



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 194 510** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **A 61 K 31/575, A 61 P 15/08**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 97101087/14, 23.06.1995
(24) Дата начала действия патента: 23.06.1995
(30) Приоритет: 23.06.1994 DK 0753/94
09.03.1995 DK 0241/95
(43) Дата публикации заявки: 10.03.1999
(46) Дата публикации: 20.12.2002
(56) Ссылки: WO 92/00752, 23.01.1992. ВОРОБЬЕВА
О.А. и др. Влияние гормонов и факторов роста
на протекание мейоза в ооцитах мышей в
культуре. Цитология, 1991, т.33, №4, с.
42-49. ФЕДОРУЩЕНКО А.И. и др. Влияние
нейроростового фактора из различных
биологических источников на спонтанное
созревание ооцитов мыши. Цитология, 1996,
т.38, №11, с. 1211-1214. СКОБЛИНА М.Н. и др.
Созревание in vitro ооцитов травяной
лягушки, одетых фолликулярными оболочками,
и лишенных их под действием холестерина.
Онтогенез. 1983, т.14, №5, с. 484-490.
HASBURY E. et al. The separation of sterol
intermediates in cholesterol biosynthesis by
high pressure liquid chromatography. J.
Lipid Research. 1980, 21(7), p.921-929.
READERSTORFF D. et al. Sterol biosynthesis
via cycloartenol and other biochemical
features related to photosynthetic phyla in
the amebae Naegleria lovamensis and
Naeglaria gruberi. Eur. J.of Biochemistry.
1987, 164(2), p.427-434. PIERCE H.D. et al.
Azasterol inhibitors in yeast. Biochimica et
Biophysica Acta. 1978, 529(3), p.429-437.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 23.01.1997
(86) Заявка РСТ:
DK 95/00265 (23.06.1995)
(87) Публикация РСТ:
WO 96/00235 (04.01.1996)
(98) Адрес для переписки:
103375, Москва, ул.Ильинка, 5/2,
ООО"Союзпатент", пат.пов. Н.Н.Высоцкая

(71) Заявитель:
НОВО НОРДИСК А/С (DK)
(72) Изобретатель: БЮСКОУ Анне Грете (DK),
АНДЕРСЕН Клаус Идинг (DK), НОРДХОЛЬМ
Ларс (DK), ТЕГЕРСЕН Хеннинг
(DK), ВАССМАНН Оле (DK), ДИЕРС Иван
Вернер (DK), ГУДДАЛЬ Эрлинг (NO)
(73) Патентообладатель:
НОВО НОРДИСК А/С (DK)
(74) Патентный поверенный:
Ятрова Лариса Ивановна

(54) ПРИМЕНЕНИЕ СОЕДИНЕНИЙ СТЕРИНА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА,
РЕГУЛИРУЮЩЕГО МЕЙОЗ, И СПОСОБ РЕГУЛЯЦИИ МЕЙОЗА

(57)
Изобретение относится к биологии, может
быть использовано в медицине и касается

стимуляции мейоза половых клеток
млекопитающих. Для этого в качестве
стимулятора используют стерини,

являющиеся промежуточными продуктами в биосинтезе холестерина, а также новые, структурно им родственные синтетические

стерины. Способ позволяет повысить эффективность стимулирования мейоза. 2 с. и 36 з.п. ф-лы, 6 табл.

RU 2 1 9 4 5 1 0 C 2

RU 2 1 9 4 5 1 0 C 2



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 194 510** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 31/575, A 61 P 15/08**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 97101087/14, 23.06.1995
(24) Effective date for property rights: 23.06.1995
(30) Priority: 23.06.1994 DK 0753/94
09.03.1995 DK 0241/95
(43) Application published: 10.03.1999
(46) Date of publication: 20.12.2002
(85) Commencement of national phase: 23.01.1997
(86) PCT application:
DK 95/00265 (23.06.1995)
(87) PCT publication:
WO 96/00235 (04.01.1996)
(98) Mail address:
103375, Moskva, ul. Il'inka, 5/2,
OOO "Sojuzpatent", pat.pov. N.N.Vysotskaja

(71) Applicant:
NOVO NORDISK A/S (DK)
(72) Inventor: BJuSKOU Anne Grete (DK),
ANDERSEN Klaus Iding (DK), NORDKhol'M Lars
(DK), TEGERSEN Khenning (DK), VASSMANN
Ole (DK), DIERS Ivan Verner (DK), GUDDAL'
Ehrling (NO)
(73) Proprietor:
NOVO NORDISK A/S (DK)
(74) Representative:
Jatrova Larisa Ivanovna

(54) APPLICATION OF STEROL COMPOUNDS IN OBTAINING A MEIOSIS-REGULATING MEDICINAL PREPARATION AND METHOD FOR MEIOSIS REGULATION

(57) Abstract:
FIELD: biology, medicine. SUBSTANCE: the innovation deals with meiotic stimulation of germ cells in mammals. For this purpose, one should apply sterols being intermediate

products in cholesterol biosynthesis and new structurally relative synthetic sterols, as well. EFFECT: higher efficiency of meiotic stimulation. 38 cl, 15 ex, 6 tbl

RU 2 194 510 C2

RU 2 194 510 C2

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области органической химии, медицине и ветеринарии, в частности к некоторым производным стерина и к их применению в качестве лекарственных средств. В частности, было обнаружено, что некоторые производные стерина могут быть использованы для регуляции мейоза.

Уровень техники

Мейоз - это исключительное важное событие у половых клеток, на котором основано половое размножение. Мейоз содержит два мейотических деления. Во время первого деления происходит обмен между материнскими и отцовскими генами, прежде чем пары хромосом разделятся на две дочерние клетки. Они имеют только половину количества ($1n$) хромосом и $2c$ ДНК. Второе мейотическое деление происходит без синтеза ДНК. Это деление, таким образом, приводит к образованию гаплоидных половых клеток только с $1c$ ДНК.

Мейотические события одинаковы у мужских и женских половых клеток, но временная программа и процессы дифференцировки, приводящие к образованию яйцеклеток и сперматозоидов, совершенно различны. Все женские половые клетки входят в профазу первого мейотического деления в начале жизни, часто до рождения, но задерживаются в развитии в виде ооцитов на более позднем этапе профазы (диктианное состояние) вплоть до овуляции после наступления половой зрелости. Таким образом в начале жизни самка имеет запас ооцитов, который расходуется, пока не будет исчерпан. Мейоз у самок не заканчивается до самого оплодотворения и в результате дает только одну зрелую яйцеклетку и два недоразвитых полярных тельца на половую клетку. В противоположность этому лишь некоторые из мужских половых клеток входят в мейоз с момента наступления половой зрелости и уходят из родовой популяции половых клеток на протяжении всей жизни. Раз начавшись, мейоз у мужской клетки продолжается без существенной задержки и дает 4 сперматозоида.

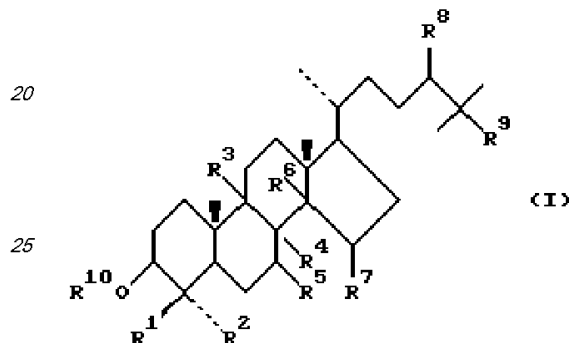
Лишь немного известно о механизмах, которые управляют возникновением мейоза у самцов и самок. Новые исследования показывают, что ответственными за остановку мейоза могут быть фолликулярные пурины - гипоксантин или аденозин (Downs, S.M. et al. Dev. Biol. 82 (1985) 454-458; Eppid, J.J. et al. Dev. Biol. 119 (1986) 313-321; и Downs, S.M. Mol. Reprod. Dev. 35 (1993) 82-94.) Наличие диффундируемого мейоз-регулирующего вещества первоначально было описано By Byskov et al. в связи с культуральной системой из половых желез плодных мышей (Byskov, A.G. et al. Dev. Biol. 52 (1976) 193-200). Яичником плодной мыши, в котором проходил мейоз, было секретировано мейоз-индуцирующее вещество (MIS), а из морфологически дифференцированного семенника с оставшимися, немейотическими половыми клетками было выделено мейоз-предотвращающее вещество (MPS). Было предположено, что относительные концентрации MIS и MPS регулировали

начало, остановку и возобновление мейоза в мужских и женских половых клетках (Byskov, A.G. et al. in The Physiology of Reproduction, (eds. Knobil, E. and Neill, J. D. Raven Preess, New York (1994)). Очевидно, что если мейоз можно регулировать, то можно управлять размножением. К сожалению до сих пор невозможно идентифицировать мейоз-индуцирующее вещество.

Сущность изобретения

Неожиданно было обнаружено, что некоторые стерины, известные как промежуточные продукты в биосинтезе холестерина, и некоторые новые, структурно родственные синтетические стеринны, могут быть использованы для регуляции мейоза.

Таким образом, настоящее изобретение относится к соединению общей формулы (I)



где R^1 и R^2 независимо выбирают из группы, содержащей водород, неразветвленный или разветвленный C_1 - C_6 алкил, который может быть замещен галогеном или гидроксигруппой, или R^1 и R^2 вместе с углеродным атомом, к которому они присоединены, образуют циклопентановое или циклогексановое кольцо,

R^3 и R^4 вместе образуют собой дополнительную связь между углеродными атомами, к которым они присоединены, и в этом случае R^5 представляет собой водород и R^6 и R^7 либо представляют собой водород, либо вместе образуют дополнительную связь между углеродными атомами, к которым они присоединены, или

R^5 и R^6 вместе образуют собой дополнительную связь между углеродными атомами, к которым они присоединены, и в этом случае R^3 представляет собой водород и R^6 и R^7 , либо представляют собой водород, либо вместе образуют дополнительную связь между углеродными атомами, к которым они присоединены, или

R^4 и R^6 вместе образуют дополнительную связь между углеродными атомами, к которым они присоединены, и в этом случае R^3 , R^5 и R^7 все представляют собой водород,

R^8 и R^9 представляют собой водород или вместе образуют дополнительную связь между углеродными атомами, к которым они присоединены, и

R^{10} представляет собой либо водород, либо ацильную группу, включающую фосфогруппу или сульфогруппу, или R^{10} представляет собой группу, которая вместе с остальной частью молекулы образует простой эфир, для применения в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение касается также новых соединений общей формулы (I).

В настоящем контексте выражение "регуляция мейоза" понимается как означающее то, что соединения могут быть использованы для стимуляции мейоза *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*.

Таким образом, более конкретно настоящее изобретение касается применения соединения приведенной выше общей формулы (I) для регуляции мейоза.

Настоящее изобретение также относится к способу регуляции мейоза в половой клетке млекопитающего, включающему обработку половой клетки, нуждающейся в таком лечении эффективным количеством соединения приведенной выше общей формулы (I).

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Было обнаружено, что мейоз-индуцирующие вещества, экстрагированные как из бычьих семенников, так и из фолликулярной жидкости человека, способны вызывать возобновление мейоза в культивированных ооцитах мыши (ооцитный тест), а также стимулировать мейоз в мужских половых клетках культивированных семенников половозрелой мыши (гонадный тест). Мейоз-индуцирующее вещество вырабатывается зрелыми семенниками различных млекопитающих, включая мужчин, а также обнаружено в зрелых фолликулах яичника некоторых видов млекопитающих, включая женщин. Из примеров 1 и 2 видно, что мейоз-индуцирующим веществом, идентифицированным в бычьих семенниках, является 4,4-диметилзимостерин, а мейоз-индуцирующим веществом, идентифицированным в фолликулярной жидкости человека,

-4,4-диметил-5 α -холеста-8,14,24-триен-3 β -ол.

О существовании мейоз-индуцирующих веществ известно уже некоторое время. Но до сих пор ничего не известно об идентификации мейоз-индуцирующего вещества или веществ. Насколько известно авторам настоящего изобретения, до сих пор еще соединения общей формулы (I) не нашли практического применения в медицине. В частности, соединения общей формулы (I) до сих пор еще не были использованы в качестве лекарственных средств для регуляции мейоза.

Существует несколько видов влияния на мейоз. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения соединения общей формулы (I) используют для стимуляции мейоза. В соответствии с другим предпочтительным вариантом настоящего изобретения соединения общей формулы (I) используют для стимуляции мейоза у людей. Так, соединения формулы (I) весьма перспективны в качестве новых средств регуляции плодовитости без обычных побочных эффектов на соматические клетки, которые известны из опыта использования до настоящего времени гормональных контрацептивов, изготовленных на основе экстрагенов и/или гестагенов. При применении в качестве противозачаточного средства у самок мейоз-индуцирующее вещество может быть введено, чтобы вызвать преждевременное возобновление мейоза в ооцитах, когда они еще находятся в растущем фолликуле, до овуляционного пика

гонадотропинов. У женщины возобновление мейоза может, например, быть вызвано через неделю после прекращения предыдущей менструации. Будучи овулированы, полученные перезрелые ооциты наиболее вероятно не будут оплодотворены.

Нормальный менструальный цикл, видимо, не будет осуществлен. В этой связи важно отметить, что присутствие мейоз-индуцирующего вещества не влияет на биосинтез прогестерона в культивированных зернистых клетках (соматические клетки фолликула) человека, тогда как эстрогены и гестагены, используемые в до сих пор применяемых гормональных контрацептивах, оказывают вредное влияние на биосинтез прогестерона.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения мейоз-индуцирующее вещество общей формулы (I) может быть использовано для лечения некоторых случаев бесплодия у самок, включая женщин, путем введения его самкам, которые вследствие недостаточного собственного вырабатывания MIS не способны продуцировать зрелые ооциты. Кроме того, при осуществлении оплодотворения *in vitro* лучшие результаты достигаются при добавлении к среде, в которой содержатся ооциты, мейоз-индуцирующего вещества общей формулы (I).

Кроме того, при бесплодии у самцов (включая мужчин), вызванном недостаточным собственным вырабатыванием мейоз-индуцирующего вещества, введение мейоз-индуцирующего вещества общей формулы (I) может смягчить проблему.

Введение композиций, содержащих соединение формулы (I), может быть осуществлено любым способом, эффективно обеспечивающим транспортировку активного соединения к месту его действия.

Так, при необходимости введения млекопитающему соединений по настоящему изобретению их удобно изготавливать в виде фармацевтической композиции, содержащей по крайней мере одно соединение общей формулы (I) в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем. Для перорального применения такие композиции изготавливают в форме капсул или таблеток.

Из сказанного выше понятно, что требуемая схема введения композиции зависит от того состояния, которое нужно вылечить. Так, при лечении бесплодия введение может быть только разовое или в течение ограниченного периода, например до наступления беременности. При использовании в качестве контрацептива мейоз-индуцирующее вещество общей формулы (I) принимают либо непрерывно, либо периодически. Когда женщина принимает его в качестве контрацептива не непрерывно, то важно соблюдать согласование во времени относительно менструального цикла.

Фармацевтические композиции могут содержать носители, наполнители, усилители всасывания, консерванты, буферы, вещества для регуляции осмотического давления, вещества для улучшения распадаемости таблеток и другие компоненты, которые традиционно используют в данной области техники. Примерами твердых носителей

являются карбонат магния, стеарат магния, декстрин, лактоза, сахар, тальк, желатин, пектин, трагакант, метилцеллюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза, низкотопляющиеся воски и масло какао.

Жидкие композиции включают стерильные растворы, суспензии и эмульсии. Такие жидкие композиции могут быть пригодными для инъекции или для использования в связи с оплодотворением *In vitro* и *ex vivo*. Жидкие композиции могут содержать другие компоненты, традиционно используемые в данной области техники, некоторые из которых упомянуты в приведенном выше перечислении.

Далее, композиция для чрезвычайного введения соединения по настоящему изобретению может быть изготовлена в форме пластыря, а композиция для введения через нос в виде аэрозоля в жидкой или порошкообразной форме.

Применяемая доза соединения по настоящему изобретению определяется лечащим врачом и зависит, кроме всего прочего, от конкретного используемого соединения, от способа введения и от цели применения.

Предпочтительными соединениями формулы (I) являются следующие:

Холест-7-ен-3 β -ол,
4-Метилхолест-7-ен-3 β -ол,
4-Этилхолест-7-ен-3 β -ол,
4,4-Диметилхолест-7-ен-3 β -ол,
4 α -Метил-4 β -этилхолест-7-ен-3 β -ол,
4 α -Этил-4 β -метилхолест-7-ен-3 β -ол,
4,4-Диэтилхолест-7-ен-3 β -ол,
4-Пропилхолест-7-ен-3 β -ол,
4-Бутилхолест-7-ен-3 β -ол,
4-Изобутилхолест-7-ен-3 β -ол,
4,4-Тетраметиленхолест-7-ен-3 β -ол,
4,4-Пентаметиленхолест-7-ен-3 β -ол,
Холест-8-ен-3 β -ол,
4-Метилхолест-8-ен-3 β -ол,
4-Этилхолест-8-ен-3 β -ол,
4,4-Диметилхолест-8-ен-3 β -ол,
4 α -Метил-4 β -этилхолест-8-ен-3 β -ол,
4 α -Этил-4 β -метилхолест-8-ен-3 β -ол,
4,4-Диэтилхолест-8-ен-3 β -ол,
4-Пропилхолест-8-ен-3 β -ол,
4-Бутилхолест-8-ен-3 β -ол,
4-Изобутилхолест-8-ен-3 β -ол,
4,4-Тетраметиленхолест-8-ен-3 β -ол,
4,4-Пентаметиленхолест-8-ен-3 β -ол,
Холест-8(14)-ен-3 β -ол,
4-Метилхолест-8(14)-ен-3 β -ол,
4-Этилхолест-8(14)-ен-3 β -ол,
4,4-Диметилхолест-8(14)-ен-3 β -ол,
4 α -Метил-4 β -этилхолест-8(14)-ен-3 β -ол,
4 α -Этил-4 β -метилхолест-8(14)-ен-3 β -ол,
4,4-Диэтилхолест-8(14)-ен-3 β -ол,
4-Пропилхолест-8(14)-ен-3 β -ол,
4-Бутилхолест-8(14)-ен-3 β -ол,
4-Изобутилхолест-8(14)-ен-3 β -ол,
4,4-Тетраметиленхолест-8(14)-ен-3 β -ол,
4,4-Пентаметиленхолест-8(14)-ен-3 β -ол,
Холеста-8,14-диен-3 β -ол,
4-Метилхолеста-8,14-диен-3 β -ол,
4-Этилхолеста-8,14-диен-3 β -ол,
4,4-Диметилхолеста-8,14-диен-3 β -ол,
4 α -Метил-4 β -этилхолеста-8,14-диен-3 β -ол,
4 α -Этил-4 β -метилхолеста-8,14-диен-3 β -ол,
4,4-Диэтилхолеста-8,14-диен-3 β -ол,

4-Пропилхолеста-8, 14-диен-3 β -ол,
4-Бутилхолеста-8, 14-диен-3 β -ол,
4-Изобутилхолеста-8, 14-диен-3 β -ол,
4,4-Тетраметиленхолеста-8, 14-диен-3 β -ол,
4,4-Пентаметиленхолеста-8, 14-диен-3 β -ол,
Холеста-8, 24-диен-3 β -ол,
4-Метилхолеста-8, 24-диен-3 β -ол,
4-Этилхолеста-8, 24-диен-3 β -ол,
4,4-Диметилхолеста-8, 24-диен-3 β -ол,
4 α -Метил-4 β -этилхолеста-8, 24-диен-3 β -ол,
4 α -Этил-4 β -метилхолеста-8, 24-диен-3 β -ол,
4,4-Диэтилхолеста-8, 24-диен-3 β -ол,
4-Пропилхолеста-8, 24-диен-3 β -ол,
4-Бутилхолеста-8, 24-диен-3 β -ол,
4-Изобутилхолеста-8, 24-диен-3 β -ол,
4,4-Тетраметиленхолеста-8, 24-диен-3 β -ол,
4,4-Пентаметиленхолеста-8, 24-диен-3 β -ол,
Холеста-8, 14, 24-триен-3 β -ол,
4-Метилхолеста-8, 14, 24-триен-3 β -ол,
4-Этилхолеста-8, 14, 24-триен-3 β -ол,
4,4-Диметилхолеста-8, 14, 24-триен-3 β -ол,
4 α -Метил-4 β -этилхолеста-8, 14, 24-триен-3 β -ол,
4 α -Этил-4 β -метилхолеста-8, 14, 24-триен-3 β -ол,
4,4-Диэтилхолеста-8, 14, 24-триен-3 β -ол,
4-Пропилхолеста-8, 14, 24-триен-3 β -ол,
4-Бутилхолеста-8, 14, 24-триен-3 β -ол,
4-Изобутилхолеста-8, 14, 24-триен-3 β -ол,
4,4-Тетраметиленхолеста-8, 14, 24-триен-3 β -ол,
4,4-Пентаметиленхолеста-8, 14, 24-триен-3 β -ол,

и их сложные и простые эфиры.

Предпочтительными сложными эфирами формулы (I) являются те, в которых R¹⁰ представляет собой ацильную группу карбоновой кислоты, которая может быть разветвленной, или неразветвленной, или циклической и может содержать необязательно замещенную аминогруппу и/или 1 или 2 атома кислорода в дополнение к карбонильному кислороду сложноэфирной группы, который связывает R¹⁰ со стерновым скелетом. Когда R¹⁰ представляет собой ацильную группу, она содержит предпочтительно от 1 до 20 углеродных атомов, более предпочтительно от 1 до 12 углеродных атомов, еще более предпочтительно от 1 до 10 углеродных атомов и наиболее предпочтительно от 1 до 7 углеродных атомов. Кислота, от которой произведен радикал R¹⁰, может быть дикарбоновой кислотой. Примерами R¹⁰ являются ацетил, бензоил, пивалоил, бутирил, никотиноил, изоникотиноил, гемисукциноил, геминлутароил, гемималоил, гемифталоил, бутилкарбамоил, фенилкарбамоил, бутоксикарбонил, трет-бутоксикарбонил, этоксикарбонил, 4-диметиламинометилбензоил, 4-диэтиламинометилбензоил, 4-дипропиламинометилбензоил, 4-(морфолинометил)-бензоил, 4-(4-метил-1-пиперазинилметил)-бензоил, 3-диметиламинометилбензоил, 3-диэтиламинометилбензоил, 3-дипропиламинометилбензоил, 3-(морфолинометил)бензоил, 3-(4-метил-1-пиперазинилметил)бензоил, сульфо (в этом случае (1) означает сложный эфир или соль сульфат) или фосфоно (в этом

случае (1) означает сложный эфир или соль фосфат).

Предпочтительными простыми эфирами формулы (I) являются те, в которых R¹⁰ представляет собой метильную, метоксиметильную, бензильную или пивалоилоксиметильную группу.

Соединения по настоящему изобретению, встречающиеся в природе, могут быть получены из природных источников известными способами. В соответствии с другим вариантом их можно, как и структурно родственные синтетические стериды по настоящему изобретению, получить путем синтеза известными способами.

Далее настоящее изобретение проиллюстрировано рядом примеров, которые не следует считать ограничивающими объем защиты. Признаки, раскрытые в описании, и в следующих далее примерах, могут служить как по отдельности, так и в любом их сочетании, материалом для реализации изобретения в различных его видах.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

ПРИМЕР 1

Выделение, очистка и идентификация мейоз-индуцирующего вещества (MIS) из бычьих семенников

Семенники шестилетнего старого быка (Danish Land race) были извлечены сразу же после забоя животного. Удалив белковую оболочку, ткань семенников помещали на сухой лед и хранили при -80°C. Замороженную ткань (92 г) измельчали на кусочки менее 1 мм и лиофилизировали в темноте до полного высыхания (приблизительно 90 ч). Лиофилизированную ткань экстрагировали 400 мл н-гептана (Lichrosolv. Merck 4390, Германия) под азотом с перемешиванием в течение 24 ч при 20°C. Суспензию фильтровали, и твердый материал экстрагировали еще раз так, как описано выше. Объединенные органические фазы упаривали досуха на ротационном испарителе при комнатной температуре, получив в результате 981 мг экстрагированного материала. Этот материал растворяли в н-гептане и распределяли по 15 пробиркам, из которых выпаривали н-гептан. Пробирки хранили под азотом при 4°C в темноте.

Экстракты очищали путем трехстадийной ВЭЖХ (HPLC):

На первой стадии содержимое одной пробирки растворяли в 50 мкл 50%-ного (объем/объем) тетрагидрофурана (ТГФ) в воде и наносили на колонку для ВЭЖХ с обращенной фазой (Lichro Spher 100 RP-8, заглушенная, 5 мкм, 250x4 мм вн. диаметр, Merck). Элюировали при 40°C с использованием линейного градиента 50%-100% ТГФ за 15 мин (расход: 1 мл/мин). Собирали 18 фракций по 1 мл и определяли их на MIS-активность.

На второй стадии фракции, полученные на первой стадии и обладающие активностью в ооцитном тесте, растворяли в 50-100 мкл 70%-ного ТГФ и наносили на колонку, аналогичную той, что была использована на первой стадии. Элюировали при 40°C с использованием линейного градиента 60%-78% ТГФ за 16 минут (Расход: 1 мл/мин).

Собирали 8 фракций по 1 мл и определяли их на MIS-активность.

На третьей стадии фракции, полученные на второй стадии и обладающие активностью в ооцитном тесте, растворяли в 100 мкл смеси н-гептан:2-пропанол (98: 2, объем/объем) и наносили на полупрепаративную колонку для ВЭЖХ (Chromspher Si 5 мкм, 250x10 мм вн. диаметр, Chrompack). Элюировали при комнатной температуре с использованием подвижной фазы, состоящей из смеси н-гептан: 2-пропанол, 98:2 (объем/объем) (расход: 5 мл/мин). Собирали 5 фракций по 2,5 мл и определяли их на MIS-активность.

На всех стадиях элюцию контролировали УФ-детектицией при 220 нм.

Материал, прошедший через описанную выше процедуру трехстадийной очистки, использовали для исследования молекулярной структуры активного соединения путем спектрометрии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и путем масс-спектрометрии.

Для получения ЯМР-спектра приблизительно 1 мг очищенного материала растворяли в 0,6 мл дейтерохлороформа. Расщепленный ЯМР-спектр на протоне ¹³C-¹H-ЯМР-спектр (с увеличением разрешения или без) и 2D TOCSY-спектр были записаны на ЯМР-спектрометре Bruker AMX2 400, снабженном инверсной широкополосной 5 мм головкой с градиентной катушкой. Химические сдвиги ¹³C-ЯМР в м. д. ((δ)) для выделенного MIS даны в таблице 1 для сравнения с соответствующими данными для зимостерина (Taylor, U.F. et al. J. Lipid Res. 22 (1981) 171) и ланостерина (Emmons, G.T. et al. Magn. Res. Chem. 27 (1989) 1012).

Масс-спектрометрию осуществляли с использованием прибора YG Trio 1000 для ЖХ и МС с интерфейсом L1NC для пучка частиц и программой LAB-BASE 2.1 (Fisons Instrumentts) и с системой ВЭЖХ, содержащей колонку (Chrompack), Chromspher Si, 3 мкм, 100x4,6 мм. ВЭЖХ осуществляли при комнатной температуре с использованием смеси н-гептан:2-пропанол, 98:2 (объем/объем) в качестве подвижной фазы (расход: 0,6 мл/мин). Образец вводимого MIS растворяли в н-гептане. Масс-спектрометр работал в режиме электронного удара. Результаты даны в таблице 2, где относительные высоты пиков для выделенного продукта сравниваются с данными для 4,4-диметилзимостерина из ссылки 1. Под ссылкой 2 "+" означает, что о соответствующем пике сообщено также в этом исследовании; "-" под ссылкой 1 или 2 означает, что о соответствующем пике в этих исследованиях не сказано.

На основе ¹³C-ЯМР-спектра и молекулярной массы 412, определенной путем масс-спектроскопии (МС), было предположено, что структура MIS, выделенного из бычьих семенников, представляет собой

4,4-диметил-5-холеста-8,24-диен-3 β -ол, также обозначенный как 4,4-диметилзимостерин (DMZ). Химические сдвиги отдельных углеродных атомов MIS-активного материала с третьей стадии очистки путем ВЭЖХ сравнивали с химическими сдвигами структурно очень

близко родственных соединений ланостерина и зимостерина. Наблюдаемые протонные химические сдвиги, константы взаимодействия и ТОС У-корреляции окончательно подтверждают, что выделенное соединение является 4,4-диметилзимостерином.

ПРИМЕР 2

Выделение, очистка и идентификация мейоз-индуцирующего вещества (MIS) из человеческой фолликулярной жидкости

Фолликулярную жидкость человека (PP) получали из фолликулов, выделенных для получения ооцитов при лечении бесплодия путем оплодотворения *in vitro*. Жидкость лиофилизировали и экстрагировали н-гептаном, экстракт очищали так же, как описано в примере 1. Соединение из активного пика имело молекулярной ион с $m/z=410$ и масс-спектр показал, что химическая структура молекулы FF-MIS - 4,4-диметил-5-холеста-8,14,24-триен-3 β -ол.

Методы: Масс-спектрометрию осуществляли с использованием прибора YG Trio 1000, для ЖХ и МС с интерфейсом LINC для пучка частиц и программой LAB-BASE 2.1 (Fisons Instruments), соединенного с системой прямофазной ВЭЖХ, содержащей колонку (Chrompack), ChromSper Si, 3 мкм, 100x4 мм в. д. и смесь н-гептан: 2-пропанол: метанол: аммиак (68:30:2:0,2) в качестве подвижной фазы (расход: 0,5 мл/мин). Образец вводимого MIS растворяли в н-гептане. Масс-спектрометр работал в режиме электронного удара. Результаты приведены в таблице 3.

ПРИМЕР 3

Получение 4 β -метилзимостерина путем ферментации

Стадия А

Штамм дрожжей *Kluyveromyces fragilis* A3410 засеивали на косяки агар YPG и выращивали 3 дня при 30 °С в термостатированном инкубаторе. К косякам добавляли 5 мл стерильной среды УЕ и дрожжевые колонии суспендировали в жидкой среде путем взбалтывания пробирки на вихревом смесителе. Затем суспензию клеток отбирали 5 мл стерильным шприцом и вносили в начальную колбу с двумя выступами на дне. Колба содержала 200 мл среды ZYM. Колбу закрепляли на качалке и инкубировали в течение 24 ч при 30 °С при 250 об/мин. Добавляли в колбу 0,4 мл стерильного профильтрованного раствора амфотерицина В и инкубировали еще 25 ч. Дрожжевые клетки собирали путем центрифугирования (Beckman JG, 5 °С, 10 мин, 4000 об/мин) и промывали один раз водой. Суспензию клеток помещали в небольшой пластмассовый контейнер и хранили при -18 °С до окончательной экстракции стерина.

Упомянутые выше питательные среды и раствор амфотерицина В имели следующий состав:

Агар YPG

Дрожжевой экстракт, - 4 г

KH₂PO₄ - 1 г

Mo₅SO₄•7H₂O - 0,5 г

Глюкоза - 15 г

Агар - 20 г

Деионизированная вода - 1000 мл

pH доводили до 5,8 перед

автоклавированием при 121 °С, 20 мин.

Среда УЕ

Дрожжевой экстракт, - 10 г

Деионизированная вода - 1000 мл

Автоклавирование 121 °С - 20 мин

Среда ZYM

Дрожжевой экстракт, Difco - 20 г

Пептон, Bacto - 10 г

Водопроводная вода - 1000 мл

pH доводили до 6,5-6,6 перед

автоклавированием при 121 °С, 20 мин, глюкоза (добавляли отдельно после автоклавирования) 60 г.

Раствор амфотерицина В

1 мг Фунгизона (лиофилизированный брикет из 50 мг амфотерицина В, 41 мг дезоксихолата натрия и 20,2 мг фосфата натрия производства ф. "Squibb") растворяли в 1 мл деионизированной воды.

Стадия В

Культивированные клетки со стадии А суспендировали в 10 мл воды и добавляли 10 мл 40%-ного КОН в метаноле. Смесь нагревали с обратным холодильником в течение 4 часов, оставляли на ночь при комнатной температуре и затем дважды экстрагировали 20 мл н-гептана. Объединенные экстракты промывали 10%-ным раствором хлорида натрия, а затем водой до нейтральной реакции (пять раз) и высушивали. После выпаривания растворителя получали 40 мг неочищенных стерина.

Стадия С

Неочищенные стерина со стадии В растворяли в 1 мл смеси н-гептан:2-пропанол (98:2) и взбалтывали на вихревом смесителе, центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин и затем подвергали ВЭЖХ:

Колонка: Lichvosorb DIOL 10 мкм, 250•4 мм внут. диаметр (Merck)

Элюент: смесь н-гептан:2-пропанол (98:2)

Расход: 1,1 мл/мин, 20 °С

Детектирование: УФ при 220 нм

Собирали фракции, полученные в нескольких хроматографиях после 6,8 мин элюирования. Собранные фракции объединяли и выпаривали растворитель. Полученный осадок подвергали масс-спектрометрии и ооцитному тесту.

Данные масс-спектра, приведенные в таблице 4, идентичны данным для 4 β -метилзимостерина, зарегистрированными в библиотеке Национального бюро стандартов.

ПРИМЕР 4

Получение

4,4-диметилхолеста-8,14-диен-3 β -ола

Это соединение было получено так, как описано by Schroepfen et al.: Chemistry and Physics of Lipids 47 (1988) 187, и обладало теми же физическими константами, как и описанные в литературе.

ПРИМЕР 5

Получение 4,4-диметилхолест-8-ен-3 β -ола

Стадия А

2,48 г

4,4-диметилхолеста-8,14-диен-3 β -ола

растворяли при 0 °С в 20 мл пиридина (пример 4). К полученному раствору добавляли 1,7 г бензоилхлорида и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После упаривания досуха

добавляли 25 мл толуола и после стандартной водной обработки, упаривания и растирания с ацетоном получили 2,3 г (74%) кристаллического бензоата.

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ) показал характеристические сигналы при: 8,1 (д, 2H), 7,55 (т, 1H), 7,4 (т, 2H), 5,4 (с, широкий, 1H), 4,2 (дд, 1H).

Стадия В
2,04 г

3-бензоилокси-4,4-диметилхолеста-8,14-диен а растворяли в 50 мл ТГФ (стадия А) и добавляли по каплям при 0 °С 360 мл 1 М раствора борана в ТГФ. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, охлаждали до 0°С и добавляли к ней по каплям 140 мл воды, а затем 360 мл 10%-ного гидроксида натрия и 378 мл 30%-ной перекиси водорода. После перемешивания в течение 90 минут к смеси добавляли 100 мл диэтилового эфира и водную фазу дважды экстрагировали диэтиловым эфиром. Объединенные органические фазы промывали два раза раствором бисульфита натрия и затем водой. После упаривания продукт очищали путем хроматографии на SiO₂ (2%-ный диэтиловый эфир в толуоле) и в результате получили 0,62 г 3-бензоилокси-4,4-диметилхолест-8-ен-15-ола

МС (молекулярный ион): 534,4.

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ) показал характеристические сигналы при: 8,0 (д, 2H), 7,5 (т, 1H), 7,4 (т, 2H), 4,75 (м, 1H), 4,1 (м, 1H).

Стадия С
0,54 г

3-бензоилокси-4,4-диметилхолест-8-ен-15-ола растворяли при 0 °С в 2,7 мл пиридина и к полученному раствору осторожно добавляли 33 мг диметиламинопиридина и 287 мг фенилхлортиоформата. Смесь перемешивали 20 часов при комнатной температуре. После добавления 25 мл диэтилового эфира смесь промывали 6 раз насыщенным раствором сульфата меди, водой, дважды 10%-ным гидроксидом натрия, водой и рассолом и упаривали с получением 0,66 г неочищенного 3-бензоил-4,4-диметилхолест-8-ен-15-фенилтиокарбоната, который дополнительно обрабатывали путем растворения в 20 мл толуола и обработки 370 мг гидрида трибутиллолова и 20 мг азоизобутиронитрила. Смесь нагревали при 90°С в течение 20 минут и повторяли ту же самую обработку. После упаривания смесь подвергали грубой очистке путем хроматографии на SiO₂ (гептан:метилхлорид = 70: 30) и в результате получили 150 мг сырого 3-бензоилокси-4,4-диметилхолест-8-ена с примесью соответствующего 8,14-диена (стадия А).

Стадия D

150 мг смеси, полученной на стадии С, растворяли в 2 мл метилхлорида, охлажденного до 0°, добавляли по каплям 0,7 мл диизобутилламингидрида и через 15 минут осторожно добавляли 0,15 мл воды. Затем добавляли 25 мл диэтилового эфира и органическую фазу промывали насыщенным раствором виннокислого калий-натрия два раза, водой и рассолом и упаривали с получением 130 мг смеси, которую подвергали хроматографии на смеси

AgNO₃/SiO₂ (полученной так, как описано в Chem. & Phys. of Lipids 63 (1992) 115) с элюированием толуолом. Кристаллизация из смеси эфир-метанол дала 49 мг целевого соединения. Температура плавления: 154-155 °С.

МС (молекулярный ион): 414,4.

¹³C-ЯМР-спектр (CDCl₃, 100,6 МГц)

показал характеристические сигналы при: 78,49 (C₃); 127,49 (C₈), 135,35 (C₉).

ПРИМЕР 6

Получение

3-ацетокси-4,4-диметилхолеста-8,14-диена

В 7,5 мл пиридина и 7,5 мл уксусного ангидрида растворяли 1,3 г 4,4-диметилхолеста-8,14-диен-3-ола (Schroepfer et al.: Chemistry and Physics of Lipids 47 (1988) 187) и раствор перемешивали при 23°С всю ночь. Смесь упаривали в вакууме, десорбировали два раза толуолом и очищали путем флэш-хроматографии на SiO₂ (толуол). Первые 300 мл элюата упаривали и продукт кристаллизовали из диэтилового эфира с получением 140 мг 3-ацетокси-8,14-диметилхолестадиена.

Температура плавления: 120-125 °С (с разложением).

МС (молекулярный ион): 454,4.

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ) показал характеристические сигналы при: 5,4 (с, широкий, 1H), 4,5 (дд, 3H), 2,0 (с, 3H).

ПРИМЕР 7

Получение холеста-8,14-диен-3β-ола

В смеси 2,7 мл бензола, 19 мл этанола и 2,7 мл концентрированной хлороводородной кислоты растворяли 770 мг дегидрохолестерина и раствор нагревали при температуре кипения с обратным холодильником в течение 3 часов. Смесь охлаждали на ледяной бане, получив в результате первую порцию (110 мг) кристаллов. Выпаривание филтраты досуха и кристаллизация из смеси эфир/метанол дали вторую порцию (220 мг) кристаллов, который объединяли с первой порцией и хроматографировали на смеси AgNO₃/SiO₂ (полученной так, как описано в примере 5, стадия D) с элюцией 2,5%-ным ацетоном в толуоле, получив в результате 94 мг чистого холеста-8,14-диен-3β-ола.

Температура плавления: 113-114,5 °С

МС (молекулярный ион): 384,4.

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ) продукта показал характеристические сигналы при: 5,35 (с, широкий, 1H), 3,6 (м, 1H).

¹³C-ЯМР-спектр (CDCl₃, 50,3 МГц)

показал характеристические сигналы при: 70,99 (C₃), 117,42 (C₁₅), 123,1 (C₈), 140,8 (C₉), 151,1 (C₁₄).

ПРИМЕР 8

Получение

4,4-тетраметилхлеста-8,14-диен-3 β-ола

Стадия А

1,15 г дегидрохолестерина растворяли в 15 мл 2-бутанола, добавляли 0,34 г изопропоксида алюминия и смесь нагревали при температуре кипения с обратным холодильником в течение 75 минут. Смесь охлаждали на ледяной бане, добавляли 15 мл 2 N хлороводородной кислоты, разделяли фазы и органическую фазу промывали два раза 7,5 мл 2 N хлороводородной кислоты.

Водную фазу экстрагировали толуолом, объединенные органические фазы промывали водой и рассолом, высушивали и упаривали с получением 1,18 г неочищенного холеста 5,7-диен-3-она в виде вязкого масла.

¹H-ЯМР-спектр показал характеристические сигналы при: 5,8 (с, 1H), 5,2 (м, 1H), 3,2 (д, 1H), 2,7 (дд, 1H).

Стадия В

0,67 г трет-бутоксидка калия растворяли в 16 мл трет-бутанола при 45°C, добавляли 0,57 г холеста-5,7-диен-3-она и смесь перемешивали 10 минут. Добавляли 0,47 г 1,4-диодбутана и смесь перемешивали 30 минут. Выпаривали растворитель, остаток вновь растворяли в толуоле и воде и добавляли немного рассола, чтобы вызвать разделение фаз. Органическую фазу промывали четыре раза водой и объединенные водные фазы экстрагировали один раз толуолом. Объединенные толуоловые экстракты высушивали и упаривали с получением 0,45 г вспененного материала, который после кристаллизации из смеси диэтилового эфира-метанол дал 0,35 г кристаллического

4,4-тетраметилхолоста-5,7-диен-3-она.

МС (молекулярный ион): 436,4.

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ) показал характеристические сигналы при: 5,75 (д, 1H), 5,5 (м, 1H).

Стадия С

130 мг diAlH₄ суспендировали в 6 мл ТГФ и к суспензии добавляли 1,97 г 4,4-тетраметилхолоста-5,7-диен-3-она, растворенного в 40 мл ТГФ по каплям в течение 30 минут. Спустя 15 минут после окончания добавления все еще оставалась некоторая часть непрореагировавшего исходного материала (ТСХ) и потому добавляли еще 65 мг LiAlH₄. После перемешивания в течение 30 минут реакция закончилась, после чего по каплям добавляли 0,9 мл воды в 5 мл ТГФ. После 30 минут перемешивания добавляли избыточное количество сульфата магния и смесь перемешивали еще 30 минут, фильтровали и упаривали досуха. Остаток растворяли в 25 мл диэтилового эфира и 25 мл метанола и эфир осторожно удаляли в вакууме. Смесь перемешивали в течение ночи, фильтровали и получали 1,75 г кристаллического 4,4-тетраметилхолоста-5,7-диен-3-ола.

МС (молекулярный ион): 438,4.

¹H-ЯМР-спектр показал характеристические сигналы при: 5,8 (д, 1H), 5,5 (м, 1H), 3,5 (м, 1H).

Стадия D

770 мг соединения, полученного на стадии С, растворяли в смеси 2,38 мл бензола, 17,5 мл этанола и 2,38 мл концентрированной хлороводородной кислоты, и раствор нагревали с обратным холодильником в течение 16 часов, и упаривали в вакууме. Остаток вновь растворяли в 5 мл толуола, фильтровали и хроматографировали на колонке среднего давления с AgNO₃/SiO₂; (гептан:толуол = 10: 90), получив в результате 35 мг 4,4-тетраметилхолоста-8,14-диен-3-ола.

МС (молекулярный ион): 438,4.

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ) продукта показал характеристические сигналы при: 5,35 (с, широкий, 1H), 3,3 (дд, 1H).

¹³C-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ 100,6 МГц) показал характеристические сигналы при: 79,0 (C₃), 117,4 (C₁₅), 122,9 (C₈), 141,3 (C₉), 151,1 (C₁₄).

ПРИМЕР 9

Получение

4,4-диметилхолост-8(14)-ен-3 β-ола

580 мг 4,4-диметилхолост-8-ен-3β-ола растворяли в 20 мл диэтилового эфира и 20 мл уксусной кислоты. Добавляли 60 мг 10%-ного Pd/C катализатора и смесь перемешивали в течение ночи под водородом при 3,5 атм. Удаляли катализатор и фильтрат концентрировали до 10 мл, в результате чего началась кристаллизация. Добавляли 10 мл метанола и через 16 часов собирали кристаллы. Перекристаллизация из метанола дала 230 мг материала, который, как показали ¹H-¹³C-ЯМР-спектры был смесью 8(9)и 8(14)-изомеров.

Смесь вновь растворяли в 10 мл диэтилового эфира и 10 мл уксусной кислоты. Добавляли 75 мг 5%-ного Pt/C катализатора и смесь обрабатывали всю ночь водородом при атмосферном давлении. Удалив катализатор, выпаривали растворитель и кристаллический остаток растирали с 5 мл метанола, получив в результате 190 мг чистого 4,4-диметилхолост-8(14)-ен-3β-ола.

МС (молекулярный ион): 414,4.

¹³C-ЯМР-спектр (COCl₂, 100,6 МГц) показал характеристические сигналы при: 79,24 (C₃), 126,11 (C₈), 142,20 (C₁₄).

ПРИМЕР 10

Ооцитный тест для определения мейоз-индуцирующей активности соединений Животные

Незрелых самок мышей (B6D 2-F1, линия C57B1/2J) держали при регулируемых освещении (14 ч света, 10 ч темноты) и температуре с употреблением пищи и воды по желанию. Когда животные достигали массы 13-16 г (что соответствует возрасту 20-22 дня от роду, им делали одну инъекцию (внутрибрюшинно) человеческого менопаузального гонадотропина (Humegon, Organon, netherlands), содержащего приблизительно 20 ЕД FSH (фолликулостимулирующий гормон) и 20 ЕД LH (лютеинизирующий гормон) (Ziebe, S. et al. Hum. Reprod. 8 (1993) 385-88). Спустя 8 часов животных убивали путем цервикального (шейного) смещения.

Сбор и культивирование ооцитов

Яичники извлекали, помещали в НХ-среду (смотри ниже) и освобождали от внешней оболочки. Среда для сбора и культивирования состояла из минимальной среды Игла (Flow, США), содержащей 4 мМ гипоксантина, 3 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,23 мМ пирувата натрия, 2 мМ глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все Sigma, США). Эту среду называют НХ-средой. Такую же среду, но без гипоксантина использовали в качестве контрольной среды.

Антральные фолликулы яичников прокалывали иглой No 27 под препаровальной лупой. Отбирали заключенные в кумулус (совокупность оболочек) клетки (CEO) одинакового размера и промывали их три раза свежей НХ-средой.

Ооциты, освобожденные от клеток кумулуса, т.е. голые ооциты (DO) получали

путем осторожного пропускания CEO через пипетку с отверстием очень малого диаметра. CEO и DO культивировали в 4-луночных чашках (Nunclon, Дания), содержащих 0,5 мл НХ-среды, за исключением контроля, который культивировали в контрольной среде. Каждая лунка содержала 35-50 ооцитов. Культуральные среды содержали различные концентрации испытуемых соединений, как указано в таблице 5.

Чашки инкубировали при 37°C и 100%-ной влажности в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 час.

Анализ ооцитов

По окончании периода культивирования подсчитывали число ооцитов с зародышевым пузырьком (GV), с разрушенным зародышевым пузырьком (GVBD) и с полярным тельцем (PB) под инверсионным микроскопом с дифференциальной интерференционно-контрастной аппаратурой. Вычисляли процент ооцитов с GVBD от общего числа ооцитов и процент ооцитов с PB от GVBD. Результаты для DO и CEO, вычисленные в виде единиц активности MIS, приведены в таблице 5. Одну единицу активности MIS определяют как

$$\frac{\%GVBD}{Z} \text{ контр}$$

и число единиц активности MIS вычисляют как

$$Z \left(\frac{\%GVBD_{\text{исп}} - \%GVBD_{\text{контр}}}{\%GVBD_{\text{контр}}} \right)$$

ПРИМЕР 11

Гонадный тест для определения мейоз-индуцирующей активности соединений

Гонадный тест выполняли, по существу, так, как описано Byskov, A.G. et al. Mol. Reprod. Dev. 34 (1993) 47-52. Результаты, приведенные в таблице 6, оценивали полуквантитативно, как описано Westergaard, L. et al. Fertil. Steril. 41 (1984) 377-84.

ПРИМЕР 12

Получение моно

(5 α-холеста-8,14-диен)-3β-сукцината
0,50 г 5α-холеста-8,14-диен-3β-ола растворяли в 10 мл ТГФ, а затем добавляли 0,39 г янтарного ангидрида и 16 мг 4-диметиламинопиридина. Раствор нагревали с обратным холодильником в течение ночи и затем упаривали досуха. Остаток суспендировали в 10 мл воды, осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали, получив в результате 0,48 г целевого соединения, которое можно было дополнительно очистить путем растворения в смеси водного раствора гидрокарбоната натрия и этанола, добавления хлороводородной кислоты до pH 2 и затем сконцентрировать раствор с получением осадка.

Температура плавления: 128-131 °C

МС (молекулярный ион): 484,4

¹H-ЯМР-спектр (COCl₂, δ) продукта показал характеристические сигналы при: 5,36 (с, 1H), 4,75 (м, 1H), 2,67 (м, 2H), 2,6 (м, 2H)

¹³C-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ 100,6 МГц) показал характеристические сигналы при: 73,4, 117,1, 122,7, 140,0, 150,5, 171,2, 177,2.

ПРИМЕР 13

Получение

3 β-этоксикарбонилокси-5α-холеста-8,14-диен а

0,50 г 5α-холеста-8,14-диен-3β-ола растворяли в смеси 5 мл толуола и 5 мл пиридина с охлаждением в ледяной бане. Добавляли в течение 5 мин 2,3 мл этилхлорформата, растворенного в 5 мл толуола. Через 30 минут ледяную баню убирали и продолжали перемешивание 20 часов при комнатной температуре, а затем 2 часа при 60°C. Реакционную смесь упаривали досуха в вакууме и остаток растирали с 10 мл этанола, получив в результате 0,505 г целевого соединения, которое может быть дополнительно очищено путем перекристаллизации из этанола.

Температура плавления: 101-106 °C

МС (молекулярный ион): 456,3

¹H-ЯМР-спектр (COCl₂, δ) продукта показал характеристические сигналы при: 5,30 (с, 1H), 4,50 (м, 1H), 4,12 (кв, 2H), 1,24 (т, 3H).

¹³C-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ 100,6 МГц) показал характеристические сигналы при: 62,6, 116,6, 122,2, 139,4, 150,0, 153,6.

ПРИМЕР 14

Получение

3 β-фосфоноксо-4,4-диметил-5α-холеста-8,14-диена
2,00 г

4,4-диметил-5-холеста-8,14-диен-3 β-ола растворяли в 10 мл сухого пиридина и полученный раствор добавляли к раствору 1,66 мл оксихлорида фосфора в течение 5 минут при охлаждении в ледяной бане. После перемешивания при комнатной температуре в течение 30 минут осадок отфильтровывали и промывали сухим ацетоном. Остаток суспендировали в 70 мл воды и нагревали с обратным холодильником в течение 1 1/4 часа. После охлаждения при комнатной температуре осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали с получением 0,93 г неочищенного продукта. 0,70 г неочищенного продукта растворяли в 75 мл 0,1 М водного раствора гидроксида калия и раствор фильтровали через 10 г смолы Амберлит 1R-120(H) и упаривали в вакууме досуха. Остаток растирали с 10 мл воды и, отфильтровав осадок, промывали его водой и высушивали, получив в результате 0,48 г целевого соединения.

Температура плавления: 183-185 °C

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃ + 2 капли CD₃OD) продукта показал характеристические сигналы при: 5,36 (с, 1H), 3,89 (м, 1H).

¹³C-ЯМР-спектр (CDCl₃ + 2 капли CO₃OD, 100,6 МГц) продукта показал характеристические сигналы при: 85,1, 116,9, 122,3, 140,9, 150,5.

ПРИМЕР 15

Получение

3 β-изоникотиноил-5 α-холеста-8,14-диена
0,50 г 5α-холеста-8,14-диен-3β-ола растворяли в 5 мл пиридина, а затем добавляли 1,16 г изоникотиноилхлоридгидрохлорида.

Суспензию нагревали с обратным холодильником в течение ночи и упаривали досуха. Остаток суспендировали в 100 мл воды при охлаждении в ледяной бане. Осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали, получив в результате 0,97 г

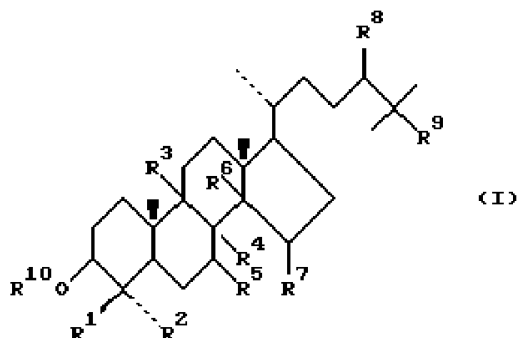
неочищенного продукта, который перекристаллизовывали из смеси ацетон-вода с получением 0,40 г целевого соединения. Температура плавления: 129-131 °C

^1H -ЯМР-спектр (COCl_2 , δ) продукта показал характеристические сигналы при: 8,77 (д, 2H), 7,84 (д, 2H), 5,39 (с, 1H), 4,49 (м, 1H).

^{13}C -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ 50,3 МГц) показал характеристические сигналы при: 75,0, 117,7, 122,8, 123,3, 138,0, 140,3, 150,5, 150,9, 164,6.

Формула изобретения:

1. Средство для стимуляции мейоза, представляющее собой стеринны общей формулы (I)



где R^1 и R^2 независимо выбирают из водорода, неразветвленного или разветвленного $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила, необязательно замещенного галогеном или гидроксигруппой, или R^1 и R^2 совместно с атомом углерода, к которым они присоединены, образуют циклопентановое или циклогексановое кольцо;

R^3 и R^4 вместе образуют дополнительную связь между атомами углерода, к которым они присоединены, причем в этом случае R^5 представляет собой водород и R^6 и R^7 либо представляют собой водород, либо вместе образуют дополнительную двойную связь между атомами углерода, к которым они присоединены, или

R^5 и R^4 вместе образуют дополнительную связь между атомами углерода, к которым они присоединены, причем в этом случае R^3 представляет собой водород и R^6 и R^7 либо представляют собой водород, либо вместе образуют дополнительную связь между атомами углерода, к которым они присоединены, или

R^6 и R^4 вместе образуют дополнительную связь между атомами углерода, к которым они присоединены, причем в этом случае R^3 , R^5 и R^7 представляют собой водород;

R^8 и R^9 представляют собой водород или вместе образуют дополнительную связь между атомами углерода, к которым они присоединены;

R^{10} представляет собой водород или ацильную группу, сульфонильную группу или фосфонильную группу, или группу, которая вместе с остальной частью молекулы образует простой эфир.

2. Средство по п. 1, в котором R^1 представляет собой водород или метил.

3. Средство по п. 1, в котором R^1 выбирают из этила и неразветвленного и

разветвленного $\text{C}_3\text{-C}_6$ алкила.

4. Средство по п. 1, в котором R^1 представляет собой неразветвленную или разветвленную гидроксильную группу, имеющую до шести атомов углерода.

5. Средство по п. 1, в котором R^1 представляет собой неразветвленную или разветвленную α -гидроксильную группу, имеющую до шести атомов углерода.

6. Средство по п. 1, в котором R^1 представляет собой неразветвленную или разветвленную алкильную группу, замещенную галогеном.

7. Средство по п. 1, в котором R^1 представляет собой трифторметил.

8. Средство по п. 1, в котором R^2 представляет собой водород или метил.

9. Средство по п. 1, в котором R^2 выбирают из этила и неразветвленного и разветвленного $\text{C}_3\text{-C}_6$ алкила.

10. Средство по п. 1, в котором R^2 представляет собой неразветвленную или разветвленную гидроксильную группу, имеющую до шести атомов углерода.

11. Средство по п. 1, в котором R^2 представляет собой неразветвленную или разветвленную α -гидроксильную группу, имеющую до шести атомов углерода.

12. Средство по п. 1, в котором R^2 представляет собой неразветвленную или разветвленную алкильную группу, замещенную галогеном.

13. Средство по п. 1, в котором R^2 представляет собой трифторметил.

14. Средство по п. 1, в котором R^1 и R^2 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклопентановое кольцо.

15. Средство по п. 1, в котором R^1 и R^2 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклогексановое кольцо.

16. Средство по п. 1, в котором R^3 и R^4 вместе образуют дополнительную связь между атомами углерода, к которым они присоединены, и R^5 представляет собой водород.

17. Средство по п. 1, в котором R^5 и R^4 вместе образуют дополнительную связь между атомами углерода, к которым они присоединены, и R^3 представляет собой водород.

18. Средство по п. 1, в котором R^6 и R^4 вместе образуют дополнительную связь между атомами углерода, к которым они присоединены, и R^3 , R^5 и R^7 представляют собой водород.

19. Средство по п. 1, в котором R^6 и R^7 представляют собой водород.

20. Средство по п. 1, в котором R^6 и R^7 вместе образуют дополнительную связь между атомами углерода, к которым они присоединены.

21. Средство по п. 1, в котором R^8 и R^9 представляют собой водород.

22. Средство по п. 1, в котором R^8 и R^9 вместе образуют дополнительную связь между атомами углерода, к которым они присоединены.

23. Средство по п. 1, в котором

R¹ представляет собой водород.

24. Средство по п. 1, в котором R¹⁰ представляет собой ацильную группу, являющуюся производной кислоты, имеющей 1-20 атомов углерода.

25. Средство по п. 24, в котором R¹⁰ представляет собой ацильную группу, выбираемую из ацетила, бензоила, пивалоила, бутирила, никотиноила, изоникотиноила, гемисукциноила, гемиглутариола, бутилкарбамоила, фенилкарбамоила, бутоксикарбонилла, трет-бутоксикарбонилла и этоксикарбонилла.

26. Средство по п. 1, в котором R¹⁰ представляет собой алкильную, аралкильную, алкилоксиалкильную или алканоилоксиалкильную группу, содержащую в сумме до 10 атомов углерода, предпочтительно до 8 атомов углерода, которая вместе с остальной частью молекулы образует простой эфир.

27. Средство по п. 26, в котором R¹⁰ представляет собой метоксиметильную или пивалиолиоксиметильную группу.

28. Средство по п. 1, в котором R¹⁰ представляет собой сульфонильную группу.

29. Средство по п. 1, в котором R¹⁰ представляет собой фосфонильную группу.

30. Средство по п. 1, представляющее собой

4,4-диметил-5 α -холеста-8,14,24-триен-3 β -ол.

31. Средство по п. 1, представляющее собой

4,4-диметил-5 α -холеста-8,24-диен-3 β -ол.

5 32. Способ стимуляции мейоза в половой клетке млекопитающего, включающий обработку половой клетки эффективным количеством средства по любому из пп. 1-31.

33. Способ по п. 32, в котором стимулирующее мейоз средство

10 представляет собой

4,4-диметил-5 α -холеста-8,14,24-триен-3 β -ол.

34. Способ по п. 32, в котором стимулирующее мейоз средство

15 представляет собой

4,4-диметил-5 α -холеста-8,24-диен-3 β -ол.

35. Способ по любому из пп. 32-34, в котором половую клетку обрабатывают средством по любому из пп. 1-31 путем введения указанного средства млекопитающему, содержащему указанную половую клетку.

20 36. Способ по любому из пп. 32-35, в котором половой клеткой является ооцит.

37. Способ по п. 36, в котором ооцит обрабатывают средством по любому из пп. 1-31 ex vivo.

25 38. Способ по любому из пп. 32-35, в котором половой клеткой является мужская половая клетка.

Приоритет по пунктам:

23.06.1994 - по пп. 1-31;

09.03.1995 - по пп. 32-38.

30

35

40

45

50

55

60

Таблица 1

Углерод	Зимостерин	Ланостерин	MIS
1	35,1	35,5	35,8
2	31,5	27,8	28,0
3	70,9	79,0	79,0
4	38,2	38,9	38,9
5	40,7	50,4	50,2
6	25,5	18,2	18,4
7	27,1	26,5	28,5
8	128,0	134,4	128,0
9	134,8	134,4	135,8

RU 2194510 C2

RU 2194510 C2

RU 2194510 C2

Продолжение табл.1

10	35,6	37,0	37,0
11	22,8	21,0	22,1
12	36,9	30,9	29,7
13	42,0	44,4	42,1
14	51,8	49,8	51,9
15	23,7	30,8	23,8
16	28,7	28,2	28,8
17	54,7	50,4	54,8
18	11,2	15,7	11,3
19	17,8	19,1	19,8
20	36,0	36,2	36,0
21	18,6	18,6	18,6
22	36,0	36,3	36,1
23	24,7	24,9	24,8
24	125,0	125,2	125,2
25	130,6	130,9	130,9
26	17,6	17,6	17,6
27	25,7	25,7	25,7
28		15,4	15,4
29		27,9	27,9
30		24,2	

RU 2194510 C2

Таблица 2

m/z	Интерпретация	MIS	Ссылка 1	Ссылка 2
412	$[M]^+$	100	100	+
397	$[M-CH_3]^+$	60	42	+
379	$[M-CH_3-H_2O]^+$	24	17	+
301	$[M-SC]^+$	11	-	+
299	$[M-SC-2H]^+$	22	13	-
274	$[M-SC-C_2H_3]^+$	8	8	-
259	$[M-SC-C_3H_6]^+$	21	33	+
241	$[M-SC-C_3H_6-H_2O]^+$	44	33	+

SC = боковая цепь, C_2H_3 = положения 16 и 17, C_3H_6 = положения 15, 16 и 17.

Ссылка 1: Baloch et al. Photochemistry 23 (1984) 2219.

Ссылка 2: Morimoto et al. Liebigs Ann. Chem. 708 (1967) 230.

Таблица 3

m/z	Интерпретация	
410	=M	$[M]^+$ (Mw для FF-MIS)
395	M-15	$[M-CH_3]^+$
392	M-18	$[M-H_2O]^+$
377	M-33	$[M-CH_3-H_2O]^+$
349	M-61	$[M-43-H_2O]^+$
381	M-129	$[M-SC-H_2O]^+$ (SC = 111)
279	M-131	$[M-SC-2H-H_2O]^+$
257	M-153	$[M-SC-42]^+$
255	M-155	$[M-154-H]^+$
239	M-171	$[M-SC-42-H_2O]^+$

SC - боковая цепь.

Таблица 4

m/z	Интерпретация	
398	=M	$[M]^+$ (Mk для 4 β -метилзимостерина)
383	M-15	$[M-CH_3]^+$
380	M-18	$[M-H_2O]^+$
365	M-33	$[M-CH_3-H_2O]^+$
269	M-129	$[M-SC-H_2O]^+$ (SC = 111)
267	M-131	$[M-SC-2H-H_2O]^+$
245	M-153	$[M-SC-C_3H_6]^+$
227	M-171	$[M-SC-C_3H_6-Hp_2O]^+$
213		$[M-SC-C_4H_8-H_2O]^+$

SC = боковая цепь.

RU 2194510 C2

RU 2194510 C2

Таблица 5

Соединение	DO	CEO	Концентрация, мкг/мл
4,4-Диметилзимостерин	2,7	2,9	1,2
	1,8	2,7	0,3
	0,6	1,3	0,2
	1,5	1,3	0,02
	0,9	1,0	0,002
4,4-Диметил-5 α -холеста-	0,6	2,3	0,3
8,14,24-триен-3 β -ол	1,6	0,5	0,03
Зимостерин	1,2	1,1	0,1
	0,6	0,4	0,01
		0,2	0,001
4 β -Метилзимостерин	6,2	3,5	3,9
	0,8	2,4	0,13
4,4-Диметилхолест-8-ен-3 β -ол	0,8	12,8	0,03
4,4-Диметилхолеста-8,14-	2,25	0	3,0
диен-3 β -ол			

Таблица 6

Соединение	Концентрация, мкг/мл	Результат
4,4-Диметил- зимостерин	10	++
4,4-Диметил-5 α - холеста-8,14,24- триен-3 β -ол	30	+