



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101903** (13) **C2**

(51) МПК (2013.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

A61P 31/00

A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2012 01224	(72) Винахідник(и):	Кісєльов Всєволод Івановіч (RU)
(22) Дата подання заявки:	05.03.2011	(73) Власник(и):	Кісєльов Всєволод Івановіч, ул. Б. Черемушкинская, д. 25, корп. 1, кв. 16, г. Москва, 117218, Российская Федерация (RU)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	13.05.2013	(74) Представник:	Янішевська Антоніна Леонідівна, реєстр. №133
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	2010116353	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2009/032699 A1, 12.03.2009 RU 2318509 C2, 10.03.2008 RU 2202346 C2, 20.04.2003 McCarty, MF et al. Multifocal angiostatic therapy: an update. Integr. Cancer Ther., vol. 4, no. 4, 11 November 2005, pages 301 - 314
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	26.04.2010		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	RU		
(41) Публікація відомостей про заявку:	11.02.2013, Бюл.№ 3		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	13.05.2013, Бюл.№ 9		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/RU2011/000141, 05.03.2011		

(54) ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ НА ОСНОВІ ДІІНДОЛІЛМЕТАНУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ГІПЕРПЛАСТИЧНИХ ТА ЗАПАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі медицини та хіміко-фармацевтичної промисловості та стосується лікарського засобу для лікування гіперпластичних і запальних захворювань людини. Засіб за винаходом містить як активне начало 3,3'-дііндолілметан і носій, що містить суміш риб'ячого жиру і щонайменше одного полісорбату при визначеному вмісті компонентів.

UA 101903 C2

Область техніки

Винахід відноситься до галузі медицини та хіміко-фармацевтичної промисловості.

Рівень техніки

В даний час в медичній практиці широке поширення отримали засоби на основі індолних сполук, виділених з сімейства хрестоцвітих (Cruciferae), до якого відносяться всі види качанної капусти, брюссельська, цвітна капуста та броколі, а також їхні синтетичні аналоги. Інтерес до сполук цієї групи викликаний, зокрема, їх антиканцерогенними і антиестрогенними властивостями, у зв'язку з чим вони можуть бути використані при лікуванні захворювань органів жіночої репродуктивної системи та деяких гормональних патологій, які супроводжуються гіперпластичними процесами. До числа найбільш поширених захворювань даної категорії відносяться мастопатії, міоми матки, ендометріоз, аденоміоз, дисплазії шийки матки різної етіології, а також гіперплазії щитовидної залози.

У структурі онкологічної захворюваності у жінок пухлини репродуктивних органів займають перше місце, і в середньому захворюваність збільшується на 1 % на рік. У структурі смертності вони стоять на другому місці, при цьому "темпл приросту" за показниками смертності залишається найвищим (28 %). За даними експертів ВООЗ в даний час кожен рік у всьому світі реєструється близько мільйона нових випадків раку молочної залози (РМЗ), одна третина з яких закінчується смертельним результатом. За оцінками ряду дослідників, в наступному десятилітті 5 млн. жінок у всьому світі буде страждати від даної злоякісної пухлини. Відомо, що тканини репродуктивних органів піддаються безперервному впливу безлічі різних чинників, стимулюючих їх до активного поділу (проліферації) та індукують запуск специфічних сигнальних каскадів. Серед них можна виділити три основних внутрішньоклітинних механізми, що призводять до активації клітинної проліферації: 1) гормональний (або естроген-залежний), 2) індукований ростовими факторами і 3) активований прозапальними цитокінами.

Участь естрогенів у розвитку неопластичних процесів в гормон-залежних тканинах (епітелій молочних залоз, ендометрій і шийка матки) в даний час вважається загально визнаною і розглядається як один з провідних етіологічних чинників їх виникнення. В даний час досить добре вивчені патогенетичні механізми розвитку гіперпластичних процесів в молочної залозі. Очевидно, що блокуючи основні канали проведення сигналів, стимулюючих проліферацію клітин молочної залози, ми можемо розраховувати на успіх у профілактиці та лікуванні виникаючих на цій основі патологічних станів. Іншими словами, фармакологічна корекція гіперпроліферативних захворювань органів репродуктивної системи повинна здійснюватися на всіх етапах і по відношенню до всіх сигнальних каскадів, що опосередковують ключові патофізіологічні функції.

Багаторічні пошуки природних сполук, що блокують розвиток гіперпластичних процесів в гормон-залежних тканинах, нарешті, увінчалися успіхом. Одна з таких сполук міститься в овочах сімейства хрестоцвітих (різні види капусти) фітонутрієнти індол-3-карбінол (ІЗС). Протипухлинний захист, що надається ІЗС, обумовлений широким спектром його біологічних активностей. У той же час відомо, що клінічний ефект, що надається ІЗС при тих чи інших патологіях, істотно залежить від індивідуальних особливостей метаболізму пацієнтів, що приймають даний препарат, зокрема, від здатності конвертувати даний препарат ІЗС в різні його похідні, між якими, у свою чергу, можливі синергетичні та / або антагоністичні взаємодії (Dalessandri KM, Firestone GL et al (2004) Pilot study: effect of 3-Diindolylmethane supplements on urinary hormone metabolites in postmenopausal women with a history of early-stage breast cancer. Nutrition and cancer, 50 (2), 161-167).

Одним з похідних індол-3-карбінолу, що утворюється при його олігомеризації, є дііндолілметан (DIM). Ця сполука має практично всі біологічні ефекти, властиві індол-3-карбінолу, в тому числі, й здатність позитивно впливати на зміни в співвідношенні метаболітів естрогену. При цьому DIM не піддається метаболічним перетворенням в організмі людини і є стабільною хімічною сполукою. Ці відмінності індол-3-карбінолу від дііндолілметану роблять використання DIMу кращим у фармацевтичних композиціях з іншими фармакологічно активними субстанціями при лікуванні гіперпластичних і проліферативних захворювань.

Дііндолілметан може використовуватися при різних запальних захворюваннях (WO 2006105196, опубл. 05.10.2006).

Встановлено, що дііндолілметан здатний індукувати проапоптотичну загибель клітин з порушеним метаболізмом. Зокрема, DIM активує один з ключових ферментів апоптозу, каспазу-8, викликаючи загибель трансформованих клітин раку кишечника (Kim EJ, Park SY et al (2007) Activation of caspase-8 contributes to Diindolylmethane-induced apoptosis in colon cancer cells, J of Nutrition, 137, 31-36). Ми припустили, що здатність DIM активувати механізми апоптозу може

поширюватися і на клітини, інфіковані внутрішньоклітинними мікроорганізмами. Зокрема, *Clamidia Trachomatis*.

Хламідійна інфекція має вельми широке поширення і, на думку багатьох авторів, є однією з основних причин жіночого безпліддя. Традиційним методом лікування хламідійних цервіцитів є терапія антибіотиками. Однак майже в 30-40 % після завершення курсу лікування не вдається домогтися повної іррадіації збудника, що призводить до рецидиву захворювання. Справа в тому, що життєвий цикл *Clamidia Trachomatis* складається з різних стадій, одна з яких "тілця включення" має стійкість до антибіотиків. Цей факт пояснює недостатню ефективність терапії антибіотиками.

Дослідники намагалися створити форми з підвищеною абсорбцією дііндолілметану. Зокрема, відома фармацевтична композиція для лікування мастопатії і ендометріозу (патент США 6689387, опублікований 10.02.2004), що являє собою мікрочастинки ІЗС або 3,3'-дііндолілметану в крохмальній матриці, в тому числі, у вигляді твердих лікарських форм для орального введення. Дані форми містять 30-70 % крохмалю, що, підвищуючи розчинність активної речовини, не забезпечує достатньої стабільності в процесі зберігання.

Відомі формуляції DIM на основі пегілірованого вітаміну Е (патент США 6416793, опублікований 09.07.2002). Проте використання композицій на основі TPGS дозволило досягти тільки дуже невеликого (не більш ніж у 1,5-2 рази) збільшення біологічної доступності DIM, його аналогів і похідних, що не дозволяє повною мірою використовувати терапевтичний потенціал цих сполук. Крім того, технологія виготовлення препарату передбачає використання розпилювальної сушки, що є вельми енергоємним процесом і здорожує його виробництво. Найбільш близьким до даного винаходу є рішення, описане в міжнародній заявці WO2009032699 (опубліковане 12.03.2009), що стосується фармацевтичних композицій на основі антипроліферативної комбінації дііндолілметану (DIM), поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) і фолієвої кислоти. Недоліком даних композицій є недостатня стабільність, тому що при зберіганні спостерігається випадання основної речовини у вигляді дрібних кристалів. Крім того, в умовах дефіциту омега-3 жирних кислот у більшості населення, ефекти від використання виділених ПНЖК можуть проявитися як надмірні. Включення фолієвої кислоти за останніми даними небажано для дітей з запальними захворюваннями аутоімунного типу.

Слід зазначити, що індолні похідні довели свою ефективність в педіатричній практиці. Зокрема, індол-3-карбінол і дііндолілметан широко використовуються при лікуванні дитячого респіраторного папіломатозу гортані (Auborn До J (2002) Therapy for recurrent respiratory papillomatosis, Antiviral therapy, 7 (1), 1-9). При використанні

твердих лікарських форм виникають труднощі з дозуванням препарату. Клінічна практика потребує рідких лікарських форм, які дозволять точно дозувати препарат з розрахунку 1 мг на 1 кг ваги.

Сутність винаходу

Задачею винаходу є наступне:

1) розробити лікарські форми на основі дііндолілметану, ефективні при лікуванні хронічних запальних і гіперпластичних процесів, що мають максимальну біодоступність і забезпечують досягнення концентрації активної речовини в крові пацієнтів, що істотно перевищує 200 нг в мл крові;

2) розробити рідку лікарську форму дііндолілметану, зручну для дозування препарату в педіатричній практиці;

Задача вирішується новою лікарською формою 3,3'- дііндолілметану. Нова форма являє собою розчин, що містить активний початок-3, 3'-дііндолілметан, і носій з риб'ячого жиру і, щонайменше, один полісорбат при наступному вмісті компонентів в мас. %:

3,3'-дііндолілметан 1-20 риб'ячий жир 10-20 полісорбат інше

Максимальна біодоступність і стабільність при зберіганні досягається за рахунок підбраного носія з риб'ячого жиру і полісорбату, узятих в певних кількостях. Полісорбати - це поверхнево-активні речовини (ПАР), які є емульгаторами і солюбілізаторами (розчинниками) жирів, як правило, для засобів на водній основі. Номери полісорбатів (20, 40, 60, 80) пов'язані з типом жирних кислот, з'єднаних з частиною молекул (кислот з кокосової олії - полісорбат 20, пальмової - полісорбати 40 і 60, оливкової - полісорбат 80). Згідно винаходу можуть використовуватися будь-які полісорбати або їх суміші. Переважно використання полісорбату 80 або полісорбату 20.

У риб'ячому жирі поліненасичені жирні кислоти, що мають здатність до конкурентного з арахідоною кислотою біосинтезу переважно вазодилатуючих простагландинів і лейкотрієнів, володіють меншою тромбогенною активністю / ЕПК і ДГК /, знаходяться в недостатній

концентрації для прояву власне терапевтичного ефекту, тому використання їх як носія призводить до підвищення біодоступності ДІМ, але не призводить до небажаних ефектів.

Розчин може бути розфасований у флакони темного скла. Також розчин може бути поміщений в капсули. Традиційно лікарські форми на основі олій фасують в м'які желатинові капсули. Однак такі капсули пропускають повітря, ДІМ поступово окислюється, що може супроводжуватися зниженням концентрації основної речовини. Саме тому переважно використання твердих желатинових капсул, покритих гідроксипропілметилцелюлозою або її фталатом. Наприклад, можуть бути використані капсули Licaps, розроблені компанією Capsugel. У ці капсули можна фасувати розчини під аргоном з подальшим запаюванням капсул за допомогою лазера.

Пропонується також застосування лікарського засобу для лікування гіперпластичних і запальних захворювань людини. Прикладами захворювань, при яких корисно призначення даного засобу є: міома, аденоміоз, гіперплазія щитовидної залози, atopічний дерматит, хвороба Крона та інші запальні захворювання кишечника, папіломатоз гортані, хламідійні цервіцити. Переважно засіб вводять з розрахунку 0,5-2 мг 3, 3'-дііндолілметану на кг ваги пацієнта. Проте залежно від тяжкості захворювання, віку, статі, супутніх патологій дози можуть бути збільшені або зменшені.

Перелік креслень

Винахід пояснюється наступними кресленнями:

Фігура 1 - Динаміка зростання прищепленої пухлини MCF-7 у бестімусних (nu / nu) мишей C57B1аск/6 в контролі (-П-) і після внутрішньошлункового введення тваринам пропонованого засобу (Н), та препаратів на основі кристалічного DIM (-А-Фігура 2 - Усереднена динаміка концентрації дііндолілметану в плазмі крові експериментальних тварин при внутрішньошлунковому введенні субстанції дііндолілметану 200,0 мг / кг (в лінійних координатах). Фігура 3 - Усереднена динаміка концентрації дііндолілметану в плазмі крові експериментальних тварин при внутрішньошлунковому введенні субстанції дііндолілметану 200,0 мг / кг (в логарифмічних координатах), Фігура 4 - Усереднена динаміка концентрації дііндолілметану в плазмі крові експериментальних тварин при внутрішньошлунковому введенні капсул дііндолілметану з підвищеною біодоступністю 0,10 мг / кг (в лінійних координатах). Фігура 5 - Усереднена динаміка концентрації дііндолілметану в плазмі крові експериментальних тварин при внутрішньошлунковому введенні капсул дііндолілметану з підвищеною біодоступністю 0,10 мг / кг (в логарифмічних координатах).

Фігура 6 - Продукція цитокінів лімфоцитами периферичної крові хворих на atopічний дерматит до і після лікування.

Фігура 7 - Вплив лікування хворих на atopічний дерматит на рівень загального IgE в сироватці.

Приклади переважного втілення винаходу

Винахід може бути проілюстровано такими прикладами конкретного виконання.

Приклад 1.

Спосіб отримання розчинної лікарської форми дііндолілметану, що має підвищену біодоступність (DIM-High Bioavailability (DIM-HB)).

До полісорбату (або суміші полісорбатів) додають риб'ячий жир в кількості 10-20 % від загальної маси композиції і отриману суміш ретельно перемішують до отримання однорідної рідини. В отриманий розчин вносять субстанцію дііндолілметану 1-20 % (10-200 мг речовини на 1 г композиції) і перемішують до її повного розчинення.

Отриманий розчин фасують у спеціальні капсули або флакони з темного скла.

Приклад 2.

Лікарські форми на основі дііндолілметану.

А. Капсули, що містять 100 мг дііндолілметану. Риб'ячий жир 100 мг, полісорбат 80-400 мг.

Б. Капсули, що містять 50 мг дііндолілметану. Риб'ячий жир 50 мг, полісорбат 80-400 мг.

С. Капсули, що містять 20 мг дііндолілметану. Риб'ячий жир 80 мг, полісорбат 80-450 мг.

Д. Флакони з темного скла, об'ємом 10 мл, що містять розчин, з концентрацією ДІМ 10 мг на 1 гр розчину, 10 % риб'ячого жиру і полісорбат 20 в суміші з полісорбатом 40-інше.

Є. Флакони з темного скла, об'ємом 50 мл, що містять розчин з концентрацією ДІМ 100 мг на 1 гр розчину, 15 % риб'ячого жиру і полісорбат 80-інше.

Приклад 3.

Експериментальне вивчення специфічної фармакологічної активності запропонованого засобу в умовах in vivo.

За 1 тиждень до щеплення пухлинних клітин самкам бестімусних (nu/nu) лінійних мишей C57B1аск / 6 імплантували в підлопаткову область пігулку, що містить 0,72 мг естрадіолу, з якої гормон вивільняється протягом 60 днів.

Для індукції солідних пухлин пухлинні клітини аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7 збирали за допомогою 0,05 % розчину Трипсин-ЕДТА ("Sigma", США), тричі промивали стерильним фосфатно-сольовим буфером (PBS) і потім у кількості 3 млн. клітин в 0,1 мл фізіологічного розчину вводили підшкірно кожній експериментальній тварині в бічну область (кількість живих клітин підраховували за допомогою барвника трипанового синього (0,1 %) і світлового мікроскопа).

Через 24 год. після інокуляції ксеногенних пухлинних клітин молочної залози тваринам з дослідної групи (10 тварин в групі) починали вводити внутрішньошлунково (за допомогою зонда) запропонований засіб за прикладом 2, пункт Д в кількості, еквівалентній 1 мг на одну мишу щодня. Контрольним тваринам вводили фізіологічний розчин.

Розмір солідних пухлин вимірювали 1 раз в 2-3 дня після її появи. Кількісне визначення рівня DIM в плазмі крові у мишей лінії C57B1аск / 6 здійснювали методом HPLC (ВЕРХ) на рідинному хроматографі "System Gold" (Beckman, США) з УФ-детектором зі змінною довжиною хвилі.

Для отримання зразків крові тварин з дослідної групи вводили внутрішньошлунково (за допомогою зонда) запропонований засіб у кількості, еквівалентній 250 мг DIM / кг (всього 36 тварин в групі) та індивідуальну речовину ІЗС в кількості 250 мг DIM / кг (30 тварин в групі). Контрольним тваринам вводили фізіологічний розчин. Через 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0; 6,0; 12,0; 18,0; 24,0 і 36,0 годин після введення запропонованого засобу та через 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0; 6,0; 12,0 і 24,0 години після введення індивідуального речовини DIM в експериментальних тварин (по 3 тварин для кожної часової точки) із хвостової вени гепаринізованим шприцем здійснювали забір периферичної крові. Кожен зразок крові поміщали в пробірку, що містить гепарин. Проби крові центрифугували (10 000 x д, 5 хв), після чого відбирали по 1,5-2,0 мл плазми, заморожували і зберігали при - 20° С. Безпосередньо перед проведенням HPLC-аналізу в дослідні зразки плазми крові об'ємом 250 мкл додавали внутрішній стандарт - 4-метокси-індол (IS) (2,5 мкл розчину концентрації 0,4 мг / мл), перемішували за допомогою Vortex і залишали при кімнатній температурі на 30 хв, після чого зразки двічі екстрагували за допомогою третбуілметилового ефіру (750 мкл).

У кожному зразку органічну фазу відокремлювали від водної центрифугуванням (2 800 x д, 10 хв) і переносили її в нову 4 мл-пробірку. Органічні шари зразків для кожної експериментальної точки об'єднували, ефір упарювали в струмі азоту, до осаду додавали 150 мкл елюента (ацетонітріл/50 ШМ Нерес-буфер (об'ємне співвідношення 40:60, рН 7,4)) і 50 мкл отриманого зразка вводили в хроматограф.

Аналогічні процедури проводили з контрольними зразками плазми крові, в які потім були внесені задані кількості дііндолілметану в діапазоні концентрацій: для: 0,05-10,0мкг / мл.

Кількісне визначення дііндолілметану в плазмі крові проводили на рідинному хроматографі "System Gold" (Beckman, США) з УФ-детектором при довжині хвилі 280 нм.

Рідинна хроматографія проводилася при кімнатній температурі (22°- 24° С) на колонці Nucleosil, C18, 5 мкм (4,6 x 50 мм). Елюент (рухома фаза) складався з води і ацетонітрилу (АЦ). Перед хроматографуванням рухливу фазу дегазували і фільтрували. Елюція здійснювалася градієнтом концентрації АЦ за наступною схемою: 1) від 15 % до 60 % АЦ протягом перших 20 хв; 2) лінійний градієнт АЦ від 60 % до 65 % з 20 по 40 хв; 3) лінійний градієнт АЦ від 65 % до 85 % з 40 по 65 хв, 4) повторне урівноваження колонки 15 % АЦ протягом 5 хв. Сумарна тривалість елюції складала 70 хв, швидкість елюювання -1 мл / хв.

Концентрацію DIM в експериментальних зразках визначали за калібрувальними графіками, що відображають залежність між концентраціями даних речовин в пробі і площами хроматографічних піків.

Мінімальна чутливість методу HPLC-аналізу складала 0,05 мкг / мл.

Протипухлинну ефективність даних сполук оцінювали, визначаючи обсяг солідної пухлини у дослідній і контрольній групах тварин.

Як видно з Фіг. 1, починаючи приблизно з 12 дня від початку експерименту у тварин контрольної групи, що не отримували пропонованого засобу, відзначалося інтенсивне зростання солідних пухлин. Протягом наступних 20 днів (з 14 по 34 день експерименту) середній розмір пухлини, індукованої клітинами аденокарциноми людини лінії MCF-7, збільшився - в 10 разів. У той же час середній обсяг пухлини у тварин, які отримували запропонований засіб, за той же проміжок часу збільшився всього в 5 разів.

Таким чином, введення бестімусним (pu / pu) мишам C57B1аск/ 6 запропонованого засобу в дозі 1мг істотно гальмувало зростання солідних пухлин, індукованих інокуляцією тваринам пухлинних клітин молочної залози людини лінії MCF-7. При цьому запропонований засіб у застосовуваних дозах не викликав жодних змін клітинної морфології печінки, нирок та інших функціонально важливих органів, а також не впливав на вагу експериментальних тварин.

Звідси можна зробити висновок, що запропонований засіб має виражену протипухлинну дію щодо раку молочної залози in vivo на тваринній ксенотрансплантаційній моделі.

Гістологічне дослідження тканин тварин, які отримували запропонований засіб (вбитих під ефірним наркозом в кінці експерименту), показало, що даний препарат в застосовуваних дозах не викликає будь-яких змін клітинної морфології печінки, нирок та інших функціонально важливих органів, а також не впливає на вагу експериментальних тварин.

Приклад 4.

Концентрації дііндолілметану в плазмі крові експериментальних тварин (мкг / мл) при внутрішньошлунковому введенні субстанції дііндолілметану, 200,0 мг/ кг.

Результати вимірювання концентрації субстанції дііндолілметану в плазмі крові щурів при внутрішньошлунковому введенні представлені в Таблиці 1. Усереднені фармакокінетичні криві відображені на Фіг. 2-3.

Таблиця 1

Час взяття проби крові, год.

JNoJNo

0,25 0,5 1,0 2,0 4,0 6,0 8,0 12,0

1 0.05 0.13 0.17 0.12 0.07 0.04 0.03 <0.03

2 0.05 0.12 0.15 0.12 0.06 0.03 0.03 0.03

3 0.04 0.1 1 0.16 0.10 0.07 0.04 0.03 0.03

4 0.03 0.12 0.13 0.11 0.06 0.05 0.04 0.03 0.03

5 0.04 0.13 0.15 0.13 0.06 0.04 0.03 0.03 0.03

6 0.03 0.15 0.14 0.12 0.08 0.03 0.03 0.03 0.03

20

Арифметичне

0.04 0.13 0.15 0.12 0.07 0.04 0.03 <0.03 середнє

Пом. середнього 0.00 0.01 0.01 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00

Стандартні

0.01 0.01 0.01 0.01 0.01 0.00 0.0 відхилення

25

Коефіцієнт 22.36 10.79 9.43 8.85 12.25 19.97 12.27

варіації % % % % % % %

Медіана 0.04 0.13 0.15 0.12 0.07 0.04 0.03

Геометричне

0.04 0.13 0.15 0.12 0.07 0.04 0.03 середнє

30

Після введення дііндолілметан починав визначатися в системному кровотоці через 15 хвилин, максимум концентрації спостерігався близько 1 години (0,13-0,17 мкг /мл). Далі концентрація дііндолілметан починала плавно знижуватися, і через 12 годин після введення дііндолілметан визначався в крові в мінімальних кількостях (менше 0,03 мкг / мл). Розкид індивідуальних значень помірний: коефіцієнт варіації CV склав 8-22 %.

35

Приклад 5.

Концентрації дііндолілметану в плазмі крові експериментальних тварин (мкг / мл) при внутрішньошлунковому введенні дііндолілметану з підвищеною біодоступністю 0,10мг/кг.

Результати вимірювання концентрації субстанції дііндолілметану в плазмі крові щурів при внутрішньошлунковому введенні представлені в Таблиці 2. Усереднені фармакокінетичні криві відображені на Фіг. 4-5.

40

Таблиця 2

Час взяття проби крові, год.

0,25 0,5 1,0 2,0 4,0 6,0 8,0 12,0

1 1,38 1,70 0,20 0,98 0,15 0,12 0,11 0,04

2 1,52 1,61 0,19 1,10 0,16 0,11 0,07 0,03

3 1,29 1,65 0,25 1,06 0,12 0,10 0,09 0,03
 4 1,40 1,88 0,18 0,93 0,14 0,1 0,10 0,04
 5 1,12 1,59 0,16 0,88 0,14 0,11 0,11 0,05
 6 1,64 1,80 0,23 1,08 0,14 0,11 0,07 0,03 Арифметичне
 1,391,71 0,20 1,01 0,14 0,11 0,09 0,04 середнє
 Пом. середнього 0,07 0,05 0,01 0,04 0,01 0,00 0,01 0,00

Стандартні

0,18 0,11 0,03 0,09 0,01 0,01 0,02 0,01 відхилення

Коефіцієнт 12,95 6,68 16,42 8,85 9,38 5,75 20,02 22,27 варіації% % % % % % % %

5 Медіана 1,39 1,68 0,20 1,02 0,14 0,11 0,10 0,04

Геометричне

1,38 1,70 0,20 1,00 0,14 0,11 0,09 0,04 середнє

Після введення дііндолілметан починав визначатися в системному кровотоці через 15 хвилин, максимум концентрації спостерігався близько 30 хвилин (1,6-1,8 мкг / мл), далі концентрація знижувалася в 8 разів, і через 2 години після введення спостерігався повторний максимум концентрації (0,9-1,1 мкг / мл). Далі концентрація дііндолілметану починала плавно знижуватися, і через 12 годин після введення дііндолілметан визначався в крові в мінімальних кількостях (близько 0,03 мкг / мл). Розкид індивідуальних значень помірний: коефіцієнт варіації CV склав 5-20 %.

Звертає на себе увагу той факт, що дозування розробленої формуляції DIM на 1 тварину в 2000 разів менше, ніж у випадку кристалічного DIMa.

Незважаючи на такі відмінності в дозуваннях, концентрація DIM в плазмі експериментальних тварин має зіставні значення для двох препаратів.

Приклад 6.

Ефективність запропонованого засобу при лікуванні атонічного дерматиту.

Під нашим спостереженням знаходилося 43 хворих на атонічний дерматит у віці від 18 до 25 років, із них 35 чоловіків (81,4 %) і 8 жінок (18,6 %). Шкірні прояви захворювання відповідали клініці атопічного дерматиту з типовою для даного дерматозу морфологією та локалізацією висипів. У хворих виявлені наступні клінічні форми АД: еритематозно-сквамозна зі слабкою або помірною лихеніфікацією - у 34 пацієнтів (78,3 %), лихеноїдна - у 1 (2,3 %), прурігоподібна - у 2 (4,6 %), екзематозна - у 6 хворих (13,8 %). Тяжкість захворювання оцінювалася за індексом SCORAD, коливалася в межах від 12,4 до 61, 2. 3 них з легким ступенем було 27 хворих (62,8 %), середнім - 15 хворих (34,9 %), важким - 1 хворий (2,3 %). Білий розлитий стійкий дермографізм визначався у 44 %. Усіх хворих турбував свербіж різного ступеня інтенсивності: від незначного до біопсуючого. Серед хворих 35 осіб (81,4 %) характеризували свербіж як помірний, терпимий, 8 хворих - як нетерпимий. Більшість - 37 хворих (86 %) - відзначали дратівливість, поганий настрій, швидку стомлюваність, порушення сну. У більшості хворих (90,7 %) відзначали коливання в перебігу захворювання. Найбільш часто загострення АД спостерігалися в холодну пору року. Серед факторів, що провокують чергове загострення, 27 (62,8 %) пацієнтів відзначають порушення гіпоалергенної дієти, 8 (18,6 %) - стресові ситуації, 5 (11,6 %) - інфекційні захворювання, 4 хворих АД (9,3 %) - прийом лікарських засобів.

Для лікування хворих був застосований новий препарат. Активною субстанцією препарату є дііндолілметан в рідкій лікарській формі, що має підвищену біодоступність.

Препарат використовували у вигляді капсул, що містять 10, 20, 50 і 100 мг активної речовини. Всі пацієнти отримували препарат в дозуванні 1 мг на 1 кг ваги на добу. Оцінку результатів терапії проводили на підставі зміни клінічної картини на 7 і 14 день лікування і через 1 місяць від початку лікування. Об'єктивними критеріями служили динаміка шкірної симптоматики захворювання, оцінювана за допомогою шкали SCORAD.

Серед 43 пацієнтів, які отримували препарат, клінічне одужання, що характеризується зникненням свербіння і запальних змін шкіри, було досягнуто у 10 хворих (23,3 %) з легким ступенем і у 9 хворих (20,9 %) з середнім ступенем важкості захворювання в середньому через 2 тижні від моменту початку терапії. Значне поліпшення відзначалося у 8 пацієнтів (18,6 %) з легким та у 5 (11,6 %) із середнім ступенем тяжкості захворювання. Позитивна динаміка на тлі проведеної терапії у вигляді поліпшення була відзначена у 7 хворих (16,3 %) з легким ступенем, у 1 (2,3 %) - з важким ступенем тяжкості захворювання. Відсутність ефекту від проведеної терапії в даній групі спостерігали у 2 хворих (4,6 %) з легким ступенем і в 1 хворого (2,3 %) з середнім ступенем тяжкості захворювання. Клінічна ефективність препарату склала 74,4 %.

Продукція цитокінів

Методом проточної цитометрії на намистинах, покритих антитілами до цитокінів, визначали рівень продукції фактора некрозу пухлин альфа (ФНО-а) та інтерферону γ (ІФН- γ) у хворих на atopічний дерматит до і після лікування.

5 Після лікування спостерігали достовірне (t-test, $p < 0,05$) зниження продукції ФНО-а. ІФН- γ (фіг. 6).

Продукція LgE

10 Лікування препаратом призводило до достовірного зниження рівня LgE, що спостерігається досить рідко при цьому захворюванні. Повторний забір крові у хворих після лікування здійснювали через 1,5-2 місяці. Час життя імуноглобулінів в сироватці крові становить близько 1 місяця. Відповідно, зниження рівня LgE в сироватці крові хворих на АД після лікування означає пряму дію препарату на продукцію LgE. Зниження LgE спостерігали в 100 % випадків, навіть якщо вихідний рівень був низьким (фіг. 7).

Приклад 7.

15 Клінічна ефективність нової формуляції DIM для профілактики рецидивів при хворобі Крона.

Мета

Визначити ефективність нової формуляції DIM для підтримання ремісії при хворобі Крона.

20 Структура дослідження

Рандомізоване подвійне сліпе плацебо-контрольоване дослідження; тривалість-1 рік.

Хворі

25 58 хворих (від 18 до 67 років, 50 % чоловіки) з хворобою Крона в стадії клінічної ремісії, але з високим ризиком рецидиву. Лабораторні показники відображали наявність хронічного запального процесу. Критерії виключення: вік < 18 або > 75 років; прийом мезаламіна, сульфасалазину або кортикостероїдів протягом попередніх 3 місяців, а імуносупресивних препаратів-протягом попередніх 6 місяців;

Лікування

30 Хворі отримували 2-3 рази/добу DIM в капсулах по 50 мг (приклад 2, пункт Б) або плацебо.

Критерії оцінки

Частота рецидивів і тривалість ремісії. Рецидив визначався з підвищення індексу активності хвороби Крона в порівнянні з базисним рівнем на 100 пунктів і його утримання на рівні > 150 балів протягом 2 тижнів.

Основні результати

35 Лікування DIM в капсулах по 50 мг знизило частоту рецидивів у порівнянні з плацебо (28 і 69 % соотв.; $P < 0,001$). Висновок:

Лікування DIM в капсулах по 50 мг знижує частоту рецидивів і підтримує ремісію при хворобі Крона в тих випадках, коли клінічні прояви захворювання відсутні, але вміст у крові маркерів запалення підвищений.

40 Приклад 8

Дослідження концентрації DIM в плазмі крові пацієнтів У всіх клінічних дослідженнях проводилося порівняння ефективності DIM-НВ і кристалічного DIM в рівних дозах. У всіх досліджуваних групах пацієнтів встановлена виражена позитивна динаміка при прийомі DIM-НВ і відсутність такої при прийомі кристалічного DIM.

45 Ймовірно, ці відмінності обумовлені досягненням ефективних терапевтичних концентрацій DIM в периферичній крові і тканинах мішенях при лікуванні DIM-НВ. Результати вимірювань цих параметрів представлені в Таблиці 3.

Таблиця 3

Препарат	Дозування	Клінічна ефективність	Концентрація DIM у плазмі
DIM кристалічний	10 мг	-	Не визначається
DIM-НВ	10 мг	+	Більше 100 нг/мл
DIM кристалічний	100 мг	-	20-30 нг/мл
DIM-НВ	100 мг	+	Більше 300 нг/мл

50 Як впливає з наших спостережень, стійкі клінічні ефекти досягнуті при лікуванні DIM-НВ в дозуванні 100 мг на день. При цьому концентрація DIM в плазмі при прийомі 100 мг DIM-НВ склала більше 300 нг/мл.

Приклад 9.

Застосування DIM-НВ у жінок з гіперпластичними процесами в ендометрії.

У дослідженні брали участь 32 пацієнтки, середній вік яких $47,3 \pm 1,53$ років, які відмовилися від гормональної терапії і в яких відсутні показання до хірургічного лікування.

Хворі отримували DIM-НВ по 50 мг 2 рази на добу протягом 6 місяців. Оцінка ефективності проводилася через 3 місяці та 6 місяців за клінічними даними, визначенням рівня гормонів, УЗД, РДВ і пайпель-біопсії ендометрію. Результати представлені в Таблиці 4.

Таблиця 4

Показники	До лікування, %	Після 3 місяців лікування, %	Після 6 місяців лікування, %
Меноррагія (рясні менструації)	65,6	56,3	34,4
Метроррагія	46,9	28,1	15,6
Болі внизу живота, пов'язані з менструальним циклом	28,1	18,8	15,6
Перед-постменструальні кров'яні виділення	21,9	21,9	12,5 (незначні)

Приклад 10.

Результати клінічних досліджень ефективності DIM-НВ при лікуванні хворих з поєднаною патологією аденоміоз + міома матки.

У дослідженні брало участь 72 пацієнтки з тривалістю захворювання 10 років, середній вік яких склав $38,5 \pm 2,7$ років.

Відбір пацієнток здійснювався за такими критеріями:

1. Хворі з початковими проявами захворювань, які відмовилися від прийому гормональних препаратів.

2. Хворі з неефективною раніше проведеною терапією.

3. Хворі з відсутністю показань для оперативного лікування.

Лікування проводилося DIM-НВ по 50 мг 2 рази на день протягом 6 місяців. Динаміка клінічних симптомів у пацієнток з поєднаною патологією аденоміоз і міома матки після шести місяців лікування представлені в Таблиці 5.

Таблиця 5

Показники	До лікування, %	Після лікування, %
Загальна слабкість, підвищена втомлюваність, зниження працездатності	21,7	4,3
Гіперполіменорея	65,2	10,9
Дисменорея	45,7	8,7
Передменструальні кров'яні виділення	39,1	10,9
Ациклічні кровотечі	10,9	2,2
Болі внизу живота, не пов'язані з менструальним циклом	48	17
Диспареунія	10,9	2,2
Порушення функцій сусідніх органів	19,6	6,5
Масталгія	76,1	8,7
Об'єм матки	$522,7 \pm 60,2 \text{ см}^3$	$480 \pm 55,8 \text{ см}^3$
Товщина задньої стінки матки аденоміозом	29,4 мм	25,2 мм

Приклад 11.

Зміна рівня молекулярних маркерів у вузлах міоми матки після застосування DIM-НВ порівняно з контролем.

У дослідженні брали участь 24 пацієнтки з показаннями до оперативного лікування, але операція з різних причин відкладена.

Тривалість прийому DIM-НВ по 50 мг 2 рази на день склала 3,5 місяця.
Результати імуногістохімічних досліджень (оцінка в балах напівкількісним методом за відсотком забарвлених клітин (Colvin R et al, 1995) ($p < 0,05$)) надані в Таблиці 6.

Таблиця 6

Процес	Маркер	Кратність збільшення ↑ зменшення ↓
Проліферація	Ki-67* PCNA C-мус FGF IGF-I	↓4,3 ↓3,8 ↓4,5 ↓1,9 ↓9,2(!!!)
Проліферація, ангіогенез	EGF (EGFR) PDGF	↓2,4 ↓2,3
Апоптоз	Bcl-2 ApopDETEK***	↓8,0(!!!) ↑5,5(!!!)
Ангіогенез	CD-34	↓5,9(!!!)

* Підрахунок відсотка забарвлених ядер на 3000 клітин

** Підрахунок відсотка виявлених апоптозних тілець на 3000 клітин

5

Приклад 12.

Вивчення результативності лікування осіб з патологією щитовидної залози препаратом на основі DIM-НВ

Для цього проведено клініко-біохімічний аналіз ефективності лікування 138 хворих.

10

У 1-у групу увійшли хворі, які одержували терапію препаратом на основі DIM-НВ в дозуваннях 10-100 мг на день. У другу групу увійшли хворі, які одержували лікування відповідно до прийнятих стандартів. Ефективність лікування хворих у групі 1 препаратом на основі DIM-НВ відображена в Таблиці 7.

Таблиця 7

Нозологія	Кількість обстежених хворих	Ефективність через		Побічна дія препаратів
		3 міс.	12 міс.	
Дифузний зоб II-III ст.	68	52	68	У всіх випадках відсутня негативна побічна дія. Помітний позитивний ефект відносно функцій інших органів.
Вузлуватий зоб	47	21	47	
Дифузний токсичний зоб	9	9	9	
Гіпотиреоз ідіопатичний	14	3	14	

15

Аналіз ефективності лікування в 1- й групі продемонстрував поліпшення всіх показників. У тих випадках гіпотиреозу, де хворі (до моменту звернення до лікаря) брали стандартну терапію, лікування препаратом DIM-НВ дозволило поступово скасувати або значно знизити дозу L-тироксину (його аналогів).

20

Ефективність лікування хворих у групі II (стандартна терапія) відображена в Таблиці 8.

Висновки:

25

Прийом препаратів на основі DIM-НВ як самостійний метод лікування патології щитовидної залози дозволяє досягти позитивних клінічних результатів; їхня ефективність підтверджується лабораторними та інструментальними методами дослідження.

30

Переважа лікування патології щитовидної залози цими препаратами полягає в досягненні стійкого клінічного результату, без погіршення з боку інших органів (відсутність побічної дії). За допомогою цих препаратів можна досягти позитивної динаміки в лікуванні гіпотиреозу (при поступовому скасуванні або зниженні доз замісної терапії); в багатьох випадках уникнути оперативного втручання, нормалізуючи структуру і функцію щитовидної залози у випадках дифузного токсичного зобу і вузлуватого зобу.

Приклад 13.

Протирецидивуюча терапія респіраторного папіломатозу гортані препаратом на основі DIM-HB.

Розчин за прикладом 2, пункт Д на основі DIM-HB призначали в дозуванні 1 мг на 1 кг ваги дитини. Препарат вводили в 1-3 прийоми, під час їжі. Тривалість лікування становила не менше 12 тижнів. Терапію починали після чергового видалення папілом.

Аналізували тривалість міжрецидивного періоду до і після призначення препарату.

Ефективність лікування оцінювали за критеріями:

тривала ремісія (припинення зростання папілом протягом 2 років і більше);

збільшення міжрецидивного періоду (збільшення часового інтервалу між операціями з видалення папілом в 1,5 рази і більше від вихідного);

відсутність ефекту (часовий інтервал між операціями не змінювався або збільшувався менш ніж в 1,5 рази від вихідного).

Критеріями виключення з дослідження з'явилися самостійне припинення прийому препарату на основі DIM-HB (2 хворих) і недостатній термін спостереження (у 7 хворих тривалість спостереження від початку прийому препарату до проведення аналізу результатів лікування була менше тривалості вихідного між рецидивного періоду).

Таким чином, аналізу піддані результати протирецидивної терапії РРП за допомогою препарату у 46 хворих. Перші симптоми захворювання у цих 46 пацієнтів виникли у віці від 1 до 156 міс. (В середньому - $44,7 \pm 29,38$ міс.). Вік першої операції з видалення папілом становив від 2 до 162 міс. (В середньому - $56,7 \pm 29,26$ міс.).

До початку терапії препаратом дітям було проведено від 2 до 64 операцій з видалення папілом (в середньому - $13,4 \pm 9,01$). Тривалість міжрецидивного періоду до лікування препаратом становила від 2 тижнів до 12 міс. (В середньому - $5,6 \pm 2,26$ міс.). Вік на момент початку терапії становив від 2 до 14 років (у середньому - $8,9 \pm 3,49$ років).

Результати:

Виразений позитивний ефект протирецидивної терапії препаратом отримано у 41 (89,1 %) хворих, в тому числі у 21 (45,6 %) - досягнута тривала (від 2 років до 3 років 10 міс. спостереження) ремісія, а у 20 (43, 4 %) - збільшення тривалості міжрецидивного періоду в 1,5-6 разів.

В жодному випадку не спостерігали будь-яких побічних ефектів від проведеної терапії.

Приклад 14.

Активність щодо хламідійного цервіцита.

Для перевірки були відібрані 30 жінок з діагнозом "хламідійний цервіцит". Одній групі (15 осіб) проводили стандартну терапію антибіотиками (Сумамед по 250 мг, 2 рази на день). Іншій групі (15 осіб) додатково призначали DIM по 50 мг (приклад 2, пункт Б), 3 рази на день. Після 30 днів лікування проби з цервікального каналу досліджували методом ПЛР на наявність *Chlamydia Trachomatis*. У першій групі негативний результат лабораторного тестування було отримано у 9 жінок, тоді як у другій групі у 14 жінок не виявлялася *Chlamydia Trachomatis*.

Висновок: введення в схему лікування хламідійних цервіцитів препаратів на основі DIM з підвищеною біодоступністю дозволить індукувати апоптотичну загибель інфікованих клітин, що призведе до збільшення ефективності проведеної терапії.

Приклад 15.

Дослідження стабільності лікарських форм DIM отриманих за технологією, описаною у прикладі 1.

Для отримання лікарських форм використовували м'які желатинові капсули і тверді желатинові капсули "Licaps". Капсули зберігали при кімнатній температурі і через певні проміжки часу визначали кількість активної речовини DIM методом хроматографії високого тиску.

Результати проведеного дослідження наведені в Таблиці 9.

Таблиця 9

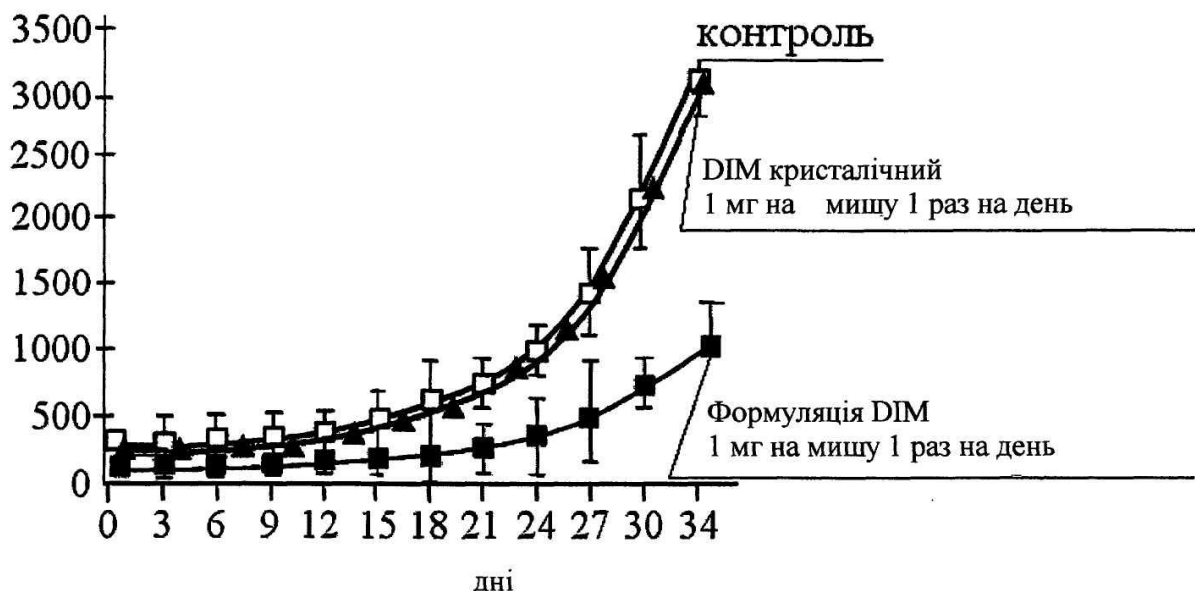
Тип капсул	Дозування DIM	Вміст DIM після зберігання і при кімнатній температурі			
		30 днів	60 днів	90 днів	120 днів
М'які	50 мг	40 мг	35 мг	30 мг	28 мг
Тверді (Licaps)	50 мг	50 мг	50 мг	50 мг	50 мг

Як впливає з отриманих даних, в твердих желатинових капсулах "Licaps" вміст активної речовини DIM залишається без змін, тоді як в м'яких желатинових капсулах спостерігається зниження концентрації речовини DIM внаслідок її окислення.

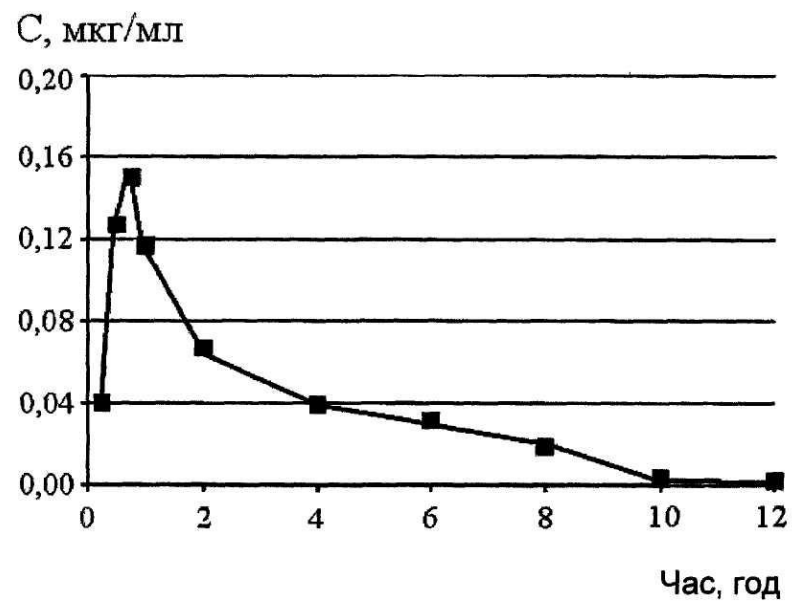
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Лікарський засіб для лікування гіперпластичних і запальних захворювань людини, що містить як активне начало 3,3'-дііндолілметан і носій, який **відрізняється** тим, що являє собою розчин, що містить як носій суміш риб'ячого жиру і щонайменше одного полісорбату, при наступному вмісті компонентів в мас. %:

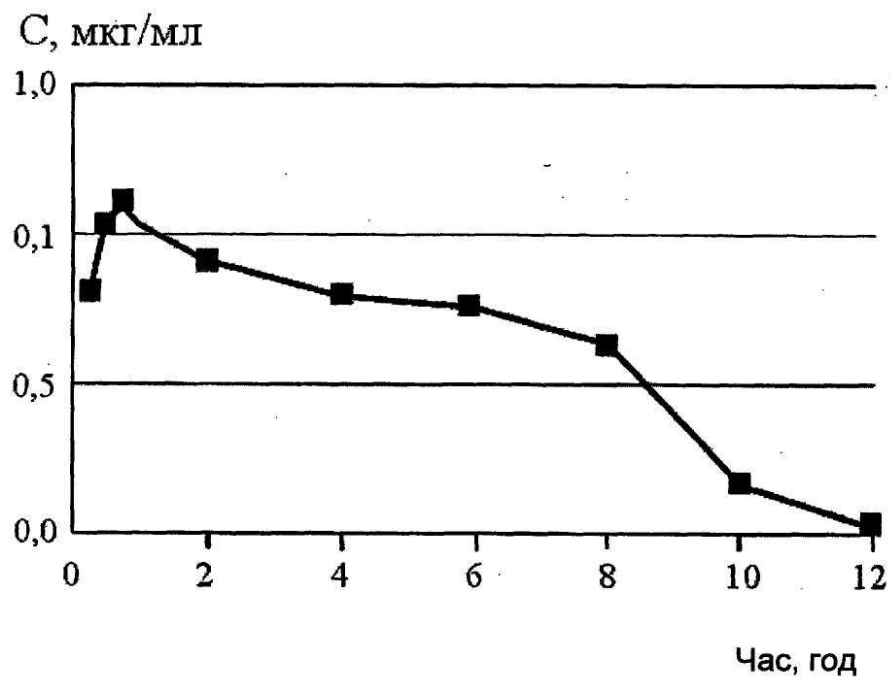
3,3'-дііндолілметан	1-20
риб'ячий жир	10-20
полісорбат	решта.
2. Лікарський засіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що він розфасований у флакони з темного скла.
3. Лікарський засіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що він розфасований у тверді желатинові капсули, вкриті гідроксипропілметилцелюлозою або її фталатом.
4. Застосування лікарського засобу за одним із пп. 1-3 для лікування гіперпластичних і запальних захворювань людини.
5. Застосування за п. 4, де засіб вводять з розрахунку 0,5-2 мг 3,3'-дііндолілметану на кг ваги пацієнта.
6. Застосування за п. 4, де зазначене захворювання являє собою захворювання, вибране з групи: міома, аденоміоз, гіперплазія щитовидної залози, atopічний дерматит, хвороба Крона, папіломатоз гортані і хламідійні цервіцити.



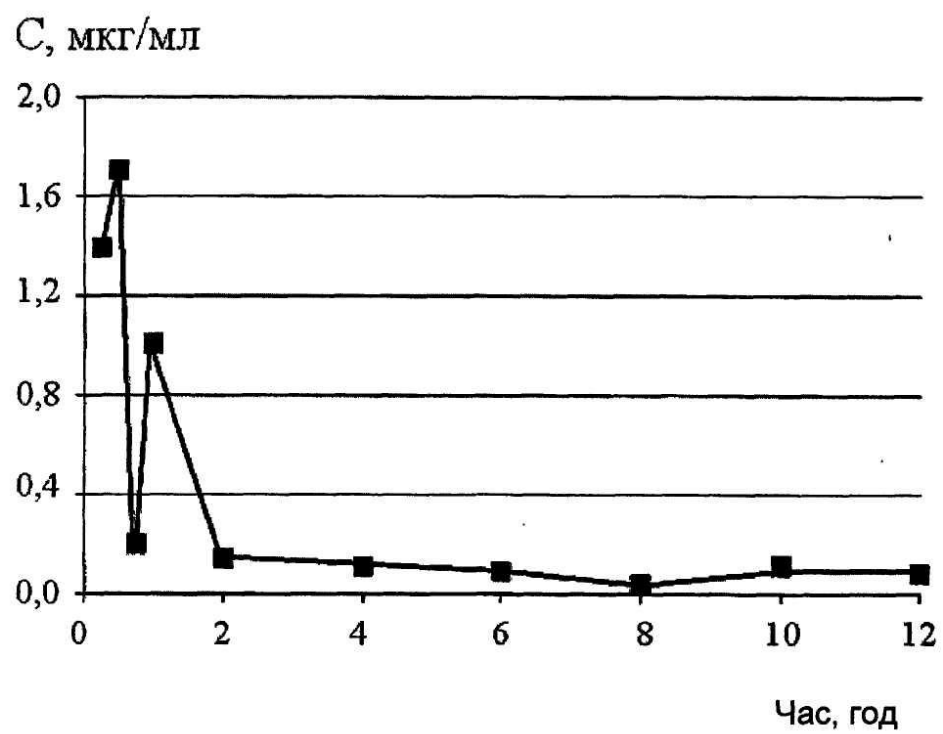
Фіг. 1



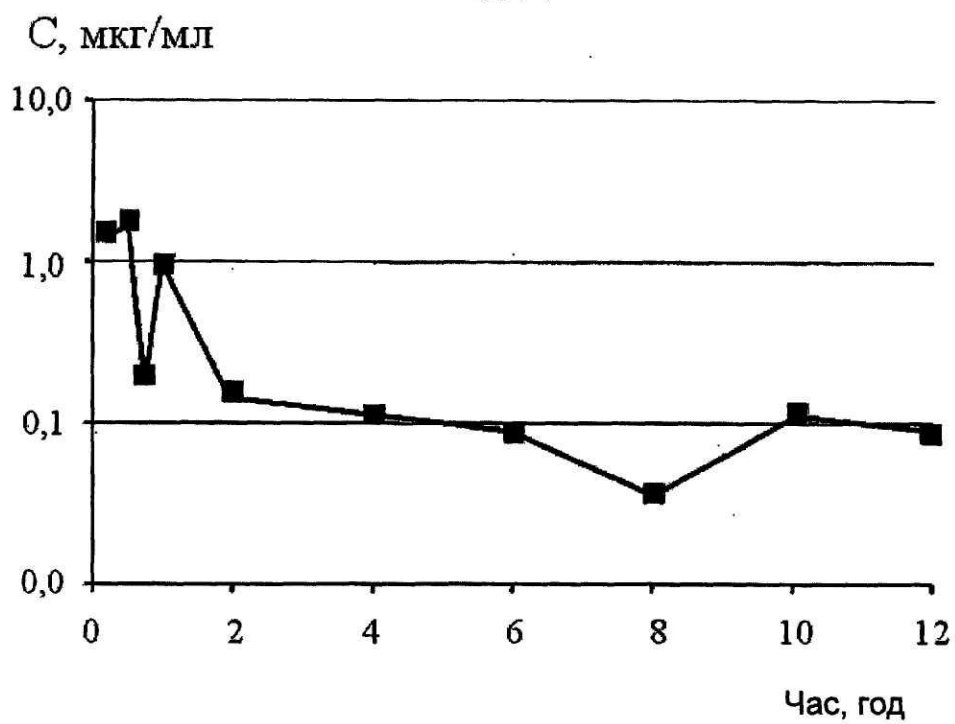
Фиг. 2



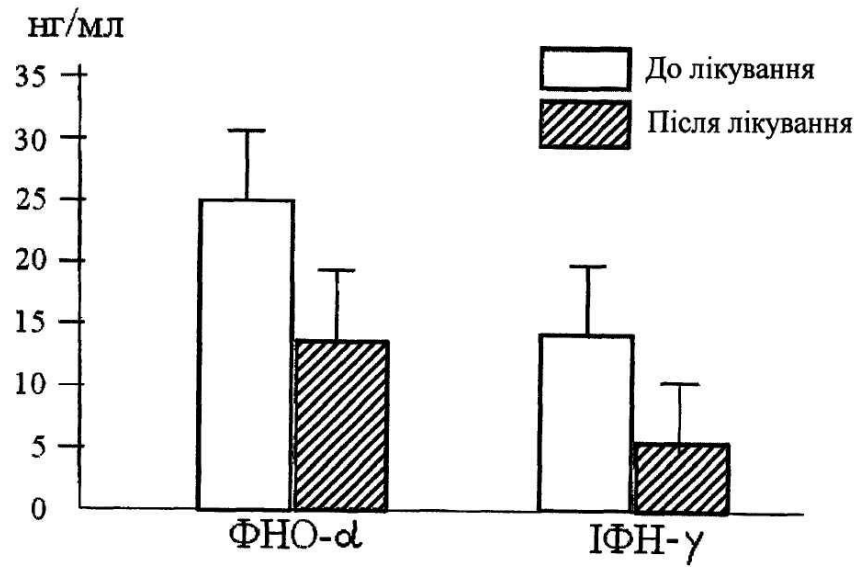
Фиг. 3



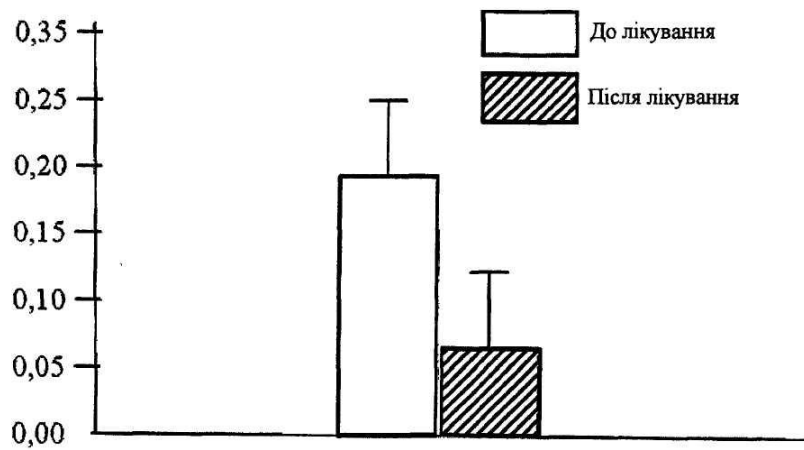
Фиг. 4



Фиг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

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