

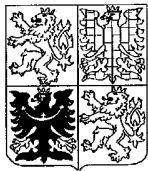
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 3583

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **01.04.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.04.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/053180**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.11.2001**
(Věstník č. 11/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US99/07178**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/49851**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 9/16

A 61 K 47/32

A 61 K 47/44

(71) Přihlašovatel:

BIORESPONSE, L. L. C., Boulder, CO, US;

(72) Původce:

Zeligs Michael A., Boulder, CO, US;

Jacobs Irwin C., Eureka, MO, US;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob výroby prostředku s obsahem
fytochemické sloučeniny**

(57) Anotace:

Způsob výroby prostředku s obsahem fytochemické sloučeniny, postup spočívá v tom, že se a) zahřeje jedna nebo větší počet solubilizačních emulgačních látek ze skupiny esteru polyethylenglykolu 1000 se sukcinátem vitamínu E, polyvinylpyrrolidonu, polyoxyethylenstearátu, cholátu sodného, deoxycholátu nebo taurocholátu sodného, b) k produktu ze stupně (a) se přidá rozpouštědlo a smáčedlo typu fosfolipidu ze skupiny fosfatidylcholin, dioleoylfosfatidylcholin, fosfatidylglycerol, dioleoylfosfatidylglycerol, dimyristoylfosfatidylcholin, dipalmitoylfosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin nebo sfingomyelin za vzniku roztoku, c) v roztoku ze stupně (b) se rozpustí jedna nebo větší počet fytochemických látek ze skupiny indolů a flavonoidů, d) k roztoku ze stupně (c) se přidá roztok, obsahující zapouzdřující látku, e) roztok, připravený ve stupni (d) se mísí za vzniku mikrodisperze s velikostí částic 5 mikrometrů nebo nižší a f) výsledná směs se suší rozprašováním za vzniku pevného prostředku s obsahem hydrofobní fytochemické látky.

CZ 2000 - 3583 A3

Způsob výroby prostředku s obsahem fytochemické
sloučeniny

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu výroby prostředku s obsahem fytochemických sloučenin k dosažení příznivějšího metabolismu steroidních hormonů. Skupinou fytochemických látek, použitelných pro účely vynálezu jsou zejména indolové alkaloidní fytochemické látky a flavonoidní fytochemické látky. Popisuje se příprava prostředků s obsahem těchto látek, které zlepšují vstřebávání nerozpustných látek z potravy a tím mohou příznivě ovlivnit účinnost steroidních enzymů typu cytochromu P450. Toto zlepšené vstřebávání nesnadno rozpustných látek zvětšuje příznivé vlivy na steroidní metabolismus.

Dosavadní stav techniky

Skupina enzymů typu cytochromu P450, CYP, indukovatelná v celé řadě buněk je schopna metabolizovat ve vodě nesnadno rozpustné hormony, léčivé látky a řadu chemických látek. Úroveň koncentrace steroidních hormonů u jednotlivce tedy odráží aktivitu enzymů CYP. Enzymy CYP se účastní biosyntézy steroidních látek a jejich aktivace a přeměny na metabolity, které jsou ve vodě lépe rozpustné. Některé enzymy CYP hrají v biochemii důležitou úlohu, zejména jsou zodpovědné za metabolismus steroidních látek a příbuzných sloučenin rostlinného původu. To znamená, že příjem některých fytochemických látek z rostlin v potravě a některých příbuzných syntetických chemických látek může ovlivnit metabolismus steroidních hormonů, ovlivňovaný enzymy CYP. Indukce nebo

inhibice účinnosti těchto enzymů může mít zásadní vliv na účinnost steroidních hormonů vzhledem k tomu, že nyní známo, že biologická účinnost dané steroidní látky většinou spočívá v jejích specifických metabolitech, jejich relativní koncentraci a biologickém poločasu, jak je možno nalézt v souhrnné publikaci Michnovicz a Bradlow, Dietary Cytochrome P-450 Modifiers In The Control OF Estrogen Metabolism, kapitola 23, Food Phytochemicals For Cancer Prevention I, Huang a další, eds. American Chemical Society, 1994.

Steroidní hormony a riziko onemocnění

Estrogen nebo 17-beta-estradiol je steroidní hormon, který má zásadní důležitost při rozmnožování, růstu, vývoji a metabolismu každého jedince. Jde o důležitou látku pro zdraví mužů i žen. Změny v účinnosti estrogenů, které počínají ve středním věku, jsou spojeny se širokým spektrem chorobných stavů. Metabolismus estrogenu závisí na celé řadě enzymů CYP, zvláště na CYP 1A1, převážně se vyskytujícím v játrech a CYP 1A2 a 1B1, které se nacházejí v mléčné žláze, děloze, vaječnících a také v pokožce. Úroveň indukce CYP 1A1, 1A2 a 1B1 se mění podle stavu dalších hormonů, například hormonů štítné žlázy, v závislosti na výživě, například na indolových fytochemických látkách a na působení toxinů z vnějšího prostředí, například na působení tabákového kouře a pesticidů. Poměry klíčových metabolitů estrogenu odrážejí stupeň indukce specifickými hydroxylačními enzymy CYP estrogenů. Mimo to řídí aromatáza ze skupiny enzymů CYP koncentraci estrogenů uvnitř buněk tím, že řídí přeměnu androgenů, androstendionů a testosteronů na estrogen.

Aromatáza CYP je zvláště důležitá v tukové tkáni nebo ve specializované pojivové tkáni, označované jako stroma.

Zjišťování důležitosti specifických metabolitů estrogeneru bylo zahájeno přibližně v roce 1970 a bylo popsáno, že množství 16OH-estronu u mužů i žen stoupá v případě systemického lupus erythematosus podle publikace Lahita a další, *Alterations of Estrogen Metabolism in Systemic Lupus Erythematosus, Arthritis and Rheumatism*, sv. 22, č. 11, 1979. Podle další studie, provedené v roce 1982 je možno prokázat podobný vzestup 16OH-estronu u nemocných se zhoubným nádorem mléčné žlázy podle publikace Schneider a další, *Abnormal Oxidative Metabolism of Estradiol in Women with Breast Cancer*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, sv. 79, s. 3047-3051, 1982. Totéž pozorování bylo později rozšířeno na zhoubné nádory dělohy podle publikace Fishman a další, *Increased Estrogen-16-Hydroxylase Activity in Women with Breast and Endometrial Cancer*, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 20, č. 48, s. 1077-81, 1984.

Při výzkumu chorob dělohy se prokázalo, že existuje korelace zvýšeného poměru estronu 16OH a 20H ve tkáni děložního krčku a rozsahu dysplasie tohoto krčku v případě zhoubného bujení v epitelu děložního krčku podle publikace Sepkovic a další, *Estrogen Metabolite Ratios and Risk Assessment of Hormone-Related Cancer*, *Assay Validation and Prediction of Cervical Cancer Risk*, *Annals of the N. Y. Acad. of Science*, sv. 768, s. 312-316, 1995. Důležitost přerušení této cesty metabolismu estrogenů je dále podporováno pozorováním na kultuře lidské tkáně mléčné žlázy, a to normální tkáně a tkáně napadené zhoubným bujením, kde rovněž dochází ke vzestupu

16-hydroxylace podle publikace Osborne a další,
Upregulation of Estradiol C16 Hydroxylation in Human
Breast Tissue: A Potential Biomarker of Breast Cancer
Risk, J.C.N.I. 85:23, s. 1917-20, 1993. Buněčná studie
buněk zhoubného bujení mléčné žlázy prokázala
pravděpodobné spojení chemických látek ze životního
prostředí s metabolismem estrogenů a jeho posunem směrem
k vyšší produkci 16OH-estronu a nižší produkci
20H-estronu po vystavení těchto buněk působení
syntetických pesticidů podle publikace Bradlow a další,
Effects of Pesticides on the Ratio of
16/2-Hydroxyestrone: A Biologic Marker of Breast Cancer
Risk, Environmental Health Perspectives, 103, Suppl. 7,
s. 147-50, 1995.

Důležitost metabolismu estrogenů při stanovení
chorob, spojených s estrogeny, je plně shrnuta v souhrnné
publikaci, která vysvětluje interakci mezi chemickými
látkami ze životního prostředí (xenoestrogeny),
metabolismem hormonů a postupy, při nichž dochází k
poškození DNA, jehož důsledkem je zhoubný nádor mléčné
žlázy, jde o publikaci Davis a další, Medical Hypothesis:
Bifunctional Genetic-Hormonal Pathways to Breast Cancer,
Environmental Health Perspectives, 105, Suppl. 3, s. 571-
576, 1997. Závažnost uváděných zjištění podporuje názor,
že riziko vzniká jak celkovým kumulativním vystavením
tkáně působení estrogenů, tak způsobem metabolismu těchto
látek.

Zjištění, že specifické enzymy CYP jsou zodpovědné
za produkci 20H-estronu vedlo k přehodnocení výzkumů z
let 1970 a dalších, které se týkaly indukce enzymů CYP
fytochemickými látkami z potravin, zejména ze zeleniny

podle publikace Wattenberg a Loub, Inhibition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Neoplasia by Naturally Occurring Indoles, Cancer Research, 38, 1410-13, 1976. Výzkumy prokázaly, že zelenina, extrakty z rostlin a zvláště fytochemické látky mohou zabránit u živočichů vzniku zhoubných nádorů, vyvolaných karcinogenními látkami. Autoři prokázali inhibici indukovaného zhoubného nádoru indolovou skupinou fytochemických látek z potravy. Uvedená skupina sloučenin měla společnou plochou molekulovou strukturu, která upravovala účinnost enzymů CYP aktivací příslušného genu přes tak zvaný arylový receptorový systém. Účinnost proti vzniku zhoubného nádoru nebo „chemoprevence“ byla vázána na heterocyklickou kruhovou strukturu. Při dalších výzkumech, týkajících se těchto látek a provedených pod vedením H. Leona Bradlowa na Rockefellerově Univerzitě, bylo prokázáno, že indol-3-karbinol, indol z křížatých rostlin typu zeleniny je schopen úspěšně posunout metabolismus estrogenů ve směru 20H-estronů, jak bylo shrnuto v publikaci Bradlow a další, Indole-3-Carbinol, A Novel Approach to Breast Cancer Prevention, Annals of the New York Academy of Science, 768: 180-200, 1995. V poslední době se uznává, že vlivy ze složek potravy na metabolismus estrogenů jsou důležitým faktorem pro prevenci zhoubných onemocnění.

Diindolylmethan jako fytochemická látka, indukující CYP

Bylo prokázáno, že koncentrace CYP 1A1/1A2 v játrech a ve střevech krys a myši se zvyšuje u zvířat, jímž byl v krmivu podáván indol-3-karbinol, I3C, jde o indol z křížatých rostlin typu zeleniny. Při doplnění krmiva živočichů i lidí touto látkou je možno prokázat zvýšení

2-hydroxylace estradiolu, které je vyvoláno účinností enzymů CYP 1A1 a 1A2. Další výzkumy prokázaly, že kondenzační produkty, které se z uvedené látky tvoří při průchodu žaludkem mají rovněž modulační účinky na enzymy CYP. Kondenzační produkt, vznikající působením kyseliny, 3,3'-diindolylmethan, DIM a 2,3-bis[3-indolylmethyl]indol byl prokázán v obsahu žaludku 1 hodinu po perorálním podání I3C podle publikace Stresser a další, Mechanisms of Tumor Modulation by Indole-3-Carbinol: Disposition and Excretion in Male Fischer 344 Rats, Drug Metabolism and Disposition, 23:9, s. 965-75, 1995. Při dalších výzkumech bylo prokázáno, že DIM je účinnější než I3C při ovlivnění metabolismu estrogenů, pokusy byly provedeny tak, že DIM a I3C byly podávány krysám v krmivu a byl měřen metabolismus estrogenů v jaterních mikrosomech podle publikace Jellinck a další, Ah Receptor Binding Properties of Indole Carbinols and Induction of Hepatic Estradiol Hydroxylation, Biochemical Pharmacology, 45:5, s. 1129-36, 1993.

V poslední době se při pozorování buněčných kultur prokázalo, že DIM podporuje preventivní apoptosu při vzniku zhoubného nádoru, to znamená programované uhynutí buněk podle publikace Ge a další, 3,3'-Diindolyl methane induces Apoptosis in Human Cancer Cells, Biochemical and Biophysical Research Communications, 228, s. 153-58, 1996. Polycyklická kruhová struktura DIM, která je podobná struktuře jiných sloučenin, o nichž je známo, že způsobují uvolnění p-glykoproteinů, vázaných na membránu, rovněž zvyšuje účinnost chemoterapie v případě nádorových buněk, odolných proti řadě chemických látek podle publikace Christensen a Leblanc, Reversal of Multidrug Resistance in Vivo By Dietary Administration of the

Phytochemical Indole-3-Carbinol, Cancer Research, 56, s. 574-81, 1996. Souhrnně tato pozorování prokazují, že DIM má indukující účinnost na CYP a současně modulační účinek na funkci buněk a je tedy velmi užitečným doplňkem stravy.

DIM je stálejší než I3C

I3C se nyní užívá jako doplněk stravy a uvádí se, že tímto způsobem je možno příznivě posunout metabolismus estrogenů ve prospěch tvorby 20H-estronu podle publikace Michnovicz a další, Changes in Levels of Urinary Estrogen Metabolites After Oral Indole-3-Carbinol Treatment in Human, Journal of the Nat'l Cancer Inst., 89:10, s. 718-23, 1997. Použití této látky pro chemoprevenci zhoubného nádoru mléčné žlázy a pro potlačení respirační infekce papillomavirem podle publikace Coll a další, Treatment of Recurrent Respiratory Papillomatosis with Indole-3-Carbinol, American Journal of Otolaryngology, 18:4, s. 283-85, 1997, vyžaduje nejnižší dávku 300 mg denně na osobu podle publikace Wong a další, A Dose-Response Study Of Indole-3-Carbinol for Breast Cancer Prevention, 1998. Existují však omezení vzhledem k použití I3C ve stravě vzhledem k tomu, že běží o nestálou látku, která se samovolně urychleně rozkládá působením tepla, světla, zvýšené vlhkosti nebo v kyselém prostředí. Při skladování I3C je možno prokázat úbytek přibližně 50 % původního množství uvedené látky za pobínek, které napodobují uložení po dobu jednoho měsíce (BioResponse New Dietary Ingredietn FDA Filing, srpen 1997). Mimo to dochází u uvedené látky in vivo k nepředvídatelným transformacím. Při průchodu žaludkem se uvedená látka samovolně mění na celou řadu kondenzačních produktů, zvláště dimerů a

trimerů. Jedním z reakčních produktů je indolokarbazol, lineární dimer s uzavřeným kruhem, který napodobuje dioxin jak svou strukturou, tak svou biologickou účinností podle publikace Bjeldanes a další, Aromatic Hydrocarbon Responsiveness-Receptor Agonists Generated From Indole-3-Carbinol in Vitro a in vivo: Comparisons with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, s. 9543-47, 1991. Tato nepředvídatelná tvorba indolokarbazolu v prostředí žaludeční kyseliny způsobuje, že není možno prokázat bezpečnost podávání I3C. Nedostatečná stálost při skladování, samovolná reakce s dalšími složkami a nedostatečná identifikovatelnost produktů, vytvořených v žaludku značně omezují použitelnost I3C jako doplňku stravy.

Při studiích DIM se ukázalo, že uvedená látka je při průchodu simulovaným žaludečním prostředím (BioResponse New Dietary Ingredient FDA Filing, srpen 1997) zcela stálá. Nevytváří se žádný indolokarbazol ani v prostředí žaludeční kyseliny, ani v průběhu skladování. DIM má tedy žádoucí vlastnosti jako látka, indukující enzymy CYP a je stálá. Z tohoto důvodu by bylo zapotřebí mít k dispozici biologicky dostupné prostředky s obsahem uvedené látky a také s obsahem jejích dimerů a trimerů vzhledem k tomu, že hydrofobní látky typu DIM se nesnadno vstřebávají.

Fytochemická látka chrysin vyvolává inhibici aromatázy CYP

Flavony, analogické indolům v potravě jsou přírodní sloučeniny z rostlin, které mohou ovlivnit účinnost estrogenů a mohou zabránit vzniku pokusných nádorů.

5,7-dihydroxyflavon, chrysin je flavon, který je možno prokázat v extraktech z mučenky *Passiflora corerula* a také v pylu nebo v propolis. Tato látka vyvolává inhibici účinnosti aromatázy CYP v buněčné kultuře a také v bezbuněčných mikrosomech podle publikací Campbell a Kruzer, Flavonoid inhibition of aromatase enzyme activity in human pre-adipocytes, J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 46:3, s. 381-388 (1993) a Kellis a Vickery, Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones, Science, 225, s. 1032-1034, 1984. Modulace účinnosti aromatázy je důležitá vzhledem k tomu, že tento enzym CYP řídí přeměnu androgenů na estrogeny v periferní tkáni, například v tukové tkáni. V průběhu stárnutí se stavba organismu mění ve prospěch zvýšeného množství tukové tkáně vzhledem ke svalovině. V důsledku toho dochází ke zvýšené produkci estrogenů z testosteronu a z androgenu nadledvinek, dehydroepiandrosteronu DHEA jak u mužů tak u žen s pokračujícím věkem. Účinnost flavonů ve stravě proti působení aromatázy a účinnost podobných isoflavonů je tedy patrně důležitým zdrojem ochrany před onemocněními, vyvolanými nadbytkem estrogenů tím, že se omezuje metabolická přeměna androgenů na estrogeny.

Přestože byla prokázána značná účinnost chrysinu proti působení aromatázy v bezbuněčných extraktech v buněčné kultuře, uvádí se nízká biologická dostupnost flavonů při perorálním podání jako problém při jejich potenciálním využití jako doplňků stravy podle publikace Kuhnau, The flavonoid. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition, World Rev. Nutr. Diet, 24, s. 117-191, 1976. Při studiích fyzikálně chemických vlastností chrysinu se prokázalo, že tato látka je velmi hydrofobní a její rozpustnost ve vodě je

pouze $2,8 \times 10^{-6}$ mol/l podle publikace Masarova a další, Solubilization of chrysin by a non-aromatic amine oxide, Pharmazie, 44, H 12, s. 865-866, 1989. Existuje tedy potřeba mít k dispozici doplněk s obsahem chrysinu se zlepšenou biologickou dostupností tak, aby bylo možno využít schopnost této látky vyvolat inhibici aromatázy CYP.

Biologická dostupnost hydrofobních fytochemických látek při perorálním podání je omezena.

Aby bylo možno dosáhnout ochranného účinku fytochemických látek, je nutno dosáhnout při perorálním podání dostatečné koncentrace těchto látek ve tkáních. Při vstřebávání musí ve vodě nerozpustné nebo hydrofobní látky, podané ve stravě překonat řadu bariér v průběhu vstřebávání. Jde o odolnost proti emulgaci tukovými micellami ve střevě, okamžitý „presystemický“ metabolismus při styku s enterocyty v tenkém střevě a návrat těchto látek do dutiny střevní působením p-glykoproteinů, které vytlačují řadu hydrofobních látek z enterocytů. To znamená, že pomocné látky, které zlepšují emulgaci do micel, snižují metabolismus enterocytů a zvyšují příjem uvedených látek do chylomikronů, mohou také zlepšit biologickou dostupnost uvedených hydrofobních látek. Zvýšený přístup těchto látek do proudu lymfy může obejít první průchod játry, kterým procházejí ve vodě rozpustné látky nebo ve vodě rozpustné metabolity.

Při prvním pokusu o laboratorní syntézy DIM v roce 1950 bylo prokázáno, že uvedená látka je ve vodě vysoce nerozpustná podle publikace Leete a Marion, The

Hydrogenolysis of 3-Hydroxymethylindole and Other Indole Derivatives with Lithium Aluminum Hydride, *Canadian J. of Chemistry*, 31:9, s. 775-84, 1953. Na buněčných kulturách bylo prokázáno, že DIM je látkou, účinně indukující enzymy CYP při přímém přidání do kultury jaterních buněk podle publikace Wortelboer a další, *Effects of Indole-3-Carbinol on Biotransformation Enzymes in the Rat: In Vivo Changes in Liver and Small Intestinal Mucosa in Comparison with Primary Hepatocyte Cultures*, *Food Chem. and Toxicology*, 30:7, s. 589-99, 1992. Avšak v případě, že došlo k podání DIM v krmivu nebo v případě, že tato látka byla vstříkována intraperitoneálně u krys, bylo možno pozorovat značně nižší účinnost. I v případě, že uvedená látka byla podávána v sezamovém oleji, který usnadní vstřebávání, bylo možno pozorovat ztrátu účinnosti pod 5 mg/kg. Účinek na indukci enzymů bylo možno prokázat až do dávky 0,3 mg/kg v případě intraperitoneálního podání podle publikace Ah Receptor Binding Properties of Indole Carbinols and Induction of Hepatic Estradiol Hydroxylation, *Biochemical Pharmacology*, 45:5, s. 1129-36, 1993. V případě začlenění do krmiva a smísení s krmivem při dalších pokusech nebylo možno ani při použití velkých dávek DIM vyvolat indukci enzymů CYP v epitelu tlustého střeva, avšak pro ve vodě rozpustnou látku I3C bylo možno tuto indukci prokázat podle publikace McDannell and McLean, *Differential Induction of Mixed-Function Oxidase, MFO, Activity in Rat Liver and Intestine by Diets Containing Processed Cabbage: Correlation with Cabbage Levels of Glucosinolates and Glucosinolate Hydrolysis Products*, *Food Chem. and Toxicology*, 25:5, s. 363-68, 1986. Tyto studie prokázaly, že se DIM nevstřebává ve farmakologicky účinných dávkách.

V případě, že byla sledována biologická dostupnost chrisinu při perorálním podávání spolu s krmivem, nebylo možno pozorovat na kryších játrech žádné účinky na CYP, přestože byly tyto látky podávány perorálně po dobu dvou týdnů v dávce 300 mg/kg denně. Příjem Tangeretinu, flavonu s lepší rozpustností v lipidech byl však spojen s indukcí CYP podle publikace Siess, M. H., Guillermic, M., LeBon, A. M., Suschetet, M., Induction of monooxygenase and transferase activities in rat by dietary administration of flavonoid, *Xenobiotica*, 19:12, s. 1379-1386, 1989. Je tedy zřejmé, že by bylo zapotřebí vyvinout specifické prostředky jako doplňky stravy s usnadněným vstřebáváním uvedených látek při perorálním podání.

Presystemický metabolismus látek, podaných ve stravě

Biologická dostupnost celé řady hydrofobních fytochemických látek, může být omezena jejich metabolismem ve vrstvě enterocytů, která vystýlá zažívací soustavu. Tento presystemický metabolismus zahrnuje skupinu CYP 3A4 enzymů typu cytochrom. Účinnost enzymu CYP 3A4 je vázána na vytlačení hydrofobních sloučenin z enterocytů zpět do průsvitu střeva účinností p-glykoproteinu membrán podle publikace Wachter a Bennet, Overlapping Substrate Specificities and Tissue Distribution of Cytochrome P450 3a and P-Glycoprotein: Implications for Drug Delivery and Activity, in *Cancer Chemotherapy, Molecular Carcinogenesis*, 13, s. 129-34, 1995. Vzhledem k tomu, že esenciální oleje z různých rostlinných zdrojů mají inhibiční účinek na CYP 3A4, bylo vyvinuto společné podávání olejů v emulzi s hydrofobními látkami v systému pro zvýšení příjmu některých účinných

látek snížením účinnosti p-glykoproteinů z membrán, jak bylo popsáno v US patentovém spisu 5665386. Celá řada látek ve stravě jsou substráty pro enzymy CYP 3A4 a jsou přednostně vytlačovány z buněk působením p-glykoproteinu. Vzhledem ke strukturní příbuznosti s různými účinnými látkami, je pravděpodobné, že příjem látek, jako jsou DIM a chrysin, je rovněž ovlivněn účinností enzymu CYP 3A4 a p-glykoproteinu.

DIM je však patrně zcela jedinečnou látkou, pokud jde o selektivní metabolismus v systému enterocytů a také pokud jde o vytlačování látek zpět do průsvitu střeva. Po podání DIM bylo možno pozorovat inhibici funkce p-glykoproteinu v buněčné kultuře a také in vivo. To znamená, že DIM snižuje účinnost celého systému pro eliminaci jiných hydrofobních sloučenin podle publikace Christensen a Leblanc, Reversal of Multidrug Resistance in vivo by Dietary Administration of the Phytochemical Indole-3-Carbinol, Cancer Research, 56, s. 574-81, 1996. Tento účinek má za následek zvýšenou účinnost chemoterapeutických látek u nádorových buněk, které jsou odolné proti působení celé řady chemických látek. Při použití molekulární sondy bylo možno prokázat přímou interakci DIM s p-glykoproteinem membrány. To znamená, že DIM zřejmě může zvláštním způsobem blokovat vytlačení, jakmile se dostane do enterocytu. To znamená, že při překonání bariéry rozpustnosti a po vstřebání do enterocytů, může DIM stimulovat svůj vlastní další systemický příjem a biologickou dostupnost a také biologickou dostupnost dalších látek, které rovněž podléhají vlivu p-glykoproteinu.

Kromě DIM a esenciálních olejů byly pozorovány ještě další dvě skupiny sloučenin, které mohou ovlivnit biologickou dostupnost s ohledem na CYP 3A4 a na p-glykoproteiny. Prvním faktorem je podávání smáčedel pro ovlivnění membrán a blokování účinnosti p-glykoproteinu změnami interakce mezi lipidy a bílkovinami, na nichž závisí p-glykoprotein. Tyto poznatky byly využity tak, že se současně podává smáčedlo a chemiterapeutická látka při léčení nádorů, odolných proti celé řadě chemických látek podle US 5591715.

Bylo také prokázáno, že přírodní látky, obsažené v grapefruitové šťávě účinně blokují účinnost CYP 3A4 a podporují tak vstřebávání různých látek, například chinidinu, cyklosporinu a felodipinu podle publikace Lown a další, Grapefruit Juice Increases Felodipine Oral Availability in Humans by Decreasing Intestinal CYP 3A Protein Expression, Journal of Clinical Investigation, 99:10, 2545-53, 1997. Vzhledem k tomu, že DIM je látka, strukturně příbuzná chinidinu, bylo by výhodné vyvinout prostředek s obsahem DIM, který by využíval grapefruitovou šťávu a blokoval účinnost CYP 3A4. Tímto způsobem by bylo možno dále usnadnit vstřebávání DIM a dalších současně podávaných látek, jako flavonů a isoflavonů. Bylo by také výhodné mít k dispozici prostředek, který by současně blokoval účinnost CYP 3A4 a přímo blokoval účinnost p-glykoproteinu. Takový prostředek je možno připravit současným podáváním smáčedel, o nichž je známo, že specificky přerušují účinnost p-glykoproteinů svým účinkem na membránách, jak bylo popsáno svrchu. Ideálně je takto usnadněné vstřebávání přechodné, dovoluje příjem sloučenin, které jsou cíleně podávány současně s grapefruitovým

koncentrátem a smáčedlem. Po podávání takového prostředku se funkce CYP 3A4 v několika hodinách vrátí do normálního stavu a enterocyty pak opět mají svou ochrannou funkci a nevstřebávají další potenciálně toxické hydrofobní sloučeniny. Předběžné farmakokinetické studie účinku grapefruitové šťávy v koncentrované formě prokazují, že se vlastnosti enterocytů navrátí na normální hodnotu v průběhu 8 až 12 hodin podle publikace Ameer, B. a Weintraub, R. A., Clinical Pharmacokinetics, 33(2): 103-21, 1997.

Nejbližší dosavadní stav

Z toho, co bylo uvedeno, je zřejmá potřeba zlepšit vstřebávání některých hydrofobních látek, z tohoto důvodu byly prováděny pokusy s použitím polyethylenglykolu PEG jako smáčedla, mimo jiné byly připravovány mikrodisperze ke snížení velikosti částic s použitím sušení rozprašováním tak, aby se vytvořily oddělené částice.

První pokusy s PEG byly popsány v US patentovém spisu 4 151273 (Riegleman a Chiou), v tomto spisu se popisuje spojení nerozpustné látky s požadovaným účinkem s rozpustným PEG jako nosičem pro zlepšení vstřebávání. Obvyklá technologie přípravy takových prostředků spočívala v tom, že byla smísena zahřátá směs PEG nebo polyvinylpyrrolidonu s málo rozpustnou účinnou látkou, načež byla směs zchlazena za vzniku „pevného roztoku“ dispergované účinné látky. Tato pevná směs nebo disperze pak byla mleta na jemný prášek, který byl zpracováván na tablety. Tímto způsobem bylo možno zpracovat různé disperze nebo emulze nerozpustných látek na prostředky, vhodné pro perorální podání. Technologie tvorby

jemnějších částic v disperzích byla později popsána pro systémy lipidů a smáčedel v US 4880634. Přidávání volných mastných kyselin a fosfolipidů k emulzím pak bylo popsáno v US 5314921, účelem byla lepší kompatibilita se střevními micelami. V poslední době jsou popisovány složitější a vícenásobné emulze v jedlých olejích jako variace tohoto postupu, například podle US 5645856 a US 5583105.

Technologie mísení hydrofobních látek s materiály pro tvorbu povlaků byla popsána v US 4 230687 (Sair a Sair) a tvoří základ pro různé formy stálých mikrodisperzí při mechanickém mísení různých polymerních zapouzdřujících materiálů, jako jsou škroby, gumy nebo proteiny. Tento postup však vyžaduje zahuštěnou směs škrobů tak, aby bylo možno uchovat jednotlivé částice v mikrodisperzi. Tímto způsobem bylo možno dosáhnout lepšího vstřebávání dipyridamolu při perorálním podání vytvořením amorfni nekrystalické směsi s polyvinylpyrrolidonem jako emulgátorem s následným sušením této směsi rozprašováním podle US 4610875. Postup pro sušení rozprašováním v případě emulze lecithinu, organického oleje a neiontového poloxameru jako smáčedla, byl vyvinut v potravinářském průmyslu pro chuťové látky tak, aby byly stálé při skladování podle US 5362425. Zlepšená tvorba částic pro nerozpustné účinné látky s použitím esterů karboxylových kyselin s PEG byla popsána později. Šlo například o použití PEG 1000 se sukcinátem vitamínu E, TPGS jako emulgačního činidla a povlakového materiálu, složky byly smíseny před sušením rozprašováním za vzniku částic podle US 5430021.

TPGS byl pak podroben dalšímu výzkumu jako rozpustná forma vitaminu E a současně jako prostředek pro tvorbu kapalných emulzí v kombinaci s hydrofobními sloučeninami nebo vitaminy. Postup byl použit pro zvýšení vstřebávání vitaminu D a dalších nesnadno rozpustných látek, například cyklosporinu podle publikace Argao a další, d-alfa-Tocopheryl Polyethylene Glycol-1000 Succinate Enhances the Absorption of Vitamin D in Chronic Cholestatic Liver Disease of Infancy and Childhood, *Pediatric Research*, 31:2, 146, 1992. TPGS a další estery PEG, vhodné pro potravinářské účely, se prokázaly jako látky, užitečné pro zvýšení vstřebávání esterifikovaného vitaminu E podle US 5179122. Další prostředky s obsahem TPGS v kombinaci s neesterifikovaným vitaminem E byly vyvinuty smísením TPGS s látkami, podporujícími sypnost s následným rozprašováním podle US 5234695. Při těchto použitích byl TPGS použit jako emulgační činidlo, které zlepšuje vstřebávání ve střevech. Tato funkce však není vyhrazena pouze pro TPGS vzhledem k tomu, že při použití lipidové frakce membrán z kravského mléka bylo možno prokázat zvýšené vstřebávání cyklosporinu do obdobného stupně podle publikace Sato a další, Enhancement of the intestinal absorption of a cyclosporine derivative by milk fat globule membrane, *Bio. Pharm. Bull.* 17(11), s. 1526-1528, 1994. V poslední době je vysvětlován mechanismus působení TPGS, kterým tento ester PEG zvyšuje biologickou dostupnost cyklosporinu.

Měření metabolitů cyklosporinu prokázalo, že TPGS neovlivní působení enzymů CYP 3A4, a musí tedy existovat jiný mechanismus, kterým TPGS vyvolává zvýšené vstřebávání některých látek. Předpokládalo se, že tímto mechanismem by mohla být inhibice působení

p-glykoproteinu podle publikace Chang a další, The effect of water-soluble vitamin E on cyclosporine pharmacokinetics in healthy volunteers, Clinical Pharmacology & Therapeutics, 59:297-303, 1996.

Na základě průkazu, že by bylo možno využít fytochemické látky z potravy k posunu metabolismu estrogenů směrem k příznivějším metabolitům, jako je 20H-estron je zřejmé, že by bylo zapotřebí vyvinout bezpečné a účinné prostředky jako potravinové doplňky. Výhodné fytochemické látky, jako DIM a chrysin jsou totiž vysoce nerozpustné a při perorálním podání je jejich biologická dostupnost fyziologickým mechanismem omezena. Je tedy zřejmé, že by bylo zapotřebí navrhnout takové zpracování uvedených látek, které by pomohlo překonat bariéry při jejich vstřebávání.

Podstata vynálezu

Vynález se týká specifických prostředků s obsahem látek, obsažených v rostlinách jako dietních doplňků a způsobů výroby těchto prostředků. Získané prostředky mají být určeny k udržení nebo dosažení hormonální rovnováhy. Prostředky překonávají nesnadnou rozpustnost a nízkou biologickou dostupnost dietních látek při perorálním podání u člověka nebo jiných živočichů. Byl vyvinut nový způsob zpracování, který dovoluje tvorbu mikrodisperze nerozpustných látek v potravě ve spojení s estery polyethylenglykolu a přírodními smáčedly. Mikrodisperze je zachycena na částice škrobu při sušení rozprašováním. Výsledkem je jemný prášek, jehož každá částice obsahuje mikročástice zpevněné účinné látky v amorfním, nekrytalickém komplexu. Prostředek tímto způsobem

stabilizuje účinnou látku a zajistí možnost dlouhodobého skladování a schopnost kombinace s dalšími složkami, užitými jako doplňky potravy. Zejména tyto prostředky zlepšují vstřebávání nerozpustných látek po perorálním podání, takže je jimi možno zajistit při použití nízkých dávek účinné dlouhodobé léčení.

Zvýšené vstřebávání a zvýšená biologická dostupnost uvedených prostředků byla podrobena zkouškám u různých živočichů i u člověka. Bylo prokázáno, že bylo dosaženo podstatného zlepšení ve srovnání s použitím týchž látek v nezpracovaném krystalickém stavu. Při použití uvedených prostředků je tedy možno podávat nesnadno rozpustné živné látky, indukující specifické enzymy CYP k vyvolání rovnovážného stavu u estrogeneru. Prostředky zlepšují vstřebávání některých látek z rostlin, jako je DIM, indolové látky a rostlinný flavon chrysin. Prostředky se prokázaly jako vhodné při úpravě metabolismu estrogenů při perorálním podání u savců. Bylo také prokázáno, že tyto látky vyvolávají bezpečnější metabolismus karcinogenních látek a jsou proto vhodné jako chemopreventivní prostředky.

Vynález bude podrobněji popsán v souvislosti s příloženými výkresy.

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 jsou znázorněny změny koncentrace testosteronu a androstendionu v moči při podávání zpracovaného chrysinu ve srovnání s chrysinem bez dalšího zpracování.

Na obr. 2 jsou znázorněny změny koncentrace androsteronu a etiocholanolonu v moči při podání zpracovaného chrysinu ve srovnání s podáním chrysinu bez dalšího zpracování.

Na obr. 3 jsou znázorněny změny koncentrace testosteronu a androstendionu v moči po podání zpracovaného DIM.

Na obr. 4 jsou znázorněny změny koncentrace androsteronu a etiocholanolanu v moči po podání zpracovaného DIM.

Na obr. 5 jsou znázorněny změny koncentrace metabolitů estrogenu po podání zpracovaného DIM.

Na obr. 6 je znázorněna koncentrace DIM v plasmě v nanogramech/ml po perorálním podání 1,0 mg/kg DIM ve zpracované formě (Plex) a v krystalické formě (DDIM) u dospělého v různých dnech po dobu 5 hodin.

Na obr. 7 je znázorněna koncentrace DIM v plasmě v nanogramech/ml po perorálním podání dávky 0,5 mg/kg krystalického DIM u tří dospělých jedinců, sledování bylo prováděno 5 hodin.

Na obr. 8 je znázorněna koncentrace DIM v plasmě v nanogramech/ml po perorálním podání dávky 0,5 mg/kg krystalického DIM a sezamového oleje u tří dospělých jedinců, pozorování bylo prováděno 5 hodin.

Na obr. 9 je znázorněna koncentrace DIM v plasmě v nanogramech/ml po perorálním podání dávky 0,5 mg/kg DIM

ve zpracované formě u tří dospělých jedinců, pozorování bylo prováděno 5 hodin.

Na obr. 10 je znázorněna koncentrace DIM v plasmě v nanogramech/ml po perorálním podání dávky 0,5 mg/kg DIM ve zpracované formě spolu s grapefruitovou šťávou u tří dospělých jedinců, pozorování trvalo 5 hodin.

Podstatu vynálezu tedy tvoří prostředek pro zlepšení vstřebávání vysoce nerozpustných hydrofobních fytochemických látek a jeho použití k dosažení příznivějšího metabolismu steroidních hormonů. Tohoto cíle je možno dosáhnout podáváním prostředků s obsahem látek, usnadňujících vstřebávání a vyvolávajících úpravu metabolické účinnosti CYP. Prostředky jsou založeny na rozpouštění účinných látek v příslušném rozpouštědle, na přítomnosti emulgátoru, jako esteru PEG se sukcinátem vitamínu E a fosfolipidů, s uvedených složek se vytvoří mikrodisperze při použití ve vodě rozpustné matrice. Amorfnní komplexy mikrodisperze uvedených látek se pak sráží společně s částicemi nosiče za sušení rozprašováním. Tyto prostředky, které obsahují účinné látky ve formě mikročástic podporují vstřebávání po rozpouštění a emulgaci v tenkém střevě člověka nebo jiných živočichů.

Přírodní indoly, například DIM nebo flavonoidy, jako chrysin, jsou příkladem látek s potravy rostlinného původu, které mají zanedbatelnou rozpustnost ve vodě, například 2,5 mikrogramů/ml pro DIM a 0,7 mikrogramů/ml pro chrysin a také minimální rozpustnost v oleji 100 mikrogramů/ml pro DIM a 50 mikrogramů/ml pro chrysin. Dalšími účinnými látkami, které je možno použít v

prostředku podle vynálezu jsou lineární triindoly, jako [2-(indol-3-ylmethyl)-indol-3-yl]indol-3-ylmethan, cyklické triindoly, jako 5,6,11,12,17,18-hexahydroxycyklononal[1,2-b:4,5-b':7,8-b]:triindol, lineární diindoly, jako 1-(3-hydroxymethyl)indolyl-3-indolylmethan, nebo tectochrysin, chemicky 5-hydroxy-7-methyletherflavon, nepetin, to znamená 5,3',4'-trihydroxy-6-methoxyflavon, tangeritin, chemicky 5,6,7,8,4'-pentamethoxyflavon, tricetin, chemicky 5,7-dihydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavon, tricin, chemicky 5,7,4'-trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavon, amentoflavon, pinocembrin, chemicky 5,7-dihydroxyflavanon, narigenin, chemicky 5,7,4'-trihydroxyflavanon, biochanin A, genistein, daidzein, med nebo včelí propolis.

Vývoj prostředků se zlepšeným vstřebáváním při perorálním podání je nezbytný pro využití výhody příznivých účinků uvedených látek, které jsou nyní dostupné v syntetické koncentrované formě. Vzhledem jedinečným fyzikálněchemickým vlastnostem hydrofobních fytochemických látek, jako jsou DIM a chrysin, byly vyvinuty nové přístupy, takže bylo možno zlepšit jejich biologickou dostupnost při perorálním podání. Vyvinuté prostředky je možno identifikovat postupem zpracování, který umožňuje redistribuci nerozpustných složek do mikročástic, bohatých na smáčedla. Cílem tohoto zpracování je vytvoření pevné disperze mikročástic v matrici částic škrobu. Tyto částice škrobu s průměrem 10 mikrometrů obsahují mikročástice, tvořené amorfní pevnou fází směsi hydrofobních fytochemických látek, jako DIM nebo chrysinu se solubilizačním emulgátorem, například esterem polyethylenglykolu 1000 se sukcinátem vitaminu E, směsí esteru polyethylenglykolu se sukcinátem vitaminu E

s polyethylenglykolem s molekulovou hmotností 400 až 2000, použít je možno i jiné estery polyethylenglykolu, například estery, vytvořené s mastnými kyselinami, jako kyselinou olejovou nebo stearovou, dále polyvinylpyrrolidony, polyvinylpolypyrrolidony, Poloxamer 188, Tweeny nebo Spany nebo fosfolipidy.

Způsob zpracování využívá nového přístupu pro snížení velikosti částic tvorbou optimalizované mikrodisperze ve vodné fázi, tato disperze se pak převede pomocí sušení rozprašováním na volně sypný prášek, který je tvořen ve vodě rozpustnou matricí, obsahující zapouzdřené mikročástice. V průběhu způsobu zpracování je upravována účinnost esterů polyethylenglykolu na zlepšení rozpustnosti pro maximální rozpouštění DIM nebo chrysinu ve směsi rozpouštědel, vhodných pro potravinářské účely, fosfolipidů a TPGS při teplotě 30 až 90 °C.

Vhodným rozpouštědlem může být hexanol, ethanol, butanol, heptanol, 2-methyl-1-pentanol, různá rozpouštědla typu ketonů, přijatelná pro potravinářské účely, jako je methylethylketon, aceton a další rozpouštědla, propylenglykol a některá esterová rozpouštědla, jako ethylacetát.

Fosfolipidy mohou zahrnovat složky lecithinu, například fosfatidylserin, fosfatidylinositol a fosfatidylglycerol, fosfolipidy, odvozené od soji, fosfolipidy tukových membrán mléčného tuku, MFGM, dioleýl fosfatidylcholin, fosfatidylglycerol, dioleýlfosfatidylglycerol, dimyristoylfosfatidylcholin, dipalmitoylfosfatidylcholin, fosfatidylethanolaminy, fosfatidylseriny, sfingomyeliny, polyglycerolestery, nebo

ethoxylovaný ricinový olej. Fosfolipid se přidává ke směsi TPGS a rozpouštědla ke snížení velikosti částic dispergované fáze po smísení s vodou. Při vysokém stříhovém namáhání této organické fáze dochází buď k rozpouštění nebo ke vzniku velmi jemné suspenze DIM, chrysinu, jiných fytochemických látek nebo směsi fytochemických látek se solubilizačním emulgátorem, například TPGS a fosfolipidem.

Poměr složek ve směsi je nutno volit tak, aby stálost emulze byla co nejvyšší. Poměr TPGS k DIM nebo chrysinu by měl být v rozmezí 0,5:1 až 1,5:1, výhodný je poměr 1:1. Obsah škrobu by měl být 25 až 75 % hmotnostních, vztaženo na celkovou hmotnost složek, poměr škrobu a TPGS se s výhodou pohybuje v rozmezí 0,8:1 až 1,5:1. Emulgátory, jako fosfatidylcholin nebo žlučové soli, jako cholát, deoxycholát nebo taurochlorát sodný a podobně, by měly tvořit 1 až 10 % hmotnostních, vztaženo na celkovou hmotnost směsi, s výhodou 3 až 5 % hmotnostních. Rozpouštědlo by mělo být použito v hmotnostním poměru 0,5:1 až 5:1 k účinné složce, to znamená k chrysinu nebo DIM.

Získaná „tavenina“ extrahovaných hydrofobních složek se homogenizuje v roztoku škrobu a dalších zapouzdřujících látek v rozpouštědle na bázi vody, použít je možno například modifikovaný škrob, jako prostředek Capsul (National Starch, Inc.), dále methylcelulózu, hydroxypropylmethylcelulózu, hydroxyethylcelulózu, hydroxypropylethylcelulózu, pektin, arabskou gumu, želatinu nebo jinou polymerní matici, která je rozpustná ve vodě a je vhodná pro sušení rozprašováním. V tomto stupni vzniká mikrodisperze, odolná proti spojování

jednotlivých částic a uchovávací mikročástice TPGS, fosfolipidu a hydrofobní fytochemické látky, jako DIM nebo chrysinu s velikostí částic 5 mikrometrů nebo s ještě menší velikostí. Ve výhodném provedení je velikost mikročástic 2 mikrometry nebo nižší. Ve velmi výhodném provedení je velikost mikročástic 1 mikrometr nebo nižší. Při sušení rozprašováním dochází k odpaření rozpouštědla a nosič, například TPGS a fostatidylcholin se srážejí za vzniku „mikročástic“ ve větších částicích škrobu. Amorfni nekrytalické mikročástice jsou snadněji uvolňovány z částic škrobu po styku s tekutinou ve střevech. Mikročástice jsou kompatibilní a dochází k jejich spojování se střevními micelami, obsahujícími fosfolipidy a žlučové soli.

Po sušení rozprašováním se zpevněné mikročástice současně sráženého solubilizačního emulgátoru, fosfolipidu a hydrofobní fytochemické látky získávají ve snadno emulgovatelné formě. Ve střevě dochází v důsledku přítomnosti TPGS k účinnosti typu smáčedla, která usnadní zařazení micel, bohatých na fytochemickou látku do lipidových membrán enterocytů. Homogenní spojení fytochemických látek v komplexních mikročásticích s TPGS příznivě ovlivní vstřebávání střevním povrchem. Jak již bylo popsáno svrchu po diestery PEG a smáčedla ze skupiny Cremophor v publikaci Buckingham a další, Reversal of Multi-drug Resistance in Vitro by Fatty Acid - PEG Diesters, International J. of Cancer, sv. 65, s. 74-79, 1996, působení TPGS na membránách může cíleně ovlivnit funkci p-glykoproteinu. TPGS a DIM pravděpodobně mají synergní účinek při inhibici účinku p-glykoproteinu, který brání vstřebávání některých látek a vyvolává vypuzení některých fytochemických látek, jako jsou indoly

z enterocytů zpět do průsvitu střeva. Prostředky, připravené svrchu uvedeným způsobem, měly za následek neočekávaně vysokou biologickou dostupnost DIM. K prostředkům tohoto typu je možno přidávat také látky, specifické pro inhibici enzymatického systému CYP 3A4. Takovou složkou může být například koncentrát grapefruitové šťávy nebo sulfophoran z brokolice, o němž již bylo dříve prokázáno, že podporuje vstřebávání substrátů CYP 3A4 inhibicí metabolismu sloučenin uvnitř enterocytů.

Neočekávané působení TPGS jako emulgátoru i jako inhibitoru p-glykoproteinu v kombinaci s fytochemickými látkami, které rovněž vyvolávají inhibici p-glykoproteinu a enzymů CYP 3A4 přispělo k možnosti získat prostředek s obsahem smácedla, který stimuluje příjem uvedených látek synergním účinkem. Každý z prostředků, které budou popsány v příkladové části přihlášky, zvyšuje biologickou dostupnost hydrofobních látek z potravy kombinací tří specifických účinků: i) příznivější zařazení do střevních micel a průnik do enterocytů působením TPGS a fosfolipidů, ii) inhibice p-glykoproteinu a tím zábrana návratu látek z potravy do průsvitu střeva kombinovaným účinkem TPGS a DIM a iii) inhibice metabolismu přiváděných hydrofobních látek působením CYP 3A4 činností současně podaného koncentráту grapefruitové šťávy nebo fytochemické látky, jako sulfophoranu nebo DIM. Vstřebané fytochemické látky se tedy dostávají do lymfatického nebo portálního oběhu ve zvýšené koncentraci ve srovnání s podáváním prostředků, připravených bez zpracování na mikročástice TPGS/fosfolipidu a bez současného podávání s inhibitorem CYP 3A4, například s koncentrátem grapefruitové šťávy nebo sulfophorany.

Způsob zpracování, který byl uveden svrchu, je možno aplikovat na čisté syntetické fytochemické látky, jako DIM a chrysin, avšak také na přírodní produkty, jako jsou koncentráty ze sojových bobů, extrakty z kopřivy (*Urtica dioica*) a na některé včelí produkty, jako propolis. V každém případě dochází v průběhu postupu k oddělení fytochemických složek, rozpustných v lipidech od ve vodě rozpustných složek ve výsledném prostředí. Používá se hexanol, propylenglykol nebo jiný systém rozpouštědel, takže dojde k oddělení látek, kompatibilních s lipidy v mikročásticích TPGS a fosfolipidů a ve vodě rozpustné látky jsou spojeny se škrobem nebo jiným nosičem, tvořícím matrici výsledného prostředí. V případě kopřivy *Urtica dioica* se například ve vodě rozpustné lipidy, jako kyselina hydroxyoktadekanová, která je účinná proti aromatáze, oddělí do komplexu TPGS/fosfolipid, kdežto ve vodě rozpustnější fytochemické látky se spojují se škrobovou matricí. Tímto způsobem dochází ke zlepšení biologické dostupnosti hydrofobnějších fytochemických látek.

Propolis a další včelí produkty představují přírodní produkty, v nichž jsou koncentrovány flavony včetně chrysinu ve směsi pylových částic a rostlinných pryskyřic podle publikace Siess a další, *Flavonoids of Honey and Propolis: Characterization and effects on hepatic drug-metabolizing enzymes and benzo[a]pyrene-DNA binding in rats*, J. Agric. Food Chem., 44:8, s. 2297-2301, 1996. Vzhledem k tomu, že účinnost na indukci CYP je v případě propolisu vyšší než v případě extraktu flavonoidů z propolisu, byl zpracováván med s obsahem pylu, který je blízce příbuzných propolisu, aby bylo možno připravit

výhodný prostředek svrchu uvedeného typu. V tomto případě byl přidán další stupeň, který spočíval v mletí a v rozpuštění komplexní směsi v rozpouštědle na bazi propylenglykolu, aby bylo možno dosáhnout zapouzdření mikročástic ve vodě nerozpustných flavonových složek spolu s TPGS. Další výhodné složky včetně kyseliny skořicové byly podobným způsobem spojeny s TPGS. Tento přístup je výhodný z toho důvodu, že chrysin nebo další výhodný flavon je možno koncentrovat pomocí včelích produktů z rostlinných zdrojů se známým obsahem flavonu, například ze slunečnic, čímž odpadá nezbytnost předběžného čištění nebo syntézy chrysinu. Prostředky s obsahem DIM a chrysinu měly velmi dobrý účinek při dosahování rovnováhy metabolismu estrogenů vzhledem ke současnému přívodu látek, které indukují CYP1A1/1A2 a současně vyvolávají inhibici aromatázy CYP.

Použití svrchu uvedených složek umožnilo přípravu potravinových doplňků, modifikujících účinnost CYP pro dosažení výhodnějšího metabolismu estrogenů u tří specifických stavů. Jde o zajištění zdravotního stavu prostaty a omezení hromadění estrogenů při stárnutí u mužů, o úpravu metabolismu estrogenů u žen k vyvolání tvorby 20H-estronu a k udržení koncentrace estrogenů a o vyvolání vysokého poměru testosteronu k estrogenům ke zlepšení fyzické kondice u sportovců.

Úprava CYP při stárnutí u mužů

Prostředek pro tento účel kombinuje účinky DIM, chrysinu a přírodního produktu z *Urtica dioica* na modulaci enzymů CYP k intervenci do hormonálního stavu při stárnutí u mužů, to znamená při tzv. andropauze. Na

rozdíl od tradičního pohledu na stárnutí u mužů jako pochodu, při němž se snižuje množství biologicky dostupného testosteronu by patrně bylo zapotřebí zavést názor, že stárnutí u mužů je provázeno nahromaděním estrogeneru při sníženém vylučování těchto hormonů. Při použití prostředku podle vynálezu s biologicky dostupným DIM došlo ke zvýšení enzymů CYP, zodpovědných za metabolismus estrogenerů na 20H-estron a 2-methoxyestron. Prostředkem s obsahem DIM ve spojení s biologicky dostupným chrysinem je možno snížit jak koncentraci prekurzorového hormonu androstendionu podle publikace Jellinck a další, Influence of indole carbinols and growth hormone on the metabolism of 4-androstenedione by rat liver microsomes, J. Steroid Biochemistry and Molec. Biol., 46:6, s. 791-798, 1993, působením aromatázy CYP pak dochází k dalšímu snížení koncentrace estrogenerů ve tkáních. Přidání extraktů z *Urtica dioica* doplní účinnost antiaromatázy ve formě kyseliny hydroxyoktadekanové a mimo to doplňuje také ve vodě rozpustnou složku, která specificky brání aktivaci estrogeneru globulinem SHBG podle publikace Hryb a další, The effect of extracts of the roots of the Stinging Nettle (*Urtica dioica*) on the interaction of SHBG with its receptor on human prostatic membranes, Planta Medica, 61, s. 31-32, 1995. Tyto kombinované účinky na metabolismus steroidů a na receptory snižuje stimulaci prostaty estrogenery, snižuje zvýšení syntézy SHBG působením estrogenerů v játrech a zvyšuje množství biologicky dostupného testosteronu.

Úprava rovnováhy estrogenerů u žen

Byl vyvinut prostředek, specificky určený pro použití u žen s obsahem biologicky dostupného DIM, extraktu Saw Palmetto extraktu ze zeleného čaje a koncentrátu phytoestrogenu, například koncentrátu isoflavonu ze soji. Na rozdíl od prostředku, určeného pro použití u mužů, tato kombinace fytochemických látek pro úpravu enzymů CYP uchovává a zvyšuje hladinu estrogenů. Indukce enzymů CYP 1A1/1A2 působením DIM rovněž zajistí metabolismus estrogenu bezpečným způsobem na 20H-estron, takže se zvyšuje poměr množství 20H-estronu k 160H-estronu. Působením extraktů ze Saw Palmetto a zeleného čaje, které ještě nebyly používány jako potravinové doplňky u žen, dochází k blokování 5-alfareduktázy a tím k zachování koncentrace androstendionu podle publikace Liao S. a Hiipakka R. A., Biochem. Biophys. Res. Comm., 214(3): 833-38, 1995. Androstendion, odvozený přímo od DHEA, je substrátem pro aromatázu CYP a důležitým zdrojem estrogenů u starších žen. Toto nové použití Saw Palmetto u žen bez chrysinu nebo jiného inhibitoru aromatázy uchovává účinnost aromatázy CYP a udržuje estrogeny, odvozené od androgenů jako prekursoru. Použití isoflavonů ze soji zajistí tvorbu aktivovaných metabolitů, jako jsou Equol, Daidzein a Genistein, které mají převážně estrogení účinek. Vyšší koncentrace estrogenů a isoflavonů ze soji podporuje mineralizaci kostní tkáně a zvyšuje produkci SHBG v játrech. SHBG u žen má také ochranný účinek na tkáň mléčné žlázy a dělohy a brání příliš vysoké stimulaci těchto tkání nevázaným estrogenem. Úpravou rovnováhy enzymů CYP takový prostředek zvyšuje bezpečnost substituční terapie (HRT) estrogeny, progesteronem a DHEA. V dalším možném provedení je možno nahradit koncentrát isoflavonu ze soji koncentrátem lignanů, které

produkují estrogenní metabolity, enterodiol a enterolakton.

Prostředek pro zlepšení fyzické kondice

Prostředek pro zlepšení fyzické kondice a zvýšení množství svalové hmoty u sportovců byl vyvinut na bázi biologicky dostupného DIM, biologicky dostupného chrysinu, extraktu Saw Palmetto a extraktu ze zeleného čaje. Zvýšení poměru testosteronu k estrogenu bylo vyvoláno modulačním účinkem tohoto kombinovaného prostředku na enzymy CYP. Působení chrysinu spolu s extrakty ze Saw Palmetto a ze zeleného čaje zachovává koncentraci androstendionu omezením metabolismu aromatázou CYP a 5-alfareduktázou. Vyšší koncentrace androstendionu má za následek zvýšenou přeměnu této látky na testosteron, zvláště v případě, že se dále dodává DHEA a androstendion. Biologicky dostupný DIM snižuje množství estrogenu v oběhu vzhledem ke zvýšenému metabolismu na 20H-estron a 2-methoxyestron. Spolu s inhibicí aromatázy působením chrysinu napomáhá DIM uchovat vylučování LH z hypofýzy vzhledem k tomu, že estrogen a aromatáza vyvolávají inhibici této sekrece. Vyšší koncentrace LH vyvolává u mužů vyšší produkci testosteronu. Touto kombinací látek v prostředku podle vynálezu je tedy možno posunout metabolismus steroidů ve prospěch zvýšeného poměru testosteronu k estrogenům ve svalových buňkách. Aby bylo možno ještě zvýšit modulační účinek na CYP, byl přidán extrakt z *Urtica dioica*, obsahující kyselinu hydroxyoktadekanovou, která vyvolává inhibici aromatázy. V kombinaci s tělesným cvičením dochází tímto způsobem k anabolickému účinku a zvýšenému vývoji svalů působením chemických látek z rostlin v prostředku podle vynálezu.

Zvýšení vstřebávání účinných složek

V každém ze svrchu uvedených prostředků je ještě jako přídatná látka obsažen koncentrát grapefruitové šťávy nebo extrakt z křížatých rostlin typu zeleniny s obsahem sulfophoranu k omezení působení CYP 3A4 ve střevě ve smyslu „presystemického metabolismu“ fytochemických složek. Vstřebávání těchto látek je rovněž podporováno přítomností TPGS a DIM. Je také výhodné, podávat uvedené potravinové doplňky spolu s malým množstvím potravy, obsahující tuk. Tímto způsobem je dále podporovat vstřebávání fytochemických látek, rozpustných v tucích zvýšením tvorby chylomikronu v enterocytech. Zvýšená tvorba chylomikronů zvýší průtok do lymfatického oběhu a celkové vstřebávání účinných látek touto cestou, čímž se obejde první průchod těchto látek játry.

Možnost dalšího použití prostředku podle vynálezu u různých chorobných stavů

Použití grapefruitové šťávy, koncentrátu grapefruitové šťávy nebo koncentrovaných grapefruitů jako takových nebo v kombinaci se zkracovaným DIM, je postupem, kterým je možno léčit stavy, spojené s nerovnováhou metabolismu estrogenů, která je charakterizována převahou účinnosti estrogenů nad účinností jiných pohlavních hormonů. Tato nerovnováha může být také charakterizována zvýšením poměru 16-hydroxyestrogenů jako metabolitu k 2-hydroxyestrogenů ve srovnání s hodnotami u normální populace. Tento způsob léčení nerovnováhy v metabolismu estrogenů je vhodný zejména pro stárnutí u mužů, které je charakterizováno hromaděním estrogenů, jde například o

předčasnou atherosklerózu podle publikace Phillips GB a další, Association of hyperestrogenemia and coronary heart disease in men in the Framingham cohort. American J. of Medicine 1983; 74: 863-869 a o hypertrofii prostaty podle publikace Gann PH a další, A prospective study of plasma hormone levels, nonhormonal factors, and development of benign prostatic hyperplasia, The Prostate, 1995, 26: 40-49. Uvedený postup je možno využít také při poruchách imunitního systému u mužů i žen, charakterizovaných nerovnováhou v metabolismu estrogenů, jako je systemický Lupus erythematosus podle publikace Lahita, RG, a další, Increased 16-alfa-hydroxylation of estradiol in systemic lupus erythematosus. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1981; 53: 174-178. Postup se týká také poruch, spojených s nerovnováhou estrogenů u žen včetně poruch nálady, například při premenstruálním syndromu PMS, při návratných bolestech mléčné žlázy podle publikace Ashley B, Mastalgia, Lippincott's Primary Care Practice. 1989; 2(2): 189-93, a v případě stavů, spojených s infekcí lidským papilomavirem, zvláště pak u dysplasií děložního krčku podle publikace Sepkovic DW a další, Estrogen Metabolite Ratios and Risk Assessment of Hormone Related Cancers: Assay Validation and Prediction of Cervical Cancer Risk. Annals of the N. Y. Acad. of Science 1995; 768: 312-316 a také v případě návratné respirační papilomatózy podle publikace Auborn K. a další, Estrogen metabolism and laryngeal papillomatosis: A Pilot Study on Dietary Prevention. Anticancer Research, 1998, 18: 4569-4574. Stejným způsobem je možno také bránit některým poruchám, spojeným s nerovnováhou metabolismu estrogenů, zvláště u žen, jako jsou fibrocystické změny mléčné žlázy, zhoubné nádory mléčné žlázy podle publikace Bradlow HL a další, 16-alfa-

hydroxylation of estradiol: a possible risk marker for breast cancer. *Annals NY Acad. Sci.* 1986, 464, 138-151, a Kabat GC, a další, Urinary estrogen metabolites and breast cancer: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997 Jul; 6(7): 505-9, fibroidní nádory dělohy, zhoubné nádory endometria podle publikace Fishman, J. a další, Increased estrogen-16-hydroxylase activity in women with breast and endometrial cancer. *Journal of Steroid Biochem. and Mol. Biol.* 1984; 20, 1077-1081 a endometrióza. Postup se specificky týká snížení rizika zhoubných nádorů mléčné žlázy podle publikace Schneider J. a další, Abnormal oxidative metabolism of estradiol in women with breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982, 89: 3047-3051 a zhoubných nádorů dělohy ve spojení se substituční hormonální terapií s použitím estrogenů.

Zvýšení biologické dostupnosti jednotlivých složek a prostředků podle vynálezu bude ilustrováno následujícími příklady. Při sledování vstřebávání bylo prokázáno, že technologie zpracování prostředku podle vynálezu zvyšuje vstřebávání DIM nebo chrysinu. Silná účinnost DIM při indikci enzymů CYP byla využita k demonstraci výhodnosti zpracovaného DIM ve srovnání s krystalickým DIM. Tento přístup byl využit u živočichů, kterým byl podáván v krmivu krystalický DIM nebo svrchu uvedeným způsobem zpracovaný DIM a pak byla přímo měřena koncentrace enzymů CYP v játrech a dalších tkáních. U člověka bylo totéž srovnání provedeno opakovaným stanovením steroidních metabolitů v moči místo přímé analýzy tkání. Vzhledem k tomu, že metabolismus steroidních látek je přímo spojen s koncentrací enzymů CYP ve tkáních a s jejich účinností, je použití koncentrace uvedených látek v moči sice

nepřímé, avšak odráží měření změn účinnosti CYP v tělesných tkáních.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Složky prostředku pro usnadnění vstřebávání DIM nebo jiných nerozpustných indolů ze stravy

Seznam složek

1. Přibližně 10 až 40 % hmotnostních indolu ze stravy, zvoleného z následujících složek jednotlivě nebo v kombinaci: čistý diindolylmethan, tzn.

3,3'-diindolylmethan, lineární triindol, chemicky [2-(indol-3-ylmethyl)-indol-3-yl]-indol-3-ylmethan, cyklický triindol, chemicky 5,6,11,12,17,18-hexahydrocyklononol [1,2-b:4,5-b':7,8-b]:triindol a lineární diindol, tzn. 1-(3-hydroxymethyl)indolyl-3-indolylmethan.

2. Přibližně 10 až 40 % hmotnostních následujících složek jednotlivě nebo v kombinaci: polyethylenglykol 1000 ve formě esteru sukcinátu vitamínu E, estery polyethylenglykolu se sukcinátem vitamínu E s molekulovou hmotností 400 až 2000 nebo jiné estery polyethylenglykolů, např. estery s mastnými kyselinami, jako je kyselina olejová nebo stearová, polyvinylpyrrolidony, polyvinylpolypyrrolidony, Poloxamer 188, Tweeny nebo Spany.

3. Přibližně 5 až 20 % hmotnostních následujících složek jednotlivě nebo v kombinaci: fosfatidylcholin

(odvozený od sojového lecithinu a dodávaný ve formě prostředku Phospholipon 50G, Rhone Poulenc Rorer), dioleoylfosfatidylcholin, fosfatidylglycerol, dioleoylfosfatidylglycerol, dimyrystoylfosfatidylcholin, dipalmitoylfosfatidylcholin, fosfatidylethanolaminy, fosfatidylseriny nebo sfingomyeliny nebo jiné zdroje fosfolipidů, například globulární částice mléčného tuku z membrán, glycerolestery, polyglycerolestery nebo ethoxylovaný ricinový olej.

4. Přibližně 15 až 30 % hmotnostních následujících složek jednotlivě nebo v kombinaci: hexanol, ethanol, butanol, heptanol, 2-methyl-1-pentanol, různá rozpouštědla typu ketonů, vhodná pro potravinářské účely, jako methylethylketon, aceton a podobně, propylenglykol a některá rozpouštědla typu esterů, jako ethylacetát.

5. Přibližně 20 až 40 % hmotnostních následujících složek jednotlivě nebo v kombinaci: modifikovaný škrob, například prostředek Capsul (National Starch, Inc.), methylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, hydroxyethylcelulóza, hydroxypropylethylcelulóza, pektin, arabská guma, želatina nebo jiné polymerní látky, vytvářející matrici se známým použitím, rozpustné ve vodě a vhodné pro sušení rozprašováním.

6. Přibližně 0,5 až 35 % hmotnostních následujících složek jednotlivě nebo v kombinaci: aerosil 200 nebo jiná látka, zvyšující sypnost na bázi oxidu křemičitého nebo příbuzné soli se známým použitím.

Příklad 2

Způsob výroby zpracovaného DIM, „p-DIM“ po jednotlivých stupních

1. 6,75 kg TPGS se zahřeje těsně nad teplotu tání za stálého míchání v zahřívané nádobě, označované jako první nádoba.

2. 9,38 kg hexanolu a 9,83 kg DIM, mletého v tryskovém mlýnu, se přidá do první nádoby a směs se míchá při teplotě 70 °C až do vzniku homogenní suspenze. Pak se přidá 1,4 kg fosfatidylcholinu.

3. Ve druhé větší nádobě se pomocí lopatkového míchadla smísí 185 l vody a 10,7 kg škrobu. Směs se neutralizuje na pH 7 přidáním malého množství uhličitanu sodného a pak se zahřeje na 75 °C a při této teplotě se 1 hodinu míchá.

4. Obsah první nádoby se přidá ke škrobu ve druhé větší nádobě a směs se důkladně promísí homogenizátorem s rotorem a statorem při mírné rychlosti po dobu 15 minut.

5. Směs ze stupně 4 se suší rozprašováním po přidání malého množství přibližně 0,5 % hmotnostních hydrofilního oxidu křemičitého, čímž se získá volně sypný prášek jemně dispergovaných mikročástic, které obsahují společně vysrážený TPGS, fosfatidylcholin a DIM v amorfní nekrytalické struktuře.

6. Sypný práškový povrch se uloží do evakuovaných sáčků z folie po odvzdušnění a propláchnutí dusíkem.

7. Při analýze přítomnosti nezměněné účinné složky bylo prokázáno 30 až 35 % hmotnostních DIM.

8. DIM, připravený způsobem podle příkladu 2, bude dále uváděn jako zpracovaný DIM nebo p-DIM.

Pro účinné léčení se svrchu uvedený prostředek podává savcům v dávce přibližně 1,5 až 12 mg/kg denně perorálně. Toto podávání účinně zajistí rovnováhu metabolismu estrogenů posunem ve prospěch 2-hydroxyestronu a 2-methoxyestronu.

Příklad 3

Složky prostředku pro zlepšení vstřebávání chrysinu nebo jiných flavonoidů

Seznam složek:

1. Čistý flavon, flavonol, flavanon, isoflavon, dimer flavonu v mikrokryсталické formě (přibližně 10 až 40 % hmotnostních) ze skupiny chrysin, apigenin, kafr, kvercetin, morin, naringenin, genistein, biochanin A, didzein, amentoflavon, ginkgetin, isoginkgetin.

2. Přibližně 10 až 40 % hmotnostních následujících složek jednotlivě nebo v kombinaci. Ester polyethylenglykolu 1000 se sukcinátem vitaminu E, estery polyethylenglykolů s molekulovou hmotností 400 až 2000 se sukcinátem vitaminu E, další estery polyethylenglykolu, vytvořené například s mastnými kyselinami, jako kyselinou olejovou nebo stearovou, polyvinylpyrrolidony, polyvinylpolypyrrolidony, Poloxamer 188, Tweeny nebo Spany.

3. Přibližně 5 až 20 % hmotnostních následujících složek jednotlivě nebo v kombinaci: fosfatidylcholin (odvozený od sojového lecithinu a dodávaný ve formě prostředku Phospholipon 50G, Rhone Poulenc Rorer), dioleoylfosfatidylcholin, fosfatidylglycerol, dioleoylfosfatidylglycerol, dimyristoylfosfatidylcholin, dipalmitoylfosfatidylcholin, fosfatidylethanolaminy, fosfatidylseriny nebo sfingomyeliny nebo jiné zdroje fosfolipidů, například globulární částice mléčného tuku z membrán, glycerolestery, polyglycerolestery nebo ethoxylovaný ricinový olej.

4. Přibližně 15 až 30 % hmotnostních následujících složek jednotlivě nebo v kombinaci: hexanol, ethanol, butanol, heptanol, 2-methyl-1-pentanol, různá rozpouštědla typu ketonů, vhodná pro potravinářské účely, jako methylethylketon, aceton a podobně, propylenglykol a některá rozpouštědla typu esterů, jako ethylacetát.

5. Přibližně 20 až 40 % hmotnostních následujících složek jednotlivě nebo v kombinaci: modifikovaný škrob, například prostředek Capsul (National Starch, Inc.), methylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, hydroxyethylcelulóza, hydroxypropylethylcelulóza, pektin, arabská guma, želatina nebo jiné polymerní látky, vytvářející matici se známým použitím, rozpustné ve vodě a vhodné pro sušení rozprašováním.

6. Přibližně 0,5 až 35 % hmotnostních následujících složek jednotlivě nebo v kombinaci: aerosil 200 nebo jiná látka, zvyšující sypanost na bazi oxidu křemičitého nebo příbuzné soli se známým použitím.

Příklad 4

Příprava prostředku pro zlepšení vstřebávání chrysinu (p-chrysin) v jednotlivých stupních

1. 6,5 kg TPGS se zahřeje těsně nad teplotu tání za míchání v zahřívané první nádobě.

2. 19,5 kg propylenglykolu a 7,5 kg chrysinu, mletého v tryskovém mlýnu, se přidá do první nádoby a směs se míchá při teplotě 80 °C až do vzniku homogenní suspenze. Pak se přidá 0,5 kg fosfatidylcholinu.

3. Ve druhé větší nádobě se důkladně promísí pomocí lopatkového míchadla 75 l vody a 9,5 kg škrobu. Pak se přidá 1 kg deoxycholátu sodného, který se promísí s vodou a škrobem. Výsledná směs se neutralizuje na pH 7 přidáním malého množství uhličitanu sodného, načež se zahřeje na 75 °C a ještě jednu hodinu míchá.

4. Obsah první nádoby se přidá ke škrobu ve druhé větší nádobě a směs se důkladně promísí homogenizátorem s rotorem a statorem při mírné rychlosti po dobu 15 minut.

5. Směs ze stupně 4 se suší rozprašováním po přidání malého množství přibližně 0,5 % hmotnostních hydrofilního oxidu křemičitého, čímž se získá volně sypný prášek jemně dispergovaných mikročástic, které obsahují společně vysrážený TPGS, fosfatidylcholin a chrysin v amorfní nekrytalické struktuře.

6. Sypný práškový povrch se uloží do evakuovaných sáčků z folie po odvodušnění a propláchnutí dusíkem.

7. Analýza přítomnosti nezměněné účinné látky prokázala 25 až 30 % hmotnostních chrysinu.

Chrysin, připravený způsobem podle příkladu 4 bude dále uváděn jako zpracovaný chrysin nebo p-chrysin.

Prostředek se podává živočichům v přibližné dávce 3 až 30 mg/kg denně perorálně a upravuje rovnováhu metabolismu estrogenů omezení účinnosti aromatázy CYP. Tímto způsobem se snižuje přeměna androstendionu na estrogeny.

Příklad 5

Výroba prostředku pro zlepšení vstřebávání s obsahem včelího medu s pylem

Včelí med s pylem byl získán od C. C. Polen Co., Phoenix, Arizona, a byl použit místo čistého chrysinu při přípravě zpracovaného chrysinu. Výchozí materiál byl mlet za vlhka ke zmenšení velikosti částic a k rozrušení pylových zrn. Od tohoto okamžiku byl materiál zpracováván naprosto stejným způsobem, jako čistý chrysin. Med s pylem, připravený způsobem podle příkladu 4 se označuje jako zpracovaný med s pylem nebo p-med s pylem.

Pro účinné léčení se svrchu uvedený prostředek savcům podává v přibližné dávce 5 až 30 mg/kg denně perorálně. V těchto dávkách je prostředek účinný pro indukci enzymů CYP v játrech a zvláště pro inhibici aromatázy CYP.

Příklad 6

Příprava prostředku pro zlepšení vstřebávání s obsahem kombinace zpracovaného DIM, zpracovaného chrysinu, Urtica dioica a koncentráту grapefruitu pro zlepšení zdravotního stavu u mužů a pro zachování normálních poměrů prostaty

Postupuje se svrchu uvedeným způsobem, čímž se připraví následující složky v suchém stavu, které se smísí v následujících množstvích spolu s vhodnými pomocnými látkami, pojivy a prostředky pro zvýšení sypnosti pro plnění do kapslí nebo pro výrobu tablet.

p-DIM	150 až 300 mg
p-chrysin	300 až 1500 mg
extrakt Urtica dioica	300 až 600 mg
koncentrát grapefruitové šťávy	300 až 600 mg

Svrchu uvedený prostředek může být připraven také ve formě gelových globulí při přidání pygeum africanum, lycopenu, vitamínu D a zinečnatých solí ve formě suspenze ve vhodném nosiči, například v oleji z tykvových semen.

Pro účinné léčení se podává jednou denně 1 až 3 tablety nebo kapsle perorálně.

Příklad 7

Příprava prostředku s kombinací zpracovaného DIM, koncentráту isoflavonu ze soji, koncentráту Saw Palmetto, koncentráту ze zeleného čaje a koncentráту grapefruitu pro zlepšení hormonální rovnováhy u žen

Dále bude popsán způsob výroby prostředku, obsahujícího kombinaci p-DIM, koncentráту fytoestrogenu a

koncentrátu grapefruitové šťávy, prostředek je vhodný pro zachování správné funkce mléčné žlázy a děložní tkáně.

Složky:

1. Koncentrát fytoestrogenu se připraví z koncentrovaného extraktu sojových bobů, který obsahuje isoflavony genistein, daidzein a lignany ve významnějším množství, použije se vhodný způsob extrakce. Obvykle se užívá extrakce zředěnou zásadou, tímto způsobem se připravuje například běžně dodávaný výrobek Genista (Natus Inc.).

2. Připraví se částicový prostředek s obsahem p-DIM, koncentrátu fytoestrogenu, extraktu ze zeleného čaje a koncentrátu grapefruitové šťávy tak, že se smísí následující složky v suchém stavu v uvedeném množství spolu s vhodnými pomocnými látkami, pojivky a látkami pro zlepšení sypnosti a výsledná směs se plní do kapslí nebo se zpracuje na tablety.

p-DIM	150 až 300 mg
koncentrát fytoestrogenu	300 až 600 mg
extrakt ze zeleného čaje	300 až 600 mg
koncentrát Saw Palmetto	300 až 600 mg
koncentrát grapefruitové šťávy	200 až 1000 mg

K léčebným účelům se podává perorálně 1 až 6 kapslí nebo tablet denně.

Příklad 8

Příprava prostředku pro zlepšení vstřebávání s obsahem kombinace zpracovaného DIM, zpracovaného chrysinu, koncentrátu Saw Palmetto, koncentrátu zeleného čaje,

koncentrátu *Urtica dioica* a koncentrátu grapefruitové šťávy pro zlepšení fyzické kondice

Při přípravě prostředku s obsahem p-DIM, p-chrysinu a *Urtica dioica* se mísí následující suché složky v uvedených množstvích v suchém stavu spolu s vhodnými pomocnými látkami, pojivy a látkami pro zlepšení sypnosti a výsledná směs se plní do kapslí nebo se zpracovává na tablety.

p-DIM	150 až 300 mg
p-chrysin	300 až 1500 mg
koncentrát <i>Saw Palmetto</i> (4:1)	300 až 600 mg
extrakt <i>Urtica dioica</i>	300 až 600 mg
extrakt ze zeleného čaje	300 až 600 mg
koncentrát grapefruitové šťávy	300 až 600 mg

Při léčebných postupech se perorálně podává 1 až 6 kapslí nebo tablet denně spolu s malým množstvím potravin s obsahem tuku a vodou.

Příklad 9

Průkaz zlepšeného vstřebávání p-DIM u živočichů

Zlepšení vstřebávání DIM po zpracování této látky mikrozapouzdřením za vzniku p-DIM bylo prokazováno v pokusu na kryších. Dospělé krysy, samci i samice kmene Sprague Dawley dostávaly krystalický DIM nebo zpracovaný DIM. Po třech dnech byly krysy usmrceny a byla odebrána játra. Po izolaci mikrosomů z jater bylo stanoveno množství enzymů CYP metodou Western Blot a bylo prokázáno, že množství CYP 1A1/1A2 je přibližně až 11,4krát vyšší po podávání p-DIM než po podávání

krystalického DIM. Pokus byl prováděn následujícím způsobem:

Skupiny krys Sprague-Dawley dostávaly žaludeční sondou krystalický DIM nebo p-DIM ve formě suspenze v methylcelulóze v dávce 100 mg/kg ve třech po sobě následujících dnech. Po usmrcení byla játra promyta fyziologickým roztokem chloridu sodného a zpracována k izolaci mikrosomální frakce. Indukce enzymu byla v mikrosomech měřena současně s protilátkami proti enzymům typu cytochromu CYP a spolu se specifickými enzymy CYP 1A1/1A2. Výsledky byly vyjádřeny v % kontrolní hodnoty. Při stanovení CYP 1A1/1A2 bylo možno pozorovat 3,9násobné zvýšení v případě p-DIM ve srovnání s krystalickým DIM u samců a 11,4násobné zvýšení pro p-DIM ve srovnání s krystalickým DIM u samic.

Stanovení cytochromů

prostředek s obsahem DIM	% kontrolní hodnoty (p-DIM a krystalický DIM)
I. CYP celkem (nmol/mg proteinu)	
krystalický	140 % (samci)
p-DIM	224 % (samci, 1,6krát)
II. CYP 1A1/1A2 (densitometrické jednotky)	
krystalický	462 % (samci)
p-DIM	1.831 (samci, 3,9krát)
krystalický	232 % (samice)
p-DIM	2.663 % (samice, 11,4x)

Příklad 10

Průkaz nezbytnosti použití DIM ve zpracované formě pro zvýšení biologické dostupnosti u živočichů

Byl proveden další pokus k průkazu výhodnosti zapouzdření pro vstřebávání účinných složek. Byla srovnávána biologická dostupnost zpracovaného DIM ve srovnání s dostupností krystalického DIM, podávaného současně s izolovanými částicemi TPGS/fosfatidylové látky tak, aby bylo možno prokázat nutnost zapouzdření k dosažení lepšího vstřebávání. Ke zjištění zlepšené biologické dostupnosti byla opět sledována indukce enzymu CYP jako biologický marker.

V průběhu pokusu byla srovnávána indukce enzymů u krysích samic po podání krystalického DIM, I3C a zpracovaného DIM v příslušných dávkách v krmivu. Pak byla měřena koncentrace CYP 1A1/1A2 a 1B1 v děloze a v jaterních mikrosomech jako koncový bod příjmu a známka biologické dostupnosti.

K pokusu bylo použito 30 krysích samic kmene Sprague-Dawley s hmotností přibližně 200 g. Pokus byl proveden následujícím způsobem:

1. Krysy byly aklimatizovány 5 až 7 dnů v klecích po skupinách, jako krmivo bylo podáváno minimální krmivo AIN76A.
2. 3 dny bylo podáváno totéž krmivo, k němuž bylo přidáno 7 různých kombinací indolů.
3. Přibližně desátého dne byly krysy usmrceny a byla izolována játra a dělohy po propláchnutí břišních orgánů k odstranění krve.
4. Orgány byly zpracovány k získání mikrosomální frakce, bohaté na enzymy CYP.

5. Imunoblotovou metodou byla stanovena koncentrace specifických enzymů CYP standardním způsobem při použití existujících protilátek proti CYP.

Zkouškám byly podrobeny mikrosomy z následujících skupin:

Skupina	N	Krmivo	Přísada/účel
1.	3	pouze AIN76A	neg.
Kontroly			
2.	3	pouze AIN76A	poz.
Kontrola/TCDD (dioxin) sondou			
3.	3	DIM 2 mg/kg/den	krystalický DIM
4.	3	DIM 10 mg/kg/den	krystalický DIM
5.	3	p-DIM 6,8 mg/kg/den	srovnání DIM
6.	3	p-DIM 34 mg/kg/den	srovnání DIM
7.	3	I3C 5 mg/kg/den	srovnání I3C
8.	3	I3C 25 mg/kg/den	srovnání I3C
9.	3	placebo TPGS 34 mg/kg/den	ověření TPGS
10.	3	TPGS 6,8 mg/kg/den a DIM 2 mg/kg/den	

Hmotnost orgánů byla zjištěna při nekropsii. Pak byla srovnávána koncentrace specifických enzymů CYP podle standardizovaných densitometrických jednotek. Výsledky prokázaly zcela zřejmou výhodnost zpracovaného DIM ve srovnání s krystalickým DIM při současném podávání s TPGS. Výsledky, vyjádřené v densitometrických jednotkách a prokazující příjem indolu a stupeň indukce enzymů, jsou uvedeny v následujících skupinách.

Skupina	N	Forma DIM	Densitometrické jedn.
1.	3	kontrola	0

2.	3	TCDD (dioxin) pozitivní kontrola	251,7
3.	3	DIM 2 mg/kg/den	0
4.	3	DIM 10 mg/kg/den	0
5.	3	p-DIM 6,8 mg/kg/den	0
6.	3	p-DIM 34 mg/kg/den	38,2
7.	3	I3C 5 mg/kg/den	0
8.	3	I3C 25 mg/kg/den	5,1
9.	3	placebo TPGS 34 mg/kg/den	0,8
10.	3	krystalické TPGS a DIM	2,5

Vzhledem k tomu, že p-DIM odpovídá 34 % hmotnostním krystalického DIM, byl ve skupině 4 podáván ekvivalent DIM v mg, totéž platí pro skupinu 6.

Výsledky prokazují zvýšení biologické dostupnosti p-DIM ve srovnání s krystalickým DIM a nezbytnost přítomnosti DIM ve zpracované mikročásticové formě, jaká se nachází v p-DIM pro dosažení této zvýšené biologické dostupnosti.

Příklad 11

Průkaz nezbytnosti přítomnosti DIM ve zpracované formě pro zvýšení biologické dostupnosti u člověka

Vzhledem k tomu, že účinek indolů ve stravě na indukci CYP se přímo odráží ve změnách metabolismu estrogenů, je možno prokázat tyto změny odebráním moči a její kvantitativní analýzou na přítomnost klíčových metabolitů působení enzymů CYP. Tento přístup byl vyvinut firmou Immunacare, Inc. Byl využit zkušební balíček Estratest typu imunologické zkoušky ELISA pro 20H a 160H estron v moči tak, aby bylo možno prokázat biologickou dostupnost p-DIM. Uvedenou zkouškou je možno

kvantitativně stanovit 20H estron a 160H estron v ng/ml v první ranní moči. Jde o metabolity, které vznikají působením cytochromů 1A1/1A2. Ze získaného kvantitativního stanovení se vypočítá poměr 20H/160H. Estratest byl poprvé použit k průkazu zvýšené biologické dostupnosti p-DIM ve srovnání s dostupností krystalického DIM u člověka po průkazu této skutečnosti u živočichů. Krystalický DIM nebo p-DIM byl podáván pokusným osobám různou dobu v různých dávkách. Před podáváním a po něm byla sbírána moč, která byla analyzována zkouškou ELISA na množství a poměr 20H estronu a 160H estronu. Jde o metabolity, vznikající působením enzymů CYP 1A1/1A2. Výsledky prokázaly zřetelné zvýšení poměru 20H/160H.

Pokusná osoba	Dávka DIM	Forma DIM
	% zvýšení 20H/160H	
D. F.	100 mg/den	krystalický
	0 %	
M. Z.	300 mg/den	krystalický
	0 %	
D. F.	50 mg/den	p-DIM
	38 %	
M. Z.	200 mg/den	p-DIM
	71 %	

Mimo to je možno prokázat v případě indukce enzymu indukci při prokazatelně nižších dávkách zpracovaného DIM v případě jeho podávání po dobu nejméně 1 týdne, jak je možno prokázat poměrem 20H/160H před podáváním a po podání účinné látky. Tato studie v závislosti dávky na účinku potvrdila biologickou dostupnost zpracovaného DIM při perorálním podání v dávkách nižších než 1 mg/kg tělesné hmotnosti vzhledem k tomu, že řada pokusných osob

měla hmotnost vyšší než 70 kg. Výsledky prokazují biologickou dostupnost zpracovaného DIM v dávkách, které jsou nižší než dávky, které byly použity u pokusných zvířat, kde bylo použito dávky 1 mg/kg DIM v kukuřičném oleji. Tyto výsledky tedy podporují zvýšení biologické dostupnosti při podávání p-DIM ve srovnání s podáváním krystalického DIM.

Pokusná osoba	Dávka DIM	Forma DIM
	% poměru 20H/160H	
E. C.	300 mg/den	p-DIM
	235 %	
M. W.	200 mg/den	p-DIM
	67 %	
C. C.	200 mg/den	p-DIM
	39 %	
K. K.	100 mg/den	p-DIM
	318 %	
S. S.	100 mg/den	p-DIM
	15 %	
P. S.	100 mg/den	p-DIM
	40 %	
E. Z.	75 mg/den	p-DIM
	4 %	
M. F.	75 mg/den	p-DIM
	4 %	
K. W.	75 mg/den	p-DIM
	79 %	
M. W.	50 mg/den	p-DIM
	66 %	
H. B.	50 mg/den	p-DIM
	37 %	
M. S.	50 mg/den	p-DIM

	158 %	
K. D.	25 mg/den	p-DIM
	45 %	
M. W.	25 mg/den	p-DIM
	36 %	

Příklad 12

Průkaz zvýšeného vstřebávání při podání zpracovaného chrysinu

Všechny druhy steroidní metabolitů, které jsou vylučovány močí, je možno identifikovat a kvantitativně stanovit plynovou chromatografií, spojenou s hmotovou spektrometrií. K rozštěpení steroidních glukuronidových metabolitů, a tím k vytvoření „profilu steroidní metabolitů“ bylo použito standardizovaného předběžného štěpení s použitím enzymu glukuronidázy. Tento postup byl použit k průkazu posunu v metabolismu estrogenů po doplnění stravy biologicky dostupným chrysinem a chrystinem v kombinaci s biologicky dostupným DIM. Bylo provedeno sledování na pokusných osobách k průkazu zlepšení vstřebávání při podání zpracovaného chrysinu. V průběhu jediného dosud provedeného a zveřejněného pokusu průkazu biologické dostupnosti flavonoidů při perorálním podání nebylo možno prokázat žádnou absorpci těchto látek.

Aby bylo možno sledovat biologickou dostupnost chrysinu ve formě mikročástic s obsahem TPGS a fosfatidylcholinu (zpracovaný chrysin), byly odebírány ve 24 hodinách vzorky moči ve třech časových intervalech. Mimo to byla sbírána celých 24 hodin veškerá moč. Tyto odběry byly nejprve zkoumány bez jakéhokoliv přídatku.

Druhé sledování bylo provedeno po 1 týdnu podávání 500 mg mikrokrystalického chrysinu denně, třetí sledování bylo prováděno po dalším týdnu, v němž bylo podáváno 500 mg zpracovaného chrysinu denně. Analytický postup pro stanovení profilu estrogenů a androgenů v moči bylo založeno na kapilární plynové chromatografii, spojené s hmotovou spektrometrií, GC/MS podle publikace Johannessen, D. C., Adlecreutz, H., Fotssi, T., a Lonning, P. E., Plasma and urinary oestrogens in breast cancer patients on treatment with 4-hydroxyandrostenedione, British, J. of Cancer, 68, s. 393-398, 1993. Byly stanoveny následující steroidní metabolity v moči: androstendion, testosteron, etiocholanolon a androsteron.

Výsledky uvedených pokusů jsou shrnuty na obr. 1 a 2, kde je možno pozorovat zvýšené vylučování metabolitů typu androgenů po použití zpracovaného chrysinu, avšak nikoliv po použití mikrokrystalického chrysinu. To je v souladu se zvýšeným příjmem zpracovaného chrysinu, sníženou přeměnou androstendionu na estron působením aromatázy a zvýšením produkce testosteronu v důsledku inhibice aromatázy.

Příklad 13

Průkaz příznivého vlivu zpracovaného DIM na metabolismus steroidů u člověka

Při použité plynové chromatografie a hmotové spektrometrie byl proveden pokus na lidských dobrovolnících k průkazu účinku zpracovaného DIM na steroidní metabolity v moči. Byl vždy odebíráán 24hodinový vzorek moči před podáním zpracovaného DIM po dobu jednoho

týdne v dávce 200 mg denně, což odpovídá dávce 70 mg čistého DIM denně. Vzorky moči byly analyzovány technikou GC/MS, tak jak je popsáno v příkladu 12. Na obr 3 a 4 jsou znázorněny výsledky pro 2 pokusné osoby, které prokazují zvýšené vylučování androgenů a metabolitů androgenů, což je známkou vyšší koncentrace testosteronu, androstendionu, androsteronu a etiocholanolonu.

U třetí pokusné osoby byl účinek zpracovaného DIM na mebatoblismus estrogenů sledován stejným způsobem. Nejprve byla odebrána moč ve 24hodinovém vzorku, druhý odběr byl proveden po dvou týdnech doplnění stravy zpracovaným DIM v dávce 200 mg denně, což odpovídá 70 mg čistého DIM denně. Výsledky, které jsou znázorněny na obr. 5 prokazují posun v metabolitech estrogenů ve prospěch tvorby 2-metoxiestronu.

Tyto kvantitativní analýzy vylučování steroidní metabolitů před a po podání účinných látek prokazují výsledky, jejichž příčinou je podání zpracovaného DIM a které jsou průkazem zlepšené biologické dostupnosti této látky ve srovnání s nezpracovaným DIM. Zpracovaná fytochemická látka indukci hydroxylace estrogenů a inhibicí aromatázy vyvolává charakteristický posun steroidních metabolitů v moči.

Příklad 14

Sledování biologické dostupnosti DIM v krevní plazmě při použití GC/MS

Ke stanovení biologické dostupnosti zpracovaného DIM u člověka při perorálním podání bylo vyvinuto stanovení této látky a jejího monohydroxylovaného metabolitu v

krevní plazmě plynovou chromatografií, spojenou s hmotovou spektrometrií. Postup je založen na známém hmotovém spektru DIM a byl potvrzen předběžným sledováním standardního DIM a známého metabolitu DIM, identifikovaného v séru krys po perorálním podání uvedené látky.

Zlepšené vstřebávání zpracovaného DIM při perorálním podání

Jak již bylo uvedeno svrchu, byla použita pro sledování biologické dostupnosti krystalického DIM ve srovnání se zpracovaným DIM plynová chromatografie ve spojení s hmotovou spektrometrií. V dávce 1 mg DIM/kg je možno prokázat zvýšený příjem DIM po jeho zpracování. Výsledky, znázorněné na obr. 6 prokazují vrchol vstřebávání pro DIM 120 minut po perorálním podání. Plocha pod křivkou se dramaticky zvětšuje pro prostředek s obsahem zpracovaného DIM. Při podání krystalického DIM dojde pouze ke vstřebání stop DIM v obdobném časovém intervalu. Dramatické zvýšení plochy pod křivkou po perorálním podání zpracovaného DIM ve srovnání s podáním krystalického DIM perorálně prokazuje výhody zpracování DIM. Perorální podání denní dávky 1 mg/kg je přitom doporučenou dávkou pro dlouhodobé podání DIM jako potravinového doplňku.

Druhý pokus byl proveden na třech pokusných osobách za účelem srovnání příjmu DIM z krystalického stavu ve srovnání s prostředkem s obsahem zpracovaného DIM. Tento pokus byl proveden s polovinou svrchu uvedené dávky, to znamená 0,5 mg/kg denně. Aby bylo možno srovnávat biologickou dostupnost DIM, byly obě dvě formy této látky

21.08.01

sledovány u týchž tří osob v různých dnech. Ve dni 1 byl podán krystalický DIM s vodou, výsledky jsou uvedeny na obr. 7. Ve dni 2 byl podán krystalický DIM s 15 ml sezamového oleje, výsledky jsou uvedeny na obr. 8. Ve dni 3 byl podán zpracovaný DIM s vodou, výsledky jsou znázorněny na obr. 9. Ve dni 4 byl podán zpracovaný DIM spolu s grapefruitovou šťávou GFJ, výsledky jsou uvedeny na obr. 10. Z výsledků je zřejmý dramatický vzestup biologické dostupnosti DIM po jeho zpracování a také zvýšené vstřebávání zpracovaného DIM v kombinaci s GFJ, toto vstřebávání je vyšší než vstřebávání samotného zpracovaného DIM.

Zřejmou výhodou použití zpracovaného DIM ve smyslu zlepšeného vstřebávání a přetrvávání koncentrace DIM v krvi je možno pozorovat srovnáváním výsledků ve dni 1 (krystalický DIM) a ve dni 2 (krystalický DIM v sezamovém oleji) s výsledky ve dni 3 (zpracovaný DIM). Při srovnání dne 3 (zpracovaný DIM) a dne 4 (zpracovaný DIM a GFJ) je možno srovnávání zjednodušit srovnáním plochy pod křivkou AUC pod křivkami pro koncentraci uvedené látky v krvi. Dále je uvedeno shrnutí těchto výsledků.

Subjekt č.	Plocha pod křivkou AUC ng/ml x minuta		Průměrná koncentrace ng/ml	
	zpracovaný DIM	zpracovaný DIM + GFJ	zpracovaný DIM	zpracovaný DIM + GFJ
1 T. K.	12.647,2	14.765,4	42,12	49,22
2 M. Z.	3.835,7	7.423,7	12,79	35,10
3 B. H.	6.523,6	10.906,6	21,75	36,36

Pokusná osoba	% zvýšení AUC, GFJ + zpracovaný DIM ve srovnání se zpracovaným DIM
T. K.	zvýšení 17 %
M. Z.	zvýšení 93 %
B. H.	zvýšení 67 %
průměr	zvýšení 59 %

Jak již bylo uvedeno, dochází k usnadněnému vstřebávání při současném podání DIM a GFJ. Tato interakce ještě nebyla popsána. Dochází ke statisticky významnému účinku při průměrném vzestupu AUC 59 %. Tento účinek napomáhá upravovat metabolismus steroidů usnadněním systemické odpovědi na DIM a navíc účinkem GFJ, takže výsledkem je zvýšení 2-hydroxylace estrogenů, popsané v příkladu 15.

Příklad 15

Zvýšení úpravy metabolismu steroidů u člověka po podání grapefruitové šťávy

Grapefruitová šťáva GFJ, o níž je známo, že zvyšuje vstřebávání různých nesnadno vstřebatelných látek svou inhibicí složek CYP 3A4 rovněž přispívá k příznivé úpravě metabolismu steroidů specifickým účinkem na tento metabolismus. Bylo zjištěno, že při podávání GFJ denně po dobu 5 dnů dochází k významnému posunu metabolismu estrogenů ve prospěch 2-hydroxymetabolitů podobně jako při podávání zpracovaného DIM. Tento překvapující účinek byl prokázán u čtyř dobrovolníků při použití zkušebního balíčku Estratest pro stanovení 20H a 160H metabolitů estrogenu v moči. Zkouška byla prováděna na vzorcích první ranní moči, odebrané před pokusem a po pětidenním podávání zmražené GFJ třikrát denně, šlo o

21.08.01

rekonstituovanou zmrazenou grapefruitovou šťávu Minute Maid v množství 2,5 dl. Dále jsou shrnuty získané výsledky.

Pokusná osoba	% zvýšení 20H/160H
K. K.	zvýšení 1.613 %
M. W.	zvýšení 273 %
B. S.	zvýšení 236 %
J. L.	zvýšení 516 %

Na základě těchto výsledků je možno uzavřít, že při použití GFJ je možno dále zlepšit výsledný účinek ve srovnání s použitím zpracovaného DIM. Uvedeným způsobem je tedy možno dosáhnout příznivého zvýšení 2-hydroxyestrogenu jako metabolitu. Účinek grapefruitové šťávy je nezávislý na účinku ostatních složek a znamená zlepšení vstřebávání navíc v případě použití nesnadno rozpustných látek.

Je tedy možno uzavřít, že byla popsána nová technologie, která umožňuje perorální podání nově syntetizovaných přírodních látek jako potravinových doplňků. Prostředky podle vynálezu jsou zcela nové a znamenají podstatný technický pokrok vzhledem k tomu, že až dosud nebyl k dispozici žádný prostředek, který by umožnil podání DIM nebo chrysinu v dostatečném množství. Nové prostředky podle vynálezu překonávají problémy, spojené s nízkou rozpustností přírodních látek. Při jejich použití je možno žádoucím způsobem upravovat metabolismus steroidů u savců. Při výrobě nových prostředků podle vynálezu se vytváří mikrodisperze účinných látek. Technologie tvorby mikrodisperze byla zdokonalena tak, že nyní je možno vytvářet menší a

stálejší mikročástice DIM a dalších fytochemických látek. Byl tedy připraven nový systém pro zlepšení vstřebávání různých, ve vodě málo rozpustných živin nebo léčiv při perorálním podání. Mimo to se využívá nového účinku grapefruitové šťávy. Tato šťáva má zcela neočekávaně schopnost výhodným způsobem měnit poměry metabolitů estrogenu. Tímto způsobem je tedy možno využít grapefruitovou šťávu a/nebo zpracovaný DIM k léčení chorob, chorobných stavů nebo poruch, charakterizovaných nízkým poměrem metabolitů 2-hydroxyestrogenu k 16-hydroxyestrogenu.

Vynález byl popsán v souvislosti se specifickými provedeními v jednotlivých příkladech, je však zřejmé, že by bylo možno navrhnout řadu funkčně ekvivalentních provedení, rovněž spadajících do rozsahu vynálezu. Takové modifikace může připravit každý odborník. Je tedy zřejmé, že vynález nemůže být omezen na provedení, popsaná v příkladové části přihlášky.

Zastupuje:

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby prostředku s obsahem fytochemické sloučeniny, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se
 - a) zahřeje jedna nebo větší počet solubilizačních emulgačních látek za skupiny esteru polyethylenglykolu 1000 se sukcinátem vitaminu E, polyvinylpyrrolidonu, polyoxyethylenstearátu, cholátu sodného, deoxycholátu nebo taurocholátu sodného,
 - b) k produktu ze stupně (a) se přidá rozpouštědlo a smáčedlo typu fosfolipidu ze skupiny fosfatidylcholin, dioleoylfosfatidylcholin, fosfatidylglycerol, dioleoylfosfatidylglycerol, dimyristoylfosfatidylcholin, dipalmitoylfosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin nebo sfingomyelin za vzniku roztoku,
 - c) v roztoku ze stupně (b) se rozpustí jedna nebo větší počet fytochemických látek ze skupiny indolů a flavonoidů,
 - d) k roztoku ze stupně (c) se přidá roztok, obsahující zapouzdřující látku,
 - e) roztok, připravený ve stupni (d) se mísí za vzniku mikrodisperze s velikostí částic 5 mikrometrů nebo nižší a
 - f) výsledná směs se suší rozprašováním za vzniku pevného prostředku s obsahem hydrofobní fytochemické látky.
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se zapouzdřující látka volí ze skupiny škrob a želatina.
3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se rozpouštědlo volí ze skupiny hexanol,

ethanol, butanol, heptanol, 2-methyl-1-pentanol, methylethylketon, aceton, propylenglykol a ethylacetát.

4. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že velikost částic je 2 mikrometry nebo nižší.

5. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že velikost částic je 1 mikrometr nebo nižší.

6. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se indol volí ze skupiny, tvořené diindolmethanem, například 3,3'-diindolylmethanem, lineárním triindolem, jako [2-(indol-3-ylmethyl)-indol-3-yl]-indol-3-ylmethanem, cyklickým triindolem, jako 5,6,11,12,17,18-hexahydrocyklononal[1,2-b:4,5-b':7,8-b]:triindolem a lineárním diindolem, jako 1-(3-hydroxymethyl)-indolyl-3-indolylmethanem.

7. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se flavonoid volí ze skupiny chrysin, to znamená 5,7-dihydroxyflavon, tectochrysin, chemicky 5-hydroxy-7-methyletherflavon, nepetin, chemicky 5,3',4'-trihydroxy-6-methoxyflavon, tangeretin, chemicky 5,6,7,8,4'-pentamethoxyflavon, tricetin, chemicky 5,7-dihydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavon, tricin, chemicky 5,7,4'-trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavon, amentoflavon, pinocembrin, chemicky 5,7-dihydroxyflavanon, narigenin, chemicky 5,7,4'-trihydroxyflavanon, biochanin A, genistein, daidzein, propolis nebo včelí pyl.

8. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako indol užije diindolylmethan.

9. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako flavonoid užije chrysin.
10. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako flavonoid užije včelí pyl.
11. Prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se připravuje způsobem podle nároku 8.
12. Prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se připravuje způsobem podle nároku 9.
13. Prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se připravuje způsobem podle nároku 10.
14. Prostředek podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je dále tvořen prostředkem podle nároku 12, extraktem urtica dioica a koncentrátem grapefruitové šťávy.
15. Prostředek podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje koncentrát fytoestrogenu, extrakt saw palmetto, extrakt zeleného čaje a koncentrát grapefruitové šťávy.
16. Prostředek podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je dále tvořen prostředkem podle nároku 12, extraktem saw palmetto, extraktem ze zeleného čaje, koncentrátem grapefruitové šťávy a extraktem urtica dioica.

17. Způsob snížení koncentrace estrogenů ve tkáních mužů, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se podává účinné množství prostředku podle nároku 14.

18. Způsob udržování koncentrace estrogenů a úpravy relativního množství metabolitů estrogenů u žen, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se podává účinné množství prostředku podle nároku 15.

19. Způsob úpravy relativního množství metabolitů estrogenů u žen, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se podává množství prostředku podle nároku 15, které účinně zvýší poměr 20H-estronu a 160H-estronu.

20. Způsob zvětšení svalové hmoty u člověka, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se podává účinné množství prostředku podle nároku 16.

21. Způsob snížení koncentrace estrogenů ve tkáních mužů, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se podává účinné množství grapefruitové šťávy nebo grapefruitového koncentrátu.

22. Způsob udržování koncentrace estrogenů a úpravy relativního množství metabolitů estrogenů u žen, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se podává účinné množství grapefruitové šťávy nebo grapefruitového koncentrátu.

23. Způsob úpravy relativního množství metabolitů estrogenu u žen, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se podává množství grapefruitové šťávy nebo

grapefruitového koncentrátu, které účinně zvýší poměr 20H-estronu ke 160H-estronu.

24. Způsob zvýšení množství svalové hmoty u člověka, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se podává účinné množství grapefruitové šťávy nebo grapefruitového koncentrátu.

Zastupuje:

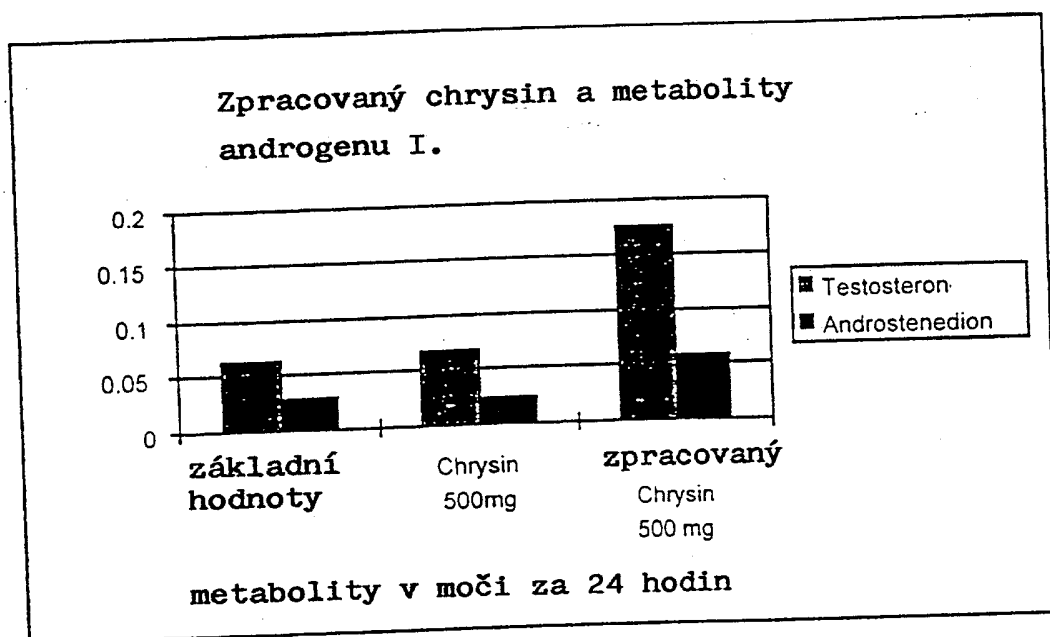


Fig. 1

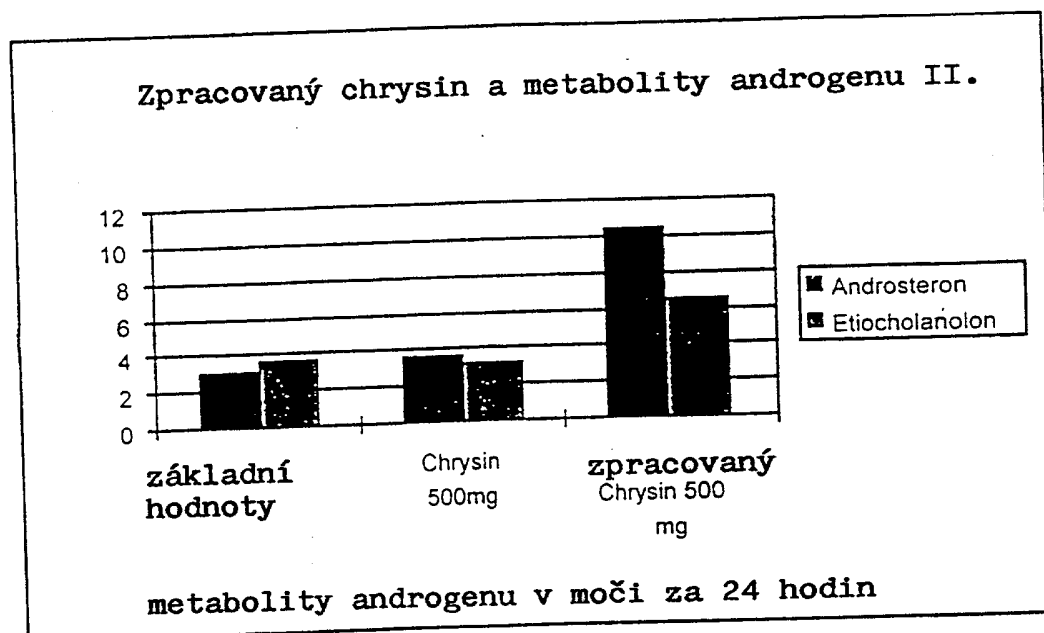


Fig. 2

21.08.01

3 / 10

PV 2000-3583

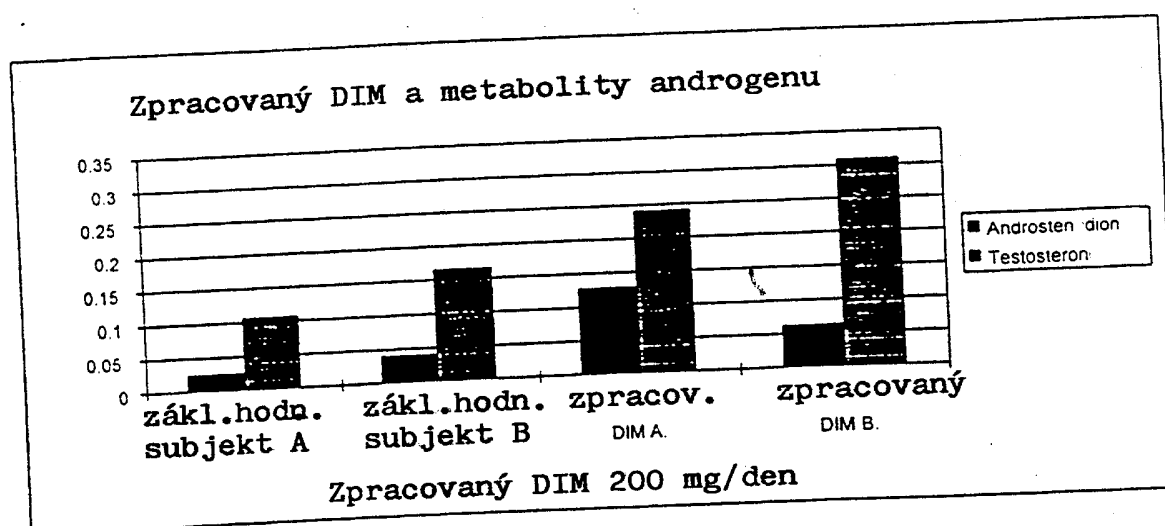


Fig. 3

21.08.01

4 /-10

PV 2000 - 3583

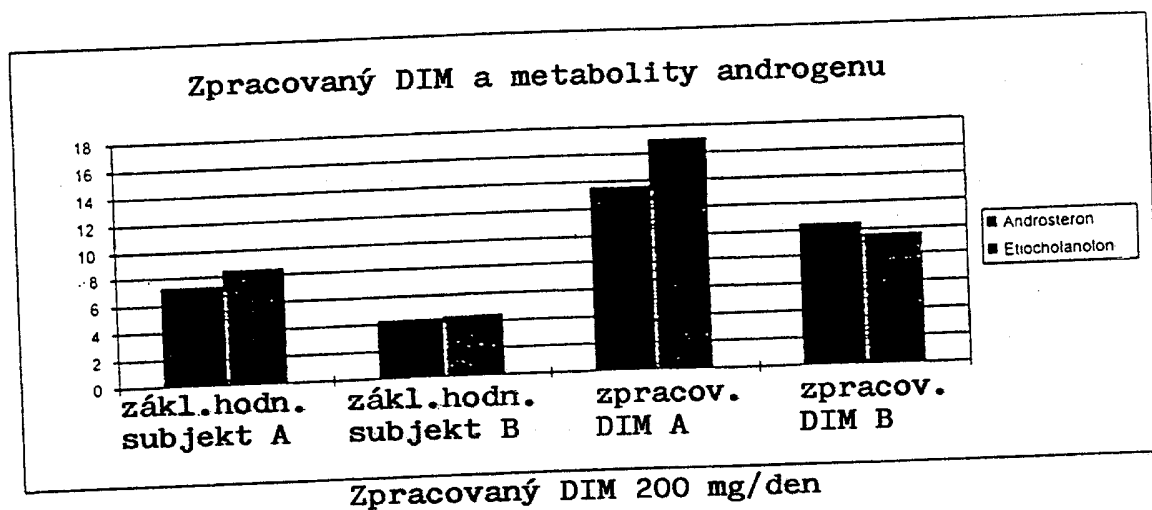


Fig. 4

21.08.01

5 / 10

PV 2000-3583

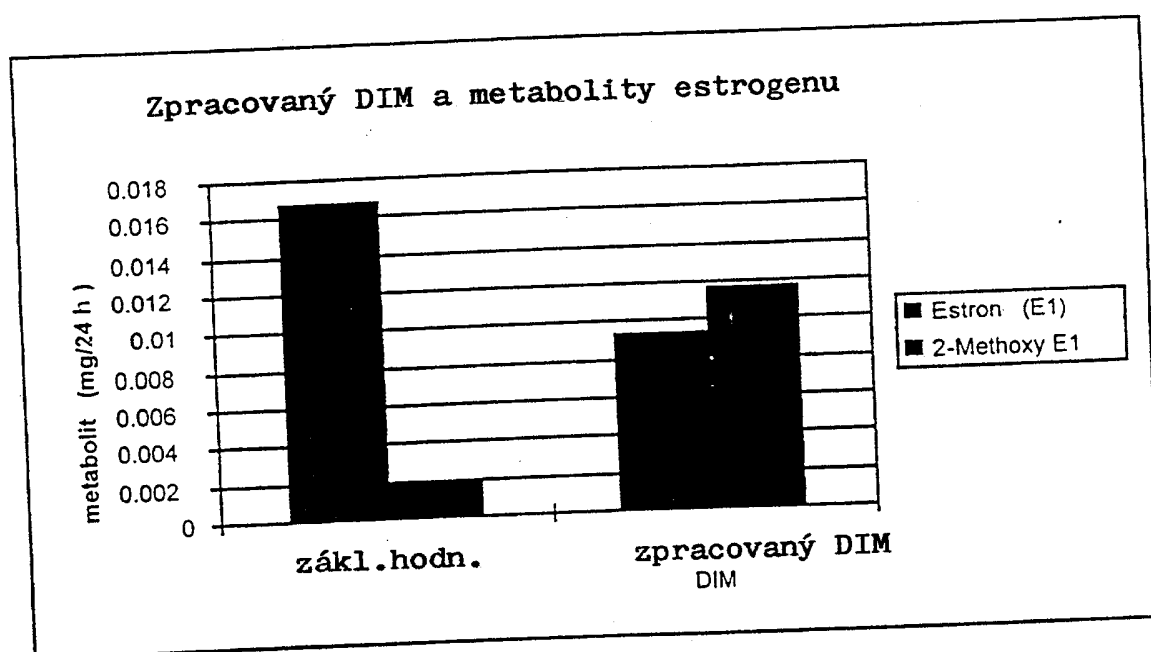


Fig. 5

21-05-01

6 / 10

PV 2000-3583

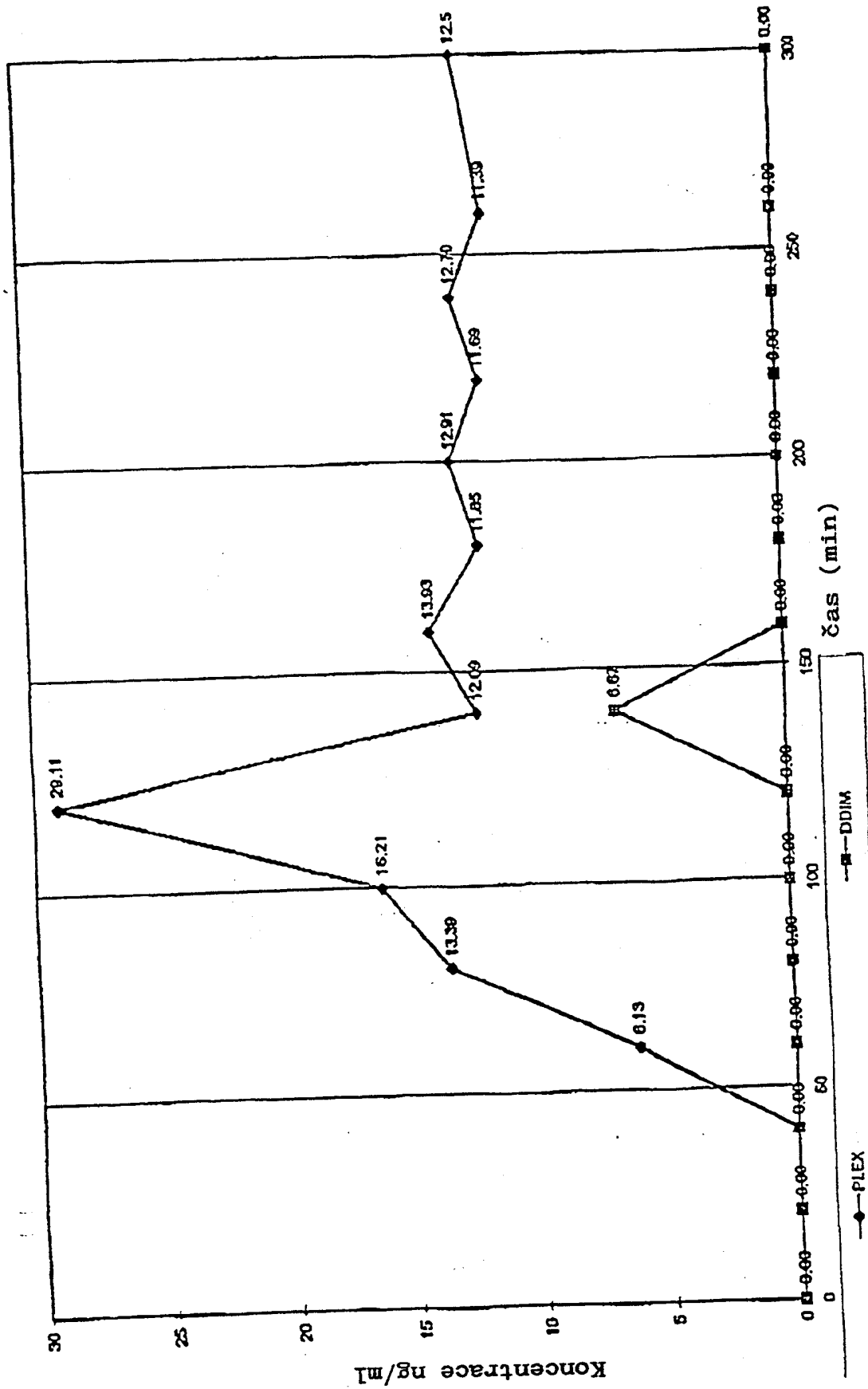


Fig. 6

21.08.01

7/10

PV 2000 - 3583

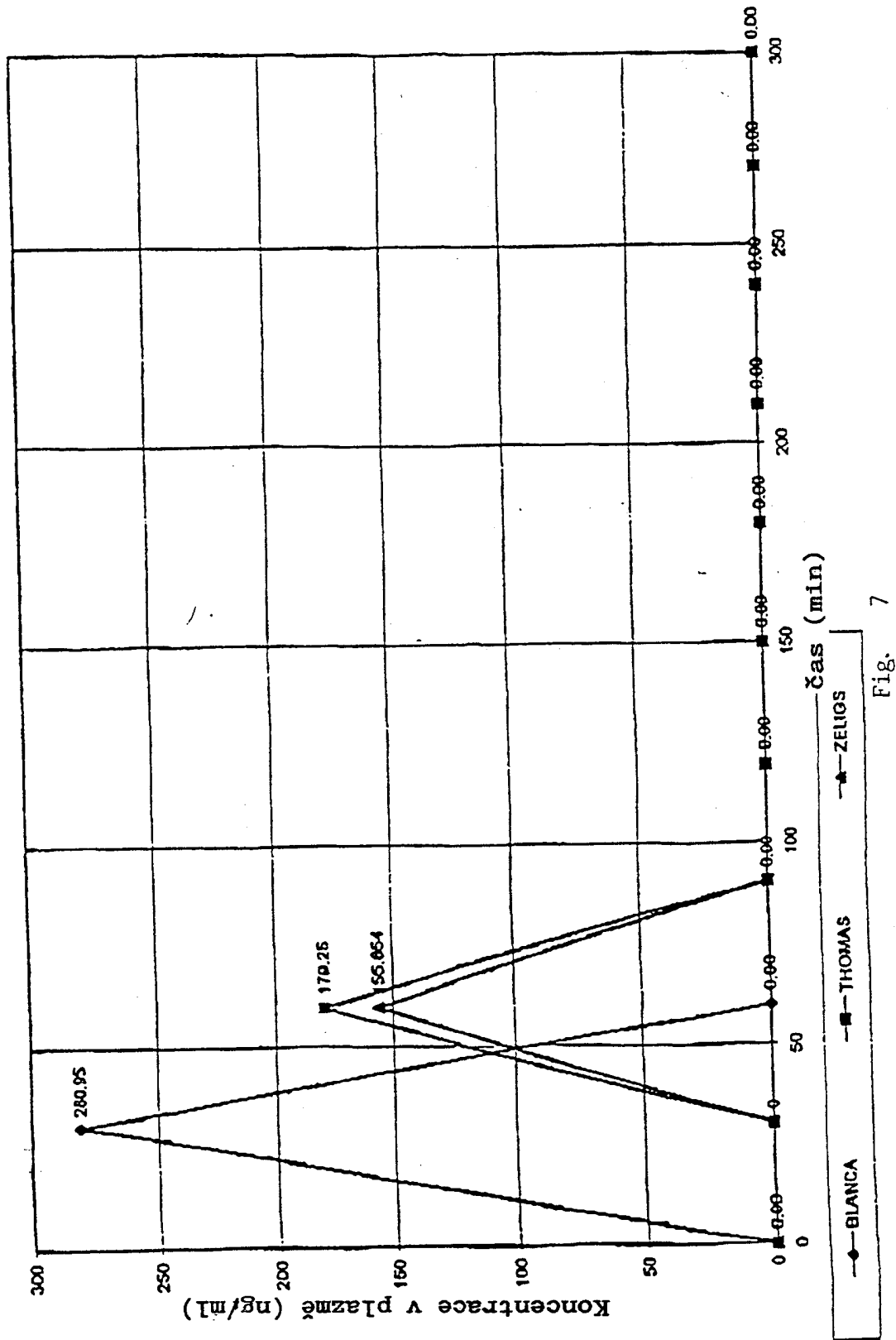


Fig. 7

21.08.01

PV 2000-3583

8/10

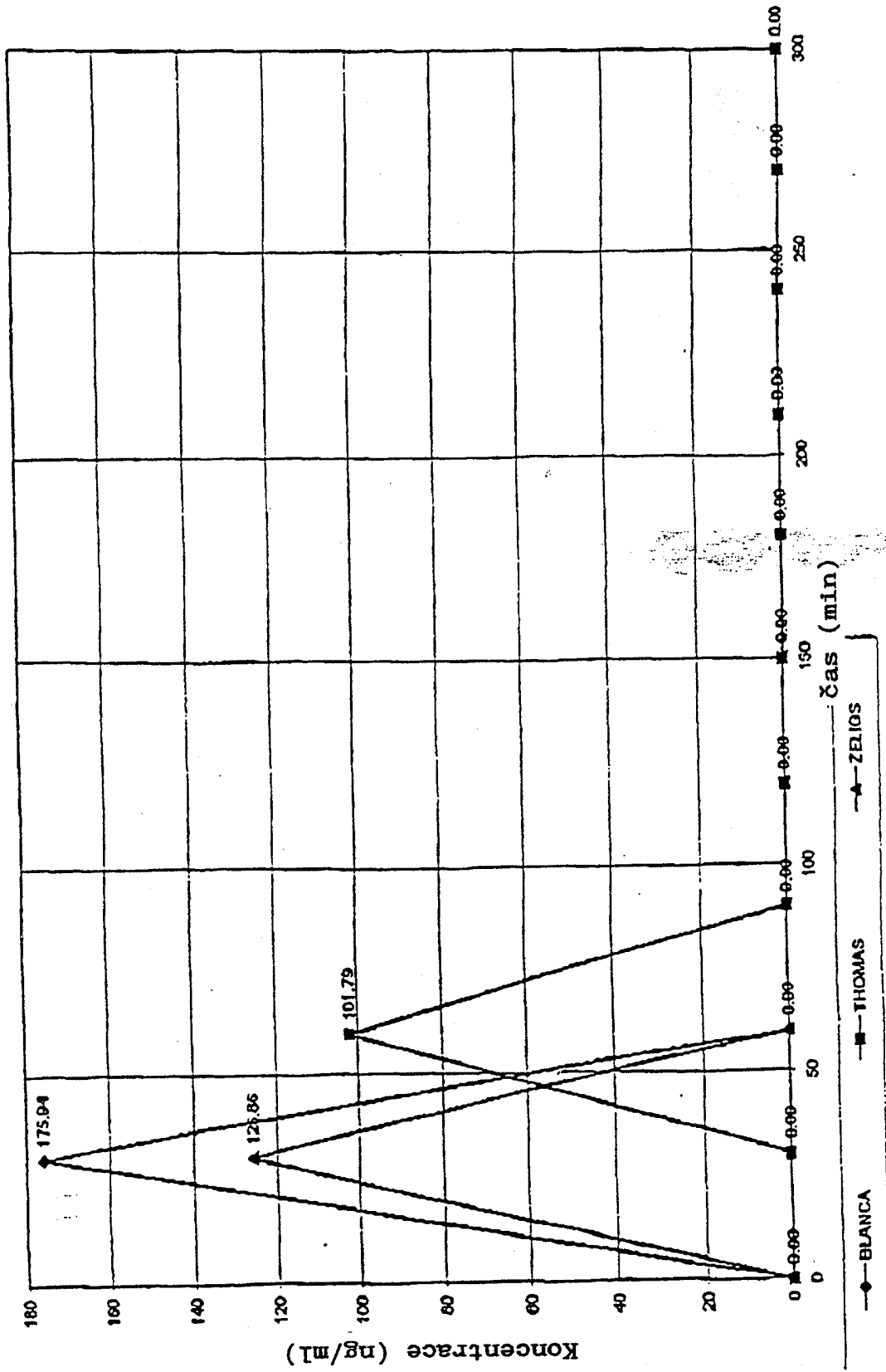


Fig. 8

21.08.01

9/10

PV 2000-3583

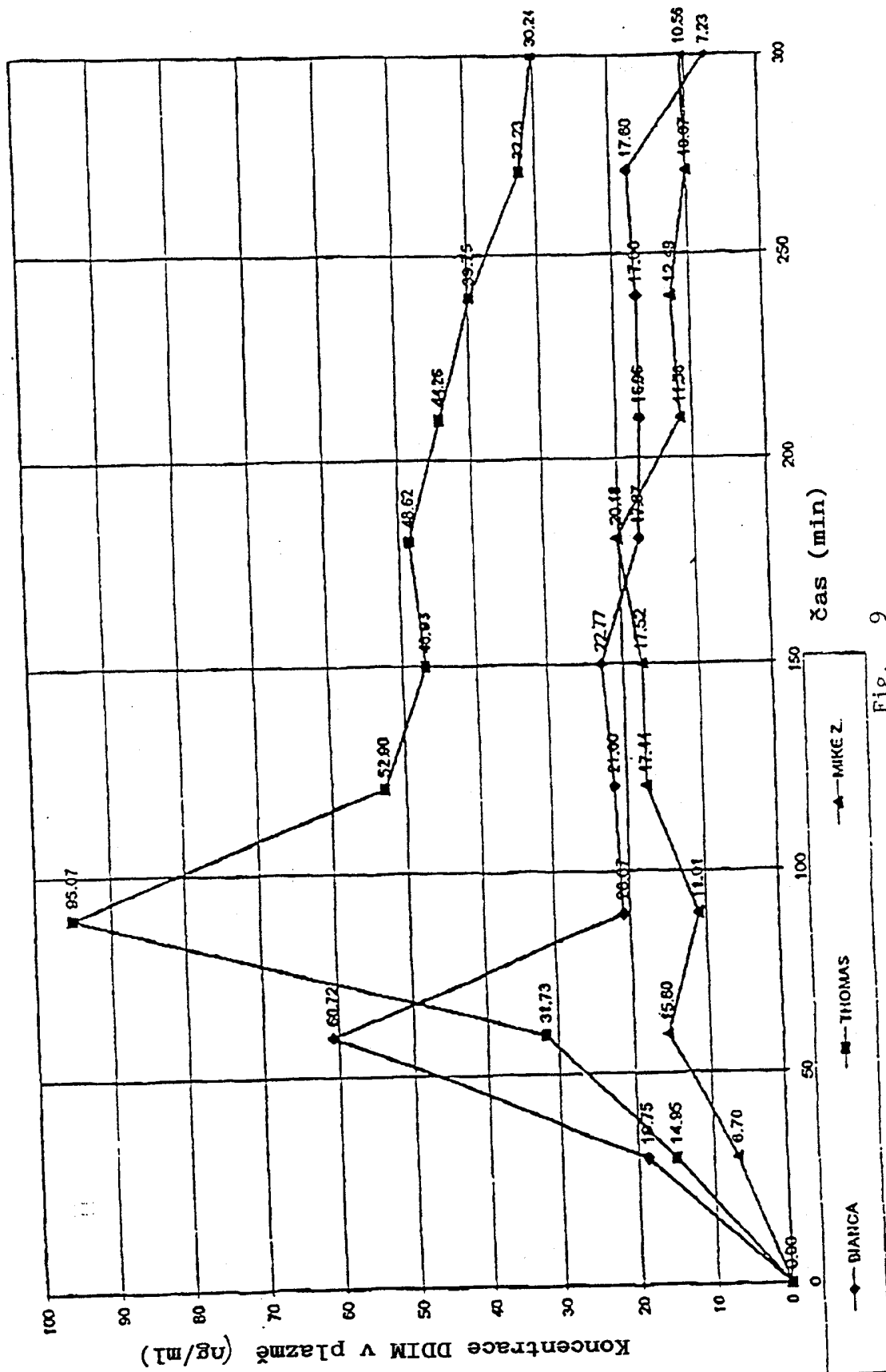


Fig. 9

21.08.01

10/10

PV 2000 - 3573

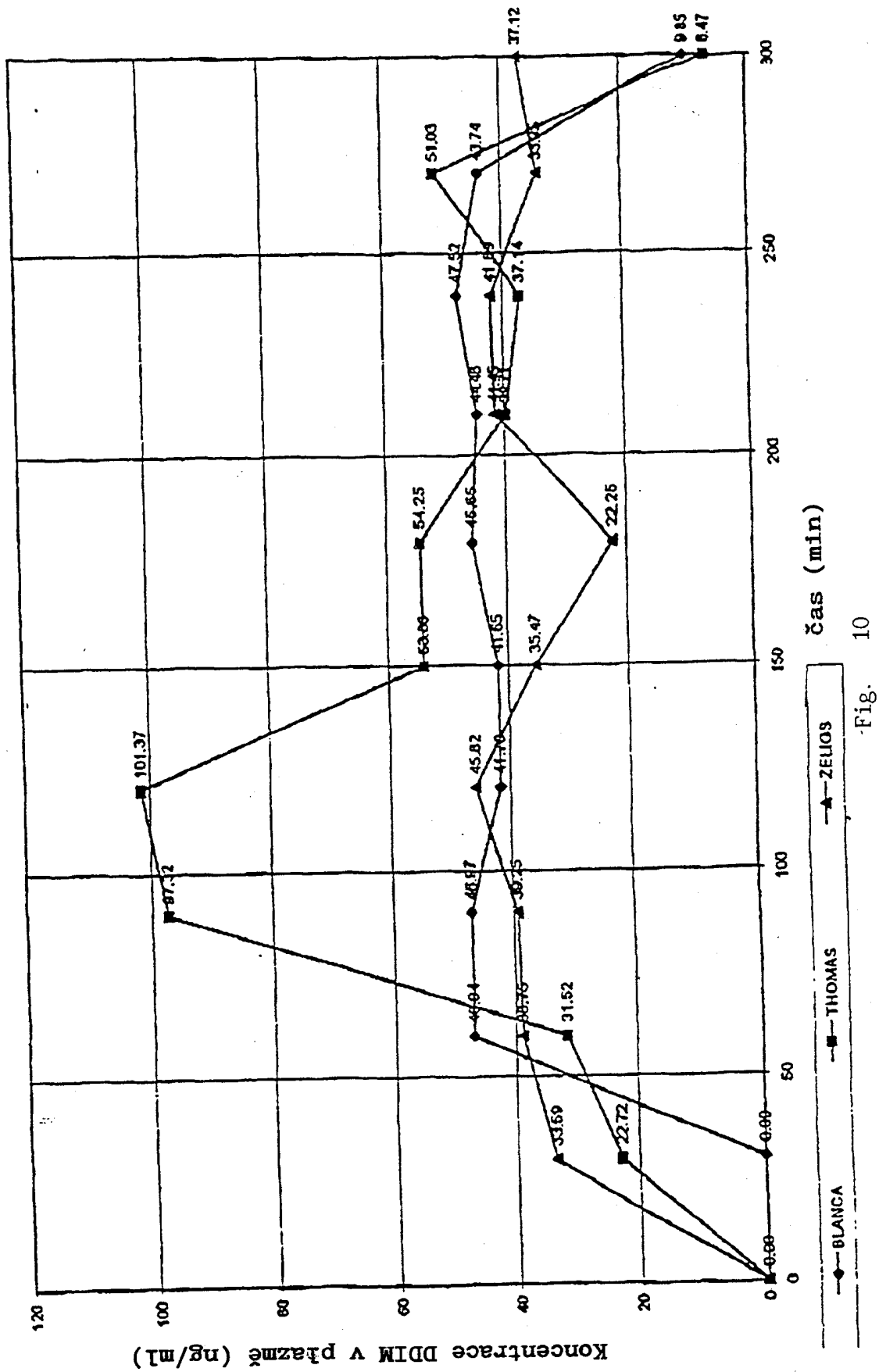


Fig. 10