



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57703 (13) C2  
(51) 7 A61K31/04,31/195,A61P15/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ СТИМУЛЯЦІЇ ТА СПОСІБ ІНГІБУВАННЯ ДОЗРІВАННЯ ШИЙКИ МАТКИ

1

(21) 97105013  
(22) 14 03 1996  
(24) 15 07 2003  
(86) PCT/US96/03540, 14 03 1996  
(31) 95250059 3  
(32) 14 03 1995  
(33) EP  
(46) 15 07 2003, Бюл. № 7, 2003 р.  
(72) Хваліш Крістоф, DE, Гарфільд Роберт Е, US  
(73) ШЕРІНГ АКТІОНГЕЗЕЛЛШАФТ, DE, БОРД ОФ  
РІДЖЕНТС ДЗЕ ЮНІВЕРСІТІ ОФ ТЕХАС СІСТЕМ,  
US  
(56) WO A 9513802 26 05 95  
Lancet, 1994, vol 343, p 1325 - 1326  
(57) 1 Спосіб стимуляції дозрівання шийки матки,  
що включає застосування принаймні одного  
донора та/або субстрату окису азоту в ефективній  
кількості, який відрізняється тим, що засіб  
вводять місцево внутрішньошийково чи  
внутрішньовагінально  
2 Спосіб інгібування дозрівання шийки матки, що  
включає застосування принаймні одного інгібітору  
окису азоту в ефективній кількості, який  
відрізняється тим, що засіб вводять місцево  
внутрішньошийково чи внутрішньовагінально при  
лікуванні недостатності шийки матки чи  
передчасних пологах  
3 Спосіб за пунктом 1, в якому донор і/або  
субстрат окису азоту використовують у сполученні  
принаймні з одним із засобів - антипрогестином,  
простагландином і/або цитокином  
4 Спосіб за пунктом 2, в якому інгібітор окису  
азоту використовують у сполученні принаймні з  
одним із засобів - прогестином і/або інгібітором  
циклооксигенази (інгібітори COX-1 і COX-2)  
5 Спосіб за пунктами 1 або 3 для індукції  
своєчасних пологів  
6 Спосіб за пунктами 1 або 3 для індукції пологів у  
зв'язку з патологічною вагітністю  
7 Спосіб за пунктами 1 або 3 для індукції пологів у  
зв'язку з внутрішньоматковою загибеллю плоду  
8 Спосіб за пунктами 1 або 3 для індукції абортів  
9 Спосіб за пунктами 1 або 3 для індукції  
передчасних пологів  
10 Спосіб за пунктами 1 або 3 для регуляції  
тривалих пологів  
11 Спосіб за пунктами 1 або 3 для індукції  
дозрівання шийки матки невагітних жінок або

2

вагітних жінок при хірургічній або діагностичній  
процедурі  
12 Спосіб за пунктами 1 або 3 для індукції  
дозрівання шийки матки у жінок, яких піддають  
штучному (in vitro) заплідненню  
13 Спосіб за пунктами 2 або 4 для лікування  
недостатності шийки матки  
14 Спосіб за пунктами 2 або 4 для лікування у  
випадку загрози передчасних пологів  
15 Спосіб за пунктом 1, в якому як субстрат і/або  
донор окису азоту використовують принаймні одну  
сполуку, вибрану з L-аргініну, нїтроприсиду натрію,  
нїтрогліцерину, гліцерилтрїнітрату, SIN-1,  
їзосорбїдмононїтрату, їзосорбїддїнітрату  
16 Спосіб за пунктом 2, в якому як інгібітор окису  
азоту використовують принаймні одну сполуку,  
вибрану з метилового ефіру NG-нїтро-L-аргініну (L-  
NAME), NG-моноетїл-L-аргініну (L-MMA), N-  
їміноетїл-L-арнітіну (L-NIO), L-монометїл-L-  
аргініну (L-NNMA), L-NG-метїларгініну (L-NMA),  
Nw-нїтро-L-аргініну (L-NA) і аміногуанїдїну  
17 Спосіб за пунктом 3, в якому як антипрогестин  
використовують принаймні одну сполуку, вибрану  
з онапрїстону(11 $\beta$ -[4-(дїметїламіно)фенїл]-17 $\alpha$ -  
гїдрокси-17 $\beta$ -(3-гїдроксїпропїл)-13 $\alpha$ -естра-4,9-  
дїєн-3-ону),  
RU 486 (11 $\beta$ -[4-(дїметїламіно)фенїл]-17 $\beta$ -  
гїдрокси-17 $\alpha$ -(1-пропенїл)естра-4,9-дїєн-3-ону),  
(Z)-11 $\beta$ -[4-(дїметїламіно)фенїл]-17 $\beta$ -гїдрокси-  
17 $\alpha$ -(3-гїдрокси-1-пропенїл)естра-4-єн-3-ону (EP-  
A 0 404 283),  
11 $\beta$ -(4-ацетїлфенїл)-17 $\beta$ -гїдрокси-17 $\alpha$ -(1-  
пропенїл)естра-4,9-дїєн-3-ону (EP-A 0 190 759),  
4',5'-дїпдро-11 $\beta$ -[4-(дїметїламіно)фенїл]-6 $\beta$ -  
метїлспїро[естра-4,9-дїєн-17 $\beta$ ,2'(3'H)-фуран]-3-  
ону,  
4',5'-дїпдро-11 $\beta$ -[4-(дїметїламіно)фенїл]-7 $\beta$ -  
метїлспїро[естра-4,9-дїєн-17 $\beta$ ,2'(3'H)-фуран]-3-  
ону,  
11 $\beta$ -(4-ацетїлфенїл)-19,24-дїнор-17,23-єпокси-  
17 $\alpha$ -хола-4,9,20-трїєн-3-ону,

(13) C2  
(11) 57703  
(19) UA

(E)-11 $\beta$ -[4-[[[ацетокси]іміно]метил]феніл]-17 $\beta$ -метокси-17 $\alpha$ -(метоксиметил)естра-4,9-дієн-3-ону,  
(E)-11 $\beta$ -[4-

[[[(етоксикарбоніл)окси]іміно]метил]феніл]-17 $\beta$ -метокси-17 $\alpha$ -(метоксиметил)-естра-4,9-дієн-3-ону

18 Спосіб за пунктом 3, в якому як простагландин використовують PGE<sub>2</sub> або Гемепрост

19 Спосіб за пунктом 3, в якому як цитокін використовують інтерлейкін-8 або інтерлейкін-1 $\beta$

20 Спосіб за пунктом 4, в якому як прогестин використовують прогестерон

21 Спосіб за пунктом 4, в якому як інгібітор циклооксигенази використовують аспірин

22 Спосіб за пунктом 4, в якому як інгібітор COX-2 використовують флусолід

Даний винахід стосується регулювання розкриття та розтягнення шийки матки використанням донорів та/або субстратів оксиду азоту або інгібіторів оксиду азоту

Пологи (вихід плоду з матки) вимагають як скорочення міометрія, гладкого м'язу матки, так і розслаблення з'єднувальної тканини шийки, так щоб вона була розтягнута та розширена достатньо, щоб дозволити плоду вийти. Це розслаблення відомо як "дозрівання".

У даний час переважним методом дозрівання шийки є використання простагландину E<sub>2</sub>. Його застосовують як вагінальний гель або таблетки або як гель, що помішують у шийку матки. Проблемою, пов'язаною з використанням простагландину E<sub>2</sub>, є те, що існує можливість гіперстимуляції матки, яка призводить до виключно сильних скорочень міометрія до дозрівання шийки та до спокійних та безпечних пологів.

Ідеальний препарат повинен розслаблювати та розгладжувати шийку, не викликаючи міометральних скорочень. Це повинно дозволити наступні скорочення (що викликаються, якщо необхідно, невеликою дозою простагландину), щоб дитині народитись з мінімальним опором. Є хороші свідчення з експериментів на тваринах, що антипрогестини, такі як RU486, повинні відповідати таким вимогам, але проблема з цим лікарським засобом у тому, що він має супутню антиглюкокортикоїдну активність, яка може ушкодити плід.

Одним з найбільш значних нещодавніх успіхів у біології та медицині є відкриття того, що оксид азоту продукується ендотеліальними клітинами, та що він включається у регулювання судинного тону, агрегації тромбоцитів, нейротрансмісії та імунної активації (Фурхготт та Завадський, 1980, Монкада, Палмер та Хігс, 1991, Інгарро, 1991). Оксид азоту є важливим медіатором релаксації гладком'язового м'язу (Монкада, Палмер та Хігс, 1991) та був до цього відомий як EDRF (розслаблюючий фактор, одержаний з ендотеліну) (Фурхготт та Завадський, 1980, Монкада, Палмер та Хігс, 1991).

Оксид азоту синтезують окислювальним деамінуванням гуанідинового азоту L-аргініну принаймні різними ізоформами флавінвміщуючого ферменту, синтази оксиду азоту (Монкада,

Палмер та Хігс, 1991).

Оксид азоту також можна генерувати, застосовуючи різні донори оксиду азоту, такі як нітропрусид натрію, нітрогліцерин, тринітрат гліцерину, SIN, мононітрат ізосорбиду, дінитрат ізосорбиду тощо.

Було показано, що синтез оксиду азоту повністю інгібується аналогами L-аргініну, метиловим ефіром NG-гідро-L-аргініну (L-NAME), KO-моноетил- $\beta$ -аргініном (LMMA), Шміноетил- $\beta$ -аргініном (L-NIO),  $\beta$ -монометил- $\beta$ -аргініном (L-NNMA), L-NG-метиларгініном (LNMA), NW-гідро-L-аргініном (L-PA) та аміногуанідином.

Обробка невагітних морських свинок L-NAME призводить до підвищеної скорочувальної здатності матки. Отже, інгібуювання скорочувальної здатності матки, стимульоване синтазою оксиду азоту, вказує, що тонізуюче виділення оксиду азоту підтримує матку в неактивному стані. Подібно до цього обробка вагітних морських свинок L-NAME викликає передчасні пологи. З іншого боку, обробка смуги матки пацюків *in vitro* L-аргініном інгібуює скорочення. Ці дослідження показують, що вироблення оксиду азоту маткою інгібуює скорочувальну здатність матки, а блокування її синтезу призводить до підвищеної скорочувальної здатності у вагітних та невагітних тварин. Отже, субстрати та донори оксиду азоту можуть бути використані у терапії для попередження скорочувальної здатності матки, а інгібітори оксиду азоту - для ефективного стимулювання скорочень матки.

На підставі попередніх вивчень на макаках-резус Дженингс та ін. (The Journal of Maternal - Fetal Medicine 2, 170-175 (1993)) припустили, що оксид азоту може бути важливим для неактивності матки під час вагітності, а актогенний оксид азоту може бути корисним для контролю передчасних пологів.

Активність синтази оксиду азоту (NOS) була продемонстрована Натучці та ін. (Biochem and Biophys Res Commun 194, N 1, 128 (1993)) у численних структурах матки вагітних пацюків, і вони дійшли висновку, що NOS повинна бути присутня у численних структурах матки вагітних пацюків. Зниження активності NOS при пологах передбачає, що NOS може вносити вклад у підтримання скорочувальної спокійності під час вагітності.

Також морфологічні вивчення вже показали наявність NOS (NADPH-діафораза, гістохімічний метод визначення всіх ізоформ NOS) та ферментів, що метаболізують NO, таких як супероксиддисмутаза у шийці матки (Папка та ін., *Neuroscience letters* 147 (1992), Шіотані та ін., *Acta Histochem Cytochem*, 26, 57-64 (1993),

Було виявлено, що обробка L-NAME морських свинок підшкірно на 48-49 після контакту (кінцевий день 67+3 дні) веде до зниження розтягнення матки та зниження розширення шийки матки

У вагітних пацієнтів було виявлено підвищене вироблення оксиду азоту (параметр, виділення нітриту або нітрату *in vitro*) з шийки матки під час пологів порівняно з 18 днем вагітності. Напроти, відбувалося зниження вироблення маточного (міометрального) NO під час вагітності пацієнтів. Антипрогестин онапристон збільшував вироблення оксиду азоту у шийці матки вагітних пацієнтів ще більше, але інгібував вироблення NO у матці (міометрі). Введення тої ж самої дози онапристону викликало дозрівання матки у пацієнтів

Ці дослідження є свідченням того, що обробка інгібитором оксиду азоту, такого як L-NAME, інгібуює дозрівання шийки, але стимулює скорочення матки у вагітних морських свинок,

вироблення NO, який дає розслаблюючий ефект на міометрій, зменшується у вагітній матці (міометрі) під час вагітності, але вона збільшується у шийці матки під час нормальних або викликаємих антипрогестином пологів у пацієнтів,

ефекти, що розходяться, інгібітора оксиду азоту, такого як L-NAME, на скорочувальну здатність матки та шийки матки обумовлені або різними діями NO системи, або присутністю різних ізоформ ферменту в міометрії та шийці, та

NO-система відіграє важливу роль у регуляції шийки матки, причому вироблення NO збільшується у процесі дозрівання шийки

Отже, можна заключити, що

а) місцеве застосування донорів та/або субстратів оксиду азоту може бути використано, щоб викликати дозрівання шийки, або

б) місцеве застосування інгібітору оксиду азоту може бути використано, щоб запобігти або інгібувати дозрівання шийки, наприклад, при лікуванні шийкової недостатності (дуже раннього дозрівання шийки) або передчасних пологів

Даний винахід стосується застосування донорів та/або субстратів оксиду азоту або інгібіторів оксиду азоту для виробництва лікарського засобу для регулювання розкриття шийки матки та/або розтягнення

Даний винахід включає застосування або

а) принаймні одного донора та/або субстрату оксиду азоту для виробництва лікарського засобу для місцевого застосування (наприклад, внутрішньом'язово або внутрішньовипинально) для викликання дозрівання матки, або

б) принаймні одного інгібітору оксиду азоту для виробництва лікарського засобу для місцевого застосування (наприклад, внутрішньом'язово або внутрішньовипинально) для інгібування дозрівання матки при лікуванні шийкової недостатності або

передчасних пологів

Як (а) донори та/або субстрати оксиду азоту або (б) інгібітори оксиду азоту у даному винаході використовують всі сполуки, відомі професіоналам, як такі, що мають необхідні властивості, сполуки, що зазначені у рівні техніки, є переважними. Донори та/або субстрати оксиду азоту (а) можуть бути також використані у комбінації з (і), принаймні, одним антипрогестином, простагландином та/або цитокіном

Антипрогестини вибирають з такої групи сполук

онапристон

(11 $\beta$ -[4-(діметиламіно)феніл]-17 $\alpha$ -гідрокси-17 $\beta$ -(3-гідроксипропіл)-13 $\alpha$ -естра-4,9-діен-3-он),

RU 486 (11 $\beta$ -[4-(діметиламіно)феніл]-17 $\beta$ -гідрокси-17 $\alpha$ -(1-пропеніл)естра-4,9-діен-3-он),

(Z)-11 $\beta$ -[4-(діметиламіно)феніл]-17 $\beta$ -гідрокси-17 $\alpha$ -(3-гідрокси-1-пропеніл)естра-4-ен-3-он (EP-A0404283),

11 $\beta$ -(4-ацетилфеніл)-17 $\beta$ -гідрокси-17 $\alpha$ -(1-пропеніл)естра-4,9-діен-3-он (EP-A 0 190 759),

4',5'-дгідр-11 $\beta$ -[4-(діметиламіно)феніл]-6 $\beta$ -метилспіро-[естра-4,9-діен-17 $\beta$ ,2'(3H)-фуран]-3-он,

4',5'-дгідр-11 $\beta$ -[4-(діметиламіно)феніл]-7 $\beta$ -метилспіро-[естра-4,9-діен-17 $\beta$ ,2'(3H)-фуран]-3-он,

11 $\beta$ -(4-ацетилфеніл)-19,24-діор-17,23-епокси-17 $\alpha$ -хола-4,9,20-тріен-3-он,

(E)-11 $\beta$ -[4-[[ацетокси]іміно]метил]феніл]-17 $\beta$ -метокси-17 $\alpha$ -(метоксиметил)естра-4,9-діен-3-он,

(E)-11 $\beta$ -[4-

[[[етоксикарбоніл]окси]іміно]метил]феніл]-17 $\beta$ -метокси-17 $\alpha$ -(метоксиметил)естра-4,9-діен-3-он,

та велика кількість інших сполук, що мають конкурентну активність антагоністів прогестерона, і які добре відомі професіоналам

Простагландини сульпростон (PGE<sub>2</sub>) або гемепрост можуть бути використані як приклад

Найбільш переважними представниками цитокінів є інтерлейкін-8 або інтерлейкін-1 $\beta$

Використання не обмежено вищеведеними сполуками

Інгібітор (б) оксиду азоту може бути також використаний у комбінації з (ii), принаймні, одним прогестином і/або інгібітором циклооксигенази (наприклад, інгібіторами COX-1 і COX-2),

Як прогестини переважно використовують придатний прогестерон, а також можливо використання одного або декількох відомих синтезованих прогестинів як пероральних контрацептивів, наприклад, левоноргестрел, ципротеронацетат, гастодеон, дроспіренон, дезогестрел, 3-кетодезогестрел, діногест тощо

Інгібітором циклооксигенази може бути, наприклад, аспирин (інгібітор COX-1 і COX-2). Інші приклади інгібіторів COX-2 можуть бути взяті з Роберт Асланян, Ніколас 1, Карузєрс, Джеймс Дж Камінські, циклооксигени 2 A Novel Target for Therapeutic Intervention, *Exp Opin Invest Drugs*, 1994 3(12), 1323-1325, наприклад, сполуки SC-58125 (GD Searle), DuP-697, флузолід [8-(2,4-діфторфенокси)-5-метилсульфоніламіно-1-інданон], Se-57666 (GDSearle), L-745337 (Merck Frosst), N-398 (Monsanto)

У першому аспекті винахід стосується застосування сполук винаходу (а) при народженні або аборті. При вагітності шийка матки оброблюється попередньо. Гормони протягом вагітності змінюють шийку матки, яка потім схильна відповідати ефективно на інші стимулятори.

Далі винахід стосується застосування сполук (а) при хірургічному втручанні або діагностичній процедурі. Отже, сполуки (а) винаходу можуть, можливо у комбінації з сполуками, вказаними як (і), бути використані для виробництва лікарських засобів, що застосовуються для

А) викликання пологів у кінці строку (час очікуваного народження при нормальному протіканні вагітності, (препарат) можна комбінувати з наступною обробкою окситоцином або подібними засобами)

Б) викликання пологів у зв'язку з патологічною вагітністю (наприклад, порок розвитку плоду), переважно аборт у другий тримісячний строк)

В) викликання пологів у зв'язку з внутрішньоматочною загибеллю плоду

Г) при аборті (переважно аборті перший тримісячний строк)

Д) викликання передчасних пологів

Е) при тривалих пологах внаслідок дистонії, що стосується шийки патології

Ж) викликання дозрівання шийки матки невагітної жінки або вагітної жінки, при хірургічній або діагностичній процедурі та

З) викликання дозрівання шийки матки у жінки, що була піддана штучному заплідненню

У другому аспекті (б) винахід стосується застосування сполук винаходу у випадках, коли необхідно запобігання надто ранньому дозріванню шийки матки або де шийка повинна підтримуватися жорсткою. Отже, сполуки (б) винаходу можуть, можливо у комбінації з сполуками (і), бути використані для одержання лікарських засобів при

І) лікуванні шийкової недостатності (шийкова функціональна недостатність) та

К) лікування загрози передчасних пологів

В основному сполуки можуть бути застосовні для жінок та самок тварин. Людські особини є переважною групою для такого лікування.

Донор та/або субстрат оксиду азоту (а) або інгібітор оксиду азоту (б) можуть бути введені будь-яким шляхом, в якому, прямо або опосередковано, він буде доходити до шийки. Отже, він звичайно застосовується інтравагінально на шийку, тобто звичайно як гель або крем. Він також може бути ініційований у тканину шийки або тупою голкою у канал шийки. Він також може бути нанесений екстраамніотично, тобто між стінкою матки та амніотичним мішком, використовуючи катетер.

Переважаючою формою є гель або крем, але він також може бути нанесений у вигляді капсул, що розм'якшуються, ліпосом або у складах уповільненого виділення або в якості водного розчину, наприклад, фізіологічного або білоквміщуючого розчину. Лікарський засіб може бути одержаний відомими методами.

При комбінованому застосуванні сполук,

вказаних вище як (а) та (і) антипрогестин може бути введений у композицію для системного або місцевого введення. Простагландин, як і цитокін, переважно вводять у композицію для місцевого введення.

При комбінованому застосуванні сполук, зазначених вище як (б) та (і), сполуки (і) можуть бути введені у склад для системного та місцевого введення.

Композиції, що включають сполуки (і) та (і), одержують відомими методами.

Сполуки (а) винаходу проявляють фармакологічну активність, викликаючи дозрівання шийки матки та, отже, можуть бути використані як лікарські засоби.

Сполуки (б) винаходу проявляють фармакологічну активність, попереджуючи дозрівання шийки матки та, отже, можуть бути використані як лікарські засоби.

Вимірювання дозрівання шийки матки описано у прикладі 1.

Нітропрусид натрію та інші донори впливають на дозрівання шийки матки при концентрації від приблизно 0,03мМ - 100мМ (1,8мкг - 6 мг/застосування) при локальному введенні вагітним самкам морських свинок. У випадках, вказаних раніше від (А) до (З), відповідне дозування буде вимірюватись залежно від, наприклад, використаної сполуки винаходу, хазяїна, способу введення та природи і важкості стану. Взагалі, задовільні результати на тваринах, як показано, одержані при концентрації від приблизно 0,03-100мМ для місцевого застосування, переважно при концентрації приблизно 10мМ.

Сполуки винаходу можуть бути введені за 8-48 годин до кінцевого дозрівання шийки матки. Наступні за дозріванням пологи можуть бути викликані введенням окситоцинової сполуки. Сполуки можна вводити у одній або більше дозах, що вводяться послідовно з різницею у декілька годин або один день. Сполуки винаходу можуть бути введені будь-яким звичайним шляхом, особливо у формі гелю, мазі або місцевої ін'єкції (при концентрації приблизно 0,03-100мМ).

Нітропрусид натрію та інші донори оксиду азоту впливають на дозрівання шийки матки при концентрації від приблизно 0,03мМ-100мМ (1,8мкг - 6мг/застосування) при введенні невагітним самкам морських свинок. У випадках, вказаних раніше від (Ж) до (З), відповідне дозування буде змінюватись залежно від, наприклад, використаної сполуки винаходу, хазяїна, способу введення та природи і важкості стану. Однак, взагалі, задовільні результати на тваринах, як показано, одержані при концентрації від приблизно 0,03мМ-100мМ (1,8мкг - 6мг/застосування) переважно при концентрації приблизно 10мМ. Сполуки винаходу можуть бути введені за 24 або 48 годин до остаточного дозрівання шийки матки. Сполуки можна вводити в одній або більше дозах, що вводяться послідовно з різницею у декілька годин або один день. Сполуки винаходу можуть бути введені будь-яким звичайним шляхом, особливо у формі гелю, мазі або місцевої ін'єкції.

Прикладами інтервалів дозування для людини типових NO-субстратів та NO донорів є

L-Аргінін 500мг - 10г/день  
 Нітропрусид натрію інтервал 500-2000мкг/кг/день  
 Нітрогліцерин 0,5-10мг/день  
 Ізосорбідмононітрат 10-100мг/день  
 Ізосорбіддинітрат 10-100мг/день  
 Інші донори та субстрати NO використовуються у біоеквівалентних кількостях  
 Прикладами інтервалів дозування типових NO-інгібіторів є

L-NAME 1-50мг/кг/день  
 L-N10 1-50мг/кг/день  
 L-NA 1-50мг/кг/день  
 L-MMA 1-50мг/кг/день  
 L-NG 1-50мг/кг/день  
 L-NMA 1-50мг/кг/день  
 Аміногуанідін 0,1-100мг/кг/день  
 Інші NO-інгібітори використовуються у біологічно еквівалентних кількостях  
 Інтервал дозування RU 486 25-600мг/день на уніцію  
 Інші антипрогестини використовуються у біологічно еквівалентних кількостях

Дозувальний інтервал для сульпростону 100-1000мкг/день внутрішньом'язово або внутрішньовенно  
 Інші простагландини, такі як PGE2 використовуються у біологічно еквівалентних кількостях  
 Простагландини також можна використовувати внутрішньошійково у вигляді гелю, внутрішньовагінально у формі гелю або таблеток

Дозувальний інтервал для інгібіторів COX-2 0,1-100мг/кг/день,

Дозувальний інтервал для IL-8 100нг-500 мкг/день, дозувальний інтервал для EL-1β 100нг-500мкг/день

Біологічно еквівалентні кількості інших сполук, що відрізняються від вказаних вище, можуть бути визначені методами, викладеними у прикладах, як кількості, що призводять до аналогічних ефектів у шийці матки, що і розкриття кількості при аналогічних умовах

Результати винаходу відображені на фігурах, на яких

Фігура 1 показує ефект нітропрусиду натрію на дозрівання шийки матки у вагітних морських свинок  
 Тварин обробляють, як описано у Прикладі 1  
 Верхня панель показує початкове розширення (в мм) під час вимірювання розтягнення, нижня панель демонструє вплив на розтягнення (нахил кривої регресії)  
 Дані представлені у вигляді діаграм  
 Вертикальні лінії представляють інтервал від мінімальної до максимальної

кількості  
 Висота стовпця, горизонтальна лінія та зірочка відповідають міжквартильному інтервалу, середньому та середньому значенню, відповідно

Фігура 2 показує вплив L-NAME на шийку матки у вагітних морських свинок  
 Верхня панель показує початкове розширення (у мм) під час вимірювання розтягнення, нижня панель демонструє вплив на розтягнення (нахил кривої регресії (N/мм)  
 Дані представлені у вигляді діаграм, як описано для фігури 1

Фігури 3-5 показують розтягненість шийки матки пацюків після обробки L-NAME (50мг/пацюка) або без обробки  
 Фігура 3 показує

розтягненість шийки матки при вагітності у пацюків (значення з, принаймні, одним загальним верхнім індексом не розрізняються при величині  $p < 0,05$  ( $n = 4$  у кожній групі)  
 Статистичний аналіз повторний дисперсійний аналіз ANOVA з наступними множинними порівняннями, що використовують критерії найменших значимих розрізень Фішера)  
 Фігура 4 показує розтягненість матки (інкубація *in vitro* з L-NAME 3мМ)  
 Фігура 5 показує розтягненість шийки матки після інкубації з L-NAME 3мМ *in vitro* (значення розрізняються при величині  $p < 0,005$ ,  $n = 6$  у кожній групі)  
 Статистичний аналіз перший t-тест)

Фігура 6 показує ефекти L-NAME (50мг/день) на пологи пацюків (значення з різними верхніми індексами розрізняються при величині  $p < 0,01$  (двосторонній T-тест),  $n = 10$  в кожній групі), тобто, збільшення у тривалості пологів та інтервали появи дитинчат (час між народженням дитинчат при обробці L-NAME)

Фігури 7-9 показують вироблення NO під час нормального розширення шийки матки ↑, після прогестерона ↓, антипрогестина ↑, та LPS ↑  
 Фігура 7 показує рівні нітриту + нітрату у шийці матки пацюків протягом вагітності (значення з, принаймні, одним загальним верхнім індексом не розрізняються при величині  $p < 0,05$  ( $n = 5-9$ )  
 Статистичний аналіз повторний дисперсійний аналіз ANOVA з наступними множинними порівняннями, що використовують критерії найменших значимих розрізень Фішера)

Фігура 8 показує рівні нітриту + нітрату у шийці матки пацюків при обробці прогестероном або антипрогестиним онаристом (значення з, принаймні, одним загальним верхнім індексом не розрізняються при величині  $p < 0,05$  ( $n = 5$ ),  
 Статистичний аналіз повторний дисперсійний аналіз ANOVA з наступними множинними порівняннями, що використовують критерії найменших значимих розрізень Фішера)

Фігура 9 показує рівні нітриту + нітрату у шийці матки пацюків при обробці LPS (значення з, принаймні, одним загальним верхнім індексом не розрізняються при величині  $p < 0,05$  ( $n = 5$ )  
 Статистичний аналіз повторний дисперсійний аналіз ANOVA з наступними множинними порівняннями, що використовують критерії найменших значимих розрізень Фішера)

#### Приклад 1

Вплив оксиду азоту на дозрівання шийки матки у вагітних морських свинок

а) Загальна частина Вимірювання дозрівання

Цілі шийки матки одержували з морських свинок на 44 день після копусу  
 Розтягненість вивчали модифікованим методом, описаним у публікації Доунінга та Шервуда (1985) *Endocrinology* 116 1215-1220  
 Відділення шийки матки розтягували між двома гаками, просунутими через кожний канал шийки  
 Один гак закріплювався, а інший рухався з частотою відбору проб 1Гц вгору, у той час як вимірювалась сила та зміщення  
 Першу шийку матки розтягували до досягнення сили 50нМ  
 Пов'язане з цим зміщення записувалося та було названо початковим розширенням  
 Отже, природна внутрішня окружність шийки матки є подвійним

початковим розширенням

Після чого шийку матки розтягували рухом гаку на 0,1мм, потім гак фіксували і шийці дозволяли розслабитися 2 хвилини. Цю процедуру повторювали до розриву шийки або принаймні до досягнення точки виходу, тобто огинаюча лінія навантаження залежно від часу ставала нелінійною (дивись публікацію Конрад та Уеланд (1979) *Am J Obstet, Gynecol*)

#### б) Аналіз

Для визначення розтягненості шийки матки вивчалась крива залежності сили від відношення подовження. Цю криву одержували, виходячи з максимальної сили на кожній стадії розтягнення, та пов'язаного з нею подовження, яке визначали як зміщення відносно початкового розширення. Нахил лінії регресії по лінійній частині кривої приймався як кількісний ефект обробки розтягненості шийки. Зменшення нахилу представляє збільшення розтягненості шийки (ефект дозрівання)

#### в) Спеціальна частина

Вагітні морські свинки, які мали 42 дні після копусу ( $n=6$  тварин у групі) оброблялись на 42 та 43 день внутрішньошийково двічі на день (о 9 ранку та 17 вечора) 200мкл гелю (3% гідроксицелюлоза), що містить 0,03мМ нитропрусиду натрію

Вимірювання розтягненості матки (параметри нахил лінії регресії, початкове розширення) проводилися на 44 день після копусу

Після введення дзеркала у піхву через 100 мм тупу голку у канал матки ін'єціювали 200 мкл целюлозного гелю, що містить або не містить гідропрусид натрію. Частина гелю проходила по каналу, розташовуючись навколо уніцевого інтернума шийки матки. Склад гелю: гель містить сполуки винаходу у фосфатному буферному фізіологічному розчині (ФБР) (дивись Хадсон і Хей (1980) *Practical Immunology, Oxford, sec edition*) з 3% (маса/об'єм) гідроксиетилцелюлози. Контрольна група одержала гель, що містить 3% (маса/об'єм) гідроксиетилцелюлози у ФБР

Механічні властивості шийки вимірювали за методом, описаним вище, який дозволив дати кількісне уявлення про розтягнення та розширення шийки матки в ізометричних умовах

г) Результати прикладу 1 показані на фігурі 1. Верхня панель показує нахили лінії регресії, яка є параметром розтягненості шийки матки. Нижня панель показує початкове розширення шийки матки у мм. Результати показують, що NO донор нитропрусид натрію (SNP) після локального введення значно збільшує дозрівання шийки матки у вагітних морських свинок

#### Приклад 2

Вплив нитропрусиду натрію (SNP) на морфологію шийки матки у вагітних морських свинок

SNP (0,1M) вводили внутрішньошийково з 0,2мл буферу ФБР, що містить 3% гідроксицелюлози, двічі на день на 42-43 день після копусу, а вплив був оцінений на 44 день після копусу морфологічною оцінкою. Контрольні тварини були оброблені наповнювачем. Всі шийки матки, використані для морфологічної оцінки,

одержували після фіксації *in situ* методом судинної перфузії. Процедуру перфузії виконували на 50 день після копусу між 9 та 10 годинами ранку під анестезією 1,5мл пентабарбітала внутрішньом'язово (60мг/мл). Канюля була імплантована в абдомінальну аорту нижче розгалуження ниркової артерії, перфузію тваринам виконували какоділатним буфером, pH7,4 протягом 60-90 секунд з наступною фіксацією 2,5% глутаральдегідом у какоділатному буфері pH7,4 протягом 6-10 хвилин під тиском 80-100см водного стовпа. Шийки матки висікали та відокремлювали від сусідніх тканин, потім фіксували при 4°C у тому ж фіксаторі. Після буферної промивки матеріал фіксували 2 години у холодному какоділатному буфері, що містить 1%  $\text{OSO}_4$ , депротували якісною серією етанолу та занурювали в епоксидну смолу Аральдїт. Відрізували від кожного зразка поперечні тонкі дослідницькі зрізи 1-2мм товщиною та фарбували 1% толуїдином синього у бораті натрію для вивчення методу світлової мікроскопії. Це дало можливість вивчити цілу шийку матки, тим самим забезпечуючи огляд розподілення різних популяцій клітин у шийці матки. Після чого відрізували маленькі зразки (1-2мм<sup>3</sup>) від поперечного блоку шийки матки та готували ультратонкі зрізи скляним або брильянтовим ножом на мікромомі Райхерт Ом U3 та розміщують на одношпинні мідні опорні решітки, покриті Формваром. Фарбували ацетатом уранілу та ацетатом свинцю і вивчали на електронному мікроскопі Цейсе EM при 60-80кВ. Вивчення електронною мікроскопією показало явне дозрівання шийки матки, що супроводжувалось розчиненням копагенових волокон, стромальними набряками, розширенням артерій та інфільтрацією макрофагів, лімфоцитів і гранулоцитів. Присутні також численні мастоцити. Морфологічні ефекти SNP були схожі на ефекти, що спостерігаються протягом нормального дозрівання шийки матки перед пологами або після обробки антипрогестином онапристон або цитокіном IL-8

#### Приклад 3

Вплив L-NAME на шийку матки у вагітних морських свинок

Вагітні морські свинки були оброблені L-NAME (12,5мг/день/тварина, підшкірно) на 48 та 49 день після копусу. Розтягнення та розширення шийки матки вимірювали на 50 день після копусу, тобто через два дні після початку обробки. Вимірювання проводили як описано у Прикладі 1. Результати Прикладу 3 показані на фігурі 2. Як початкове розширення, так і розтягненість шийки (збільшення нахилу) зменшувались порівняно з контрольною групою

#### Приклад 4

Вплив L-NAME на пологи у вагітних морських свинок

Осмотичний мінінасос, що містить L-NAME (група 1 7, група 2 12,5мг та група 3 25мг/тварина/день), імплантували підшкірно на 50 день після копусу (пологи = 67±2 дні після копусу). Контрольна група була оброблена наповнювачем

Всі тварини (5/5) з групи 3 та 3/5 з групи 2

народжувались передчасно (до 65 дня після копусу) у межах 8 днів після обробки. Дослідження довели, що L-NAME викликає передчасні пологи у морських свинок шляхом активації скорочення матки. Однак, у тварин, оброблених L-NAME спостерігались тривалі пологи, що тривали декілька годин. Це спостереження є непрямою вказівкою на недостатнє дозрівання шийки матки, яке було показано в окремому експерименті, виконаному на 50 день після копусу, з використанням вимірювання розтягненості шийки матки (фігура 2).

#### Приклад 5

Вплив L-NAME на пологи у пацюків

Фігура 6, яка базується на експерименті, подібному до описаного у Прикладі 4, показує, що протягом обробки L-NAME (50мг/день) вагітних пацюків тривалість пологів та інтервал появи дитинчат, який є часом між народженням окремих дитинчат, помітно збільшуються. Це ясно показує, що інгібітори оксиду азоту попереджають дозрівання шийки матки у пацюків.

#### Приклад 6

Вироблення оксиду азоту у пацюків протягом нормального розширення шийки матки, після обробки прогестероном, антипрогестином та LPS

##### а) Метод

Активність генерування оксиду азоту, виміряну як загальна кількість накопиченого нітриту у тканинах шийки та матки, оцінювали за методом, описаним у Яппампаллі, Гарфілд, Байем-Смт (1993). Оксид азоту інгібує скорочувальну здатність матки під час вагітності, але не під час пологів, Endocrinology 133: 1899-1902. Коротко, маленькі шматочки тканин шийки або матки одержували з народжуючих пацюків (22-23 день вагітності), оброблювали онапристоном (10мг на 18 день після копусу підшкірно) та наповнювачем на 18-21 день після копусу (контроль) та інкубували у мінімальному підтримуючому

середовищі (МПС) з L-аргініном з або без L-NAME 24 години при 37°C. Середовище аналізували на загальну кількість нітритів за допомогою реактиву Грієсса.

#### б) Результати

Вироблення нітриту у маточній тканині (міометрії) вироблення значно падає у зразках матки, одержаних з народжуючих тварин порівняно з 18 днем вагітності (Яппампаллі та ін. посилення цитоване). Вироблення нітриту у тканині шийки матки (фігура 7) є значне збільшення вироблення NO у шийці матки, одержаній від народжуючих тварин, порівняно з вагітними пацюками на 18-22 день після копусу. Вплив онапристону на вироблення NO у шийці матки (фігура 8) є значне збільшення вироблення NO у шийці порівняно з контрольною групою на 19 день після копусу до рівнів, відмічених для самовільно народжуючих тварин.

#### Приклад 7

Попереднє викликання дозрівання шийки матки донором оксиду азоту

Вагітній жінці (біля 30 років, 50-80кг) на 38 тижні вагітності, якій було призначено викликання пологів через прееклампсію, ввели нітропрусид натрію у концентрації 0,01-0,1мМ у гелі внутрішньошийково двічі на день, щоб досягти дозрівання шийки матки. Викликання пологів було виконано на наступний день, використовуючи впливання окситоцину внутрішньовенно.

#### Приклад 8

Лікування недостатності шийки матки місцевим застосуванням L-NAME

Вагітній жінці (біля 30 років, 50-80кг) на 26 тижні вагітності, що показує ознаки недостатності шийки матки (розширення шийки матки, розм'якшення шийки матки) вводили L-NAME у гелі внутрішньошийково або внутрішньовагінально у концентрації 0,1-50мг/мл по 2-3 дози на день до покращення симптомів недостатності шийки матки.