



Российский национальный
исследовательский
медицинский университет
имени Н.И. Пирогова

Международная конференция: «Реальный путь от
научных разработок до лекарственных средств»
31 октября-1 ноября 2019 г, Москва

**GLP-аспекты фармакологического исследования новых
стероидных соединений класса прегнановых гестагенов -
потенциальных противоопухолевых средств**

д.м.н., г.н.с. НИЛ молекулярной фармакологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Федотчева Татьяна Александровна

2019г.

Актуальность создания новых стероидных соединений класса прегнановых гестагенов

- Стероидные лекарственные препараты занимают важное место среди синтетических л.с. и используются при лечении свыше ста распространенных заболеваний
- Большинство из них входят в список жизненно-важных.
- На сегодняшний день потребность в стероидных лекарственных препаратах значительно возросла как в мире, так и в России, при этом ни один стероидный препарат не производится в России.
- Эта ситуация диктует необходимость поиска путей синтеза новых высокоактивных аналогов стероидов с улучшенными терапевтическими свойствами.

В РНИМУ им. Н.И. Пирогова (совместно с ФИЦ Биотехнологии РАН) разработан новый эффективный гестаген – АМП-17 в виде таблеток Гестобутаноил.



3300 рублей



530 рублей



438 рублей



597 рублей

Гестобутаноил,
таблетки 2 мг



100 рублей

Анализ рынка
свидетельствует о
перспективности
производства
Гестобутаноила

Good laboratory practice (GLP) Доклинические исследования лекарственного средства стероидной структуры для гормональной заместительной терапии гестагенной недостаточности – таблеток Гестобутаноила, проведены нами в соответствии с разработанными в РНИМУ СОПами.

- Achem 2, Achem-7...Achem-24 – аналитическая химия, дозы, весы, мешалки
- Anim 2...24, Am 1...11 – манипуляции с животными
- FM-33-38 – холодильники, биохимические анализаторы
- Hpath1,2 – процедура некропсии, подготовка гистологических срезы
- Hem1,4 – подготовка мазков крови
- Gen 6-8 – общие СОП, в том числе СОП по первичным данным: документация, исправления, листы изменений ДКИ и т.д.



Программа стандартных операционных процедура (СОП)

Центра GLP-исследований

Код раздела - AChem

Название раздела– Аналитическая химия

SOP #	Название /Name	Авторы СОП	Дата начала действия
ACChem-1	Разработка и валидация ВЭЖХ-МС биоаналитических методов	Сухоруков В.С.	архивирован
ACChem-2,v-2 В.В. Негреб	Порядок эксплуатации дозатора механического 1-канального с варьируемым объемом дозирования	Шмиголь Т.А.	08.11.2018
ACChem-3	Порядок эксплуатации аналитических весов «OhausPioneer»	Сухоруков В.С.	01.11.2016
ACChem-4	Порядок эксплуатации Вортекс «МикроспинFVL-2400N»	Сухоруков В.С.	архивирован
ACChem-5	Порядок эксплуатации лабораторной центрифуги «5702/5702REPPENDOPF»	Сухоруков В.С.	01.11.2016
ACChem-6	Порядок эксплуатации хроматомасс-спектрометражидкостногоAGILENT 6410 QQQLC/MS	Сухоруков В.С.	архивирован
ACChem-7	По работе с весами «AND»GR102, GR-202, HR-120, GX-8000	Киселева Н.М.	01.11.2016
ACChem-8	Использование и обслуживание Центрифуги-миксер CM-50M	Шмиголь Т.А.	01.11.2016
ACChem-9	Эксплуатация дозаторов SartoriusProline	Негребский В.В.	01.11.2016
ACChem-10	Калибровка дозаторов SartoriusProline	Негребский В.В.	01.11.2016
ACChem-11	Испаритель центрифужныйSPD1010-230– использование, обслуживание	Негребский В.В.	01.11.2016
ACChem-12	Эксплуатация, обслуживание и калибровка pH-метра SelectaPH-2006	Борозденко Д.А.	01.11.2016
ACChem-13	Эксплуатация Multi-VortexV-32	Борозденко Д.А.	18.11.2016
ACChem-14	Мешалка магнитная с подогревом IKAC-MAG HS7 Использование и обслуживание	Негребский В.В.	24.11.2016
ACChem-15	Валидация методик для определения концентрации морфина	Негребский В.В.	01.11.2016
ACChem-16	Валидация методик для определения концентрации лоразепама	Негребский В.В.	01.11.2016
ACChem-17	Эксплуатация высокоэффективного жидкостного хроматографа «Shimadzu» с высокопроизводительный жидкостным хроматомасс-спектрометром «Shimadzu» LCMS-8030/8040	Негребский В.В.	01.11.2016
ACChem-18	Пригодность хроматографической системы	Негребский В.В.	01.11.2016
ACChem-19	Интегрирование хроматографических пиков	Негребский В.В.	01.11.2016
ACChem-20	Валидациябиоаналитических методик	Негребский В.В.	01.11.2016
ACChem-21	Эксплуатации высокоэффективного жидкостного хроматографа «Shimadzu»	Негребский В.В.	01.11.2016
ACChem-22	Эксплуатации термоджидкостного хроматографаBioradIQ5	Федотчева Т.А.	18.11.2016
ACChem-23	Анализатор иммуноферментных реакций АИФР-01 «Униплан»	Федотчева Т.А.	18.11.2016
ACChem-24	Эксплуатации спектрофотометра УФ ПЭ-5400 «Экрос»	Федотчева Т.А.	18.11.2016

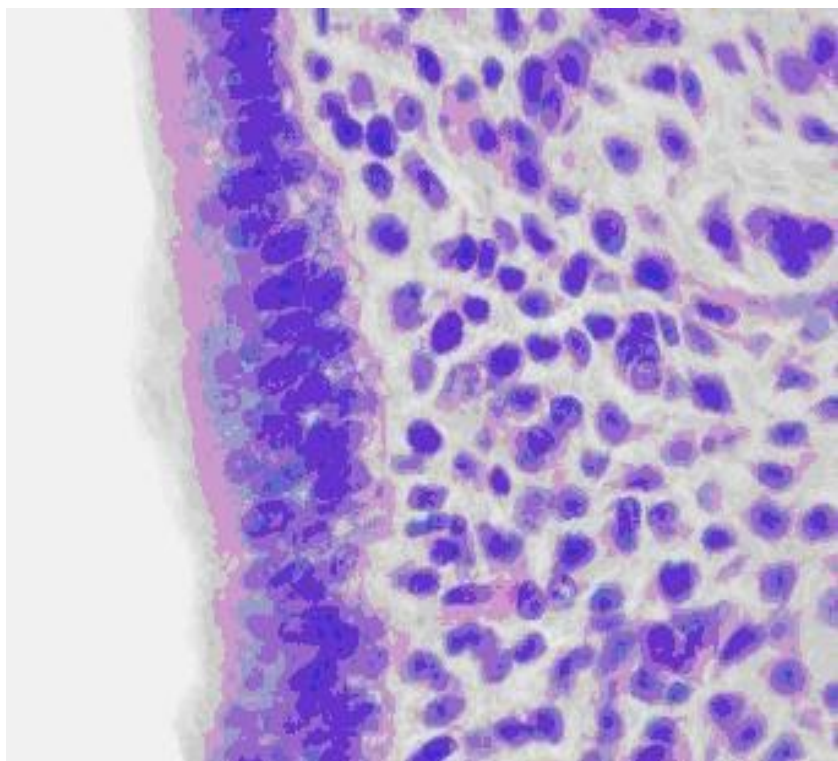
В результате были наработаны таблетки Гестобутаноил: в состав таблетки входит 2 мг АМП-17 и только 2 вспомогательных компонента, синтез субстанции состоит всего из 2-х стадий

17 α -ацетокси-3 β -окси-6-метилпрегна-4,6-диен-20-он (в виде бутаноата) (в пересчете на 100 % вещество)	2,00 мг
Поливиниловый спирт	4,00 мг
PROSOLV EASYTab SP	94,00 мг
Масса таблетки	100,00 мг

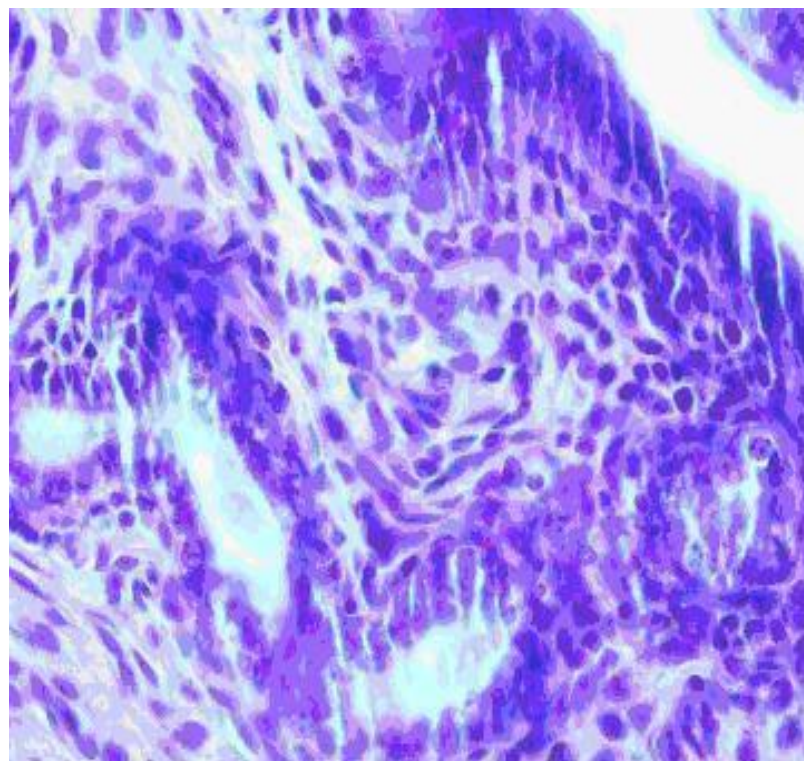


Фармакологическое действие Гестобутаноила : выраженная гестагенная активность – децидуализация эндометрия

Гистологическая картина эндометрия крыс, получавших растительное масло (контроль) - фаза пролиферации эндометрия

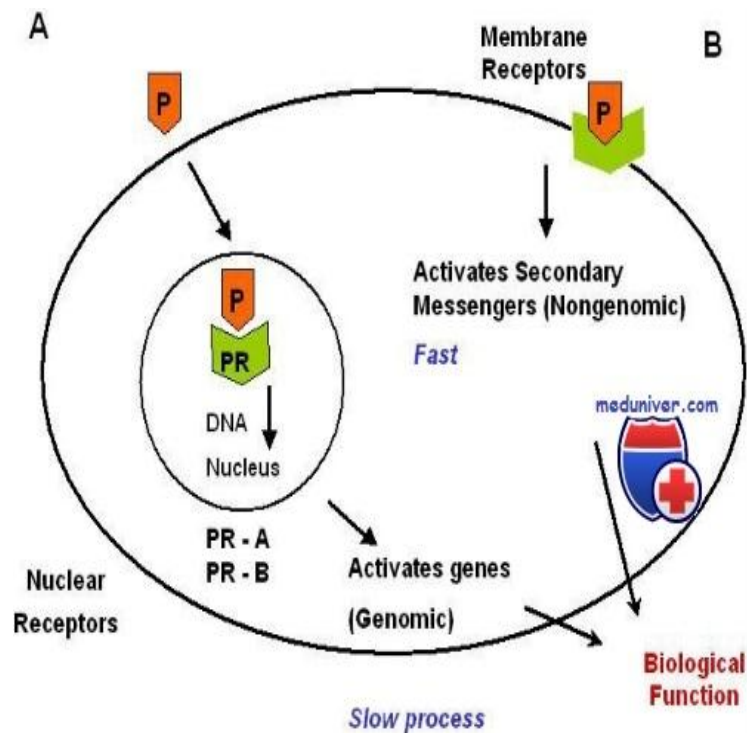


Гистологическая картина эндометрия крыс, получавших Гестобутаноил в дозе 0,025 мг/кг/день в течение 6 дней - фаза секреции эндометрия

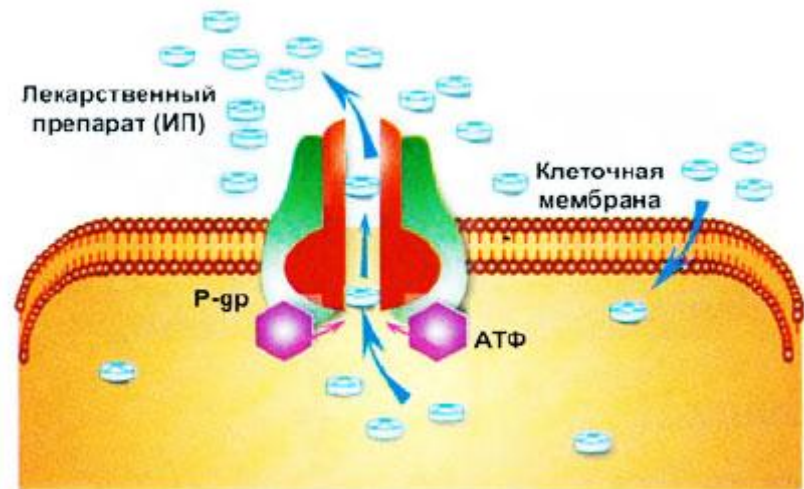


Механизм действия ГБ: молекулярные мишени - рецепторы, АВС-транспортеры, МТП

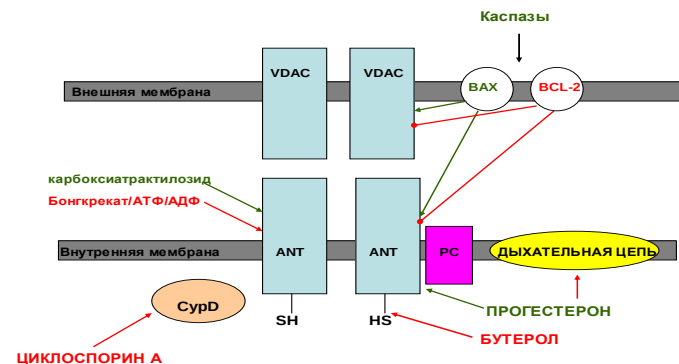
Мембранные и ядерные рецепторы прогестерона



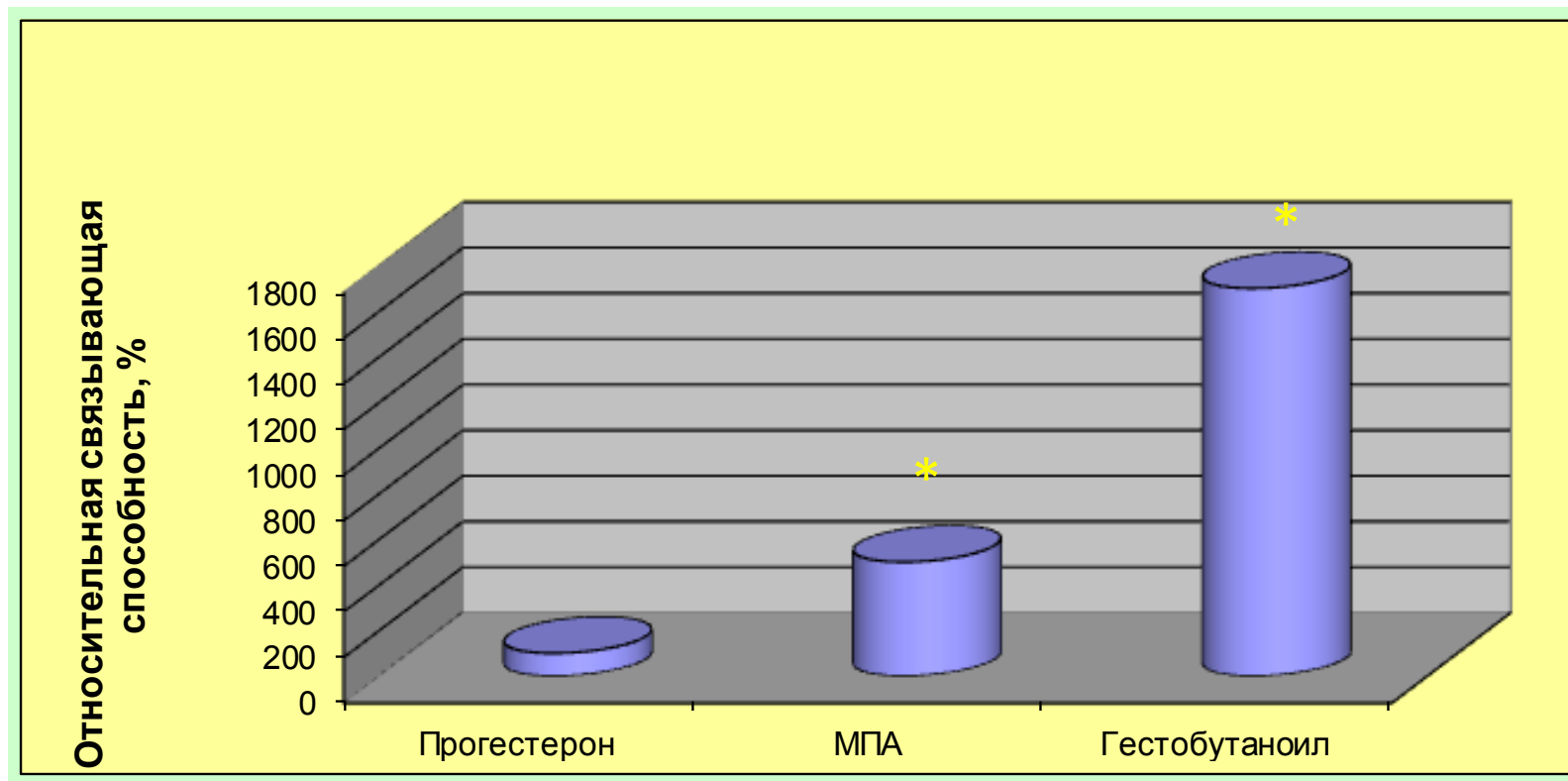
Р-гликопротеин



Ca²⁺-зависимая митохондриальная пора



**Радиолигандный анализ связывания Гестобутаноила с рецепторами ПР:
связывание с рецепторами прогестерона с высоким сродством:
относительная связывающая способность гестагенов (RBA, relative binding activity) радиолигандный метод**



* - достоверное отличие от связывания прогестерона при $P < 0,05$

За счёт связывания с РП реализуется гестагенное действие ГБ

Объект исследования

Гестобутаноил (ГБ) – инновационное лекарственное средство, являющееся аналогом эндогенного гормона – прогестерона.

По структуре ГБ относится к производным 17-ацетата мепрегенола, содержащим модифицированную гидроксильную группу в 3-ем положении прегнанового каркаса

¹ВЭЖХ-МС методика одновременного количественного определения инновационного отечественного гестагена и его метаболитов в сыворотке крови крыс и кроликов
Елена Сергеевна Степанова, Л. М. Макаренкова, В. В. Чистяков, Ю. Л. Рыбаков, В. М. Гукасов, Т. А. Федотчева, В. А. Паришин, В. А. Вотяков, Н. Л. Шимановский

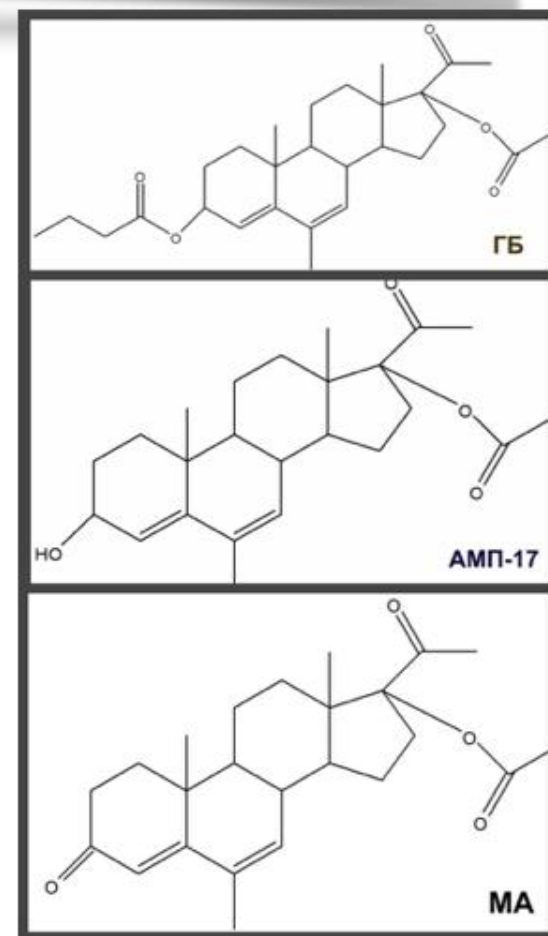
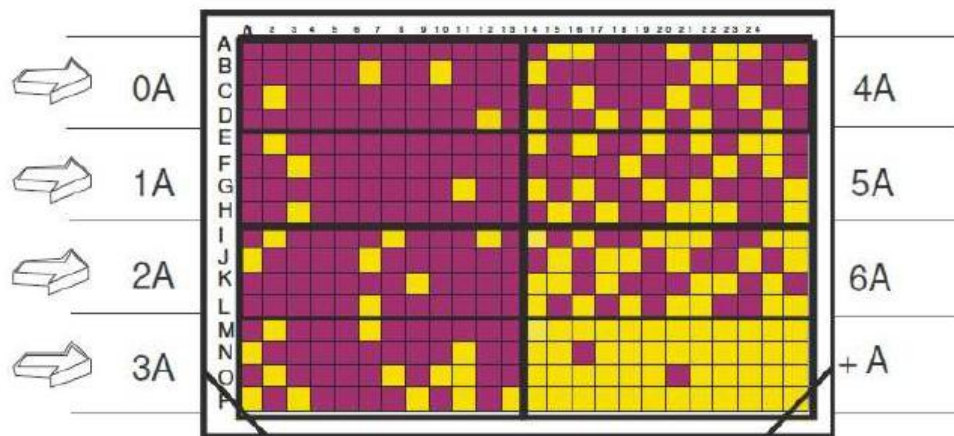


Рис. 1. Структурные формулы ГБ и его метаболитов¹

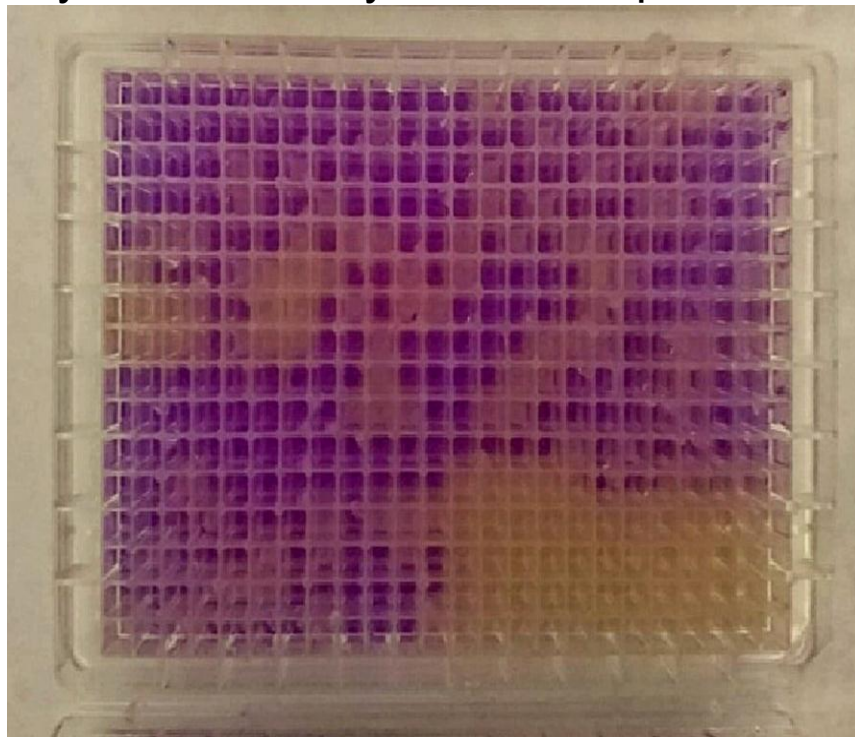
В тесте Эймса определяли возможное мутагенное действие Гестобутаноила: считали количество ревертантных (желтых) лунок в каждой 48- луночной секции после инкубации с Гестобутаноилом



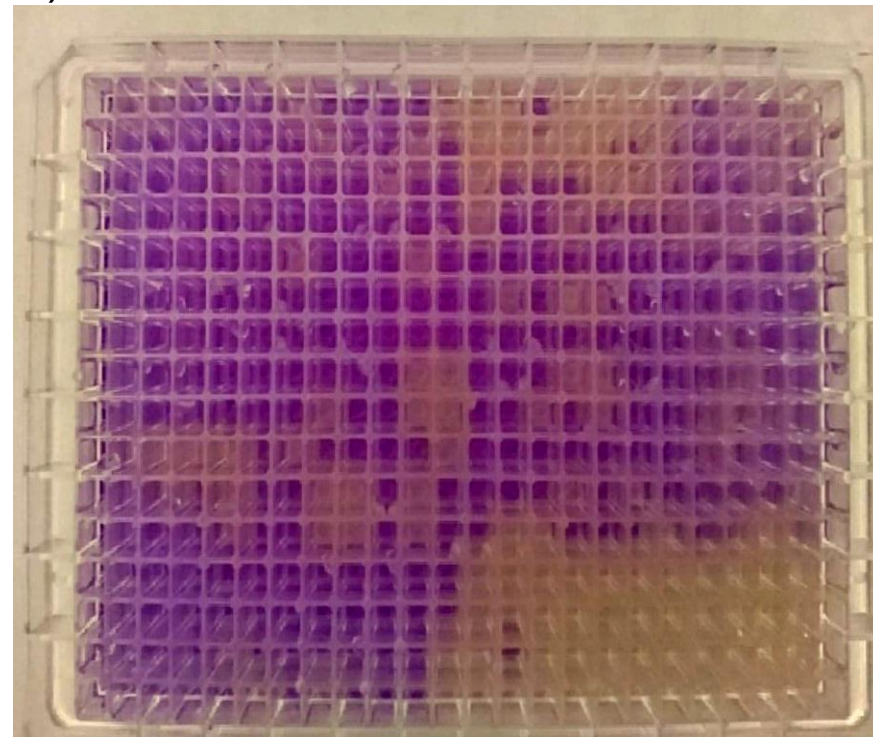
Без метаболической активации

С метаболической активацией, с фракцией S9 печени

Инкубация Гестобутаноила с бактериями штамма TA100 (индукция мутаций по типу замены пар оснований)



-S9



+S9

Число колоний в опытных чашках (с тестируемым образцом) не превышает число колоний в отрицательном контроле более, чем **в 2,5 раза**

Среднее число позитивных лунок *Salmonella typhimurium* TA100 с метаболической активацией (+S9)

Концентрация	n	Среднее число позитивных лунок	SD	Нулевая линия	Кратность превышения (нулевой линии)	t-test Р-значение (непарный, односторонний)
0 (негативный контроль)	3	2,67	0,44	3,11		
312,5 мкМ	3	2	0,64		0,64	0,24
0,625 мМ	3	4	0,88		1,3	0,11
1,25 мМ	3	2,33	0,44		0,2	0,07
2,5 мМ	3	1,33	1,11		0,43	0,54
5 мМ	3	2	0,67		0,43	0,06
10 мМ	3	2,67	1,11		0,43	0,19
положительный контроль (2АА)	3	46,33	0,9		14,9*	<0,05

Среднее число позитивных лунок *Salmonella typhimurium* TA100 без метаболической активации (-S9)

Концентрация	n	Среднее число позитивных лунок	SD	Нулевая линия	Кратность превышения (нулевой линии)	t-test р-значение (непарный, односторонний)
0 (негативный контроль)	3	1,33	0,58	1,91		
312,5 мкМ	3	3	1,73		1,57	0,23
0,625 мМ	3	2	1		1,05	0,31
1,25 мМ	3	1,15	0,66		0,6	0,42
2,5 мМ	3	1,33	0,58		0,7	0,5
5 мМ	3	2	1,73		1,05	0,37
10 мМ	3	1,67	0,58		0,87	0,36
положительный контроль (4NQO)	3	45	0,65		23,6*	<0,05

Оценка генотоксических свойств Гестобутаноила и его метаболитов на МНК периферической крови человека методом ДНК-комет *in vitro*(1)

ГБ,
10 нМ, 18ч

%ДНК = 99 ± 1
ТМ = $0,12 \pm 0,05$

АМП-17,
10 нМ, 18ч

%ДНК = 97 ± 1
ТМ = $0,14 \pm 0,04$

МА,
10 нМ, 18ч

%ДНК = 99 ± 1
ТМ = $0,04 \pm 0,03$

ПГ,
10 нМ, 18ч

%ДНК = 92 ± 2
ТМ = $1,1 \pm 0,1$

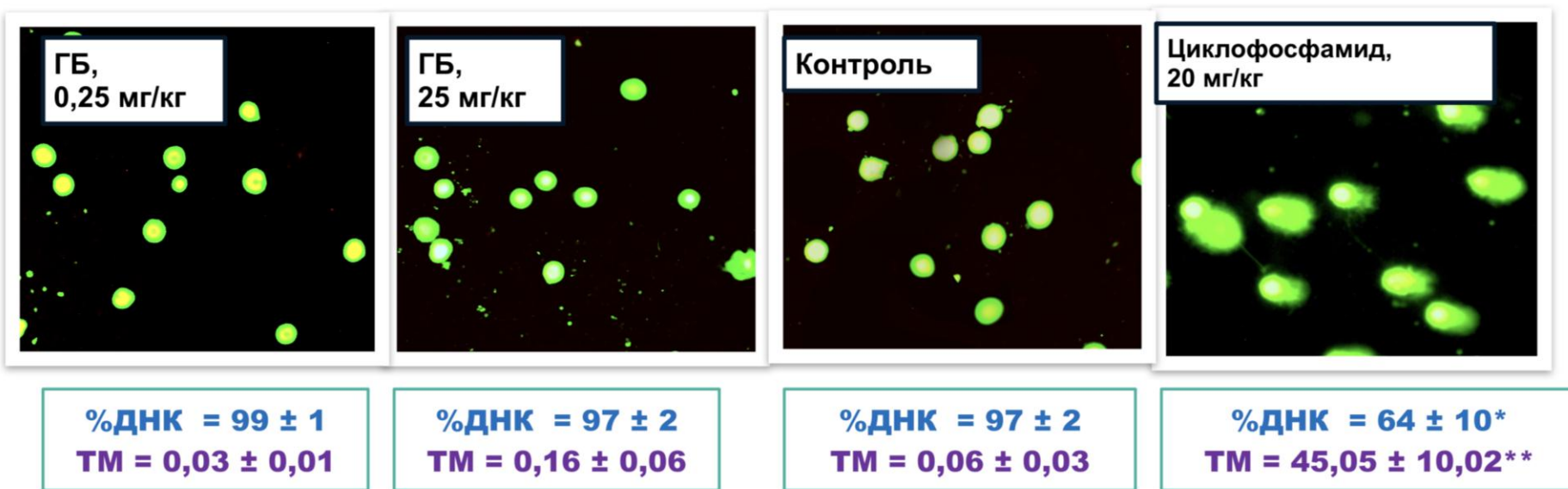
Циклофосфамид,
20 мкМ, 18ч

%ДНК = 72 ± 10
ТМ = $55,14 \pm 15,88^*$

Контроль,
10 нМ, 18ч

%ДНК = 99 ± 1
ТМ = $0,04 \pm 0,01$

Оценка генотоксических свойств Гестобутаноила на МНК мышей методом ДНК-комет *in vivo*

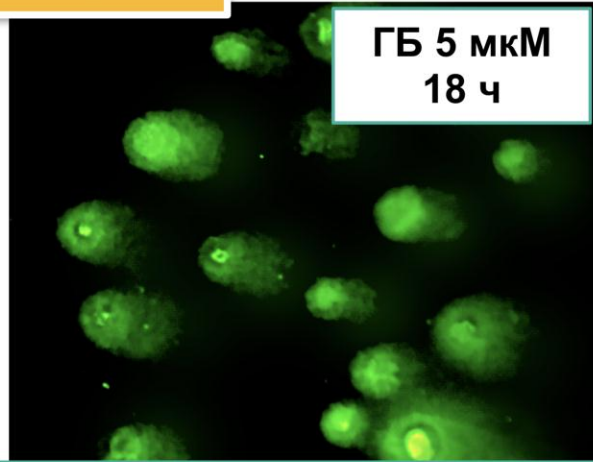


Введение ГБ и циклофосфамида мышам инбредной линии СВА/J осуществлялось ежедневно в течение 4х дней.

Оценка генотоксических свойств ГБ на линии клеток HeLa и МНК человека методом ДНК-комет

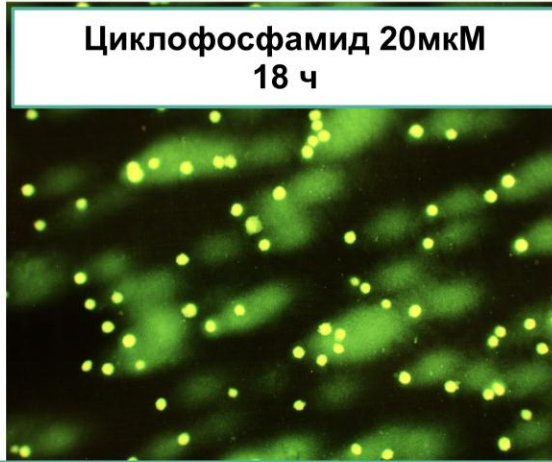
HeLa

ГБ 5 мкМ
18 ч



%ДНК = 78 ± 1 ; ТМ = $12 \pm 3^*$

Циклофосфамид 20мкМ
18 ч



%ДНК = 49 ± 1 ; ТМ = $61,5 \pm 1^*$

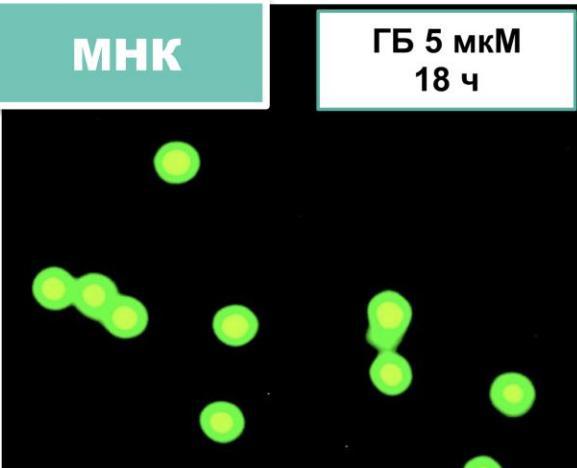
Контроль



%ДНК = 99 ± 1 ; ТМ = $0,02 \pm 0,01$

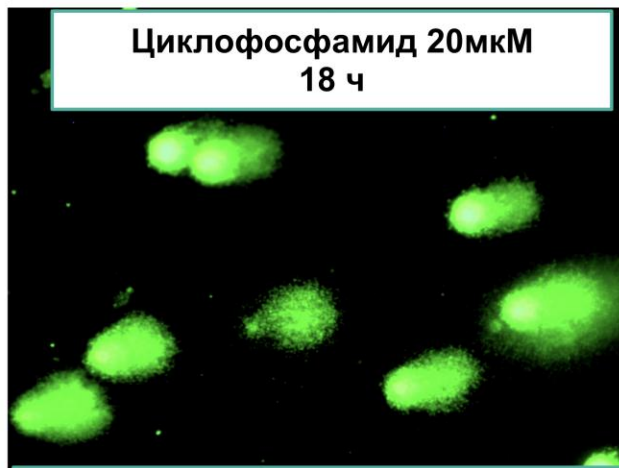
МНК

ГБ 5 мкМ
18 ч



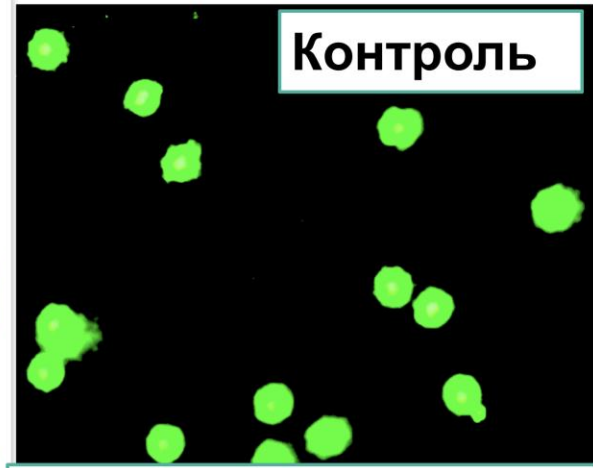
%ДНК = $99,5 \pm 2$; ТМ = $0,02 \pm 0,01$

Циклофосфамид 20мкМ
18 ч



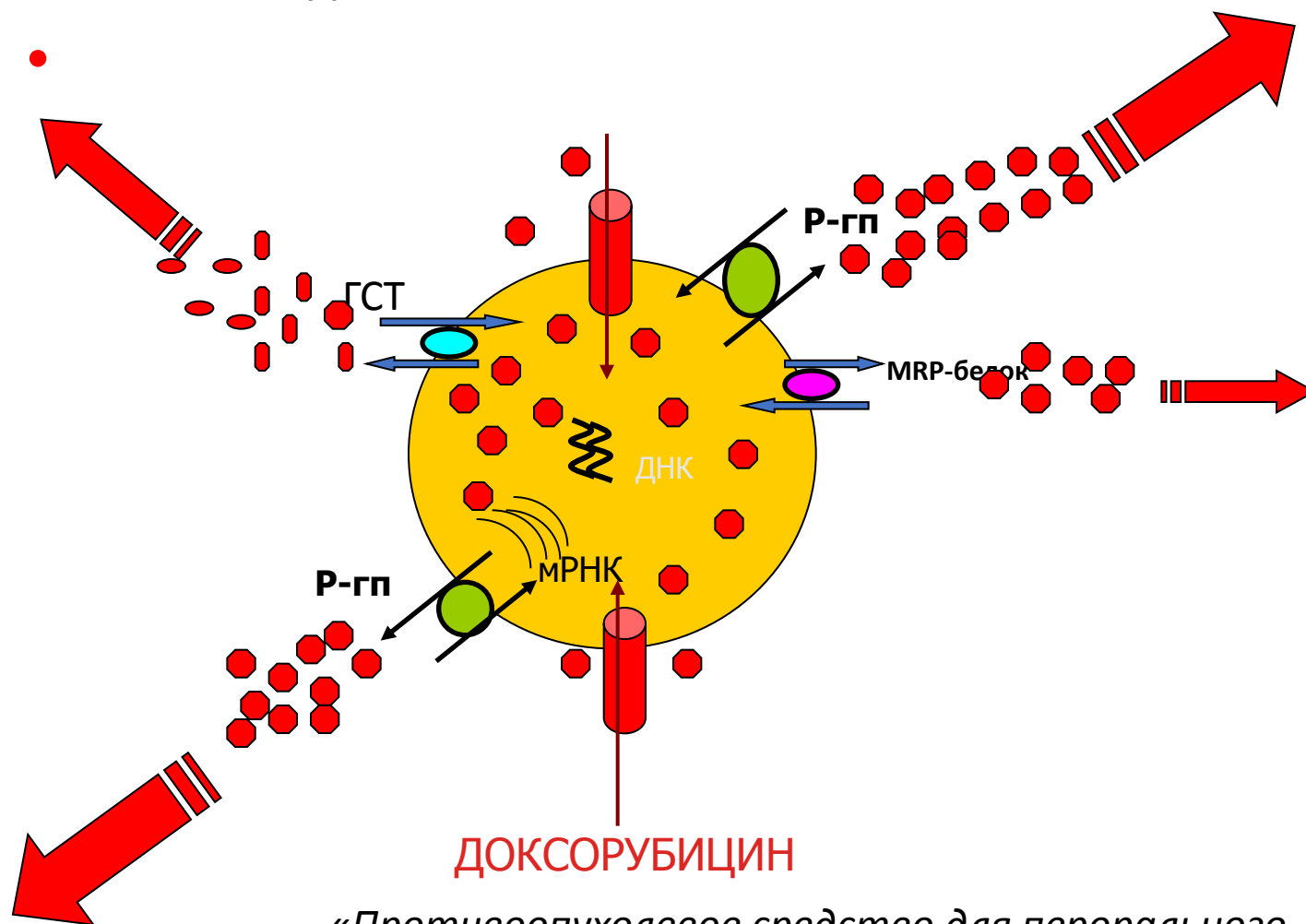
%ДНК = $56,4 \pm 2$; ТМ = $38,75 \pm 1,31^*$

Контроль



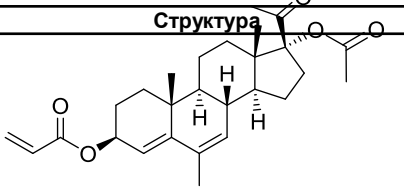
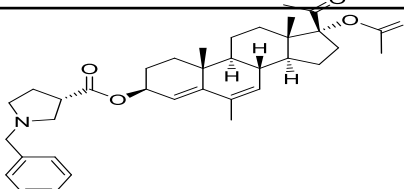
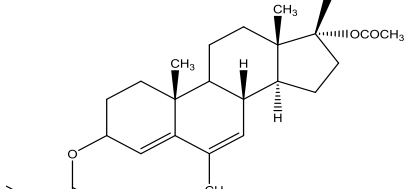
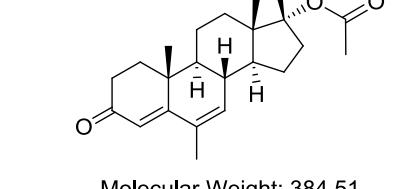
%ДНК = 98 ± 2 ; ТМ = $0,02 \pm 0,01$

Гестобутаноил обладает не только собственным цитотоксическим действием IC_{50} 7-8мкМ (HeLa, MCF-7), но и , ингибируя Р-гликопротеин, увеличивает накопление в клетке доксорубина, и, соответственно, увеличивает его цитостатическое действие.

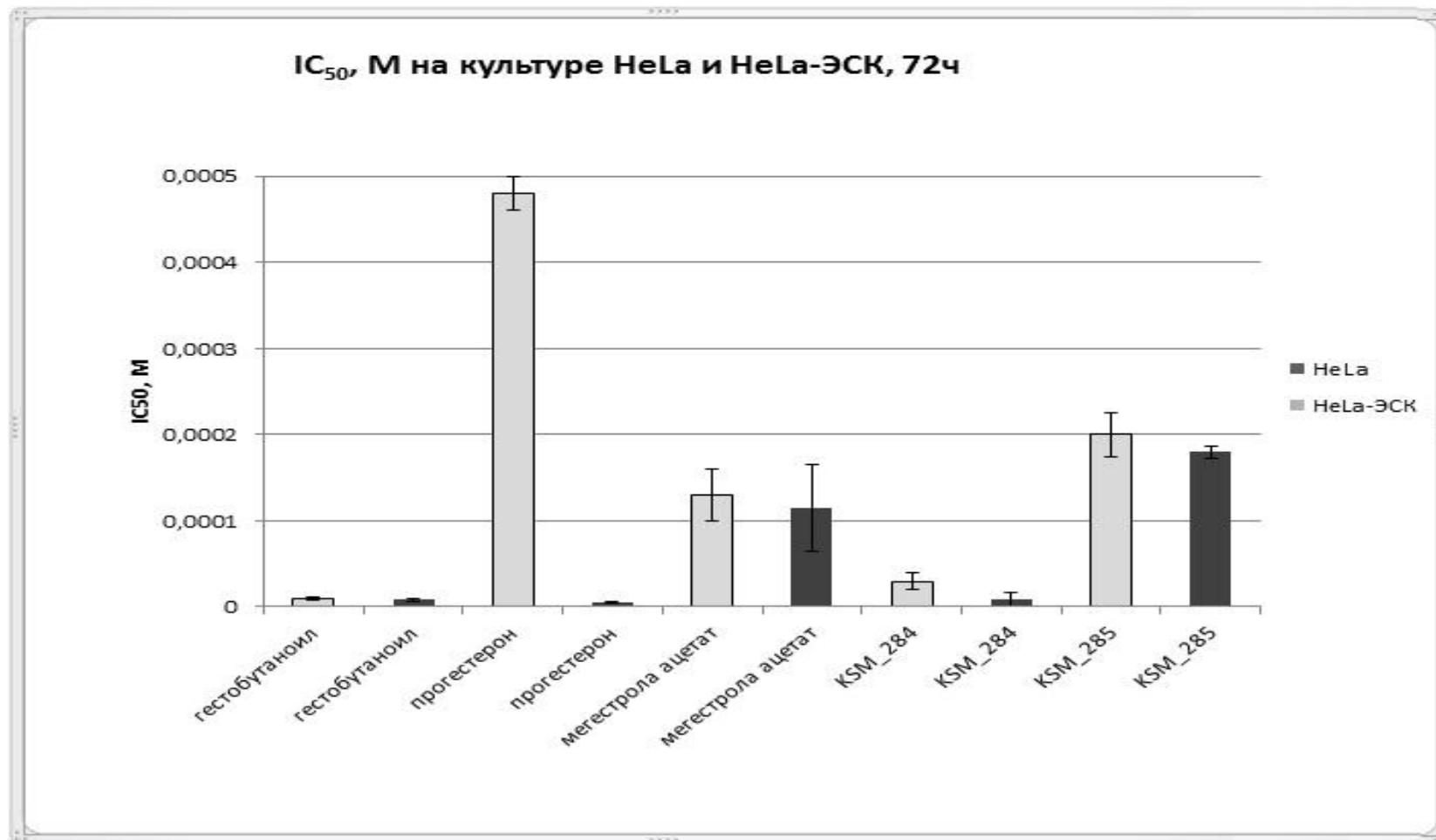


«Противоопухолевое средство для перорального применения и способ его получения» Патент РФ №2292209

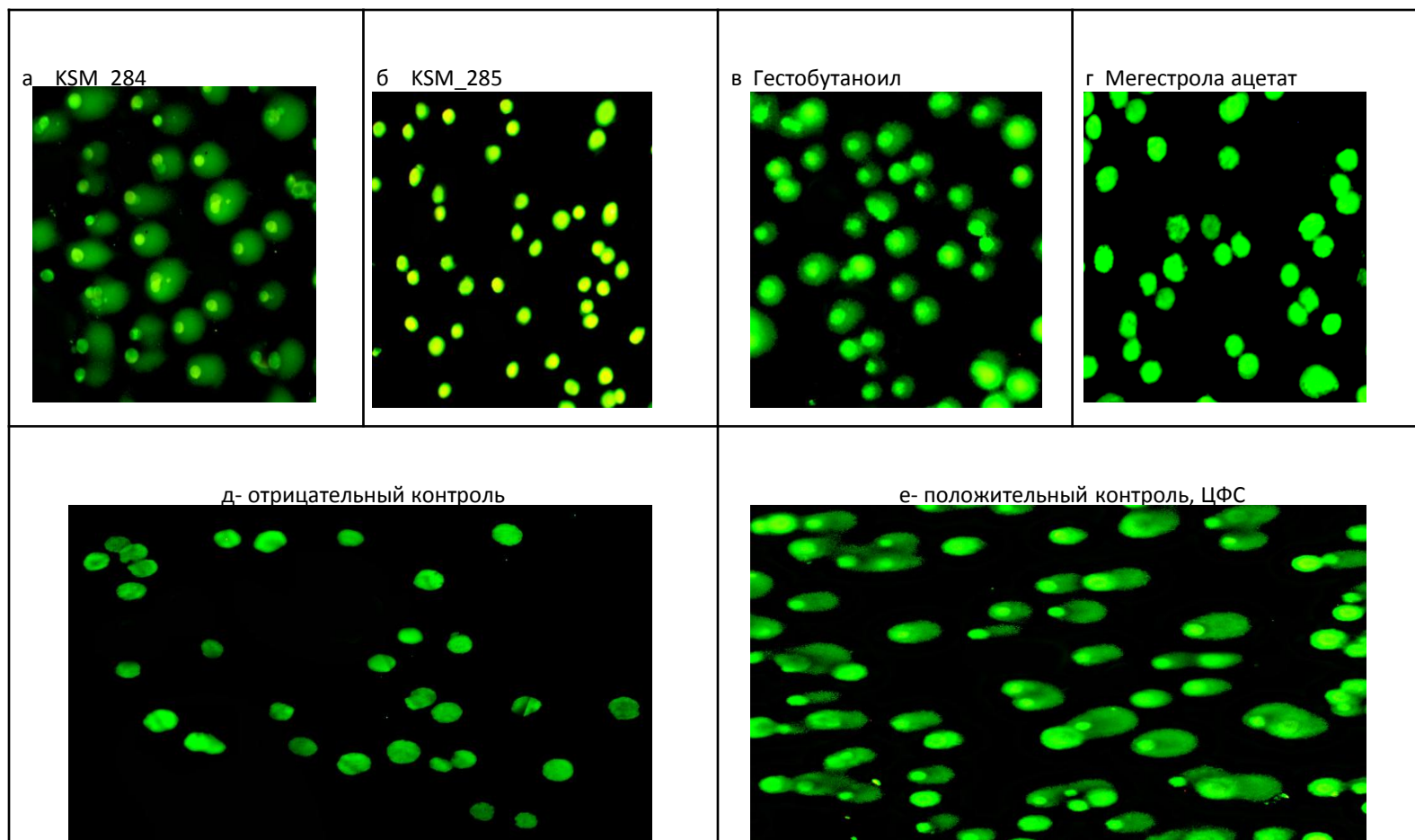
В настоящее время совместно с кафедрой медицинской химии Химического факультета МГУ под руководством д.х.н. Кудрявцева К.В. синтезированы новые прегнановые стероиды в качестве потенциальных противоопухолевых средств с различными заместителями при С3. Грант РФФИ [19-015-00195](#)

Шифр	Структура	Chemical name
KSM_284	 Molecular Weight: 440,57	(3S,8R,9S,10R,13S,14S,17R)-17-acetoxy-17-acetyl-6,10,13-trimethyl-2,3,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yl acrylate C27H36O5
KSM_285	 Molecular Weight: 573,77	(3S,8R,9S,10R,13S,14S,17R)-17-acetoxy-17-acetyl-6,10,13-trimethyl-2,3,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yl (S)-1-benzylpyrrolidine-3-carboxylate C36H47NO5
Gestobutanoyl	 Molecular Weight: 456,6	Gestobutanoyl or Butagest or (3S, 8R, 10R, 13S, 14S, 17R) -17-acetoxy-17-acetyl-6,10,13-trimethyl-2,3,8,9,10,11,12,13,14,15, 16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta [a] phenanthren-3-yl-butyrate C28H40O5
MA	 Molecular Weight: 384,51	Megestrol acetate or (8R,9S,10R,13S,14S,17R)-17-acetyl-6,10,13-trimethyl-3-oxo-2,3,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl acetate C24H32O4

Методом МТТ (СОП) определены IC_{50} на культуре клеток HeLa и HeLa-ЭСК



Методом ДНК-комет установлено ДНК-повреждающее действие KSM-284, но не KSM_285 и МА.



Высокая избирательность новых стероидов прегнанового ряда: IC_{50} в 5 раз ниже для опухолевых клеток, чем для нормальных.

06.09.2019

MCF-7

HSF

	EC50	CO	EC50	CO
KSM_316_2		3,657858	0,157809	2,546396
KSM_314_2		69,94654	5,132888	175,4525
KSM_317_2		22,42813	1,214671	140,8066
KSM_306_2		62,98288	6,911825	102,5601

23.08.019

MCF-7

HSF

	EC50	CO	EC50	CO
KSM_316_2		24,49823	4,022104	14,80803
KSM_314_2		91,5556	1,726592	679,135
KSM_317_2		22,64957	0,998404	152,8389
KSM_306_2		42,87293	10,41253	98,96736

12.08.019

MCF-7

HSF

	EC50	CO	EC50	CO
KSM_316_2				
KSM_314_2		45,21497	9,31102	2038,808
KSM_317_2				
KSM_306_2		40,61119	14,64857	183,2205

Федеральное агентство
по техническому регулированию и метрологии
ФБГУ «Калужский ЦСМ»

БУ144575

Аттестат аккредитации № RA.RU.1112165, бессрочно

**свидетельство
о поверке**
№ 5-3048

Действительно до «23» октября 2019 г.

Предмет измерения Двухцветный иммунофлуоресцентный реактив АИФР-01 УНИКАН, с.р.№ 15166 – 98
(иммуноферментный тест, иммунодиагностика, взаимодействие реагента с субстратом, взаимодействие флюорофора с люминисцирующим веществом)
Цели и условия проведения поверки: поверка метрологических характеристик измерительного средства (наличие шкалы отсчета и значения показаний) в соответствии с требованиями к поверке средств измерений;
Виды и номер класса предыдущей поверки (если такая серия и номер имеются) на импортном
устройстве номер (номеров) 539 № 2001 в.

поверено единица оптической плотности в диапазоне значений от 0,0 до 3,5 Б
выполнено в объеме, позволяющем установить соответствие требованиям действующего законодательства Российской Федерации по метрологии, включая требования к методам поверки, условиям проведения поверки, порядку выдачи результатов поверки, оформлению протоколов поверки;

поверено в соответствии с адаптером для измерения иммунофлуоресцентных реакций АИФР-01 УНИКАН,
используемым в устройстве, не имеющем собственной калибровки

Инструкция по поверке: МОНХ 941416 001 ЛП

применены эталоны: Комплект светофильтров полнорамочный КОТ-028хУВ 3/4, зов. №2/0
использованы материалы: набор реактивов для определения концентрации белка при помощи спектрометра фотоколориметрического типа; набор реактивов для определения содержания белка при помощи спектрометра фотоколориметрического типа

Пределы допускаемых значений погрешности измерений:

- 0,003 Б в диапазоне от 0,030 Б до 1,0 Б
- 0,006 Б в диапазоне от 1,001 Б до 2,0 Б
- 0,025 Б в диапазоне от 2,001 Б до 3,0 Б
- 0,08Б в диапазоне от 3,0015 до 4,000Б.

При следующих значениях влияющих факторов: температура окружающей среды 20 ± 0,5 °C
влажность воздуха относительная влажность не более 80% относительной влажности воздуха
возможные помехи электромагнитного излучения частотой выше 90 МГц, эквивалентная мощность излучения на длине волны 100 МГц не более 10 Вк/м²

на основании результатов проверки перечней (прикладных), проверка позиционному соответствию установленным в описании типа метрологическим требованиям и пригодным к применению в сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений.

подпись поверяемого:
Назначение сектора _____ А. Н. Булин
Подпись лица _____ А. Н. Булин
подпись поверителя _____

Дата поверки «24» октября 2018 г.

В 2018, 2019 г. получены 2 патента РФ на способ получения субстанции и пероральной лекарственной формы разработанного прегнанового гестагена Гестобутаноила.

Получено положительное решение о выдаче патента на «ПРЕГНАНОВЫЕ СТЕРОИДЫ, ОБЛАДАЮЩИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ, И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ»



RU 2 684 917 C 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 684 917** (13) **C1**

(51) МПК
A61K 31/57 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61K 47/38 (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01)
A61P 5/34 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 9/20 (2018.08); A61K 31/57 (2018.08); A61K 47/38 (2018.08); A61P 5/34 (2018.08)

(21) (22) Заявка: 2018124595, 05.07.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.07.2018

Дата регистрации:
16.04.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 05.07.2018

(45) Опубликовано: 16.04.2019 Бюл. № 11

Адрес для переписки:
117997, Москва, ул. Островитянова, 1, ФГБОУ
ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава
России, отдел охраны интеллектуальной
собственности и коммерциализации РИД

(72) Автор(ы):
Шимановский Николай Львович (RU),
Федотчева Татьяна Александровна (RU),
Семейкин Александр Владимирович (RU),
Паршин Валерий Александрович (RU),
Шенна Наталья Ивановна (RU),
Скрябина Эмилия Григорьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Российский национальный
исследовательский медицинский университет
имени Н.И. Пирогова" Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2292209 C2, 2007.01.27. RU
2456991 C1, 27.07.2012. RU 2567800 C2,
2015.11.10. RU 2653507 C1, 2018.05.10. RU
2200165 C1, 10.03.2003. Промышленная
технология лекарств, под ред. Проф. В.И.
Чуешова, т. 2, 1999, Харьков, Изд-во
УкрФА, стр. 10-11.

(54) Пероральная форма гестаген-содержащей композиции для лечения женщин с состояниями гестагенной недостаточности и способ ее получения

(57) Реферат:
Изобретение относится к области химио-фармацевтической промышленности и медицины. Композиция включает в качестве активной фармацевтической субстанции бутиловый эфир 17α-ацетокси-3β-окси-6-метилпрегна-4,6-диен-20-она (АМР-17), поливиниловый спирт и наполнитель PROSOLV EASYTab SP. Описан способ получения таблеток. Таблетки не токсичны в остром и хроническом эксперименте, обладают высокой гестагенной активностью, 2 н.п. ф-лы, 3 ил., 3 табл.

RU 2 684 917 C 1

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!