

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190589** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.05.26

(22) Дата подачи заявки
2019.10.28

(51) Int. Cl. *A61K 9/02* (2006.01)
A61K 31/405 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **СПОСОБ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ДИСПЛАЗИИ ШЕЙКИ МАТКИ,
АССОЦИИРОВАННОЙ С ВИРУСАМИ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА**

(31) 2019100638

(32) 2019.01.14

(33) RU

(86) PCT/RU2019/000769

(87) WO 2020/149766 2020.07.23

(71)(72) Заявитель и изобретатель:

**КИСЕЛЁВ ВСЕВОЛОД ИВАНОВИЧ
(RU)**

(74) Представитель:

Пилишкина Л.С. (RU)

(57) Изобретение относится к области медицины, а именно касается терапии дисплазий шейки матки, индуцированных вирусами папилломы человека. Разработана новая эффективная схема лечения цервикальных дисплазий, основанная на современном понимании ВПЧ-индуцированного канцерогенеза и включающая системную иммунотерапию и местное лекарственное воздействие на очаги, пораженные вирусом папилломы человека (ВПЧ). Способ терапии дисплазии шейки матки, ассоциированной с ВПЧ, заключается в том, что осуществляют местное лечение пациентки с помощью лекарственного средства, содержащего дииндолилметан, и перед началом местного лечения осуществляют однократное введение пациентке вакцины против вируса папилломы человека. В качестве лекарственного средства, содержащего дииндолилметан, используют вагинальные суппозитории.

A1

202190589

202190589

A1

Способ комбинированной терапии дисплазии шейки матки, ассоциированной с вирусами папилломы человека

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Изобретение относится к области медицины, а именно касается
5 терапии дисплазий шейки матки, индуцированных вирусами папилломы человека.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Папилломавирусная инфекция (ПВИ) является наиболее
распространенным инфекционным заболеванием, передающимся
10 половым путем. Согласно статистике более 50% сексуально
активного населения в течение жизни инфицируется вирусом
папилломы человека (ВПЧ). Биологический и медицинский интерес к
папилломавирусам объясняется тем, что они относятся к
опухолеродным, способным вызвать доброкачественную
15 гиперплазию, а некоторые типы ВПЧ – инициировать развитие
злокачественных опухолей аногенитальной области: рак шейки
матки, вульвы, влагалища и пр. Следствием инфицирования ВПЧ
считают также цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN),
относящиеся к предраковым состояниям. ДНК ВПЧ высокой степени
20 онкогенного риска (преимущественно 16 и 18 типов) обнаруживают в
80% образцов умеренной и тяжелой дисплазии плоского эпителия
шейки матки и в 90% инвазивного рака [*Katrin Ochs et al. Incidence
Trends of Cervical Cancer and Its Precancerous Lesions in Women of Central
Switzerland from 2000 until 2014. Frontiers in Medicine 2018; V5: A58*].

25 Рак шейки матки (РШМ) занимает второе место по
распространенности среди злокачественных новообразований у

женщин. Ежегодно в мире регистрируется около полумиллиона новых случаев данного заболевания и 270000 вызванных им смертей. Стандартизированный показатель заболеваемости и смертности от РШМ составляет 16,2 и 9 на 100000 населения, соответственно. При этом приблизительно 52% всех случаев цервикального рака возникает в Азии. В России от РШМ (4,8% среди всех злокачественных опухолей у женщин) ежегодно умирает более 6 тыс. больных (у женщин в возрасте от 20 до 40 лет РШМ является основной причиной смерти). Показатель заболеваемости, приблизительно, вдвое выше.

Основными методами лечения предраковых неопластических заболеваний репродуктивных органов, обусловленных ВПЧ, в настоящее время являются химическая деструкция, хирургическое иссечение или абляция. Данные методы нередко сопровождаются осложнениями, требуют применения дорогостоящего медицинского оборудования и далеко не всегда оказываются эффективными. При этом, огромное число молодых женщин с невыраженной клинической картиной, подлежащие деструктивному лечению, являются носителями инфекции и представляют опасность для половых партнеров и будущего ребенка [Katrin Ochs et al. Incidence Trends of Cervical Cancer and Its Precancerous Lesions in Women of Central Switzerland from 2000 until 2014. *Frontiers in Medicine* 2018; V5: A58].

При инфицировании эпителиальных тканей ВПЧ использует целый набор механизмов, подчиняющих своим интересам жизнедеятельность инфицированной клетки. Установлено, что ВПЧ индуцирует процессы конверсии эстрадиола в канцерогенный метаболит 16 альфа дигидроэстрон (Киселев В.И., Киселев О.И.

Этиологическая роль вируса папилломы человека в развитии рака шейки матки: генетические и патогенетические механизмы (2003) Цитокины и воспаление, том 2, №4, стр.31-38). Известно, что ДНК ВПЧ кодирует синтез двух белков E6 и E7, индуцирующих переход 5 дифференцированных клеток в S-фазу клеточного цикла. На стадии активной репродукции вируса экспрессия генов E6 и E7 регулируется белковым продуктом гена E2 – репрессором транскрипции этих генов. Именно поэтому, пока вирус находится в эписомальном состоянии, имеют место доброкачественные процессы разрастания 10 инфицированных тканей. Ключевым событием в малигнизации клеток является интеграция вируса в геном клетки-хозяина, которая сопровождается делецией гена E2 [M.A. Oyervides-Muñoz et al. Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. Infection, Genetics and Evolution 2018; 61: 134–144; Daisuke Sano, 15 Nobuhiko Oridate. The molecular mechanism of human papillomavirus-induced carcinogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. Int J Clin Oncol 2016].

Контроль клеточного цикла и дифференцировки осуществляется посредством онкогенных белков E6 и E7, инактивирующих 20 "ключевые" белки-регуляторы пролиферативной активности клеток – проапоптотический белок p53 и белок ретинобластомы (pRB). Установлено, что белок E7 способен образовывать стабильный комплекс с белком pRB, вызывая его деградацию, что приводит к высвобождению транскрипционного фактора E2F, который 25 стимулирует транскрипцию генов, необходимых для репликации ДНК в S-фазе клеточного цикла. Кроме того, E7 влияет на активность целого ряда других белков-регуляторов клеточного цикла, таких как

А- и Е-циклины, cdk2-киназа и ингибиторы циклин-зависимой киназы p21 и p27 [M.A. Stanley et al. HPV: from infection to cancer. Biochemical Society Transactions 2007; V35: 1456-1460].

В последние годы установлено, что прогрессия диспластических
5 процессов, индуцированных ВПЧ, обусловлена способностью онкобелков вирусов изменять генетическую программу инфицированной клетки. Такое влияние вирусов реализуется через эпигенетические механизмы. Оказалось, что онкобелки вирусов
10 высокого онкогенного риска способны активировать гистондеацетилазы и ДНК-метилтрансферы клетки. В результате этого в клетке происходит метилирование (инактивация) генов апоптоза и генов-супрессоров опухолевого роста. Изменяется конформация хроматина и меняется спектр синтеза микроРНК, то есть
15 нейтрализуются все природные механизмы способные противостоять канцерогенезу [David Soto et al. Epigenetic Alterations in Human Papillomavirus-Associated Cancers. Viruses 2017; 9: 248; Eric Johannsen and Paul F. Lambert. Epigenetics of Human Papillomaviruses Virology. 2013; 445(0); Julia Durzynska et al. Human papillomaviruses in epigenetic regulations. Mutation Research 2017; 772:36–50; Chunyang Feng et al. The
20 Progress of Methylation Regulation in Gene Expression of Cervical. Cancer International Journal of Genomics 2018].

Суммируя вышесказанное, можно заключить, что
инфицирование эпителиальных клеток ВПЧ является необходимым, но недостаточным фактором для их малигнизации. Для
25 формирования необратимой неоплазии необходимы: 1) индукция метаболических механизмов конверсии эстрадиола в 16 α -ОНЕ1, играющего ключевую роль в раковом перерождении ВПЧ-

инфицированных клеток; 2) активная экспрессия онкогенов E6 и E7 вируса, стимулируемая взаимодействием комплекса гормон-рецептор с промотором ДНК ВПЧ; 3) индукция множественных повреждений хромосомной ДНК в инфицированной клетке, завершающая процесс
5 опухолевой трансформации; 4) эпигенетическое
перепрограммирование инфицированной клетки. Новая генетическая программа стимулирует активное клеточное деление и злокачественное перерождение.

Переломным моментом в борьбе с этой патологией можно
10 назвать разработку вакцин против ВПЧ, основу которых составляют капсидные белки вирусов различных типов. В настоящее время доступны поливалентные вакцины Гардасил и Церварикс, которые уже широко применяются во многих странах мира. Принцип действия вакцин основан на стимуляции выработки нейтрализующих
15 антител, способных связывать свободные вирусные частицы. В литературе это состояние ВПЧ принято называть эписомальным. В таком состоянии вирус передается в сексуальном контакте. Диспластические процессы же начинаются при интеграции вирусной ДНК в геном инфицированной клетки. Это состояние вируса
20 называют интегративным, а клинически это персистирующая хроническая инфекция. Таким образом, разработанные вакцины эффективны только, как профилактическое средство, так как способны помочь нейтрализовать вирус при передаче от полового партнера. Вакцины не действуют на диспластические процессы,
25 развивающиеся при интеграции вирусной ДНК [*Susanne K. Kjaer et al.* A 12-Year Follow-up on the Long-Term Effectiveness of the Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine in 4 Nordic Countries. *Clinical Infectious*

Diseases® 2017; XX(00):1–7]. Именно поэтому вакцины рекомендованы для профилактики ВПЧ инфекции до сексуального дебюта и показали свои высокую эффективность. Таким образом, задача профилактики инфекции может быть решена при включении

5 вакцинации в календарь прививок [*Sung-Jong Lee et al. Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. J Gynecol Oncol 2016; 27(5):e5*]. Однако, как мы упоминали, в различных странах мира уровень инфицированности женского населения, особенно сексуально

10 активного возраста колеблется от 30 до 60%. И для этой категории граждан должна быть выработана стратегия лечебных мероприятий, основанная на современном понимании ранних процессов ВПЧ-индуцированного канцерогенеза. Одно из таких направлений – разработка терапевтических вакцин [*Marcelo Nazário Cordeiro et al.*

15 *Current research into novel therapeutic vaccines against cervical cancer. Expert Review of Anticancer Therapy 2018*]. Однако разработка таких вакцин находится на стадии экспериментальных исследований, и их появление в клинической практике – это вопрос далекого будущего.

К сожалению, лекарственные средства, избирательно

20 воздействующие на ВПЧ, до недавнего времени не были разработаны. Наиболее часто для лечения ВПЧ-инфекции используются так называемые иммуномодуляторы и препараты интерферона (IFN) – белка, вырабатываемого клетками иммунной системы в ответ на стимуляцию вирусными антигенами. Однако в

25 большинстве случаев даже длительная IFN-терапия не приводит к клиническому улучшению. Показано, что устойчивость к действию IFN ВПЧ-инфицированных цервикальных клеток определяется

повышенным уровнем экспрессии онкобелка E7, внутриклеточно инактивирующего фактор регуляции IFN, который включает транскрипцию генов, кодирующих синтез противовирусных белков. Кроме того, описаны многочисленные механизмы блокады
5 противовирусного иммунитета в случае интеграции вирусной ДНК в геном клетки, что делает применение препаратов такого типа малоэффективными [Joseph A. Westrich et al. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. *Virus Research* 2017; 231:21–33].

На протяжении многих лет ведутся поиски природных и
10 синтетических противоопухолевых соединений, способных остановить развитие предраковых состояний шейки матки.

В одном из экспериментальных исследований была показана способность дииндолилметана (DIM) вызывать апоптоз цервикальных ВПЧ-инфицированных кератиноцитов человека в
15 условиях in vitro [Timothy H Carte et al. Diindolylmethane Alters Gene Expression in Human Keratinocytes In Vitro. *The Journal of Nutrition* 2002; V132: 3314–3324].

Несколько лет тому назад с помощью метода microarray-анализа было установлено, что DIM конститутивно изменял транскрипцию
20 более чем 100 генов, большая часть которых прямо или косвенно контролирует клеточную пролиферацию (апоптоз), а также экспрессию ВПЧ-онкогенов в вирус-инфицированных клетках [Da-Zhi Chen et al. Indole-3-Carbinol and Diindolylmethane Induce Apoptosis of Human Cervical Cancer Cells and in Murine HPV16-Transgenic
25 Preneoplastic Cervical Epithelium. *J.Nutrit*, 2001, 131, 3294-3302].

Необходимо упомянуть еще об одном, недавно описанном, важнейшем свойстве DIM – его иммуномодулирующей активности.

Было показано, что в условиях *in vitro* в опухолевых клетках DIM стимулирует IFN α -зависимые сигнальные каскады посредством активации экспрессии рецепторов IFN α , а также других IFN-респонсивных регуляторных белков [Jacques E. Riby *et al.* Activation and
5 Potentiation of Interferon- γ Signaling by 3,3'-Diindolylmethane in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Cells. Mol. Pharmacol* 2006; 69:430-439]. Опубликованы убедительные данные, указывающие на паразитную способность DIM избирательно ингибировать жизнедеятельность трансформированных клеток, не влияя на жизнеспособность
10 нормальных клеточных линий [Shishinn Sun *et al.* Endoplasmic reticulum stress as a correlate of cytotoxicity in human tumor cells exposed to diindolylmethane *in vitro*. *Cell Stress & Chaperones* 2004; 9 (1), 76–87; Da-Zhi Chen *et al.* Indole-3-Carbinol and Diindolylmethane Induce Apoptosis of Human Cervical Cancer Cells and in Murine HPV16-Transgenic
15 Preneoplastic Cervical Epithelium. *The Journal of Nutrition* 2001; V131: I12:3294–3302; Sanjeev Banerjee *et al.*, Attenuation of multi-targeted proliferation-linked signaling by 3,3'-diindolylmethane (DIM): from bench to clinic. *Mutat Res.* 2011; 728(0): 47–66; Zhu J. *et al.*, Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of 3,3'-diindolylmethane in human cervical cancer cells.
20 *J Oncology Reports* 2012; 28: 1063-1068]. Кроме того, установлено, что DIM обладает способностью ингибировать развитие эпигенетических изменений в трансформированных клетках [Junaid M. *et al.* Molecular Simulation Studies of 3,3'-Diindolylmethane as a Potent MicroRNA-21 Antagonist. *J Pharm Bioallied Sci.* 2017; 9(4):259-265; Huang J *et al.*
25 Cancer chemoprevention by targeting the epigenome. *Current Drug Targets* 2011; V12: I13: 1925 – 1956; Wong CP *et al.* Effects of sulforaphane and 3,3'-diindolylmethane on genome-wide promoter methylation in normal

prostate epithelial cells and prostate cancer cells. PLoS One. 2014; 9(1):e86787; Wu TY, Khor TO, Su ZY et al. Epigenetic modifications of Nrf2 by 3,3'-diindolylmethane *in vitro* in TRAMP C1 cell line and *in vivo* TRAMP prostate tumors. *The AAPS J* 2013; 15(3), 864-874].

5 Эти результаты послужили основанием для разработки лекарственного средства в виде вагинальных суппозиториев на основе дииндолилметана. Лекарственное средство Цервикон-ДИМ, вагинальные суппозитории, содержащие 100 мг дииндолилметана [RU 2318510 C1, опуб. 10.03.2008; Регистрационное удостоверение ЛП-
10 004939] было широко апробировано для лечения цервикальных дисплазий и показало достаточно высокую эффективность при лечении CIN1-2. Терапевтический эффект наблюдался у 70% пациенток [Ashrafian L, Sukhikh G, Kiselev V. et al. Double-blind randomized placebocontrolled multicenter clinical trial (phase IIa) on
15 diindolylmethane's efficacy and safety in the treatment of CIN: implications for cervical cancer prevention. *The EPMA Journal* 2015; 6:25]. Выраженный клинический эффект при назначении Цервикон-ДИМ наблюдается при довольно длительной терапии. Средняя продолжительность лечения составляет около 3-х месяцев. Вероятно,
20 это обусловлено тем, что на стадии CIN1-2 в очаге поражения присутствуют не только клетки с интегрированной ДНК вируса, но и свободные вирусные частицы, способные реинфицировать эпителиальные клетки шейки матки. Для полной иррадикации вируса необходимо более продолжительное время и включение системного
25 иммунитета благодаря выраженным иммуностимулирующим свойствам дииндолилметана.

Лекарственная коррекция диспластических процессов наиболее эффективна на стадиях CIN1-2. На этих этапах довольно высока вероятность спонтанной регрессии. Однако на сегодняшний день до конца не ясно и невозможно предвидеть, по какому сценарию будет развиваться инфекционный процесс. Анализ состояний вирусов на этой фазе развития процесса показал, что уже при CIN1 почти 50% случаев наблюдается интеграция вирусного генома [*L-W Huang et al. Integration of human papillomavirus type-16 and type-18 is a very early event in cervical carcinogenesis. J Clin Pathol 2008; 61:627–631*]. То есть, с биохимической точки зрения уже запущен механизм вирусного канцерогенеза. С другой стороны, вплоть до стадии CIN3 обнаружено присутствие ВПЧ в эписомальном состоянии. Скорее всего, эти две формы существования вирусов синергично взаимодействуют в развитии раннего злокачественного процесса [*Daisuke Sano, Nobuhiko Oridate. The molecular mechanism of human papillomavirus-induced carcinogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. Int J Clin Oncol 2016*]. Это предположение подводит к мысли о том, что эффективной терапией дисплазий необходимо воздействовать как на клетки, содержащие вирусный геном, так и на вирус в эписомальном состоянии. Как следует из изложенного ранее, нейтрализации вируса в эписомальном состоянии легко достичь индукцией нейтрализующих антител путем вакцинации, а жизнеспособность инфицированных клеток ингибировать препаратом Цервикон-ДИМ, содержащим дииндолилметан.

Апробации такой схемы лечения и посвящено данное изобретение.

Способ лечения дисплазий шейки матки с помощью препарата Цервикон-ДИМ [RU 2318510 С1, опуб. 10.03.2008; Регистрационное

удостоверение ЛП-004939] был выбран в качестве прототипа. Способ заключается в интравагинальном введении суппозиторий, содержащих дииндолилметан, по 100 мг 2 раза в сутки, длительность курса лечения 3-6 месяцев

5 (https://medi.ru/instrukciya/cervikon_15027).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Технической проблемой, решаемой настоящим изобретением, является разработка новой эффективной схемы лечения цервикальных дисплазий, основанной на современном понимании

10 ВПЧ индуцированного канцерогенеза и включающей системную иммунотерапию и местное лекарственное воздействие на очаги, пораженные ВПЧ.

Техническая проблема решается способом терапии дисплазии шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы человека, заключающийся в том, что осуществляют местное введение пациентке

15 лекарственного средства, содержащего дииндолилметан, отличающийся тем, что перед началом местного лечения осуществляют однократное введение пациентке вакцины против вируса папилломы человека.

Предпочтительно в качестве лекарственного средства, содержащего дииндолилметан, использовать вагинальные суппозитории.

20

ПРИМЕРЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Протокол клинических исследований комбинированной терапии цервикальных интраэпителиальных неоплазий. Оценка эффективности «Цервикон-ДИМ» в сочетании с вакцинацией препаратами Гардасил и

25

Церварикс в лечении цервикальной интраэпителиальной неоплазии слабой и средней степени (CIN1-2).

Параметры эффективности:

5 Доля пациенток с полной регрессией CIN1-2 через 1 месяц после начала применения указанной схемы лечения на основании кольпоскопии результатов гистологического исследования биоптатов шейки матки.

Основные критерии включения:

- 10 1. Наличие письменного информированного согласия об участии в данном исследовании.
2. Способность выполнять процедуры, предусмотренные Протоколом исследования.
3. Кольпоскопическая картина поражений шейки матки на фоне зоны трансформации I и II типа.
- 15 4. Возраст 18-45 лет.
5. Диагноз цервикальной интраэпителиальной неоплазии 1-2 степени (CIN I-II), верифицированный гистологически.
6. Наличие ВПЧ 16 или 18 типов, выявленных методом полимеразной цепной реакции.

20 По основным демографическим показателям (возраст, рост, масса тела, индекс массы тела) группы исследования не различались, что позволяло объединить их для анализа согласно задачам исследования

Значимых различий в характеристиках исходного состояния: данных гинекологического анамнеза (возраст, менархе, длительность

менструаций, интервал между менструациями, возраст начала половой жизни) выявлено не было.

5 Всем пациенткам проведено стандартное гинекологическое обследование: микроскопия мазка, цитологическое исследование мазков с шейки матки, ВПЧ-тест, кольпоскопия, биопсия с последующим гистологическим исследованием биоптатов шейки матки.

10 У всех пациенток перед исследованием был выявлен вирус папилломы человека (ВПЧ), который определялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). По результатам генотипирования для дальнейшей работы были отобраны женщины с ВПЧ 16 или 18 типов.

15 Схема лечения включала в себя однократную вакцинацию препаратом Гардосил или Церварикс и со следующего дня введение вагинальных суппозиторий Цервикон-ДИМ (100 мг) утром и вечером в течение двух месяцев.

20 После завершения периода терапии, пациенткам были, в какой день повторно выполнены кольпоскопическое исследование и цитологический анализ шейки матки. Эффективность проведенной терапии отображается в Таблице.

Таблица

Оценка показателей эффективности терапии через 2 месяца лечения – по данным кольпоскопии и цитологического исследования

	Цервикон-ДИМ		Цервикон-ДИМ + Гардосил		Цервикон-ДИМ + Церварикс	
	Число пациенток	% в группе	Число пациенток	% в группе	Число пациенток	% в группе

Эффект: нормализация по данным кольпоскопии и цитологическо- го исследования	Нет	5	50	2	20	1	10
	Да	5	50	8	80	9	90

Оценка эффективности лечения проводилась по твердой конечной точке – данным гистологического изучения биоптатов шейки матки. При этом повторная биопсия проводилась по тем же правилам, что и исходная. В случае, если установить патологически измененный участок шейки матки при кольпоскопии не представлялось возможным (например, в случае нормальной кольпоскопической картины), биопсия бралась из участка, максимально близкого к месту исходной биопсии.

Как следует из полученных результатов, представленных в таблице, комбинация вакцинных препаратов с вагинальными суппозиториями, содержащими дииндолилметан, демонстрирует выраженный терапевтический эффект по сравнению с монотерапией Цервикон-ДИМ.

15

20

Формула изобретения

1. Способ терапии дисплазии шейки матки, ассоциированной с вирусами папилломы человека, заключающийся в том, что осуществляют местное лечение пациентки с помощью лекарственного средства, содержащего дииндолилметан, отличающийся тем, что перед началом местного лечения осуществляют однократное введение пациентке вакцины против вируса папилломы человека.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в качестве лекарственного средства, содержащего дииндолилметан, используют вагинальные суппозитории.

15

20