

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА , ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОР О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (PCT)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(10) Номер международной публикации
W O 2009/139665 A 1

(43) Дата международной публикации
19 ноября 2009 (19.11.2009)

PCT

- (51) Международная патентная классификация :
A61K 36/15 (2006.01) **A61P 33/02** (2006.01)
п а) [RU/RU]; Комendantский пр-т, 32/1-342, Санкт -
Петербург , 197373, St.Petersburg (RU).
- (21) Номер международной заявки : **PCT/RU2009/0002 15** (74) Агент : САБУРОВА , Галина Петровна (**SABUROVA, Galina Petrovna**); а/я 71, Санкт -Петербург ,
194017, St.Petersburg (RU).
- (22) Дата международной подачи :
05 мая 2009 (05.05.2009)
- (25) Язык подачи : Русский (81) Указанные государства (если не указано иначе , для
каждого вида национальной охраны) : AE, AG, AL,
AM, A O, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ш , IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (26) Язык публикации : Русский (84) Указанные государства (если не указано иначе , для
каждого вида региональной охраны) : ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), европейский патент (AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) Данные о приоритете :
2008 119139 14 мая 2008 (14.05.2008) RU
- (71) Заявители и
(72) Изобретатели : РОЩИН , Виктор Иванович
(**ROSCHIN, Viktor Ivanovich**) [RU/RU]; пр-т
Непокоренных , 10/1-53, Санкт -Петербург , 197220,
St.Petersburg (RU). СУЛТАНОВ , Вагиф
Султанович (**SULTANOV, Vagif Sultano vich**)
[RU/RU]; ул. Латышских стрелков , 5/2-218, Санкт -
Петербург , 195213, St.Petersburg (RU).
- (72) Изобретатели ; и
(75) Изобретатели /Заявители (только для US):
ЖЕБРУН , Анатолий Борисович (**ZHEBRUN, Apa -
tolii Borisovich**) [RU/RU]; пер. Гривцова , 6-5, Санкт -
Петербург , 190000, St.Petersburg (RU). НИКИТИНА ,
Тамара Валентиновна (**NIKITINA, Tamara Valenti-
novna**) [RU/RU]; ул. Орбели , 25/5-25, Санкт -
Петербург , 194223, St.Petersburg (RU). КУЛЯШОВА ,
Лидия Борисовна (К ULIA SH OVA , **Lidija Borisovna**)
[RU/RU]; ул. Здоровцева , 33/1-107, Санкт -Петербург ,
198259, St.Petersburg (RU). БЕРЕЗИНА , Людмила
Александровна (**BEREZINA, Ludmila Aleksandrov-**
Опубликована :
— с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
— до истечения срока для изменения формулы
изобретения и с повторной публикацией в случае
получения изменений (правило 48.2(K))

(54) Title: MEDICINAL AGENT EXHIBITING ANTIPROTOZOAL ACTIVITY TO TRICHOMONAS VAGINALIS IN AN IN-VITRO MODEL SYSTEM

(54) Название изобретения : ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО , ОБЛАДАЮЩЕЕ ПРОТИВОПРОТОЗОЙНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ TRICHOMONAS VAGINALIS В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ IN VITRO

(57) Abstract: The invention relates to medicine and can be used for treating different forms of mycotic infections during the acute urogenital tract diseases as well as during persistent and latent infections. The aim of the invention is to develop a novel medicinal agent of plant origin for treating different forms of mycotic infections with a smallest side effect. The claimed medicinal agent of plant origin exhibits antiprotozoal activity to *Trichomonas vaginalis* in an in-vitro model system and is in the form of a conifer chlorophyll carotin paste. Said conifer chlorophyll carotin paste is characterised in that it exhibits trichomonocidal and trichomonostatic properties with a concentration equal to or greater than 100 mg/ml, inhibits *Trichomonas vaginalis* growth with a concentration of 300 mg/ml and kills *Trichomonas vaginalis* with a concentration of 500 mg/ml.

(57) Реферат: Изобретение относится к области медицины и может быть использовано для лечения различных форм трихомонадной инфекции , как при острых заболеваниях уrogenитального тракта , так и при хронических и скрытых формах инфекции . Задача, решаемая изобретением , заключается в создании нового лекарственного средства растительного происхождения для лечения различных форм трихомонадной инфекции с минимальным побочным эффектом . Выявлено лекарственное средство растительного происхождения , обладающее противопрозонойной активностью в отношении *Trichomonas vaginalis* в модельной системе in vitro, которое представляет собой хвойную хлорофилло - каротиновую пасту . XXXXI характеризуется тем, что при концентрации не менее - 100 мг/мл проявляет трихомонадоцидное и трихомонадостатическое свойства , при концентрации 300 мг/мл - подавляет рост *Trichomonas vaginalis*, а при концентрации 500 мг/мл приводит к гибели *Trichomonas vaginalis*.

WO 2009/139665 A1

Лекарственное средство , обладающее противопротозойной активностью в отношении *Trichomonas vaginalis* в модельной системе **in vitro**

Область техники

Изобретение относится к области медицины и может быть использовано для
5 лечения различных форм трихомонадной инфекции , как при острых заболеваниях уrogenитального тракта , так и при хронических и скрытых формах инфекции .

Уровень техники

Проблема уrogenитального трихомоноза в настоящее время является
10 чрезвычайно актуальной . По данным ВОЗ на рубеже XX и XXI веков , почти половину из выявленных в мире случаев инфекций , передаваемых половым путем , составлял трихомоноз (Grodstein F. Relation of tubal infertility to a history of sexually transmitted diseases / F.Grodstein, M.B.Goldman, D.W.Cramer // Am. J. Epidemiol. - 1993. - Vol.137. - P. 577-584; Vilkki M., Pukkala E., Nieminen P. et al. Gynecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia// Acta Oncol.-2000.-
15 vol.- P.71-75; Тихомиров А . Л. Уrogenитальный трихомоноз . / А.Л. Тихомиров , Ч.Г. Олейник // Тр. МГМСУ . - М., Б.и., 2003. - С. 1-7).

Трихомоноз занимает первое место по распространенности среди заболеваний мочеполового тракта и держит первенство среди заболеваний , передаваемых половым путем . Эта инфекция имеет большое медицинское и социально -
20 экономическое значение в связи с высокой инфицированностью людей , нередко хроническим течением с рецидивами , поражением различных органов и систем .

Мочеполовой трихомоноз передается при половом контакте от больного человека или носителя , иногда встречается и неполовой путь инфицирования :
25 детей от больных матерей при родах , контактный путь передачи через одноразовые перчатки при осмотре , подкладные пеленки , судна , ночные горшки , сиденья в туалетах , общие предметы личной гигиены и др. (Исаков В.А., Захаркив Ю .Ф ., Ермоленко Д.К. и др. Диагностика и лечение уrogenитального трихомоноза , Рекомендации для врачей , Санкт -Петербург , Великий Новгород , 2006, 49с).

Важное значение в эпидемическом процессе имеет наличие малосимптомных
30 форм и трихомонадоносительство , что способствует эпидемиологическому распространению возбудителя . Без лечения эти простейшие не покидают организм хозяина и способны вызывать всевозможные осложнения . Так , трихомоноз был диагностирован у 70-80 летних мужчин с последними половыми связями

- 2 -

тридцатилетней давности .

Известны лекарственные средства , использующиеся для лечения трихомональной инфекции , которые дают некоторое уменьшение симптоматики . К ним относятся акрихин , аминарсон , дихлордифенилтрихлорэтан , трихомицин и др.

5 Однако , эти препараты являются малоэффективными .

Для лечения женщин с урогенитальными заболеваниями использовали методы фитотерапии : экстракты и настойки , полученные из лука , чеснока , редьки , хрена , хвой ели , сосны , можжевельника .

В настоящее время для лечения мочеполювого трихомоноза широко
10 применяется метронидазол , синтезированный в 1959. Кроме того , широко используют комплексные методы лечения , что выражается в совместном применении пероральных и интравагинальных средств - клион -Д , гиналгин , тержинан , метрогил , патент RU 2320319 «Суппозит ории вагинальные » , 2006.11.07). Однако надежного метода лечения мочеполювого трихомоноза к настоящему
15 времени нет .

В последние годы лечение трихомоноза стало более сложным из-за появления штаммов , обладающих полирезистентностью к лекарственным препаратам . Обосновано положение о том , что хронический урогенитальный трихомоноз , протекающий как смешанная инвазия , служит показателем высокой вероятности
20 обнаружения лекарственно -устойчивых штаммов *T.vaginalis*.

Существующие в данное время общепринятые схемы лечения далеко не всегда дают должный эффект из-за того , что не учитывают индивидуальные особенности организма пациента : наличие сопутствующих заболеваний , изменения иммунной системы , а также особенности возбудителя (состояние его
25 биологической активности , резистентность к лекарственным веществам). Определение чувствительности *T. vaginalis* к антипротозойным препаратам позволяет существенно повысить эффективность лечения больных хроническим урогенитальным трихомонозом .

Известны и другие лекарственные средства , такие как мебедазол ,
30 бутоканозол , бензоизотиазолин (Видадь , Лекарственные препараты России , изд .б-е, 2000).

Новые лекарственные средства необходимы для создания укороченных , а также комплексных методик лечения мочеполювого трихомоноза на основе

- изучения фармакокинетики и определения чувствительности разных штаммов *T. vaginalis* к одной и той же дозе применяемого препарата . (8 Narcisi E.M . In vitro effect ofimidazole and furazolidone on metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* / E.M .Narcisi, W.E. Secor // Antimicrob. Agents Chemother. - 1996. - Vol.40. - P. 1121—
- 5 1125; Захаркив Ю .Ф. Зависимость эффективности этиотропной терапии больных трихомонозом от чувствительности штаммов возбудителя к антипротозойным препаратам ./Захаркив Ю .Ф., Позняк А.Л., Сидорчук С.Н., Гудков Р.В./ Материалы Российской научно -практической конференции «Узловые вопросы борьбы с инфекцией»), Санкт -Петербург, Военно -Медицинская Академия, 2004, с.192- 193).
- 10 Традиционная антипротозойная терапия, как правило, приводит к значительному улучшению состояния пациента и этиологическому излечению. Однако клиническое выздоровление не наступает у 64% больных вследствие формирования посттрихомонадного уретрита (ПТУ). При этом пациенты жалуются на неприятные ощущения при мочеиспускании, периодические слизисто -гнойные
- 15 выделения из уретры (Vilkki M., Pukkala E., Nieminen P. et al. Gynecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia// Acta Oncol.-vol.- P.71-75). Тщательное лабораторное обследование на трихомоноз дает отрицательные результаты, а дополнительная антипротозойная терапия успеха не имеет. Клинически посттрихомонадные уретриты протекают волнообразно или
- 20 принимают монотонное течение. При этом пациенты становятся раздражительными, нарушается сон, могут появиться расстройства половой функции. Чаще всего причиной ПТУ являются другие возбудители инфекций, передающиеся половым путем. Урогенитальные трихомонады представляют собой депо для выживания гонококков, грибов, хламидий, микоплазм, вирусов (Thomasop
- 25 J. L. *Trichomonas vaginalis* / JX. Thomason, S.M. Gelbet // Obstetrics and Gynecology. - 1989. -Vol.74. - P.536-541), ибо ферменты простейших не всегда могут уничтожить фагоцитированные ими микроорганизмы. Впоследствии эти патогены могут длительно поддерживать воспалительный процесс. Известно, что трихомонады препятствуют выявлению хламидий на клеточных культурах.
- 30 Воспаления микоплазменной и хламидийной этиологии клинически протекают с рецидивами, нередко с поражением придаточных половых желез. Развитию ПТУ способствует не только сопутствующая мочеполовому трихомонозу микрофлора, но и формирование L-форм микроорганизмов, а также снижение

- 4 -

иммунобиологической резистентности организма хозяина, в том числе местного иммунитета органов уrogenитального тракта.

В последнее время многие врачи стали сталкиваться с неэффективным лечением мочеполювого трихомоноза метронидазолом. Эти неудачи могут быть
5 связаны с низким содержанием цинка в крови (Debbia E.A. In vitro activity of metronidazole alone and in combination with clotrimazole against clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. / E.A. Debbia, U. Campora, S. Massaro et al. // J. Chemother. - 1996. Vol.8, N2. - P. 96-101; Tara Meri LT. Resistance of *Trichomonas vaginalis* to Metronidazole: Report of the First Three Cases from Finland and Optimization of In
10 Vitro Susceptibility Testing under Various Oxygen Concentrations / LT. Таги Meri, Sakari Jokiranta, I. Laihi Sihonen et al.// Journal of Clinical Microbiology. - 2000. - Vol.38. -N°2. - P.763-767), низкой абсорбцией препарата (Du Bouchet L. Multicenter comparison of clotrimazole vaginal tablets, oral metronidazole, and vaginal suppositories containing sulfanilamide, aminacrine hydrochloride, and allantoin in the treatment of
15 symptomatic trichomoniasis / L. Du Bouchet, M.R. Spence, M.F. Rein et al. //Sex. Transm. Dis. - 1997. - N3. - P. 156-60Honigberg B.M. Structure of *Trichomonas vaginalis* Донше / B.M. Honigberg, V.M. King // J. Parasitol. - 1964. - Vol. 50. - P. 345-364; Land K.M., Delgado-Corea M.G., Tachezy G. et al/. Targeted gene replacement of ferredoxin gene in *T. vaginalis* does resistance// Mol. Microbiol. - 2004. - vol.5L- P.115-
20 120), неэффективной доставкой препарата во влагалище или инактивацией препарата под воздействием флоры влагалища (Borchardt K.A. A comparison of the sensitivity of the In Pouch TV, Diamond's and Trichosel media for detection of *Trichomonas vaginalis*./ Borchardt K.A., Zhang M.Z., et al // J. Genitourin Med. - 1997. -Vol.1A - P. 297-298).

25 Другие исследователи считают, что причиной неэффективности терапии могут быть неоднократные неудачные попытки лечения (Narcisi E.M. In vitro effect of tinidazole and furazolidone on metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* / E.M. Narcisi, W.E. Secor // Antimicrob. Agents Chemother. - 1996. - Vol.40. - P. 1121-1125).

30 К решению этой проблемы подходят разными путями: повышение дозы метронидазола, сочетание различных противотрихомонадных средств, а так же применение этих средств в сочетании с неспецифической терапией (Narcisi E.M. In vitro effect of tinidazole and furazolidone on metronidazole-resistant *Trichomonas*

vaginalis / E.M. Narcisi, W.E. Secor // Antimicrob. Agents Chemother. - 1996. - Vol.40. - P. 1121-1125).

В настоящее время для лечения мочеполового трихомоноза наряду с метронидазолом применяют другие нитроимидазолы : тинидазол , орнидазол ,
5 секнидазол , ниморазол , карнидазол .

Тем не менее , наиболее близким препаратом сравнения выбрано лекарственное средство — метронидазол , который , как правило , всегда входит в качестве препарата лечения трихомоноза в индивидуальной или комплексной терапии .

10 Раскрытие изобретения

Задача , на решение которой направлено изобретение , заключается в создании нового лекарственного средства растительного происхождения для лечения различных форм трихомонадной инфекции с минимальным побочным эффектом .

Поставленная задача решена следующим образом . Выявлено лекарственное
15 средство растительного происхождения , обладающее противопрозонойной активностью в отношении *Trichomonas vaginalis* в модельной системе *in vitro*, которое представляет собой хвойную хлорофшшо -каротиновую пасту (ХХКП). ХХКП характеризуется тем , что при концентрации не менее - 100 мг/мл проявляет трихомонаддоцитное и трихомонадостатическое свойства , а при концентрации 300
20 мг/мл - подавляет рост *Trichomonas vaginalis*.

Авторами была изучена антипротозойная активность растительного средства - ХХКП на паразитического простейшего *Trichomonas vaginalis* в модельной системе *in vitro* и было исследовано действие этого лекарственного средства на различные формы *Trichomonas vaginalis*, выделенные от больных людей , в конечных
25 концентрациях 100, 200, 300 и 500 мг/мл.

Полученные результаты сравнивали с чувствительностью данных штаммов *Trichomonas vaginalis* к традиционному препарату - метронидазолу .

Растительное средство (препарат) представляет собой - пасту оливкового цвета с содержанием влаги 35-40%, обладает запахом хвои .

30 Паста входит в состав препарата , произведенного под названием «Биоэффektiv -А», в котором ХХКП (субстанция) заключена в капсулы .

В ХХКП входят производные хлорофилла , каротиноиды , витамины А, Е, К , фитостерины , полипренолы , сквален , натриевые соли жирных и смоляных кислот ,

- 6 -

природные антибиотики - фитонциды , эфирные масла и другие терпеноиды (лабдановые спирты , альдегиды и кислоты .

Возбудитель инфекции - паразитическое простейшее *Trichomonas vaginalis*, выделенное от больных культивировали на питательных средах *in vitro*.

- 5 Питательную среду объемом 4,5 мл помещали в стерильные пробирки и заливали слоем стерильного вазелинового масла толщиной 5 мм для создания анаэробных условий культивирования трихомонад . Посев производили стерильной пастеровской пипеткой путем помещения 0,5 —1,0 мл исследуемого материала на дно пробирок . Пробы инкубировали при температуре 37°C. Учет роста
- 10 производили через 48 и 96 часов после посева . При положительных результатах трихомонады дают придонный рост в виде плотного беловатого осадка , из которого пастеровской пипеткой берется материал для микроскопического исследования . Для приготовления препарата для микроскопии , на предметное стекло наносили каплю теплого изотонического раствора хлорида натрия или
- 15 раствора Рингера -Локка , с которой смешивали исследуемую пробу . Взвесь накрывали покровным стеклом и микроскопировали при увеличении объектива x40 и окуляра x15. Для анализа использовали микроскоп марки МИКМЕД-5. Количество клеток простейших подсчитывали в камере Горяева с пересчетом на 1 мл в соответствии с инструкцией к камере
- 20 Результаты исследований включают несколько этапов . Первый этап - выделение и отбор штаммов *T.vaginalis*. Всего было обследовано 150 человек с различными воспалительными заболеваниями уrogenитального тракта . Информация о пациентах представлена в таблице 1.

25

30

Таблица 1.

Демографические и клинические данные о пациентах, обследованных на наличие *T.vaginalis*

	Нозологическая форма	Всего обследовано больных	Возраст (лет)
5	Острые заболевания урогенитального тракта женщин	9 6%	19-23
	Острые заболевания урогенитального тракта мужчин	10 6,7%	17-26
10	Хронические заболевания урогенитального тракта женщин	32 21,3%	20-35
	Хронические заболевания урогенитального тракта мужчин	37 24,7%	20-45
15	Бесплодие (женщины)	29 19,3%	28-35
	Бесплодие (мужчины)	33 22,0%	26-42
	ВСЕГО	150 100%	17-45

20 Затем были выделены штаммы для изучения противопротозойной активности препарата ХХКП на паразитического простейшего *Trichomonas vaginalis* в модельной системе *in vitro*.

25 При изучении выделенного штамма особое внимание было обращено на размеры и форму трихомонад, характер их движения, внутреннее содержимое клеток. В типичных случаях трихомонады обнаруживали в виде подвижных образований грушевидной, реже овальной формы размером в среднем от 13 до 17 мкм. Характер их движений толчкообразный. Иногда было заметно движение свободных жгутиков под микроскопом. Ядра трихомонад при изучении неокрашенного препарата плохо различимы. Цитоплазма трихомонад обычно была 30 зернистой, вакуолизированной.

Затем было произведено определение чувствительности *Trichomonas vaginalis* к лекарственному препарату метронидазолу *in vitro* с использованием в качестве критерия иммобилизацию трихомонад. При использовании данного критерия

- 8 -

оценки чувствительности, тестируемые штаммы *T.vaginalis* должны содержать не менее 90% подвижных клеток. Согласно этому методу, чувствительность штаммов *T.vaginalis* к метронидазолу определялась с помощью метода серийных разведений препарата в питательной среде. Среда заливается по 4,0 мл в стерильные пробирки, 5 затем в них вносили 0,5 мл раствора, содержащего разные концентрации метронидазола: от 0,25 мкг/мл до 1000 мкг/мл (1 мг/мл).

После этого в пробирки вносили 0,5 мл культуры возбудителя с заранее определенной концентрацией возбудителя (к.л./мл). Контролем служила среда без препарата. Затем для создания анаэробных условий, необходимых для 10 культивирования *T. vaginalis*, на поверхность среды наносили вазелиновое масло (толщина слоя - 0,5 мм). Пробирки с исследуемым материалом инкубировали в термостате при $t = 37^{\circ}\text{C}$. Учет результатов производили через 48 и 96 часов после посева.

Чувствительность трихомонад к метронидазолу оценивали путем определения 15 минимальной ингибирующей концентрации (МИК), вызывающей иммобилизацию всех клеток *T. vaginalis*. К лекарственно-устойчивым относили штаммы, у которых иммобилизация обнаруживается при концентрациях метронидазола, превышающих 15 мкг/мл.

При наличии атипичных, амастиготных форм *Trichomonas vaginalis*, 20 описанный метод применить невозможно. Поэтому использовали известный метод определения чувствительности к антипротозойным препаратам *in vitro*, выбирая в качестве критерия лизис трихомонад при терапевтически эффективной концентрации лекарственного вещества. Воздействие препарата считается оптимальным при лизисе всех клеток трихомонад, контроль - суспензия 25 возбудителя в питательной среде без метронидазола. При проведении исследований были выбраны концентрации метронидазола 10, 15, 25 и 50 мкг/мл. Устойчивыми к метронидазолу считали штаммы, лизирующиеся при концентрации препарата более 25 мкг/мл.

Для определения чувствительности клинических штаммов *Trichomonas* 30 *vaginalis* к действию ХХКП использовали метод культивирования на среде СВТ. При этом в среду вносили ХХКП в виде водного раствора таким образом, чтобы конечная концентрация соответствовала 100 мг/мл, 200 мг/мл, 300 мг/мл и 500 мг/мл. Контрольная проба содержала только взвесь культуры трихомонад в

питательной среде .

У обследованных 150 человек , (80 мужчин и 70 женщин в возрасте от 17 до 45 лет с различными заболеваниями урогенитального тракта) (смотри таблицу 1) было выделено 30 штаммов *Trichomonas vaginalis*. Частота выделения трихомонад у 5 обследованных пациентов , представлена в таблице 2.

Таблица 2.

Частота выделения *Trichomonas vaginalis* при различных заболеваниях репродуктивной сферы

10	Нозологическая форма	Всего обследовано	кол-во выделенных штаммов	частота выделения (%)
	Острые заболевания урогенитального тракта женщин	9	2	22,2 %
15	Острые заболевания урогенитального тракта мужчин	10	2	20 %
	Хронические заболевания урогенитального тракта женщин	32	5	15,6 %
20	Хронические заболевания урогенитального тракта мужчин	37	9	24,3 %
	Бесплодие, (женщины)	29	4	13,7%
25	Бесплодие (мужчины)	33	8	24,2 %
30	ВСЕГО	150	30	20%

Из 30 выделенных штаммов *Trichomonas vaginalis* для дальнейшей работы были выбраны 3 активно подвижных и 7 амастиготных вариантов .

- 10 -

Критериями отбора явилась концентрация возбудителя не менее 10^4 кл/мл и способность размножаться на искусственных питательных средах .

Характеристика штаммов трихомонад и краткое описание клинических и анамнестических данных пациентов - хозяев этих простейших , представлены в 5 таблице 3.

Как видно из таблицы , все активно подвижные штаммы выявлены при первичной инфекции . Люди , от которых были выделены амастиготные формы , имеют различный стаж болезни и , как правило , лечились антипротозойными препаратами .

10

15

20

25

30

Таблица 3.

Демографические и клинические данные о пациентах и характеристика штаммов *T. vaginalis*, участвующих в изучении противотрихомонадной активности препарата ХХКП *in vitro*

№ штамма	Пол	Возраст	Диагноз	Данные анамнеза	Характеристика штамма
1	Ж	19	острый вульвовагинит	Больная Б. - первичное обращение к врачу, болеет впервые, не лечилась	активно подвижные 5·10 ⁴ кл/мл
2	Ж	20	острый кольпит	Больная К. - первичное обращение к врачу болеет впервые, не лечилась	активно подвижные 3·10 ⁴ кл/мл
3	М	17	острый уретрит	Больной П. - болеет впервые, не лечился	активно подвижные 10 ⁴ кл/мл
4	Ж	24	хронический кольпит	Больная С.- многократное обращение к врачу. Болеет 2 года, <i>T. vaginalis</i> выделены впервые. Лечение метронидазолом проведено при первичном обращении как превентивное, после чего явления острого воспаления были сняты. Рецидив – через 5 месяцев. В анамнезе 4 курса антибиотикотерапии без положительной динамики	амастиготные 10 ⁴ кл/мл
5	Ж	41	хронический кольпит, хронический аднексит	Больная К. - многократное обращение к врачу. Острый трихомоноз в анамнезе 7 лет назад. Лечилась различными препаратами, в том числе метронидазолом.	амастиготные 10 ⁴ кл/мл

Таблица 3. (продолжение)

№ штамма	Пол	Возраст	Диагноз	Данные анамнеза	Характеристика штамма
6	Ж	28	хронический кольпит, вторичное бесплодие	Больная Е. - первичное обращение к врачу (больной себя не считает). Обследовалась по контакту и в связи с бесплодием. <i>T. vaginalis</i> выделены впервые. У полового партнера хронический трихомоноз выявлен 2,5 года назад, прошла курс превентивного лечения метронидазолом.	амастиготные 3 · 10 ⁴ кл/мл
7	М	22	хронический простатит	Больной М. - первичное обследование. После случайной связи появились выделения, к врачу не обращался – лечился сам метронидазолом согласно аннотации к препарату, после чего острые явления ушли, но через 2 месяца появились периодические тянущие боли внизу живота. Считает себя больным 8 месяцев.	амастиготные 10 ⁴ кл/мл
8	М	38	хронический простатит	Больной Р. - многократное обращение к врачу. Острый трихомоноз в анамнезе был поставлен 14 лет назад. Лечился в КВД. Первый рецидив – через 8 месяцев после лечения. Повторный курс антипротозойной терапии, название препаратов не помнит. После повторного курса субъективно улучшения не было, поэтому лечился сам, принимая обезболивающие препараты при ухудшении здоровья. Постоянные тянущие боли в течение последних 6 месяцев вынудили обратиться к урологу.	амастиготные 5 · 10 ⁴ кл/мл

Таблица 3. (продолжение)

№ штамма	Пол	Возраст	Диагноз	Данные анамнеза	Характеристика штамма
9	М	31	хронический простатит, бесплодие: выраженная олигоспермия, астеноспермия	Больной И. - первичное обследование, возбудитель выявляется впервые. Диагноз простатита поставлен 5 лет назад. 2 раза лечился от хламидийной и уреоплазменной инфекций, которые рецидивировали через 8-10 месяцев после антибиотикотерапии. Метронидазол входил в курс лечения хламидиоза.	амастиготные 10 ⁴ кл/мл
10	М	30	хронический простатит, бесплодие: умеренно выраженная астеноспермия	Больной П. - многократное обращение к врачу. Острый трихомоноз в анамнезе 12 лет назад. Где и как лечился не помнит. Чувствовал себя хорошо, но периодически появлялись быстро проходящие тянущие боли в области малого таза, связанные с приемом алкоголя, стрессами, переутомлением, на фоне простудных заболеваний. Обследуется в связи с бесплодием.	амастиготные 10 ⁴ кл/мл

- 14 -

Далее проводилось определение чувствительности клинических штаммов *Trichomonas vaginalis* к ХХКП и метронидазолу. Десять штаммов трихомонад, отобранных в соответствии с необходимыми для получения достоверных результатов параметрами: достаточным количеством и способностью размножаться на питательной среде СТВ, рассеяли в пробирки, содержащие определенное количество метронидазола или ХХКП в соответствии с методикой, описанной выше. Каждый опыт был повторен 3 раза. Для каждого штамма был поставлен контроль — питательная среда СВТ.

Полученные результаты представлены в таблице 4.

10

15

20

25

30

Таблица 4

Действие фармакологического препарата ХХКП на клинические штаммы
Trichomonas vaginalis

№ штамма	Контроль (количество трихомонад кл/мл)	«Биоэффектив А» (количество трихомонад кл/мл)				метронидазол (МИК мкг/мл)
		100 мг/мл	200 мг/мл	300 мг/мл	500 мг/мл	
5	активно подвижные $5 \cdot 10^4$ кл/мл	слабо подвижные 10^2	0	0	0	15
10	активно подвижные $3 \cdot 10^4$ кл/мл	0	0	0	0	15
15	активно подвижные 10^4 кл/мл	слабо подвижные $<10^2$	0	0	0	25
	амастиготные 10^4 кл/мл	амастиготные 10^2	амастиготные $<10^2$	0	0	50
20	амастиготные 10^4 кл/мл	амастиготные $<10^2$	0	0	0	25
	амастиготные $3 \cdot 10^4$ кл/мл	0	0	0	0	50
	амастиготные 10^4 кл/мл	амастиготные $<10^2$	амастиготные $<10^2$	0	0	25
25	амастиготные $5 \cdot 10^4$ кл/мл	0	0	0	0	25
	амастиготные 10^4 кл/мл	амастиготные 10^3	амастиготные $<10^2$	0	0	>50
30	амастиготные 10^4 кл/мл	амастиготные $5 \cdot 10^2$	амастиготные $<10^2$	<10	0	50

Обозначения : 0- отсутствие трихомонад в среде.

Как видно из таблицы, штаммы №№ 4, 6, 9 и 10 характеризовались устойчивостью к метронидазолу : МИК превышала 25 мкг /мл.

- 16 -

Препарат ХХКП в концентрации 100 мг/мл полностью лизировал трихомонады в трех случаях (NUNS 2, 6, 8), в остальных пробах количество простейших существенно снижалось по сравнению с контролем .

В пробах , содержащих ХХКП в концентрации 200 мг/мл трихомонады
5 отсутствовали в №№ 1- 6 и N°8. Количество клеток возбудителя в штаммах №№ 7,9, и 10 было существенно меньше , чем в контроле .

Концентрация испытуемого препарата ХХКП 300 мг/мл разрушала клетки трихомонад штаммов №№ 1 - 9. В пробе , содержащей штамм N°10 обнаруживали единичные клетки *Trichomonas vaginalis*.

10 Внесение в питательную среду препарата ХХКП в конечной концентрации 500 мг/мл приводило к гибели простейших во всех десяти пробах .

Результаты исследований показали , что испытуемый препарат ХХКП , обладает антипротозойной активностью в отношении всех 10 испытанных штаммов *Trichomonas vaginalis*. При этом минимальная концентрация 100 мг/мл в 3
15 случаях (30%) оказывала трихомонад оцидное , а в 70% случаев - трихомонадостатическое действие . Концентрация 200 мг/мл разрушала возбудитель в 7 пробах (70%) и снижала его количество в 3 случаях.(30%). Внесение ХХКП в концентрации 300 мг/мл разрушало 9 штаммов (90%). Больше содержание лекарственного препарата коррелировало с полным отсутствием
20 возбудителя во всех пробах . Препарат ХХКП оказывал разрушающее действие и на активно подвижные , и на безжгутиковые формы трихомонад . Корреляции между чувствительностью к метронидазолу и чувствительностью к испытуемому лекарственному препарату ХХКП не установлено . Из 10 штаммов трихомонад , метранидазол действовал только на 2 штамма активно -подвижных трихомонад в
25 концентрации 15 мкг /мл, остальные штаммы были устойчивы к метронидазолу .

Следует отметить , увеличение концентрации препарата ХХКП в ростовой среде соответственно снижало количество питательных веществ , необходимых для трихомонад . В контрольных пробах штаммов NsNo 4,5,8,9 отмечали обильный рост сопутствующей бактериальной флоры . В образцах этих же культур , содержащих
30 препарат ХХКП в концентрации 300 мг/мл и выше роста микробной флоры не наблюдали .

Полученные результаты , показали наличие противотрихомонадной активности у препарата ХХКП в концентрации 200 мг/мл. Зависимости от формы

- 17 -

Trichomonas vaginalis, наличия предыдущих курсов лечения, отношения к действию метронидазола не выявлено. Кроме того, было выявлено антибактериальное действие ХХКП на сопутствующую флору у пациентов с дисбактериозами урогенитального тракта, которые возникли после предыдущих курсов антибиотикотерапии. Эффективная концентрация для четырех наблюдаемых проб была не менее 300 мг/мл. Клинические и литературные данные свидетельствуют, что большая часть заболеваний, обусловленных *Trichomonas vaginalis* носит хронический характер, плохо лечатся существующими на сегодняшний день лекарственными препаратами - метронидазолом и производными 5-нитроимидазола пролонгированного типа действия (тинидазол, ниморазол, орнидазол, секнидазол), а также производными 4-аминохинолина (хлорохин) и нитрофурана. Кроме того, использование в терапии заболеваний урогенитального тракта антибиотиков широкого спектра действия, приводит к формированию различных нарушений в микробиоценозе урогенитального тракта. Это состояние ухудшает работу местного неспецифического иммунитета и является причиной жалоб на зуд, жжение, раздражение, выделения с неприятным запахом. Подобные состояния трудно поддаются терапии, поэтому установленное в данной работе бактерицидное действие исследуемого лекарственного средства растительного происхождения поможет предотвратить формирование дисбактериозов.

Проведенные исследования показали перспективность использования ХХКП для лечения различных форм трихомонадной инфекции:

1. Препарат ХХКП обладает антипротозойной активностью в отношении всех 10 испытанных штаммов *Trichomonas vaginalis*, выделенных от больных с острыми и хроническими заболеваниями урогенитального тракта;

2. В зависимости от концентрации препарата, он проявляет трихомонадоцидное или трихомонадостатическое действие. При минимальной концентрации 100 мг/мл, препарат ХХКП в 30% случаях оказывал трихомонадоцидное действие, а в 70% - трихомонадостатическое. При концентрации 300 мг/мл в 90% случаях препарат подавлял рост *Trichomonas vaginalis*;

3. Препарат ХХКП оказывает разрушающее действие и на активно подвижные и на безжгутиковые формы трихомонад;

- 18 -

4. Установлено антибактериальное действие ХХКП на сопутствующую флору у пациентов с дисбактериозами, которые возникли после предыдущих курсов антибиотикотерапии, что позволяет говорить об эффективности препарата при терапии сопутствующих трихомонозу заболеваний, таких как дисбактериоз для

5 коррекции микробиоценоза урогенитального тракта.

Примеры предпочтительного выполнения изобретения

Ниже приведены примеры эмульсии лекарственного средства.

Пример 1.

ХХКП - 10,0 г

10 Бидистиллированная вода - остальное до 100г.

Пример 2.

ХХКП - 30,0 г

Бидистиллированная вода —остальное до 100г.

Пример 3.

15 ХХКП - 50,0 г

Бидистиллированная вода - остальное до 100г.

Для приготовления эмульсий (примеры 1-3) в аппарат с перемешивающим устройством загружают расчетное количество ХХКП, включают нагрев и разогревают пасту при перемешивании до температуры +50⁰С и затем подают

20 расчетное количество бидистиллированной воды. По достижении однородной массы нагрев выключают, полученную эмульсию разливают в стеклянные фasonsы.

Промышленная применимость

Полученные результаты исследования показали перспективность использования препарата ХХКП для лечения различных форм трихомонадной

25 инфекции, как при острых заболеваниях урогенитального тракта, так и при хронических и скрытых формах инфекции. Включение растительного препарата ХХКП с антибактериальными свойствами в антипротозойную терапию позволит ускорить процесс лечения больных, добиться не только подавление роста *Trichomonas vaginalis*, но и подавление роста сопутствующей патогенной

30 микрофлоры при урогенитальных инфекциях, в частности при дисбактериозе.

- 19 -

Формула изобретения

Лекарственное средство, обладающее противопротозойной активностью в отношении *Trichomonas vaginalis* в модельной системе *in vitro*, представляющее собой хвойную хлорофилло-каротиновую пасту и характеризующееся тем, что при 5 концентрации не менее - 100 мг/мл проявляет трихомонадоцитное и трихомонадостатическое свойства, при концентрации 300 мг/мл - подавляет рост *Trichomonas vaginalis*, а при концентрации 500 мг/мл приводит к гибели *Trichomonas vaginalis*.

10

15

20

25

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT /RU 2009/0021 5

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61 K 36/15 (2006.01); A61 P 33/02 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61 K 36/15, A61 P 33/02 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PAJ, Esp@se net, PCT Online, USPTO, CIPO (Canada PO), SIPO DB		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	RU 2208950 C2 (NEKRASOVA VALERIYA BORISOVNA) 27.07.2003, the description, p. 3, col. 1, lines 19-60, col.2, lines 23-32	1
X	Khlorofillo-karotinovaya pasta (khvoynaya), 2004, p. 1 [found 07.09.2009]. Found from Internet < URL: http://www.sumtech.ru/bank/medicine/archive/pasta.htm	1
A	RU 2272626 C1 (OTKRYTOE AKTSIONERNOE OBSHCHESTVO "SCHELKOVSKY VITAMINNY ZAVOD") 27.03.2006	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 September 2009 (07.09.2009)		Date of mailing of the international search report 08 October 2009 (08.10.2009)
Name and mailing address of the ISA/ RU		Authorized officer
Facsimile No		Telephone No

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT /RU 2009/000215

A . КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ :		A61K 36/15 (2006.01) A61P 33/02 (2006.01)
Согласно Международной патентной классификации МПК		
B . ОБЛАСТИ ПОИСКА :		
Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации):		
A 61K 36/15, A61P 33/02		
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки :		
Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины): PAJ, Esp@cenet, PCT Online, USPTO, CIPO (Canada PO), SIPO DB		
C . ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ :		
Категория *	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	RU 2208950 C2 (НЕКРАСОВА ВАЛЕРИЯ БОРИСОВНА) 27.07.2003, описание, стр. 3, кол. 1, строки 19-60, кол. 2, строки 23-32	1
X	Хлорофилло -каротиновая паста (хвойная), 2004, с.1 [найдено 07.09.2009]. Найдено из Интернет : < URL: http:// www.sumtech.ru/bank/medicine/archive/pasta.htm	1
A	RU 2272626 C1 (ОТКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "ЩЕЛКОВСКИЙ ВИТАМИННЫЙ ЗАВОД ") 27.03.2006	1
последующие документы указаны в продолжении графы C. <input type="checkbox"/> Данные о патентах-аналогах указаны в приложении		
* Особые категории ссылочных документов :		
A	документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	T более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение
E5	более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	X документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности
L	документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	Y документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста
C)	документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию в т.д.	& документ, являющийся патентом-аналогом
P	документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	
Дата действительного завершения международного поиска : 07 сентября 2009 (07.09.2009)		Дата отправки настоящего отчета о международном поиске : 08 октября 2009 (08.10.2009)
Наименование и адрес ISA/RU ФГУ ФИПС РФ Д 23995, Москва, Г-59, Г СП-5, Бережковская наб., 30,1 Ф акс:(499) 243-3337		Уполномоченное лицо : Е.Курильченко Телефон JVs (495) 730-7675