



УКРАЇНА

(19) UA (11) 41875 (13) C2

(51) 7 A61K31/566

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ІНГІБУВАННЯ ЕСТРОГЕНЗАЛЕЖНИХ ПУХЛИН З ВИКОРИСТАННЯМ СТЕРОЇДНИХ СУЛЬФАТОВІСНИХ ІНГІБІТОРІВ

(21) 94005380

(22) 28 08 1992

(24) 15 10 2001

(31) 9118478 8

(32) 29 08 1991

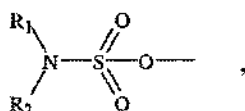
(33) GB

(86) PCT/GB92/01587, 28 08 1992

(46) 15 10 2001, Бюл № 9, 2001 р

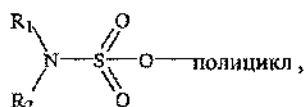
(72) Рід Майкл Джон, GB, Поттер Баррі Віктор
Ллойд, GB

(73) СТЕРІКС ЛІМІТЕД, GB

(56) 1 Schwarz S и др, Pharmazie – Berlin, 1975,
vol 30, No 1, 17–212 Townsley J Research on steroids – Rome, 1973,
vol 5, 73–78(57) 1 Способ ингибирования активности стероид-
сульфатазы у нуждающегося в этом субъекта,
включающий введение указанному субъекту инги-
бирующее активность стероид-сульфатазы коли-
чество соединения, включающего кольцевую сис-
тему и сульфаматную группу формулы

где R₁ и R₂ независимо выбраны из H, алкила, алкенила, циклоалкила и арила или вместе они представляют алкилен, необязательно содержащий один или несколько гетероатомов или групп в алкиленовой цепи, и соединение является ингибитором фермента, обладающего активностью стероид-сульфатазы (ЕС 3 1 6 2) причем, если бы сульфаматная группа соединения была бы замещена сульфатной группой для образования сульфата и инкубирована с ферментом стероид-сульфатазы (ЕС 3 1 6 2) при pH 7,4 и температуре 37°C, оно бы обеспечило значение K_m менее 50 мкМ

2 Способ по п 1, отличающийся тем, что соединением является соединение формулы



где R₁ и R₂ – как они определены в п 1

3 Способ по п 2, отличающийся тем, что полицикл является остатком полициклического спирта

4 Способ по п 2 или 3, отличающийся тем, что полицикл является остатком стерина

5 Способ по п 4, отличающийся тем, что стерин является 3-стерин

6 Способ по п 4 или 5, отличающийся тем, что стерин выбирают из группы, состоящей из эстрогена, дегидроэпиандростеронов, замещенных эстронов и замещенных дегидроэпиандростеронов

7 Способ по любому из пунктов 1-6, отличающийся тем, что сульфаматная группа присоединена к кольцевой системе

8 Способ по любому из пунктов 1-7, отличающийся тем, что R₁ и R₂ независимо выбраны из H или C₁-C₁₀ алкила

9 Способ по любому из пунктов 1-8, отличающийся тем, что R₁ и R₂ независимо выбраны из H или C₁-C₅ алкила

10 Способ по любому из пунктов 1-9, отличающийся тем, что R₁ и R₂ независимо выбраны из H или метила

11 Способ по любому из пунктов 1-10, отличающийся тем, что соединением является соединение, выбранное из эстрон-3-сульфата, эстрон-3-N,N-диметилсульфата, эстрон-3-N-монометилсульфата

12 Способ по любому из пунктов 1-11, отличающийся тем, что по меньшей мере один из R₁ и R₂ является H

13 Способ по любому из пунктов 1-12, отличающийся тем, что R₁ является H и R₂ является H

14 Способ по любому из пунктов 1-13, отличающийся тем, что соединением является эфир сульфаминовой кислоты и полициклического спирта или N-алкил, N-алкенил, N-циклоалкил или N-арипроизводное указанного эфира, или фармацевтически приемлемая соль любого из указанных эфиров, или N-замещенных эфиров, спиртовой остаток эфира является остатком полициклического спирта, сульфат которого является гидролизуемым ферментом, обладающим активностью стероид-сульфатазы (ЕС 3 1 6 2)

Настоящее изобретение касается новых соединений, используемых в качестве ингибиторов стероид-сульфатазы, и содержащих их фармацевтических составов

Известно, что предшественники стероидов или прогормоны, имеющие сульфатную группу в 3-положении стероидного ядра, имеют большое значение как промежуточные продукты в метаболизме стероидов в организме человека. Эстрон-сульфат и дегидроэпиандростерон-сульфат (ДЭС) например, играют, как известно, важную роль как промежуточные продукты в производстве эстрогенов, таких как эстрон и эстрадиол, в теле человека. В частности известно, что эстронсульфат, например, представляет собой один из основных циркулирующих предшественников эстрогена, особенно у женщин постклимактерического периода, а активность эстрон-сульфатазы при опухолях груди в 100–1000 раз больше, чем других ферментов, участвующих в образовании эстрогена (James и сотр Steroids, 50 269–279 (1987))

Другие эстрогены, например, эстрон и эстрадиол, особенно при их перепроизводстве, также показаны при различных заболеваниях например, при раке груди, см Breast Cancer Treatment and Prognosis R A Stoll, стр 156–172 Blackwell Scientific Publications (1986) и контроль за производством эстрогенов является специфической целью многих направлений противораковой терапии, в том числе химиотерапии и хирургического подхода, например, овариэктомии (удаления яичников) и адреналэктомии (резекции надпочечника). Что касается эндокринной терапии, то все усилия направлены пока еще только на концентрирование ингибиторов ароматазы, т.е. соединений, способных ингибировать активность ароматазы, активность которой как показывает схема метаболизма эстрогена (фиг. 1), состоит в превращении андрогенов, например, андростендиона и тестостерона в эстерон и эстрадиол соответственно

В недавно опубликованной Международной заявке W091/13083 предлагалось воздействовать на другой участок метаболического пути эстрогена, или скорее на два различных участка, иными словами на превращение сульфата ДЭС и эстрон-сульфата в ДЭС и эстрон соответственно под влиянием активности стероид-сульфатазы при использовании 3-моноалкилтиофосфонат-стероид-эфиров как ингибитора стероид-сульфатазы, в частности эстрон-3-монометилтиофосфоната

1 Целью настоящего изобретения является создание новых соединений, способных ингибировать активность стероид-сульфатазы *in vitro* и *in vivo*

2 Целью настоящего изобретения является также создание новых соединений, обладающих высокой активностью в качестве ингибиторов стероид-сульфатазы *in vitro* и *in vivo*

3 Кроме того целью изобретения является создание фармацевтической композиции, эффективной при лечении эстрогензависимых опухолей

4 Целью изобретения также является создание фармацевтической композиции, эффективной при лечении рака груди

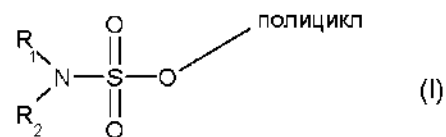
5 Далее целью изобретения также является разработка способа лечения эстрогензависимых

опухолей у млекопитающих, в частности у человека

6 И, наконец, целью изобретения является разработка способа лечения рака груди у млекопитающих, в частности у женщин

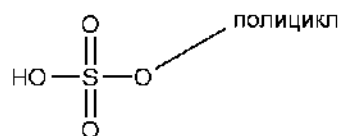
Настоящее изобретение основывается на открытии новых соединений, обладающих ингибирующей активностью стероид-сульфатазы, в ряде случаев исключительно высоким уровнем активности. Эти соединения являются эфирами сульфаминовой кислоты и полициклических спиртов, сульфат которых представляет собой субстрат для ферментов, обладающих активностью стероид-сульфатазы (EC 3.1.6.2), N-алкил- и N-арил-производные этих эфиров сульфаминовой кислоты и их фармацевтически приемлемых солей

Соединения формулы (I)



в которой R₁ и R₂ каждый независимо друг от друга представляет собой H, алкил, циклоалкил, алкенил и арил или вместе они представляют собой алкилен, необязательно содержащий один или несколько гетеро-атомов или групп в цепи алкилена, и группа -O-полициклической структуры представляет собой остаток полициклического спирта, сульфат которого представляет собой субстрат для ферментов, обладающих активностью стероид-сульфатазы (EC 3.1.6.2)

Что касается спиртов, сульфаты которых являются субстратом для ферментов, обладающих активностью стероид-сульфатазы, то речь идет о полициклических спиртах, сульфаты которых, т.е. производные формулы



при выдерживании с стероид-сульфатазой EC 3.1.6.2 при pH 7.4 и температуре 37°C дают значение K_m менее 50 мкмоль

Активность заявленных соединений как ингибиторов активности стероид-сульфатазы иллюстрируется следующими рисунками

На фиг. 1 представлена схема метаболических путей, ферментов и стероидных промежуточных продуктов, участвующих в производстве эстрадиола *in vivo*

На фиг. 2 представлена гистограмма зависимости от дозы ингибирующего действия эстрон-3-сульфата на активность стероид-сульфатазы в клетках MCF-7 *in vitro*

На фиг. 3 представлено зависимое от дозы ингибирующее действие эстрон-3-N,N-диметил-сульфата на активность стероид-сульфатазы в клетках MCF человека *in vitro*

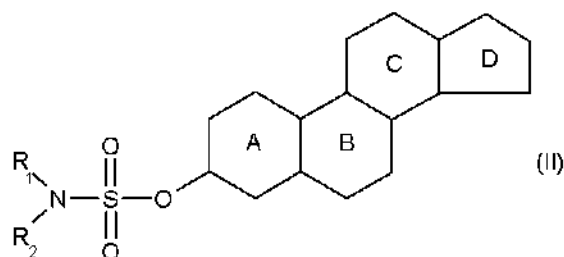
На фиг. 4 дано сравнение кривых реагирования для эстрон-3-сульфата и эстрон-3-N,N-

диметилсульфата на активность стероид-сульфатазы в MCF-клетках человека *in vitro*

На фиг 5 представлено зависимое от дозы ингибирующее действие эстрон-3-сульфата вместе с IC_{50} -значением (концентрация, необходимая для 50% ингибирования) на активность стероид-сульфатазы в плацентарных микросомах

Одним из аспектов изобретения являются новые соединения эфира сульфаминовой кислоты и полициклических спиртов. Под полициклическими спиртами имеются ввиду такие спирты, сульфаты которых являются субстратом для ферментов, обладающих активностью стероид-сульфатазы, а также их N-алкил, N-циклоалкил, N-алкенил и N-арил-производные. Эти соединения соответствуют вышеприведенной формуле I

Предпочтительно, если полициклическая группа содержит, включая все заместители максимум около 40, обычно же не более 30 заместителей. Предпочтительными полициклами можно считать стероидные циклические структуры, так называемый циклопентанофенантроновый скелет. Предпочтительно, если сульфамил- или замещенная сульфамил-группа находится в этом скелете в 3-положении, т.е. речь идет о соединениях формулы II



в которой R_1 и R_2 имеют указанные выше значения, а циклическая система ABCD представляет собой замещенное или незамещенное, насыщенное или ненасыщенное стероидное ядро, предпочтительно эстрон или дегидроэпиандростерон

Другие приемлемые системы стероидных колец представляют собой замещенные эстроны, а именно

2-ОН-эстрон, 2-метокси-эстрон, 4-ОН-эстрон, 6 α -ОН-эстрон, 7 α -ОН-эстрон, 16 α -ОН-эстрон, 16 β -ОН-эстрон, эстрадиолы и замещенные эстрадиолы, а именно

2-ОН-17 β -эстрадиол, 2-метокси-17 β -эстрадиол, 4-ОН-17 β -эстрадиол, 6 α -ОН-17 β -эстрадиол, 7 α -ОН-17 β -эстрадиол, 16 α -ОН-17 α -эстрадиол, 16 β -ОН-17 α -эстрадиол, 16 β -ОН-17 β -эстрадиол, 17 α -эстрадиол, 17 β -эстрадиол, 17 α -этинил-17 β -эстрадиол, эстриолы и замещенные эстриолы, а именно

эстриол, 2-ОН-эстриол, 2-метокси-эстриол, 4-ОН-эстриол, 6 α -ОН-эстриол, 7 α -ОН-эстриол, замещенные дегидроэпиандростероны, а именно

6 α -ОН-дегидроэпиандростерон, 7 α -ОН-дегидроэпиандростерон, 16 α -ОН-дегидроэпиандростерон, 16 β -ОН-дегидроэпиандростерон

Циклическая стероидная система ABCD может содержать различные немешающие заместители. В частности, циклическая система ABCD может содержать один или несколько гидроксильных, ал-

кильных, особенно низших алкил-(C_{1-6})-заместителей, например, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, и других изомеров пентила, а также н-гексил, и другие изомеры гексила, алкокси, особенно низшие (C_{1-6})-алкокси-заместители, например метокси, этокси, пропокси и т.д., алкинил, например, этинил или га-логен, например, фтор

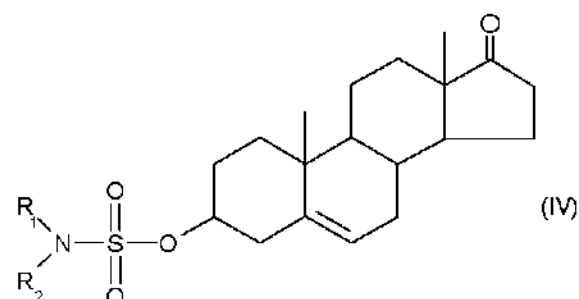
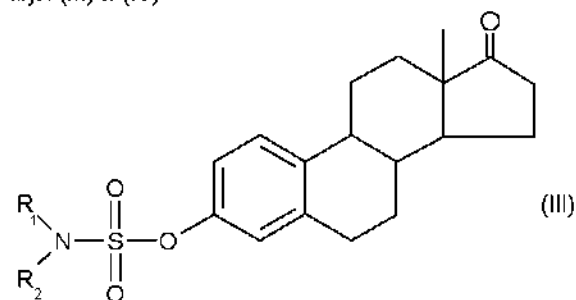
Приемлемые нестероидные циклические системы включают в себя диэтилстильбоэстрол, стильбоэстрол и другие циклические системы, при условии, что сульфаты имеют K_m -значение менее 50 мкмоль со стероид-сульфатазой EC 3.1.6.2

Если представляемые изобретением замещенные, N-замещенные соединения содержат один или два N-алкил, N-алкенил, N-циклоалкил или N-арил-заместителя, предпочтительно, если они или каждый из них содержит максимум 10 C-атомов. В случае, если R_1 и/или R_2 алкил, предпочтительно, выбирать такие значения, при которых R_1 и R_2 каждый независимо друг от друга выбирается из числа низших алкильных групп с 1-5 C-атомами, т.е. из числа метила, этила, пропила и т.д. Предпочтительно, если R_1 и R_2 оба представляют собой метил. В случае, если R_1 и/или R_2 арил, обычно – фенил и толил ($-PhCH_3$, о-, м- пара). Если R_1 и R_2 представляют собой циклоалкил, обычно это – циклопропил, цикlopentил, циклогексил и т.д. Соединенные вместе R_1 и R_2 представляют собой группу алкилена, при условии, что кольцо состоит из 4-6 C-атомов, необязательно разрываемых одним или несколькими гетеро-атомами или группами, например, -O- или -NH- с получением 5-, 6- или 7-членного гетероцикла, например, морфолина, пирролидина или пиперидина

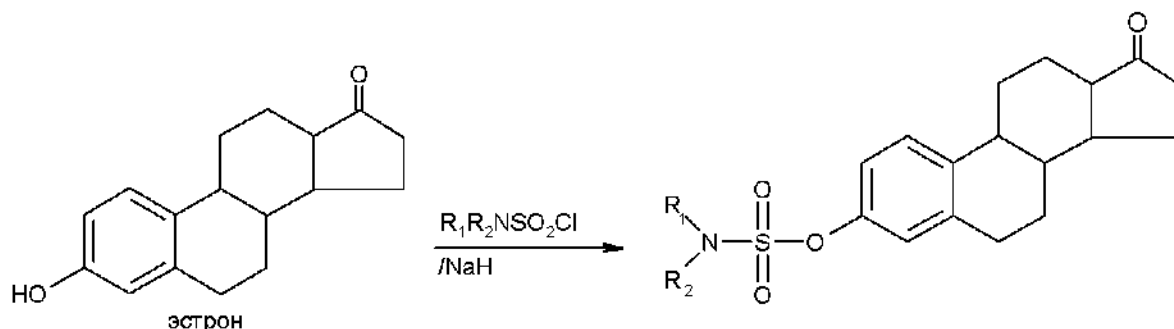
Под алкильными, циклоалкильными, алкенильными и арильными группами следует иметь ввиду группы, содержащие в качестве заместителей в них одну или несколько групп, которые не оказывают влияния на ингибирующую активность сульфатазы в рассматриваемых соединениях

Немешающими заместителями можно считать гидроксильные, амино, гало, алкокси, арил и алкил

Более предпочтительны соединения формул (III) и (IV)



в которых R_1 и R_2 представляют собой C_{15} -алкил, т.е. эстрон-3-сульфамат и дегидроэпиандростерон-3-сульфамат и их N -(C_{15})-алкил-производные, особенно диметил-производные $R_1 = R_2 = CH_3$



В соответствии с указанной схемой реакцию проводят следующим образом

Нитрат натрия и сульфамилхлорид добавляют при перемешивании в раствор эстрона в безводном диметилформамиде при 0°C . В последующем реакцию проводят при нагревании до комнатной температуры еще в течение 24 часов. Реакционную смесь выливают в холодный насыщенный раствор бикарбоната натрия и образовавшуюся водную фазу экстрагируют дихлорметаном. Объединенный органический экстракт сушат над безводным сульфатом магния. После фильтрования и последующего выпаривания растворителя в вакууме и совыпаривания с толуолом получают необработанный остаток, который в дальнейшем очищают с помощью флеш-хроматографии.

В случае необходимости функциональные группы в полициклическом спирте (стероиде) могут быть защищены известным способом с последующим удалением защищающих групп или группы в конце реакции.

Для фармацевтического применения ингибиторы стероид-сульфатазы, представляемые настоящим изобретением, могут быть приготовлены согласно известным опробованным традиционным фармацевтическим методикам с использованием традиционных фармацевтических носителей, наполнителей, разбавителей и т.д., обычно рекомендуемых для парентерального применения. Средняя эффективная доза в зависимости от индивидуальной активности соединений, рассматриваемых в настоящем изобретении, и в расчете на средний вес тела пациента (70 кг) колеблется в пределах от 100 до 800 мг/день. Обычная доза для предпочтительных или более активных соединений составляет от 200 до 800 мг/день, более предпочтительно 200-500 мг/день, еще более предпочтительно от 200 до 250 мг/день. Лекарство можно принимать в виде однократной дозы, дробной дозы или же многократных мелких доз в течение нескольких дней. Для орального применения лекарственных средства могут быть приготовлены в виде таблеток, капсул, растворов или суспензий, содержащих от 100 до 500 мг соединения на стандартную дозу. Предпочтительно, если для парентерального применения соединения будут приготовлены при использовании пригодных для парентерального введения носителей и если однократ-

Представляемые изобретением эфиры сульфаминовой кислоты получают путем реакции полициклического спирта, например, эстрона или дегидроэпиандростерона с сульфамилхлоридом $R_1R_2NSO_2Cl$, т.е. в соответствии со схемой, представленной ниже

ная дневная доза будет содержать от 200 до 800 мг, предпочтительно от 200-500, более предпочтительно от 200 до 250 мг указанных соединений. Однако такие эффективные дневные дозы будут весьма значительно зависеть от активности присутствующей активному ингредиенту и в значительной степени должны определяться весом тела пациента, что всегда должно быть учтено лечащим врачом.

Для так называемого "частичного" применения, рассматривается вопрос, что представляемые изобретением ингибиторы стероид-сульфатазы могут быть использованы для комбинированного лечения, либо в сочетании с другим ингибитором сульфатазы, либо например, в комбинации с ингибитором ароматазы, в частности с 4-гидроксиандростендином (4-OHA).

Более подробно предмет изобретения иллюстрируется приведенными ниже примерами и результатами проведенных испытаний.

Пример 1.

Получение эстрон-3-сульфамата

Гидрид натрия (60% дисперсия, 2 экв.) и сульфамилхлорид (2 экв.) добавляют при перемешивании в раствор эстрона (1 экв.) в безводном диметилформамиде при 0°C . Затем реакцию проводят при нагревании до комнатной температуры, продолжая перемешивание, еще в течение 24 часов.

Реакционную смесь выливают в холодный насыщенный раствор бикарбоната натрия и образовавшуюся водную фазу экстрагируют дихлорметаном. Объединенный органический экстракт сушат над безводным сульфатом магния. После фильтрования с последующим выпариванием растворителя в вакууме и совыпариванием с толуолом получают необработанный продукт, который затем очищают с помощью флеш-хроматографии. Анализ показывает следующие результаты:

$\delta^1\text{H}$ (270 МГц, CD_3OD) 0,91 (с, 3H, $\text{C}_{18}\text{-Me}$), 1,40-2,55 (серии от м, 13H), 2,90-2,92 (м, 2H), 7,04 (шир д, $J=10,44$ Гц), 7,33 (шир д, 1H, $J=8,42$ Гц)

$\delta^{13}\text{C}$ (67,8 МГц, CD_3OD) 14,53 (кв, $\text{C}_{18}\text{-Me}$), 22,80 (т), 27,24 (т), 27,73 (т), 30,68 (т), 33,05 (т), 37,01 (т), 39,76 (д), 45,73 (с, C_{19}), 51,86 (д), 120,76 (д), 123,54 (д), 127,89 (д), 139,83 (с), 150,27 (с), 273,87 (с, C=O)

m/z (%) 349(9) (m^+), 270(100), 233(26), 185(43), 172(31), 159(21), 146(36), 91(33), 69(37), 57(73), 43(56), 29(24)

Данные микроанализа

	C	H	N
Рассчитано, %	61,87	6,63	4,01
Найдено, %	61,90	6,58	3,95

Пример 2.

Получение эстрон-3-N-метилсульфамата

Повторяют методику, описанную в примере 1, но вместо сульфамойл хлорида берут такое же количество N-метилсульфамойлхлорида. При анализе получают следующие результаты

$\delta^1\text{H}$ (270 мГц, CDCl_3) 0,91 (с, 3H, $\text{C}_{18}\text{-Me}$), 1,26–1,68 (м, 6H), 1,93–2,60 (серия от м, 7H), 2,90–2,95 (м, 2H), 2,94 (д, 3H, J = 5,13 Гц, MeN), 4,68–4,71 (шир м изменяемый, 1H-NH), 7,02–7,07 (м, 2H), 7,26–7,32 (м, 1H)

m/z (%) 364(M+H)⁺

Пример 3.

Получение эстрон-3-N,N-диметилсульфамата

Повторяют методику, описанную в примере 1, но вместо сульфамойлхлорида берут такое же количество N,N-диметилсульфамойлхлорида. При анализе получают следующие результаты

$\delta^1\text{H}$ (270 мГц, CDCl_3) 0,92 (с, 3H, $\text{C}_{18}\text{-Me}$), 1,39–1,75 (м, 5H), 1,95–2,60 (серия от м, 6H), 2,82 (с, 3H, MeN-), 2,96–3,00 (м, 4H), 2,98 (с, 3H, MeN-), 7,04 (шир д, 2H, J = 7,69 Гц), 7,29 (шир д, 1H, J = 7,88 Гц)

m/z (%) 377(M)⁺

Данные микроанализа

	C	H	N
Рассчитано, %	63,63	7,21	3,71
Найдено, %	63,50	7,23	3,60

Пример 4.

Ингибирование стероид-сульфатазной активности в MCF⁷-клетках под действием эстрон-3-сульфамата

Под стероид-сульфатазой следует понимать стерильную сульфатазу EC 3.1.6.2

Стероид-сульфатазную активность измеряют *in vitro*, используя для этой цели интактные MCF-7 раковые клетки груди человека. Гормонозависимую линию клеток широко используют для регуляции роста раковых клеток груди человека. Она отличается ярко выраженной стероид-сульфатазной активностью (MacIndoe и соотр. *Endocrinology*, 123 1281-1287 (1988) Purohit и Reed *Int J Cancer* 50 901-905 (1992)) и может быть получена в США из Американской коллекции клеточных культур, а в Великобритании, например, из Королевского фонда раковых исследований. Клетки обрабатывают в минимальной эссенциальной среде (Flow Laboratories, Irvine, Шотландия), содержащей 20 ммоль НЕРЕС, 5% сыворотки новорожденных крупного рогатого скота, 2 ммоль глутамина, аминокислоты и 0,075% бикарбоната натрия. До 30 емкостей с образцами клеточных культур (25 см²) засевают примерно 2х10⁵ клеток на каждую емкость, используя указанную выше среду. Клетки выращивают до 80% слияний, среду меняют каждый третий день.

Интактные монослой клеток MCF-7 в трех вариантах по 25 см² клеточной культуры в каждой емкости промывают сбалансированным солевым раствором Эрла (EBSS из ICN Flow, High Wycombe, Великобритания) и выдерживают в течение 3-4 часов при 37° с 5 пмолями (7х10⁵ число

распадов в минуту) (6,7-³H)-эстрон-3-сульфата) удельная активность 60 кюри/ммоль из Ядерного общества Новая Англия, Бостон, Массачусетс, США) в несодержащей сыворотки минимальной среде (2,5 мл) вместе с эстрон-3-сульфаматом (11 концентраций 0, 1 фМ, 0,01 пМ, 0,1 пМ, 0,01 нМ, 0,1 нМ, 1 нМ, 0,01 мкМ, 0,1 мкМ, 1 мкМ). По окончании выдерживания каждую емкость охлаждают и среду пипеткой вводят в отдельные трубки, содержащие (¹⁴C/эстрон) 7х10³ распадов/в мин. Удельная активность 97 кюри/ммоль получена из Эмерсгеймского Международного радиохимического центра Amersham, Великобритания). Смесь встряхивают в течение 30 секунд с толуолом (5 мл). Эксперименты показывают, что > 90% (¹⁴C) эстрона и < 0,1% (³H/эстрон-3-сульфата) удаляются из водной фазы в результате подобной обработки. Часть (2 мл) органической фазы удаляют, выпаривают и определяют содержание ³H и ¹⁴H в остатке, используя для этой цели метод сцинтилляционной спектрометрии. Гидролизованную массу эстрон-3-сульфата рассчитывают исходя из полученного ³H-значения (с поправкой на объем среды и используемой органической фазы, добавленной для выделения ¹⁴C-эстрона) и удельной активности субстрата. Каждая серия экспериментов включает инкубацию микросом, полученных из сульфатаза-положительной плаценты человека (положительный контроль) и емкостей без клеток (для определения очевидности неферментативного гидролиза субстрата). Количество клеточных ядер в каждой емкости определяют с помощью счетчика Култера после обработки монослоев клеток запонином. Одну емкость в каждой серии используют для оценки состояния оболочки клетки и ее жизнеспособности, используя для этой цели эксклюзивный метод трипрана-голубого (H J Phillips (1973) Тканевые культуры и их применение (D F Kruse и M K Patterson), стр 406-408 Academic Press, Нью-Йорк).

Данные для эстрон-3-сульфамата представлены в таблице 1 и на фиг 2 и 4. Результаты оценки стероид-сульфатазной активности выражают в средних значениях ± 1 стандартное отклонение от общего продукта (эстрон+эстрадиол), образующегося в ходе инкубационного периода (20 часов), рассчитанного для 10⁶ клеток и для значений, имеющих статистическую значимость в процентах уменьшения (ингибирования) в процессе инкубации без использования эстрон-3-сульфамата, t-критерий Стьюдента используют для подтверждения статистической значимости результатов.

Пример 5.

Ингибирование стероид-сульфатазной активности в MCF-7-клетках под действием эстрон-3-N,N-диметилсульфамата

Экспериментальные условия, аналогичные описанным в примере 4, используют для получения результатов для эстрон-3-N,N-диметилсульфамата, за исключением того, что используют при инкубациях эстрон-3-N,N-диметилсульфамата в пяти различных концентрациях, а именно 0, 0,001 мкМ, 0,01 мкМ, 0,1 мкМ и 1 мкМ вместо эстрон-3-сульфамата.

Результаты для эстрон-3-N,N-диметилсульфамата представлены в таблице 2 и на фиг 3 в

том же выражении, что и в таблице 1 и на фиг 2 соответственно. Дополнительно на фиг 4 представлено сравнение кривых логарифма дозы с эстрон-3-сульфаматом

Пример 6.

Ингибирование стероид-сульфатазной активности в MCF-7-клетках, предварительно обработанных эстрон-3-N,N-диметилсульфаматом и эстрон-3-сульфаматом

Условия эксперимента, аналогичные описанным в примере 4, используют для определения действия MCF-7-клеток, предварительно обработанных эстрон-3-N,N-диметилсульфаматом и эстрон-3-сульфаматом соответственно

Интактные монослои сначала выдерживают в течение 2 часов при 37°C с 0,1 мкМ эстрон-3-сульфамата, эстрон-3-N,N-диметилсульфамата или с одной средой (контрольная группа). Среду, содержащую клетки, удаляют путем отсасывания и клетки три раза последовательно промывают 5 мл среды (по 5 мл каждый раз). Полученные промытые клетки затем повторно суспендируют и выдерживают в течение 3-4 часов при 37°C в среде, содержащей 5 пмоль (7×10^5 распадов в минуту) (6,7-³H)-эстрон-3-сульфата. Во всех других отношениях методика аналогична описанной в примерах 3 и 4

Результаты, полученные для эстрон-3-сульфамата и эстрон-3-N,N-диметилсульфамата, представлены в таблице 3 по аналогии с таблицей 1

Пример 7.

Ингибирование стероид-сульфатазной активности в микросомах плаценты под действием эстрон-3-сульфамата

Сульфатаза-положительную плаценту человека от нормального срока беременности (Obstetric Ward, St Marys Hospital Лондон) размельчают ножницами и промывают один раз охлажденным фосфатным буфером (pH 7,4, 50 ммоль), после чего повторно суспендируют в охлажденный фосфатный буфер (5 мл/г ткани). Гомогенизацию завершают обработкой в гомогенизаторе Ультра-Тарракс. Продукт обрабатывают три раза по 10 секунд с перерывами на 2-минутное охлаждение на льду. Осколки ядер и клеточного материала удаляют путем центрифугирования (4°C) при 2000g в течение 30 минут и часть надосадочного слоя (2 мл) хранят при -20°C. Концентрацию протеинов в надосадочном слое определяют по методу Брендфорда (Ann Biochem, 72, 248-254 (1976))

Для проведения инкубации (1 мл) используют концентрацию протеинов 100 мкг/мл, концентрацию субстрата 20 мкмоль (6,7-³H)-эстрон-3-сульфата (удельная активность 60 кюри/ммоль, производства Ядерного центра Новая Англия, Бостон, Массачусетс, США). Продолжительность инкубации – 20 минут при 37°C. Применяют 8 концентраций эстрон-3-сульфамата, а именно 0 (контрольная), 0,05 мкМ, 0,1 мкМ, 0,2 мкМ, 0,4 мкМ, 0,6 мкМ, 0,8 мкМ, 1,0 мкМ. После истечения инкубационного периода каждую пробу охлаждают и средой (1 мл) пипеткой вводят в отдельные трубки, заполненные (¹⁴C)-эстрон (7×10^3 распадов в минуту) (удельная активность 97 кюри/ммоль, производства Эмерсгеймского международного радиохимического центра, Эмерсгейм, Великобритания)

Смесь встряхивают в течение 30 минут с толуолом (5 мл). Эксперименты показывают, что > 90% ¹⁴C-эстрона и < 0,1% ³H-эстрон-3-сульфата удаляются из водной фазы при подобной обработке. Часть (2 мл) органической фазы удаляют, упаривают и определяют содержание ³H и ¹⁴C в остатке, используя метод сцинтилляционной спектрометрии. Массу гидролизованного эстрон-3-сульфамата определяют путем расчетов на основании значения ³H (с поправкой на объем среды и используемую органическую фазу и для выделения ¹⁴C-эстрона) и удельной активности субстрата

Результаты, полученные для эстрон-3-сульфамата, представлены в таблице 4 и на фиг 5. Результаты определения стероид-сульфатазной активности даны в таблице 4 в виде общего продукта (эстрон+эстрадиол), образовавшегося в ходе инкубационного периода (как функция времени) и процентного уменьшения (ингибирования) в сравнении с контрольной группой без использования эстрон-3-сульфамата. Результаты, полученные для стероид-сульфатазной активности, представлены на фиг 4 в виде процентного уменьшения (ингибирования) по отношению к контрольной группе при использовании IC₅₀-значения (т.е. концентрации эстрон-3-сульфамата, которая дает 50% ингибирование в сравнении с контрольной группой) в 0,07 мкмоль

Пример 8.

Ингибирование стероид-сульфатазной активности в препаратах, приготовленных из микросом печени, выделенных из крыс, обработанных подкожно эстрон-3-сульфаматом

Четырем группам самок крыс породы Wistar (весом около 80–110 г) вводят подкожно 100 мкм инъекции (один раз в день в течение 7 дней, жидкий носитель пропиленгликоль) следующих веществ

пропиленгликоль (контрольная группа)

эстрон-3-сульфамат (10 мг/кг/день)

эстрон-3-сульфат (10 мг/кг/день) (контрольный субстрат)

эстрон-3-сульфат (10 мг/кг/день)+эстрон-3-сульфамат (10 мг/кг/день)

На восьмой день крыс забивают и при препарировании выделяют печень. Микросомные составы печени получают в соответствии с методикой, описанными в примере 6, за исключением того, что в качестве источника ткани используют печень крыс и проводят двойной эксперимент по определению стероид-сульфатазной активности, используя (6,7-³H)-эстрон-3-сульфат и (7-³H) дегидроандростерон-3-сульфат в качестве отдельных субстратов

Результаты определения стероид-сульфатазной активности представлены в таблице 5 и выражены в виде общего продукта, образующегося в ходе инкубационного периода в виде средних значений + стандартное отклонение. Результаты инкубаций тканей, полученные в группах крыс, обработанных эстрон-3-сульфаматом, также представлены в виде процентного уменьшения (ингибирования) активности стероид-сульфатазной активности в сравнении с соответствующими данными для контрольной группы

На фиг 1 приведен метаболизм ферментов в стероидогенезе 1-дегидроэпиандростеронсуль-

фат, 2-дегидроэпиандростерон, 3-андростендион, 4-дигидротестостерон, 5-тестостерон, 6-эстрон, 7-эстронсульфат, 8-эстрадиол

Условные обозначения к фиг 1 1-сульфатаза, 2-ароматаза, 3-дегидрогеназа, 4-5-редуктаза

Фиг 2 1 – полученный продукт (фмоль/20 час/10⁶ клеток), 2-эстрон-3-сульфат

Фиг 3 1 – полученный продукт (фмоль/20 час/10⁶ клеток), 2-(эстрон-3-N,N-диметилсульфат)

Фиг 4 %-ингибирования, 1-эстрон, -3-сульфат, 2-эстрон-3-N,N-диметилсульфат

Фиг 5 1-% ингибирования, 2-(эстрон-3-сульфат/мкмоль)

Таблица 1

Стероид-сульфатазная активность в MCF-7 клетках в присутствии эстрон-3-сульфата

Концентрация эстрон-3-сульфата	Стероид-сульфатазная активность ^x (фмоль/20 час/10 ⁶ клеток)	% уменьшения по сравнению с контрольной группой (% ингибирования)
0 (контроль)	319,7±18,5	–
1 fM	353,3±39,0	–
0,01 pM	362,3±21,2	–
0,1 pM	330,7±17,8	–
1 pM	321,8±6,2	–
0,01 nM	265,1±11,0*	17,2%
0,1 nM	124,8±12,4***	60,9%
1 nM	16,49±4,7***	95,0%
0,01 μM	3,92±0,4***	98,8%
0,1 μM	2,53±1,1***	99,2%
1 μM	1,68±0,7***	99,5%

^xсреднее значение ±1 стандартное n=3

*p ≤ 0,05

***p ≤ 0,001 отклонение,

Таблица 2

Стероид-сульфатазная активность в MCF-7 клетках в присутствии эстрон-3-N,N-диметилсульфата

Концентрация эстрон-3-N,N-диметилсульфата	Стероид-сульфатазная активность ^x (фмоль/20 час/10 ⁶ клеток)	% уменьшения в сравнении с контрольной группой (% ингибирования)
0 (контроль)	82,63±3,6	–
0,001 μM	68,33±3,2**	17,3%
0,01 μM	46,0±4,9***	44,3%
0,1 μM	17,43±4,3***	78,9%
1 μM	11,89±3,7***	85,6%

*среднее значение ± стандартное отклонение n=3

**p ≤ 0,01

***p ≤ 0,001

Таблица 3

Стероид-сульфатазная активность в MCF-7-клетках, предварительно обработанных эстрон-3-сульфатом

Предварительная обработка	Стероид-сульфатазная активность ^x (фмоль/20 час) 10 ⁶ клеток	% уменьшения в сравнении с контрольной группой (% ингибирования)
Контрольная группа	65,4±6,4	–
Эстрон-3-сульфат	1,7±0,2***	97,4%
Эстрон-3-N,N-диметилсульфат	53,1±3,4*	18,8%

^xсреднее значение ±1 стандартное отклонение, n = 3

*p ≤ 0,05

***p ≤ 0,001

Таблица 4

Стероид-сульфатазная активность в микросомах плаценты в присутствии эстрон-3-сульфамата

Концентрация эстрон-сульфамата	Стероид-сульфатазная активность* (пмоль/час/0,1 мг протеина)	% уменьшения в сравнении с контрольной группой (% ингибирования)
0 (контроль)	768,6	—
0,05 μM	430,4	44,0%
0,1 μM	305,9	60,2%
0,2 μM	140,0	81,8%
0,4 μM	83,3	89,2%
0,6 μM	61,8	92,0%
0,8 μM	49,2	93,6%
1,0 μM	51,6	93,3%

*среднее значение двух определений

Таблица 5

Стероид-сульфатазная активность в микросомных препаратах печени крыс, обработанных подкожно эстрон-3-сульфаматом

Обработанная группа	Анализ субстрата	Активность стероид-сульфатазы* (нмоль/30 мин) 200 мкг протеина	% уменьшения в сравнении с контрольной группой
(контрольная группа) (жидкий наполнитель)	$\text{E}_1\text{-S}$	$20,95 \pm 0,2$	—
контрольная группа	$(\text{E}_1\text{-SO}_3\text{NH}_2)\text{E}_1\text{-S}$	$0,34 \pm 0,1^{***}$	98,4%
контрольная группа (жидкий наполнитель)	DHA-S	$1,73 \pm 0,4$	—
$\text{E}_1\text{-SO}_3\text{NH}_2$	DHA-S	$0,1 \pm 0,01^{***}$	94,2%
контрольная группа ($\text{E}_1\text{-S}$)	$\text{E}_1\text{-S}$	$20,6 \pm 0,4$	—
$\text{E}_1\text{-S} + \text{E}_1\text{-SO}_3\text{NH}_2$	$\text{E}_1\text{-S}$	$0,21 \pm 0,03^{**}$	99,0%
контрольная группа ($\text{E}_1\text{-S}$)	DHA-S	$1,71 \pm 0,1$	—
$\text{E}_1\text{-S} + \text{E}_1\text{-SO}_3\text{NH}_2$	DHA-S	$0,09 \pm 0,01^{***}$	94,7%

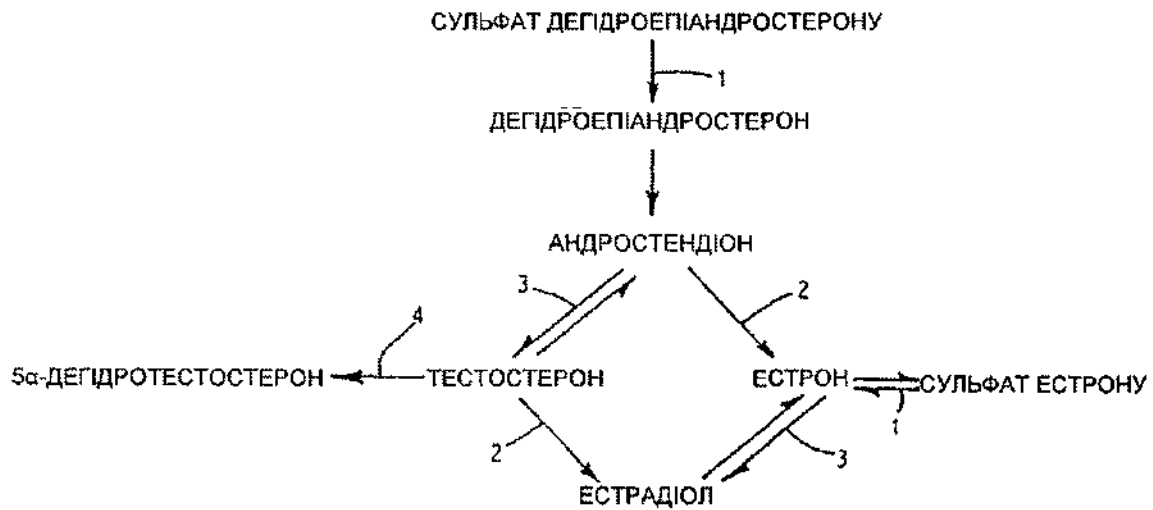
*среднее значение ± 1 стандартное отклонение, $n = 3$

$***p \leq 0,001$

$\text{E}_1\text{-S}$ = эстрон-3-сульфамат

DHA-S = дегидроэпиандростерон-3-сульфат

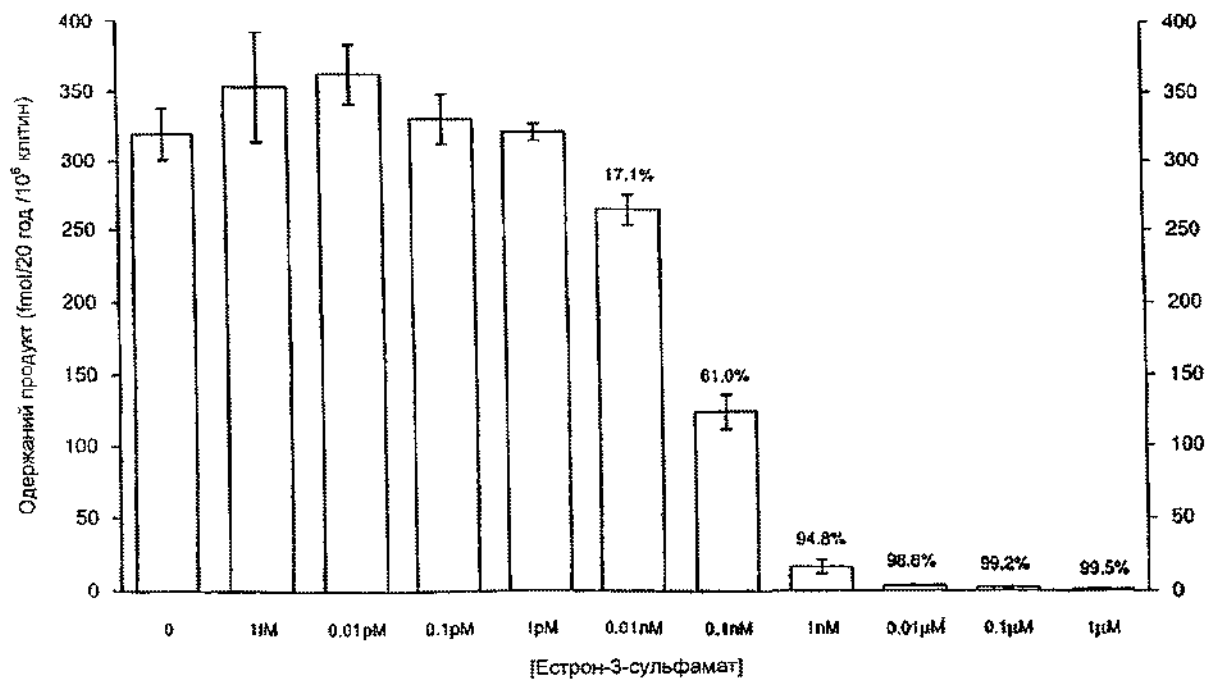
$\text{E}_1\text{-SO}_3\text{NH}_2$ = эстрон-3-N,N-диметилсульфамат



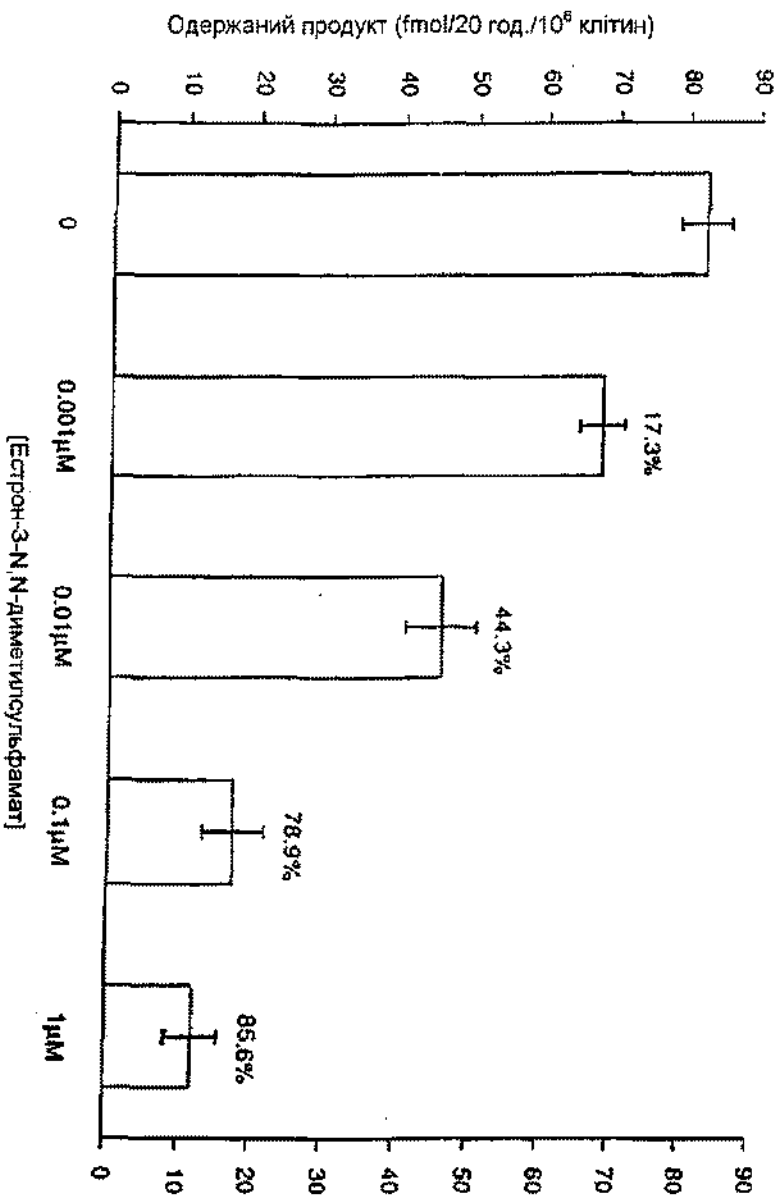
КЛЮЧОВІ ФЕРМЕНТИ У СТЕРОЇДОГЕНЕЗІ -

1. СУЛЬФАТАЗА 2. АРОМАТАЗА 3. ДЕГІДРОГЕНАЗА 4 5α-РЕДУКТАЗА

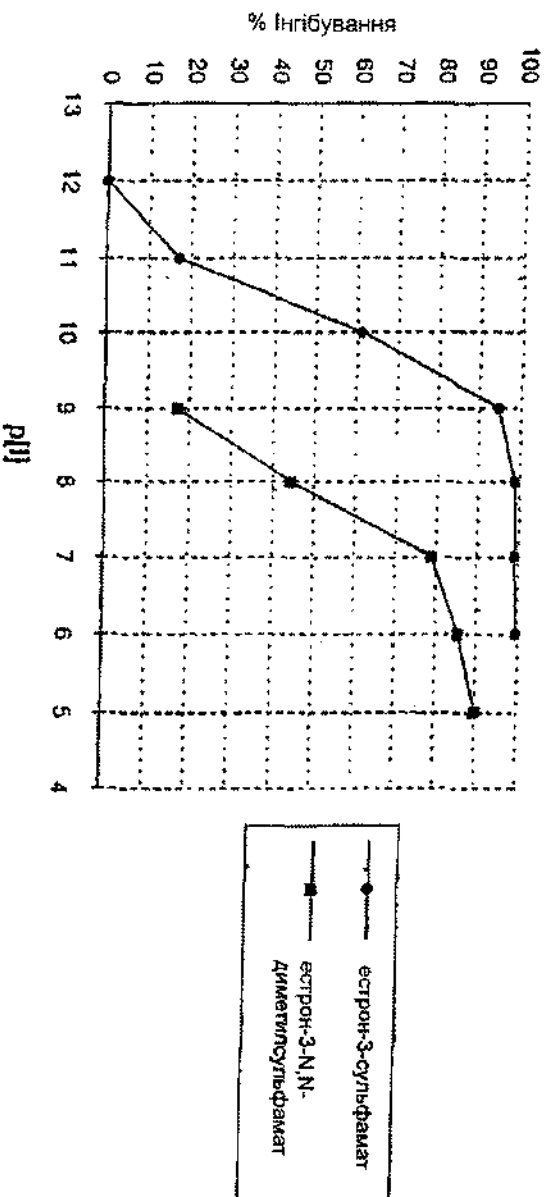
Фиг. 1



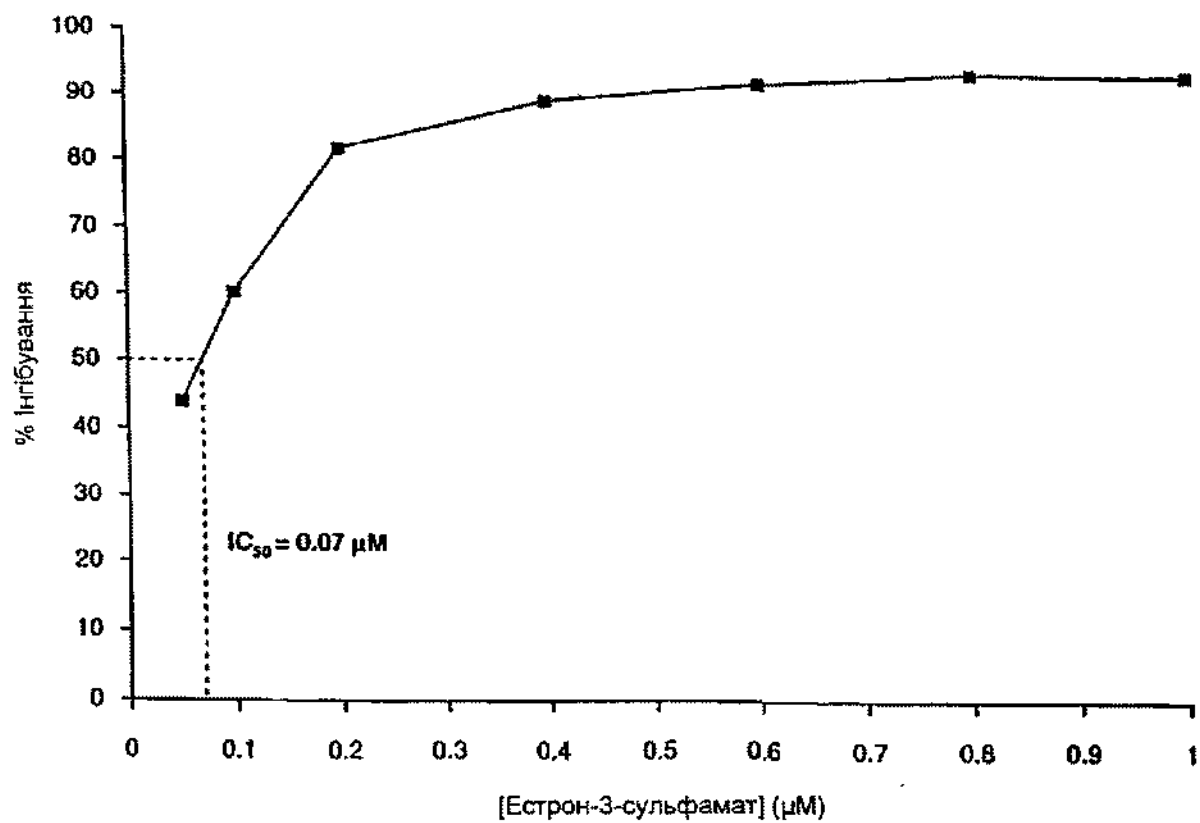
Фиг. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4



Фиг. 5

Тираж 50 екз

Відкрите акціонерне товариство «Патент»
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03
