagen vom Typ II induziert wird, stark anfällig. Am Tag 0 wurden die Mäuse mit Rindercollagen vom Typ II (100  $\mu$ g), das in komplettem Freund-Adjuvans emulgiert worden war, immunisiert (vier subkutane Einspritzungen in den Rücken). Am Tag 21 wurde den Mäusen i.p. eine Auffrischungsspritzung von 100  $\mu$ g in PBS verdünntem Collagen vom Typ II verabreicht.

**[0112]** Die Wirkung der oralen Behandlung mit Östetrol bei collageninduzierter Arthritis wurde in einem 6 Wochen langen Studienprogramm studiert. Vom 22. Tag bis zum Ende der Studie (42. Tag) wurden die Tiere einmal täglich mit Vehikel (Lösung von 20 Gew./Vol.-% Hydroxypropylbetacyclodextrin in Wasser) behandelt, wobei sie als negative Kontrolle dienten, oder vier verschiedenen Dosen von Östetrol (3 mg/kg, 1 mg/kg, 0, 3 mg/kg und 0, 1 mg/kg). Dexamethason (1 mg/kg) wurde als positive Kontrolle gewählt, weil es ein gründlich untersuchtes Kortikosteroid ist, das Schwellung und Entzündung reduziert und bei einer Reihe verschiedener krankhafter Störungen wie Hautkrankheiten (Schuppenflechten, Nesselsucht), allergischen Zuständen, Atmungsproblemen, Krebs, Blutkrankheiten (Anämie), Verdauungsproblemen, Augenbeschwerden und zur Behandlung von Arthritis verwendet wird. Obwohl es als Entzündung hemmendes Mittel wirksam ist, ist Dexamethason auch dafür bekannt, eine Anzahl von Nebenwirkungen auszulösen, die unter anderem beim Menschen die Induzierung von Osteoporose, reduzierter Nebennierenfunktion, Schwindel, Übelkeit, Verdauungsstörun-

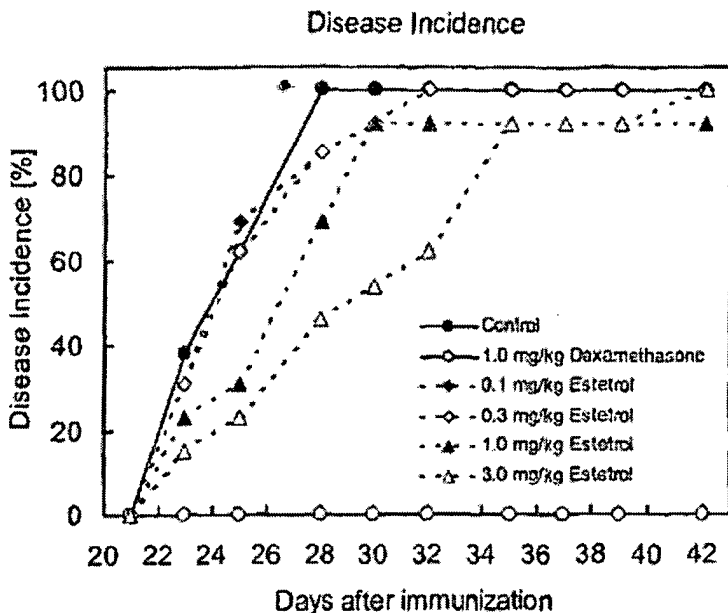


gen, erhöhten Appetit, Gewichtszunahme aufgrund von Wasserretention, Schwäche und/oder Schlafstörungen einschließen. Außerdem führt die systemische Dexamethasonbehandlung bei Nagetieren zu starken katabolischen Auswirkungen, die ohne Weiteres als Gewichtsabnahme zu beobachten sind (Orzechowski et al. 2002 „Rats with a glucocorticoid-induced catabolic state show symptoms of oxidative stress and spleen atrophy: the effects of age and recovery (Ratten in einem durch Glucokortikoid induzierten katabolischen Zustand weisen Symptome von oxidativem Stress und Milzatrophy auf: Die Wirkungen des Alters und Genesung)“ J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med; 49:256–63).

**[0113]** Alle bei der Studie benutzten Gruppen bestanden aus 13 Mäusen. Während der Studie wurden die Tiere gewogen und auf klinische Anzeichen von Arthritis hin überwacht. Das Scoren der Ernsthaftigkeit der Erkrankung (klinisches Arthritis-Score) wurde dem von Joosten et al. 1997 beschriebenen Scoresystem (J. Immunol., 159:4094–4102) und Joosten et al. 1999 (J. Immunol., 163:5049–55) entsprechend durchgeführt.

**[0114]** Grundlegende statistische Analysen wurden wie folgt durchgeführt: Die Signifikanz von Unterschieden zwischen allen Behandlungsgruppen bei den klinischen Hauptergebnisparametern wurde unter Anwendung der Varianzanalyse (ANOVA) geprüft. Ruf jede signifikante ANOVA hin wurden post hoc-Tukey-Tests durchgeführt, um die Signifikanz des Unterschieds zwischen jeder Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe zu bestimmen. Des Weiteren wurde die lineare Regressionsanalyse zum Studieren der Dosisabhängigkeit der Auswirkungen der Behandlung mit Östetrol verwendet. Alle statistischen Analysen wurden unter Anwendung des statistischen Software-Programms SPSS 10.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

**[0115]** Die mit Vehikel behandelten Tiere (Kontrollen) entwickelten alle kurz nach der zweiten Immunisierung mit Collagen vom Typ II am 21. Tag Arthritis. Der Durchschnittstag des Einsetzens der Krankheit bei mit Vehikel behandelten Mäusen war  $25,4 \pm 0,64$  Tage und erreichte ein Auftreten der Krankheit von 100 % am 28. Tag (Figur 6). Auf die Auffrischungsspritze am 21. Tag hin entwickelte keines der mit Dexamethason behandelten Tiere (positive Kontrolle) Arthritis vor Ende der Studie. Bei dieser Behandlungsgruppe betrug das Auftreten der Krankheit 0 % bis zum 42. Tag (Figur 6). Durch dosisabhängige Behandlung mit Östetrol wurde der durchschnittliche Tag des Auftretens der Krankheit auf den Tag 25,8, 26,0, 28,2 und 30,7 bei den mit 0,1, 0,3, 1,0 und 3,0 mg/kg Östetrol-behandelten Gruppen verzögert. Diese Wirkung ist auch in Figur 6 zu sehen, wobei die Erhöhung des Auftretens der Krankheit bei den 1,0 mg und 3,0 mg/kg Östetrolgruppen im Vergleich mit der Kontrollgruppe mit Vehikel behandelte Tiere klar verzögert ist.



Figur 6

Auftreten der Krankheit

Abszisse: Tage nach der Immunisierung

Ordinate: Auftreten der Krankheit [%]

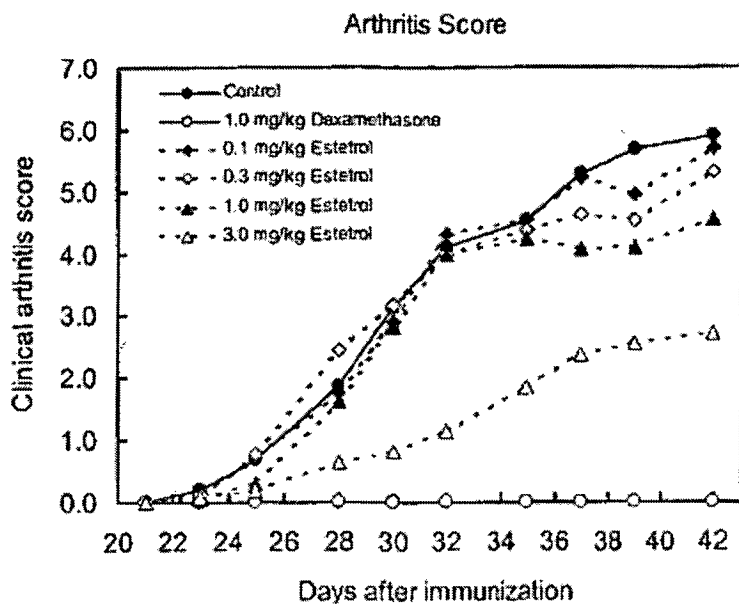
Kontrolle

1,0 mg/kg Dexamethason

0,1 mg/kg Östetrol

[0116] Figur 6: Die Wirkung der Behandlung mit Östetrol auf das Auftreten der Krankheit bei Maus-CIA, das das Auftreten der Krankheit bei allen studierten Behandlungsgruppen in Abhängigkeit von der Zeit zeigt. „Krankheit“ wurde als makroskopisches Arthritis score von  $> 0$  definiert.

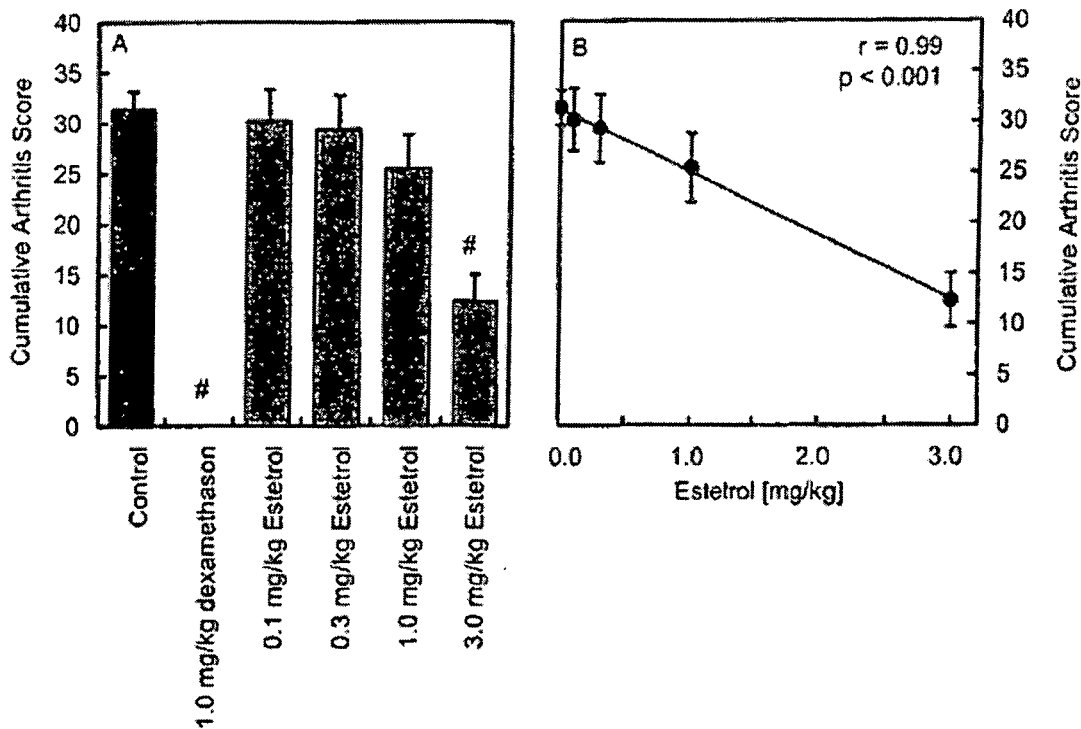
[0117] Das makroskopische Arthritis score stieg bei mit Vehikel behandelten Mäusen ununterbrochen an und erreichte ein Durchschnittsscore von  $5,90 \pm 0,38$  am 42. Tag (Figur 7). Über die gesamte Beobachtungszeit-spanne betrug das durchschnittliche kumulative Arthritis score (vom 21. bis 42. Tag) bei mit Vehikel behandelten Mäusen  $31,4 \pm 1,73$  (Figur 8). Da sich bei mit Dexamethason behandelten Tieren keine Krankheit entwickelte, blieb das makroskopische Arthritis score bis zum 42. Tag bei 0 (Figur 7). Aus diesem Grund betrug das durchschnittliche kumulative Arthritis score (vom 21. bis 42. Tag) bei mit Dexamethason behandelten Tieren ebenfalls 0 (Figur 8). Des Weiteren war dem verzögerten Auftreten von Arthritis entsprechend die Entwicklung des makroskopischen Arthritis score bei Mäusen, die Östetrol erhielten, dosisabhängig reduziert (Figur 7). GleichermäÙen war das durchschnittliche kumulative Arthritis score (21. bis 42. Tag) bei mit Östetrol behandelten Tieren dosisabhängig reduziert und im Vergleich mit mit Vehikel behandelten Tieren signifikant verschieden (Figur 8A und 8B).



Figur 7

Abszisse: Tage Nach der Immunisierung  
 Ordinate: klinisches Arthritis score  
 Arthritis Score = Arthritis score

Figur 7: Die Wirkung der Behandlung mit Östetrol auf das makroskopische Arthritis score bei Maus-CIA. Jeder Punkt stellt den Gruppendurchschnitt ( $n = 13$ ) dar.

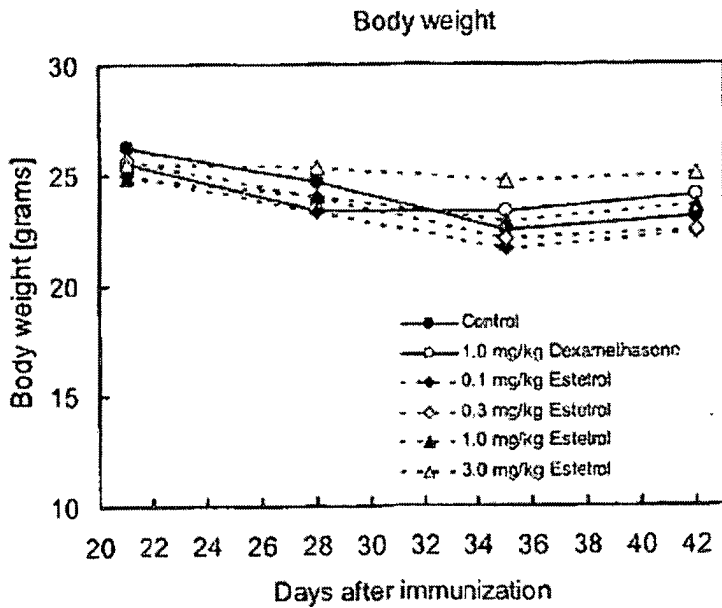


Linke Darstellung:  
 Cumulative Arthritis Score = Kumulatives Arthritiscore  
 Control = Kontrolle  
 Dexamethasone = Dexamethason  
 Östetrol = Östetrol

Rechte Darstellung:  
 Cumulative Arthritis Score = Kumulatives Arthritiscore Östetrol

Figuren 8A und 8B: Die Wirkung der Behandlung mit Östetrol auf das kumulative Arthritiscore bei Maus-CIA. Bei jeder Maus wurde das kumulative Score durch Zusammenzählen der Scores, die bei jedem der 10 Zeitpunkte erhalten wurden, errechnet. Abbildung A: Die Gruppendaten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 13$ ) dargestellt. Abbildung B: Lineare Regression der Östetrol-dosis in Abhängigkeit vom kumulativen Arthritiscore. # bedeutet  $p < 0,001$  im Vergleich mit der Kontrolle auf der Basis von ANOVA- und Tukey post hoc-Tests.

**[0118]** Als zusätzlichen klinischen Endpunkt für die Ernsthaftigkeit der Krankheit und/oder arzneimittelinduzierte Nebenwirkungen wurden die Körpergewichte wöchentlich gemessen. Das Körpergewicht der mit Vehikel behandelten Tiere (negative Kontrolle) fiel auf 94,2 %, 85,7 % und 87,9 % des ursprünglichen Gewichts (am 21. Tag) am 28., 35. bzw. 42. Tag ab (Figur 9). Auf die Behandlung mit Dexamethason hin fiel das Körpergewicht ebenfalls auf 91,5 %, 91,4 % und 94,0 % des anfänglichen Gewichts (am 21. Tag) am 28., 35. bzw. 42. Tag ab (Figur 9). Die Gewichtsabnahme bei oral mit Östetrol behandelten Mäusen war mit den negativen und positiven Kontrolltiergruppen bei den niedrigeren Dosen (0,1, 0,3 und 1,0 mg/kg) vergleichbar. Jedoch schützte die höchste Östetrol-dosis (3,0 mg/kg) Mäuse gegen Gewichtsabnahme: das Körpergewicht der Mäuse in dieser Gruppe fiel nur auf 99,3 %, 96,7 % und 97,9 % des ursprünglichen Gewichts (am 21. Tag) am 28., 35. bzw. 42. Tag ab (Figur 9), was anzeigt, dass weder die Arthritis noch arzneimittelinduzierte Nebenwirkungen (wie sie beispielsweise bei Dexamethason zu sehen sind) die mit der Dosis von 3,0 mg/kg behandelten Tiere negativ beeinflusste.



Figur 9

Abzisse: Tage nach der Immunisierung  
 Ordinate: Körpergewicht [Gramm]  
 Body weight = Körpergewicht

Kontrolle  
 Dexamethason  
 Östetrol

**[0119]** Figur 9: Die Auswirkung der Behandlung mit Östetrol auf das Körpergewicht bei Maus-CIA. Die Mäuse wurden pro Gruppe am 21., 28., 35. und 42. Tag gewogen.

**[0120]** Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass Östetrol, das oral in einer Menge verabreicht wird, die wirksam ist, auch endokrine Parameter (z.B. Vaginalverhornung) zu modifizieren, erstaunlicherweise die Entwicklung von Arthritis sowie die Ernsthaftigkeit der Arthritis bei CIA unterdrückt. Als solches kann Östetrol eine therapeutische Möglichkeit gegen Arthritis sein, ohne die Nebenwirkungen aufzuweisen, die bei den zur Zeit verfügbaren Arzneimitteln, z.B. Dexamethason, zu sehen sind.

#### Beispiel 9

**[0121]** Die Fähigkeit von Östetrol (Ö4), die Symptome und Ernsthaftigkeit von immunvermittelten krankhaften Störungen zu mildern, wird noch weiter in ovariectomierten Mäusen, die durch Collagen induzierte Arthritis (CIA) entwickeln, beurteilt.

**[0122]** Weibliche DBA-1-Mäuse im Alter von 8–12 Wochen zu Beginn der Versuche werden in Behandlungsgruppen von 12 Mäusen geteilt. Drei Tage vor der CIA-Krankheitsinduktion werden die Tiere unter Anwendung einer Ketamin/Xylazin-Betäubungsmischung betäubt und ovariectomiert. Die Ovarien werden nach einem einzigen Einschnitt durch die Rückenhaut und einem bilateralen Flankeneinschnitt durch die Gebärmutter entfernt.

**[0123]** Rindercollagen vom Typ II (CII) wird dem Protokoll von Wooley et al. (J. Exp. Med. 154:688–700, 1981) gemäß isoliert und gereinigt. Vor der Anwendung wird CII zuerst in 0,1 M Essigsäure in einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst und dann mit komplettem Freund-Adjuvans (CFA), das Mycobacterium tuberculosis H.sub.37 Ra (4 mg/ml) enthält 1:1 emulgiert oder für die Erfrischungsimpfung mit inkomplettem Freund-Adjuvans (IFA) 1:1 emulgiert.

**[0124]** Zum Induzieren der CIA werden die Mäuse mit 0,1 ml der in CFA zubereiteten Emulsion unten am Schwanz immunisiert. Einundzwanzig Tage später erhalten die Tiere eine Auffrischungsimpfung mit 0,1 ml der in IFA zubereiteten Emulsion. Die Mäuse werden täglich auf klinische Anzeichen von CIA vom Anfang des Experiments bis zum Abschluss am 60. Tag nach der ersten Immunisierung untersucht. Klinische Zeichen von

CIA werden Wooley et al. (J. Exp. Med. 154:688–700, 1981) gemäß unter Anwendung einer Skala von 0 bis 3 für jede Pfote gescored: 0: keine Arthritis; 1: Röte und Anschwellung in der Pfote oder den Zehen; 2: starkes Anschwellen oder Deformität der Pfote und 3: Ankylose. Ein arthritisches Score für jede Maus wird durch Zusammenzählen der Scores für alle Pfoten erhalten. Für jede Maus kann die mögliche Ernsthaftigkeit, wie durch das arthritische Score gemessen, im Bereich von 0 bis 12 liegen.

**[0125]** Ein kombiniertes Prävention-/Therapeutikprotokoll wird verwendet, bei dem den Mäusen verschiedene Mengen von Ö4, beginnend am 1. Tag der Studie (Tag der erste CII-Immunsierung) bis zu einschließlich dem 60. Tag verabreicht werden. Vier Gruppen von Mäusen werden einmal täglich mit Ö4 (0,1, 0,3, 1,0 oder 3,0 mg/kg/Tag) behandelt und eine Gruppe von Mäusen, die täglich einmal oral eine Behandlung mit Vehikel (20 Gew./Vol.-% Hydroxypropylbetacyclodextrin) erhalten, dient als negative Kontrolle. Desgleichen umfasste die Studie des Weiteren vier Gruppen von Mäusen, die subkutan einmal täglich mit Ö4 (0,1, 0,3, 1,0 oder 3,0 mg/kg/Tag) behandelt wurden und eine Gruppe von Mäusen, die täglich einmal eine subkutane Behandlung mit Vehikel (20 Gew./Vol.-% Hydroxypropylbetacyclodextrin) erhalten, als negative Kontrollgruppe.

**[0126]** Weder die orale noch die subkutane Behandlung mit Vehikel ist wirksam, die Entwicklung der CIA-Krankheit bei mit CII immunisierten Mäusen zu verhindern. Mit Vehikel behandelte Mäuse weisen typischerweise ein schnelles Einsetzen von Krankheitssymptomen auf und entwickeln weitere Anzeichen von CIA im Laufe der Beurteilungszeitspanne. Am 60. Tag leiden die meisten der Tiere an schweren Formen von CIA (typischerweise Einstufung 4 oder mehr). Interessanterweise zeigen die subkutane und orale Ö4-Behandlung dosisabhängige Auswirkungen, indem sie das Einsetzen von CIA-Symptomen verzögern und eine fortschreitende Entwicklung zu ernsthafteren Formen der Gelenkzerstörung über eine Beurteilungszeitspanne von 60 Tagen verhindern. Ein Vergleich der Behandlungsgruppen mit den Kontrollgruppen zeigt, dass die Anzahl betroffener Tiere und/oder die Ernsthaftigkeit von CIA-Symptomen bei mit Ö4 behandelten Mäusen dosisabhängig reduziert ist.

**[0127]** Die Studie wird getrennt mit nichtkastrierten weiblichen DBA-1 wiederholt, was wiederum die Fähigkeit von Ö4 beweist, Symptome und die Ernsthaftigkeit von CIA nach täglicher subkutaner und/oder oraler Verabreichung dosisabhängig zu mildern.

#### Beispiel 10

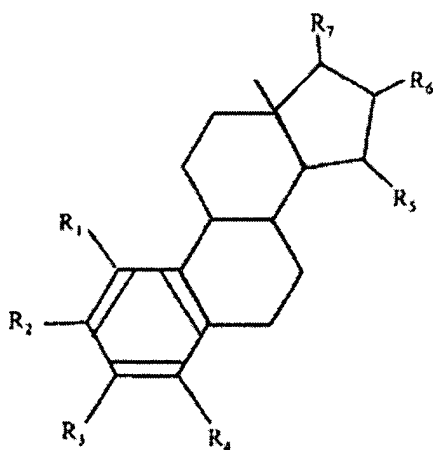
**[0128]** Zubereitung von 100 Kapseln, die 2 mg Östetrol und 2 mg Dexamethason pro Kapsel enthalten: 200 mg Östetrol, 200 mg Dexamethason (als Dinatriumphosphatsalz) und 75 mg kolloidales Siliciumdioxid (Aerosil® 200V) werden miteinander gemischt. Die dabei gebildete Pulvermischung wird in einen Becher mit einer Volumenangabe überführt. Das Volumen wird mit mikrokristalliner Cellulose (Avicel® PH102) auf 37 ml eingestellt. Daraufhin wird die Pulvermischung in 100 aus zwei Stücken bestehende harte Gelatinkapseln (Capsugel® 2) eingefüllt.

#### Beispiel 11

**[0129]** Zubereitung von 100 Kapseln, die 2 mg Östetrol und 3 mg Methotrexat pro Kapsel enthalten: 200 mg Östetrol, 300 mg Methotrexat (als Dinatriumsalz) und 75 mg kolloidales Siliciumdioxid (Aerosil® 200V) werden miteinander gemischt. Die so erhaltene Pulvermischung wird in einen Becher mit einer Volumenangabe überführt. Das Volumen wird mit mikrokristalliner Cellulose (Avicel® PH102) auf 37 ml eingestellt. Die so erhaltene Pulvermischung wird in 100 aus zwei Stücken bestehende harte Gelatinkapseln (Capsugel® 2) eingefüllt.

### Patentansprüche

1. Verwendung einer östrogenen Komponente ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: Substanzen, i die durch die folgende Formel dargestellt sind:



in welcher Formel  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  unabhängig ein Wasserstoffatom, eine Hydroxylgruppe oder eine Alkoxygruppe mit 1–5 Kohlenstoffatomen sind; jedes von  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  eine Hydroxylgruppe ist; nicht mehr als 3 von  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  Wasserstoffatome sind;

Vorläufer, die in der Lage sind, eine der oben erwähnten Formel entsprechende Substanz freizusetzen, wenn sie bei dem vorliegenden Verfahren verwendet werden, welche Vorläufer Derivate östrogenen Substanzen sind, wobei das Wasserstoffatom von mindestens einer der Hydroxylgruppen durch ein Acylradikal einer Kohlenwasserstoffcarbonsäure, -sulfonsäure oder -sulfaminsäure mit 1–25 Kohlenstoffatomen substituiert ist; Tetrahydrofuran-yl; Tetrahydropyranal oder einem geradkettigen oder verzweigt-kettigen glycosydischen Rest, der 1–20 glycosydische Einheiten pro Rest enthält; und Mischungen von einer oder mehreren der oben erwähnten Substanzen und/oder Vorläufer; wobei die östrogene Komponente eine  $8\beta$ -,  $9\alpha$ -,  $13\beta$ -,  $14\alpha$ -Konfiguration des Steroidskeletts aufweist,

bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung oder Prävention einer immunvermittelten krankhaften Störung bei einem Säuger, wobei die immunvermittelte krankhafte Störung aus der Gruppe ausgewählt ist bestehend aus Autoimmunkrankheiten; rheumatoider Arthritis; Osteoarthritis; insulinabhängiger Diabetes (Typ-I-Diabetes); systemischem Lupus Erythrematosus; Schuppenflechte; von Immunpathologien, die durch infektiöse Agenten induziert werden; Virusinfektionen oder bakteriellen Infektionen; Tuberkulose; lepromatöser Lepra; Transplantatabstoßung; Transplantat-Wirt-Reaktion; atopische Zustände; Bindehautentzündung und Glomerulonephritis und die Verwendung die Verabreichung dem Säuger einer therapeutisch wirksamen Menge der östrogenen Komponente umfasst.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei  $R_3$  eine Hydroxylgruppe oder eine Alkoxygruppe darstellt.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei mindestens 3 der Gruppen  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  und  $R_4$  Wasserstoffatome darstellen.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–3, wobei die Verwendung die ununterbrochene Verabreichung der östrogenen Komponente während einer Zeitspanne von mindestens 5 Tagen, bevorzugt von mindestens 30 Tagen, umfasst.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–4, wobei die Verwendung die orale oder subkutane Verabreichung der östrogenen Komponente umfasst.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die Verwendung die orale Verabreichung umfasst.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–6, wobei die östrogene Komponente in einer Menge von mindestens  $1 \mu\text{g}$  pro kg Körpergewicht pro Tag, bevorzugt von mindestens  $5 \mu\text{g}$  pro kg Körpergewicht pro Tag verabreicht wird.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–7, wobei die immunvermittelte krankhafte Störung eine T-Lymphozytvermittelte krankhafte Störung und/oder eine chronische Entzündungskrankheit ist.
9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei die immunvermittelte krankhafte Störung eine Th1-vermittelte krankhafte Störung ist.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–9, wobei die immunvermittelte krankhafte Störung aus der Gruppe ausgewählt ist bestehend aus Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, Osteoarthritis, insulinabhän-

giger Diabetes (Typ-I-Diabetes), systemischem Lupus Erythrematosus und Schuppenflechte.

11. Pharmazeutische Formulierung umfassend die östrogene Komponente, wie in Anspruch 1 definiert, ein immuntherapeutisches Mittel und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger, einschließlich einer pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltend die östrogene Komponente, wie in Anspruch 1 definiert, und ein einziges immuntherapeutisches Mittel in Form von Progesteron.

12. Pharmazeutische Formulierung nach Anspruch 11, wobei die Formulierung mindestens 10 µg der östrogenen Komponente umfasst.

13. Pharmazeutische Formulierung nach Anspruch 11 oder 12, wobei die Formulierung mindestens 1 µg des immuntherapeutischen Mittels umfasst.

14. Pharmazeutische Formulierung nach einem der Ansprüche 11–13, wobei das immuntherapeutische Mittel aus der Gruppe ausgewählt wird bestehend aus entzündungshemmenden Mitteln; D-Pencillamin; 4-Aminochinolinmittel; Azathioprin; Methotrexat; Cyclosporin; monoklonalen Antikörpern gegen T-Lymphozyten; monoklonalen Antikörpern gegen Zytokine; Tumornekrosefaktor-Rezeptor(TNFR-)IgG; IL-1-Rezeptorantagonisten; ICE-Inhibitoren; Betaferon; Vitamin D; 1α,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> und 1α,25-Dihydroxyvitamin D<sub>2</sub>; Mittel, die spezifisch ein Molekül binden, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem T-Zellrezeptor, einem Antigen und einem HLA-Molekül; organischen Goldderivaten wie beispielsweise Goldnatriumthiomalat, Aurothioglucose oder Auranofin; einem Angiogeneseinhibitor.

15. Orale Einheitsdosierform umfassend eine pharmazeutische Formulierung nach einem der Ansprüche 11–14.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen