



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102711755 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 03

(21) 申请号 201080052406. 4

A61K 9/14 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 09. 07

A61K 9/20 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 9/48 (2006. 01)

2009134872 2009. 09. 18 RU

A61K 9/107 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61K 47/30 (2006. 01)

2012. 05. 18

A61P 35/00 (2006. 01)

A61P 37/00 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/RU2010/000487 2010. 09. 07

(87) PCT申请的公布数据

W02011/034465 RU 2011. 03. 24

(71) 申请人 威勒斯法玛股份有限公司

地址 俄罗斯莫斯科

(72) 发明人 V. I. 基塞莱夫 I. G. 瓦西里瓦

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 王国祥

(51) Int. Cl.

A61K 31/404 (2006. 01)

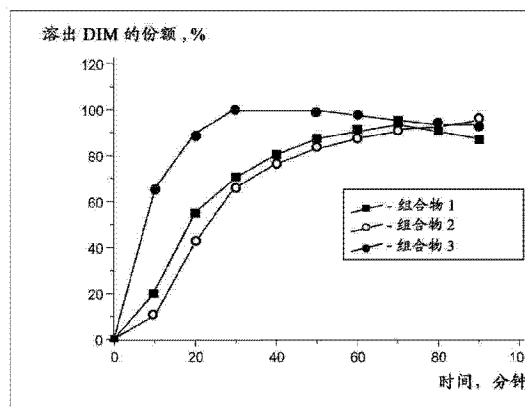
权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 4 页

(54) 发明名称

用于口服 3, 3'-二吡啶基甲烷的药物组合物

(57) 摘要

本发明涉及药学。它包含含有 3, 3'-二吡啶基甲烷 (DIM) 的嵌段共聚物药物组合物。口服用药物组合物包含作为活性成分的 3, 3'-二吡啶基甲烷以及目标添加剂, 该目标添加剂是环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物, 其中疏水嵌段含量小于 50 质量% 并且亲水嵌段的分子量等于 2, 250Da 或更大, 其中所述活性成分与所选择的嵌段共聚物之比为 10 : 1 至 2 : 1。所述组合物改善了口服时活性化合物的血流吸收。



1. 一种口服用药物组合物,其包含作为活性成分的 3,3'-二吡啶基甲烷以及目标添加剂,其还包含环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物作为所述目标添加剂,其中疏水嵌段的含量小于 50 质量 % 并且亲水嵌段的分子量是 2,250Da 或更大,其中所述活性成分与所选择的嵌段共聚物之比在 10:1 与 2:1 之间变化。

2. 权利要求 1 的药物组合物,还包含 Pluronic F127 作为环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物。

3. 权利要求 2 的药物组合物,还包含 Pluronic L10。

4. 权利要求 1 的药物组合物,还包含可药用载体。

5. 权利要求 4 的药物组合物,所述组合物呈片剂、冻干粉剂、混悬剂或胶囊剂的形式。

用于口服 3, 3' - 二吲哚基甲烷的药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及药学,具体涉及用于口服 3, 3' - 二吲哚基甲烷 (DIM) 的新药物组合物以及在其帮助下治疗疾病的方法。

背景技术

[0002] 3, 3' - 二吲哚基甲烷 (DIM) 及其类似物和衍生物具有广谱的生物活性,因而 DIM 可视为很有希望的药理学活性化合物。3, 3' - 二吲哚基甲烷 (DIM) 是吲哚 -3- 甲醇 (I3C) 的主要寡聚体产物,已证实其针对不同来源的转化细胞是高度选择性的 (Aggarwal B. B., Ichikawa H. (2005), Molecular Targets and Anticancer Potential of Indole-3-Carbinol and Its Derivatives, Cell Cycle, 4(9), 1201-1215)。药代动力学研究表明口服 I3C 在胃的酸性介质中几乎立即转化为 DIM (Arneson D. W., Hurwitz A., McMahon L. M., 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)。许多研究 I3C 的抗癌活性的研究者因此往往接受这样的观点,其给药时注册的临床效果的大多数实际上是通过吲哚 -3- 甲醇的二聚形式或者 DIM 产生的。

[0003] 实验上已经证明, I3C 体外和体内引起的几乎所有的多重抗癌机制也是 DIM 固有的 (Chang X., Tou J. C., Hong C., et al. (2005), 3, 3' -Diindolylmethane Inhibits Angiogenesis and the Growth of Transplantable Human Breast Carcinoma in Athymic Mice, Carcinogenesis, 26(4), 771-778; Firestone G. L., Bjeldanes L. F. (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-Sp1 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 H. A., Firestone G. L., 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 D. A., Hedstrom O. R., Fisher K. A. (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 F. H. (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 F. A. (2003), Indole-3-Carbinol and 3, 3' -Diindolylmethane Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells, Food Chem. Toxicol., 41, 745-752)。该结论也适用于前列腺癌。类似 I3I, DIM 体外和体内抑

制前列腺癌细胞的生长 (Li Y., Li X., Sarkar F. H. (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 F. A., Yannai S. (2004), Therapeutic Activity of 3,3'-Diindolylmethane on Prostate Cancer in an in vivo Model, Prostate, 61(2), 153-160) 并引起它们的凋亡 (Li Y., Li X., Sarkar F. H. (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 F. A. (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), 在该情形中类似于 I3C, 它通过以下方式在亚分子水平显示其活性: 调节负责增殖、分化和生存性过程的基因的表达 (Li Y., Li X., Sarkar F. H. (2003), Gene Expression Profiles of I3C-and DIM-Treated PC3 Human Prostate Cancer Cells Determined by cDNA Microarray Analysis, J. Nutr., 133, 1011-1019) 和抑制导致细胞过增殖的多信号路径。

[0004] 激素敏感性前列腺细胞 (LNCaP 培养物) 已经用于证实 DIM 能同时与雄激素受体结合从而以这种方式抑制它们易位至核中和相继的基因转录活化以及编码前列腺特异性 PSA 抗原的基因启动子的表达。PSA 蛋白 (特异性前列腺蛋白酶) 是前列腺癌的一种经典的标记, 其由前列腺癌细胞大量产生和分泌。同一文章在进行了结构研究之后还确定 DIM 在分子几何结构上非常类似于众所周知的合成抗雄激素康士得 (Casodex) (参见 Le H. T., Schaldach C. M., Bjeldanes L. F. (2003), Plant-Derived 3,3'-Diindolylmethane Is a Strong Androgen Antagonist in Human Prostate Cancer Cells, J. Biol. Chem., 278, 21136-21145), 然而, 与 DIM 相反, 康士得促进雄激素受体易位至核中 (Masiello D., Cheng S., Bubley G. J., et al. (2002), Bicalutamide Functions as an Androgen Receptor Antagonist by Assembly of a Transcriptionally Inactive Receptor, J. Biol. Chem., 277, 26321-26326)。

[0005] 最近才发现的 DIM 显示抗血管形成活性的能力是极其有意义的进展。血管的病理性生长几乎总是伴随增生过程和致瘤性过程 (neoplastic process)。作为常识, 除非形成毛细管网络以向 1~2mm 直径的新肿瘤供应氧气和营养物, 否则该肿瘤根本不会继续生长。已经证实, 微摩尔浓度的 DIM 体外抑制内皮细胞的增殖和迁移及其有效形成血管的能力。在体内, 皮下注入实验动物中的 DIM (5mg/kg 天) 是 74% 有效于抑制病理性新血管发生 (Chang X., Tou J. C., Hong C., et al. (2005), 3,3'-Diindolylmethane Inhibits Angiogenesis and the Growth of Transplantable Human Breast Carcinoma in Athymic Mice, Carcinogenesis, 26(4), 771-778; McCarty M. F., Block K. I. (2005), Multifocal Angiostatic Therapy: An Update, Integrative Cancer Therapies, 4(4), 301-314)。

[0006] 核转录因子 NF- κ B 是最有意义的分子靶标, 其显示在临床实践中开发和采用的现代靶向制剂 (定向制剂) 意在阻断的活性。已经证明, 该因子介导炎性响应并在调节在生长因子和细胞因子引起的信号途径的最终阶段的增殖性 (抗细胞凋亡)、生成血管的、迁移性、和侵袭性细胞活性中具有关键作用。此外, 活性因子易位至核中以及负责这些过程的基因的转录激活是有意义的活动。已经发现, 若体

外使用, DIM(Rahman K.M., 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, Mol. Cancer Ther., 6(10), 2757-2765; Rahman K.M., Sarkar F.H. (2005), Inhibition of Nuclear Translocation of Nuclear Factor- κ B Contributes to 3,3'-Diindolylmethane-Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells, Cancer Res., 65, 364-371) 及其代谢前体 I3C 有效地抑制 NF- κ B 的核易位和活性。这意味,除了其抗增殖和抗血管生成效果之外,基于 DIM 的制剂还能抑制往往出现在激素依赖性器官和组织中的增生过程和致瘤性过程中的局部炎症反应。

[0007] 在安慰剂控制的临床研究的框架中对具有宫颈非典型增生的消退 (regression of cervical dysplasias) 的患者的具体研究有助于探索疾病的积极动力学与 I3C 转化为 DIM 的效率之间的直接联系 (Sepkovic D.W., Bradlow H.L., Bell M. (2001), Quantitative Determination of 3,3'-Diindolylmethane in the Urine of Individuals Receiving Indole-3-Carbinol, Natr. Cancer, 41, 57-63)。在接受该制剂的患者的尿中确定了高 DIM 浓度。

[0008] 最近的一项实验研究证实了 DIM 体外引起人宫颈 HPV 感染的角质形成细胞的凋亡的能力。此外,在被研究的 3 种宫颈癌细胞系中的一种中, DIM 显示比 I3I 高得多的效率。DIM 的 LD₅₀ 值为 50~60 μ M, I3C 的 LD₅₀ 值为 200 μ M,但是与其代谢前体 (I3C) 不同, DIM 未在正常 (未转化) 角质形成细胞中引起任何凋亡变化 (Chen D.Z., Qi M., Auborn K., Carter T.H. (2001), Indole-3-Carbinol and Diindolylmethane Induce Apoptosis of Human Cervical Cancer Cells and in Murine HPV 16-Transgenic Preneoplastic Cervical Epithelium, J. Nutrit., 131, 3294-3302)。

[0009] 结论是,最近发现 DIM 具有另外的性质,即其免疫调变活性,这可能是其最重要的优点之一。研究者显示当体外使用时, DIM 通过激活 IFN γ 受体以及其它 IFN 反应性调节蛋白的表达来刺激肿瘤细胞的 IFN γ - 依赖性信号途径。

[0010] 给药基于 DIM 的制剂的口服方法必须优选考虑,因为它提供比其它给药方法好的一系列优点,具体是患者舒适度、灵活的治疗战术、以及治疗成本。然而,口服给药显著限制了 DIM 的生物利用度,因为其差的溶解性和在小肠中低的吸收效率。DIM 通常在生理盐溶液中显示差的溶解性,并且具有有限的通过屏障膜的能力。此外,该化合物已知与血浆蛋白结合并涉及血流内的多种非特异性反应中,所述多种非特异性反应大大降低了该化合物运送至病灶的效率。

[0011] 最近已经开发了几种基于聚乙二醇化维生素 E (TPGS) 的药物组合物作为解决上述问题的方法 (Anderton M.J., Manson M.M., et al. (2004), Physiological Modeling of Formulated and Crystalline Diindolylmethane Pharmacokinetics Following Oral Administration in Mice, Drug Metabolism and Disposition, 32(6), 632-638)。聚乙二醇化维生素 E 已知其能提高各种化合物在水中的溶解度 (Constantinides P.P., Tustian A., Kessler D.R. (2004), Tocol Emulsions for Drug Solubilization and Parenteral Delivery, Adv. Drug Deliv. Rev., 56, 1243-1255) 以及在口服时改善它们的生物利用度 (Wu S.H.W., Hopkins W.K. (1999), Characteristics of d- α -Tocopheryl

PEG 1000 Succinate for Applications as an Absorption Enhancer in Drug Delivery Systems, Pharm. Technol., 23, 52-68)。然而, 基于 TPGS 的组合物仅能轻微提高 (仅提高 50% 至 100%) DIM 及其类似物或衍生物的生物利用度 (Zeligs, et al., US Patent 6, 416, 793, Formulation and Use of Controlled-Release Indole Alkaloids), 因此这些化合物的治疗潜力不能完全得到利用。

发明内容

[0012] 因此, 本发明的一个目的是改善 DIM 给药。

[0013] 该目的通过基于环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物的用于 DIM 口服的新药物组合物实现。

[0014] 该口服用药物组合物包含作为活性成分的 3, 3' - 二吡啶基甲烷以及目标添加剂 (target additive), 所述目标添加剂是环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物, 其中疏水嵌段含量小于 50 质量%, 并且亲水嵌段的分子量是 2, 250Da 或更大, 所述活性成分与所选择的嵌段共聚物之比等于 10:1 至 2:1。

[0015] 所述药物组合物优选包含 Pluronic F127 共聚物作为环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物。

[0016] 所述药物组合物还可包含 Pluronic L10。

[0017] 所述药物组合物还可包含可药用载体。

[0018] 所述药物组合物可呈片剂、冻干粉剂、混悬剂或胶囊剂的形式。

附图说明

[0019] 图 1 示例说明 DIM 溶出的动力学 (DIM 浓度由光密度变化来确定)。

[0020] 组合物 1-DIM (对照);

[0021] 组合物 2-Pluronic F127 和 DIM;

[0022] 组合物 3-Pluronic F127、Pluronic L10 和 DIM。

[0023] 图 2 示例说明 DIM 在给予下面组合物的大鼠的血浆中的药代动力学:

[0024] 组合物 1-DIM (对照);

[0025] 组合物 2-Pluronic F127 和 DIM;

[0026] 组合物 3-Pluronic F127、Pluronic L10 和 DIM 的冻干溶液 (lyophilically dried solution)

[0027] 组合物 4-Pluronic F127 和 DIM;

[0028] 组合物 5-Pluronic L10 和 DIM。

[0029] 图 3 显示患有前列腺瘤 (PGA) 和前列腺上皮内瘤 (PIN) 的患者在治疗前后的形态学研究结果:

[0030] 组 I (18 个患者) 给予根据本发明的基于 DIM 的药物组合物; 以及

[0031] 组 II (16 个患者) 给予包含结晶 DIM 的药物组合物。

[0032] 图 4 显示免疫组织学分析结果, 其中在给药制剂之前和之后研究了 IGF 和 EGF 生长因子和 TGF- β 调节因子;

[0033] 组 I (4 个患者) 给予本发明要求保护的基于 DIM 的药物组合物; 以及

[0034] 组 II (4 个患者) 给予包含结晶 DIM 的药物组合物。

具体实施方式

[0035] 环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物还以名称 Pluronic 和 Poloxamer 著称。

[0036] Pluronics 的疏水 - 亲水性及其增溶水不溶性化合物的能力由聚环氧乙烷 (亲水) 嵌段和聚环氧丙烷 (疏水) 嵌段的大小和比例决定。下表 (表 1) 显示各种 Pluronics 的结构性质。

[0037] 表 1 : 各种 Pluronics 的结构性质

[0038]

Pluronic	亲水嵌段质量, Da	疏水嵌段含量, 质量%
L10	3,200	60%
L31	950	90%
F35	950	50%
L42	1,200	80%
L43	1,200	70%
L44	1,200	60%
L61	1,750	90%

[0039]

L62	1,750	80%
L63	1,750	70%
P65	1,750	50%
F68	1,750	20%
L72	2,050	80%
P75	2,050	50%
L81	2,250	90%
P84	2,250	60%
P85	2,250	50%
F87	2,250	30%
F88	2,250	20%
L92	2,750	80%
F98	2,750	20%
P103	3,250	70%
P104	3,250	60%
P105	3,250	50%
F108	3,250	20%
L121	4,000	90%
L122	4,000	80%
L123	4,000	70%
F127	4,000	30%
10R5	1,000	50%
10R8	1,000	20%
12R3	1,200	70%
17R2	1,700	80%
17R2	1,700	80%
17R4	1,700	60%
17R8	1,700	20%
22R4	2,200	60%
25R1	2,500	90%

[0040]

25R2	2,500	80%
25R4	2,500	60%
25R5	2,500	50%
25R8	2,500	50%
31R1	3,100	90%
31R2	3,100	80%
31R4	3,100	60%

[0041] 尽管在药物组合物和化妆品组合中广泛使用上述嵌段共聚物例如用于提高疏水性水不溶性化合物的溶解度 (Foster B., Cosgrove T., Hammouda B. (2009), Pluronic Triblock Copolymer Systems and Their Interactions with Ibuprofen, *Langmuir*, 25(12), 6760-6766), 但是对于各具体的药物需要针对其用途的个体化途径。

[0042] 目前已知有超过 50 种能以一种方式或另一种方式影响药物的生物利用度的 ATP 依赖性转运蛋白 (Oostendorp R.L., Beijnen J.H., Schellens J.H. (2009), The Biological and Clinical Role of Drug Transporters at the Intestinal Barrier, *Cancer Treat. Rev.*, 35(2), 137-147)。此外, 这些转运蛋白的遗传多态性也显著地促使不同药物的生物利用度差异性 (Nakamura T., Yamamori M., Sakaeda T. (2008), Pharmacogenetics of Intestinal Absorption, *Curr. Drug Deliv.*, 5(3), 153-169)。限制不同药物的生物利用度的在各种表面-活性的聚合物和各种转运蛋白及其组合之间相互作用的确切机制还未建立, 并且对一种活性试剂的生物利用度具有积极效果的组合可能对于另一种试剂是无效的, 反之亦然。

[0043] 通过环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物提高的化合物口服生物利用度与 P-糖蛋白活性调节相关, 因此, 提议将这些嵌段共聚物加入至其中 P-糖蛋白底物是活性试剂的组合中 (Kabanov A.V. et al., US Patent 6,277,410, Copolymer Compositions for Oral Delivery), 如几种 MRP 制剂那样 (Miller D.W., Batrakova E.V., Kabanov A.V. (1999), Inhibition of Multidrug Resistance-Associated Protein (MRP) Functional Activity with Pluronic Block Copolymers, *Pharm. Res.*, 16(3), 396-401)。其它表面-活性聚合物化合物也证实了类似的性质。具体而言, 除了针对水不溶性化合物的高度增溶活性之外, 还确定了 Solutol H15 调节 P-糖蛋白活性的能力 (Coon J.S., Knudson W., Clodfelter K., et al. (1991), Solutol HS 15, Nontoxic Polyoxyethylene Esters of 12-Hydroxystearic Acid, Reverses Multidrug Resistance, *Cancer Res.*, 51, 897-902), 使得其潜在地能用作口服药物制剂的吸收增强剂。在上述的 Chremophor EL、Tween 80、TPGS 以及其它类似化合物中也发现类似的性质 (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)。

[0044] 下述的直接实验 (实施例 8) 表明 DIM 未提高表达 P-糖蛋白的细胞对罗丹明 123

的捕获,这暗示DIM不是该转运蛋白的底物。该发现与上述使用TPGS作为高度活性的P-糖蛋白调节剂用于提高DIM生物利用度的尝试的结果很好地一致,该尝试未能显著地提高这个参数。作为比较,根据本发明使用的多种表面-活性聚合物导致药物的口服生物利用度的显著提高。

[0045] DIM在含有不同比例的疏水嵌段和亲水嵌段的Pluronics中溶解度的分析表明含有50质量%以上的亲水嵌段的聚合物具有比含有低于50质量%的亲水嵌段的聚合物高的增溶能力。已知一些Pluronics具有恒定的亲水单元分子量以及可变的环氧乙烷基团含量。

[0046] 出乎预料地发现,DIM生物利用度还依赖于亲水嵌段的分子量。这样的环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物促使了较高的生物利用度,其中疏水嵌段含量低于50质量%并且亲水嵌段的分子量是2,250Da或更大。PluronicF127显示最高的效率并可用于获得含有超过3mg/ml的DIM的稳定水分散体。当该DIM组合物口服给药于大鼠时,其生物利用度显著增大(超过5倍)。所述活性成分与所选择的嵌段共聚物的比例可根据期望的释放时间而变化,该比例平均为10:1至2:1。最适宜的Pluronic F127与DIM之比为6:1。

[0047] 还出乎预料地发现,在口服给药于大鼠时对DIM在水中溶解度和生物利用度具有很小作用的Pluronic L10(含有约40%的亲水嵌段和总分子量为约3,200)被证明与对照相比能显著提高Pluronic F127的效果和提高DIM制剂的生物利用度超过15倍。Pluronic F127与Pluronic L10的最佳比发现为8:1至1:1。还出乎预料的是,含有低于50%的亲水嵌段的其它Pluronics例如Pluronic P85和Pluronic L61却不产生类似的效果。

[0048] 本发明组合物可通过下面方法制备:例如各组分在合适溶剂诸如水、和醇或水-醇溶液中的联合或单独溶出,然后以所要求的比例混合各溶液。

[0049] 所得的溶液剂可无需干燥形成固体药物制剂。溶液剂通过任意技术上合适的方法或者方法组合干燥,包括但不限于诸如在旋转蒸发仪或SpeedVac中蒸发、冷冻干燥或者连续流干燥等方法。

[0050] 就绪的药物制剂可通过使用必要的赋形剂例如硬脂酸钠、乳糖、纤维素衍生物等将干燥组合物制成片剂来获得。

[0051] 就绪的药物制剂可通过将干燥组合物装入胶囊例如具有固体壳的明胶胶囊中来获得。

[0052] 含有有效量的DIM的药物组合物可用于治疗多种疾病。

[0053] 考虑到上述DIM分子靶标(具体而言,其对雌激素代谢、恢复细胞凋亡过程以及抗增殖活性、抗肿瘤活性和抗血管形成活性的积极作用),本申请所述的组合物适于治疗增殖性疾病诸如子宫肌瘤、子宫内膜异位和前列腺增生疾病。我们还证实高生物利用度DIM在治疗细胞内传染物诸如沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)引起的生殖泌尿道传染病中的高临床功效。很可能的是,这些效果是由诱导被沙眼衣原体感染的上皮细胞的程序化细胞死亡引起的。

[0054] 治疗和疾病预防所需的3,3'-二吡啶基甲烷的有效量可根据疾病的种类和严重性以及患者的年龄和状况而变化,并且可由主治医师基于各案确定。所用剂量可在2mg至2,000mg/天变化。

[0055] 本发明用下面的实施例示例说明。

[0056] 实施例 1

[0057] 测定 DIM 在各种 Pluronics 水分散体中的溶解度

[0058] 制备 Pluronic 溶液

[0059] 将 400mg 的 Pluronic、9.7ml 脱水乙醇和 0.3ml 蒸馏水置于玻璃容器中。将所得的混合物在磁力搅拌器中小心搅拌直至得到透明溶液。

[0060] 制备 DIM 溶液

[0061] 将 10mg of DIM 置于玻璃容器中,加入 1.0ml 脱水乙醇。将混合物在磁力搅拌器中小心搅拌直至得到透明溶液。

[0062] 制备含有 Pluronic 和 DIM 的分子分散体

[0063] 将 0.5ml 的 Pluronic 溶液 (20mg) 和 0.2ml 的 DIM 溶液置于 2ml 试管中。

[0064] 所得的溶液用超声处理 10 分钟并搅拌 1 小时。在旋转蒸发仪或 SpeedVac 中从所得的混合物中除去乙醇,继续真空蒸发过夜。由于这些操作,将所得的混合物溶于 1.5ml 蒸馏水中,过滤,在得到的溶液中的 DIM 浓度通过光谱测定法确定。在下表 (表 2) 中给出的结果表明:当使用 Pluronic F127 时,DIM 具有最高的溶解度。

[0065] 表 2 :DIM 在各种 Pluronics 水分散体中的溶解度

[0066]

Pluronic	亲水嵌段质量	疏水嵌段含量	DIM 在水中溶解度, mg/ml
L10	1,000	60%	> 0.01
L31	950	90%	> 0.01
F35	950	50%	0.15
L42	1,200	80%	> 0.01
L43	1,200	70%	> 0.01
L44	1,200	60%	0.1
L61	1,750	90%	> 0.01
L62	1,750	80%	> 0.01
L63	1,750	70%	> 0.01
P65	1,750	50%	0.2
F68	1,750	20%	0.35
L72	2,050	80%	> 0.01
P75	2,050	50%	0.33
L81	2,250	90%	> 0.01
P84	2,250	60%	0.15
P85	2,250	50%	1.2
F87	2,250	30%	0.9
F88	2,250	20%	0.8
L92	2,750	80%	> 0.01
F98	2,750	20%	0.4
P103	3,250	70%	> 0.01

[0067]

P104	3,250	60%	0.3
P105	3,250	50%	0.5
F108	3,250	20%	0.5
L121	4,000	90%	> 0.01
L122	4,000	80%	> 0.01
L123	4,000	70%	0.02
F127	4,000	30%	<3.0

[0068] 实施例 2

[0069] 制备含有 Pluronic F127 和 DIM 的分子混悬剂

[0070] 制备 Pluronic F127 溶液

[0071] 将 400mg 的 Pluronic F127、9.7ml 脱水乙醇和 0.3ml 蒸馏水置于玻璃容器中。将所得的混合物在磁力搅拌器中小心搅拌直至得到透明溶液。

[0072] 制备 DIM 溶液

[0073] 将 10mg 的 DIM 置于玻璃容器中,加入 1.0ml 脱水乙醇。将内容物在磁力搅拌器中小心搅拌直至得到透明溶液。

[0074] 制备含有 Pluronic F127 和 DIM 的分子混悬剂

[0075] 将 10mg 的 Pluronic F127 (20mg) 和 0.2ml 的 DIM 溶液置于 2ml 试管中。所得的溶液用超声处理 10 分钟并搅拌 1 小时。在旋转蒸发仪或 SpeedVac 中从所得的混合物中除去乙醇,继续真空蒸发过夜。由于这些操作,得到蜡状物质,将其溶于蒸馏水中以获得目标的 DIM 浓度 (3mg/1ml 蒸馏水)。

[0076] 实施例 3

[0077] 制备含有 Pluronic F127、Pluronic L10 和 DIM 的分子混悬剂

[0078] 制备 Pluronic L 10 溶液

[0079] 将 250mg 的 Pluronic L10 和 10ml 脱水乙醇置于玻璃容器中。将所得的混合物在磁力搅拌器中小心搅拌。

[0080] 制备 Pluronic F127 溶液

[0081] 将 400mg 的 Pluronic F127、9.7ml 脱水乙醇和 0.3ml 蒸馏水置于玻璃容器中。将所得的混合物在磁力搅拌器中小心搅拌直至得到透明溶液。

[0082] 制备 DIM 溶液

[0083] 将 10mg 的 DIM 置于玻璃容器中,加入 1.0ml 脱水乙醇。将内容物在磁力搅拌器中小心搅拌直至得到透明溶液。

[0084] 制备含有 Pluronic F127、Pluronic L10 和 DIM 的分子混悬剂

[0085] 将 0.5ml 的 Pluronic F127 溶液 (20mg)、0.2ml of DIM 溶液和 0.1ml 的 Pluronic L10 溶液置于 2ml 试管中。所得的溶液用超声处理 10 分钟并搅拌 1 小时。在旋转蒸发仪或 SpeedVac 中从所得的混合物中除去乙醇,继续真空蒸发过夜。由于这些操作,得到蜡状物质,将其溶于蒸馏水中以获得目标的 DIM 浓度 (3mg/1ml 蒸馏水)。

[0086] 实施例 4

[0087] 通过冻干法制备水溶性 DIM 组合物

[0088] 将 1ml 蒸馏水加入在实施例 1 和实施例 2 中所述的含有 Pluronic 的 DIM 溶液之一中。将混合物在搅拌器中搅拌直至得到透明溶液。该溶液稳定 15 小时。所得的溶液进行冷冻并置于冷冻干燥机中。冻结溶液的冻干得到无色粉末。

[0089] 实施例 5

[0090] 通过喷雾干燥制备 DIM 组合物

[0091] 将 200g 的 Pluronic F127、300ml 蒸馏水和 10 升乙醇置于 20 升玻璃容器中。搅拌混合物直至 Pluronic 完全溶解并得到透明溶液。向所得溶液中加入 25g 的 Pluronic L10 和 20g 的 DIM。搅拌所得的混合物直至得到透明的溶液,而后进行过滤。所得的溶液在 40° C 的温度在喷雾干燥机中干燥。

[0092] 实施例 6

[0093] 通过将 DIM 直接溶解在熔融 Pluronic 中制备组合物

[0094] 将 Pluronic F98 和 Pluronic F127 或者它们适宜比例的组合 (F98 与 F127 之比为约 1:4) 混合,并在 60° C 熔融,然后在激烈搅拌下将结晶 DIM 加入熔融物料中。在 DIM 溶解之后,将溶液快速冷却至 +5° C。将所得的固体物料研磨成粉末。

[0095] 实施例 7

[0096] 研究含 DIM 的组合物的溶解度

[0097] 进行测定实施例 2 和 3 中获得的 DIM 组合物在水中的溶解度的研究。出于该目的,将 2ml 的 0.9% 氯化钠水溶液加入每个所得的组合物 (它们的按钮各自包含 6mg 的 DIM) 中并置于以 200 转 / 分钟旋转的水平振荡器中。周期性取出 0.2ml 样品从而根据其光密度变化确定 DIM 浓度。实验结果示于附图 (图 1)。

[0098] 实施例 8

[0099] DIM 相对于膜 P-糖蛋白的抑制活性研究

[0100] 研究罗丹明 (罗丹明 123 (R123)) 被表达膜 P-糖蛋白 (P-gp) 的 MESSA/DX 细胞的吸收,作为研究实验的模型。阴性 P-gp MESSA/DX 细胞用作对照。将细胞以 40,000 个细胞 / 孔的浓度置于 96 孔板中。在 24 小时孵育之后,向细胞中以 3 μ M 的浓度加入 R123,在各种浓度的 DIM 和维拉帕米 (verapamil, 一种众所周知的 P-gp 抑制剂) 的存在下在 37° C 继续孵育 1 小时。孵育结束时,移出溶液,并用冷的磷酸盐缓冲液漂洗细胞 3 次。然后测量细胞样品中的罗丹明荧光。所有的实验都进行 3 次。如预期那样,与阴性 MESSA 细胞相比,表达膜 P-gp 的 MESSA/DX 细胞非显著地吸收罗丹明。维拉帕米 (一种众所周知的 P-gp 抑制剂) 提高了 R123 在 MESSA/DX 细胞中的积累 (取决于剂量),但是 DIM 未影响 R123 在任何细胞系中的积累,这明确地表明 DIM 不是 P-gp 的底物。

[0101] 实施例 9

[0102] 在给予 DIM 组合物的实验动物中的 DIM 药代动力学

[0103] 出于本研究目的使用实施例 3~4 中制备的 DIM 组合物。结果在本实施例的末尾处的表中给出。

[0104] 将组合物以水分散体的形式 (目标 DIM 浓度为 3mg/1ml 溶剂) 口服给药于动物。结晶 DIM 以 15mg 的 DIM 在 5ml 的 0.5% 甲基纤维素于蒸馏水的溶液中的混悬剂给药。

[0105] 在实验中使用重 250~350g 的斯普拉-道来雌大鼠。所有的实验都严格按照 GLP 规则进行。DIM 制剂以 60mg/1kg 体重给药于动物。在给药后的不同的时间间隔抽取血液样品 (15、30、45 分钟以及 1、2、4、6 和 24 小时)。抽取后立即将血液样品离心, 将从血液中分离出的血浆在 -80°C 冷冻存储。

[0106] 异氟烷 (Bimeta-MTC, Animal Health Inc., Cambridge, ON, Canada)。从静脉抽取血液, 加入含肝素的试管中, 立即将试管置于冰上 5 至 10 分钟。然后将血液离心分离出血浆。将血浆样品在 -80°C 冷冻存储。

[0107] 样品萃取和分析

[0108] 血浆样品解冻, 离心, 并在塑料试管中以 $100\mu\text{L}$ 等分液分装。然后在 180°C 搅拌的同时用 $750\mu\text{L}$ 甲基叔丁基醚萃取样品 2 分钟两次。样品以 10,000r.p.m. 离心 10 分钟。分离出上清液, 转移至玻璃试管中。有机相在 50°C 用氮气蒸发直至其完全干燥。将干燥的样品在 -80°C 存储。将研究的样品溶于 $15\mu\text{L}$ 乙腈和 $85\mu\text{L}$ 流动相中。然后通过 HPLC 方法分析总体积 $20\mu\text{L}$ 的等分液。

[0109] HPLC 性能:

[0110] C18 反相柱 $50\times 4.6\text{mm}$, Symmetry/Shield $3.5\mu\text{m}$ (吸着剂, 以 μm 计的颗粒), 30°C , 流速 1.5ml/min. , 注入体积 $20\mu\text{L}$, 在 280nm 。

[0111] 流动相: 缓冲液 B 的线性梯度, 0% 至 100%, 缓冲液 A: 5% 乙腈, 0.1% 三氟乙酸, 缓冲液 B: 90% 乙腈, 0.1% 三氟乙酸, 达 10 分钟。

[0112] DIM 浓度在校准曲线上基于峰面积 (AUP) 确定。曲线下面积 (AUC) 根据梯形规则 (其用于确定具体的积分) 确定。对照和组合物的 C_{max} 和 AUC 值在下表 (表 3) 中给出。

[0113] 表 3. 在各种组合物中的 DIM 药代动力学

[0114]

组	组合物	C_{max} [$\mu\text{g/mL}$]	C_{max} 组合物/对照之比	$\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ [$\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$]	$\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ 组合物/对照之比
1	对照 (0.5% 甲基纤维素)	0.22 ± 0.02		3.88 ± 0.08	
2	L10/F127 (实施例 3)	4.47 ± 0.17	20.3	56.76 ± 6.25	14.6
3	L10/F127 (冷冻干燥, 实施例 4)	4.99 ± 0.64	22.7	58.56 ± 7.76	15.1
4	F127 (实施例 2)	3.08 ± 0.17	14	21.55 ± 3.31	5.6
5	L10 (实施例 2)	0.55 ± 0.04	2.5	7.75 ± 0.32	2.0

[0115] 数据图示于附图 (参见图 2) 中, 说明了给予上述组合物的大鼠的血浆中的 DIM 的

药代动力学。

[0116] 实施例 10

[0117] 实施例 2 的药物 DIM 组合物的临床功效研究

[0118] 研究目的

[0119] 进行本研究来评价与含有结晶 DIM 的药物组合物（在胶囊剂中含有 50mg 结晶 DIM）相比新药物 DIM 组合物（在胶囊剂中含有 50mg 的 3,3'-二吡啶基甲烷）的临床功效、形态学效果和安全性。

[0120] 研究主题是：

[0121] • 评价制剂对下尿道功能障碍症状的动力学和前列腺癌患者的生存质量的影响；

[0122] • 评价制剂对主要尿动力学因素（最大尿流速 ($Q_{\max}$) 和残余尿体积 (V_{res})）的影响；

[0123] • 评价制剂对 PSA 动力学的影响；

[0124] • 评价制剂对前列腺体积的影响；

[0125] • 评价与安慰剂相比对前列腺组织的形态学影响的性质；以及

[0126] • 基于对不期望事件的频率、副作用和血清的主要生化参数的动力学的分析评价制剂的安全性。

[0127] 采用下面的组合物进行试验：

[0128] 含有根据本发明的 DIM 的药物组合物（组 I），2 个胶囊 /2 次一天。

[0129] 含有结晶 DIM 的药物组合物（组 II），2 个胶囊 /2 次一天。

[0130] 对 34 个患有前列腺癌 (PGA) 和前列腺上皮内瘤 (PIN) 的患者进行检查和治疗，以评价制剂的临床功效、形态学效果和安全性。组 I (18 个患者) 给予 2 个所述含 DIM 的药物组合物的胶囊 2 次每天，组 II (16 个患者) 给予 2 个结晶 DIM 药物组合物胶囊 2 次每天。

[0131] 根据下面标准选择接受治疗的患者：

[0132] • 症状和形态学上确认患有 PGA 和 PIN 的门诊患者和住院患者；

[0133] • 年龄超过 50 岁；

[0134] • 给出书面同意并在处方治疗上遵照医生指示的患者；

[0135] • 在 I-PSS 等级上超过 7 的症状表现；

[0136] • $Q_{\max}$ 大于 5 且小于 15ml/s；

[0137] • 残留尿不超过 200ml；

[0138] • 前列腺体积超过 25cm³；以及

[0139] • PSA 至多 10ng/ml。

[0140] 评价制剂对临床症状的效果

[0141] 在时间起点处 (V_1)，记录两组的两个形态学特性 L-PIN 和 H-PIN。患者症状在制剂的影响下恶化、不变或者改善。在 V_1 与 V_2 之间的时间间隔内总共存在 7 种可能的临床响应变化。在此情形中，可能针对顺序等级评价临床变化 (V_1 与 V_2 之间)。用于比较在所研究的组中的临床变化而言，曼 - 惠特尼准则 (Mann-Whitney criterion) 是最敏感的。

[0142] 所有患者的形态学研究数据的变化示于附图中（参见图 3），其说明了研究期间组 I 和 II 的形态学特性的变化。

[0143] 基于治疗效果的双侧显著水平，组 I（其给予根据本发明的含 DIM 的药物组合物）

和组 II (给予含有结晶 DIM 的药物组合物) 显著不同 ($p=0.002$)。

[0144] 比较恶性频率

[0145] 进行单独的研究来探索恶性频率 (malignity frequency) 在研究组中的差异。在核心组 (其 18 个患者给予新配方形式的含 DIM 的药物组合物) 中未观察到恶性病例。在对照组 (16 个患者给予含有结晶 DIM 的药物组合物) 中记录有 4 例前列腺癌。考虑到卡方近似的概然误差, 采用更准确的 Fischer 准则。

[0146] 结论: 被研究的组在恶性频率上不同, 它们的差异是统计上显著的 ($p=0.039$)。

[0147] 评价本发明要求保护的含 DIM 药物组合物对免疫组织化学数据的影响

[0148] 在两组 4 个患者中进行免疫组织化学分析, 来自组 I 的患者给予新配方形式的含 DIM 的药物组合物, 而来自组 II 的患者接受含有结晶 DIM 的药物组合物。在给药研究制剂之前和之后, 评价诸如 IGF 和 EGF 生长因子以及 TGF- β 调节因子等因子。IGF、EGF 和 TGF- β 的初始值是统计一致的, 进一步测量时记录这些参数水平的下列差异:

[0149] 在服用新配方形式的含 DIM 的药物组合物的患者组中, 记录了生长因子 IGF ($p=0.004$) 和 EGF ($p=0.002$) 的统计信赖的降低, 还记录了 TGF- β 水平的升高 ($p=0.047$)。在对照组中未登记到可信赖的动力学。所得的数据图示于附图 (参见图 4) 中。

[0150] 结论

[0151] 在服用本发明要求保护的含 DIM 的药物组合物的患者组中得到的 IGF 和 EGF 生长因子的可信赖降低以及 TGF- β 水平升高的数据指向该制剂的活性试剂对病理性细胞增殖的主要信号机制的作用, 还指向诱导转化细胞的凋亡。

[0152] 在治疗期间未登记到副作用或者不期望事件。

[0153] 新配方形式的含 DIM 的药物组合物在患有前列腺瘤 (PGA) 和前列腺上皮内瘤 (PIN) 的患者中显示出抗增殖活性。

[0154] 新配方形式的含 DIM 的药物组合物是治疗 PGA 和 PIN 的安全药物, 因为在治疗期间其没有副作用和不期望事件。

溶出 DIM 的份额, %

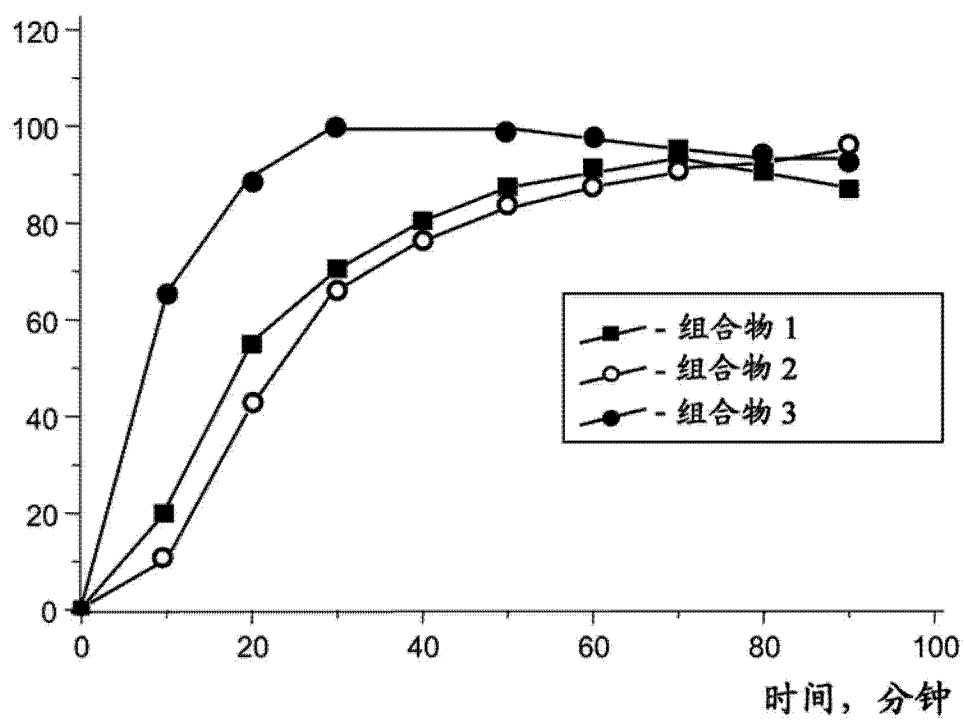


图 1

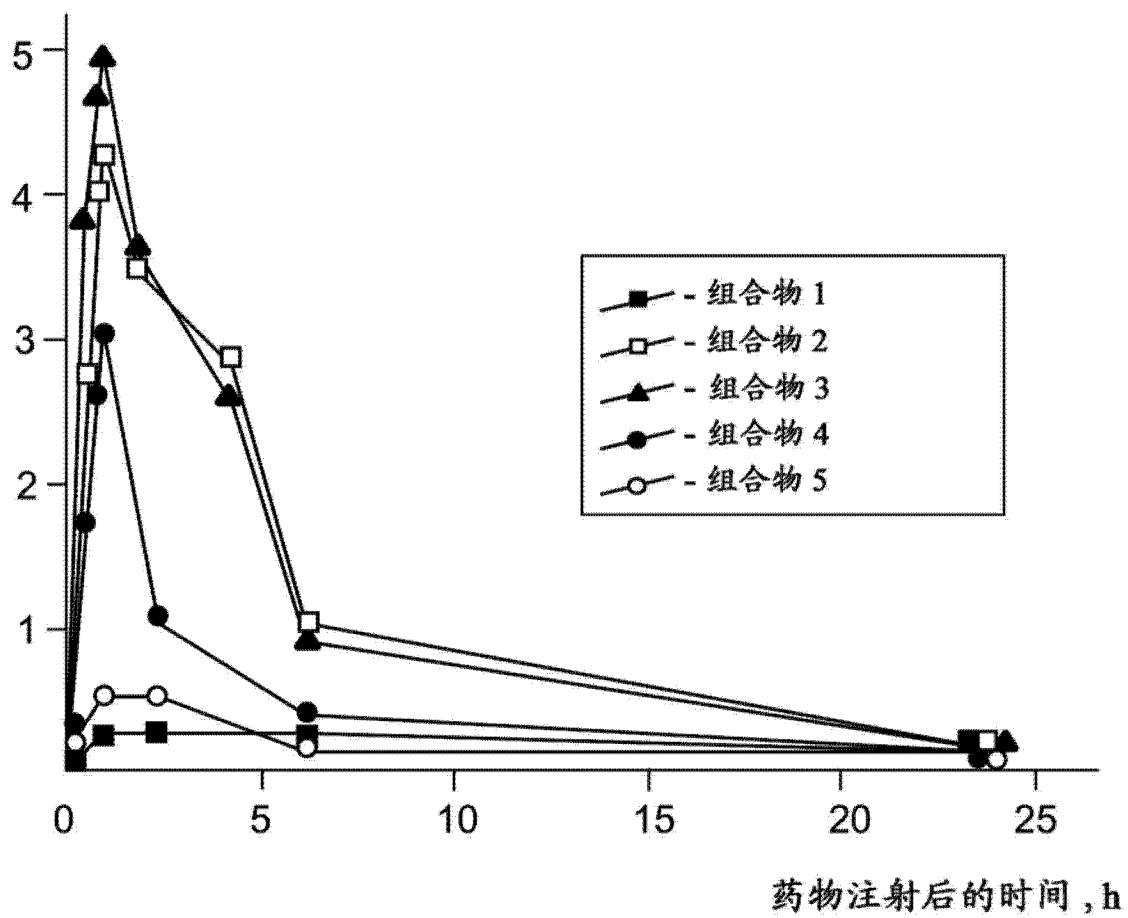
DIM 血浆浓度, $\mu\text{g/ml}$ 

图 2

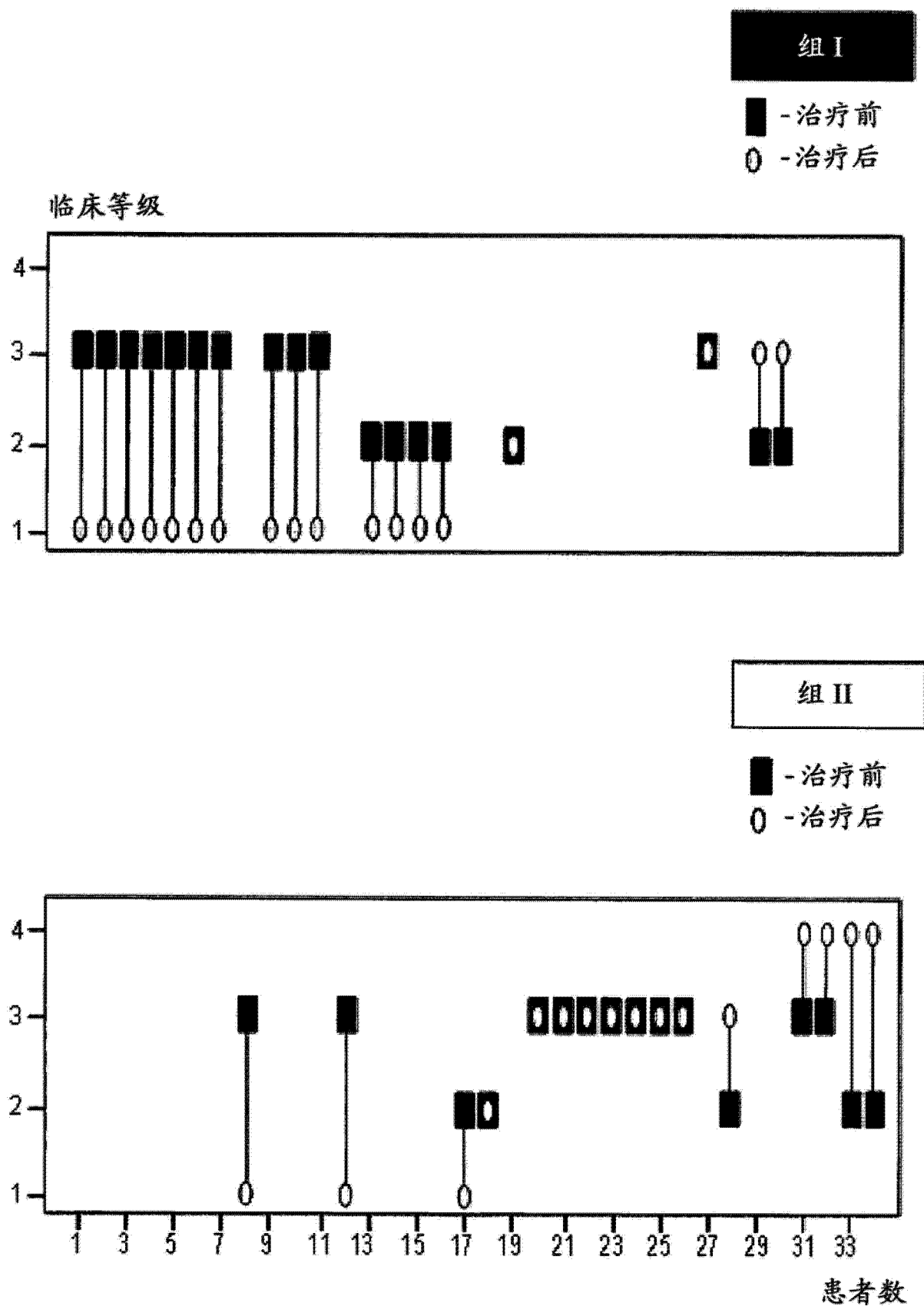


图 3

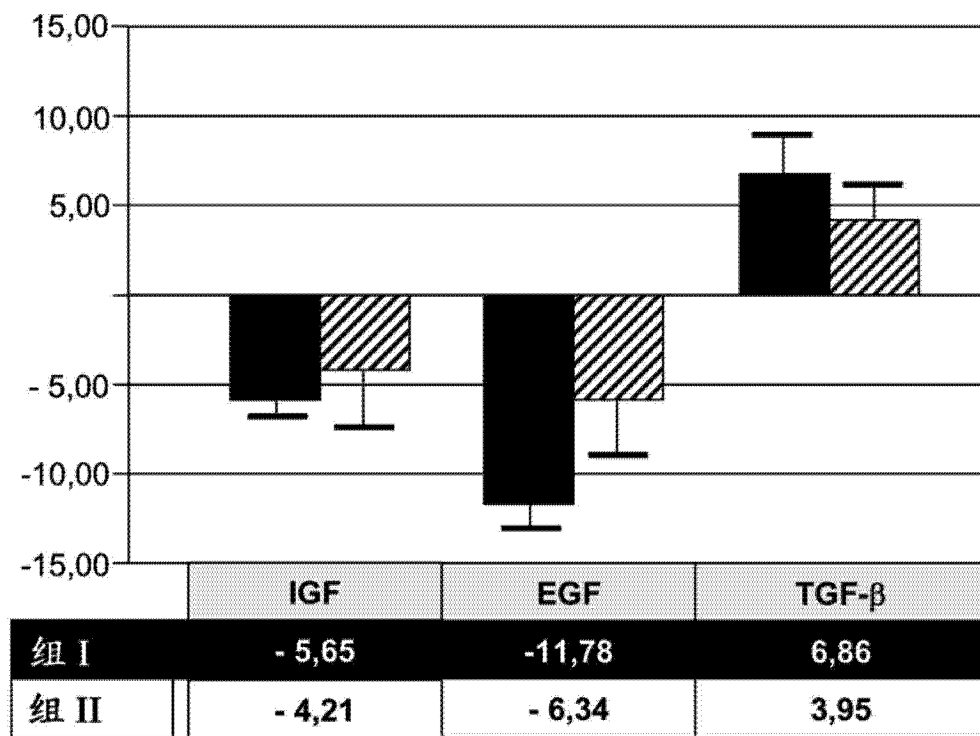


图 4