

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042485**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.02.17**

**(21)** Номер заявки  
**202191322**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.09.19**

**(51)** Int. Cl. **A61K 31/566** (2006.01)  
**C07J 73/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 31/138** (2006.01)

---

**(54) ЛЕЧЕНИЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ВКЛЮЧАЯ ТРИЖДЫ НЕГАТИВНУЮ ФОРМУ**

---

**(31)** 2018139335

**(32)** 2018.11.08

**(33)** RU

**(43)** 2021.08.06

**(86)** PCT/RU2019/000649

**(87)** WO 2020/096485 2020.05.14

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ИЛЬЯСОВА НАТАЛЬЯ  
ЭДУАРДОВНА (RU)**

**(72)** Изобретатель:  
**Ильясов Шамиль Сионович, Шавва  
Александр Григорьевич, Морозкина  
Светлана Николаевна (RU)**

**(74)** Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

**(56)** US-A1-20180085348

RU-C1-2619457

RU-C1-2620084

MOROZKINA S.N. et al. Sintez i  
issledovanie nekotorykh biologicheskikh svoistv  
sulfamatov 8a-analogov steroidnykh estrogenov.  
Zhurnal organicheskoi khimii, 2015, Volume 51, issue  
3, p. 425-430, compound 4c

RU-C1-2629186

US-A1-20150366824

CN-A-108379568

CH-A5-614217

---

**(57)** Изобретение относится к области медицины и химико-фармацевтической промышленности и касается средств для лечения рака молочной железы. Предложены применение 3-О-сульфоилокси-7β-метил-D-гомо-6-окса-8α-эстра-1,3,5(10)-триен-17α-она в качестве противоопухолевого агента при моно- и адьювантной терапии рака молочной железы, включая трижды негативный рак молочной железы, и способ его получения.

---

**042485**

**B1**

**042485**

**B1**

### Область техники

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

#### Предшествующий уровень техники

Рак молочной железы является ведущим онкологическим заболеванием у женщин [Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., and 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 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. 161-170]. При иммуногистохимическом исследовании рака молочной железы определяются рецепторы эстрогенов (ER), прогестерона (PR) и her2neu ("чувствительность к герцептину"). Значительная часть опухолей содержит рецепторы эстрогенов, прогестерона и/или HER2NEU 3+. Если опухоль не имеет рецепторов и не чувствительна к герцептину (ER0, PR0, 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.

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 применение ингибиторов, блокирующих образование этой группы свободных гормонов в опухоли.

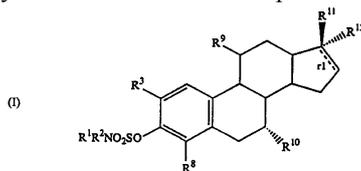
К препаратам из группы селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов, которые блокируют эффекты эстрогена на гормонозависимые ткани, в том числе - на ткани молочной железы, относится тамоксифен. Тамоксифен является стандартом гормональной терапии для женщин в пременопаузе и постменопаузе. Наиболее характерными побочными эффектами, возникающими на фоне применения тамоксифена, являются: 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 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 летрозол и анастрозол, которые по системе БКС отнесены к первому классу - препараты, который имеют высокую растворимость и высокую проницаемость. К побочным эффектам ингибиторов ароматазы относятся остеопороз, приливы, головные боли.

Кроме того, привлекает внимание стероидная сульфатаза в связи с локальным межтканевым образованием эстрогенов из обильного пула циркулирующего сульфата эстраона. Стероидная сульфатаза катализирует гидролиз сульфата эстраона до эстраона и 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 эстраона (Ahmed S., *Curr. Med. Chem.*, 2002, vol. 9, No. 2, p. 263-273). Однако он обладает существенным недостатком. Под действием ингибиторов сульфатазы эстраона, имеющих в своем составе сульфаматную группу, происходит необратимая дезактивация фермента с высвобождением свободного лиганда [Howarth N.M., Purohit A., Reed M.J. *J. Med. Chem.*, 1994, vol. 37, p. 219-221]. В частности, сульфамат эстраона эффективно ингибирует сульфатазу эстраона, однако высвобождение свободного гормона приводит к появлению сильной утеротропной активности [Shields-Botella Jet al., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*, 2003, vol. 84, p. 327-335].

Ряд ингибиторов сульфатазы эстраона защищены в патенте WO 99/33858 (A2) - 1999-07-08, где в качестве ингибиторов сульфатазы эстраона для лечения или профилактики эстрогензависимых расстройств, таких как рак молочной железы, могут быть использованы производные общей формулы



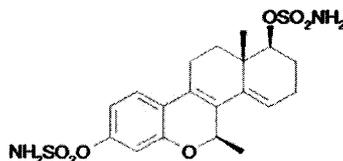
Данные производные обладают также утеротропной активностью.

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

Выполнение этих условий привело к расширению области применения сульфаматов на основе эстрогенов ввиду широкого потенциала их действия, в частности, при рецидивирующем раке молочной же-

лезы [Shah R. et al., Sulfatase inhibitors for recidivist breast cancer treatment: A chemical review, Eur. J. Med. Chem., 2016. vol. 114, p. 170-190].

Известно соединение 3,17 $\alpha$ -дисульфамоиокси-7 $\beta$ -метил-D-гомо-6-окса-эстра-1,3,5(10),8,14-пентаена формулы

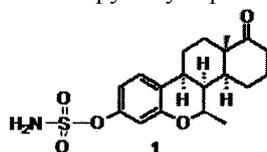


в качестве ингибитора роста клеток рака молочной железы MCF-7 (RU 2619457, опубл. 16.05.2017). Данное соединение может быть указано в качестве ближайшего аналога.

#### 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 рака молочной железы, в том числе при лечении его самой смертоносной форме - трижды негативной (ER-/PR-/HER-2-).

Задача решается использованием соединения 3-О-сульфамоиокси-7 $\beta$ -метил-6-окса-D-гомо-8 $\alpha$ -эстра-1,3,5(10)-триен-17 $\alpha$ -она (1), которое ингибирует сульфатазу эстрогена,



в качестве противоопухолевого агента при моно- и адъювантной терапии начальных и прогрессирующих форм рака молочной железы, включая трижды негативную форму (ER-/PR-/HER-2-) рака молочной железы.

Поставленная задача также решена способом получения противоопухолевого агента. Отличительной особенностью предложенной схемы является то, что возможно масштабирование в промышленных масштабах. Способ включает кислотный гидролиз метилового эфира 7 $\beta$ -метил-6-окса-D-гомо-8 $\alpha$ -эстрогена под действием бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, при этом гидролиз проводят в атмосфере аргона с последующей экстракцией этилацетатом, промыванием водой, насыщенным раствором натрия хлорида, сушкой, полученный рацемический 7 $\beta$ -метил-6-окса-D-гомо-8 $\alpha$ -эстрон растворяют в диметилформамиде и добавляют сульфамойлхлорид, продукт реакции экстрагируют этилацетатом, промывают насыщенным раствором хлористого натрия, сушат сульфатом натрия.

Полученный противоопухолевый агент относится к 5 классу опасности ( $LD_{50} > 5000$  мг/кг). Полученные данные позволяют оценить дозы для исследования противоопухолевой активности как безопасные. Терапевтически эффективные дозы препарата предпочтительно составляют от 0,1 до 20 мг.

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

На фиг. 1 представлено окрашивание антителами к ER $\alpha$  опухоли МЖ. Визуализация пероксидазы хрена + диаминобензидин, ув.  $\times 100$  (А). Специфическое окрашивание ядер клеток протока молочной железы и ядер единичных опухолевых клеток (Б), ув.  $\times 400$ .

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

На фиг. 2 отображена динамика среднего объема опухолей, имевшихся к началу опыта, у мышей при терапии схемой САФ.

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 САФ наблюдается отсутствие изменения этого показателя на протяжении почти 3 недель, свидетельствующее о стабилизации заболевания. Частота стабилизации отдельных опухолей составляет около 60% к 21 суткам.

Исследование проведено на мышках-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.

Для исследования была использована лекарственная форма препарата Тамоксифен Гексал (Гексал АГ, Германия, 83607 Хольцкирхен, серия HA1575 от 01/17), представляющая собой таблетки, покрытые оболочкой белого или слегка желтоватого цвета, круглые, двояковыпуклые, с однородной гладкой 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).

Животных содержали в отдельном помещении группами (не более 5 особей) в индивидуальных клетках для лабораторных грызунов типа T2. Размеры 268×215×141 мм (площадь основания 370 см<sup>2</sup>). Ванна из поликарбоната, крышка из нержавеющей стали с бункером для корма, разделителем для поилки.

Подстил - стружка древесная обеспыленная.

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 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 ч ночь - 12 ч день при искусственном 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, ФИО 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.

Проведено определение LD<sub>50</sub> 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.

На первом шаге 3 мышам вводили препарат в дозе 300 мг/кг. Исследуемый препарат вводили внутрижелудочно с помощью металлического атравматического зонда (в соответствии с пероральным путем применения в клинике). Для внутрижелудочного введения субстанцию препарата смешивали с оливковым 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 препарата в дозе 300 мг/кг этот же уровень дозы препарата использован для введения еще 3 животным для каждого из препаратов. Гибель животных также отсутствовала, поэтому далее препарат вводили в дозе 2000 мг/кг в 2 шага по 3 животных на каждом шаге.

Вели клиническое наблюдение и регистрацию массы тела в соответствие с табл. 1. Животных осматривали ежедневно 2 раза в день, клинически обследовали индивидуально после введения дозы первые 60 мин, с особым вниманием в течение первых 4 ч, периодически в течение первых 24 ч, 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 максимально 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. Было 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															■

Исследуемый препарат вводили внутривенно 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 пятикратной суточной дозе - 100 мг/кг массы тела. Для введения его темпоре готовили раствор препаратов в оливковом масле (рафинированное оливковое масло с добавлением нерафинированного Extra Virgen марки Global Village "Clasico" серия L:183351116, срок годности до 26.04.2020, ВАИЕО, Испания). Объем введения составил 0,1 мл на 10 г массы тела мыши (0,2 мл готовой формы для мыши массой 20 г). Начало введения препарата через 24 ч после рандомизации. Курс введения составил 27-28 дней.

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. Эта доза соответствует суточной дозе для человека 20 мг/кг. Таблетку тамоксифена измельчали в ступке, из полученного порошка готовили суспензию в 40 мл оливкового 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 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).

Массу тела животных регистрировали перед первым введением препаратов и далее два раза в неделю с помощью поверенных быстродействующих электронных лабораторных весов Ohaus Scout Pro (США), с максимально нагрузкой 2000 г, шагом измерения 0,1 г.

Один раз в неделю во время взвешивания у животных измеряли макроскопически определяемые опухолевые узлы. Для каждого узла измеряли два линейных размера: наибольший и больший, перпендикулярный к нему. Наибольший размер принимали за длину (а) и второй размер за ширину (b) опухолевых узлов. Объем опухоли рассчитывали по формуле

$$V=(axb)^2/2, (1)$$

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

Процент торможения роста опухоли рассчитывали по формуле

$$ТРО = (VK-VO)/VK \times 100 (\%), (2)$$

где VK - средний объем опухоли в контрольной группе;

VO - средний объем опухоли в опытной группе.

Первичные данные с индивидуальных бланков перенесены в книги программы Microsoft Excel 2007. Для всех количественных данных вычислены групповое среднее арифметическое (M) и среднеквадратическое отклонение (m). 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 мин, затем осматривались ежечасно 3 ч, далее через 24 ч. На вторые 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 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 поведение 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.

Данные о массе тела приведены в табл. 2 и 3.

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	29,0	29,2	29,6	29,8
мышь №2	26,4	26,4	27,0	27,2
мышь №3	28,2	28,0	28,4	28,6
2 серия	15.05.2018	16.05.2018	21.05.2018	28.05.2018
мышь №4	30,0	30,8	30,8	30,3
мышь №5	29,0	29,6	31,2	31,0
мышь №6	29,5	28,6	30,4	30,6
Среднее (% исходной)	28,7	28,8 (0)	29,6 (3)	29,6 (3)
Летальные эффекты (пало/всего)				0/6

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	26,2	24,7	25,7	26,5
1 серия	17.09.18	18.09.18	23.09.18	30.09.18
мышь №2	26,0	25,7	25,0	25,1
мышь №3	28,4	27,7	25,8	28,3
2 серия	30.09.18	01.10.18	06.10.2018	13.10.2018
мышь №4	27,7	27,0	26,9	28,0
мышь №5	26,2	25,3	24,6	25,9
мышь №6	28,3	27,4	27,6	29,1
Среднее (% исходной)	27,1	26,3 (-3)	25,9 (-4)	27,2 (0)
Летальные эффекты (пало/всего)				0/6

Поскольку гибель животных при введении дозы 300 мг/кг отсутствовала, перешли к введению препарата в дозе 2000 мг/кг. Препарат был введен в два приема с интервалом 3 ч, в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела на прием при концентрации 100 мг/мл так как 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 3% на 2 сутки и на 4 % на 7 сутки от исходной. К концу периода наблюдения средняя масса тела не отличалась от исходного значения.

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.

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.

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.

Легкие светло-розового цвета, воздушные.

Таким образом, в соответствии с проведенным тестом ОЭСР 423 препарат может быть отнесен к 5-й или не классифицируемой категории с LD<sub>50</sub>, равной или более 5000 мг/кг, что соответствует классу малоопасных веществ по ГОСТ 12.1.007-76.

Животные удовлетворительно переносили введение препарата, клинических признаков токсичности не наблюдалось. Масса тела животных несколько уменьшалась к концу 1-й недели введения препарата, а также в контрольной группе, что вероятно связано со стрессом манипуляций по пероральному введению препаратов, в дальнейшем наблюдалась прибавка массы тела, которая может быть связана также с увеличением объема опухолевых узлов у мышей (табл. 4).

При аутопсии специфических признаков токсического поражения внутренних органов не выявлено. У мышей всех групп наблюдалась жировая инфильтрация стенки верхних отделов тонкого кишечника, вероятно связанная с введением масла.

Таблица 4

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

Группа	Показатель	27.06.2018 (1)	02.07.2018 (6)	09.07.2018 (13)	16.07.18 (20)	23.07.18 (27)
Контроль-1	M	27,5	26,9	27,5	28,1	29,3
	m	0,8	0,7	0,8	0,9	1,0
20 мг/кг	M	28,9	27,5	28,2	28,8	30,2
	m	0,7	0,6	0,8	1,0	1,2
100 мг/кг	M	28,6	27,6	28,3	28,6	30,3
	m	0,5	0,4	0,6	0,7	0,8
Тамоксифен-1, 4 мг/кг	M	27,7	26,5	27,3	27,5	28,2
	m	0,8	0,8	0,9	0,9	1,0

Данные о динамике среднего объема опухолей, имевшихся к началу опыта, приведены на фиг. 5 и в табл. 5.

Средние объемы опухолей увеличивались в течение периода наблюдения во всех группах. Показатель ТРО на 27 сутки составил 9 и 21% для групп 20 и 100 мг/кг соответственно. Эта активность сопоставима с эффектом препарата сравнения тамоксифеном, для которого показатель ТРО к концу периода наблюдения составил 35% (p<0,05 по сравнению с группой контроля).

Таблица 5

Динамика среднего объема опухолей (см<sup>3</sup>), имевшихся к началу опыта, при оценке противоопухолевой активности препарата

Группа	Показатель	25.06.201 8 (-1)	02.07.201 8 (6)	09.07.201 8 (13)	16.07.18 (20)	23.07.18 (27)	% изменения от исх.
Контроль-1 (N=23)	M	0,18	0,3	0,56	0,66	0,89	394
	m	0,03	0,05	0,09	0,09	0,13	
20 мг/кг (N=27)	M	0,27	0,32	0,39	0,6	0,81	200
	m	0,05	0,06	0,08	0,13	0,16	
	ТРО, %	-50	-7	30	9	9	
100 мг/кг (N=25)	M	0,34	0,38	0,46	0,55	0,7	106
	m	0,12	0,11	0,11	0,1	0,14	
	ТРО, %	-89	-27	18	17	21	
Тамоксифен- 1, 4 мг/кг (N=29)	M	0,23	0,26	0,3	0,47	0,58 *	152
	m	0,07	0,07	0,07	0,1	0,11	
	ТРО, %	-28	13	46	29	35	

M - среднее значение,

m - ошибка средней арифметической,

N - число опухолей на начало лечения и включенных в анализ.

\* p<0,05 по сравнению с контрольной группой.

Средний объем новых опухолей, появившихся за время наблюдения, измеренный в конце периода наблюдения, статистически значимо не отличался между группами, но имелась тенденция к уменьшению этого показателя в опытных группах (табл. 6). Так, в группе Контроль-1 средний объем новых опухолей составил 0,33±0,08 см<sup>3</sup>, в группе 20 мг/кг -0,27±0,05 см<sup>3</sup>, в группе 100 мг/кг - 0,20±0,05 см<sup>3</sup>, что на 18 и на 39% меньше, чем в контрольной группе, соответственно. В группе Тамоксифен-1 этот показатель составил 0,16±0,05 см<sup>3</sup>, что на 52% меньше, чем в контрольной группе.

Статистически значимых отличий по оцененным показателям между опытными и контрольной группами не было, кроме статистически значимого ТРО для группы Тамоксифен-1 на 27 сутки опыта. Торможение роста опухоли постепенно увеличивалось в группах, получавших препарат в дозе 100 мг/кг.

Таблица 6

Частота стабилизации 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 <sup>3</sup> )	
				M	m
Контроль-1	23	4%	26	M	0,33
				m	0,08
20 мг/кг	27	19%	29	M	0,27
				m	0,05
100 мг/кг	25	16%	25	M	0,20
				m	0,05
Тамоксифен-1, 4 мг/кг	29	10%	21	M	0,16 (p=0,0728)
				m	0,05

% стабилизации заболевания – показатель, аналогичный критерию RECIST, отражающий частоту опухолей, объем которых не увеличился более чем на 20% к концу наблюдения по отношению к началу лечения.

Средний суммарный объем опухолей на -1 сутки и на 6 сутки был больше в опытных группах, чем в контроле, а на 13-27 сутки наблюдалось его уменьшение по сравнению со значениями в контрольной группе (табл. 7, фиг. 6), что свидетельствует о противоопухолевом эффекте препарата в дозе 100 мг/кг и препарата сравнения - тамоксифена.

Таблица 7

Средний суммарный объем опухолей (см<sup>3</sup>) у мышей при оценке противоопухолевой активности препарата

Группа	Показатель	25.06.201 8 (-1)	02.07.201 8 (6)	09.07.201 8 (13)	16.07.18 (20)	23.07.18 (27)	% изменения от псх
Контроль-1 (N=10)	M	0,42	0,68	1,29	1,51	2,04	386
	m	0,06	0,12	0,26	0,31	0,49	
20 мг/кг (N=10)	M	0,72	0,86	1,04	1,61	2,19	204
	m	0,21	0,25	0,31	0,53	0,64	
	TPO, %	-71	-26	19	-7	-7	
100 мг/кг (N=10)	M	0,86	0,94	1,15	1,36	1,74	102
	m	0,27	0,27	0,28	0,29	0,41	
	TPO, %	-105	-38	11	10	15	
Тамоксифен-1, 4 мг/кг (N=10)	M	0,66	0,76	0,88	1,38	1,68	155
	m	0,17	0,18	0,28	0,37	0,41	
	TPO, %	-57	-12	32	9	18	

M - среднее значение,

m - ошибка средней арифметической,

N - число животных включенных в анализ.

При оценке относительного изменения суммарного объема опухолей у мышей установлено, что этот показатель в контрольной группе (Контроль-1) изменяется линейно и постоянно увеличивается. Во всех опытных группах, включая препарат сравнения, этот показатель был статистически значимо меньше (табл. 8, фиг. 7), что свидетельствует о влиянии исследуемого препарата на рост опухоли, хотя это не привело к уменьшению абсолютных значений объемов опухолей.

Таблица 8

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

Группа	Показатель	25.06.2018 (-1)	02.07.2018 (6)	09.07.2018 (13)	16.07.18 (20)	23.07.18 (27)
Контроль-1 (N=10)	M	0	68	227	292	407
	m	0	16	53	70	92
20 мг/кг (N=10)	M	0	20	38 **	101 **	212 **
	m	0	6	12	27	45
100 мг/кг (N=10)	M	0	26	68 *	139 *	198 **
	m	0	16	28	63	75
Тамоксифен-1, 4 мг/кг (N=10)	M	0	40	80 *	161 *	246 *
	m	0	18	41	44	73

\*, \*\*, \*\*\* - p<0,05, p<0,01, p<0,001, соответственно, по сравнению с контрольной группой.

В качестве параметра оценки гормонального эффекта препарата оценен вес тела матки без рогов (табл. 9). Вес этого органа не отличался от показателя контрольной группы, что свидетельствует об отсутствии гормонального эффекта препарата в отношении матки.

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-1	67±3	Э – 8	28,5±1,0
	32±16	Д – 2	32,9±2,5
	60±6	Все	29,3±1,0
Тамоксифен-1, 4 мг/кг	31±2	Э – 9	28,0±1,0
	34	Д – 1	30,5
	32±2	Все	28,2±1,0
20 мг/кг	47±7	Э – 7	30,1±1,7
	49±16	Д – 3	30,3±1,8
	48±5	Все	30,2±1,2
100 мг/кг	56±5	Э – 8	29,6±0,5
	26±12	Д – 2	33,1±4,5
	50±6	Все	30,3±0,8

Полученные результаты свидетельствуют о наличии противоопухолевой активности препарата, сопоставимой с препаратом сравнения.

Эффективность препарата на модели множественных опухолей молочной железы у мышей самок линии FBV/N трансгенных по HER-2/neu по показателю ТРО составила 9 и 21% для доз 20 и 100 мг/кг, соответственно. Эта активность сопоставима с эффектом препарата сравнения тамоксифеном (4 мг/кг), для которого показатель ТРО к концу периода наблюдения составил 35%.

Показано, что у препарата отсутствует утеротропная активность.

В соответствии с проведенным тестом ОЭСР 423 препарат может быть отнесен к 5-й или не классифицируемой категории с LD<sub>50</sub>, равной или более 5000 мг/кг, что соответствует классу малоопасных веществ по ГОСТ 12.1.007-76.

#### Краткое описание фигур чертежей

На фиг. 1 представлено окрашивание антителами к ER $\alpha$  опухоли МЖ.

На фиг. 2 отображена динамика среднего объема опухолей, имевшихся к началу опыта, у мышей при терапии схемой CAF.

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

Фиг. 4 показывает относительное изменение среднего суммарного объема опухолей, имевшихся к началу опыта, у мышей при терапии схемой CAF.

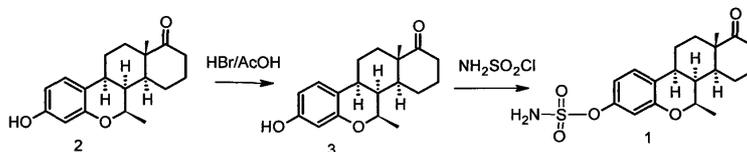
На фиг. 5 показана динамика среднего объема опухолей, имевшихся к началу опыта, у мышей при оценке противоопухолевой активности.

Фиг. 6 представляет средний суммарный объем опухолей у мышей при оценке противоопухолевой активности препарата.

Фиг. 7 показывает относительное изменение среднего суммарного объема опухолей у мышей при оценке противоопухолевой активности препарата.

#### Лучший пример осуществления изобретения

Изобретение может быть проиллюстрировано следующими ниже конкретными примерами осуществления изобретения.



Пример 1.

Синтез 3-О-сульфамойлокси-7 $\beta$ -метил-D-гомо-6-окса-8 $\alpha$ -эстра-1,3,5(10)-триен-17 $\alpha$ -она (1).

К раствору 300 мг метилового эфира рацемического 7 $\beta$ -метил-6-окса-D-гомо-8 $\alpha$ -эстрона (2) в 15 мл ледяной уксусной кислоты при комнатной температуре добавляют 2 мл 40% HBr. Реакционную смесь кипятят 7 ч, затем выливают в воду, экстрагируют этилацетатом. Органические слои промывают водой, насыщенным раствором NaCl, сушат над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Растворитель удаляют на ротационном испарителе. Получают 174 мг (62%) рацемического 7 $\beta$ -метил-6-окса-D-гомо-8 $\alpha$ -эстрона (3), т.пл. 231-232°C (по данным лит. т.пл. 230-231°C [WO 2009/059806]).

Найдено, %: С 76,14; Н 8,17. С<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>. Вычислено, %: С 75,97; Н 8,05.

К раствору 100 мг соединения (3) в 1 мл диметилформамида добавляют 12 мг сульфамойлхлорида. Через 2 ч реакционную смесь выливают в 6 мл насыщенного раствора NaCl, продукты реакции экстрагируют этилацетатом. Органическую фазу промывают насыщенным раствором NaCl, сушат сульфатом натрия. Получают 93 мг (74%) целевого продукта 1, т.пл. 195-197°C.

Спектр ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ , м.д.: 214,9, 153,5, 149,8, 125,6, 130,6, 115,0, 111,7, 71,6, 47,4, 44,8,

40.7, 37.9, 34.8, 32.9, 27.4, 26.9, 24.7, 20.0, 19.6.

Масс-спектр, m/z ( $I_{\text{отн}}$ , %): 379 (100), 331 (18), 316 (6), 305 (11), 278 (62), 270 (72), 251 (48), 225 (32), 211 (43), 199 (55), 185 (22), 171 (30).

Найдено, %: С 60.12; Н 6.48; N 3.58.  $C_{10}H_{25}NO_5S$ . Вычислено, %: С 60.14; Н 6.64; N 3.69.

Пример 2.

Клетки высаживались на флаконы Карреля по  $50 \times 10^4$  клеток на флакон. Для изучения пролиферативной активности клеток в условиях подавления сульфатазы через 24 ч после 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 в культуральной среде не превышала 0.5%. Для исключения цитотоксического действия ДМСО ставили контроль с добавлением ДМСО без ингибитора сульфатаз. Для исключения неспецифического губительного действия веществ использовали нормальные кожные фибробласты человека. Далее, клетки снимали раствором версенатрипсина (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 определялось как 100%. Пролиферативную активность всех исследованных клеточных культур при воздействии ингибиторов сульфатаз определяли не менее трех раз.

Исследование влияния полученного сульфамата на рост перевиваемой культуры клеток человека MCF-7 (аденокарцинома молочной железы) показало, что стероид (1) 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 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. Результаты исследования представлены в табл. 10. Экспериментальные данные анализировали с помощью пакета статистических программ "STATISTICA 5.0".

Таблица 10

Влияние на биохимические параметры овариэктомированных крыс (ОВЭ)

Группа крыс (число животных в группе)	Изменение массы тела за время опыта, г	Масса матки, мг/100 г массы тела	Вес золы после сжигания бедренной кости /«Влажный» вес бедренной кости	Содержание холестерина в сыворотке крови, мг/100 мл	Содержание триглицеридов в сыворотке крови, мг/100 мл
Ложнооперированные (10)	29±3*	200±12**	0.435±0.005*	50.4±2.9*	85.4±5.9*
Овариэктомированные (15)	54±4	32±3	0.400±0.003	69.3±3.2	69.2±5.4
Овариэктомированные, получавшие ЕЕ (0.1 мг/кг массы тела) (15)	3±4*	164±11**	0.436±0.004*	45.5±2.1*	129.8±14.5*
Овариэктомированные, получавшие препарат (5 мг/кг массы тела) (15)	48±4	33±3	0.390±0.004	52.2±2.6*	59. 59.6±4.8

ЕЕ - 17 $\alpha$ -этинилэстрадиол,

\*  $P_{\text{ОВЭ}} < 0,05$ ,

\*\*  $P_{\text{ОВЭ}} < 0,01$ .

Полученные результаты показывают, что заявленный агент не обладает утеротропной активностью, проявляет гипохолестеринемическое действие и не повышает содержание триглицеридов в сыворотке крови. Последнее важно, поскольку высокий уровень триглицеридов в сыворотке крови связывают с риском возникновения сердечно-сосудистых заболеваний.

В экспериментах на мышах линии FVB, трансгенной по HER-2/neu (ER-/PR-/HER2+), с опухолями молочных желез, агент ингибирует рост опухолей в той же степени, что и применяемый в клинической практике тамоксифен, что допускает их совместное использование для лечения рака молочной железы (это может привести к снижению побочных эффектов).

На клеточной линии трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231 соединение ингиби-

рует рост клеток,  $IC_{50}=4,8$  цМ, что сравнимо с применяющимся в клинической практике химиотерапевтическим препаратом этопозидом.

Показано, что проведение химиотерапии пациентам с метастазами в подмышечные лимфоузлы достоверно увеличивает 5-летнюю безрецидивную выживаемость на 11% по сравнению с группой без химиотерапии и повышает общую выживаемость по сравнению с терапией тамоксифеном.

На животных моделях, с привитой человеческой опухолью трижды негативного рака молочной железы препарат показал более высокую активность по сравнению с используемыми в клинической практике тамоксифеном и ингибитором ароматазы летрозолом.

#### Промышленная применимость

В результате исследований было установлено, что описываемое соединение проявляет активность против трижды негативного рака молочной железы, нетоксично, оказывает гипохолестеринемическое действие, не оказывает влияния на содержание триглицеридов в сыворотке крови, не оказывает негативного влияния на эндометрий, не обладает утеротропным действием.

В связи с наличием перечисленных свойств данное соединение рекомендуется к применению для моно- и адъювантной терапии раннего гормоноположительного рака молочной железы у женщин в постменопаузе;

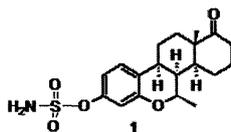
лечения трижды негативного рака молочной железы;

моно- и адъювантной терапии рака молочной железы у женщин в постменопаузе после 2-3-летнего применения тамоксифена;

лечения распространённого рака молочной железы на поздних стадиях.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

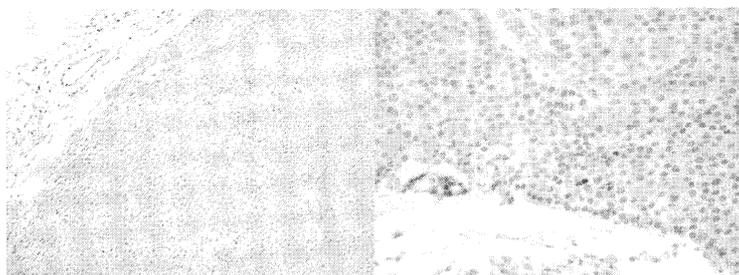
1. Применение 3-О-сульфамойлокси-7β-метил-D-гомо-6-окса-8α-эстра-1,3,5(10)-триен-17α-она формулы



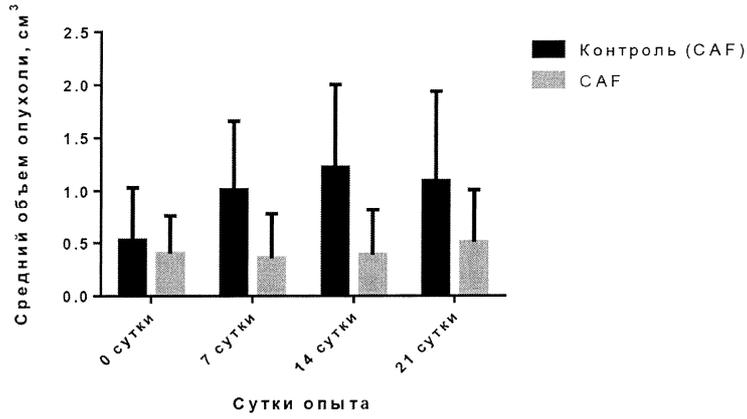
в качестве противоопухолевого агента при моно- и адъювантной терапии трижды негативного рака молочной железы.

2. Применение по п.1, где 3-О-сульфамойлокси-6-окса-7β-метил-D-гомо-8α-эстра-1,3,5(10)-триен-17α-он вводят перорально женщинам с раком молочной железы в начальной стадии и при прогрессирующем раке молочной железы, а также после 2-3-летнего применения тамоксифена.

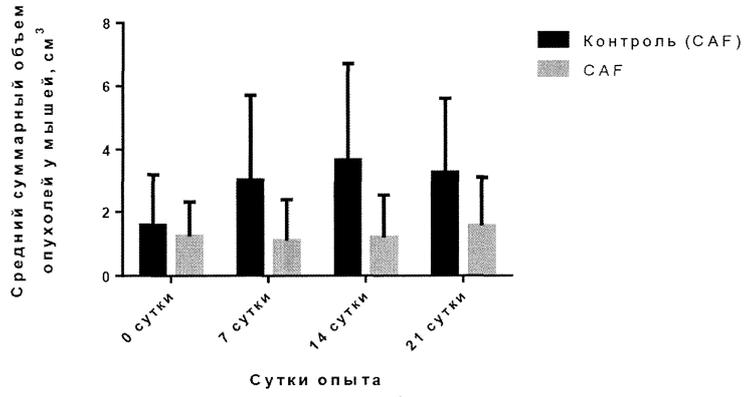
3. Способ получения противоопухолевого агента по п.1, включающий кислотный гидролиз метилового эфира 7β-метил-6-окса-D-гомо-8α-эстрона под действием бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте, характеризующийся тем, что гидролиз проводят в атмосфере аргона с последующей экстракцией этилацетатом, промыванием водой, насыщенным раствором натрия хлорида, сушкой, полученный рацемический 7β-метил-6-окса-D-гомо-8α-эстрон растворяют в диметилформамиде и добавляют сульфамойлхлорид, продукт реакции экстрагируют этилацетатом.



Фиг. 1

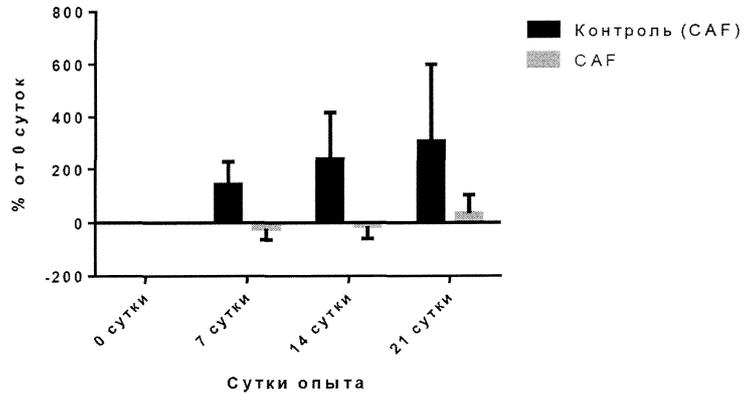


Фиг. 2

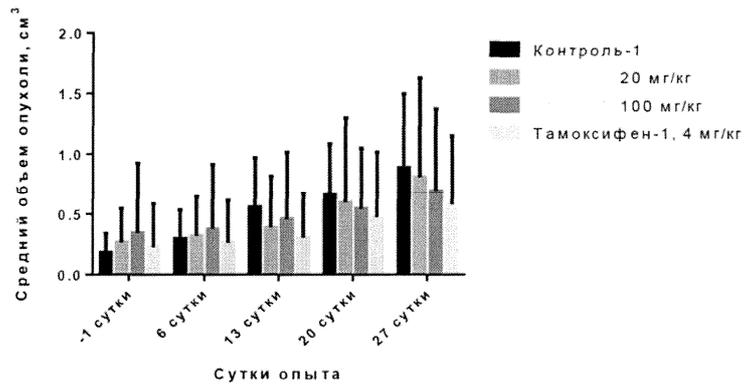


Фиг. 3

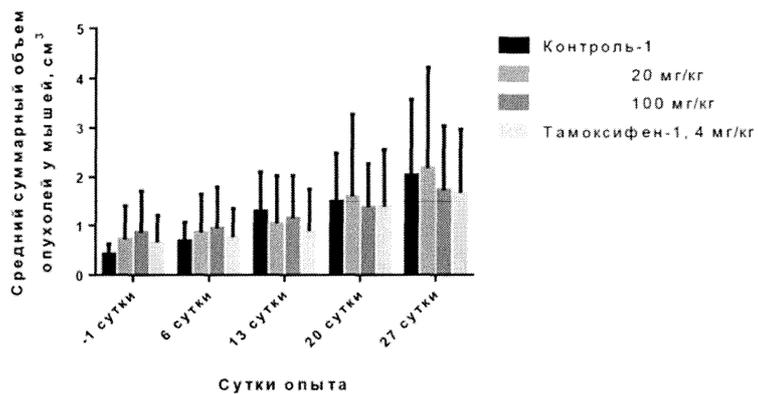
Относительное изменение среднего суммарного объема опухолей у мышей



Фиг. 4

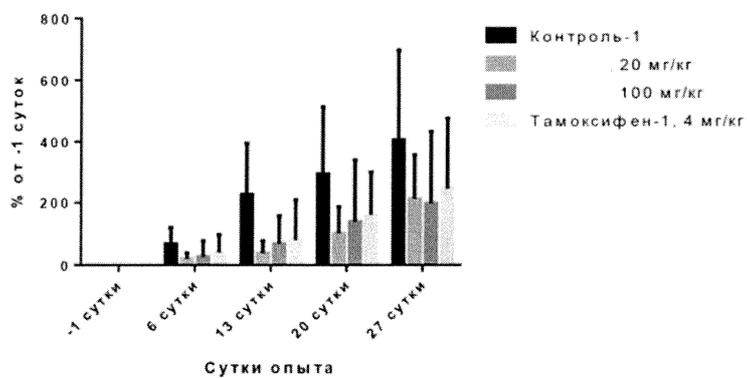


Фиг. 5



Фиг. 6

Относительное изменение среднего суммарного объема опухолей у мышей



Фиг. 7