



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(21) Broj prijave:



HR P20000729A A2

HR P20000729A A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: **A 61 K 31/135**

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 27.10.2000.

(43) Datum objave prijave patenta u HR: 30.06.2001.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/US99/10146

Datum podnošenja međunarodne prijave 07.05.1999.

(87) Broj međunarodne objave: WO 99/56739

Datum međunarodne objave 11.11.1999.

(31) Broj prve prijave: 60/084,602

(32) Datum podnošenja prve prijave: 07.05.1998.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(71) Podnositelj prijave:

**The University of Tennessee Research Corporation, Suite 403, 1534
White Avenue, Knoxville, 37996 TN, US**

(72) Izumitelji:

**Mitchell, S. Steiner, 8894 Silverbark Drive, Germantown, 38138 TN, US
Sharon Raghow, 1535 Brookline Cove, Germantown, 38138 TN, US**

(74) Punomoćnik:

Mladen VUKMIR, Zagreb, HR

(54) Naziv izuma:

POSTUPAK ZA KEMOPREVENCIJU RAKA PROSTATE

(57) Sažetak: Izum opisuje kemoprevenciju raka prostate, točnije, postupak primjene na pojedinca učinkovite doze sredstva za kemoprevenciju, toremifena i njegovih analoga ili metabolita, u svrhu sprečavanja ponovne pojave, suzbijanja ili inhibicije karcinogeneze u prostati. Ovaj izum opisuje siguran i učinkovit postupak za suzbijanje ili inhibiranje latentnog raka prostate, a posebno je učinkovit za liječenje pojedinaca koji imaju povećan rizik za razvoj karcinoma prostate, na primjer onih koji imaju benignu hiperplaziju prostate, intraepitelnu neoplaziju prostate (PIN) ili nenormalno visoku razinu cirkulirajućih protutijela na prostata-specifični antigen (PSA), ili onih s karcinomom prostate u obitelji.

HR P20000729A A2

Područje tehnike

Ovaj izum se odnosi na kemoprevenciju raka prostate, točnije, na postupak primjene na osobu učinkovite doze sredstva za sprečavanje ponovne pojave, suzbijanje ili potiskivanje karcinogeneze u prostati.

Stanje tehnike

Rak prostate je jedan od najčešćih karcinoma među muškarcima u SAD, a stotine tisuća novih slučajeva otkriju se svake godine. Nažalost, više od šezdeset posto novodijagnosticiranih slučajeva raka prostate su, patološki, uznapredovali oblici, bez mogućnosti liječenja i s nepovoljnom prognozom. Jedan od pristupa ovom problemu jest i traganje za rakom prostate u ranoj fazi, pomoću programa probira, ne bi li se time smanjio broj bolesnika s uznapredovalom bolešću. No, postoji i druga strategija, i to razvoj lijekova za sprečavanje raka prostate. Jedna trećina ukupne muške populacije u dobi iznad 50 godina ima latentni oblik raka prostate koji se može aktivirati u klinički oblik koji je opasan po život. Nađeno je kako učestalost latentnih tumora prostate raste sa svakim desetljećem života od 50-ih (5.3-14%) do 90-ih (40-80%). Broj ljudi s latentnim rakom prostate jednak je u svim kulturama, etničkim zajednicama i rasama, dok se učestalost klinički agresivnog raka značajno razlikuje. Ovo upućuje na mogućnost da činitelji okoliša igraju ulogu u aktiviranju latentnog raka prostate. Prema tome, razvoj kemoprevencijskih strategija protiv raka prostate mogao bi imati najveći ukupni učinak, medicinski i ekonomski, protiv raka prostate.

Radi velike pojavnosti i smrtnosti od raka prostate, nužno je razviti kemoprevencijske strategije protiv ove opake bolesti.

Razumijevanje činitelja koji sudjeluju u karcinogenezi u prostati, uključujući inicijaciju, promociju i progresiju raka prostate, omogućit će dobivanje ključa, na razini molekulskih mehanizama, kao odgovarajućih točaka djelovanja za sprečavanje ili zaustavljanje procesa karcinogeneze. Hitno su potrebni novi, inovativni pristupi u temeljnim znanostima, kao i na kliničkoj razini, sa svrhom smanjenja pojavnosti raka prostate, te zaustavljanja ili povlačenja latentnog raka prostate. Kako učestalost raka prostate dramatično raste upravo u dobi kada se muška populacija suočava s drugim uzrocima smrtnosti, jednostavno uspoređivanje napredovanja adenokarcinoma prostate bila bi i prikladnija i isplativija zdravstvena strategija.

U kemoprevenciji raka prostate postoje različiti pristupi. Greenwald, "Expanding Horizons in Breast and Prostate Cancer Prevention and Early Detection" u *J. Cancer Education*, 1993, vol. 8, br. 2, str. 91-107, raspravlja o ispitivanju inhibitora 5 α -reduktaze, poput finasterida, u prevenciji raka prostate. Brawley i sur., "Chemoprevention of Prostate Cancer" u *Urology*, 1994, vol. 43, br. 5, također spominju inhibitore 5 α -reduktaze kao i difluorometilornitin i retinoide kao potencijalna sredstva za kemoprevenciju.

Kelloff i sur., "Introductory Remarks: Development of Chemopreventive Agents for Prostate Cancer" u *Journal of Cellular Biochemistry*, 1992, supl. 16H: 1-8, opisuju pretkliničke studije sedam sredstava provedene u National Cancer Institute: al-trans-N-(4-hidroksifenil)retinamid, difluorometilornitin, dehidroepiandrosteron, liarozol, lovastatin, oltipraz i finasterid.

Lucia i sur., "Chemopreventive Activity of Tamoxifen, N-(4-hydroxyphenyl)retinamide, and the Vitamin D Analogue Ro24-5531 for Androgen-promoted Carcinomas of the Rat Seminal Vesicle and Prostate", u *Cancer Research*, 1995, vol. 55, str. 5621-5627, izvješćuju o kemoprevenciji karcinoma prostate u Lobund-Wistar štakora tamoksifenom, modulatorom estrogenskog odgovora.

Prema raspravi u Potter i sur., "A mechanistic hypothesis for DNA adduct formation by tamoxifen following hepatic oxidative metabolism" u *Carcinogenesis*, 1994, vol. 15, br. 3, str. 439-442, tamoksifen uzrokuje karcinogenezu u jetri štakora, što se pripisuje stvaranju kovalentnih DNA adukata. Ovaj rad također tvrdi kako analog tamoksifena toremifen, koji pokazuje mnogo nižu razinu stvaranja DNA adukata nego tamoksifen, nije karcinogeničan.

Toremifen je primjer trifenilalkenskog spoja opisanog u SAD patentima br. 4696949 i 5491173 autora Toivole i sur., čija su otkrića ovdje uklopljena kao reference. Parenteralna i topička primjena na sisavce pripravaka koji sadrže toremifen opisana je u SAD patentu br. 5571534 autora Jalonena i sur., te u SAD patentu br. 5605700 autora DeGregoria i sur., čija su otkrića ovdje uklopljena kao reference.

Pripravci koji sadrže toremifen a služe za obrat rezistencije na više lijekova na stanice raka u citotoksični lijek opisani su u SAD patentu br. 4990538 autora Harrisa i sur., čija su otkrića ovdje uklopljena kao reference. SAD patenti br. 5595722 i 5599844 autora Graingera i sur., čija su otkrića ovdje uklopljena kao reference, opisuju postupke za iznalaženje sredstava koja povećavaju razinu TGFP, kao i za oralnu primjenu pripravaka koji sadrže aktivatore TGFP i

stimulatore produkcije TGFP u svrhu sprečavanja ili liječenja stanja koja se odlikuju abnormalnom proliferacijom glatkih mišićnih stanica, na primjer, vaskularne traume. Opisana sredstva za povećavanje razine TGFP uključuju tamoksifen i njegov analog toremifen.

- 5 SAD patenti br. 5629007 i 5635197 autora Audia i sur., čija su otkrića ovdje uklopljena kao reference, opisuju postupak za sprečavanje razvoja raka prostate u slučaju rizika za razvijanje tog raka, na primjer u bolesnika s benignom hiperplazijom prostate, primjenom na bolesnika oktahidrobencofkvinolin-3-onskog spoja.

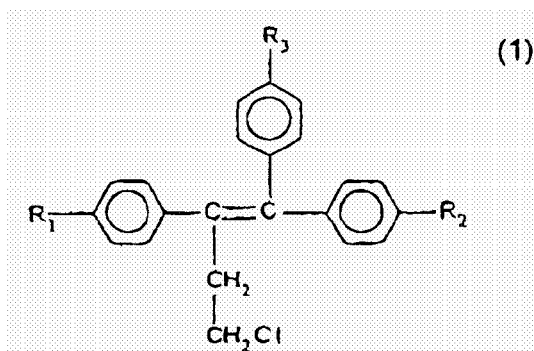
- 10 SAD patent br. 5595985 autora Labrie, čije je otkriće ovdje uklopljeno kao referenca, također opisuje postupak za liječenje benigne hiperplazije prostate pomoću kombinacije inhibitora 5 α -reduktaze i spoja koji se veže i priječi pristup androgenim receptorima. Jedan primjer spoja koji blokira androgenske receptore je flutamid.

- 15 SAD patent br. 4329364 i 4474813 autora Nerija i sur., čija su otkrića ovdje uklopljena kao reference, opisuje farmaceutske pripravke koji sadrže flutamid za odgađanje i/ili sprečavanje pojave karcinoma prostate. Pripravak može biti u obliku kapsule, tablete, čepića ili eliksira. Unatoč ovom napretku, postoji trajna potreba za sredstvima i postupcima učinkovitim za sprečavanje raka prostate. Ovaj je izum namijenjen udovoljavanju ovoj potrebi.

Izlaganje biti izuma

- 20 Ovaj izum opisuje kemoprevenciju raka prostate, točnije, postupak primjene na osobu učinkovite doze sredstva za kemoprevenciju, toremifena i njegovih analoga ili metabolita, u svrhu sprečavanja ponovne pojave, liječenja, suzbijanja ili potiskivanja karcinogeneze u prostati.

- 25 Ovaj izum je namijenjen postupku za sprečavanje karcinogeneze u prostati. Ovaj izum uključuje primjenu na životinju farmaceutskog pripravka kemoprevencijskog sredstva čija je formula:



- 30 pri čemu su R₁ i R₂, koji mogu biti isti ili različiti, H ili OH, R₃ je OCH₂CH₂NR₄R₅, pri čemu R₄ i R₅, koji mogu biti isti ili različiti, su H ili alkilna skupina od 1 do oko 4 atoma ugljika; kao i njihovi farmaceutski prihvatljivi nosači, sredstva za razrjeđivanje, soli, esteri ili N-oksidi, kao i njihove smjese.

- 35 Ovaj izum opisuje siguran i učinkovit postupak za suzbijanje ili potiskivanje latentnog raka prostate, a posebno je učinkovit za liječenje osoba koje imaju povećan rizik za razvoj raka prostate, na primjer onih koji imaju benignu hiperplaziju prostate, intraepitelnu neoplaziju prostate (PIN) ili abnormalno visoku razinu cirkulirajućeg prostata-specifičnog antigena (PSA), ili onih s karcinomom prostate u obitelji.

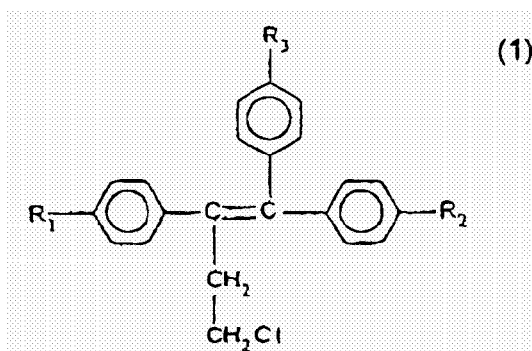
Kratak opis crteža

- 40 **Slika 1:** Grafikon koji prikazuje kemoprevencijske učinke toremifena u TRAMP modelu.
Slike 2A-2C: H&E rezovi koji prikazuju ventralne stanice prostate u normalnog miša i karcinom prostate u TRAMP miša uključenog u studiju.
Slika 3: Učinak toremifena na razvoj ventralne prostate u TRAMP miša.
Slika 4: Učinak toremifena na pojavu tumora u TRAMP miša.
 45 **Slika 5:** Učinak toremifena na razvoj tumora u TRAMP modelu.
Slike 6A-6B: Poredba učinaka placeba vs. toremifena na rast tumora.

Detaljan opis izuma

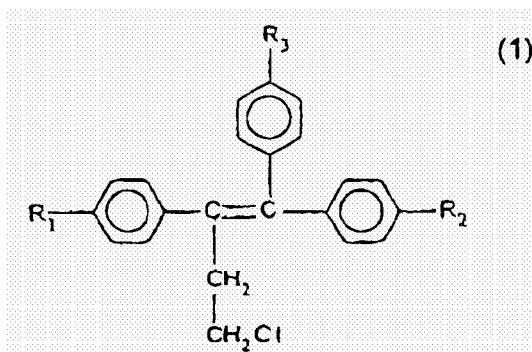
Ovaj izum opisuje postupak za sprečavanje karcinogeneze u prostati; 2) postupke za suzbijanje ili potiskivanje raka prostate; 3) postupke za smanjivanje rizika razvoja raka prostate; i 4) postupke za povećavanje preživljenja osoba koje koriste sredstvo za kemoprevenciju u prostati, toremifen, njegove analoge i metabolite.

- 5 Kao što je ovdje prikazano, toremifen je sredstvo za kemoprevenciju u prostati. U ovdje provedenim pokusima, prostate su disecirane i ocjenjivane i histološki i analizom cjelokupnih rezova. Pored toga, toremifen je ispitan za liječenje raka prostate obradom LNCaP ksenografta u golih miševa. Kao što je prikazano, podaci su prilično dramatični; naime, ne samo da je toremifen potiskivao rast, nego je doveo i do povlačenja tumora.
- 10 Ovaj izum odnosi se na postupak za sprečavanje karcinogeneze u prostati. Ovaj izum uključuje primjenu na sisavca farmaceutskog pripravka kemoprevencijskog sredstva formule:



- 15 pri čemu su R_1 i R_2 , koji mogu biti jednaki ili različiti, H ili OH, R_3 je $OCH_2CH_2NR_4R_5$, pri čemu su R_4 i R_5 , koji mogu biti jednaki ili različiti, H ili alkilna skupina od 1 do oko 4 ugljikova atoma; kao i njihovi farmaceutski prihvatljivi nosači, sredstva za razrjeđivanje, soli, esteri ili N-oksidi, te njihove smjese.

- Ovaj izum odnosi se na uporabu farmaceutskog pripravka za sprečavanje ponovne pojave, suzbijanje ili potiskivanje karcinogeneze u prostati ili povećavanje preživljenja osobe oboljele od raka prostate, koja obuhvaća kemoprevencijsko sredstvo formule:
- 20



- 25 pri čemu su R_1 i R_2 , koji mogu biti jednaki ili različiti, H ili OH, R_3 je $OCH_2CH_2NR_4R_5$, pri čemu su R_4 i R_5 , koji mogu biti jednaki ili različiti, H ili alkilna skupina od 1 do oko 4 ugljikova atoma; kao i njihovi farmaceutski prihvatljivi nosači, sredstva za razrjeđivanje, soli, esteri ili N-oksidi, te njihove smjese.

- Ovaj izum opisuje siguran i učinkovit postupak za suzbijanje ili potiskivanje latentnog raka prostate, a posebno je učinkovit za liječenje osoba koje imaju povećan rizik za razvoj raka prostate, na primjer onih koji imaju benignu hiperplaziju prostate, intraepitelnu neoplaziju prostate (PIN) ili abnormalno visoku razinu cirkulirajućeg prostata-specifičnog antigena (PSA), ili onih s karcinomom prostate u obitelji.
- 30

Spoj 4-kloro-1,2-difenil-1-[4-[2-(N,N-dimetilamino)etoksi]fenil]-1-buten formule (I), pri čemu su R_1 i R_2 svaki H, R_4 i R_5 su svaki metil, zove se toremifen.

- 35 Toremifen se pokazao sigurnim i učinkovitim protutumorskim spojem, a pokazuje hormonske učinke kao estrogensko ili protuestrogensko sredstvo, ovisno o korištenoj dozi. Nakon primjene, toremifen ima nekoliko metabolita koji su također biološki aktivni.

Ovaj izum također opisuje uporabu analoga ili metabolita toremifena, koji su dobro poznati upućenom stručnjaku. Drugi primjeri kemoprevencijskih sredstava formule (I) su slijedeći: 4-kloro-1,2-difenil-1-[4-[2-(N-metilamino)etoksi]fenil]-1-buten; 4-kloro-1,2-difenil-1-[4-[2-(N,N-dietilamino)etoksi]fenil]-1-buten; 4-kloro-1,2-difenil-1-[4-(aminoetoksi)fenil]-1-buten; 4-kloro-1-(4-hidroksifenil)-1-[4-[2-(N,N-dimetilamino)etoksi]fenil]-2-fenil-1-buten; 4-kloro-1-(4-hidroksifenil)-1-[4-[2-(N-metilamino)etoksi]fenil]-2-fenil-1-buten; i 4-kloro-1,2-bis(4-hidroksifenil)-1-[4-[2-(N,N-dimetilamino)etoksi]fenil]-1-buten.

Izum uključuje čiste (Z)- i (E)-izomere spojeva i njihove smjese, kao i čiste (RR,SS)- i (RS,SR)-enantiomerske parove i njihove smjese.

Sredstva koja su spojevi formule (I) mogu se pripremiti postupcima opisanima u prethodno citiranim SAD patentima br. 4696949 i 5491173 autora Toivole i sur.

Izum uključuje farmaceutski prikladne soli amino-supstituiranih spojeva s organskim i neorganskim kiselinama, na primjer, limunskom kiselinom i kloridnom kiselinom. Izum također uključuje N-okside amino supstituenata spojeva formule (I). Farmaceutski prihvatljive soli također se mogu pripremiti iz fenolnih spojeva obradom s neorganskim bazama, na primjer, natrij hidroksidom. Također, esteri fenolnih spojeva mogu se pripremiti s alifatskim i aromatskim karboksilnim kiselinama, na primjer, octenom kiselinom i esterima benzojeve kiseline.

U značenju u kojem se ovdje koristi, "farmaceutski pripravak" znači terapijski učinkovite količine sredstva zajedno s prikladnim sredstvima za razrjeđivanje, konzervansima, solubilizatorima, emulgatorima, adjuvansima i/ili nosačima. "Terapijski učinkovita količina", u značenju u kojem se ovdje koristi, odnosi se na onu količinu koja dovodi do terapijskog učinka za određeno stanje i režim primjene. Takvi pripravci su tekućine ili liofilizirani ili na koji drugi način sušeni pripravci i uključuju sredstva za razrjeđivanje različitog puferuskog sadržaja (na pr. Tris-HCl, acetat, fosfat), pH i ionske jakosti, dodatke poput albumina ili želatine za sprečavanje apsorpcije na površine, detergente (na pr. Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, soli žučnih kiselina), solubilizatore (na pr. glicerol, polietilen glicerol), protuoksidanse (na pr. askorbinsku kiselinu, natrij metabisulfit), konzervanse (na pr. Thimerosal, benzil alkohol, paraben), tvari za postizanje mase ili podešivače osmolarnosti (na pr. laktoza, manitol), kovalentno vezanje polimera poput polietilen glikola na protein, stvaranje kompleksa s metalnim ionima, ili ugrađivanje tvari u ili na pojedine pripravke polimernih spojeva poput polimilječne kiseline, poliglikolne kiseline, hidrogelova itd., ili na liposome, mikroemulzije, micele, jednolamelarne ili višelamelarne mjehuriće, eritrocitne sjene ili sferoplaste. Ovakvi pripravci utjecat će na fizikalno stanje, topljivost, stabilnost, brzinu oslobađanja *in vivo* i brzinu klirensa *in vivo*. Pripravci s kontroliranim ili produljenim oslobađanjem uključuju formulacije u lipofilnim depoima (na pr. masne kiseline, voskovi, ulja). Pod izumom se također podrazumijevaju pojedini pripravci obloženi s polimerima (na pr. poloksameri ili poloksamini). Daljnji oblici pripravaka izuma obuhvaćaju pojedine oblike zaštitnih obloga, inhibitore proteaza ili pospješivače prodiranja za različite puteve primjene, uključujući parenteralni, pulmonalni, nazalni i peroralni. U jednom obliku farmaceutski pripravak se primjenjuje parenteralno, parakarcinomski, transmukozno, transdermalno, intramuskularno, intravenski, intradermalno, supkutano, intraperitonejski, intraventrikulski, intrakranijski i intratumorski.

Nadalje, u značenju u kojem se ovdje primjenjuje, "farmaceutski prihvatljivi nosač" je dobro poznat upućenom stručnjaku i uključuje, bez ograničenja, 0.01-0.1M, a preporučljivo 0.05M fosfatni pufer ili 0.8%-tnu fiziološku otopinu. Nadalje, takvi farmaceutski prihvatljivi nosači mogu biti vodene ili nevodene otopine, suspenzije i emulzije. Primjeri nevodene otopine su propilen glikol, polietilen glikol, biljna ulja poput maslinovog ulja, te injektibilni organski esteri poput etil oleata. Vodeni nosači uključuju vodu, alkoholno/vodene otopine, emulzije ili suspenzije, uključujući fiziološku otopinu i puferirane medije. Parenteralni nosači uključuju otopinu natrij klorida, Ringerovu dekstrozu, dekstrozu i natrij klorid, Ringerov laktat ili fiksna ulja. Intravenski nosači uključuju nadomjestke za tekućine i hranjive tvari, nadomjestke za elektrolite poput onih koji se temelje na Ringerovoj dekstrozi i sličnih. Također mogu biti prisutni konzervansi i drugi aditivi, poput, na primjer, protumikrobnih sredstava, protuoksidansa, kolirajućih sredstava, inertnih plinova i sličnih.

Izraz "adjuvans" odnosi se na spoj ili smjesu koja povećava imunosni odgovor na antigen. Adjuvans može poslužiti kao tkivni depo koji polako otpušta antigen, također i kao aktivator limfnog sustava koji nespecifično pospješuje imunosni odgovor (*Hood i sur., Immunology, 2. izd, 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, str. 384*). Često primarni podražaj samim antigenom, bez adjuvansa, ne uspije pobuditi humoralni ili celularni imunosni odgovor. Adjuvans uključuje, bez ograničenja, potpuni Freundov adjuvans, nepotpuni Freundov adjuvans, saponin, mineralne gelove poput aluminij hidroksida, površinski aktivne tvari poput lizolecitina, pluronskih poliola, polianiona, peptida, ulja ili ugljikovodičnih emulzija, krpeljnog hemocijanina, dinitrofenola i potencijalno korisnih humanih adjuvansa kao što su BCG (*bacillus Calmette-Guerin*) i *Corynebacterium parvum*. Preporučljivo, adjuvans je farmaceutski prihvatljiv.

Pripravci s kontroliranim ili produljenim otpuštanjem uključuju pripravke u lipofilnim depoima (na pr. masne kiseline, voskovi, ulja). Izumom su također obuhvaćeni pojedini spojevi obloženi polimerima (na pr. poloksameri ili

poloksamini) i spoj vezan za protutijela usmjerena protiv tkivno-specifičnih receptora, liganda ili antigena ili vezan za ligande ili tkivno-specifične receptore.

Daljnji oblici pripravaka izuma obuhvaćaju pojedine oblike zaštitnih obloga, inhibitore proteaza ili pospješivače prodiranja za različite puteve primjene, uključujući parenteralni, pulmonalni, nazalni i peroralni. Za spojeve modificirane kovalentnim vezanjem vodotopljivih polimera poput polietilen-glikola, kopolimera polietilen glikola i polipropilen glikola, karboksimetilceluloze, dekstrana, polivinil alkohola, polivinilpirolidona ili poliprolina je poznato kako općenito imaju dulji poluživot u krvi nakon intravenske injekcije u odnosu na odgovarajuće nemodificirane spojeve (*Abuchowski i sur., 1981; Newmark i sur., 1982; Katre i sur., 1987*). Ove modifikacije također mogu povećati topljivost spojeva u vodenim otopinama, spriječiti agregaciju, povećati fizikalnu i kemijsku stabilnost spoja, te značajno smanjiti imunogeničnost i reaktivnost spoja. Kao rezultat ovoga, željena *in vivo* biološka aktivnost može se postići primjenom takvih abdukata spojeva-polimera rjeđe ili u manjim dozama u odnosu na nemodificirane spojeve.

U slijedećem obliku, farmaceutski pripravci mogu se davati u sustavu za kontrolirano otpuštanje. Na primjer, sredstvo se može primijeniti intravenskom infuzijom, osmotskom crpkom za implantaciju, transdermalnim flasterom, liposomima ili drugim načinima za primjenu. U jednom obliku, može se koristiti crpka (vidi *Langer, gore; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald i sur., Surgery 88:507 (1980); Saudek i sur., N. Eng. J. Med. 321:574 (1989)*). U slijedećem obliku, mogu se koristiti polimerske tvari. U daljnjem obliku, sustav za kontrolirano otpuštanje može se smjestiti u blizinu terapijskog cilja, tj. mozga, pa je tada dostatan samo dio doze za sistemsku primjenu (vidi, na pr., *Goodson, u Medical Applications of Controlled Release, gore, vol. 2, str. 115-138 (1984)*). Preporučljivo, uređaj za kontrolirano otpuštanje uvodi se u pojedinca u blizinu mjesta neodgovarajuće imunosne aktivacije ili tumora. Drugi sustavi za kontrolirano otpuštanje prikazani su u pregledu čiji je autor Langer (*Science 249:1527-1533 (1990)*).

Postupak prema ovom izumu za sprečavanje karcinogeneze u prostati obuhvaća primjenu na sisavca farmaceutskog pripravka koji sadrži kemoprevencijsko sredstvo ili njegov metabolit ili sol. Farmaceutski pripravak može se sastojati samo od kemoprevencijskog sredstva ili može sadržavati i farmaceutski prihvatljiv nosač, može biti u krutom ili tekućem obliku, kao tablete, prašci, kapsule, pelete, otopine, suspenzije, eliksiri, emulzije, gelovi, kreme ili supozitoriji, uključujući rektalne i uretralne supozitorije. Farmaceutski prihvatljivi nosači uključuju gume, škrobove, šećere, celulozne tvari i njihove smjese. Farmaceutski pripravak koji sadrži kemoprevencijsko sredstvo može se primijeniti na osobu, primjera radi, potkožnim implantiranjem pelete; u daljnjem obliku, pelete omogućuju kontrolirano otpuštanje kemoprevencijskog sredstva tijekom vremena. Pripravci se također mogu primijeniti intravenskom, intraarterijskom ili intramuskularnom injekcijom tekućeg pripravka, peroralnom primjenom tekućeg ili krutog pripravka, ili lokalnom primjenom. Primjena se može provesti i uporabom rektalnog supozitorija ili uretralnog supozitorija. Farmaceutski pripravak može također biti u parenteralnoj formulaciji; u jednom obliku, formulacija sadrži liposom koji uključuje kompleks kemoprevencijskog spoja poput, na primjer, toremifena i ciklodekstrinskog spoja, kao što je opisano u prethodno citiranom SAD patentu br. 5571534 autora Jalonena i sur.

Farmaceutski pripravci izuma mogu se pripremiti poznatim postupcima otapanja, miješanja, granuliranja ili stvaranja tableta. Za peroralnu primjenu, kemoprevencijska sredstva ili njihovi fiziološki podnošljivi derivati poput soli, estera, N-oksida i sličnih se miješaju s aditivima uobičajenima za ovu svrhu, kao što su vehikuli, stabilizatori ili inertna sredstva za razrjeđivanje, i prevode se uobičajenim postupcima u oblike prikladne za primjenu, kao što su tablete, obložene tablete, tvrde ili meke želatinske kapsule, vodene, alkoholne ili uljne otopine. Primjeri prikladnih inertnih vehikula su uobičajene baze za tablete, poput laktoze, saharoze, ili kukuruznog škroba u kombinaciji sa sredstvima za vezanje, kao što su akacija, kukuruzni škrob, želatina, ili sa sredstvima za dezintegriranje, poput kukuruznog škroba, krumpirovog škroba, algijske kiseline, ili s lubrikansima poput stearinske kiseline ili magnezij stearata. Primjeri prikladnih uljnih vehikula ili otapala su biljna ili životinjska ulja poput suncokretova ulja ili ulja iz riblje jetre. Pripravci se mogu načiniti bilo kao suhe ili kao mokre granule. Za parenteralnu primjenu (potkožna, intravenska, intraarterijska ili intramuskularna injekcija), kemoprevencijska sredstva ili njihovi fiziološki podnošljivi derivati poput soli, estera, N-oksida i sličnih se prevode u otopine, suspenziju ili emulziju, ukoliko se želi s tvarima uobičajenima i prikladnima za ovu svrhu, na primjer sa solubilizatorima ili s drugim pomoćnim tvarima. Primjeri su: sterilne tekućine poput vode i ulja, sa ili bez dodavanja surfaktanta i drugih farmaceutski prihvatljivih adjuvansa. Ilustracije radi, ulja su naftnog, životinjskog, biljnog ili sintetičkog porijekla, na pr. kikirikijevo ulje, sojino ulje, ili mineralno ulje. Općenito, voda, fiziološka otopina, vodena otopina dekstroze i srodne otopine šećera kao i glikoli poput propilen glikola ili polietilen glikola su preporučeni tekući nosači, posebno za otopine za injiciranje.

Priprava farmaceutskih pripravaka koji sadrže aktivni sastojak dobro je poznata u struci. Tipično, takvi pripravci se pripremaju u obliku aerosola polipeptida koji se dovodi u nazofarinks ili kao pripravci za injiciranje, bilo kao otopine tekućina ili suspenzije; međutim, mogu se pripremiti i kruti oblici prikladni za otapanje ili suspendiranje u tekućini prije injiciranja. Pripravci također mogu biti emulgirani. Aktivni terapijski sastojak se često miješa s ekscipijensima koji su farmaceutski prihvatljivi i kompatibilni s aktivnim sastojkom. Prikladni ekscipijensi su, na primjer, voda, fiziološka otopina, dekstroza, glicerol, etanol i slični, kao i njihove kombinacije. Uz to, po želji pripravak može sadržavati manje

količine pomoćnih tvari, kao što su sredstva za ovlaživanje ili emulgiranje, sredstva za puferiranje pH, koja povećavaju učinkovitost aktivnog sastojka.

Aktivni sastojak može se formulirati u pripravak u obliku neutraliziranih farmaceutski prihvatljivih soli. Farmaceutski prihvatljive soli uključuju kisele adicijske soli (oblikuju se sa slobodnim amino skupinama polipeptidne molekule ili molekule protulijeka) koje se tvore s neorganskim kiselinama poput, na primjer, kloridne ili fosfatne kiseline, ili takvih organskih kiselina kao što su octena, oksalna, tartarna, mandelična i slične. Soli oblikovane od slobodnih karboksilnih skupina također mogu biti izvedene iz neorganskih baza kao što su, na primjer, natrijev, kalijev, amonijev, kalcijev ili željezni hidroksid, i takvih organskih baza kao što su izopropilamin, trimetilamin, 2-etilamino etanol, histidin, prokain i slični.

Za lokalnu primjenu na površine tijela pomoću, na primjer, krema, gelova, kapi i sličnog, kemoprevencijska sredstva ili njihovi fiziološki podnošljivi derivati poput soli, estera, N-oksida i sličnog pripremaju se i primijenjuju kao otopine, suspenzije ili emulzije u fiziološki prihvatljivom sredstvu za razrjeđivanje sa ili bez farmaceutskog nosača.

U slijedećem obliku, aktivni spoj može se dostaviti u mjehuriću, poglavito u liposomu (vidi *Langer, Science 249:1527-1533 (1990)*; *Treat i sur., u Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (ur.), Liss, New York, str. 353-365 (1989)*; *Lopez-Berestein, isto, str. 317-327*; općenito, vidi isti izvor).

Farmaceutski pripravci ovog izuma osobito su korisni za liječenje osobe koja ima povišen rizik za razvoj raka prostate. Osobe s visokim rizikom uključuju, na primjer, one s benignom hiperplazijom prostate, intraepitelnom neoplazijom prostate (PIN) ili abnormalno visokom razinom cirkulirajućeg prostata-specifičnog antigena (PSA), ili onih s karcinomom prostate u obitelji.

Nadalje, sredstvo za kemoprevenciju u prostati može se primijeniti u kombinaciji s drugim citokinima ili čimbenicima rasta, uključujući, bez ograničenja: IFN- γ ili α , IFN- β ; interleukin (IL) 1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, čimbenik nekroze tumora (TNF) α , TNF- β , čimbenik stimuliranja kolonije granulocita (G-CSF); granulocitni/makrofagni CSF (GM-CSF); pomoćne molekule, uključujući članove integrinske nadobitelji i članove Ig nadobitelji poput, bez ograničenja, LFA-1, LFA-3, CD22 i B7-1, B7-2 i ICAM-1 molekule za sustimulaciju T-stanica.

Kemoprevencijsko sredstvo može prethoditi ili slijediti nakon izlaganja sredstvu za oštećivanje DNA, u razmaku koji je u rasponu od minuta do tjedana. Protokoli i postupci poznati su upućenima u struku. Sredstva ili čimbenici za oštećivanje DNA poznati su upućenima u struku i podrazumijevaju svaki kemijski spoj ili postupak za liječenje koji potiče oštećenje DNA kada se primijeni na stanicu. Ovakva sredstva i čimbenici uključuju zračenje i valove koji dovode do oštećenja DNA poput gama-zračenja, X-zraka, UV-zračenja, mikrovalova, emisije elektrona i sličnog. Brojni kemijski spojevi, također opisani kao "kemoterapijska sredstva", djeluju tako što dovode do oštećenja DNA, a sva su od koristi pri kombiniranom liječenju ovdje opisanih postupaka. Kemoterapijska sredstva koja se razmatraju kao korisna uključuju, na primjer, adriamicin, 5-fluorouracil (5FU), etopozid (VP-16), kamptotecin, aktinomicin-D, mitomicin C, cisplatin (CDDP), čak i vodikov peroksid. Izum također uključuje uporabu kombinacije jednog ili više sredstava za oštećivanje DNA, temeljenih bilo na zračenju, bilo na ovim spojevima, kao što je uporaba X-zraka s cisplatinom ili uporaba cisplatina s etopozidom.

U daljnjem obliku, lokalizirano sijelo tumora može se zračiti sa zračenjem koje dovodi do oštećenja DNA, kao što su X-zrake, UV-zrake, gama-zrake ili čak mikrovalovi. Alternativno, tumorske stanice mogu se dovesti u dodir sa sredstvom za oštećivanje DNA primjenom na osobu terapijski učinkovite količine farmaceutskog pripravka koji sadrži spoj za oštećivanje DNA poput adriamicina, 5-fluorouracila, etopozida, kamptotecina, aktinomicina-D, mitomicina C, ili preporučljivije, cisplatina. Sredstva koja oštećuju DNA također uključuju spojeve koji ometaju replikaciju DNA, mitozu i razdvajanje kromosoma. Ovi kemoterapijski spojevi uključuju adriamicin, poznat i kao doksorubicin, etopozid, verapamil, podofilotoksin i slične.

Često se koriste i drugi čimbenici koji uzrokuju oštećenje DNA, uključujući ono što je općenito poznato kao gama-zrake, X-zrake i/ili usmjereno dostavljanje radioizotopa do tumorskih stanica. Razmatraju se i drugi oblici čimbenika za oštećivanje DNA, poput mikrovalova i UV-zračenja. Najvjerojatnije je da svi čimbenici uzrokuju opsežna oštećenja DNA, na prethodnicima DNA, umnožavanju i popravku DNA, kao i na slaganju i održavanju kromosoma.

Kao što će stručnjak s prosječnim iskustvom lako uočiti, postupci i farmaceutski pripravci ovog izuma posebno su prikladni za primjenu na sisavce, preporučljivo na ljude.

Bioobilježivači međuzavršnih točaka su mjerljive biološke promjene u tkivu koje nastaju između inicijacije i razvitka očite neoplazije. Pretpostavlja se kako modulacija jednog ili više bioobilježivača međuzavršnih točaka

kemoprevencijskim sredstvom može odražavati pravu inhibiciju karcinogeneze. Bioobilježivač se može vrednovati ako je konačna, završna točka, pojava raka, također smanjena pretpostavljenim kemoprevencijskim sredstvom. Međuspojni bioobilježivači u raku mogu biti klasificirani u slijedeće skupine: histološki, proliferacijski, diferencijacijski i biokemijski obilježivači. U svakoj kemoprevencijskoj strategiji, dostupnost histološki prepoznatljivih i prihvaćenih prekanceroznih lezija predstavlja važnu polaznu točku. Za prostatu, mogući histološki obilježivač je intraepitelna neoplazija prostate (PIN), koja je prekancerozni prethodnik adenokarcinoma prostate. PIN se javlja kao abnormalna proliferacija unutar prostatičkih duktusa u premalignim žarištima stanične displazije i karcinoma *in situ* bez stromalne invazije. PIN i histološki rak prostate su morfološki i fenotipski slični. Prema tome, razvoj PIN-a visokog stupnja može predstavljati važan korak u putu napredovanja pri čemu normalna prostata razvija PIN, histološki rak prostate, invazivni klinički rak prostate i metastaze.

Slijedeći primjeri izloženi su radi potpunijeg prikaza preporučenih oblika izuma. Međutim, oni ne smiju ni na koji način biti shvaćeni kao ograničavajući za širinu izuma.

ODJELJAK O EKPERIMENTALNIM POJEDINOSTIMA

Primjer 1: Transgenički adenokarcinom miše prostate

Ispitivanje kemoprevencije raka prostate otežano je manjkom odgovarajućih životinjskih modela. Nedavno otkriće modela transgeničkog adenokarcinoma miše prostate (TRAMP) omogućuje istraživanje kemoprevencije. U TRAMP modelu, koji su opisali Greenberg i sur., "*Prostate cancer in a transgenic mouse*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, str. 3439-3443, PB-SV40 veliki T antigen (PB-Tag) transgen se eksprimira specifično u epitelnim stanicama miše prostate. Kao posljedica toga, ovaj model ima nekoliko prednosti pred sada postojećim modelima: 1) miševi razvijaju progresivne oblike epitelne hiperplazije prostate već s 10 tjedana, a invazivni adenokarcinom s oko 18 tjedana starosti; 2) obrazac metastatskog širenja raka prostate oponaša ljudski rak prostate s tipičnim metastaziranjem u limfne čvorove, pluća, bubreg, nadbubrežnu žlijezdu i kost; 3) razvoj i napredovanje raka prostate može se pratiti u relativno kratkom razdoblju od 10 do 30 tjedana; 4) tumori se javljaju sa 100%-tnom učestalosti; i 5) životinje se mogu probati na nazočnost transgena raka prostate prije nastupa kliničkog raka prostate čime se izravno ispituje liječenje sa sredstvima za kemoprevenciju koja mogu izmijeniti karcinogenezu u prostati.

TRAMP model transgeničkog miša je odličan *in vivo* model za određivanje mehanizama inicijacije i promocije raka prostate i za ispitivanje učinkovitosti potencijalnih sredstava za kemoprevenciju. Ovi miševi progresivno razvijaju epitelnu hiperplaziju prostate, PIN, i potom rak prostate unutar kratkog razdoblja (<17 tjedana).

Kemoprevencijsko liječenje hibridnih TRAMP miševa započinje se 30 dana nakon rođenja, pomoću kemoprevencijskih sredstava u količini od oko 0.5-50 mg/kg težine subjekta dnevno, preporučljivo oko 6-30 mg/kg težine subjekta dnevno. Kemoprevencijska sredstva se obično oblikuju u 21-dnevne i 90-dnevne pelete (pripravljaju ih tvrtka Innovative Research of America, Sarasota, FL) i postavljaju kao potkožni implantati. Kontrolne životinje primaju placebo implantate. U svakoj skupini koja se liječi lijekom, životinje se žrtvuju u dobi od 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40 i 50 tjedana do razvoja palpabilnog tumora. Krv se prikupi i pulira prema vremenu liječenja kako bi se procijenile promjene u serumskom testosteronu i estradiolu. Tkiva prostate se prikupe za morfološka, histološka i molekularna ispitivanja.

U ispitivanju se koriste slijedeći postupci:

- 1) Analiza potpunih rezova prostate provodi se serijski kako bi se ustanovile promjene u duktalnoj morfologiji prostate tijekom vremena, uz ili bez liječenja; primjeri su prikazani na Sl. 2. Tkivni rezovi se procjenjuju histološki H&E i Masson-trihom standardnim bojenjem. Ocjenjuje se pojava PIN-a i ista se stupnjuje (I-bлага do III-teška).
- 2) Razine serumskog estradiola i ukupnog testosterona se mjere (RIA) za svaki dobni interval, kako bi se procijenila svaka promjena ovih hormona nastala kao posljedica kemoprevencijskih sredstava.

Primjer 2: Analiza imunohistokemijskih podataka

Mikroskopske slike svakog tkivnog reza se ocjenjuju računalnom (Mac9500-I 32 računalo i monitor) kvantifikacijom slike (NIH-Image 1.6PPC), uz pomoć Kodak DCS 460 kamere na Nikon-Microphot-FX mikroskopu i kvantificiraju pomoću bojanog kvantifikacijskog sustava za analizu slike (IPLab Spectrum 3.1, Scanalytics, Inc., VA) koji razlučuje razlike u boji obojenih tkivnih rezova. Prag se podesi tako da se uoče različiti sastojci tkiva prostate. Gustoće površinskih točaka koje odgovaraju svakom od ovih sastojaka tkiva se izračunaju za svaki cijeli ekran monitora u boji. Uzima se prosjek od ukupno 5 ekrana po rezu prostate. Imunohistokemijske slike mogu se digitalizirati i kvantificirati da se omogući statistička analiza određivanjem koeficijenta korelacije i vjerojatnosti u uzorku (*2-tailed*).

Primjer 3: Ispitivanje kemoprevencijske aktivnosti

Provedeno je ispitivanje kako bi se ustanovila učinkovitost kemoprevencijskih sredstava u TRAMP transgeničkih životinja (PBTg X FVBwt)(dobiven od Dr. Normana Greenberga, Baylor College of Medicine, TX). Ovi miševi pokazali su preliminarne znakove raka već s 10 tjedana. TRAMP transgenička muška mladunčad pregledaju se na veliki T ag transgen i pozitivni mužjaci se koriste u ispitivanju. Toremifen, antiestrogen čiji se mogući kemoprevencijski učinci ispituju, se ugradi u prilagođene pelete (Innovative Research of America, Sarasota, FL) i kemoprevencijsko liječenje miševa se započne 30-og dana po rođenju (prosječna težina miševa 14 g). U četiri skupine od po 10-12 životinja svaka primi potkožne implantate peleta koje sadrže toremifen s 90-dnevnim oslobađanjem. Difuzibilno doziranje lijeka, podešeno za promjene težine vezane za rast, prilagođeno je tako da dostavi bilo nisku dozu (6 mg/kg), bilo visoku dozu (30 mg/kg) toremifena. Kontrolne životinje (n=10) primile su placebo implantate. Učinkovitost liječenja mjerena je odsutnošću palpabilne tumorske tvorbe. Tumori mišjih prostata su prikupljeni i ispitani molekularnim i histološkim tehnikama.

Pomoću TRAMP transgeničnog modela raka prostate, u kojem svaka životinja koja naslijedi gen za rak prostate razvije rak prostate, pokazalo se kako toremifen i produljava latenciju i smanjuje incidenciju raka prostate.

Kao što je prikazano na Slici 1, učinci i niske i visoke doze toremifena bili su učinkoviti. Stvaranje tumora u ventralnoj prostati TRAMP miševa zabilježeno je sa 17 tjedana u placebo skupini (n=10), sa 19 tjedana u skupini liječenoj visokom dozom toremifena (n=12), te sa 28 tjedana u skupini liječenoj niskom dozom toremifena (n=12). Prema tome, 5 liječenja toremifenom značajno je produljilo, do 11 tjedana, razdoblje latencije za razvoj raka u ventralnoj prostati TRAMP miševa.

Kako životinje liječene toremifenom nisu dostigle 50%-tnu točku razvoja tumora tijekom trajanja ispitivanja, između skupina je uspoređivano vrijeme u kojem je 25% životinja imalo tumore. Tumori su bili palpabilni u 25% od 10 životinja do 23. tjedna u placebo skupini, te do 30-31. tjedna u skupinama s visokim i niskim dozama toremifena, što je kasnije od 7-8 tjedana. Obje toremifenske skupine, s niskim i s visokim dozama, u usporedbi s placebom su bile značajne temeljem log rank i Wilcoxonove statističke analize, kao što je prikazano na Tablici 1 koja slijedi.

Tablica 1 - statistička analiza

	log-rank P	Wilcoxon p
niski toremifen vs. placebo	0.0003*	0.0004*
visoki toremifen vs. placebo	0.0017*	0.0071*

*značajnost $P < 0.05$

U 33. tjednu, u vremenu kada su sve kontrolne životinje razvile tumore, 72% životinja u skupini liječenoj s niskom dozom toremifena i 60% njih u skupini liječenoj s visokom dozom i dalje su bile bez tumora. Prema tome, liječenje toremifenom, i u niskim i u visokim dozama dovelo je do značajnog smanjenja pojave tumora u ventralnoj prostati TRAMP miševa.

Ovi rezultati, dobiveni u skladu s ovim izumom, nisu se mogli predvidjeti prema rezultatima koji su objavljeni u gore spomenutom članku čiji su autori Lucia i sur., koji opisuje primjenu na dvije razine doze tamoksifena, bliskog strukturnog analoga toremifena, na Lobund-Wistar štakore koji imaju karcinome prostate inducirane primjenom kombinacije inicijatora i promotora. U referenci Lucie i sur., izvješćuje se kako je samo 22-26% životinja koje su primale nižu dozu i samo 32-50% životinja koje su primalu višu dozu tamoksifena bilo bez tumora u prednjoj prostati. Treba primijetiti kako prednja prostata u glodavaca, za razliku od ventralne prostate, nema odgovarajućeg segmenta u prostati čovjeka.

Lucia i sur. nadalje tvrde kako kombinacija inicijator-promotor korištena u opisanim postupcima, iako je učinkovita u indukciji raka u prednjoj prostati ispitivanih životinja, nije inducirala karcinome u ventralnoj prostati. Stoga ne postoji temelj za očekivanje kemoprevencijskog učinka na tumore u ventralnoj prostati primjenom tamoksifena na Lobund-Wistar štakore ili na ljude.

Kao što je već spomenuto, primjena toremifena dovodi do značajnog kemoprevencijskog učinka protiv tumora u ventralnoj prostati TRAMP miševa. Ovaj rezultat je ohrabrujući u pogledu sličnih povoljnih učinaka na ljude, čija prostata nema segment koji odgovara ventralnoj prostati sisavaca.

Primjer 4: Histološko ispitivanje tkiva prostate

Tumori iz placebo i skupina liječenih visokom dozom toremifena, koji su prikupljeni u trenutku kada su postali palpabilni, pregledani su histološki. Slika 2A je H&E rez ventralne prostate normalnog odraslog miša u dobi od 17 tjedana. Slika 2B, rez ventralne prostate placebo liječenog TRAMP miša u dobi od 16 tjedana, prikazuje kako, za razliku od normalne strukture prostate prikazane na Slici 2A, ventralna prostata TRAMP miša ima polja nediferenciranih, anaplastičkih stanica visokog mitotičkog indeksa. Nasuprot tome, kao što je prikazano na Slici 2C, prostata toremifenom liječenog TRAMP miša u dobi od 30 tjedana zadržava većinu normalne žlijezdane arhitekture ha tumora s diferenciranim strukturom, a mitotički indeks je znatno niži nego u životinja liječenih placebo. Ovi rezultati ukazuju na to da toremifen, čak i u niskim dozama, može potisnuti karcinogenezu u prostati u TRAMP modelu.

Primjer 5: Uporaba kemoprevencijske učinkovitosti toremifena protiv raka prostate u modelu TRAMP miša

Ovaj pokus potvrđuje i pokazuje kemoprevencijsku učinkovitost toremifena. Ovo ispitivanje usmjereno je na histološke i molekulske promjene povezane s razvojem tumora prostate u kontrolnih životinja i na mehanizam kemoprevencijskog djelovanja toremifena s TRAMP životinjama koje su okočene, pregledane i liječene s peletama za produljeno oslobađanje lijeka. U unaprijed određena vremena, skupine od 5 životinja su žrtvovane, a prostate su im izvađene radi analize. U prostatama je promatrana nazočnost tumora histološki, cjelokupnim rezovima i imunohistokemijom na veliki T antigen. Do danas, dovršeno je liječenje placebo i toremifenom sa 7, 10, 15 i 20 tjedana, a rezultati su opisani dolje.

Rezultati: Prikupljeni su cjelokupni rezovi prostate u dobi od 7, 10, 15 i 20 tjedana za različite skupine. Analiza cjelokupnih rezova otkrila je kako su miševi liječeni placebo razvili tumore prostate u dobi od 15-20 tjedana, što je slično prethodnom pilot ispitivanju. Nadalje, životinje liječene toremifenom imale su odgodu pojave raka prostate i do 20 tjedana (Slika 3). Do 20. tjedna, postoji izrazita odgoda pojave tumora u skupini liječenoj toremifenom do 35 tjedana (Slika 4). Ovi podaci potvrđuju da je čak i uz osjetljiviju procjenu tumorogenosti toremifen pokazao kemoprevencijsko djelovanje. Za histološku procjenu, uzorci tkiva su fiksirani, procesirani i uklopljeni u parafin. Rezani su rezovi (debljine 5µm) i obojeni uobičajenom H&E metodom. Toremifen je inhibirao duktalni razvoj i diferencijaciju tkiva (usporedi tumore prostate TRAMP miševa u dobi od 17 tjedana vs. divljeg tipa (Slika 4); b) histologiju prostate liječene toremifenom vs. placebo u dobi od 15 tjedana (Slika 5). Kvalitativno, imunohistokemija placebo i toremifenom liječenih tkiva pokazala je nazočnost T-antigena u ventralnoj prostati. Prema tome, izgleda kako kemoprevencijsko djelovanje koje je opaženo kod toremifena nije posredovano supresijom probazina, promotora u TRAMP modelu.

Zaključci: Sposobnost toremifena da spriječi pojavu raka prostate u TRAMP modelu potvrđena je uporabom osjetljivijih tehnika za uočavanje stvaranja tumora. Izgleda kako mehanizam kemoprevencijskih učinaka toremifena nije posredovan gubitkom transgena za veliki T-antigen protein.

Primjer 6: Toremifen potiče povlačenje postojećeg raka ljudske prostate u modelu golih miševa

Rak prostate i dalje je danas najčešće dijagnosticirani rak u američkih muškaraca. Međutim, ostaju pitanja etiologije i liječenja ove bolesti, posebno u uznapredovalim oblicima. Hormonsko liječenje i dalje je standardni postupak liječenja rekurentnog i uznapredovalog raka prostate, unatoč čestom razvoju otpornosti bolesti na hormone. Stoga su potrebni novi pristupi sprečavanju i liječenju raka prostate, kako bi se pomoglo rastućem broju muškaraca u kojih je bolest ustanovljena. Dolje prikazani pokusi i rezultati pokazuju da toremifen potiskuje rast hormonski ovisnog LNCaP tumora u atimičnih golih miševa.

Materijal i metode: Jedan milijun LNCaP stanica u Matrigelu potkožno je injicirano u obje slabine atimičnih golih miševa. Ukupno je injicirano 40 miševa. Nakon približno 3-4 tjedna, razvili su se vidljivi tumori. Nakon registriranja veličine tumora u dvije dimenzije, miševi su podijeljeni u placebo i liječene skupine, prema ekvivalentu opterećenja tumorom. Jedna peleta (placebo vs. 35 mg toremifena) se potkožno implantira između lopatica svakog miša. Tjedna mjerenja veličine tumora su bilježena. Izračunat je volumen tumora ($\text{volumen tumora} = 0.5(L+W) \times L \times W \times 0.5236$, pri čemu je L= duljina tumora, a W=širina tumora). Volumen tumora u vrijeme implantacije pelete služio je kao referentna točka za buduće usporedbe promjena veličine tog tumora. Tjedne promjene volumena svakog tumora su bilježene u obliku postotka razlike od izvornog mjerenja pri implantaciji pelete.

Rezultati: Dva su miša umrla ubrzo nakon implantacije pelete, od smrtonosnih rana koje su im nanijeli drugi miševi. Jedan od miševa liječenih toremifenom isključen je iz ispitivanja zbog opsežnog krvarenja u tumor i razvoja hematoma. Svi su miševi razvili vidljive tumore, jednostrano ili obostrano. Svaki je tumor zasebice praćen tijekom trajanja ispitivanja. Dvadesetčetiri tumora liječeno je placebo, a 28 tumora je liječeno toremifenom. Rezultati su prikazani u Tablici 2 i na Slici 6A i 6B.

Tablica 2

PLACEBO SKUPINA

Tjedan	N=	% promjene volumena u odnosu na nulti dan liječenja
3	11	9.44
4	8	115.27
5	8	271.71
6	8	600.88

TOREMIFEN

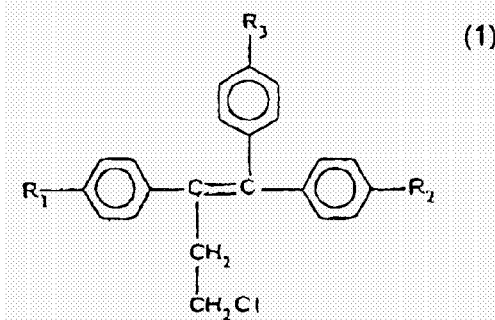
Tjedan	N=	% promjene volumena u odnosu na nulti dan liječenja
3	11	-34.58
4	7	-61.01
5	7	-74.51
6	5	-61.72

Interval praćenja opisanog uzorka bit će produljen, a u tijeku je prikupljanje podataka o dodatnim životinjama.

Zaključak: Toremifen inhibira i dovodi do povlačenja postojećih LNCaP tumora. Iako je mehanizam kojim toremifen dovodi do tog učinka nepoznat, sposobnost postizanja tih učinaka podupire uporabu toremifena za liječenje raka prostate i za sprečavanje ponovne pojave raka prostate u visoko rizičnih bolesnika s postojećim mikrometastazama raka prostate.

PATENTNI ZAHTEJEVI

- Postupak za sprečavanje karcinogeneze u prostati, **naznačen time**, što obuhvaća: primjenu na subjekt-sisavca farmaceutskog pripravka koji sadrži sredstvo za kemoprevenciju čija je formula:

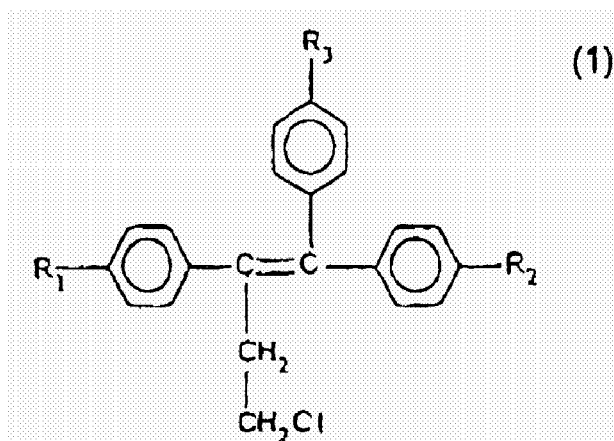


pri čemu su R_1 i R_2 , koji mogu biti isti ili različiti, H ili OH, R_3 je $OCH_2CH_2NR_4R_5$, pri čemu R_4 i R_5 , koji mogu biti isti ili različiti, su H ili alkilna skupina od 1 do oko 4 atoma ugljika;

i njegove farmaceutski prihvatljive soli, estere ili N-oksidi, kao i njihove smjese.

- Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što spomenuti farmaceutski pripravak sadrži i farmaceutski prihvatljiv nosač.
- Postupak prema zahtjevu 2, **naznačen time**, što je spomenuti nosač odabran iz skupine koja obuhvaća gumu, škrob, šećer, celuloznu tvar i njihove smjese.
- Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što spomenuta primjena obuhvaća: potkožno usadivanje spomenutom subjektu pelete koja sadrži spomenuti farmaceutski pripravak.
- Postupak prema zahtjevu 4, **naznačen time**, što spomenuta peleta omogućuje kontrolirano otpuštanje spomenutog farmaceutskog pripravka tijekom određenog vremena.
- Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što je spomenuta primjena intravensko, intraarterijsko ili intramuskularno injiciranje u spomenuti subjekt spomenutog farmaceutskog pripravka u tekućem obliku.
- Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što je spomenuta primjena peroralna primjena na spomenuti subjekt tekućeg ili krutog pripravka koji sadrži spomenuti farmaceutski pripravak.
- Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što je spomenuta primjena lokalna primjena na površinu kože spomenutog subjekta spomenutog farmaceutskog pripravka.
- Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što je spomenuti farmaceutski pripravak odabran iz skupine koja se sastoji od pelete, tablete, kapsule, otopine, suspenzije, emulzije, eliksira, gela, kreme i supozitorija.
- Postupak prema zahtjevu 9, **naznačen time**, što je spomenuti supozitorij rektalni supozitorij ili uretralni supozitorij.
- Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što je spomenuti farmaceutski pripravak parenteralna formulacija.

12. Postupak prema zahtjevu 11, **naznačen time**, što spomenuta parenteralna formulacija sadrži liposom koji sadrži kompleks spomenutog kemoprevencijskog sredstva i ciklodekstrinskog spoja.
13. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što spomenuto kemoprevencijsko sredstvo sadrži toremifen, njegov N-oksid, farmaceutski prihvatljive soli i njihove smjese.
14. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što se spomenuta primjena provodi u dozi od oko 0.5 mg/kg težine subjekta dnevno do oko 50 mg/kg težine subjekta dnevno spomenutog kemoprevencijskog sredstva.
15. Postupak prema zahtjevu 14, **naznačen time**, što se spomenuta primjena provodi u dozi od oko 6 mg/kg težine subjekta dnevno do oko 30 mg/kg težine subjekta dnevno spomenutog kemoprevencijskog sredstva.
16. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što spomenuti subjekt ima povećan rizik od raka prostate.
17. Postupak prema zahtjevu 16, **naznačen time**, što spomenuti subjekt ima benignu hiperplaziju prostate, intraepitelnu neoplaziju prostate (PIN) ili abnormalno visoku razinu cirkulirajućeg prostata-specifičnog antigena (PSA).
18. Postupak za sprečavanje ponovne pojave, suzbijanje ili potiskivanje karcinogeneze u prostati ili povećavanje preživljenja subjekta oboljelog od raka prostate, **naznačen time**, što obuhvaća: primjenu na subjekt-sisavca farmaceutskog pripravka koji sadrži kemoprevencijsko sredstvo formule:

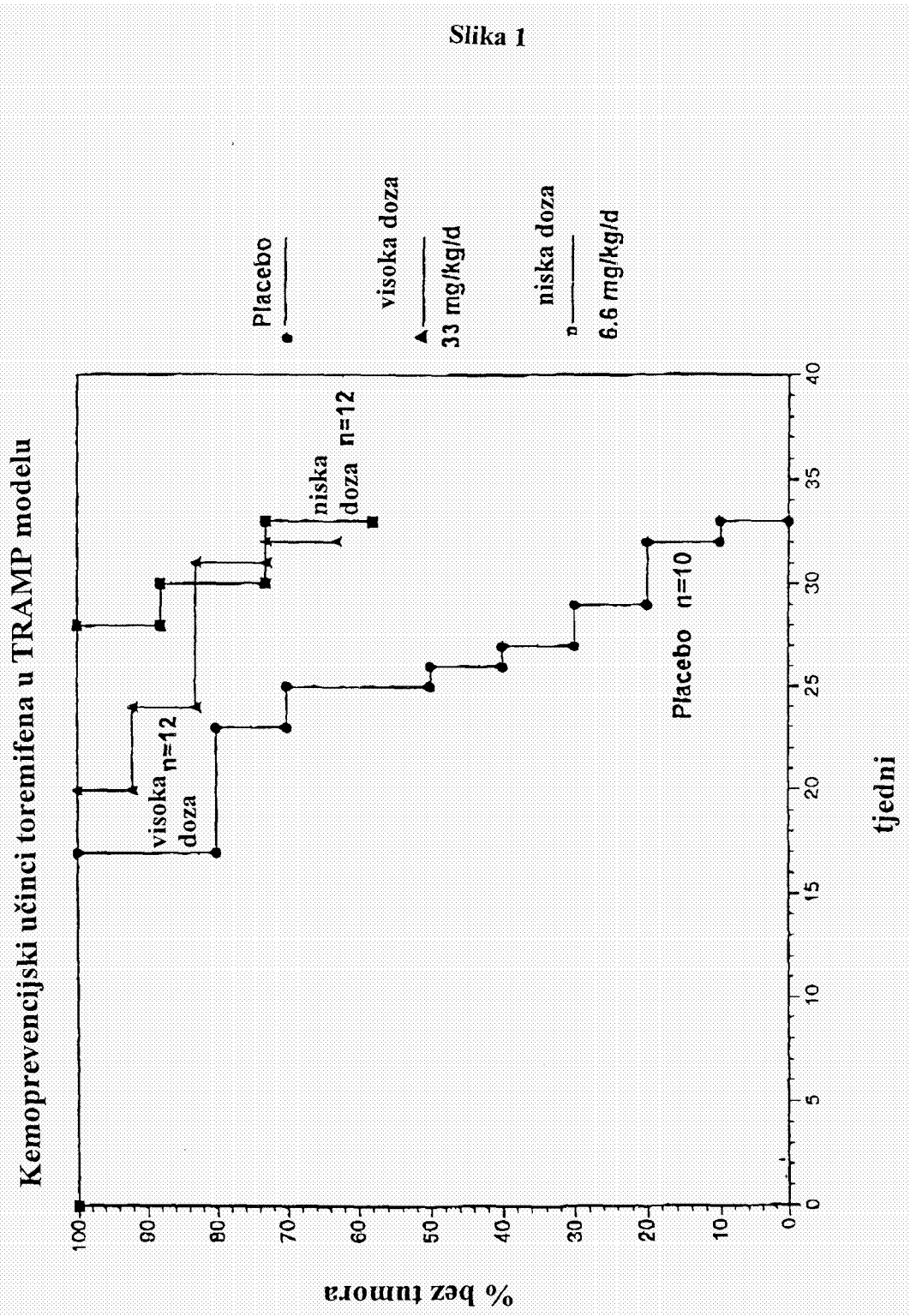


pri čemu su R_1 i R_2 , koji mogu biti isti ili različiti, H ili OH, R_3 je $OCH_2CH_2NR_4R_5$, pri čemu su R_4 i R_5 , koji mogu biti isti ili različiti, H ili alkilna skupina od 1 do oko 4 atoma ugljika;

i njegove farmaceutski prihvatljive soli, estere ili N-okside, kao i njihove smjese.

SAŽETAK

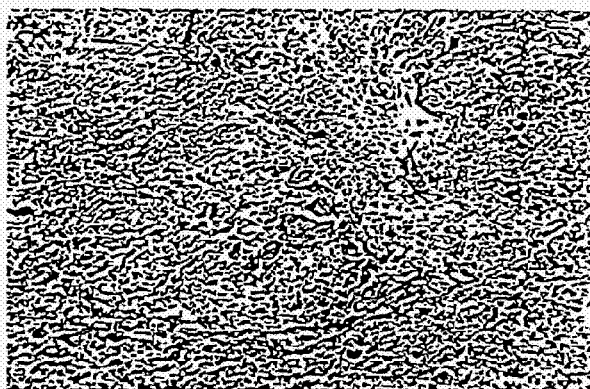
Izum opisuje kemoprevenciju raka prostate, točnije, postupak primjene na pojedinca učinkovite doze sredstva za kemoprevenciju, toremifena i njegovih analoga ili metabolita, u svrhu sprečavanja ponovne pojave, suzbijanja ili inhibicije karcinogeneze u prostati. Ovaj izum opisuje siguran i učinkovit postupak za suzbijanje ili inhibiranje latentnog raka prostate, a posebno je učinkovit za liječenje pojedinaca koji imaju povećan rizik za razvoj karcinoma prostate, na primjer onih koji imaju benignu hiperplaziju prostate, intraepitelnu neoplaziju prostate (PIN) ili nenormalno visoku razinu cirkulirajućih protutijela na prostata-specifični antigen (PSA), ili onih s karcinomom prostate u obitelji.



Slika 2



A. Ventralna prostata normalnog odraslog miša od 17 tj.
(pov. 200x)

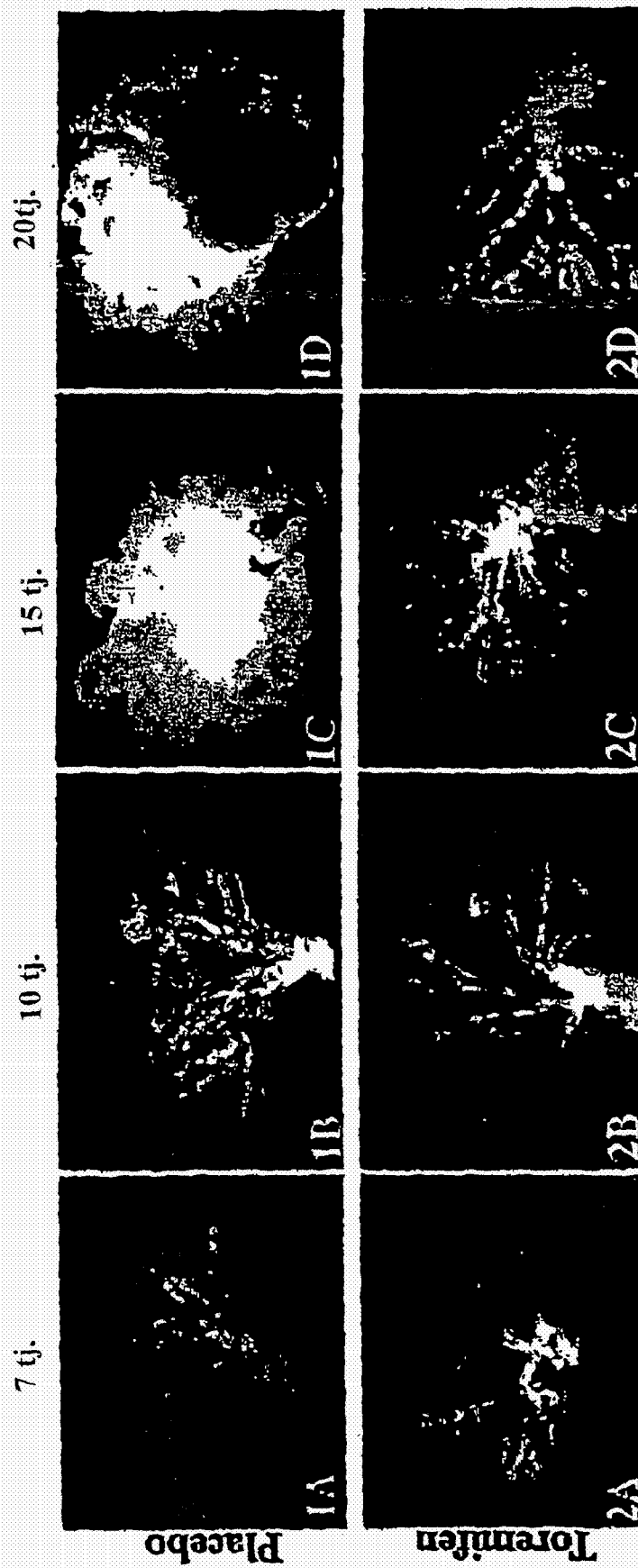


B. Adenokarcinom prostate u TRAMP miša od 16 tj.
liječenog placebom (pov. 200x)

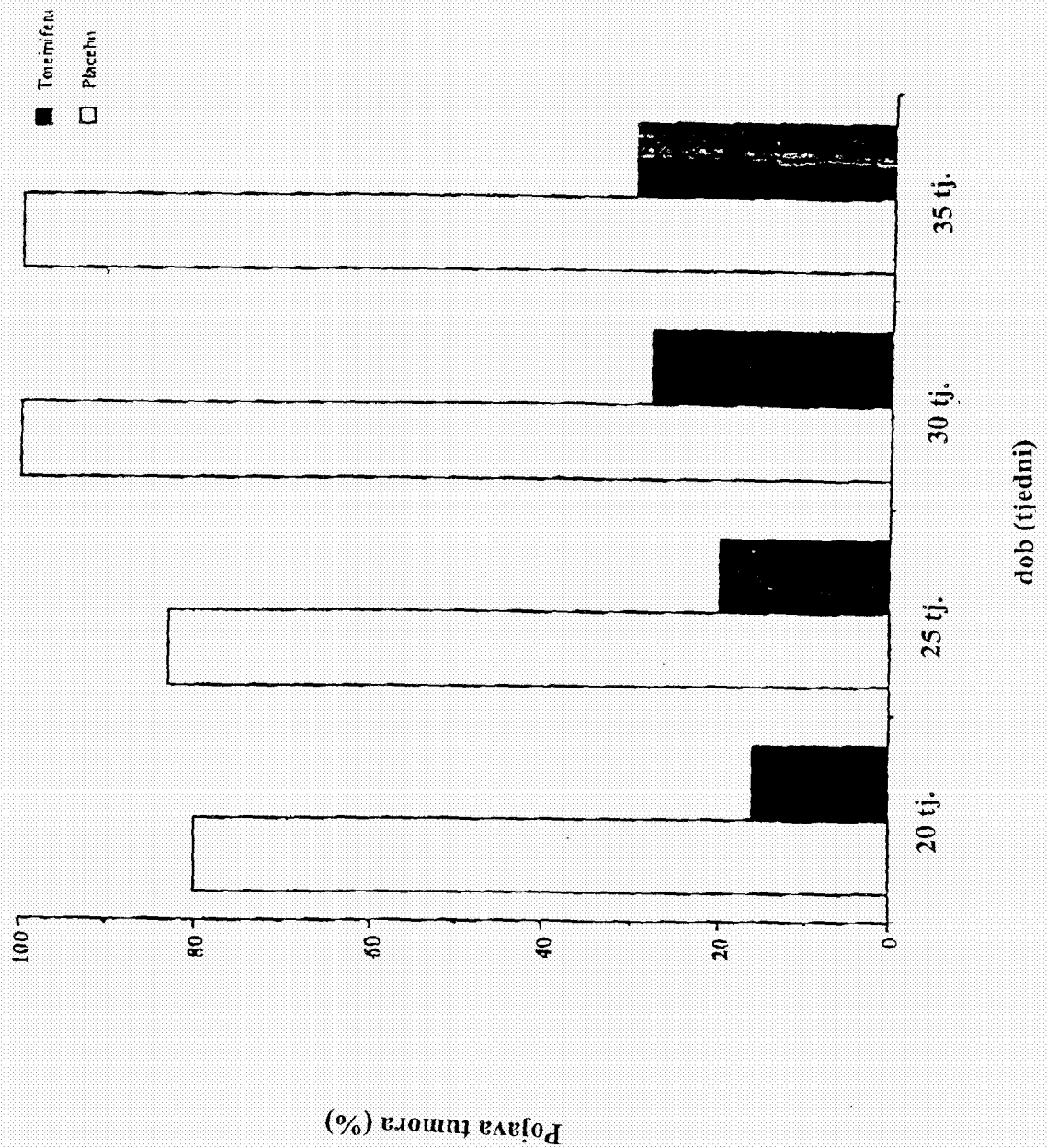


C. Adenokarcinom prostate u TRAMP miša od 30 tj.
liječenog toremifenom (pov. 200x)

Učinak toremifena na razvoj ventralne prostate u TRAMP miša



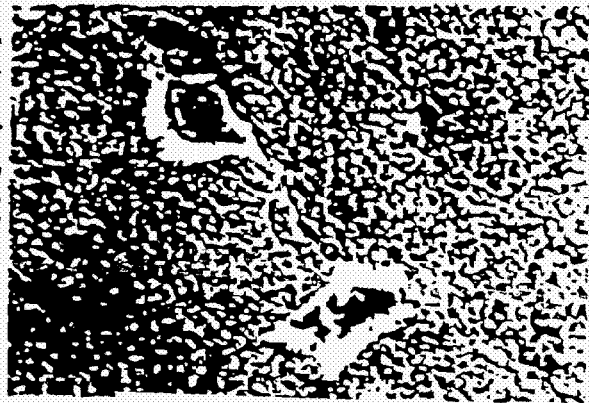
Slika 4





divlji tip -VP-17 tj.

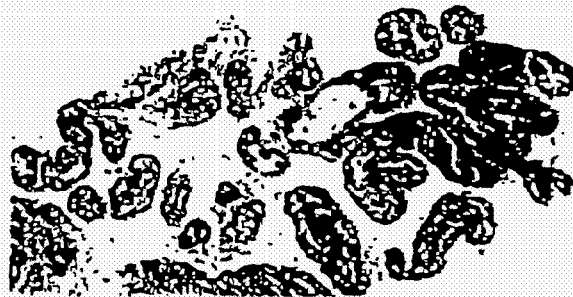
7 tj.



TRAMP-VP-17 tj.

15 tj.

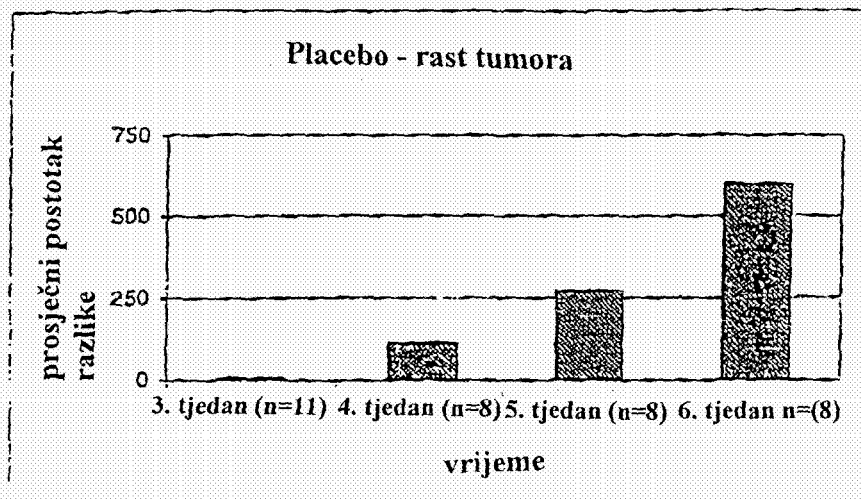
Placebo



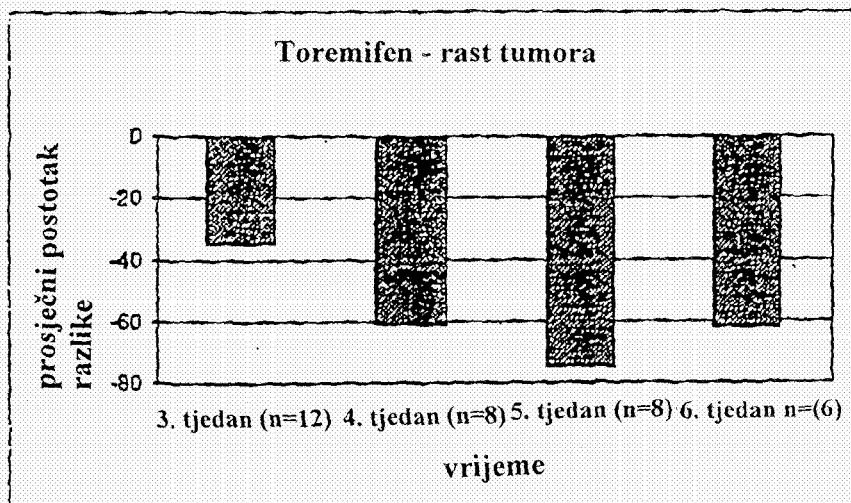
Toremifen



Slika 6



vrijeme nakon liječenja	% promjene u odnosu na dan 0
3. tjedan (n=11)	9.44
4. tjedan (n=8)	115.27
5. tjedan (n=8)	271.71
6. tjedan (n=8)	600.88



vrijeme nakon liječenja	% promjene u odnosu na dan 0
3. tjedan (n=12)	-34.58
4. tjedan (n=8)	-61.01
5. tjedan (n=8)	-74.51
6. tjedan (n=6)	-61.72