



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **51 622** ⁽¹³⁾ **C2**
(51)МПК ⁷ **A 61K 31/575 A, A 61P 15/00**
B, A 61B 17/43 B

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 96124771, 23.06.1995
(24) Дата начала действия патента: 16.12.2002
(30) Приоритет: 23.06.1994 DK 0753/94
09.03.1995 DK 0241/95
(46) Дата публикации: 15.12.2002
(86) Заявка РСТ:
РСТ/DK95/00265, 19950623

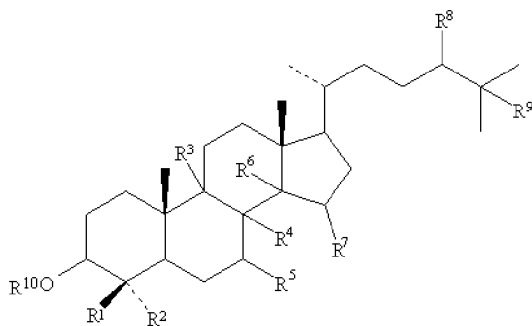
(72) Изобретатель:
Бисков Анне Грете, DK,
Андерсен Клаус Идинг, DK,
Нордхольм Ларс, DK,
Тьогерсен Хеннинг, DK,
Вассманн Оле, DK,
Дирс Иван Вернер, DK,
Гуддал Ерлинг, NO
(73) Патентовладелец:
НОВО НОРДИСК А/С, DK

(54) ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ РЕГУЛИРОВАНИЯ МЕЙОЗА

(57) Реферат:

Некоторые стериды, которые могут быть экстрагированы из бычьих семенников и из человеческой фолликулярной жидкости, и химически родственные стериды могут быть использованы для регулирования мейоза в половых клетках.

Официальный бюллетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2002, N 12, 15.12.2002. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.





(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **51 622** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61K 31/575 A, A 61P 15/00**
B, A 61B 17/43 B

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 96124771, 23.06.1995

(24) Effective date for property rights: 16.12.2002

(30) Priority: 23.06.1994 DK 0753/94
09.03.1995 DK 0241/95

(46) Publication date: 15.12.2002

(86) PCT application:
PCT/DK95/00265, 19950623

(72) Inventor:

Biscov Anne Grete, DK,
Andersen Claus Iding, DK,
Nordholm Lars, DK,
Tiogersen Henning, DK,
Vassmann Ole, DK,
Diers Ivan Verner, DK,
Guddal Erling, NO

(73) Proprietor:

NOVO NORDISK A/C, DK

(54) **DRUG FOR CONTROLLING MEIOSIS**

(57) Abstract:

Certain sterols extracted from bull testes and from human follicular fluid and chemically related sterols can be used for regulating the meiosis in oocytes and in male germ cells.

]

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2002, N 12, 15.12.2002. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** (11) **51 622** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **A 61K 31/575 A, A 61P 15/00**
B, A 61B 17/43 B

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
96124771, 23.06.1995

(24) Дата набуття чинності: 16.12.2002

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької
конвенції : 23.06.1994 DK 0753/94
09.03.1995 DK 0241/95

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 15.12.2002

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки
відповідно до договору РСТ:
PCT/DK95/00265, 19950623

(72) Винахідник(и):

Бісков Анне Грете , DK,
Андерсен Клаус Ідінг , DK,
Нордхольм Ларс , DK,
Тьогерсен Хеннінг , DK,
Вассманн Оле , DK,
Дірс Іван Вернер , DK,
Гуддал Ерлінг , NO

(73) Власник(и):

НОВО НОРДІСК А/С, DK

(54) ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ ДЛЯ РЕГУЛЮВАННЯ МЕЙОЗУ

(57) Реферат:

Деякі стерини, екстраговані з бичачих
сім'яників та з фолікулярної рідини людини, а

також хімічно споріднені до них стерини можуть
використовуватись для регулювання мейозу в
статевих клітинах.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к некоторым производным стерина и к их применению в качестве лекарственных средств.

В частности, было обнаружено, что некоторые производные стерина могут быть использованы для регулирования мейоза.

Предпосылки создания изобретения

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 половитну количества(1n) хромосом и 2с ДНК. Второе мейотическое деление происходит без синтеза ДНК. Это деление, таким образом, приводит к образованию гаплоидных половых клеток только с 1с 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(дикиатное 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]

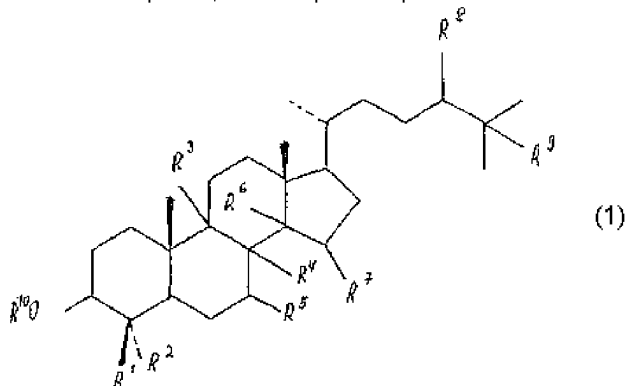
Яичником плодной мыши, в котором проходил мейоз, было скретировано мейоз - индуцирующее вещество(MIS), а из морфологически дифференцированного семенника с оставшимися, немейотическими половыми клетками было выделено мейоз - предотвращающее вещество(MPS). Было предположено, что относительные концентрации MIS и MPS регулировали начало, остановку и возобновление мейоза в мужских и женских половых клетках [Byskov, A. G. et. al. in the Physiologi of Reproduction(eds. Knobil, E. and Neill, J. D., Raven Press, New Yark(1994)].

Очевидно, что если мейоз можно регулировать, что можно управлять размножением. К сожалению до сих пор невозможно идентифицировать мейоз - индуцирующее вещество.

Краткое изложение существа изобретения

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

Таким образом, настоящее изобретение относится к соединению общей формулы(1)



где R^1 и R^2 независимо выбраны 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 представляют дополнительную связь между углеродными атомами, к которым они присоединены, и в этом случае R^5 представляет водород и R^6 и R^7 либо представляют водород, либо вместе представляют дополнительную связь между углеродными атомами, к которым они присоединены, или

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

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

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

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

Настоящее изобретение касается также новых соединений общей формулы(1).

В настоящем контексте выражение "регулирование 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(1) в регулировании мейоза.

И еще настоящее изобретение относится к способу регулирования мейоза в половой клетке млекопитающего, включающему введение эффективного количества соединения приведенной выше общей формулы(1) в половую клетку, нуждающуюся в таком лечении.

Подробное описание изобретения

Было обнаружено, что мейоз - индуцирующие вещества, экстрагированные как из бычьих семенников, так и из фолликулярной жидкости человека, способны вызывать возобновление мейоза в культивируемых ооцитах мыши(ооцитный тест), а также стимулировать мейоз в мужских половых клетках культивируемых семенников плодной мыши(гонадный тест). Мейоз - индуцирующее вещество вырабатывается зрелыми семенниками различных млекопитающих, включая мужчину, а также обнаружено в зрелых яичниковых фолликулах некоторых видов млекопитающих, включая женщину. Из примеров 1 и 2 видно, что мейоз - индуцирующим веществом, найденным в бычьих семенниках, является 4,4-диметилзимостерин, а мейоз - индуцирующим веществом, обнаруженным 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 создателям настоящего изобретения, до сих пор еще соединения общей формулы(1) не нашли практического применения в медицине. В частности, соединения общей формулы(1) до сих пор еще не были использованы в качестве лекарственных средств для регулирования мейоза.

Существует несколько видов влияния на мейоз. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения соединения общей формулы(1) используют для стимуляции мейоза. В соответствии с другим предпочтительным вариантом настоящего изобретения соединения общей формулы(1) используют для стимуляции мейоза у людей. Так, соединения формулы(1) много обещают как новые средства регулирования плодovitости без обычных побочных эффектов на соматические клетки, которые известны из 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 доцитах, 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 культивируемых 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(1) может быть использовано для лечения некоторых случаев бесплодия у самок, включая женщину, 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 социты, мейоз - индуцирующего вещества общей формулы(1).

Кроме того, при бесплодии у самцов(включая мужчин), вызванном недостаточным собственным вырабатыванием мейоз - индуцирующего вещества, введение мейоз - индуцирующего вещества общей формулы(1) может смягчить проблему.

Введение композиций, содержащих соединения формулы(1), 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(1) 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(1) 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 регулирования 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, низкоплавящиеся 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 *ex vivo* и *in vitro*. Жидкие композиции могут содержать другие компоненты, традиционно используемые в данной области техники, некоторые из которых упомянуты в приведенном выше перечислении.

Далее, композиция для чрезкожного 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 (1) 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,
5 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,

10 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,
15 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,

20 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,
25 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,

30 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
35 и их сложные и простые эфиры.

Предпочтительными сложными эфирами формулы(1) являются те, в которых R¹⁰ представляет 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 стеринным скелетом. Когда R¹⁰ представляет 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 еще более 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(1) являются те, в которых R¹⁰ представляет метильную, метоксиметильную, бензильную или пивалоилоксиметильную группу.

Соединения по настоящему изобретению, встречающиеся в природе, могут быть получены из природных источников известными сами по себе способами. В соответствии с другим вариантом их можно - подобно родственным структурно синтетическим стеринам по настоящему изобретению - получить путем синтеза известными как таковыми способами.

Далее настоящее изобретение проиллюстрировано на следующих примерах, которые не следует считать ограничивающими объем защиты. Признаки, раскрытые в предшествующем описании, и в следующих далее примерах, могут служить - отдельно или в любом их сочетании - материалом для реализации изобретения в различных его видах.

Примеры

Пример 1.

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

65 Семенники шестилетнего старого быка(Danish Landrace) были извлечены сразу же после убоя. Удалив белочную оболочку, текстикулярную ткань поместили на сухой лед и хранили при -80°C, Замороженную

тестикулярную ткань(92г) измельчали на кусочки менее 1мм и подвергали лиофильной сушке(вымораживанием) в темноте до полного высыхания(приблизительно 90ч). Лиофилизированную ткань экстрагировали 400мл н-гептана [Lichrosolv, Merck 4390, Германия] под азотом с перемешиванием в течение 24ч при 20°С. Суспензию фильтровали и твердый материал экстрагировали еще раз так же, как описано выше.

Объединенные органические фазы упаривали досуха на роторном испарителе при комнатной температуре, получив в результате 981мг экстрагированного материала. Этот материал растворяли в н-гептане и распределяли по 15 пробиркам, из которых выпаривали н-гептан. Пробирки хранили под азотом при 4°С в темноте.

Для экстрактов использовали трехслойную очистку путем ВЭЖХ(высокоэффективная жидкостная хроматография):

На первой стадии содержимое одной пробирки растворяли в 50мкл 50%-ного(объем/объем) тетрагидрофурана(ТГФ) в воде и переносили на колонку для обращенно - фазовой ВЭЖХ(Lichro Spher 100 RP-8, заглушенная, 5мкм 250 x 4мм вн. диаметр, Merck). Элюирование осуществляли при 40°С с использованием линейного градиента ТГФ, проходящего от 50% до 100% за 15мин(расход: 1мл/мин). Собирали 18 фракций по 1мл и испытывали их на MIS - активность.

На второй стадии фракции с первой стадии, которые были найдены активными при социтном тесте, растворяли в 50 - 100мкл 70%-ного ТГФ и переносили на колонку, аналогичную той, что была использована на первой стадии. Элюирование осуществляли при 40°С с использованием линейного градиента ТГФ, проходящего от 60% до 78% за 16минут(Расход: 1мл/мин). Собирали 8 фракций по 1мл и испытывали их на MIS - активность.

На третьей стадии фракции с второй стадии, которые были найдены активными при социтном тесте, растворяли в 100мл смеси и н-гептан: 2-пропанол(98 : 2, объем/объем) и переносили на колонку для полупрепаративной ВЭЖХ(Chrom Spher Si 5мкм, 250 x 10мм вн. диаметр, Chrompack) Элюирование осуществляли при комнатной температуре с использованием подвижной фазы, состоящей из смеси н-гептан: 2-пропанол, 98 : 2(объем/объем) (расход: 5мл/мин). Собирали 5 фракций по 2,5мл и испытывали их на MIS - активность.

На всех стадиях элюирование контролировали УФ - детектированием при 220нм.

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 1мг очищенного материала растворяли в 0,6мл дейтерохлороформа. Расщепленный ЯМР - спектр на протоне ¹³C-1H-ЯМР - спектр(с увеличением разрешения или без) и 2D TOCSV - спектр были записаны на ЯМР - спектрометре Druker AMX2 400, снабженном инверсной широкополосной 5мм 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 [Taulor. V. t. et. al. J. Lipid Res. 22(1981) 171] и ланостерина [Emmons, G. T. et. al. Magn. Res. Chem. 27(1989) 1012].

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
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	

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 Instruments) и с системой ВЭЖХ, содержащей колонку(Chrompack), ChromSpher Si, 3мкм, 100 х 4,6мм. ВЭЖХ осуществляли при комнатной температуре с использованием смеси н-гептан: 2-пропанол, 98 : 2(объем/объем) в качестве подвижной фазы(расход: 0,6мл/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.

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 ₂ O] ⁺	24	17	+
301	[M-SC] ⁺	11	-	+
299	[M-SC-2H] ⁺	22	13	-
274	[M-SC-C ₂ H ₃] ⁺	8	8	-
259	[M-SC-C ₃ H ₆] ⁺	21	33	+
241	[M-SC-C ₃ H ₆ -H ₂ O] ⁺	44	33	+

SC = боковая цепь, C₂H₃ = положения 16 и 17, C₃H₆ = положения 15, 16 и 17.

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

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

На основа ¹³C-ЯМР-спектра и молекулярной массы 412, определенной путем масс - спектроскопии(МС), было предположено, что структура MIS, выделенного из бычих семенников, представляет собой 4,4-диметил-5 α -холесте-8,24-диен-3 β -ол, также обозначенный как 4,4-диметилзимостерин(OMZ). 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.

Человеческую фолликулярную жидкость(FF) получали из фолликулов, отсосанных для сбора доцитов при лечении бесплодия путем оплодотворения in vitro. Жидкость лиофилизировали и экстрагировали н-гептаном и экстракт очищали, используя такие же продукты, как описанные в примере 1. Соединение активного пика имело молекулярной ион с m/z = 410 и масс - спектр показал, что химическая структура молекулы FF-MIS - 4,4-диметил-5 α -(холеста-8,14,24-триен-3 β - ол.

Методы: 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 Instruments), соединенного с системой прямофазной ВЭЖХ, содержащей колонку(Chrompack), ChromSpher Si, 3мкм, 100 х 4мм в.д. и смесь н-гептан: 2-пропанол: метанол: аммиак(68 : 30 : 2 : 0,2) в качестве подвижной фазы(расход: 0,5мл/мин). Образец вводимого MIS растворяли в н-гептане. Масс - спектрометр работал в режиме электронного удара. Результаты даны в таблице 3.

Таблица 3		
M/z	Интерпретация	
410	= M	[M] ⁺ (Mw для FF-MIS)
395	M-15	[M-CH ₃] ⁺
392	M-18	[M-H ₂ O] ⁺
377	M-33	[M-CH ₃ -H ₂ O] ⁺
349	M-61	[M-43-H ₂ O] ⁺
381	M-129	[M-SC-H ₂ O] ⁺ (SC = 111)

279	M-131	[M-SC-2H-H ₂ O] ⁺
257	M-153	[M-SC-42] ⁺
255	M-155	[M-154-H] ⁺
239	M-171	[M-SC-42-H ₂ O] ⁺

SC = боковая цепь.

Пример 3

Получение 4β-метилзимостерина путем ферментации.

Стадия А

Штамм дрожжей *Kluuyeromyces bulgaricus* A3410 засеивали на скошенный агар УРГ и выращивали 3дня при 30°С в термостатированном инкубаторе. Добавляли в скошенный агар 5мл стерильной среды УЕ и дрожжевые колонии суспендировали в жидкой среде путем взбалтывания пробирки на вихревом смесителе. Затем суспензию клеток засасывали в 5мл стерильный шприц и вводили в колбу для взбалтывания с двумя отражателями на дне. Колба содержала 200мл среды ZYM.

Колба закрепляли на вращающемся столе и обеспечивали размножение дрожжей в течение 24часов при 250об/мин, 30°С. Добавляли в колбу 0,4мл стерильного профильтрованного раствора амфотерицина В и продолжали размножение еще 25часов. Дрожжевые клетки собирали путем центрифугирования(Модель 6 Бекмана, 5°С, 10мин, 4000об/мин) и промывали один раз в воде. Суспензию клеток закрывали в небольшом пластмассовом контейнере и хранили при -18°С до окончательной экстракции стеринов.

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

Агар УРГ	
Дрожжевой экстракт	4г
KH ₂ PO ₄	1г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5г
Глюкоза	15г
Агар	20г
Деионизированная вода	1000 мл

pH регулировали до 5,8 перед автоклавированием при 121°С, 20мин.

Среда УЕ	
Дрожжевой экстракт	10г
Деионизированная вода	1000мл
Автоклавирование 121°С, 20мин	
Среда ZYM	
Дрожжевой экстракт, Difco	20г
Пептон, Bacto	10г
Водопроводная вода	1000мл

pH регулировали до 6,5 - 6,6 перед автоклавированием при 121°С, 20мин. Глюкоза(добавляли отдельно после автоклавирования) 60г.

Раствор амфотерицина В

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

Стадия В

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

Стадия С

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

Колонка: Lich vo Sorb DIOL 10мкм, 250 x 4мм внут. диаметр(Merck)

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

Расход: 1,1мл/мин, 20°С

Детектирование: УФ при 220нм

От нескольких проходов собирали пиковые фракции после 6,8мин элюирования. Собранные фракции объединяли и выпаривали растворитель, что дало остаток, который подвергали масс - спектрометрии и социтному тесту.

Данные масс - спектра, приведенные в таблице 4, идентичны с данными для 4В-метилзимостерина, зарегистрированными в библиотеке Национального бюро стандартов.

Таблица 4

n/z	Интерпретация
398	= M [M] ⁺ (Mw для 4β-метил зимостерина)
383	M-15 [M-CH ₃] ⁺
380	M-18 [M-H ₂ O] ⁺
365	M-33 [M-CH ₃ -H ₂ O] ⁺
269	M-129 [M-SC-H ₂ O] ⁺ (SC = 111)
267	M-131 [M-SC-H ₂ O-2H] ⁺
245	M-153 [M-SC-C ₃ H ₆]
227	M-171 [M-SC-C ₃ H ₆ -Hp2O] ⁺
213	M-185 [M-SC-C ⁴ H ₈ -H ₂ O] ⁺

SC = боковая цепь.

Пример 4 Получение 4,4-диметилхолеста-8,14-диен-3β-ола

Это соединение было получено так, как описано by Schroepfer et al.; Chem; Stry and Physics of Lipids 47(1988) 187, и показали такие физические константы, какие описаны в литературе.

Пример 5

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

Стадия А

В 20мл пиридина растворяли при 0°С 2,48г 4,4-диметилхолеста-8,14-диен-3β-ола(пример 4). К полученному раствору добавляли 1,7г бензоилхлорида и смесь перемешивали при окружающей температуре всю ночь. После упаривания досуха добавляли 25мл толуола и после стандартной водной обработки, упаривания и растирания с ацетоном получили 2,3г(74%) кристаллического бензоата.

¹Н-ЯМР-спектр(CD CL₃, δ) показал характеристические сигналы при: 8,1(д, 2Н), 7,55(т, 1Н), 7,4(т, 2Н), 5,4(с, широкий, 1Н), 4,2(дд, 1Н).

Стадия В

В 50мл ТГФ растворяли 2,04г 3-бензоилокси-4,4-диметилхолеста-8,14-диена(стадия А) и добавляли по каплям при 0°С 360мл 1М раствора борана в ТГФ. Смесь перемешивали при окружающей температуре всю ночь, охлаждали до 0°С и добавляли к ней по каплям 140мл воды, а затем добавляли 360мл 10%-ного гидроксида натрия и 378мл 30%-ного пероксида водорода. После перемешивания в течение 90минут к смеси добавляли 100мл 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 0,62г 3-бензоилокси-4,4-диметилхолест-8-ен-15-ола. МС(молекулярный ион): 534,4.

¹Н-ЯМР-спектр(CD CL₃, δ) показал характеристические сигналы при: 8,0(д, 2Н), 7,5(т, 1Н), 7,4(т, 2Н), 4,75(м, 1Н), 4,1(м, 1Н).

Стадия С

В 2,7мл пиридина при 0°С растворяли 0,54г 3-бензоилокси-4,4-диметилхолест-8-ен-15-ола и к полученному раствору осторожно добавляли 33мг диметиламинопиридина и 287мг фенолхлортиоформата. Смесь перемешивали 20часов при окружающей температуре. После добавления 25мл диэтилового эфира смесь промывали браз насыщенным раствором сульфата меди, водой, дважды 10%-ным гидроксидом натрия, водой и рассолом и упаривали с получением 0,68г неочищенного 3-бензоил-4,4-диметилхолест-8-ен-15-фенилтиокарбоната, который дополнительно обрабатывали путем растворения в 20мл толуола и обработки 370мг гидроксида трибутилолова и 20мг азоизобутиронитрила. Смесь нагревали при 90°С в течение 20минут и повторяли ту же самую обработку. После упаривания смесь подвергали грубой очистке путем хроматографии на SiO₂(гептан : метилхлорид = 70 : 30) и в результате получили 150мг сырого 3-бензоилокси-4,4-диметилхолест-8-ена с примесью соответствующего 8,14-диена(стадия А).

Стадия D

В 2мл метилхлорида, охлажденного до 0°С, растворяли 150мг смеси, полученной на стадии С. Добавляли по каплям 0,7мл диизобутилалюминийгидрида и через 15минут осторожно добавляли 0,15мл воды. Затем добавляли 25мл диэтилового эфира и органическую фазу промывали насыщенным раствором виннокислого калий-натрия два раза, водой и рассолом и упаривали с получением 130мг смеси, которую подвергали хроматографии на смеси AgNO₃/SiO₂ U2 [полученной так, как описано в Chem. 2 Phys. Of Lipids 63(1992) 115] с элюированием толуолом. Кристаллизация из смеси эфир-метанол дала 49мг целевого соединения. Температура плавления: 154 - 155°С. МС(молекулярный ион): 414,4.

¹³С-ЯМР-спектр(CD CL₃ 100,6МГц) показал характеристические сигналы при: 78,49(C₃), 127,49(C₈), 135,35(C₉).

Пример 8

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

В 7,5мл пиридина и 7,5мл уксусного ангидрида растворяли 1,3г 4,4-диметилхолеста-8,14-диен-3-ола [Schroepfer et al.; Chem; stru and Phys 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 300мл элюата упаривали и продукт кристаллизовали из диэтилового эфира с получением 140мг 3-ацетокси-8,14-диметилхолестадиена.

Температура плавления: 120 - 125°C(с разложением). МС(молекулярный ион): 454,4.

¹H-ЯМР-спектр(CD CL₃ δ) оказал характеристические сигналы при: 5,4(с, широкий, 1H), 4,5(дд, 1H), 2,0(с, 3H).

Пример 7

Получение холеста-8,14-диен-3В-ола

В смеси 2,7мл бензола, 19мл этанола и 2,7мл концентрированной хлороводородной кислоты растворяли 770мг дегидрохолестерина и раствор нагревали при температуре кипения с обратным холодильником в течение 3часов. Смесь охлаждали на ледяной бане, получив в результате первый сбор(110мг) кристаллов. Выпаривание фильтрата досуха и кристаллизация из смеси эфир/метанол дали второй сбор(220мг) кристаллов, который объединяли с первым сбором и хроматографировали на смеси AgNO₃/SiO₂(полученной так, как описано в примере 5, стадия D) с элюированием 2,5%-ным ацетоном в толуоле, получив в результате 94мг чистого холеста-8,14-диен-3В-ола. Температура плавления: 113 - 114,5°C МС(молекулярный ион): 384,4.

¹H-ЯМР-спектр(CD CL₃, δ) ородукта показал характеристические сигналы при: 5,35(с, широкий, 1H), 3,6(м, 1H).

¹³C-ЯМР-спектр(CD CL₃ 50,3МГц) показал характеристические сигналы при: 70,99(C₃), 117,42(C₁₅), 123,1(C₈), 140,8(C₉), 151,1(C₁₄).

Пример 8

Получение 4,4-тетраметиленхолеста-8,14-диен-3-ола

Стадия А

В 15мл 2-бутанола растворяли 1,15г дегидрохолестерина, добавляли 0,34г изопропоксида алюминия и смесь нагревали при температуре кипения с обратным холодильником в течение 75минут. Охладив смесь на ледяной бане, добавляли 15мл в 2 н.хлороводородной кислоты, разделяли фазы и органическую фазу промывали два раза 7,5мл 2 н.хлороводородной кислоты. Водную фазу экстрагировали толуолом и объединенные органические фазы промывали водой и рассолом, сушили и упаривали с получением 1,18г 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(д,д, 1H).

Стадия В

В 16мл трет-бутанола при 45°C растворяли 0,67г трет-бутоксид калия, добавляли 0,57г холеста-5,7-диен-3-она и смесь перемешивали 10минут. Добавляли 0,47г 1,4-динодбутана и смесь перемешивали 30минут. 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 сушили и упаривали с получением 0,45г вспененного материала, который после кристаллизации из смеси диэтиловый эфир-метанол дал 0,35г кристаллического 4,4-тетраметиленхолеста-5,7-диен-3-она. МС(молекулярный ион): 436,4.

¹H-ЯМР-спектр(CD CL₃ δ) оказал характеристические сигналы при: 5,75(д, 1H), 5,5(м, 1H).

Стадия С

В 6мл ТГФ суспендировали 130мг Li ALH₄ и к суспензии добавляли по каплям в течение 30минут 1,97г 4,4-тетраметиленхолеста-5,7-диен-3-она, растворенного в 40мл ТГФ. Спустя 15минут после окончания добавления все еще оставалась некоторая часть непрореагировавшего исходного материала(ТСХ) и потому добавляли еще 65мг LiALH₄. После перемешивания в течение 30минут реакция закончилась, после чего добавляли по каплям 0,9мл воды, растворенной в 5мл ТГФ. После 30минут перемешивания добавляли избыточное количество сульфата магния и смесь перемешивали еще 30минут, фильтровали и упаривали досуха. Остаток растворяли в 25мл диэтилового эфира и 25мл метанола и эфир осторожно удаляли в вакууме. После перемешивания на протяжении ночи, выделяли путем фильтрования 1,75г кристаллического 4,4-тетраметиленхолеста-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

В смеси 2,38мл бензола, 17,5мл этанола и 2,38мл концентрированной хлороводородной кислоты растворяли 770мг соединения, полученного на стадии С, и раствор нагревали с обратным холодильником в течение 16часов и упаривали в вакууме. Остаток вновь растворяли в 5мл толуола, фильтровали и хроматографировали на колонке среднего давления с AgNO₃/SiO₂(гептан : толуол = 10 : 90), получив в результате 35мг 4,4-тетраметиленхолеста-8,14-диен-3-ола. МС(молекулярный ион): 438,4.

¹H-ЯМР-спектр(CD CL₃ δ) ородукта показала характеристические сигналы при: 5,35(с, широкий, 1H), 3,3(дд, 1H).

¹³C-ЯМР-спектр(CD CL₃, 100,6МГц) показал характеристические сигналы при: 79,0(C₃), 117,4(C₁₅), 122,9(C₈), 141,3(C₉), 151,1(C₁₄).

Пример 9

Получение 4,4-диметилхолест-8(14)-ен-3В-ола

В 20мл диэтилового эфира и 20мл уксусной кислоты растворяли 580мг 4,4-диметилхолест-8-ен-3В-ола. Добавляли 60мг 10%-ного Pd/C катализатора и смесь оставляли при перемешивании на ночь под водородом

при 3,5атм. Удаляли катализатор и фильтрат концентрировали до 10мл, в результате чего началась кристаллизация. Добавляли 10мл метанола и через 16часов собирали кристаллы. Перекристаллизация из метанола дала 230мг материала, который, как показали ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектры был смесью 8(9)- и 8(14)-изомеров.

Смесь вновь растворяли в 10мл диэтилового эфира и 10мл уксусной кислоты. Добавляли 75мг 5%-ного Pt/C катализатора и смесь обрабатывали всю ночь водородом при атмосферном давлении. Удалив катализатор, выпаривали растворитель и кристаллический остаток растирали с 5мл метанола, получив в результате 190мг чистого 4,4-диметилхолест-8(14)-ен-3В-ола. МС(молекулярный ион): 414,4.

¹³C-ЯМР-спектр(CD CL₃ 100,6МГц) показал характеристические сигналы при: 79,24(C₃) I 126,11(C₈), 142,20(C₁₄).

Пример 10

Испытание мейоз - индуцирующего вещества в ооцитном тесте,

Животные

Недоразвитых мышей - самок(B6D 2-F1, линия C57B1/2J) держали при регулируемых освещении(14ч света, 10ч темноты) и температуре с употреблением пищи и воды по желанию. Когда животные достигли массы 13 - 16г(что соответствует возрасту 20 - 22дня отроду), им сделали одну инъекцию(внутрибрюшинно) человеческого менолаузного гонадотропина(Humegon, Organon, Nerherlands), содержащего приблизительно 20 МЕД FS H(фолликулостимулирующий гормон) и 20 МЕД jH(лютеинизирующий гормон) (Ziebe, S□et al, Hum. Rerod 8(1993) 385 - 88). Спустя 8часов животных убивали путем цервикального(шейного) смещения.

Сбор и культивирование ооцитов

После извлечения яичников помещали их в НХ - среду(смотри ниже) и освобождали от инородной ткани. Среда для сбора и культивирования состояла из минимально необходимой среды Иглеса(Flow, США), содержащей 4 мМ гипоксантина, 3мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,23ММ пирувата натрия, 2мМ глутамина, 100ЕД/мл пенициллина и 100мкг/мл стрептомицина(все Sigma, США). Эту среду называют НХ - средой. Такую же среду, но без НХ использовали в качестве контрольной среды.

Антральные фолликулы яичников прокалывали под препаровальной лупой иглой калибра 27. Отбирали заключенные в кумулус(совокупность оболочек) клетки(СЕО) одинакового размера и промывали их три раза-в свежей НХ - среде.

Ооциты, освобожденные от клеток кумулуса, т.е. денудированные(оголенные) ооциты(DO) получали путем осторожной продувки СЕО через ротовую пипетку с отверстием очень малого диаметра. СЕО и DO культивировали в тарелках с 4 ячейками(Nuncлон, Дания), содержащих 0,5мл НХ - среды, кроме контрольных, которые культивировали в контрольной среде. Каждая ячейка содержала 35 - 50 ооцитов. Культуры для испытания были приготовлены с разными концентрациями испытуемых соединений, как указано в таблице 5.

Культуры приготавливали при 37°С и 100%-ной влажности с 5% СО₂ в воздухе. Время культивирования составляло 24 часа.

Проверка ооцитов

По окончании периода культивирования подсчитывали число ооцитов с ядром(GV) или с разрушением ядра(GVBD) и ооцитов с полярным тельцем (PB) под инвертационным 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 СЕО, вычисленные в виде единиц активности MIS, даны в таблице 5. Одну единицу активности MIS определяют как:

$$\frac{\%GVBD_{\text{контр.}}}{2}$$

и число единиц активности MIS вычисляют как:

$$2 \left(\frac{\%GVBD_{\text{исп.}} - \%GVBD_{\text{контр.}}}{\%GVBD_{\text{контр.}}} \right)$$

Таблица 5

Таблица 5			
Вещество	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-5А-холеста-	0,6	2,3	0,3
8,14,24-триен-3В-ол	1,6	0,5	0,03
Зимостерин	1,2	1,1	0,1
	0,6	0,4	0,01
		0,2	0,001
4В-Метилзимостерин	6,2	3,5	3,9
	0,8	2,4	0,13
4,4-Диметилхолест-8-ен-3В-ол	0,8	12,8	0,03

Пример 11 Испытание мейоз - индуцирующего вещества в гонадном тесте

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

Таблица 6		
Вещество	Концентрация мкг/мл	Результат
4,4-Диметил-зимостерин	10	++
4,4-Диметил-5А-холеста-8,14,24-триен-3В-ол	30	+

Пример 12

Получение моно (5А-холеста-8,14-диен) -3В-сукцината

В 10мл ТГФ растворяли 0,50г 5А-холеста-8,14-диен-3В-ола, а затем 0,39г янтарного ангидрида и 16мг 4-диметиламинопиридина. Раствор нагревали с обратным холодильником всю ночь и затем упаривали досуха. Остаток суспендировали в 10мл воды и осадок отфильтровывали и промывали водой и высушивали, получив в результате 0,48г целевого соединения, которое можно было дополнительно очистить путем растворения в смеси водного раствора гидрокарбоната натрия и этанола, добавить хлороводородную кислоту до pH2 и затем концентрировать раствор с получением осадка.

Температура плавления: 128 - 131°C МС(молекулярный ион): 484,4

¹Н-ЯМР-спектр(CD CL₃ δ) ородукта показал характеристические сигналы при: 5,36(с, 1Н), 4,75(м, 1Н), 2,67(м, 2Н), 2,6(м, 2Н)

¹³С-ЯМР-спектр(CD CL₃ 100,6МГц) показал характеристические сигналы при: 73,4, 117,1, 122,7, 140,0, 150,5, 171,2, 177,2.

Пример 13

Получение 3В-этоксикарбонилокси-5А-холеста-8,14-диена

В смеси 5мл толуола и 5мл пиридина растворяли с охлаждением в ледяной бане 0,50г 5В-холеста-8,14-диен-3В-ола. Добавляли в течение 5мин 2,3мл этилхлорформиата, растворенного в 5мл толуола. Через 30минут ледяную баню убрали и продолжали перемешивать 20часов при комнатной температуре и затем 2часа при 60°C. Реакционную смесь упаривали досуха в вакууме и остаток растирали с 10мл этанола, получив в результате 0,505г целевого соединения, которое может быть дополнительно очищено путем перекристаллизации из этанола. Температура плавления: 101 - 106°C МС(молекулярный ион): 456,3

¹Н-ЯМР-спектр(CD CL₃ δ) ородукта показал характеристические сигналы при: 5,30(с, 1Н), 4,50(м, 1Н), 4,12(кв, 2Н), 1,24(т, 3Н).

¹³С-ЯМР-спектр(CD CL₃ 100,6МГц) показал характеристические сигналы при: 62,6, 116,6, 122,2, 139,4, 150,0, 153,6.

Пример 14

Получение 3В-фосфоноксо-4,4-диметил-5А-холеста-8,14-диена

В10мл сухого пиридина растворяли 2,00г 4,4-диметил-5А-холеста-8,14-диен-3В-ола и полученный раствор добавляли к раствору 1,66мл оксихлорида фосфора в течение 5минут при охлаждении в ледяной бане. После перемешивания при комнатной температуре в течение 30минут осадок отфильтровывали и промывали сухим ацетоном. Остаток суспендировали в 70мл 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 0,93г неочищенного продукта. 0,70г неочищенного продукта растворяли в 75мл 0,1М водного раствора гидроксида калия и раствор фильтровали через 10г смолы Амберлит IR-120(Н) и упаривали в вакууме досуха. Остаток растирали с 10мл воды и, отфильтровав осадок, промывали его водой и высушивали, получив в результате 0,48г целевого соединения. Температура плавления: 183 - 185°C

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

¹³С-ЯМР-спектр(CDCl₃ + 2капли CD₃OD, 100,6МГц) продукта показал характеристические сигналы при: 85,1, 116,9, 122,3, 140,9, 150,5.

Пример 15 Получение 3В-изоникотиноил-5А-холеста-8,14-диена

В 5мл пиридина растворяли 0,50г 5А-холеста-8,14-диен-3В-ола, а затем 1,16г изоникотиноилхлоридгидрохлорида. Суспензию нагревали с обратным холодильником всю ночь и затем упаривали досуха. Остаток суспендировали в 100мл воды при охлаждении в ледяной бане. Осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали, получив в результате 0,97г неочищенного продукта, который перекристаллизовывали из смеси ацетон - вода с получением 0,40г целевого соединения.

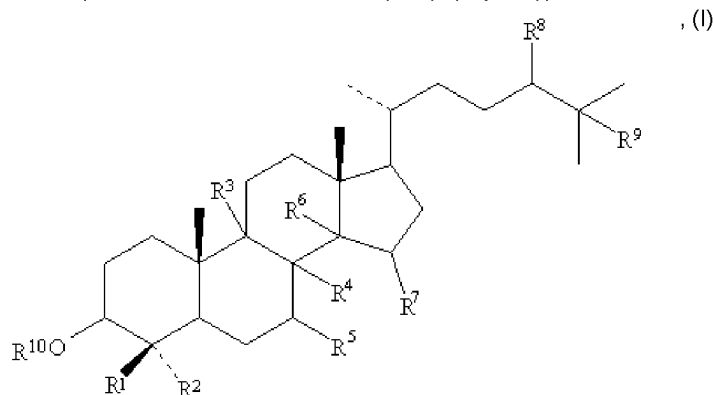
Температура плавления: 129 - 131°C

¹Н-ЯМР-спектр(CD CL₃ δ) ородукта показал характеристические сигналы при: 8,77(д, 2Н), 7,84(д, 2Н), 5,39(с, 1Н), 4,49(м, 1Н).

¹³С-ЯМР-спектр(CD CL₃ 50,3МГц) показал характеристические сигналы при: 75,0, 117,7, 122,8, 123,3, 138,0, 140,3, 150,5, 150,9, 164,6.

Формула винаходу

1. Применение соединения общей формулы (I)



где R^1 и R^2 независимо выбраны из группы, включающей водород, неразветвленный или разветвленный C_1 - C_6 алкил, который может быть замещен галогеном или гидроксильной группой, или R^1 и R^2 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклопентановое или циклогексановое кольцо,

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

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

R^6 и R^4 вместе представляют собой связь между атомами углерода, 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 представляют собой дополнительную связь между атомами углерода, к которым они присоединены, и

R^{10} представляет собой водород или ацильную группу, сульфогруппу, фосфогруппу, или группу, которая вместе с остальной частью молекулы образует простой эфир в качестве лекарственного средства для регулирования мейоза в половой клетке млекопитающего.

2. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^1 представляет собой водород или метил.

3. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^1 выбран из группы, содержащей этил и неразветвленный и разветвленный C_1 - C_6 алкил.

4. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^1 представляет собой неразветвленную или разветвленную гидроксиалкильную группу, содержащую до шести атомов углерода.

5. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^1 представляет собой неразветвленную или разветвленную α -гидроксиалкильную группу, содержащую до шести атомов углерода.

6. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^1 представляет собой неразветвленную или разветвленную алкильную группу, замещенную галогеном.

7. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^2 представляет собой трифторметил.

8. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^2 представляет собой водород или метил.

9. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^2 выбран из группы, включающей этил, неразветвленный и разветвленный C_1 - C_6 алкил.

10. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^2 представляет собой неразветвленную или разветвленную гидроксиалкильную группу, содержащую до шести атомов углерода.

11. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^2 представляет собой неразветвленную или разветвленную α -гидроксиалкильную группу, содержащую до шести атомов углерода.

12. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^2 представляет собой неразветвленную или разветвленную алкильную группу, замещенную галогеном.

13. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^2 представляет собой трифторметил.

14. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^1 и R^2 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклопентановое кольцо.

15. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^1 и R^2 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклогексановое кольцо.

16. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^3 и R^4 вместе представляют собой дополнительную связь между атомами углерода, к которым они присоединены, а R^5 представляет собой водород.

17. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^5 и R^4 вместе представляют собой дополнительную связь

между атомами углерода, к которым они присоединены, а R^3 представляет собой водород.

18. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^6 и R^4 вместе представляют собой дополнительную связь между атомами углерода, к которым они присоединены, а R^3 , R^5 и R^7 представляют собой водород.

19. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^6 и R^7 представляют собой водород.

20. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^6 и R^7 вместе представляют собой дополнительную связь между атомами углерода, к которым они присоединены.

21. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^8 и R^9 представляют собой водород.

22. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^8 и R^9 вместе представляют собой дополнительную связь между атомами углерода, к которым они присоединены.

23. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^{10} представляет собой водород.

24. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^{10} представляет собой ацильную группу, производную от кислоты, содержащей от 1 до 20 атомов углерода.

25. Применение по п. 24, отличающееся тем, что R^{10} представляет собой ацильную группу, выбранную из группы, включающей ацетил, бензоил, пивалоил, бутирил, никотиноил, изоникотиноил, гемисукциноил, гемиглутароил, бутилкарбамоил, фенилкарбамоил, бутоксикарбонил, трет-бутоксикарбонил и этоксикарбонил.

26. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^{10} 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. Применение по п. 26, отличающееся тем, что R^{10} представляет собой метоксиметильную или пивалоилоксиметильную группу.

28. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^{10} представляет собой сульфогруппу.

29. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R^{10} представляет собой фосфогруппу.

30. Применение по п. 1, отличающееся тем, что соединение общей формулы (I) представляет собой 4,4-диметил-5 α -холеста-8,14,24-триен-3 β -ол.

31. Применение по п. 1, отличающееся тем, что соединение общей формулы (I) представляет собой 4,4-диметил-5 α -холеста-8,24-диен-3 β -ол.

32. Применение по п. 1, отличающееся тем, что половой клеткой является ооцит.

33. Применение по п. 1, отличающееся тем, что соединение общей формулы (I) вводят в ооцит *ex vivo*.

34. Применение по п. 1, отличающееся тем, что половой клеткой является мужская половая клетка.

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2002, N 12, 15.12.2002. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.