

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро

(43) Дата международной публикации
14 мая 2020 (14.05.2020)

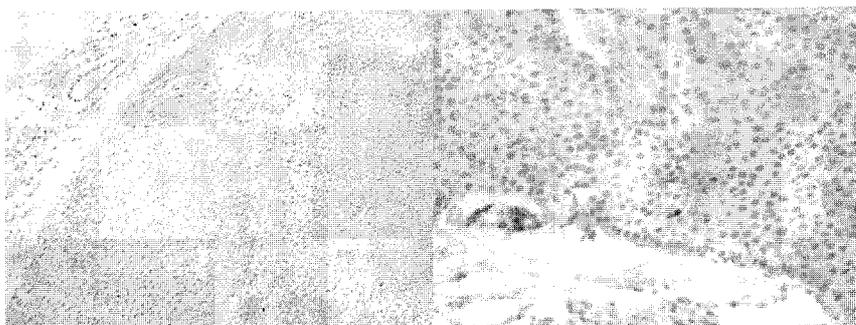


(10) Номер международной публикации
WO 2020/096486 A1

- (51) Международная патентная классификация :
A 61K 31/566 (2006.01) C07J 63/00 (2006.01)
A 61P 35/00 (2006.01)
- (21) Номер международной заявки : PCT/RU20 19/000650
- (22) Дата международной подачи :
19 сентября 2019 (19.09.2019)
- (25) Язык подачи : Русский
- (26) Язык публикации : Русский
- (30) Данные о приоритете :
2018139336 08 ноября 2018 (08.11.2018) RU
- (72) Изобретатель ; и
- (71) Заявитель : ИЛЬЯСОВ , Шамиль Сионович
(**ILYASOV, Shamil Sionovich**) [RU/RU]; Каменно -
островский пр., 446, кв. 44 Санкт -Петербург , 192022,
St.Petersburg (RU).
- (72) Изобретатели : ШАВВА , Александр Григорье -
вич (**SHAVVA, Alexandr Grigorievich**); ул. Ба-
бушкина , 22, кв. 27 Санкт -Петербург , 192029,
St.Petersburg (RU). МОРОЗКИНА , Светлана Никола -
евна (**MOROZKINA, Svetlana Nikolaevna**); ул. Вой -
кова , 50, кв. 11 Санкт -Петербург , 198504, St.Petersburg
(RU).
- (74) Агент : КОРНИЕНКО , Елена Викторовна
(**KORNIENKO, Elena Viktorovna**); ООО "Аси -
рис -М " (для Е.В . Корниенко), а/я 67 Москва , 127562,
Moscow (RU).
- (81) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида национальной охраны) : АЕ, АG, АL, АМ,
А О, АТ, АU, АZ, ВА, ВВ, ВG, ВН, ВN, ВR, ВW, ВY, ВZ,
СА, СH, СL, СN, СO, СR, СU, СZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, ЕС, ЕЕ, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ш , IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP,
KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,

(54) Title: USE OF 3-O-SULFAMATE-16, 16-DIMETHYL-D-HOMOEQUILENIN TO TREAT ONCOLOGICAL DISEASES

(54) Название изобретения : ПРИМЕНЕНИЕ 3-О-СУЛЬФАМАТА 16,16-ДИМЕТИЛ -D-ГОМО ЭКВИЛЕНИНА ДЛЯ
ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ



Фиг . 1

(57) Abstract: The invention relates to the field of medicine and to the chemical and pharmaceutical industry, and concerns agents for treating cancer. 3-O-sulfamate- 16, 16-dimethyl-D-homoequilenin is proposed as an anti-cancer agent in monotherapy and adjuvant therapy in cases of oncological diseases such as hepatocellular carcinoma, gastric carcinoma, lung cancer, chronic myelogenous leukemia, and breast cancer, including triple-negative breast cancer.

(57) Реферат : Изобретение относится к области медицины и химико -фармацевтической промышленности и касается средств для лечения рака . 3-О-сульфамат -16, 16-диметил -D-гомозквиленина предложен в качестве противоонкологического агента при моно - и адьювантной терапии при онкологических заболеваний , таких как гепатокарцинома , карцинома желудка , рак легкого , хроническая миелогенная лейкемия , рак молочной железы , включая трижды негативную форму рака молочной железы .



WO 2020/096486 A1

OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована :

— с отчётом о международном поиске (статья 21.3)

ПРИМЕНЕНИЕ 3-О-СУЛЬФАМАТА 16,16-
ДИМЕТИЛ -D-ГОМОЭКВИЛЕНИНА ДЛЯ
ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

5 Область техники

Изобретение относится к области медицины и химико - фармацевтической промышленности и касается средств для лечения рака , в том числе рака молочной железы .

10 Предшествующий уровень техники

Рак молочной железы является ведущим онкологическим заболеванием у женщин [Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P., CA Cancer J. Clin., 2005, vol. 55, p. 74-108]. По данным ВОЗ , в мире 2.09 миллионов больных , а ежегодно умирают от рака
15 молочной железы 627 тыс . женщин [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer] .

Значительная часть опухолей этой локализации прогрессирует под действием эстрогенов [Yue W., Yager J.D., Wang J.-P., Jupe E.R., Santen R.J., *Steroids*, 2013, vol. 78, p. 161-
20 170]. При иммуногистохимическом исследовании рака молочной железы определяются рецепторы эстрогенов (ER), прогестерона (PR) и her2neu («чувствительность к герцептину »). Значительная часть опухолей содержат рецепторы эстрогенов , прогестерона и/или HER2NEU 3+. Если опухоль не имеет рецепторов и не
25 чувствительна к герцептину (ER0, PRO, HER2NEU 0-1) её рассматривают как трижды негативную (ER-/PR-/HER-2-). Это

одна из самых смертоносных форм рака молочной железы по причине отсутствия мишеней для подавления её роста . На сегодняшний день в мире нет лекарственных препаратов для лечения этой формы рака .

5 Эстрогены циркулируют в крови и накапливаются в опухоли в виде сульфатов , не способных связываться с рецепторами эстрогенов , однако после превращения в свободные гормоны они активируют рост опухоли . Поэтому перспективной является стратегическая линия лечения , в основе которой лежит
10 применение ингибиторов , блокирующих образование этой группы свободных гормонов в опухоли .

К препаратам из группы селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов , которые блокируют эффекты эстрогена на гормонозависимые ткани , в том числе - на ткани
15 молочной железы , относится тамоксифен . Тамоксифен является стандартом гормональной терапии для женщин в пременопаузе и постменопаузе . Наиболее характерными побочными эффектами , возникающими на фоне применения тамоксифена , являются :
20 повышение риска развития тромбоза вен , усугубление течения заболеваний сердечно -сосудистой системы (включая приступы стенокардии) , а также появление новообразований эндометрия (полипы , и рак эндометрия) , а также фиброма матки . Также тамоксифен обладает гепатотоксичностью . По
25 биофармацевтической классификационной системе (БКС) , разработанной Gordon Amidon с соавторами в 1995 году ,

тамоксифен отнесён ко второму классу - препарат , который имеет низкую растворимость и высокую проницаемость .

Большую эффективность по сравнению с тамоксифеном показали ингибиторы ароматазы . В настоящее время нашли применение в данной области такие ингибиторы ароматазы как 5 летрозол и анастразол , которые по системе БКС отнесены к первому классу - препараты , которые имеют высокую растворимость и высокую проницаемость . К побочным эффектам ингибиторов ароматазы является остеопороз , приливы , головные 10 боли .

Кроме того , привлекает внимание стероидная сульфатаза в связи с локальным межклеточным образованием эстрогенов из обильного пула циркулирующего сульфата эстрона . Стероидная сульфатаза катализирует гидролиз сульфата эстрона до эстрона и 15 сульфата DHEA до DHEA (Dibbelt 1., Biol. Chem., Hoppe-Seyler, 1991, 372, 173-185; Stein C., J. Biol. Chem., 1989, 264, 13865-13872).

Самым известным ингибитором стероидной сульфатазы является EMATE - сульфамат эстрона (Ahmed S., Сшт . Med. 20 Chem., 2002, vol. 9, no. 2, p. 263-273). Однако он обладает существенным недостатком . Под действием ингибиторов сульфатазы эстрона , имеющих в своем составе сульфаматную группу , происходит необратимая дезактивация фермента с высвобождением свободного лиганда [Howarth N.M., Purohit A ., 25 Reed M.J. *J. Med. Chem.*, 1994, vol. 37, p. 219-221]. В частности , сульфамат эстрона ингибирует сульфатазу эстрона , однако

высвобождение свободного гормона приводит к появлению сильной утеротропной активности [Shields-Botella, J. et al., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2003, vol. 84, p. 327-335].

5 Таким образом, при поиске новых противоонкологических агентов исследователи должны учесть, что носитель сульфаматной группы ингибитора сульфатазы эстрогена не должен обладать гормональной (утеротропной) активностью.

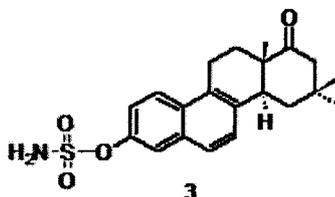
В качестве средства профилактики карциномы молочной железы известно применение d-эквилина, который не обладает канцерогенными свойствами. На основе производных эквиленина получены препараты с гипохолестеринемическим действием, лишенные утеротропной и гипертриглицеридемической активности [Урсова Е.А., Глуздинов И.А., Селиванов С.И., Старова Г.Л., Николаев С.В., Шавва А.Г. // Синтез и исследование производных эквиленина и его модифицированных аналогов. *ЖОрХ*, 2004. Т. 40. Вып. 4. С. 506-512].

Соединения эквиленинового ряда входят в состав терапевтических средств (Premarin®), используемых в 20 гормонозаместительной терапии. Наличие указанных свойств желательно, так как использование ингибиторов метаболизма стероидных эстрогенов подразумевает их длительное применение.

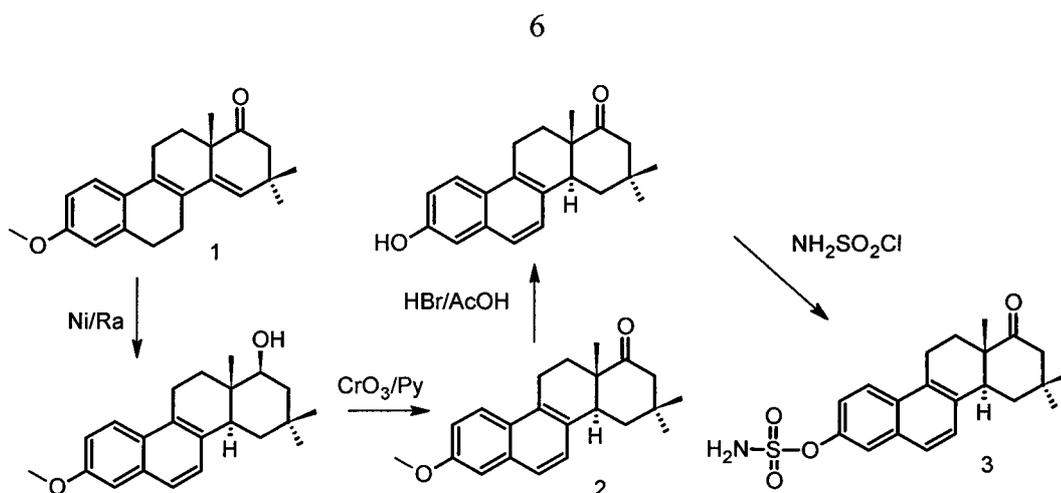
Раскрытие изобретения

Задачей настоящего изобретения является поиск и разработка эффективного синтеза соединений, которые могут быть использованы в качестве противоопухолевых агентов при моно- и адъювантной терапии онкологических заболеваний, таких как гепатокарцинома, карцинома желудка, рак легкого, хроническая миелогенная лейкемия, рак молочной железы, в том числе при его самой смертоносной форме - трижды негативной (ER-/PR-/HER-2-).

10 Задача решается использованием соединения 3-0-сульфамат - 16,16-диметил -D-гомозквиленина (3), который ингибирует сульфатазу эстрогена.



15 Схема синтеза целевого соединения (3) представлена ниже. Отличительной особенностью, в отличие от опубликованных данных, отработанная схема позволяет масштабировать получение целевого соединения в промышленных масштабах.



Реакция известной изотиурониевой соли [Аль Сафар, 5 Захарычев А.В., Ананченко С.Н., Торгов И.В. // Синтез некоторых 16,16-диметил -D-гомостероидов . Изв . А Н СССР . Сер . Хим . 1968. № 10. С . 2326-2332] с 2,4,4-триметилциклопентан -1,3-дионом приводит к образованию секостероида , циклодегидратация которого позволяет получить эстрапентаен 10 (1). После обработки последнего Ni/Ra в условиях , предложенных ранее для синтеза близкого по структуре D-гомоаналога [Gluzdikov I.A., Egorov M.S., Selivanov S.I., Starova G.L., Shavva A.G. New analogues of D-homoequilenene with substituents in the D ring. Russian J. Org. Chem., 2006, vol. 42, no. 15 11, pp. 1675-1682], выделили метиловый эфир 16,16-диметил -D-гомоэквиленин (2) [Глуздигов И.А. Дисс . на соискание степени канд . наук , 2007, Санкт -Петербург]. Сульфамат 3 получали по известной методике [Морозкина С.Н., Глуздигов И.А., Дроздов А.С., Селиванов С.И., Ковалев Р.А., Филатов М.В., Шавва А.Г. 20 ЖОрХ , 2015, т . 51, N 3, с. 425-430].

Результаты моделирования связывания стероида показали , что структура этого стероида плохо совместима с геометрией лигандсвязывающего кармана рецептора . Расстояние между кислородом кетогруппы стероида и NH His524 составляет 4.9 Å, что исключает образование водородной связи . Расстояние между гидроксильной группой при C3 и кислородом карбоксильной группы Glu353, по расчетным данным , около 3.9 Å, что намного больше , чем в комплексе с природным гормоном эстрадиолом (2.34 Å).

Несоответствие между геометрией стероида и областью рецептора , ответственной за связывание лиганда , будет причиной низкого сродства рассматриваемого соединения к рецептору , в результате чего данный стероид практически не обладает утеротропной активностью .

Соединение полностью ингибирует пролиферацию опухолевых клеток MCF-7.

Препарат относится к 4 классу опасности ($LD_{50} > 300-2000$ мг/кг). Полученные данные позволяют оценить дозы для исследования противоопухолевой активности как безопасные .

При изучении связывания с рецепторами эстрогенами , показано , что сульфамат не обладает гормональным действием в концентрациях -0.001 и 0.01, 0.1 и 1.0 микромоль .

На животных моделях , с привитой человеческой опухолью трижды негативного рака молочной железы заявленный препарат более эффективен по сравнению с используемыми в

клинической практике тамоксифеном и ингибитором ароматазы летрозолом .

Таким образом , область применения соединения – лечение рака молочной железы , включая трижды -негативную форму .

5 Проведены доклинические исследования специфической активности на моделях РМЖ выполнены в параллельном сравнении с противоопухолевым препаратом ТФ (препарат сравнения) . Сравнительное исследование препаратов *in vivo* выполнено на мышах -самках Balb/c Nude с п/к
10 трансплантированными опухолевыми клетками . Длительность исследования составила 29 суток после первого введения препарата (введение препаратов начинали на 5-е сутки после трансплантации опухолевого штамма) .

Препарат и препарат сравнения вводили многократно
15 внутрижелудочно в дозах 30 мг/кг и 10 мг/кг ежедневно в течение 21 дня .

Группе плацебо вводили 1% раствор крахмала
внутрижелудочно в эквивалентных объемах и аналогичном
режиме , Измерение опухолевых узлов проводили 2 раза в
20 неделю , О противоопухолевой активности судили по стандартному показателю торможения роста опухоли (ТРО) . После окончания лечения проводили последнее измерение опухоли , животных взвешивали и подвергали эвтаназии .

Все необходимые манипуляции с животными (тесты ,
25 взвешивание , измерение , вскрытие животных) выполнялись с 9 до 12 часов дня .

Взвешивание животных проводили на первые сутки эксперимента , и затем 2 раза в неделю в течение всего эксперимента , согласно временному протоколу .

Измерение опухолевого узла проводили после введения
5 опухоли 2 раза в неделю в течение всего эксперимента . Объем опухолевого узла определяли по формуле :

$V = \pi/6 * L * W * H$, где L,W,H — линейные размеры опухоли .

Определение противоопухолевой активности

Критерием эффективности исследуемого препарата служил
10 показатель торможения роста опухоли (ТРО), который вычисляли по формулам :

$$TPO (\%) = \frac{|V_k - V_o|}{V_k} * 100,$$

где V_k и V_o - средний объем опухоли (мм³) в контрольной и опытной группах соответственно .

15 После курса лечения животным проводили эвтаназию путем цервикальной дислокации шейных позвонков .

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета SPSS 21 (лицензия JNb20130626-3). В качестве описательных статистик в работе приведены : среднее арифметическое , стандартное отклонение (SD), ошибка среднего (SE), медиана , квантили , межквартильный размах . Для сравнения количественных признаков в группах применяли критерий Манна - Уитни - Вилкоксона без поправок на множественные сравнения . Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Опухоли молочной железы (МЖ) у мышей самок линии FBV/N, трансгенных по HER-2/neu представляют собой аденокарциномы , которые характеризуются низким содержанием рецепторов эстрогена (ЭР) (Рис. 1) и отсутствием рецепторов прогестерона (ПР). Можно выделить два подтипа , а именно ЭР+, ПР-, и ЭР-, ПР- [2]. При иммуногистохимическом исследовании ERα в опухолях МЖ только в 10 образцах из 45 обнаружены единичные позитивно окрашенные ядра (Фиг . 1).

Модель чувствительна к схеме CAF (циклофосфамид , адриамицин , 5-фторурацил), при этом отмечается торможение роста опухоли , приводящее к стабилизации среднего объема опухолей (Фиг . 2). Торможение роста опухоли составило 63% на 14 сутки и 46% на 21 сутки опыта .

Поскольку у животных возможно развитие множественных опухолей , то представляется целесообразным анализ среднего суммарного объема опухолей у мышей (Фиг . 3) и его относительное изменение к началу опыта (Фиг . 4). На графике

- относительного прироста объема опухоли видно, что происходит линейное изменение этого показателя в контрольной группе, что свидетельствует о целесообразности использования данного показателя для оценки биологического ответа опухоли на лечение. Так при воздействии схемы CAF наблюдается отсутствие изменения этого показателя на протяжении почти 3-х недель, свидетельствующее о стабилизации заболевания. Частота стабилизаций отдельных опухолей составляет около 60% к 21 суткам.
- 10 Исследование проведено на мышах -самках линии FVB трансгенных по HER-2/neu конвенциональной категории, линия получена из питомника Charles River Laboratories (Италия). Возраст животных к началу исследования составлял 21-41 неделю, вес – 25-30 г.
- 15 Для исследования была использована лекарственная форма препарата Тамоксифен Гексал (Гексал АГ, Германия, 83607 Хольцкирхен, серия HA 1575 от 01/17), представляющая собой таблетки, покрытые оболочкой белого или слегка желтоватого цвета, круглые, двояковыпуклые, с однородной гладкой
- 20 поверхностью, содержащие 20 мг действующего вещества.
- Условия содержания соответствуют стандартам, указанным в руководстве "The Guide for Care and Use of Laboratory Animals (ILAR publication, 1996, National Academy Press, 1996).
- 25 Животных содержали в отдельном помещении группами (не более 5 особей) в индивидуальных клетках для лабораторных грызунов типа T2. Размеры 268 x 215 x 141 мм (площадь

основания 370 см²). Ванна из поликарбоната , крышка из нержавеющей стали с бункером для корма , разделителем для поилки .

Подстил - стружка древесная обеспыленная .

5 Животные имели неограниченный доступ к комбинированному полнорационному гранулированному корму для лабораторных грызунов .

Вода питьевая , давалась *ad libitum* в стандартных поилках объемом 190 мл, производства TECNIPLAST из
10 высокотемпературного полисульфона с силиконовым кольцом и металлической крышкой из нержавеющей стали AISI 316.

Температура в помещении поддерживалась на уровне 20-26°C, относительная влажность - 50-70%. Фотопериод установлен 12 часов ночь - 12 часов день при искусственном
15 освещении лампами дневного света .

На клетке содержания устанавливали идентификационную карточку , на которой указывали номер карточки /клетки , номер опытной группы , индивидуальные номера животных , их количество и пол , номер исследования , фамилия , имя , отчество
20 руководителя исследования . Каждому животному проводили установку на ушную раковину металлического метчика для мелких лабораторных грызунов из никелевого сплава Kent-Scientific, США (на метчиках имеются проштампованные производителем трехзначные номера).

В конце опыта мышей подвергли эвтаназии углекислым газом . Все трупы животных подвергали аутопсии с макроскопическим описанием .

5 Проведено определение LD50 препарата у мышей линии FVB трансгенных по HER-2/neu по тесту OECD 423 (OECD guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method).

Использованы 12 мышей -самок .

10 На первом шаге 3 мышам вводили препарат в дозе 300 мг/кг . Исследуемый препарат вводили внутрижелудочно (в/ж) с помощью металлического атравматического зонда (в соответствии с пероральным путем применения в клинике). Для в/ж введения субстанцию препарата смешивали с оливковым
15 маслом для получения суспензии необходимой концентрации для введения из расчета 0,1 мл суспензии на 10 г массы тела животного . Лекарственная форма для введения готовилась *ex tempore*.

В связи с отсутствием гибели животных при введении
20 препарата в дозе 300 мг/кг, этот же уровень дозы препарата был использован для введения еще 3 животным . Гибель животных также отсутствовала , поэтому далее препараты вводили в дозе 2000 мг/кг в 2 шага по 3 животных на каждом шаге .

Вели клиническое наблюдение и регистрацию массы тела в
25 соответствие с Таблицей 1. Животных осматривали ежедневно 2 раза в день , клинически обследовали индивидуально после

введения дозы первые 60 минут , с особым вниманием в течение первых 4 часов , периодически в течение первых 24 часов , на 2 сутки и еженедельно до 14 дней . Выполняли подробный осмотр животного в клетке содержания , в руках . Фиксировали общее состояние животных : особенности их поведения , интенсивность и характер двигательной активности , состояние волосяного и кожного покрова .

Регистрировали массу тела животных с помощью поверенных быстродействующих электронных лабораторных весов Ohaus Scout Pro (США) , с максимальной нагрузкой 2000 г , шагом измерения 0,1 г .

На 15 сутки выполняли эвтаназию и аутопсию с регистрацией макроскопических изменений . Данные заносили в специальный индивидуальный бланк вскрытия .

Патоморфологическому исследованию подлежали все экспериментальные животные в конце исследования . После эвтаназии животные были тщательно обследованы на предмет внешних патологических признаков . Проведено исследование состояния грудной и брюшной полостей и макроскопическое исследование внутренних органов . Микроскопический анализ органов и тканей лабораторных животных не проводился , так как гибель животных не зафиксирована в течение всего периода наблюдения , кроме того , макроскопический анализ внутренних органов не выявил патологических изменений .

Таблица 1.

Схема наблюдения и взвешивания животных при оценке
острой токсичности

Показатели	Сутки опыта (взвешивание в первые сутки проводится до введения препарата)															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Взвешивание	■	■					■								■	
Введение препаратов	■															
Клиническое обследование	■	■					■								■	
Эвтаназия животных																■

5 Исследуемый препарат вводили в/ж с помощью металлического атравматического зонда (в соответствии с предполагаемым пероральным путем применения в клинике). Препарат вводили в однократной суточной дозе (20 мг/кг массы тела) и 5-ти кратной суточной дозе - 100 мг/кг массы тела. Для

10 введения *ex tempore* готовили раствор препаратов в оливковом масле (рафинированное оливковое масло с добавлением нерафинированного Extra Virgen марки Global Village «Clasico» серия L:18335 1116, срок годности до 26.04.2020, ВАЕО, Испания). Объем введения составил 0,2 мл на 10 г массы тела

15 мыши (0,2 мл готовой формы для мыши массой 20 г). Начало введения препарата через 24 часа после рандомизации. Курс введения составил 27-28 дней.

20 Препарат сравнения - тамоксифен - вводили также с помощью металлического атравматического зонда (в соответствии с пероральным путем применения в клинике),

- суточная доза составила 4 мг/кг и была определена при пересчете ,
 клинических доз [5]. Эта доза соответствует суточной дозе для
 человека 20 мг/кг. Таблетку тамоксифена измельчали в ступке ,
 из полученного порошка готовили суспензию в 40 мл оливкового
 5 масла , объем введения составил 0,08 мл на 10 г массы тела
 мыши , длительность введения соответствовала длительности
 введения опытных препаратов и составила 27-28 дней ;
- В контрольных группах вводили оливковое масло (плацебо) ;
 Критериями оценки были данные клинического
 10 наблюдения , масса тела животных , сроки гибели (в случае
 таковой) , рост опухоли в динамике , данные
 патоморфологического исследования (верификация
 новообразования при аутопсии , оценка токсического действия по
 макроскопической картине изменений внутренних органов) ;
- 15 Массу тела животных регистрировали перед первым
 введением препаратов и далее два раза в неделю с помощью
 поверенных быстросействующих электронных лабораторных
 весов Ohaus Scout Pro (США) , с максимальной нагрузкой 2000 г ,
 шагом измерения 0,1 г .
- 20 Один раз в неделю во время взвешивания у животных
 измеряли макроскопически определяемые опухолевые узлы . Для
 каждого узла измеряли два линейных размера : наибольший и
 25 больший перпендикулярный к нему . Наибольший размер
 принимали за длину (а) и второй размер за ширину (б)
 опухолевых узлов . Объем опухоли рассчитывали по формуле :

$$V=(axb)^2/2,$$

Эффективность терапии оценивали по изменению среднего объема опухолей , торможению роста опухоли (ТРО), динамике среднего суммарного объема опухолей у каждой мыши и его относительного изменения .

- 5 Процент торможения роста опухоли рассчитывали по формуле :

$$\text{ТРО} = (\text{VK}-\text{VO})/\text{VK} \times 100 (\%),$$

где VK - средний объем опухоли в контрольной группе , а VO - средний объем опухоли в опытной группе .

- 10 Первичные данные с индивидуальных бланков перенесены в книги программы Microsoft Excel 2007. Для всех количественных данных вычислены групповое среднее арифметическое (M) и среднеквадратическое отклонение (т). Статистический анализ проведен с использованием статистической программы GraphPad Prism 6.0. Отличия между группами оценены с помощью регрессионного анализа ANOVA и точного критерия Фишера .

- При оценке острой токсичности животные находились под непрерывным наблюдением первые 60 минут , затем осматривались ежечасно 3 часа , далее через 24 часа . На вторые 20 сутки наблюдение осуществляли два раза в день . Затем наблюдения проводили раз в день . Клинический осмотр каждого животного проводили после введения субстанции , через сутки , далее еженедельно . Выполняли подробный осмотр животного в клетке содержания , в руках . Отмечали общее состояние 25 животных : особенности их поведения , двигательной активности , состояние волосяного и кожного покрова .

При введении препарата в дозе 300 мг/кг в ходе эксперимента не была зафиксирована гибель животных . Визуально , признаков интоксикации за весь период наблюдения отмечено не было ни у одного животного . Внешний вид и поведене

5

ние животных были обычными . При взятии в руки реакция была стандартная низкая . Вокализация у животных не отмечена , в том числе непосредственно во время и сразу после введения .

Ежедневное наблюдение за общим состоянием животных , поведенческими реакциями показали , что однократное пероральное введение тестируемого объекта не оказало влияния на общее состояние и активность подвергнутых интоксикации экспериментальных животных .

10

Данные о массе тела приведены в Таблицах 2 и 3.

15

Таблица 2.

Динамика массы тела животных при введении препарата в стартовой дозе 300 мг/кг

доза 300 мг/кг	Сутки опыта			
	1	2	7	14
1 серия	03.05.2018	04.05.2018	09.05.2018	16.05.2018
мышь №1	26,4	26,8	27,2	27,6
мышь №2	29,6	29,2	29,6	30,2
мышь №3	27,8	27,4	28,2	29,0
2 серия	15.05.2018	16.05.2018	21.05.2018	28.05.2018
мышь №4	28,0	27,8	29,7	30,6
мышь №5	30,0	30,4	31,2	31,1
мышь №6	27,0	27,2	28,4	28,6
Среднее (исходной)	28,1	28,1 (0)	29,1 (3)	29,5 (5)
Летальные эффект (тазо /всего)	-	1	0/6	

Как следует из данных Таблицы 2, средняя массы тела равномерно увеличивалась в периоде наблюдения за животными , которые получали препарат в дозе 300 мг/кг.

20

Поскольку гибель животных при введении дозы 300 мг/кг отсутствовала, перешли к введению препарата в дозе 2000 мг/кг. Препарат вводили в 2 приема с интервалом 3 часа, в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела на прием при концентрации 100 мг/мл т.к. суспензия в масле при большей концентрации густая, что не позволяет ввести препарат через зонд. При введении дозы 2000 мг/кг клиническая картина интоксикации не наблюдалась. Ширина глазной щели животных, независимо от группы, практически не менялись в течение всего периода наблюдения. Патологических выделений из глаз не отмечалось. Нос розовый, умеренно влажный, патологические выделения отсутствовали. Шерсть у всех мышей была опрятной, блестящей, без очагов облысения. Отмечено снижение средней массы тела у животных на 1% на 2 сутки и на 2% на 7 сутки от исходной (Таблица 3). К концу периода наблюдения средняя масса тела была на 3% больше исходного значения.

Таблица 3.

Динамика массы тела животных при введении препарата в дозе 2000 мг/кг

доза 2000 мг/кг	Сутки опыта			
	1	2	7	14
1 серия	30.05.2018	31.05.2018	05.06.2018	12.06.2018
мышь №1	27,2	26,4	26,3	27,0
1 серия	17.09.18	18.09.18	23.09.18	30.09.18
мышь №2	28,4	28,0	26,8	26,9
мышь №3	27,5	26,8	24,9	26,0
2 серия	30.09.18	01.10.18	06.10.2018	13.10.2018
мышь №4	25,7	25,3	25,0	26,6
мышь №5	24,2	24,4	25,9	28,7
мышь №6	24,0	23,8	25,4	26,9
Среднее (% исходной)	26,2	25,8 (-1)	25,7 (-2)	27,0 (3)
Летальные эффекты (пало всего)			0,6	

Аутопсии подвергались все животные , подвергнутые запланированной эвтаназии на 15-е сутки опыта . При макроскопическом исследовании отклонений в состоянии внутренних органов не обнаружено .

Данные аутопсии были следующие :

Шерсть животных имела опрятный вид , была блестящей , без очагов облысения . Упитанность животных была удовлетворительной .

Патологических выделений из естественных отверстий не было .

Подчелюстные лимфатические узлы имели округлую форму , бледно -розовую окраску и умеренную плотность . Слюнные железы обычной формы , бледно -желтого цвета , умеренной плотности .

Брюшина гладкая , блестящая , свободной жидкости в полости нет .

Селезенка не увеличена, плотная, капсула гладкая и блестящая. Поджелудочная железа бледно-розовая, дольчатой структуры.

5 Величина и форма печени не изменены, капсула печени блестящая. Ткань печени имела коричневатый цвет и умеренно плотную консистенцию.

Почки плотные, капсула гладкая, блестящая, вокруг почек умеренное разрастание жировой клетчатки.

Яичники не увеличены с блестящей поверхностью.

10 Желудок со складчатой блестящей слизистой оболочкой, небольшим количеством слизи и пищевого содержимого в просвете.

Плевра гладкая, блестящая, свободной жидкости в грудной полости нет. Тимус треугольной формы, беловатого цвета.

15 Легкие светло-розового цвета, воздушные.

Таким образом, в соответствие с проведенным тестом ОЭСР 423 препарат может быть отнесен к 5-й или не классифицируемой категории с LD50 равной или более 5000 мг/кг, что соответствует классу малоопасных веществ.

20 Животные удовлетворительно переносили введение препарата, клинических признаков токсичности не наблюдалось. При этом шерсть животных, получавших препарат, была блестящей, в отличие от животных контрольной группы, у которых она была несколько взъерошенной. Также в
25 контрольной группе были более выражены опухолевые узлы.

При аутопсии в конце опыта специфических признаков токсического поражения внутренних органов не выявлено. Объем опухолевого поражения был значительно меньшим при введении препарата в дозе 20 мг/кг и особенно в дозе 100 мг/кг, чем у животных контрольной группы.

Масса тела животных увеличивалась в течение всего периода наблюдений во всех группах, прибавка массы тела может быть связана с увеличением объема опухолевых узлов у мышей (Таблица 4).

10

Таблица 4.

Динамика средней массы тела мышей (г) при оценке противоопухолевой активности препарата

Группа	Показатель	18.09.18 (1)	24.09.18 (7)	01.10.18 (14)	08.10.18 (21)	15.10.18 (28)
Контроль-3	M	31,4	31,8	33,7	35,8	36,7
	m	0,9	1,1	1,2	1,4	1,5
20 мг/кг	M	31,9	31,8	33,5	35,2	36,7
	m	1,2	1,2	1,4	1,5	1,5
100 мг/кг	M	31,4	31,7	32,0	33,7	34,4
	m	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5
Тамоксифен-2, 4 мг/кг *	Дата	20.08.18 (0)	27.07.18 (7)	03.09.18 (14)	10.09.18 (21)	17.09.18 (28)
	M	31,0	32,0	32,9	32,8	34,2
	m	1,1	1,3	1,2	1,3	1,4

15

При анализе динамики среднего объема опухолей было выявлено, что введение препарата в дозе 20 мг/кг и 100 мг/кг обладает статистически значимым противоопухолевым эффектом, так к 28 суткам опыта ТРО составил 27% для дозы 20 мг/кг и 42% для дозы 100 мг/кг, эффект был пропорционален

дозе препарата . Следует отметить , что при введении 100 мг/кг средний объем опухоли за 28 дней наблюдения увеличился всего на 60% от исходного , а в контрольной группе - на 155% (Фиг . 5).

5

Таблица 5.

Динамика среднего объема опухолей (см³), имевшихся к началу опыта , при оценке противоопухолевой активности препарата в дозе 20 мг/кг и 100 мг/кг

10

Группа	Показатель	17.09.18 (0)	24.09.18 (7)	01.10.18 (14)	08.10.18 (21)	15.10.18 (28)	% изменения от исх.
Контроль-3 (N=60)	M	0,38	0,5	0,7	0,85	0,97	155
	m	0,05	0,06	0,08	0,1	0,11	
20 мг/кг (N=49)	M	0,35	0,39	0,55	0,64	0,71 *	103
	m	0,06	0,07	0,1	0,12	0,14	
	ТРО, %	8	22	21	25	27	
100 мг/кг (N=48)	M	0,35	0,37	0,48	0,57 *	0,56 ** *	60
	m	0,04	0,03	0,04	0,05	0,05	
	ТРО, %	8	26	31	33	42	
Тамоксифен-2, 4 мг/кг * (N=39)	Дата	20.08.18 (0)	27.07.18 (7)	03.09.18 (14)	10.09.18 (21)	17.09.18 (28)	-
	M	0,29	0,46	0,65	0,75	1,27 *	338
	m	0,04	0,07	0,08	0,09	0,16	
	ТРО, %	24	8	7	12	-31	

M - среднее значение , m - ошибка средней арифметической , N - число опухолей на начало лечения и включенных в анализ . # - группа препарата сравнения приведена из третьей серии опытов . * - $p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой , а - $p < 0,05$, по сравнению с группой препарата сравнения .

Следует отметить , что торможение роста опухоли при введении препарата в обеих дозах увеличивалось к концу срока наблюдения , а при введении препарата сравнения было максимальным на 21 сутки опыта . Таким образом , можно

ожидать что эффект препарата при увеличении продолжительности введения может быть выше .

При анализе частоты стабилизаций выявлено , что введение 100 мг/кг значительно увеличивает этот показатель , с 8% в контрольной группе до 27%. При этом средний объем новых опухолей , которые развились за период наблюдения и их количество были меньше , чем эти показатели в контрольной группе (Таблица б).

10

Таблица б.

Частота стабилизаций опухолей , число и средний объем новых опухолей , развившихся к концу исследования , при оценке противоопухолевой активности препарата

Группа	Число опухолей на начало лечения и частота их стабилизаций		Абсолютное число новых опухолей	Средний объем новых опухолей к концу наблюдения, (см ³)	
				M	m
Контроль-3	60	8%	25	M	0,23
				m	0,04
20 мг/кг	49	22%	23	M	0,15
				m	0,04
100 мг/кг	48	27%	15	M	0,12 *
				m	0,02
Тамоксифен-2, 4 мг/кг #	39	3%	32	M	0,20
				m	0,05

15 % стабилизаций заболевания - показатель аналогичный критерию RECIST, отражающий частоту опухолей , объем которых не увеличился более чем на 20% к концу наблюдения по отношению к началу лечения . * - $p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой . # - группа препарата сравнения приведена из третьей серии опытов .

20

Средний суммарный объем опухолей у мышей при введении препарата в дозах 20 мг/кг и 100 мг/кг был достоверно меньше, чем в контрольной группе с 14 по 28 сутки. А для в дозе 100 мг/кг на 28 сутки опыта этот показатель был статистически значимо меньше, чем в группе препарата сравнения (Таблица 7, Фиг. 6).

Таблица 7.

Средний суммарный объем опухолей (см³) у мышей при оценке противоопухолевой активности препарата.

Группа	Показатель	17.09.18 (0)	24.09.18 (7)	01.10.18 (14)	08.10.18 (21)	15.10.18 (28)	% изменения от исх.
Контроль-3 (N=10)	M	2,26	3,02	4,17	5,07	5,80	157
	m	0,36	0,46	0,58	0,70	0,73	
20 мг/кг (N=10)	M	1,69	1,93	2,67 *	3,15 **	3,48 ***	106
	m	0,30	0,33	0,47	0,56	0,65	
	ГРО, %	25	36	36	38	40	
100 мг/кг (N=10)	M	1,70	1,79	2,30 *	2,75 **	2,71 ***	59
	m	0,31	0,34	0,41	0,45	0,42	
	ГРО, %	25	41	45	46	53	
Тамоксифен-2, 4 мг/кг # (N=9)	Дата	20.08.18 (0)	27.07.18 (7)	03.09.18 (14)	10.09.18 (21)	17.09.18 (28)	-
	M	1,26	2,01	2,84	3,23	5,52	
	m	0,23	0,35	0,52	0,58	1,11	
	ГРО, %	44	33	32	36	5	

- группа препарата сравнения приведена из третьей серии опытов. * - $p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой. а - $p < 0,05$, по сравнению с группой препарата сравнения.

При оценке относительного изменения среднего суммарного объема опухолей также было показано, что эффект препарата зависел от его дозы и превосходил эффективность тамоксифена (Фиг. 7, Таблица 8).

Таблица 8.

Относительное изменение среднего суммарного объема
опухолей к 1 суткам (%) у мышей при оценке
противоопухолевой активности препарата

5

Группа	Показатель	17.09.18 (0)	24.09.18 (7)	01.10.18 (14)	08.10.18 (21)	15.10.18 (28)
Контроль-3 (N=10)	M	0	34	88	131	175 *
	m	0	6	14	22	25
20 мг/кг (N=10)	M	0	19	64 *	91 **	107 ***
	m	0	6	16	17	20
100 мг/кг (N=10)	M	0	1 *	38 *	75 **	69 ***
	m	0	7	10	16	16
Тамоксифен-2, 4 мг/кг * (N=9)	Дата	20.08.18 (0)	27.07.18 (7)	03.09.18 (14)	10.09.18 (21)	17.09.18 (28)
	M	0	67	134	178	363 *
	m	0	15	21	41	66

Для оценки гормонального воздействия препарата была
оценена масса тела матки без рогов на 28 сутки наблюдения
10 (Таблица 9). Достоверных отличий этого показателя выявлено не
было .

Таблица 9.

15 Вес тела матки и масса тела мышей с опухолями молочной
железы при изучении противоопухолевой активности препарата

Группа	Вес тела матки (мг)	Фаза эстрального цикла (число мышей)	Масса тела (г)
Контроль-3	27	Э - 1	28,6
	16±1	Д - 8	37,2±1,5
	17±2	Все	36,7±1,5
Тамоксифен-2, 4 мг/кг	28±1	Э - 9	34,2±1,4
	-	Д - 0	-
	28±1	Все	34,2±1,4
20 мг/кг	45±7	Э - 3	35,5±1,6
	19±3	Д - 7	37,1±2,2
	27±5	Все	36,7±1,5
100 мг/кг	50±10	Э - 2	31,5±5,4
	19±4	Д - 8	35,1±1,7
	26±6	Все	34,4±1,5

* - включая 1 животное в фазе метаэструса ; Э - эструс ; Д - диэструс .

5 Препарат в дозах 20 мг/кг и 100 мг/кг обладает выраженным противоопухолевым эффектом , так к 28 суткам опыта ТРО составил 27% для дозы 20 мг/кг и 42% для дозы 100 мг/кг, эффект был пропорционален дозе препарата (различия статистически значимы). Введение в дозе 100 мг/кг значительно увеличивает частоту стабилизаций опухолей , с 8% в контрольной группе до 27%. Препарат в дозе 100 мг/кг по эффективности к концу периода наблюдения на 28 сутки статистически значимо превосходит по эффективности препарат сравнения тамоксифен (4 мг/кг).

15 Исследования показали , что у препарата отсутствует утеротропная активность .

В соответствие с проведенным тестом ОЭСР 423 препарат может быть отнесен к 5-й или не классифицируемой категории с LD50 равной или более 5000 мг/кг, что соответствует классу малоопасных веществ согласно принятому ГОСТ .

Краткое описание фигур чертежей

Изобретение иллюстрируется следующими фигурами :

5 Фиг . 1 - Окрашивание антителами к ERα опухоли молочной железы .

Визуализация пероксидаза хрена + диаминобензидин , ув. x100 (А). Специфическое окрашивание ядер клеток протока молочной железы и ядер единичных опухолевых клеток (Б), ув. x400.

10 Фиг . 2 - Динамика среднего объема опухолей , имевшихся к началу опыта , у мышей при терапии схемой CAF.

Фиг . 3 - Динамика среднего суммарного объема опухолей , имевшихся к началу опыта , у мышей при терапии схемой CAF.

15 Фиг 4 - Относительное изменение среднего суммарного объема опухолей , имевшихся к началу опыта , у мышей при терапии схемой CAF.

Фиг . 5 - Динамика среднего объема опухолей у мышей при оценке противоопухолевой активности препарата

20 Фиг . 6 - Средний суммарный объем опухолей у мышей при оценке противоопухолевой активности препарата .

Фиг . 7 - Относительное изменение среднего суммарного объем опухолей у мышей при оценке противоопухолевой активности препарата .

Лучший пример осуществления изобретения

Пример 1.

Работа проведена на перевиваемой культуре клеток
5 человека MCF-7 (аденокарцинома молочной железы). В качестве
отрицательного контроля использовали нормальные кожные
фибробласты человека (КФЧ) ранних пассажей. Клетки
культивировали во флаконах Карреля в среде DMEM/F12
(Биолот) с добавлением 1% эмбриональной сыворотки крупного
10 рогатого скота (Биолот), без антибиотиков, в 5% CO₂ атмосфере,
при 37°C.

Клетки высаживались на флаконы Карреля по 50 x 10⁴
клеток на флакон. Для изучения пролиферативной активности
клеток в условиях подавления сульфатазы через 24 часа после
15 посева культуральную среду заменяли на среду, содержащую
ингибиторы сульфатаз до конечной концентрации 50 мкг/мл,
после чего инкубировали данные опухолевые клеточные линии в
течение различных промежутков времени (от 24 до 72 ч).
Ингибитор растворяют в ДМСО. Конечная концентрация ДМСО
20 в культуральной среде не превышала 0.5%. Для исключения
цитотоксического действия ДМСО ставили контроль с
добавлением ДМСО без ингибиторасульфатаз. Для исключения
неспецифического губительного действия веществ использовали
нормальные кожные фибробласты человека. Далее клетки
25 снимали раствором версена-трипсина (Биолот), рассеивали на
флаконы Карреля, содержащие новую полную культуральную

среду . Подсчет клеток проводили в момент достижения необработанными контрольными клетками максимальной плотности клеток на единицу площади поверхности культурального флакона (монослой), при этом их количество 5 определялось как 100%. Пролиферативную активность всех исследованных клеточных культур при воздействии ингибиторов сульфатаз определяли не менее трех раз .

Исследование влияние полученного сульфамата на рост 10 перевиваемой культуры клеток человека MCF-7 (аденокарцинома молочной железы) показало , что стероид (3) полностью блокирует рост опухолевых клеток при концентрации 20 мкг /мл, при этом он не влияет на рост кожных фибробластов человека , не имеющих рецепторов эстрогенов . Рост опухолевых 15 клеток ингибируется в той же степени , что и под действием тамоксифена , применяемого в медицинской практике более 30 лет. Это весьма важно , поскольку сульфаматы и тамоксифен имеют разные механизмы действия , и есть перспективы их 20 совместного применения .

В экспериментах на мышах линии FVB, трансгенной по 20 HER-2/neu (ER-/PR-/HER2+), с опухолями молочных желез , стероид ингибирует рост опухолей сравнимо с применяемым в клинической практике тамоксифеном , что предполагает их совместное использование для лечения рака молочной железы .

На клеточной линии трижды негативного рака молочной 25 железы MDA-MB-231 соединение ингибирует рост клеток на

83%, что сравнимо с применяющимся в клинической практике химиотерапевтическим препаратом этопозидом .

Препарат показал активность против клеток гепатокарциномы SK-Нер-1 ($IC_{50} = 53.4 \mu M$), рака легких А 549 (5 $IC_{50} = 29.6 \mu M$), аденокарцинома желудка SNU638 ($IC_{50} = 22.8 \mu M$), а также против клеток хронической миелогенной лейкемии (К 562).

Пример 2.

- 10 Группа Контроль . В группе 10 мышей , 10 опухолей . На момент начала терапии $V_{ср}=1,5\pm 0,4 \text{ мм}^3$. Без специфического лечения размеры опухоли к 33-м суткам после трансплантации достигли $V_{ср}=233,2\pm 86,5 \text{ мм}^3$. Число павших мышей в группе до окончания периода наблюдения - 2 из 10.
- 15 Группа препарат , 10 мг/кг. В группе 7 мышей , 7 опухолей . На момент начала терапии $V_{ср}=1,0\pm 0,4 \text{ мм}^3$ без достоверных отличий от контрольной группы . На 7-е сутки после начала лечения зафиксировано недостоверное ТРО =74,3% ($V_{ср}=5,1\pm 2,3 \text{ мм}^3$ против $V_{ср}=20,0\pm 6,0 \text{ мм}^3$ в контроле , $p<0,220$). На 10-е сутки
- 20 после начала лечения ТРО =68,0% ($V_{ср}=24,8\pm 12,2 \text{ мм}^3$ против $V_{ср}=77,3\pm 32,0 \text{ мм}^3$ в контроле , $p<0,181$). На 14-е сутки после начала лечения наблюдали максимальное достоверное ТРО , равное 94,3% ($V_{ср}=6,9\pm 2,2 \text{ мм}^3$ против $V_{ср}=120,6\pm 44,4 \text{ мм}^3$ в контроле , $p<0,03$), которое сохранялось примерно на том же
- 25 уровне и составило 90,6% ($V_{ср}=17,6\pm 0,7 \text{ мм}^3$ против $V_{ср}=186,4\pm 65,0 \text{ мм}^3$ в контроле , $p<0,061$) и 90,2% ($V_{ср}=26,1\pm 12,1$

мм³ против $V_{cp}=266,5\pm 91,3$ мм³ в контроле , $p<0,061$) к 17-м суткам и 21 суткам , соответственно . Число павших мышей в группе до окончания периода наблюдения - 5 из 7.

Группа Тамоксифен , 30 мг/кг. В группе 7 мышей , 7
5 опухолей . На момент начала терапии $V_{cp}=0,9\pm 0,2$ мм³ без достоверных отличий от контрольной группы . На 7-е сутки ТРО составило 12,6% ($V_{cp}=18,8\pm 7,4$ мм³ против $V_{cp}=20,0\pm 6$, мм³ в контроле , $p<0,962$) и до конца периода наблюдения не превышало этих значений . На 17-е и 21-е сутки после начала
10 лечения отмечали отрицательное ТРО с максимальным значением на 21-е сутки ТРО = -44,2 ($V_{cp}=384,8\pm 103,2$ мм³ против $V_{cp}=266,5\pm 91,3$ мм³ в контроле , $p<0,106$). Число павших мышей в группе до окончания периода наблюдения - 6 из 7.

Группа Тамоксифен , 10 мг/кг. В группе 7 мышей , 7
15 опухолей . На момент начала терапии $V_{cp}=0,7\pm 0,1$ мм³ без достоверных отличий от контрольной группы . На 7 -е сутки после начала лечения зафиксировано недостоверное ТРО = 63,9% ($V_{cp}=7,2\pm 3,9$ мм³ против $V_{cp}=20,2\pm 6,0$ мм³ в контроле , $p<0,364$). На 10-е сутки после начала лечения зафиксировано ТРО = 56,9%
20 ($V_{cp}=33,4\pm 16,1$ мм³ против $V_{cp}=77,3\pm 32,0$ мм³ в контроле , $p<0,315$). С 14-е по 17-е сутки наблюдали увеличение ТРО до 60,6% ($V_{cp}=47,5\pm 16,8$ мм³ против $V_{cp}=120,6\pm 44,4$ мм³ в контроле , $p<0,193$) и 68,9% ($V_{cp}=58,0\pm 18,2$ мм³ против $V_{cp}=186,4\pm 65,0$ мм³ в контроле , $p<0,070$), соответственно . На 21-
25 е сутки после начала лечения и до конца периода наблюдения ТРО ниже биологически значимых значений (<50%). Число

павших мышей в группе до окончания периода наблюдения - 2 из 7.

Сводные результаты измерений и статистическая значимость отличий межгрупповых измерений приведены в 5 Таблицах 10 и 11.

Таблица 10.

Объемы опухолей у мышей в группах среднее и его ошибка
($M \pm m$)

10

Группы	Сутки от начала лечения							
	0	3	7	10	14	17	21	24
Стероид, 10 мг/кг	1,0±0, 4	1,2±0, 4	5,1±2, 3	24,8±12, 2	6,9±2,2	17,6±0,7	26,2±12,1	32,0±6,9
Тамоксифен 30 мг/кг	0,9±0, 2	2,0±0, 4	18,8±7, 4	67,6±21, 1	117,1±41, 7	218,3±63, 6	384,8±103, 2	392,1
Тамоксифен 10 мг/кг	0,7±0, 1	1,0±0, 3	7,2±3, 9	33,4±16, 1	47,5±16, 8	58,0±18, 2	145,5±70,9	211,1±9, 4,0
Контроль	1,5±0, 4	2,2±0, 5	20,0±6, 0	77,3±32, 0	120,6±44, 4	186,4±65, 0	266,5±91,3	233,2±8, 6,5

Таблица 11.

Влияние Препарата и Тамоксифена на торможение роста
SKBR-3 за весь период наблюдения, ТРО %

15

Группа		Сутки от начала лечения					
		7	10	14	17	21	24
1	Препарат, 10 мг/кг	74,3	68,0	94,3	90,6	90,2	86,3
2	Тамоксифен, 30 мг/кг	6,2	12,6	2,9	-17,1	-44,4	-68,1
3	Тамоксифен, 10 мг/кг	63,9	56,9	60,6	68,9	45,4	9,5

Пример 3.

Группа Контроль . В группе 12 мышей , 12 опухолей . На момент начала терапии $V_{cp}=3,8\pm 1,0$ мм³. Без специфического лечения размеры опухоли к 30-м суткам после трансплантации достигли $V_{cp}=299,1\pm 100,5$ мм³. Число павших мышей в группе до окончания периода наблюдения - 6 из 12.

Группа Препарат , 10 мг/кг. В группе 10 мышей , 10 опухолей . На момент начала терапии $V_{cp}=1,6\pm 0,4$ мм³ без достоверных отличий от контрольной группы . На 7-е сутки после начала лечения зафиксировано достоверное ТРО =66,1% ($V_{cp}=27,0\pm 5,1$ мм³ против $V_{cp}=79,6\pm 14,2$ мм³ в контроле , $p<0,002$). На 10-е сутки после начала лечения наблюдали ТРО =78,7% ($V_{cp}=21,6\pm 4,9$ мм³ против $V_{cp}=101,2\pm 22,5$ мм³ в контроле , $p<0,007$). На 14-е сутки после начала лечения наблюдали максимальное недостоверное ТРО , равное 83,1% ($V_{cp}=27,6\pm 2,6$ мм³ против $V_{cp}=163,3\pm 31,0$ мм³ в контроле , $p<0,06$). На 17-е сутки после начала лечения ТРО снижалось до 76,1% ($V_{cp}=46,3\pm 5,3$ мм³ против $V_{cp}=193,6\pm 39,6$ мм³ в контроле , $p<0,04$). Число павших мышей в группе до окончания периода наблюдения - 10 из 10.

Группа Тамоксифен , 30 мг/кг. В группе 10 мышей , 10 опухолей . На момент начала терапии $V_{cp}=4,1\pm 1,2$ мм³ без достоверных отличий от контрольной группы . На 7-е сутки и до конца периода наблюдения ТРО было ниже биологически значимого порога и не превышало 44,5% ($V_{cp}=44,1\pm 8,8$ мм³

против $V_{ср}=79,6\pm 14,2$ мм³ в контроле $p<0,10$). Число павших мышей в группе до окончания периода наблюдения — 4 из 10.

Группа Тамоксифен 10 мг/кг. В группе 10 мышей, 10 опухолей. На момент начала терапии $V_{ср}=2,3\pm 0,8$ мм³ без достоверных отличий от контрольной группы. В этой группе не выявлено ингибирование роста опухоли в течение всего периода наблюдения. Число павших мышей в группе до окончания периода наблюдения — 6 из 9.

Сводные результаты измерений и статистическая значимость отличий межгрупповых измерений приведены в Таблицах 12 и 13.

Таблица 12.

Объемы опухолей у мышей в группах среднее и его ошибка

15

(M ± ш)

Группы	Сутки от начала лечения						
	0	3	7	10	14	17	21
Препарат, в/ж 10 мг/кг (1)	1,57±0,3 5	5,65±1,6 4	26,98±5,1 2	21,59±4,8 8	27,59±2,57	46,25±5,3 1	
Тамоксифен 30 мг/кг (2)	4,14±1,2 2	17,12±4, 12	44,13±8,8 1	61,37±12, 03	119,53±18, 54	141,85±3 5,07	199,54±43, 55
Тамоксифен 10 мг/кг (3)	2,33±0,7 6	25,61±5, 56	79,17±18, 80	122,09±2 7,84	193,24±54, 10	237,32±7 7,07	322,76±88, 25
Контроль (4)	3,84±1,0 4	28,52±6, 27	79,57±14, 20	101,19±2 2,51	163,25±31, 00	193,58±3 9,56	299,05±100 ,50

Таблица 13.

Влияние Препарата и Тамоксифена на торможение роста

20

TNBC_Kad за весь период наблюдения, TPO %

Группа		Сутки от начала лечения				
		7	10	14	17	21
1	Препарат, 10 мг/кг	66,1	78,7	83,1	76,1	-
2	Тамоксифен, 30 мг/кг	44,5	39,4	26,8	26,7	33,3
3	Тамоксифен, 10 мг/кг	0,5	-20,7	-18,4	-22,6	-7,9

Проведенные сравнительные исследования противоопухолевой активности препарата при многократном введении бестимусным иммунодефицитным мышам Balb/c Nude на двух моделях подкожных ксенографтов рака молочной железы человека SKBR-3 и TNBC-Kad, отличающихся по фенотипу .

Пилотное исследование противоопухолевой активности препарата на модели SKBR3 в сравнении с Тамоксифеном (лекарственная форма) показало , что терапия препаратом в дозе 10 мг/кг была наиболее эффективной среди всех изученных режимов лечения : на 10-е сутки после начала терапии выявлен достоверный противоопухолевый эффект - максимальное ТРО =91,2% ($V_{cp}=2,2\pm 2,0$ мм³ против $V_{cp}=24,9\pm 12,5$ мм³ в контроле , $p<0,018$) на фоне относительно хорошей переносимости препарата . Тамоксифен в дозе 10 мг/кг был не эффективен : биологически значимое значение ТРО на протяжении всего периода наблюдения не достигнуто , напротив , с 10-17-е сутки после начала лечения зафиксирована стимуляция роста опухоли ..

Повторное исследование противоопухолевой активности препарата на той же модели SKBR3 в сравнении с Тамоксифеном (субстанция) показало, что препарат в дозе 10 мг/кг оказывает высокий противоопухолевый эффект с максимальным достоверным ТРО на 14-е (94,3%, $p < 0,03$) и на 24-е (86,3%, $p < 0,04$) сутки, что воспроизвело полученный в первом опыте результат.

Исследование противоопухолевой активности препарат на модели TNBC_Kad в сравнении с Тамоксифеном (субстанция) показало, что препарат в дозе 10 мг/кг на 7 и 10 сутки после начала лечения вызывает торможение роста опухоли на 66,1 и 78,7% (достоверные отличия от контрольной группы и группы с тамоксифеном 30 мг/кг). Эффект сохраняется в течение 10 дней примерно на том же уровне. Тамоксифен в дозе 30 мг/кг вызывает слабое недостоверное торможение роста опухоли на 44,5% на 7 сутки, которое уменьшается к концу наблюдения. Тамоксифен в дозе 10 мг/кг неэффективен на этой модели.

Промышленная применимость

Проведенные исследования показали, что заявленное применение соединения характеризуется:

- отсутствием цитотропного действия,
- широким спектром противоонкологической активности, включая активность против трижды негативного рака молочной железы,
- отсутствием токсичности,

- гипохолестеринемическим действием и отсутствием влияния на содержание триглицеридов в сыворотке крови,
- отсутствием негативного влияния на эндометрий.

5 Изобретение может быть применено при:

- моно- и адъювантной терапии раннего гормоноположительного рака молочной железы у женщин в постменопаузе.

- моно- и адъювантной терапии раннего гормоноположительного рака молочной железы у женщин в постменопаузе после 2-3

10 летнего применения тамоксифена.

- лечению распространенного рака молочной железы на поздних стадиях.

- лечению трижды негативного рака молочной железы.

- моно- и адъювантной терапии гепатокарциномы.

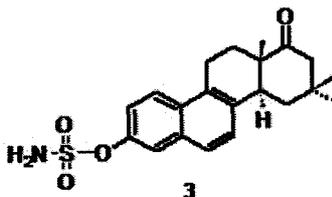
15 - моно- и адъювантной терапии карциномы желудка.

- моно- и адъювантной терапии рака легкого.

- моно- и адъювантной терапии хронической миелогенной лейкемии.

«ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ»

1.] Применение 3-О-Сульфатат -[16,16-диметил Д-Гомоэквиленина"
(формулы

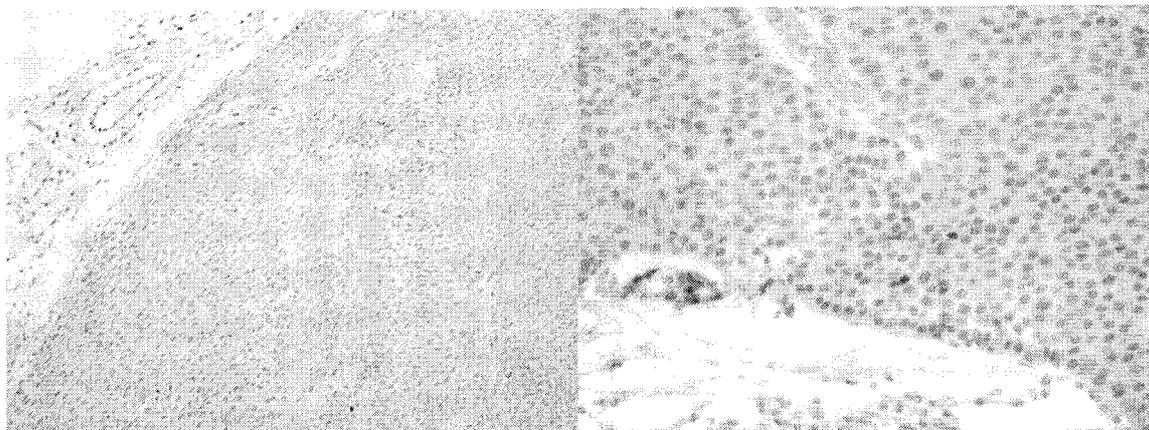


5

в качестве противоонкологического агента при моно- и адьювантной терапии онкологических заболеваний, таких как: гепатокарцинома, карцинома желудка, рак легкого, хроническая миелогенная лейкемия, рак молочной железы, включая трижды

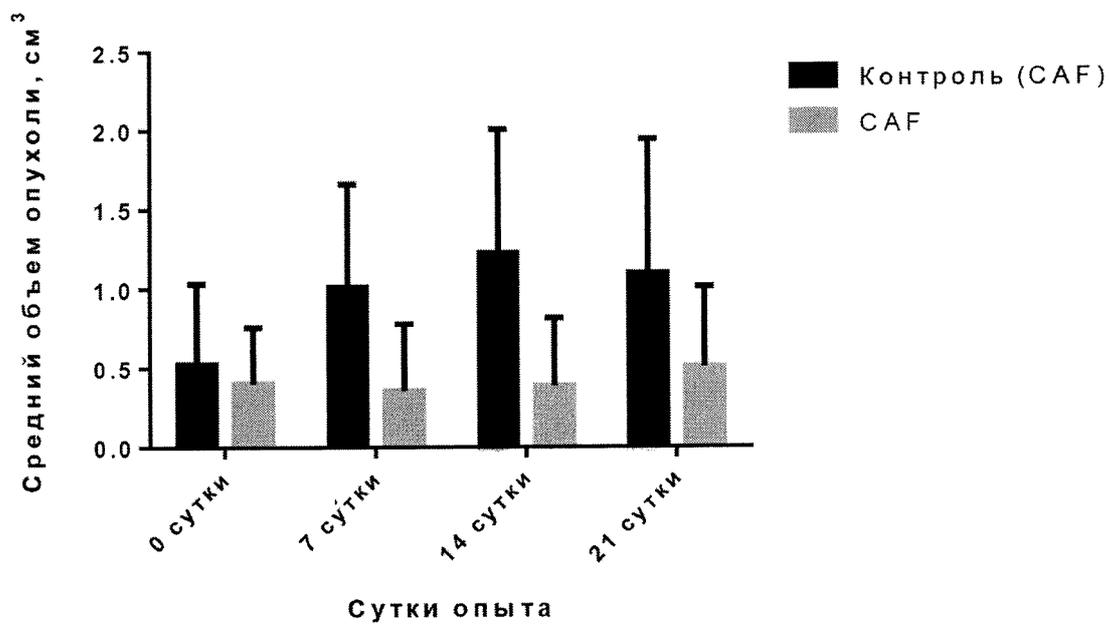
10 негативную форму рака молочной железы.

1/7



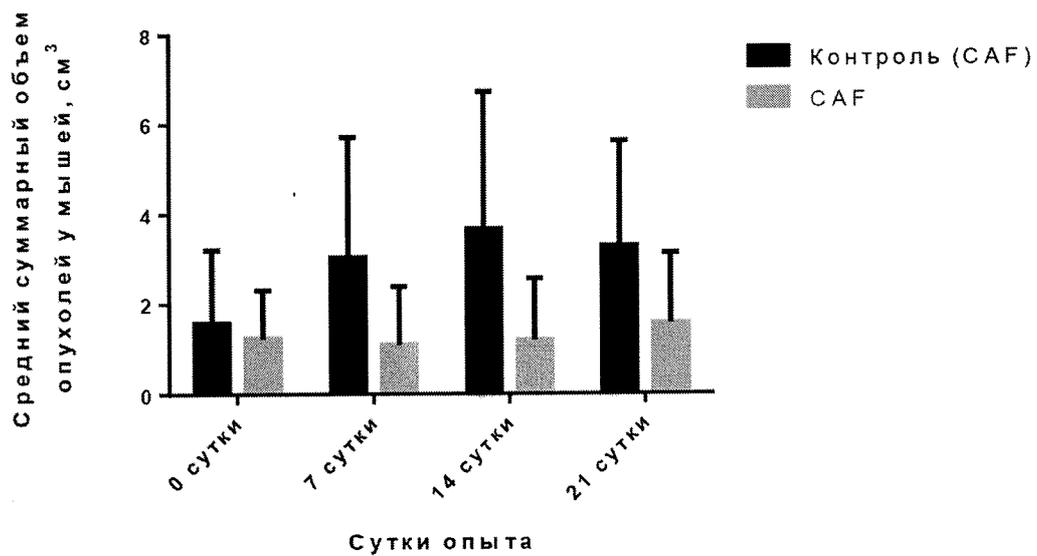
Фиг. 1

2/7



Фиг. 2

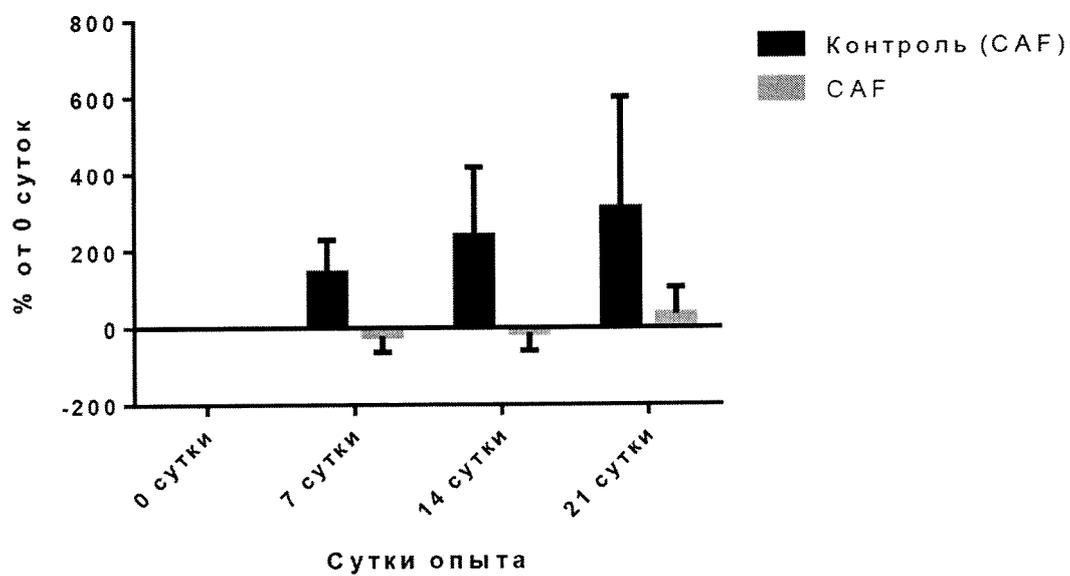
3/7



Фиг. 3

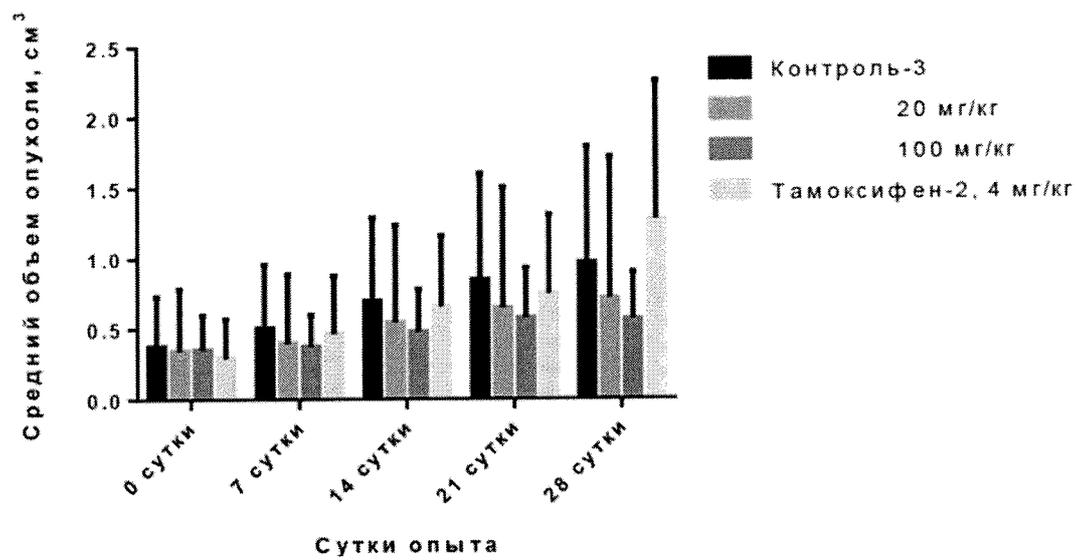
4/7

Относительное изменение среднего суммарного
объема опухолей у мышей



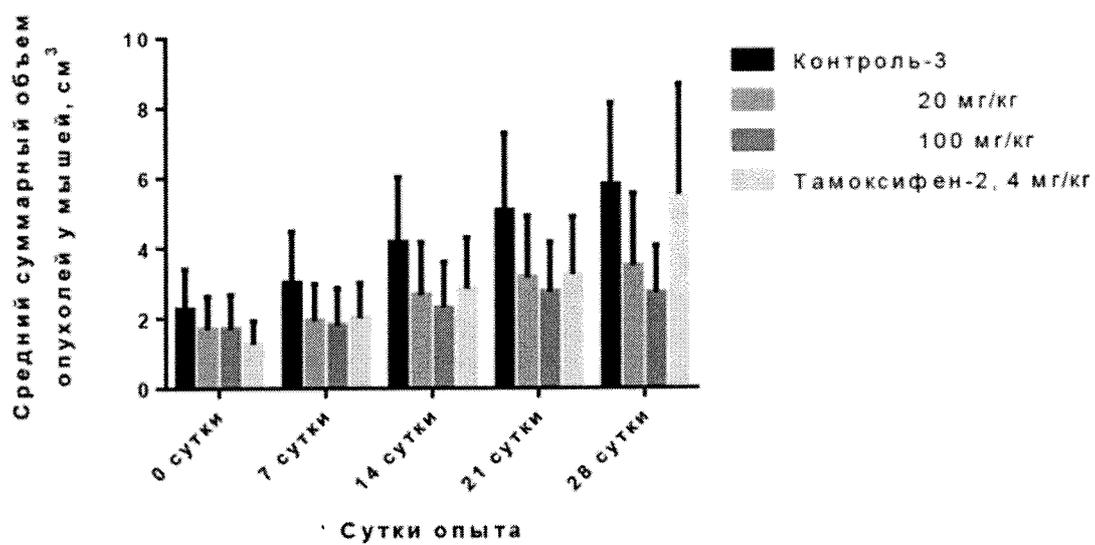
Фиг. 4

5/7



Фиг. 5

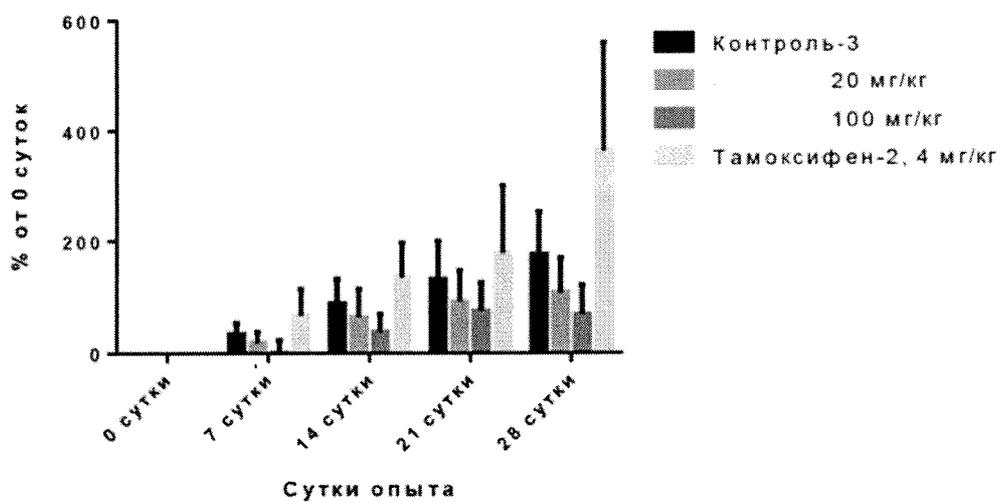
6/7



Фиг. 6

7/7

Относительное изменение среднего суммарного объема опухолей у мышей



Фиг. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2019/000650

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/566 (2006.01); A61P 35/00 (2006.01); C07J 63/00 (2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/566, A61P 35/00, C07J 63/00

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatSearch (RUPTO internal), USPTO, PAJ, Esp@cenet, DWPI, EAPATIS, PATENTSCOPE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GLUZDIKOV I. A. Sintez ingibitorov sulfatazy estrona: Avtoref. disp. na soiskanie uchenoi stepeni kandidata khimicheskikh nauk. Sankt-Peterburg: 2007, 17 p., compound 6	1
A	I. A. Gluzdikov et al. "Novye analogi D-gomoekvilenina, soderzhaschie zamestiteli v koltse D" ZHURNAL ORGANICHESKOI KHIMII, V. 42, Issue 11, 2006, 41687-1694	1
A	S.N. Morozkina et al. "Sintez i issledovanie nekotorykh biologicheskikh svoistv sulfamatov 8 a- analogov steroidnykh estrogenov" ZHURNAL ORGANICHESKOI KHIMII, V. 51, Issue 3, 2015, 425-430	1
A	WO 2004/074309 A1 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT) 02.09.2004	1

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 December 2019 (20.12.2019)

Date of mailing of the international search report

09 January 2020 (09.01.2020)

Name and mailing address of the ISA/

RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2019/000650

<p>А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ</p> <p style="text-align: center;"><i>A61K 31/566 (2006.01)</i> <i>A61P 35/00 (2006.01)</i> <i>C07J 63/00 (2006.01)</i></p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>																												
<p>В. ОБЛАСТЬ ПОИСКА</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)</p> <p style="text-align: center;">A61K 31/566, A61P 35/00, C07J 63/00</p> <p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки</p> <p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)</p> <p style="text-align: center;">PatSearch (RUPTO internal), USPTO, PAJ, Esp@cenet, DWPI, EAPATIS, PATENTSCOPE</p>																												
<p>С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Категория*</th> <th>Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th>Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>ГЛУЗДИКОВ И. А. Синтез ингибиторов сульфатазы эстрогена: Автореф. дисс. на соискание учёной степени кандидата химических наук. Санкт-Петербург: 2007, 17 с., соед. 6</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>И. А. Глуздикив и др. "Новые аналоги D-гомоэквиленина, содержащие заместители в кольце D" ЖУРНАЛ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ, т. 42, вып. 11, 2006, 41687-1694</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>С.Н. Морозкина и др. "Синтез и исследование некоторых биологических свойств сульфаматов 8α-аналогов стероидных эстрогенов" ЖУРНАЛ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ, т. 51, вып. 3, 2015, 425-430</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2004/074309 A1 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT) 02.09.2004</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы С. <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении</p> <table border="1"> <tr> <td>* Особые категории ссылочных документов:</td> <td>"Т" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</td> </tr> <tr> <td>"А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</td> <td>"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</td> </tr> <tr> <td>"Е" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</td> <td>"У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</td> </tr> <tr> <td>"L" документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</td> <td>"&" документ, являющийся патентом-аналогом</td> </tr> <tr> <td>"O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</td> <td></td> </tr> </table>		Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	X	ГЛУЗДИКОВ И. А. Синтез ингибиторов сульфатазы эстрогена: Автореф. дисс. на соискание учёной степени кандидата химических наук. Санкт-Петербург: 2007, 17 с., соед. 6	1	A	И. А. Глуздикив и др. "Новые аналоги D-гомоэквиленина, содержащие заместители в кольце D" ЖУРНАЛ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ, т. 42, вып. 11, 2006, 41687-1694	1	A	С.Н. Морозкина и др. "Синтез и исследование некоторых биологических свойств сульфаматов 8α-аналогов стероидных эстрогенов" ЖУРНАЛ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ, т. 51, вып. 3, 2015, 425-430	1	A	WO 2004/074309 A1 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT) 02.09.2004	1	* Особые категории ссылочных документов:	"Т" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение	"А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности	"Е" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	"У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста	"L" документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	"&" документ, являющийся патентом-аналогом	"O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.		"P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №																										
X	ГЛУЗДИКОВ И. А. Синтез ингибиторов сульфатазы эстрогена: Автореф. дисс. на соискание учёной степени кандидата химических наук. Санкт-Петербург: 2007, 17 с., соед. 6	1																										
A	И. А. Глуздикив и др. "Новые аналоги D-гомоэквиленина, содержащие заместители в кольце D" ЖУРНАЛ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ, т. 42, вып. 11, 2006, 41687-1694	1																										
A	С.Н. Морозкина и др. "Синтез и исследование некоторых биологических свойств сульфаматов 8α-аналогов стероидных эстрогенов" ЖУРНАЛ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ, т. 51, вып. 3, 2015, 425-430	1																										
A	WO 2004/074309 A1 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT) 02.09.2004	1																										
* Особые категории ссылочных документов:	"Т" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение																											
"А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности																											
"Е" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	"У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста																											
"L" документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	"&" документ, являющийся патентом-аналогом																											
"O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.																												
"P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета																												
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p style="text-align: center;">20 декабря 2019 (20.12.2019)</p>	<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p style="text-align: center;">09 января 2020 (09.01.2020)</p>																											
<p>Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП-3, Россия, 125993 Факс: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37</p>	<p>Уполномоченное лицо:</p> <p style="text-align: center;">Крылова С.М.</p> <p>Телефон № 8 499 240 25 91</p>																											