



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102187** (13) **C2**  
(51) МПК (2013.01)**A61K 31/404** (2006.01)**A61K 9/14** (2006.01)**A61K 9/20** (2006.01)**A61K 9/48** (2006.01)**A61K 9/107** (2006.01)**A61K 47/30** (2006.01)**A61P 35/00****A61P 37/00**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2012 04644</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Кісєльов Всеволод Івановіч (RU),</b> <b>Васільєва Іріна Геннадієвна (RU)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>07.09.2010</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ЗАКРИТОЄ АКЦІОНЕРНОЄ ОБЩЕСТВО</b> <b>"ВЕЛЕС ФАРМА",</b> Сухаревская площадь, д. 6, стр. 1, г. Москва, 127051, Российская Федерация (RU)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>10.06.2013</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Янішевська Антоніна Леонідівна, реєстр.</b> <b>№133</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>2009134872</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: RU 2 318 509 C2, 10.03.2008 US 6 277 410 B1, 21.08.2001 US 6 416 793 B1, 09.07.2002 US 2004/072891 A1, 15.04.2004 WO 99/49851 A1, 07.10.1999
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>18.09.2009</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>RU</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>25.06.2012, Бюл.№ 12</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.06.2013, Бюл.№ 11</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/RU2010/000487,</b> <b>07.09.2010</b>	

**(54) ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОЇ ДОСТАВКИ ДІНДОЛІЛМЕТАНУ****(57) Реферат:**

Винахід належить до галузі фармації. Описуються фармацевтичні композиції з 3,3'-дсіндолилметаном (DIM), що містять блок-співполімер оксіетилену і оксипропілену, в якому вміст гідрофобного блока складає менше ніж 50 мас. %, а молекулярна маса гідрофільного блока складає 2250 Да й більше, при співвідношенні блок-співполімеру і активного компонента 10:1-2:1.

UA 102187 C2



## ОБЛАСТЬ ТЕХНІКИ

Винахід відноситься до галузі фармації і стосується нових фармацевтичних композицій для пероральної доставки 3,3 '-диіндолілметана (DIM) і способів лікування захворювань з їх допомогою.

## 5 РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

3,3' -диіндолілметан (DIM), його аналоги і похідні володіють широким спектром біологічних активностей, що дозволяє розглядати його як дуже перспективну фармакологічно активну сполуку. 3,3 '-диіндолілметан (DIM) є основним олігомерним продуктом індол-3-карбінола (I3C), для якого показана виражена виборча активність відносно трансформованих клітин різного походження (Aggarwal BB, Ichikawa H. (2005) Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle*, 4 (9), 1201-1215). Як показали фармакокінетичні дослідження під впливом кислого середовища шлунка прийнятий перорально I3C майже миттєво перетворюється в DIM (Arneson DW, Hurwitz A, McMahon LM, Robaugh D (1999) Presence of 3,3 '-diindolylmethane in human plasma after oral administration of indole-3 -carbinol (abstr.) *Proc. Am. Assoc. Cancer Res*, 40, 2833); Тому багато авторів, що досліджують протипухлинну активність I3C, схилиються до думки, що більшість клінічних ефектів, які спостерігаються при його прийомі, насправді обумовлені димерною формою індол-3-карбінола - DIM.

Експериментально доведено, що практично всі множинні протипухлинні механізми, індуковані I3C in vitro та in vivo, характерні і для DIM (Chang X, Той JC, Hong 3 et al. (2005) 3,3 '-Diindolylmethane inhibits angiogenesis and the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice. *Carcinogenesis*, 264 (4), 771-778; Firestone GL, Bjeldanes LF (2003) Indole-3-Carbinol and 3,3 '- Diindolylmethane anti-proliferative signaling pathways control cell cycle gene transcription in human breast cancer cells by regulating promoter-Spl transcription factor interactions. *J. Nutr.*, 133, 2448S-2455S; Ge X, Yannai S, Rennert G et al. (1996) 3,3 '-Diindolylmethane induces apoptosis in human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 228, 153-158; Hong C, Kim HA, Firestone GL et al. (2002) 3,3 '-Diindolylmethane (DIM) induces a cell cycle arrest in human breast cancer cells that is accompanied by Sp-1-mediated activation of p21 WAF1/CIP1 expression. *Carcinogenesis*, 23, 1297-1305; Leibelt DA, Hedstrom OR, Fisher KA (2003) Evaluation of chronic dietary exposure to indole-3-carbinol and absorption enhanced 3, 3'-diindolylmethane in Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.*, 74,10-21; Li Y, Li X, Sarkar FH (2003) Gene expression profiles of I3C-and DIM-treated PC3 human prostate cancer cells determined by cDNA microarray analysis. *J. Nutr.*, 133,1011 -1019; Nachshon-Kedmi M, Yannai S, Haj A, Fares FA. (2003) Indole-3-carbinol and 3,3 '-diindolylmethane induce apoptosis in human prostate cancer cells. *Food Chem. Toxicol.*, 41, 745-752). Даний висновок справедливий і щодо раку простати. Так само, як і I3C, DIM in vitro та in vivo зупиняє ріст пухлинних простатичних клітин (Li Y, Li X, Sarkar FH. (2003) Gene expression profiles of I3C-and DIM-treated PC3 human prostate cancer cells determined by cDNA microarray analysis. *J. Nutr.*, 133,1011-1019; Nachshon-Kedmi M, Fares FA, Yannai S (2004) Therapeutic activity of 3,3 '-diindolylmethane on prostate cancer in an in vivo model. *Prostate*, 61 (2), 153-160) і індукує їх апоптоз (Li Y, Li X, Sarkar FH. (2003) Gene expression profiles of I3C-and DIM-treated PC3 human prostate cancer cells determined by cDNA microarray analysis. *J. Nutr.*, 133,1011-1019; Nachshon-Kedmi M, Yannai S, Fares FA. (2004) Induction of apoptosis in human prostate cancer cell line, PC3, by 3,3 -diindolylmethane through the mitochondrial pathway, *Br. J. Cancer*, 91, 1358-1363), при цьому так само, як і I3C, реалізує свою активність на субмолекулярному рівні, регулюючи експресію генів, відповідальних за процеси проліферації, диференціювання і виживання (Li Y, Li X, Sarkar FH. (2003) Gene expression profiles of I3C-and DIM-treated PC3 human prostate cancer cells determined by cDNA microarray analysis. *J. Nutr.*, 133,1011 -1019) та інгібуючи множинні сигнальні шляхи, що ведуть до клітинної гіперпроліферації.

На гормон-чутливих клітинах передміхурової залози (культура LNCaP) показана здатність DIM конкурентно зв'язуватися з андрогеновими рецепторами, пригнічуючи, таким чином, транслокацію їх у ядро з наступною активацією генної транскрипції, а також експресію промотора гена, що кодує простата-специфічний антиген PSA. Білок PSA (специфічна протеаза простати) є класичним маркером раку передміхурової залози, що продукується і секретується в надмірній кількості пухлинними простатичними клітинами. У тій же роботі в результаті проведених структурних досліджень було встановлено, що з молекулярної геометрії DIM надзвичайно схожий на відомий синтетичний антиандроген Касодекс (Le HT, Schaldach CM, Bjeldanes LF. (2003) Plant-derived 3,3 '-diindolylmethane is a strong androgen antagonist in human prostate cancer cells, *J. Biol. Chem.*, 278, 21136-21145), який, однак, на відміну від DIM сприяє транслокації андрогенового рецепторів в ядро (Masiello D, Cheng S, Bubley GJ et al. (2002)

Bicalutamide functions as an androgen receptor antagonist by assembly of a transcriptionally inactive receptor, *J. Biol Chem.*, 277, 26321-26326).

Надзвичайно важливим моментом представляється недавно виявлена здатність DIM проявляти антиангіогенну активність. Патологічне зростання судин практично завжди супроводжує гіпер-і неопластичні процеси. Відомо, що без формування мережі капілярних судин, які постачають щойно утворену пухлину, яка досягла в діаметрі 1-2 мм, киснем і живильними речовинами, абсолютно неможливе її подальше зростання. Показано, що в умовах *in vitro* мікромольні концентрації DIM ефективно пригнічують проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин, а також їх здатність утворювати судини. *In vivo* введений підшкірно експериментальним тваринам DIM (5 мг/кг, щодня) на 74% придушував патологічний неоангіогенез (Chang X, Той JC, Hong 3 et al. (2005) 3,3 '-Diindolylmethane inhibits angiogenesis and the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice. *Carcinogenesis*, 264 (4), 771-778; McCarty MF, Block KI (2005) Multifocal angiostatic therapy: an update, *Integrative Cancer Therapies*, 4 (4), 301-314).

Найважливішою молекулярної мішенню, на блокування активності якої спрямована дія сучасних таргетних препаратів (препаратів спрямованої дії), які розробляються і впроваджуються в клінічну практику, є ядерний фактор транскрипції NF-KB. Доведено, що даний фактор опосередковує запальну відповідь, а також грає важливу роль в регуляції проліферативної (антиапоптотичної), ангіогенної, міграційної та інвазивної клітинних активностей, здійснюючи заключний етап сигнальних каскадів, індукованих ростовими факторами і цитокінами. При цьому ключовим моментом є транслокація активного чинника в ядро і активація транскрипції генів, відповідальних за ці процеси. Встановлено, що в умовах *in vitro* DIM (Rahman KM, Ali S, Aboukameel A et al. (2007) Inactivation of NF-kappaB by - 3,3 '-diindolylmethane contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agent in breast cancer cells. *Moі. Cancer Ther.*, 6 (10), 2757-2765; Rahman KM, Sarkar FH. (2005) Inhibition of nuclear translocation of Nuclear Factor-B contributes to 3,3 '-diindolylmethane-induced apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res* ., 65, 364-371), а також його метаболічний попередник ІЗС ефективно пригнічують ядерну транслокацію і активність фактора NF-KB. Це означає, що, крім антипроліферативної і антиангіогенної дії, препарат, вироблений на основі DIM, здатний пригнічувати місцеві запальні реакції, які нерідко супроводжують гіпер- і неопластичні процеси в гормон-залежних органах і тканинах. У нещодавно проведених плацебо-контрольованих клінічних дослідженнях більш детальне дослідження хворих з регресією цервікальних дисплазій дозволило встановити прямий зв'язок між позитивною динамікою перебігу захворювання та ефективністю перетворення НД в DIM (Serkovic DW, Bradlow HL, Bell M. (2001) Quantitative determination of 3,3 '-Diindolylmethane in the urine of individuals receiving indole-3-carbinol. *Natr. Cancer*, 41, 57-63). Висока концентрація останнього визначалася в сечі пацієнток під час прийому препарату.

В одному з останніх експериментальних досліджень була показана здатність DIM викликати апоптоз цервікальних ВПЛ-інфікованих кератиноцитів людини в умовах *in vitro*. При цьому на одній з трьох досліджених клітинних ліній цервікального раку DIM демонстрував в кілька разів більшу ефективність, ніж ІЗС. Величина LD50 складала 50-60 мкМ для DIM і 200 мкМ для ІЗС, відповідно, але так само, як і його метаболічний попередник (ІЗС), DIM не викликав апоптотичних змін у нормальних (нетрансформованих) кератиноцитах (Chen DZ, Qi M, Auburn До , Carter TH. (2001) Indole-3-Carbinol and Diindolylmethane induce apoptosis of human cervical cancer cells and in murine HPV16-transgenic preneoplastic cervical epithelium. *J. Nutrit*, 131, 3294-3302).

На закінчення необхідно згадати ще про одну, недавно описану, найважливішу властивість DIM - його імуномодуючу активність. Було показано, що в умовах *in vitro* в пухлинних клітинах DIM стимулює IFN $\gamma$ -залежні сигнальні каскади за допомогою активації експресії рецепторів IFN $\gamma$ , а також інших IFN-респонсивних регуляторних білків.

Пероральний спосіб дозування препаратів на основі DIM є найкращим, оскільки він містить цілий ряд переваг перед іншими способами дозування, таких як найбільший комфорт для пацієнта, можливість гнучких режимів лікування, а також ефективність вартості лікування. Однак біологічна доступність DIM при пероральному дозуванні сильно обмежена через його дуже низьку розчинність та низьку ефективність абсорбції в тонкому кишечнику. DIM зазвичай демонструє низьку розчинність в фізіологічних рідинах і має дуже обмежену здатність проникати через бар'єрні мембрани. Більше того, добре відома здатність цієї сполуки зв'язуватися з білками плазми крові, а також брати участь в різних неспецифічних взаємодіях в кровотоці, що істотно знижує ефективність його доставки до вогнища захворювання. В якості одного із способів вирішення вищевказаних проблем недавно були запропоновані декілька

фармацевтичних композицій на основі пегільованого вітаміну E (TPGS), (Anderton MJ, Manson MM et al. (2004) Physiological modeling of formulated and crystalline Diindolylmethane pharmacokinetics following oral administration in mice. Drug metabolism and Disposition, 32 (6), 632-638), відомого своєю здатністю збільшувати водну розчинність різних сполук (Constantinides PP, Tustian A, Kessler DR (2004) Tocol emulsions for drug solubilization and parenteral delivery, Adv. Drug Deliv. Rev., 56, 1243-1255) і посилювати їх біологічну доступність при пероральному введенні (Wu SHW, Hopkins WK (1999) Characteristics of da-tocopheryl PEG 1000 succinate for applications as an absorption enhancer in drug delivery systems, Pharm. Technol, 23, 52 -68). Проте використання композицій на основі TPGS дозволило досягти тільки дуже невеликого (не більш ніж в 1,5-2 рази) збільшення біологічної доступності DIM, його аналогів і похідних (Zeligs et al. US patent 6.416.793 Formulation and use of controlled-release indole alkaloids), що не дозволяє повною мірою використовувати терапевтичний потенціал цих сполук.

#### СУТНІСТЬ ВИНАХОДУ

Таким чином, завданням цього винаходу є вирішення проблеми поліпшеної доставки DIM.

Задача вирішується новими фармацевтичними композиціями для пероральної доставки DIM на основі блок-сополімерів оксиетилена і оксипропілена.

Фармацевтична композиція для перорального введення містить 3,3'-диіндолілметан в якості активного компонента і цільову добавку, причому вона містить в якості цільової добавки блок-сополімер оксиетилена і оксипропілена, в якому вміст гідрофобного блоку складає менше 50 мас.%, а молекулярна маса гідрофільного блоку складає 2250 Да й більше, при співвідношенні активного компонента і вибраного блок-сополімеру 10: 1-2:1.

Фармацевтична композиція переважно містить як блок-сополімер оксиетилена і оксипропілена Пльоронік F127.

Фармацевтична композиція може містити додатково Пльоронік L10.

Фармацевтична композиція може також містити додатково фармацевтично прийнятний носій.

Фармацевтична композиція може являти собою таблетку, ліофілізований порошок, суспензію або капсулу.

#### ПЕРЕЛІК КРЕСЛЕНЬ

Фігура 1 - динаміка розчинення DIM (визначення концентрації DIM за зміною оптичної щільності):

Композиція 1 - DIM (контроль)

Композиція 2 - Пльоронік F127 і DIM,

Композиція 3 - Пльоронік F127, Пльоронік L10 і DIM,

Фігура 2 - фармакокінетика DIM в плазмі щурів, які отримали такі композиції:

Композиція 1 - DIM (контроль),

Композиція 2 - Пльоронік F 127, Пльоронік L10 і DIM,

Композиція 3 - ліофільно висушений розчин Пльоронік F127, Пльоронік L10 і DIM,

Композиція 4 - Пльоронік F127 і DIM,

Композиція 5 - Пльоронік L10 і DIM,

Фігура 3 - дані морфологічного дослідження по пацієнтах з аденомою передміхурової залози (АПЗ) і інтраепітеліальною неоплазією простати (СІН) до і після лікування:

Група I - (18 пацієнтів) брали фармацевтичну композицію з DIM згідно винаходу.

Група II - (16 пацієнтів) брали фармацевтичну композицію з кристалічним DIM.

Фігура 4 - дані імуногістохімічного аналізу, досліджувалися такі показники, як фактори росту IGF і EGF, регулюючий фактор TGF-D, до і після призначення препаратів:

Група I - (4 пацієнта) брали заявлену фармацевтичну композицію з DIM.

Група II - (4 пацієнта) брали фармацевтичну композицію з кристалічним DIM.

#### ПРИКЛАДИ ЗДІЙСНЕННЯ ВИНАХОДУ

Блок-сополімери оксиетилена і оксипропілена, також відомі під назвою «Пльоронік» або «Полоксамер».

Гідрофобно-гідрофільні властивості Пльоронік та їх здатність солюбілізувати водонерозчинні сполуки визначаються розмірами і співвідношенням поліоксигетіленового (гідрофільного) і поліоксипропіленового (гідрофобного) блоків. Наступна таблиця (Таблиця 1) підсумовує структурні властивості різних Пльороніків.

Таблиця 1

## Структурні властивості різних Пліуроніків

Пліуронік	Маса гідрофільного блоку, Да	Склад гідрофобного блоку, мас. %
L10	3200	60%
L31	950	90%
F35	950	50%
L42	1200	80%
L43	1200	70%
L44	1200	60%
L61	1750	90%
L62	1750	80%
L63	1750	70%
P65	1750	50%
F68	1750	20%
L72	2050	80%
P75	2050	50%
L81	2250	90%
P84	2250	60%
P85	2250	50%
F87	2250	30%
F88	2250	20%
L92	2750	80%
F98	2750	20%
P103	3250	70%
P104	3250	60%
P105	3250	50%
F108	3250	20%
L121	4000	90%
L122	4000	80%
L123	4000	70%
F127	4000	30%
10R5	1000	50%
10R8	1000	20%
12R3	1200	70%
17R2	1700	80%
17R3	1700	80%
17R4	1700	60%
17R8	1700	20%
22R4	2200	60%
25R1	2500	90%
25R2	2500	80%
25R4	2500	60%
25R5	2500	50%
25R8	2500	50%
31R1	3100	90%
31R2	3100	80%
31R4	3100	60%

Незважаючи на те, що зазначені блок-сополімери широко використовуються у фармацевтичних та косметичних композиціях, в тому числі, і для збільшення розчинності гідрофобних водонерозчинних сполук (Foster B, Cosgrove T, Hammouda B (2009) Pluronic triblock copolymer systems and their interactions with ibuprofen, Langmuir, 25 (12), 6760-6766), потрібно індивідуальне рішення про їх використання для кожного конкретного препарату.

В даний час відомо понад п'ятдесят АТФ-залежних транспортерів, які в тій чи іншій мірі можуть впливати на біологічну доступність ліків (Oostendorp RL, Beijnen JH, Schellens JH. (2009) The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier, *Cancer Treat Rev*, 35 (2), 137-147). Більш того, генетичний поліморфізм цих транспортерів також вносить значний вклад в варіабельність біодоступності різних ліків (Nakamura T, Yamamori M, Sakaeda T. (2008) Pharmacogenetics of intestinal absorption, *Curr Drug Deliv*, 5 (3), 153 -169). Точні механізми взаємодії різних поверхнево-активних полімерів з різними транспортерами та їх комбінаціями, що обмежують біодоступність різних ліків, в даний час не встановлені, і композиція, що зробила позитивний ефект на біодоступність однієї активної речовини може виявитися неефективною для іншої і навпаки.

Що стосується використання блок-сополімерів оксиетилена і оксипропілена для посилення оральної біодоступності сполук, то її пов'язують з модулюванням активності Р-глікопротеїну, і відповідно вони пропонуються в складі композицій, де активні речовини є субстратами Р-глікопротеїну (Kabanov et al. US patent 6.277.410 Copolymer compositions for oral delivery) і деяких форм MRP (Miller DW, Batrakova EV, Kabanov AV (1999) Inhibition of multidrug resistance-associated protein (MRP) functional activity with pluronic block copolymers, *Pharm Res*, 16 (3), .396 - 401). Подібні властивості були також продемонстровані для інших полімерних поверхнево-активних сполук. Зокрема, на додаток до високої солюбілізуючої активності відносно водонерозчинних сполук, була описана здатність Solutol HI 5 модулювати активність Р-глікопротеїну (Coon JS, Knudson W, Clodfelter Do et al. (1991) Solutol HS 15, Nontoxic Polyoxyethylene Esters of 12 - Hydroxystearic Acid, Reverses Multidrug Resistance, *Cancer Res*, 51, 897-902), що потенційно відкриває можливість його застосування як підсилювача абсорбції пероральних лікарських форм. Аналогічні властивості були також описані для Chremophor EL, Tween 80, вищезазначеного TPGS та інших їм подібних сполук (Seelig A, Gerebtzoff G (2006) Enhancement of drug absorption by noncharged detergents through membrane and P-glycoprotein binding, *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 2 (5), 733-752). Прямий експеримент, опис якого наводиться нижче (приклад 8), показав, що DIM не викликає посилення захоплення родаміну 123 клітинами, які експресують Р-глікопротеїн, що вказує на те, що DIM не є субстратом цього транспортера. Це добре узгоджується з результатами згаданої вище спроби застосувати високоактивний модулятор Р-глікопротеїну TPGS для збільшення біодоступності DIM, що не призвела до істотного поліпшення цього параметра. Разом з тим використання ряду поверхнево-активних полімерів, описуваних даним винаходом, призвело до значного підвищення оральної біодоступності ліків.

Аналіз розчинності DIM у Пліуроніках з різним вмістом гідрофобних і гідрофільних блоків показав, що полімери, що містять 50 мас.% і більше гідрофільного блоку, мають більш високу солюбілізуючу здатність, ніж полімери, що містять менше 50 мас.% гідрофільного блоку. При цьому відомо, що у ряду Пліуроніків молекулярна маса гідрофобного елемента постійна, а вміст оксиетиленових груп змінюється. Несподівано виявилось, що біодоступність DIM залежить також і від молекулярної маси гідрофільного блоку. Більш високу біодоступність забезпечують блок-сополімери оксиетилена і оксипропілена, в яких вміст гідрофобного блоку складає менше 50 мас.%, а молекулярна маса гідрофільного блоку складає 2250 Да й більше. Найбільш ефективним виявився Пліуронік F127, що дозволяє отримати стабільні водні дисперсії, що містять більше 3 мг/ мл DIM. Пероральне введення такої композиції DIM щурам дозволило значно (більш ніж у 5 разів) підвищити його біологічну доступність.

Співвідношення активного компонента і вибраного блок-сополімеру може варіювати в залежності від бажаної тривалості вивільнення і становить в середньому 10:1-2:1. Найбільш оптимальне співвідношення Пліуронік F127 і DIM виявилось 6: 1. Також несподівано Пліуронік L10 (вміст гідрофільного блоку близько 40% і загальна молекулярна маса близько 3200), який надавав малий ефект на водну розчинність DIM і його біологічну доступність при пероральному введенні щурам, виявився здатним значно посилювати ефект Пліуронік F 127, що призвело до збільшення біодоступності формуляції DIM більш ніж в 15 разів у порівнянні з контролем. Оптимальне співвідношення Пліуронік F127 і Пліуронік L10 виявилось 8:1 -1:1. Також несподівано, що інші Пліуроніки з вмістом гідрофільного блоку менше 50%, наприклад, Пліуронік P85 і Пліуронік L61 подібного ефекту не справили. Композиції згідно винаходу можуть бути отримані, наприклад, шляхом спільного чи роздільного розчинення компонентів у відповідних розчинниках, таких як вода, спиртові або водно-спиртові розчини, подальшого змішування отриманих розчинів в необхідних пропорціях.

Отримані розчини необов'язково можуть бути висушені для отримання твердої лікарської форми. Висушування проводять будь-яким технологічно відповідним методом або їх комбінацією, включаючи, але не обмежуючись такими методами як упарювання на роторному

випарнику або спідваку, ліофільна сушка, сушка в потоці. Готові лікарські форми можуть бути отримані шляхом таблетування висушених композицій з використанням необхідних ексципієнтів, наприклад, стеарату натрію, лактози, похідних целюлози та ін..

5 Готові лікарські форми можуть бути отримані шляхом упаковки висушених композицій в капсули, наприклад, желатинові капсули з твердою оболонкою.

Фармацевтичні композиції, що містять ефективну кількість DIM, можуть використовуватися для лікування різних захворювань.

10 Враховуючи вищезгадані молекулярні мішені дії DIM, а саме, позитивний вплив на метаболізм естрогенів, відновлення процесів апоптозу, антипроліферативну, протипухлинну та антиангіогенну активність, описані суміші пропонуються для лікування таких проліферативних захворювань як міома матки, аденоміоз, гіперпластичні захворювання передміхурової залози. Нами також продемонстрована висока клінічна ефективність DIM з підвищеною біодоступністю при лікуванні інфекційних захворювань уrogenітального тракту, викликаних такими внутрішньоклітинними інфекційними агентами як *Chlamydia trachomatis*. Скоріш за все ці ефекти

15 обумовлені індукцією програмованої клітинної загибелі епітеліальних клітин, інфікованих *Chlamydia trachomatis*.  
Ефективна кількість диіндолілметана, необхідна для лікування і профілактики, може змінюватись в залежності від виду та тяжкості захворювання, віку та стану пацієнта і може бути визначена у кожному конкретному випадку лікарем. При цьому використовувані дози

20 знаходяться в межах від 2 до 2000 мг на добу.  
Винахід ілюструється наступними прикладами:

Приклад 1

Визначення розчинності DIM у водних дисперсіях різних Пльороніків

Приготування розчину Пльороніка

25 У скляну ємність вносимо 400 мг Пльороніка, 9,7 мл зневодненого етилового спирту і 0,3 мл дистильованої води. Отриману суміш ретельно перемішуємо на магнітній мішалці до отримання прозорого розчину.

Приготування розчину DIM

30 У скляну ємність вносимо 10 мг DIM, додаємо 1,0 мл зневодненого етилового спирту. Ретельно перемішуємо на магнітній мішалці до отримання прозорого розчину.

Приготування молекулярних дисперсій, що містять Пльоронік і DIM.

35 В пробірку об'ємом 2 мл внести 0,5 мл розчину Пльороніка (20мг) і 0,2мл розчину DIM. Отриманий розчин обробити ультразвуком протягом 10 хв і перемішати протягом 1:00. Етанол з отриманої суміші видалити на роторному випарнику або «спідваку» і продовжити випарювання під вакуумом протягом ночі. В результаті проведених маніпуляцій отриману суміш розчиняють в 1,5 мл дистильованої води, фільтрують і визначають концентрацію DIM в отриманому розчині, використовуючи спектрометричний метод. Результати, наведені у таблиці (Таблиця 2), свідчать, що найбільш високу розчинність DIM вдається отримати при використанні Пльороніка F 127.

Таблиця 2

Розчинність DIM у водних дисперсіях різних Пльороніків

Пльоронік	Маса гідрофільних блоків	Вміст гідрофобних блоків	Розчинність DIM у воді, мг / мл
L10	1000	60%	> 0.01
L31	950	90%	> 0.01
F35	950	50%	0.15
L42	1200	80%	> 0.01
L43	1200	70%	> 0.01
L44	1200	60%	0.1
L61	1750	90%	> 0.01
L62	1750	80%	> 0.01
L63	1750	70%	>0.01
P65	1750	50%	0.2
F68	1750	20%	0.35
L72	2050	80%	> 0.01
P75	2050	50%	0.33
L81	2250	90%	> 0.01
P84	2250	60%	0.15



P85	2250	50%	1.2
F87	2250	30%	0.9
F88	2250	20%	0.8
L92	2750	80%	> 0.01
F98	2750	20%	0.4
P103	3250	70%	> 0.01
P104	3250	60%	0.3
P105	3250	50%	0.5
F108	3250	20%	0.5
L121	4000	90%	> 0.01
L122	4000	80%	> 0.01
L123	4000	70%	0.02
F127	4000	30%	<3.0

#### Приклад 2

Приготування молекулярних суспензій, що містять Пльоронік F127 та DIM

Приготування розчину Пльороніка F127

- 5 У скляну ємність вносимо 400 мг Пльороніка F127, 9,7 мл зневодненого етилового спирту і 0,3 мл дистильованої води. Отриману суміш ретельно перемішуємо на магнітній мішалці до отримання прозорого розчину.

Приготування розчину DIM

- 10 У скляну ємність вносимо 10 мг DIM, додаємо 1,0 мл зневодненого етилового спирту. Ретельно перемішуємо на магнітній мішалці до отримання прозорого розчину. Приготування молекулярних суспензій, що містять Пльоронік F127 і DIM. В пробірку об'ємом 2 мл внести 0,5 мл розчину Пльороніка F127 (20мг) і 0,2мл розчину DIM. Отриманий розчин обробити ультразвуком протягом 10 хв і перемішати протягом 1:00. Етанол з отриманої суміші видалити на роторному випарнику або «спідваку» і продовжити випарювання під вакуумом протягом ночі.
- 15 В результаті проведених маніпуляцій виходить воскоподібна маса, яку слід розчинити в дистильованій воді до кінцевої концентрації DIM 3 мг в мл.

#### Приклад 3

Приготування молекулярних суспензій, що містять Пльоронік F127, Пльоронік L10 та DIM.

Приготування розчину Пльороніка L10.

- 20 У скляну ємність вносимо 250 мг Пльороніка L10 і 10 мл зневодненого етилового спирту. Отриману суміш ретельно перемішуємо на магнітній мішалці.

Приготування розчину Пльороніка F127

- 25 У скляну ємність вносимо 400 мг Пльороніка F127 і 9,7 мл і зневодненого етилового спирту і 0,3 мл дистильованої води. Отриману суміш ретельно перемішуємо на магнітній мішалці до отримання прозорого розчину.

Приготування розчину DIM

У скляну ємність вносимо 10 мг DIM, додаємо 1,0 мл зневодненого етилового спирту. Ретельно перемішуємо на магнітній мішалці до отримання прозорого розчину.

Приготування молекулярних суспензій, що містять Пльоронік F127, Пльоронік L10 і DIM.

- 30 В пробірку об'ємом 2 мл внести 0,5 мл розчину Пльороніка F127 (20мг), 0,2мл розчину DIM і 0,1 мл Пльороніка L10. Отриманий розчин обробити ультразвуком протягом 10 хв та перемішати протягом 1:00. Етанол з отриманої суміші видалити на роторному випарнику або «спідваку» і продовжити випарювання під вакуумом протягом ночі. В результаті проведених маніпуляцій виходить воскоподібна маса, яку слід розчинити в дистильованій воді до кінцевої концентрації DIM 3 мг в мл.

- 35 DIM 3 мг в мл.

#### Приклад 4

Приготування водорозчинної композиції DIM методом ліофілізації 1 мл дистильованої води додати до одного з розчинів DIM з пльороніками, описаними у прикладах 1 і 2. Суміш перемішати на мішалці до отримання прозорого розчину. Розчин стабільний протягом 15 годин.

40 Отриманий розчин заморожується і поміщається в ліофілну сушку. В результаті ліофілізації із замороженого стану виходить білий безбарвний порошок.

#### Приклад 5

Отримання композиції DIM методом розпилювальної сушки

- 45 В 20-літровий скляний контейнер завантажити 200 гр Пльороніка F127, 300 мл дистильованої води, 10 літрів етанолу. Суміш перемішувати до повного розчинення Пльороніка і отримання прозорого розчину. До отриманого розчину додати 25 г. Пльороніка L10 і 20 г DIM. Отриману

суміш перемішувати до отримання прозорого розчину і відфільтрувати. Отриманий розчин висушується на розпилювальній сушці при температурі 40 ° С.

#### Приклад 6

Отримання композиції прямим розчиненням DIM в розплавлених пліуроніках. Пліуроніки F98, F127, або їх поєднання в оптимальній пропорції (F98 і F127, приблизно, 1: 4) змішуються і розплавляються (температура 60 ° С), після чого DIM в кристалічному вигляді вноситься в розплавлену масу при інтенсивному перемішуванні. Після розчинення DIM розчин швидко охолоджується до +5 ° С. Утворюється тверда маса, яка розмелюється до порошкоподібного стану.

#### Приклад 7

Дослідження розчинності складів, що містять DIM.

Досліджувалася розчинність в воді композицій DIM, отриманих в прикладах 2-3. Для цих цілей до кожної з отриманих композицій (навішування містили по 6 мг DIM) додавали 2 мл 0,9% водного розчину хлориду натрію і поміщали в горизонтальний шейкер, що обертається зі швидкістю 200 оборотів на хв. Зразки по 0,2 мл періодично відбиралися для визначення концентрації DIM по зміні оптичної щільності. На малюнку представлені результати експериментів (Фігура 1).

#### Приклад 8

Дослідження інгібуючої активності DIM щодо мембранного Р-глікопротеїну

В якості моделі для проведення експериментів вивчалася поглинання родаміну (Rhodamine 123 (R123) клітинами MESSA/DX, які експресують мембранний Р-глікопротеїн (Р-гр). Р-др негативні клітини MESSA/DX використовували в якості контролю. Клітини поміщали в 96-луночну плату в концентрації 40 000 клітин на лунку. Після 24 годин інкубації до клітин додавали R123 в концентрації 3 мкм та інкубували 1:00 при 37 ° С в присутності різних концентрацій DIM і верапамілу-відомого інгібітору Р-гр. Після інкубації розчин видалявся, а клітини тричі відмивали охолодженим фосфатним буфером. Після цього в клітинних зразках вимірювали флуоресценцію родаміну. Всі експерименти виконувалися триразово. Як і очікувалося, клітини MESSA / DX, що експресують мембранний Р-глікопротеїн (Р-др), слабо поглинають родамін порівняно до Р-гр негативних клітин MESSA. Верапаміл -відомий інгібітор Р-гр в доза-залежній манері підвищує накопичення R123 в клітинах MESSA / DX, але не впливає на його накопичення в клітинах MESSA. DIM в концентрації 500 мкм не впливає на накопичення R123 в жодній з клітинних ліній, що однозначно свідчить про те, що DIM не є субстратом Р-гр.

#### Приклад 9

Фармакокінетика DIM у експериментальних тварин, які отримують композиції DIM. Для дослідження використовували композиції DIM, отримані в прикладах 2-4. Результати підсумовані в таблиці, наведеній в кінці цього прикладу. Композиції давали тваринам перорально у вигляді водних дисперсій з кінцевою концентрацією DIM 3 мг в мл. Кристалічний DIM давали у вигляді суспензії 15 мг DIM в 5 мл 0,5% метилцелюлози в дистильованій воді.

В експерименті використовували самок щурів породи Female Sprague-Dawley вагою 250-350 г. Всі дослідження проводилися в повній відповідності з правилами GLP. Формуляції DIM призначалися тваринам в дозуванні 60 мг на кг ваги. Після отримання препаратів в різні інтервали часу (15, 30, 45 хв та 1, 2, 4, 6 і 24 години) у тварин збирали зразки крові. Відразу після забору зразки крові центрифугували, а відокремлену плазму заморожували і зберігали при - 80 ° С. Ізофлуран (Bimeta-MTC, Animal Health Inc. Cambridge, ON, Canada). Забір крові проводився з яремної вени в пробірки з гепарином, які негайно поміщали в лід на 5 -10 хвилин. Потім кров піддавали центрифугуванню для її відокремлення від плазми. Зразки з плазмою заморожували і зберігали при -80 ° С.

#### Екстракція та аналіз зразка

Зразки з плазмою розморожували, центрифугували, аліквоти по 100 мкл розфасовували у пластикові пробірки. Далі зразки двічі екстрагували за допомогою 750 мкл метил-трет-бутилового ефіру протягом 2 хв перемішування при 180 ° С. Зразки центрифугували при 10 000 протягом 10 хвилин. Супернатант відокремлювали і переносили в скляні пробірки. Органічна фаза випаровувалася з допомогою азоту при 50 ° С до повного висушування. Висушені зразки зберігали при температурі -80 ° С. Досліджувані зразки розводили в 15 мкл ацетонітрилу і 85 мкл рухомої фази. Далі аліквоти в обсязі 20 мкл аналізували за допомогою методу HPLC.

Проведення HPLC:

С18 зворотньо-фазові колонки 50 x 4,6 MM, Symmetry / shield 3,5 мкм (сорбент, зернення в мкм), 30 ° С, швидкість потоку 1,5 мл / хв, об'єм ін'єкції 20 мкл, при 280 нм. Рухома фаза: лінійний градієнт буфера В від 0 до 100%, буфер А: 5% ацетонітрil, 0,1 трифторуксусна кислота, буфер В: 90% ацетонітрil, 0,1% трифторуксусна кислота, протягом 10 хвилин. Концентрацію DIM розраховували за допомогою калібрувальної кривої, виходячи з площі піка

(AUP). Площу під кривими розраховували (AUC), використовуючи формулу трапецій (використовується для обчислення певних інтегралів). Значення  $C_{max}$  і AUC для контролю і досліджуваних композицій представлені в наступній таблиці (Таблиця 3).

Таблиця 3

## Фармакокінетика DIM в різних композиціях

Група	Композиція	$C_{max}$ [pg/mL]	Відношення $C_{max}$ Композиція/ контроль	AUC 0-24h [ $\mu$ g h/mL]	Відношення AUC 0-24h Композиція/ контроль
1	Контроль (0,5% метил- целюлоза)	0,22±0,02		3,88±0,08	
2	L10/F127 (приклад 3)	4,47±0,17	20,3	56,76±6,25	14,6
3	L10/F127 (ліофільно- висушений, приклад 4)	4,99±0,64	22,7	58,56±7,76	15,1
4	F127 (приклад 2)	3,08±0,17	14	21,55±3,31	5,6
5	L10 (приклад 2)	0,55±0,04	2,5	7,75±0,32	2,0

5

Графічна презентація даних показана на наступному малюнку - фармакокінетика DIM в плазмі щурів, які отримали вищевказані композиції (див. Фігура 2).

Приклад 10

Вивчення клінічної ефективності фармацевтичної композиції DIM, отриманої за Прикладом

10

2.

Мета дослідження

Оцінити клінічну ефективність, морфологічні ефекти і безпеку фармацевтичної композиції з DIM в новій композиції (містить в одній капсулі 50 мг Диіндолілметана) в порівнянні з фармацевтичною композицією, яка містить кристалічний DIM (містить в одній капсулі 50 мг кристалічного Диіндолілметана).

15

Завдання дослідження

- Оцінити вплив препаратів на динаміку симптомів порушення функції нижніх сечових шляхів (НЧСШ) і якість життя хворих аденомою передміхурової залози АПЗ;

20

- Оцінити вплив препаратів на основні уродинамічні показники: максимальну швидкість потоку сечі ( $Q_{max}$ ) і обсяг залишкової сечі ( $V_{res}$ );

- Оцінити вплив препаратів на динаміку PSA;

- Оцінити вплив препаратів на обсяг передміхурової залози;

- Оцінити характер морфологічних ефектів препаратів на тканину передміхурової залози в порівнянні з плацебо;

25

- Оцінити безпеку препаратів на підставі аналізу частоти небажаних явищ, побічних ефектів і динаміки основних біохімічних параметрів сироватки крові.

Для проведення випробувань були пред'явлені:

Фармацевтична композиція з DIM згідно винаходу (група I)-2 капсули / 2 рази на день.

Фармацевтична композиція з кристалічним DIM (група II) - 2 капсули / 2 рази на день.

30

Для оцінки клінічної ефективності, морфологічних ефектів та безпеки препаратів, обстежено і проліковано 34 пацієнта з аденомою передміхурової залози (АПЗ) і інтраепітеліальною неоплазією простати (ПІН). Група I (18 пацієнтів) приймала запропоновану фармацевтичну композицію з DIM по 2 капсули двічі на день, група II (16 пацієнтів) приймала фармацевтичну композицію з кристалічним DIM по 2 капсули двічі на день.

35

Хворі були відібрані на лікування за наступними критеріями

- амбулаторні і стаціонарні хворі з симптоматичною і морфологічно підтвердженою АПЗ та ПІН;

- вік старше 50 років;

- пацієнти, що дали письмову згоду і дотримуються вказівки лікаря, щодо призначеної терапії;

- вираженість симптомів за шкалою I-PSS понад 7 балів;
- Qmax більше 5 і менше 15 мл / с;
- 5 - Залишкової сечі не більше 200 мл;
- Об'єм простати більше 25 куб. см;
- PSA-до 10 нг/мл.

Оцінка впливу препарату на клінічний стан

10 У вихідній тимчасовій точці (V1) в обох групах було зафіксовано 2 морфологічних характеристики: L-PIN і H-PIN. У результаті впливу препарату стан пацієнта погіршувався, залишався незмінним або спостерігалася поліпшення. Усього можливо 7 варіантів клінічної відповіді в інтервалі часу між V1 і V2. В даному випадку представляється можливим віднести оцінку клінічної зміни (між V1 і V2) до порядкової шкали. Найбільшу чутливість для порівняння клінічної зміни в досліджуваних групах має критерій Манн-Уїїні:

15 Зміни даних морфологічного дослідження по всіх пацієнтах представлені на малюнку (див. Фігура 3), який показує зміну морфологічної характеристики в групах I і II в ході дослідження.

На підставі отриманого двостороннього рівня значущості за результатами впливу терапії, групи I (приймали фармацевтичну композицію з DIM згідно винаходу) і II (приймали фармацевтичну композицію з кристалічним DIM) значимо відрізнялися ( $p = 0.002$ ).

20 Порівняння частоти малігнізації

Окремо вивчалась відмінність частоти малігнізації в досліджуваних групах.

В основній групі (фармацевтична композиція з DIM в новій формуляції, 18 пацієнтів) випадків малігнізації не відзначено. У контрольній групі (фармацевтична композиція з кристалічним DIM, 16 пацієнтів) зафіксовано 4 випадки розвитку раку передміхурової залози. Беручи до уваги ймовірну помилку апроксимації хі-квадрат, для аналізу частот ознак використовувався точний критерій Фішера.

Висновок: Досліджувані групи розрізняються за частотою малігнізації, відмінності статистично значущі ( $p = 0,039$ ).

Оцінка впливу заявленої Фармацевтичної композиції з DIM на імуногістохімічні показники

30 Імуногістохімічний аналіз проводився удвох груп пацієнтів, які налічують по чотири людини з групи брали фармацевтичну композицію з DIM у новій формі (група I) та фармацевтичну композицію з кристалічним DIM (група II), відповідно. Оцінювалися такі показники, як фактори росту IGF і EGF, регулюючий фактор TGF-D, до і після призначення досліджуваних препаратів. При статистично однорідних вихідних значеннях IGF, EGF і TGF-D, відзначалися такі зміни рівня досліджуваних параметрів при подальшому вимірі:

35 Відзначається статистично достовірне зниження факторів росту IGF ( $p = 0.004$ ) і EGF ( $p = 0.002$ ), а також підвищення рівня TGF-D ( $p = 0.047$ ), в групі пацієнтів, що приймали фармацевтичну композицію з DIM в новій формуляції. У контрольній групі достовірної динаміки не відзначено. Більш наочно отримані дані відображено в наведеному нижче малюнку (див. Фігура 4).

Висновок

45 Отримані дані достовірного зниження факторів росту IGF і EGF, підвищення рівня TGF-D в групі приймаючих заявлену фармацевтичну композицію з DIM говорять про вплив діючих речовин препарату на основні сигнальні механізми патологічної клітинної проліферації, а також на індукцію апоптозу трансформованих клітин.

В ході лікування побічних ефектів і небажаних явищ не зареєстровано.

Фармацевтична композиція з DIM в новій формуляції має антипроліферативну активність у хворих з аденомою передміхурової залози і простатичною інтроепітеліальною неоплазією.

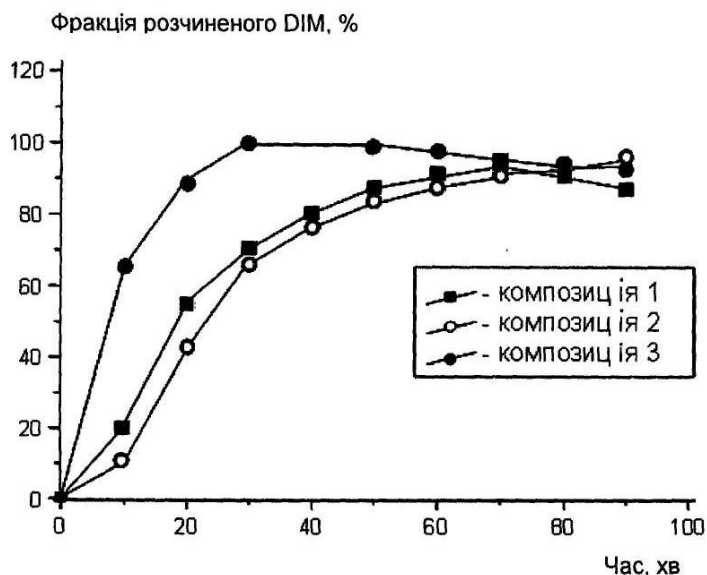
50 Фармацевтична композиція з DIM в новій формуляції є безпечним засобом у лікуванні АПЗ та ПІН з причини відсутності побічних ефектів і небажаних явищ в ході лікування.

## ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

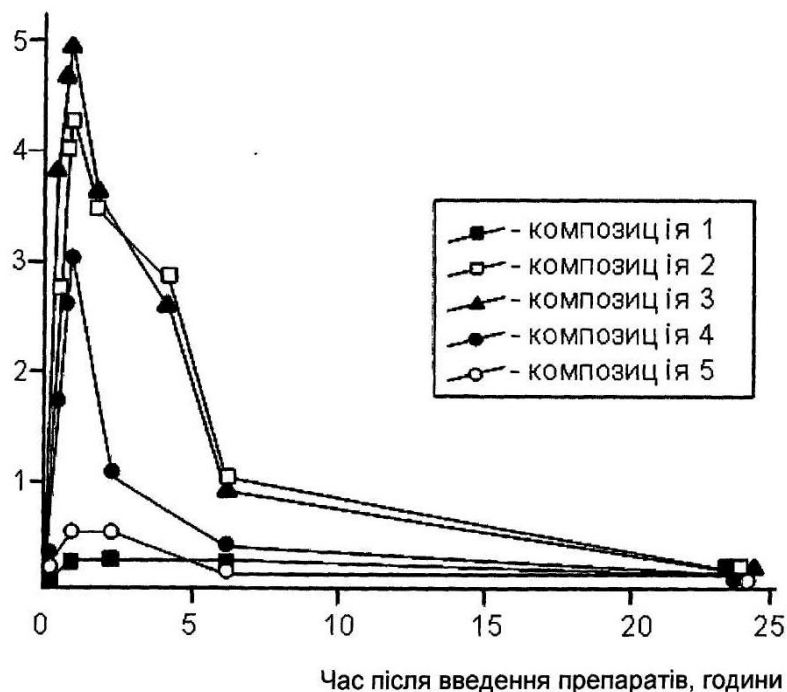
55 1. Фармацевтична композиція для перорального введення, що містить 3,3'-дііндолілметан як активний компонент і цільову добавку, яка **відрізняється** тим, що цільовою добавкою є блок-співполімер оксіетилену і оксипропілену, в якому вміст гідрофобного блока складає менше ніж 50 мас. %, а молекулярна маса гідрофільного блока складає 2250 Да й більше, при співвідношенні вибраного блок-співполімеру і активного компонента 10:1-2:1.

60 2. Фармацевтична композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що блок-співполімером оксіетилену і оксипропілену є Пліуронік F127.

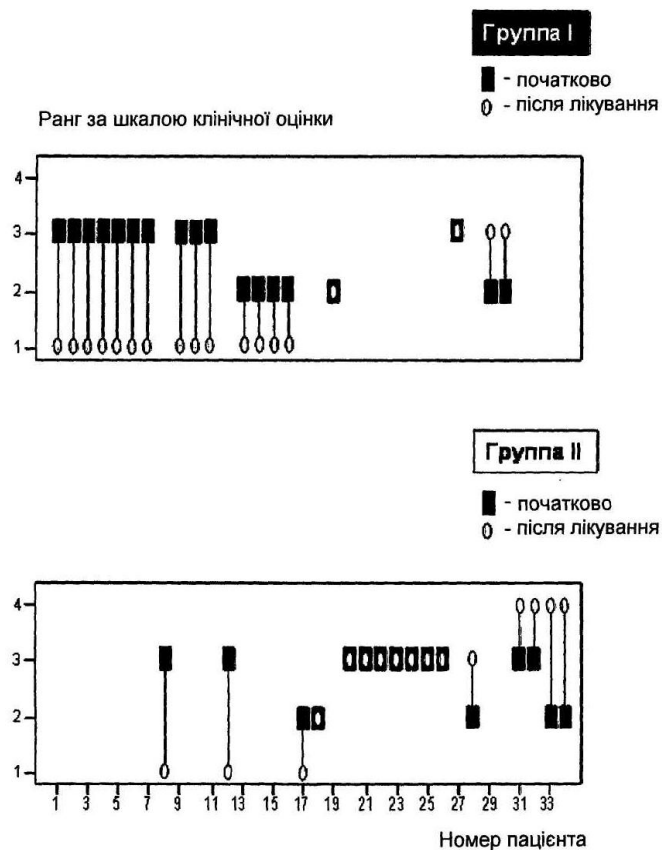
3. Фармацевтична композиція за п. 2, яка **відрізняється** тим, що додатково містить Плуронік L10.
4. Фармацевтична композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що додатково містить фармацевтично прийнятний носій.
5. Фармацевтична композиція за п. 4, яка **відрізняється** тим, що являє собою таблетку, ліофілізований порошок, суспензію або капсулу.



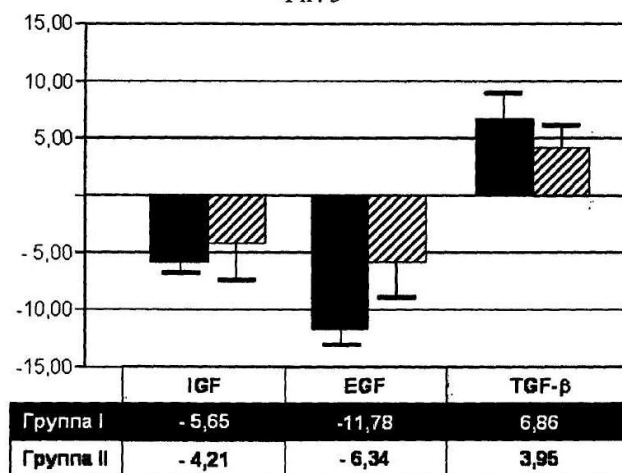
Фіг. 1  
Концентрація DIM у плазмі, мкг/мл



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601