

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 08.11.2000

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 08.11.1999 20.03.2000

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1999/436208 2000/531472

(33) Země priority: US US

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 12.02.2003
(Věstník č. 2/2003)

(86) PCT číslo: PCT/US00/30658

(87) PCT číslo zveřejnění: WO01/034117

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 1763

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 31/01

A 61 P 35/00

A 61 P 13/08

(71) Přihlašovatel:

THE UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH
CORPORATION, Knoxville, TN, US;

(72) Původce:

Steiner Mitchell S., Germantown, TN, US;
Raghow Sharan, Collierville, TN, US;

(74) Zástupce:

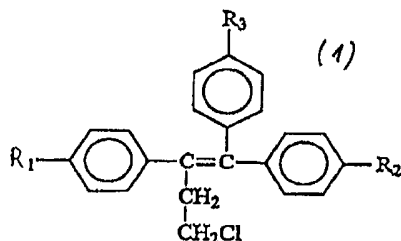
Guttmann Michal JUDr. Ing., Nad Štolou 12, Praha 7,
17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Léčivo pro prevenci a léčení karcinomu prostaty

(57) Anotace:

Použití anti-estrogenu, nebo jeho analogu, derivátu, izomeru a metabolitu nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí, esterů, N-oxidů nebo jejich směsí pro přípravu léčiva pro prevenci karcinogenese prostaty u jedince, pro zlepšení přežívání z jedince s karcinomem prostaty, nebo pro léčení jedince s karcinomem prostaty, za podmínky, že uvedený anti-estrogen je jiný než sloučenina vzorce 1, kde R_1 a R_2 , které mohou být stejné nebo různé, jsou H nebo OH, R_3 je $OCH_2CH_2NR_4R_5$, kde R_4 a R_5 , které mohou být stejné nebo různé, jsou H nebo alkylová skupina obsahující 1 až 4 atomy uhlíku.



(1)

Léčivo pro prevenci a léčení karcinomu prostaty

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká léčiva pro prevenci karcinogenese prostaty u jedince, pro zlepšení přežívání u jedince s karcinomem prostaty, nebo pro léčení jedince s karcinomem prostaty. Účinná látka působí preventivně proti karcinomu prostaty, brání recidivě, potlačuje nebo inhibuje karcinogenesi v prostatě a léčí karcinom prostaty.

Dosavadní stav techniky

Karcinom prostaty je jedním z nejčastěji se vyskytujících nádorů u mužů v USA a každý rok jsou diagnostikovány tisíce nových případů. Naneštěstí je více než 60% nově diagnostikovaných karcinomů prostaty v pokročilém stadiu, se špatnou prognosou bez šance na vyléčení. Jedním přístupem k řešení tohoto problému je časnější detekce karcinomu prostaty pomocí skríníngových programů, což by redukovalo počet pacientů s pokročilým nádorem. Jinou strategií je vývoj léků pro prevenci karcinomu prostaty. Jedna třetina mužů ve věku nad 50 let má latentní formu karcinomu prostaty, která se může aktivovat v život ohrožující klinickou formu karcinomu prostaty. Bylo prokázáno, že frekvence latentních karcinomů prostaty se významně zvyšuje s každou dekádou života od 50 (5,3-14%) do 90 (40-80%). Počet jedinců s latentním karcinomem prostaty je stejný ve všech kulturách, etnických skupinách a rasách, ale počet klinicky agresivních karcinomů je značně odlišný. Toto naznačuje, že faktory prostředí mohou mít vliv na aktivaci latentního karcinomu prostaty. Proto

může mít vývoj chemopreventivních strategií pro karcinom prostaty značný lékařský a ekonomický význam.

Toremifen je příkladem trifenylalkenové sloučeniny popsané v US patentech č. 4696949 a 5491173 (Toivola et al.), jejichž objevy jsou zde uvedeny jako odkazy. Parenterální a lokální podání prostředků obsahujících toremifen savcům je popsáno v US patentech č. 5571534 (Jalonen et al.) a 5605700 (DeGregorio et al.), jejichž objevy jsou zde uvedeny jako odkazy.

US patent č. 5595985 (Labrie), jehož objevy jsou zde uvedeny jako odkazy, také popisuje způsob pro léčbu benigní hyperplasie prostaty za použití inhibitoru 5 α -reduktasy a sloučeniny, která se váže na a blokuje přístup k androgenním receptorům. Jedním příkladem sloučeniny, která blokuje androgenní receptory, je flutamid.

US patenty č. 4329364 a 4474813 (Neri et al.), jejichž objevy jsou zde uvedeny jako odkazy, popisují farmaceutické přípravky obsahující flutamid určené pro oddálení vzniku a/nebo prevenci karcinomu prostaty. Přípravky mohou být ve formě kapslí, tablet, čípků nebo elixírů. I přes tyto pokroky trvá potřeba činidel a způsobů účinných pro prevenci karcinomu prostaty.

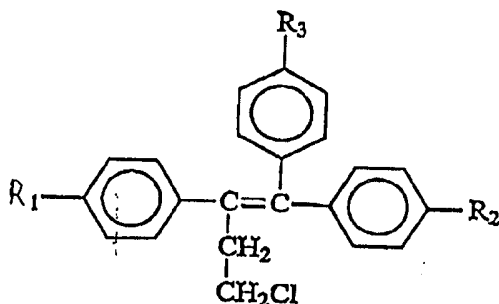
Vzhledem k vysoké incidenci a mortalitě karcinomu prostaty je vývoj chemopreventivních strategií proti této devastující nemoci imperativní. Pochopení faktorů, které přispívají ke karcinogenezi v prostatě, včetně iniciace, promoce a progresu karcinomu prostaty, poskytne molekulární cíle pro intervenci nebo prevenci nebo zastavení procesu karcinogeneze. Nové postupy jsou nutné jak v základním výzkumu, tak v klinice, kde tyto postupy sníží incidenci karcinomu prostaty a zastaví vývoj nebo způsobí regresi latentního karcinomu prostaty. Protože se frekvence karcinomu

prostaty dramaticky zvyšuje ve stejném věku, ve kterém jsou muži ohroženi jinými příčinami mortality, může být pouhé zpomalení progresu adenokarcinomu prostaty vhodnou a ekonomickou terapeutickou strategií. Překládaný vynález je zaměřen na splnění této potřeby.

Dále, protože prostatická intraepitelová neoplasie přímo předchází karcinomu prostaty a její přítomnost specificky ukazuje na vyšší riziko karcinomu prostaty, dochází u mužů s diagnostikovanou intraepitelovou neoplasí prostaty k dramatickým změnám v kvalitě jejich života. Jediným způsobem pro diagnostikování prostatické intraepitelové neoplasie je biopsie prostaty. Po diagnostikování prostatické intraepitelové neoplasie spočívá standardní léčba v tom, že pacient je častěji sledován lékařem a jsou častěji prováděny biopsie prostaty. Dále, pacienti a lékaři mají značné obavy, protože hrozí karcinom prostaty. V současnosti neexistuje léčba pro pacienty s prostatickou intraepitelovou neoplasí.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je použití anti-estrogenu, nebo jeho analogu, derivátu, izomeru a metabolitu nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí, esterů, N-oxidů nebo jejich směsi pro přípravu léčiva pro prevenci karcinogeneze prostaty u jedince, pro zlepšení přežívání u jedince s karcinomem prostaty, nebo pro léčení jedince s karcinomem prostaty; za podmínky, že uvedený anti-estrogen je jiný než sloučenina vzorce (1)



(1)

kde R_1 a R_2 , které mohou být stejné nebo různé, jsou H nebo OH, R_3 je $OCH_2CH_2NR_4R_5$, kde R_4 a R_5 , které mohou být stejné nebo různé, jsou H nebo alkylová skupina obsahující 1 až 4 atomy uhlíku.

Prevence karcinogenese prostaty u jedince se dosáhne snížením rizika vzniku karcinomu prostaty u jedince nebo snížením množství prekancerosních prekursorů karcinomu prostaty nebo karcinom prostaty je ošetřen supresí nebo inhibicí latentního karcinomu prostaty u jedince. Tento jedinec může mít prekancerosní prekursory adenokarcinomu prostaty a nemá přítomkarcinom prostaty.

Podle jednoho aspektu vynálezu prekancerosní prekursory adenokarcinomu prostaty jsou prostatická intraepitelová neoplasie (PIN). Podle jiného provedení vynálezu anti-estrogenem je selektivní modulátor estrogenového receptoru (SERM), trifenylethylen nebo trifenylalkan.

Farmaceutický přípravek obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič, přičemž uvedený nosič je vybrán ze skupiny zahrnující klovatinu, škrob, sacharid, celulosový materiál a jejich směsi. Léčivo se s výhodou podává jedinci podkožní implantací pelety obsahující uvedené léčivo, přičemž uvedená peleta poskytuje řízené uvolňování léčiva.

Podle jiného aspektu vynálezu se léčivo podává jedinci intravenosně, intraarteriálně nebo intramuskulárně injekcí v kapalně formě nebo se léčivo podává orálně v kapalně nebo pevném přípravku. Uvedené léčivo je vybráno ze skupiny zahrnující pelety, tablety, kapsle, roztoky, suspenze, emulze, elixíry, gely, krémy a čípky, přičemž čípek je rektální čípek nebo uretrální čípek. Uvedené léčivo může být rovněž parenterálním

přípravkem, který obsahuje liposom obsahující komplex uvedené anti-estrogenové sloučeniny a cyklodextrinové sloučeniny.

Uvedené léčivo se s výhodou podává v dávce přibližně 0,5 mg/kg hmotnosti jedince a den až přibližně 80 mg/kg hmotnosti jedince a den.

Toto řešení tedy poskytuje léčivo pro prevenci karcinogenese v prostatě, supresi nebo inhibici latentního karcinomu prostaty, a je zejména vhodný pro léčbu jedinců se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prostaty, jako jsou například jedinci s benigní hyperplasií prostaty, prostatickou intraepiteliální neoplasií (PIN) nebo abnormálně vysokými koncentracemi prostatického specifického antigenu (PSA), nebo jedinci s rodinnou anamnesou karcinomu prostaty.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr. 1: Graf ilustrující chemopreventivní účinky Toremifenu v TRAMP modelu.

Obr. 2A-2C: H&E řezy ilustrující ventrální buňky prostaty u normálních myší a buňky karcinomu prostaty u TRAMP myší použitých

Obr. 3: Vliv toremifenu na vývoj ventrální prostaty u TRAMP myší. v pokusu.

Obr. 4: Vliv toremifenu na výskyt nádorů u TRAMP myší.

Obr. 5: Vliv toremifenu na vývoj nádorů v TRAMP modelu.

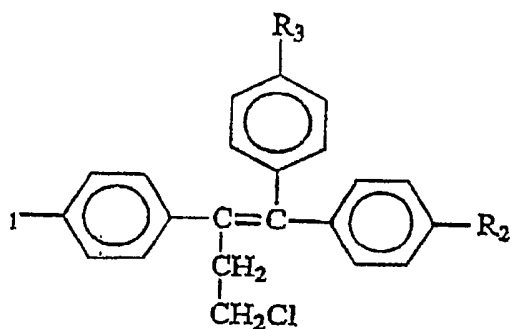
Obr. 6A-6B: Srovnání efektů placeba vs. Toremifenu na růst nádorů.

Podrobný popis předkládaného vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje: (1) léčivo pro prevenci karcinogenese v prostatě; (2) léčivo pro supresi nebo inhibici karcinomu prostaty; (3) léčivo pro redukci rizika vzniku karcinomu prostaty; a (4) léčivo pro zvýšení přežívání u jedince; (5) léčivo pro léčbu karcinomu prostaty; (6) léčivo pro dosažení regrese prostatické intraepitelové neoplasie a léčivo pro redukci prostatické intraepitelové neoplasie s vysokým stupněm pomoci podání chemopreventivních činidel, jak jsou zde popsány.

V jednom provedení je chemopreventivním činidlem antiestrogen, jeho analog, derivát, izomer a metabolit. V jiném provedení je chemopreventivním činidlem trifenylalkyl nebo jeho analog, derivát, izomer a metabolit. V jiném provedení je chemopreventivním činidlem dihydronaftalen nebo jeho analog, derivát, izomer a metabolit. V jiném provedení je chemopreventivním činidlem benzothiofen nebo jeho analog, derivát, izomer a metabolit. V jiném provedení je chemopreventivním činidlem selektivní modulátor estrogenového receptoru (SERM) nebo jeho analog, derivát, izomer a metabolit. V jiném provedení je antiestrogenem antiestrogen nevytvářející addukty DNA nebo jeho analog, derivát, izomer a metabolit. V jiném provedení je chemopreventivním činidlem tamoxifen. V jiném provedení je chemopreventivním činidlem faslodex. V jiném provedení je chemopreventivním činidlem raloxifen.

V jednom provedení při použití chemopreventivního činidla pro prevenci karcinogenese v prostatě nebo pro potlačení nebo inhibici latentního karcinomu prostaty chemopreventivní činidlo neobsahuje sloučeninu vzorce:



(1)

kde R_1 a R_2 , které mohou být stejné nebo různé, jsou H nebo OH, R_3 je $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_4\text{R}_5$, kde R_4 a R_5 , které mohou být stejné nebo různé, jsou H nebo alkylová skupina obsahující 1 až přibližně 4 atomy uhlíku, a její analogy a metabolity.

Jak je zde uvedeno, jsou tamoxifen, faslodex a raloxifen, které jsou příklady antiestrogenů, chemopreventivními činidly pro prostatu a prostatickou intraepitelovou neoplasií.

Průběžné sledované biologické markery jsou měřitelné biologické alterace ve tkáni, ke kterým dochází mezi iniciací a vznikem zřejmé neoplasie. Biologický marker se ověří tehdy, když se konečný jev, incidence nádoru, také redukuje v důsledku aplikace potenciálního chemopreventivního činidla. Průběžné biologické markery u nádorů mohou být klasifikovány do následujících skupin: histologické, proliferační, diferenciační a biochemické. V jakékoliv chemopreventivní strategii tvoří dostupnost histologicky rozpoznatelných a akceptovaných prekancerósních lézí významný výchozí bod. Pro prostatu je histologickým markerem prekancerósní prekursor adenokarcinomu prostaty, jehož příkladem je prostatická intraepitelová neoplasie (PIN). PIN se jeví jako abnormální proliferace v prostatických duktech, kterou tvoří premaligní ložiska buněčné dysplasie a karcinomu in situ bez stromální invaze. PIN a histologický karcinom prostaty jsou morfometricky a fenotypově podobné. Proto představuje vývoj "high grade" PIN významný krok v dráze od normální prostaty

přes PIN, histologický karcinom prostaty, invazivní klinický karcinom prostaty k metastázám.

Bylo prokázáno, že prostatická intraepitelová neoplasie je prekancerózní lézí nebo prekursorem adenokarcinomu prostaty. Prostatická intraepitelová neoplasie je abnormální proliferace v prostatických duktech, kterou tvoří premaligní ložiska buněčné dysplasie a karcinomu in situ bez stromální invaze. Prostatická intraepitelová neoplasie je nejpřesnějším a nejspolehlivějším markerem karcinogeneze v prostatě a může být použita jako přijatelný znak pro studie týkající se chemoprevence karcinomu prostaty. Prostatická intraepitelová neoplasie má nejvyšší prediktivní hodnotu jako marker pro adenokarcinom a její zjištění vyžaduje opakování biopsie pro vyloučení současného nebo následného invazivního karcinomu. Většina studií naznačuje, že u většiny pacientů s prostatickou intraepitelovou neoplasií se vyvine karcinom během 10 let. Zajímavé je to, že prostatická intraepitelová neoplasie nepřispívá k sérovému PSA, což není překvapivé, protože oproti karcinomu prostaty neinvaduje prostatická intraepitelová neoplasie do vaskulatury prostaty, čímž dochází k uvolňování PSA do krevního řečiště. Tak může prostatická intraepitelová neoplasie předcházet i elevacím PSA souvisejícím s karcinodem prostaty.

V jednom provedení patří mezi antiestrogeny, které působí jako chemopreventivní činidla na prostatu, následující sloučeniny: trifenylethyleny, mezi které patří droloxifen, idoxifen, (2)-4-OH.tamoxifen; arzoxifen; chromany jako je levomeloxifen; a centchroman; benzothiofeny, jako je raloxifen a LY353381; naftaleny, jako je CP336156. V jiném provedení patří mezi chemopreventivní činidla fytoestrogeny, jako jsou isoflavonoidy, včetně daidzeinu, genisteinu, yenoestrogenů,

coumestrolu, zearalenonu, apigeninu, waempherolu, phloretinu, biochaninu A, naringeninu, formononetinu, ipriflavonu, quercetinu a chrysinu. V jiném provedení patří mezi chemopreventivní činidla flavonoidy; flavony, isoflavony, flavanony a chalcony); coumestany; mykoestrogeny; lakton kyseliny resorcycké; nafoxideneandequol a lignin včetně enterodiolu a enterolaktonu. V jiném provedení patří mezi chemopreventivní činidla následující sloučeniny: ICI 164384; ICI 182780; TAT-59; EM 652 (SCG 57068), EM-800 (SCH 57050), EM 139, EM-651, EM-776 a peptidový antagonisté lidských estrogenových receptorů.

Předkládaný vynález poskytuje použití prostředků a farmaceutických prostředků pro prevenci karcinogenese v prostatě; supresi nebo inhibici karcinomu prostaty; pro redukci rizika vzniku karcinomu prostaty; pro zvýšení přežívání u jedince; pro léčbu karcinomu prostaty; pro dosažení regrese prostatické intraepitelové neplasie a způsoby pro redukci prostatické intraepitelové neplasie s vysokým gradíngem pomocí podání chemopreventivních činidel, jak jsou zde popsána, a nosiče nebo ředidla a/nebo jejich farmaceuticky přijatelných nosičů, ředidel, solí, esterů nebo N-oxidů, a jejich směsí.

Předkládaný vynález poskytuje bezpečný a účinný způsob pro prevenci karcinogenese, supresi nebo inhibici latentního karcinomu prostaty a je zejména vhodný pro léčbu jedinců se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prostaty, například jedinců s benigní hyperplasií prostaty, prostatickou intraepitelovou neplasí (PIN) nebo abnormálně vysokou koncentrací cirkulujícího prostatického specifického antigenu (PSA), nebo jedinců s rodinou anamnesou karcinomu prostaty. V jednom

provedení je jedincem savec. V jiném provedení je jedincem člověk.

Vynález zahrnuje čisté (Z) a (E) izomery sloučenin a jejich směsi, stejně jako čisté (RR,SS)- a (RS,SR)-enantiomerové páry a jejich směsi.

Vynález zahrnuje farmaceuticky přijatelné soli amino-substituovaných sloučenin s organickými a anorganickými sloučeninami, jako je například kyselina citrónová a chlorovodíková. Vynález také zahrnuje N-oxidy amino substituentů sloučenin vzorce (I). Farmaceuticky přijatelné soli mohou být připraveny z fenolických sloučenin reakcí s anorganickými bázemi, jako je například hydroxid sodný. Také mohou být připraveny estery fenolických sloučenin s alifatickými a aromatickými karboxylovými kyselinami, jako jsou například estery kyseliny octové a benzoové.

Termín farmaceutický přípravek, jak je zde použit, označuje terapeuticky účinná množství činidla společně s vhodnými ředidly, konzervačními činidly, solubilizačními činidly, emulgačními činidly, adjuvans a/nebo nosiči. Termín "terapeuticky účinné množství", jak je zde použit, označuje množství dostatečné pro terapeutický účinek pro dané onemocnění a režim aplikace. Takovými prostředky jsou kapalné nebo lyofilizované nebo jinak sušené prostředky a obsahují ředidla s různým obsahem pufrů (například Tris-HCl, acetat, fosfát), pH a iontovou silou, aditiva jako je albumin nebo želatina pro prevenci absorpce na povrchy, detergentní činidla (jako je například Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, soli žlučových kyselin), solubilizační činidla (například glycerol, polyethylenglycerol), anti-oxidační činidla (jako je kyselina askorbová, kyselý siřičitan sodný), konzervační činidla

(například Thimerosal, benzylalkohol, parabeny), objemové substance nebo substance modifikující tonicitu (jako je laktosa nebo manitol), polymery s kovalentní vazbou proteinů, jako je polyethylenglykol, nebo s komplexací s ionty kovů nebo inkorporací materiálu do nebo na částice polymeru, jako je kyselina mléčná, kyselina polyglykologá, hydrogely atd., nebo na liposomy, mikroemulze, micelly, unilamelární nebo multilamelární vesikuly, erythrocyty nebo sféroplasty. Takové přípravky ovlivňují fyzikální stav, rozpustnost, stabilitu, rychlost uvolňování in vivo a rychlost klírens in vivo. Mezi prostředky s řízeným nebo prodlouženým uvolňováním patří prostředky tvořící lipofilní depa (například obsahující mastné kyseliny, vosky a oleje). Vynález také zahrnuje prostředky ve formě částic potažených polymery (například poloxamery nebo poloxaminy). Mezi další provedení prostředků podle předkládaného vynálezu patří prostředky ve formě části s ochrannými potahy, inhibitory proteas nebo činidla zesilujícími průnik, pro různé způsoby podání, včetně parenetrálního, plicního, nasálního orálního. V jednom provedení je farmaceutický přípravek podán parenterálně, perinádorově, transslizničně, transdermálně, intramuskulárně, intravenosně, intradermálně, podkožně, intraperitoneálně, intraventrikulárně, intrakraniálně a intratumorálně. Dávka může být v rozmezí od 5 do 80 mg/den. V jednom provedení je dávka v rozmezí 35-66 mg/den. V jiném provedení je dávka v rozmezí 40-60 mg/den. V jiném provedení je dávka v rozmezí 45-60 mg/den. V jiném provedení je dávka v rozmezí 15-25 mg/den. V jiném provedení je dávka v rozmezí 45-60 mg/den. Dávka může být 60 mg/den. Dávka může být 20 mg/den. Dávka může být 45 mg/den. Tableta pro orální podání může obsahovat 88,5 mg chemopreventivního činidla, což je ekvivalentní 60 mg chemopreventivního činidla.

Dále, farmaceuticky přijatelné nosiče jsou dobře známé v oboru a patří mezi ně například 0,01-0,1M a výhodně 0,05M fosfátový pufr nebo 0,8% salinický roztok. Dále, takové farmaceuticky přijatelné nosiče mohou být vodné nebo nevodné roztoky, suspenze a emulze. Příklady nevodných rozpouštědel jsou propylenglykol, polyethylenglykol, rostlinné oleje jako je olivový olej, a injikovatelné organické estery, jako je ethyloléat. Vodné nosiče zahrnují vodu, alkoholické/vodné roztoky, emulze nebo suspenze, včetně salinických a pufrovaných medií. Mezi parenterální vehikula patří roztok chloridu sodného, Ringrova dextrosa, dextrosa a chlorid sodný, Ringer-laktát nebo netěkavé oleje. Mezi intravenosní vehikula patří náhrady tekutin a živin, elektrolytů, jako jsou roztoky na bázi Ringerovi dextrosy, a podobně. Mohou být použita také konzervační činidla a jiná aditiva, jako jsou například antimikrobiální činidla, antioxidační činidla, kolatační činidla, inertní plyny a podobně.

Termín "adjuvans" označuje sloučeninu nebo směs sloučenin, která zesiluje imunitní reakci na antigen. Adjuvans může sloužit jako tkáňová zásoba, která pomalu uvolňuje antigen, a také jako aktivátor lymfoidního systému, který nespecificky zesiluje imunitní reakci (Hood et al., Immunology, 2. vydání, 1984, Benjamin/Cummings, Menlo Park, California, str. 384). Často primární expozice antigenem samotným, za nepřítomnosti adjuvans, selže v indukci protilátkové nebo buněčné imunitní reakce. Adjuvans je, například, kompletní Freundovo adjuvans, nekompletní Freundovo adjuvans, saponin, minerální gely, jako je hydroxid hlinitý, povrchově aktivní substance, jako je lysolecitin, pluronické polyoly, polyanionty, peptidy, olejové nebo uhlovodíkové emulze, přílipkové hemokyaniny, dinitrofenol a potenciálně použitelná lidská adjuvans, jako je BCG (bacille

Calmette-Guerinové) a *Corynebacterium parvum*. Výhodně je adjuvans farmaceuticky přijatelné.

Mezi prostředky s řízeným nebo zpomaleným uvolňováním patří prostředky v lipofilních depech (například v mastných kyselinách, voskách a olejích). vynález také zahrnuje prostředky ve formě částic potažených polymery (například poloxamery nebo poloxaminy) a sloučeniny navázané na protilátky namířené proti tkáňově specifickým receptorům, ligandům nebo antigenům nebo navázané na ligandy tkáňově specifických receptorů. Jiným provedením vynálezu jsou prostředky ve formě částic opatřených ochrannými potahy, inhibitory proteas nebo zesilovači průniku pro různé způsoby podání, včetně parenterálního, plicního, nasálního a orálního. Sloučeniny modifikované kovalentním navázáním polymerů rozpustných ve vodě, jako je polyethylenglykol, kopolymery polyethylenglykolu a polypropylenglykolu, karboxymethylcelulosa, dextran, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon nebo polyprolin, mají významně delší poločasy v krvi po intravenosní injekci než odpovídající nemodifikované sloučeniny (Abuchowski et al., 1981; Newmark et al., 1982; a Katre et al., 1987). Takové modifikace mohou také zvyšovat rozpustnost sloučeniny ve vodném roztoku, mohou eliminovat agregaci sloučeniny, mohou zvyšovat fyzikální a chemickou stabilitu sloučeniny a mohou značně redukovat imunogenicitu a reaktivitu sloučeniny. V důsledku toho může být požadovaná in vivo biologická aktivita dosažena podáváním takových adduktů polymer-sloučenina méně často nebo v nižších dávkách, než při podávání nemodifikované sloučeniny.

V ještě jiném provedení může být farmaceutický přípravek podán v systému s řízeným uvolňováním. Například může být činidlo podáno za použití intravenosní infuze, implantovatelné

osmotické pumpy, transdermální náplasti, liposomů nebo jiného způsobu podání. V jednom provedení může být použita pumpa (viz Langer, výše; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88: 507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. med. 321: 574 (1989)). V jiném provedení mohou být použity polymerické materiály. V ještě jiném provedení může být systém s řízeným uvolňováním uložen do blízkosti terapeutického cíle, tj. mozku, což umožní podání pouze frakce systémové dávky (viz například Goodson, v Medical Applications of Controlled Release, výše, svazek 2, str. 115-138 (1984)). Výhodně je přípravek s řízeným uvolňováním zaveden jedinci do blízkosti místa nevhodné imunoaktivace nebo nádoru. Jiné systémy s řízeným uvolňováním jsou popsány v přehledu od Langer (Science 249: 1527-1533 (1990)).

Způsob podle předkládaného vynálezu pro prevenci karcinogeneze v prostatě zahrnuje podání farmaceutického přípravku obsahujícího chemopreventivní činidlo nebo jeho metabolit nebo sůl savci. Farmaceutický přípravek může obsahovat chemopreventivní činidlo samotné, nebo může dále obsahovat farmaceuticky přijatelný nosič, a může být pevný nebo kapalný, jako jsou například tablety, kapsle, pelety, roztoky, suspenze, elixíry, emulze, gely, krémy nebo čípky, včetně rektálních a urethrálních čípků. Mezi farmaceuticky přijatelné nosiče patří klovatiny, škroby, sacharidy, celulosové materiály a jejich směsi. Farmaceutické přípravky obsahující chemopreventivní činidlo mohou být podány jedinci například prostřednictvím podkožní implantace pelety; v další provedení umožňuje peleta řízené uvolňování chemopreventivního činidla během určité doby. Přípravek může být také podán intravenosní, intararteriální nebo intramuskulární injekcí kapalného přípravku, orálním podáním kapalného nebo pevného přípravku nebo lokálním podáním. Podání může být také

provedeno rektálním čípkiem nebo urethrálním čípkiem. Farmaceutickým přípravkem může být také parenterální přípravek; v jednom provedení obsahuje přípravek liposomy, které obsahují komplex chemopreventivního činidla, jako je například Toremifen, a cyklodextranové sloučeniny, jak je popsáno ve výše citovaném US patentu 5571534, Jalonon et al.

Farmaceutické přípravky podle předkládaného vynálezu mohou být připraveny známými procesy rozpouštění, mísení, granulování nebo tabletování. Pro orální podání jsou chemopreventivní činidla nebo jejich fyziologicky přijatelné deriváty, jako jsou soli, estery, N-oxidy a podobně smíšený s přísadami běžně používanými pro tento účel, jako jsou vehikula, stabilizátory nebo inertní ředidla, a tyto směsi jsou přeměněny běžnými způsoby na formy vhodné pro podání, jako jsou tablety, potahované tablety, kapsle z měkké nebo tuhé želatiny, vodné, alkoholové nebo olejové roztoky. Příklady vhodných inertních vehikul jsou běžné tabletové baze, jako je laktosa, sacharosa nebo kukuřičný škrob, v kombinaci s pojivem jako je arabská klovatina, kukuřičný škrob, želatina, nebo s činidly podporujícími rozpadavost, jako je kukuřičný škrob, bramborový škrob, kyselina alginová, nebo s kluznými činidly, jako je kyselina stearová nebo magnesium-stearát. Příklady vhodných olejových rozpouštědel nebo vehikul jsou rostlinné nebo živočišné oleje, jako je slunečnicový olej nebo olej z rybích jater. Prostředky mohou být připraveny jako suché nebo jako vlhké granule. Pro parenterální aplikaci (podkožní, intravenosní, intraarteriální nebo intramuskulární injekci) jsou chemopreventivní činidla nebo jejich fyziologicky přijatelné deriváty, jako jsou soli, estery, N-oxidy a podobně, přeměněny na roztoky, suspenze nebo emulze, pokud je to vhodné, tak se substancemi běžnými a vhodnými pro tento účel, jako jsou solubilizační činidla nebo jiná pomocná

činidla. Příklady jsou: sterilní kapaliny, jako je voda nebo oleje, s nebo bez přidání surfaktantu a jiných farmaceuticky přijatelných adjuvans. Ilustrativní oleje jsou ropné, živočišné, rostlinné nebo syntetické oleje, jako je například podzemnicový olej, sojový olej nebo minerální olej. Obecně, voda, salinický roztok, vodné roztoky dextrosy a podobných sacharidů, a glykolů jako jsou propylenglykoly nebo polyethylenglykoly, jsou výhodnými kapalnými nosiči, zejména pro injekční roztoky.

Příprava farmaceutických přípravků, které obsahují aktivní složku, je dobře známá v oboru. Obvykle jsou takové přípravky připraveny jako aerosol polypeptidu podávaný do nasofaryngu nebo jako injekční prostředky, buď jako kapalné roztoky nebo jako suspenze; mohou však být také připraveny pevné formy vhodné pro přípravu roztoku nebo suspenze před injekcí. Přípravek může být také emulgovaný. Aktivní terapeutické činidlo může být smíšeno s přísadami, které jsou farmaceuticky přijatelné a kompatibilní s aktivní složkou. Vhodnými přísadami jsou, například, voda, salinický roztok, dextrosa, glycerol, ethanol a podobně, nebo jejich kombinace. Dále, pokud je to žádoucí, může přípravek obsahovat malá množství pomocných substancí, jako jsou smáčivá nebo emulgační činidla nebo činidla pufřující pH, která zvyšují účinnost aktivní složky.

Aktivní složka může být zapracována do přípravku ve formě neutralizované farmaceuticky přijatelné soli. Farmaceuticky přijatelné soli zahrnují adiční soli s kyselinami (tvořené s volnými amino skupinami polypeptidu nebo protilátky), které jsou tvořeny s anorganickými kyselinami, jako je například kyselina chlorovodíková nebo fosforečná, nebo s organickými kyselinami, jako je kyselina octová, šťavelová, mandlová,

vinná a podobně. Soli tvořené s volnými karboxylovými skupinami mohou být také připraveny s anorganickými bázemi, jako je například hydroxid sodný, draselný, amonný, vápenatý nebo železitý, a s organickými bázemi, jako je isopropylamin, trimethylamin, 2-ethylaminoethanol, histidin, prokain a podobně.

Pro lokální podání na tělní povrchy za použití, například, krémů, gelů, kapek a podobně, jsou chemopreventivní činidla nebo jejich fyziologicky přijatelné deriváty, jako jsou soli, estery a N-oxidy a podobně, připraveny a aplikovány jako roztoky, suspenze nebo emulze ve fyziologicky přijatelném ředidlu s nebo bez farmaceutického nosiče.

V jiném provedení může být aktivní sloučenina podána ve vehikulu, konkrétně v liposomu (viz Langer, Science 249: 1527-1533 (1990); Treat et al., v Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (ed.), Liss, New York, str. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, tamtéž, str. 317-327; obecně viz tamtéž).

Farmaceutické přípravky podle předkládaného vynálezu jsou zejména vhodné pro léčbu jedinců se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prostaty. Jedinci s vysokým rizikem jsou například jedinci s benigní hyperplasií prostaty, prostatickou intraepitelovou neoplasií (PIN) nebo abnormálně vysokou koncentrací cirkulujícího prostatického specifického antigenu (PSA), nebo jedinci s rodinou anamnesou karcinomu prostaty.

Dále, prostatické chemopreventivní činidlo může být podáno v kombinaci s jinými cytokiny nebo růstovými faktory, jako je například IFN γ nebo α , IFN β , interleukin (IL) 1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, faktor nekrosy nádorů (TNF) α , TNF β , faktor

stimulující kolonie granulocytů (G-CSF), granulocytů/makrofágů (GM-CSF), akcesorní molekuly, včetně členů integrinové superrodiny a členů Ig superrodiny, jako jsou, například, LFA-1, LFA-3, CD22 a B7-1, B7-2 a ICAM-1 T-lymfocytární kostimulační molekuly.

Chemopreventivní činidlo může být podáno před nebo po činidle poškozujícím DNA v intervalu v rozsahu od minut do týdnů. Protokoly a způsoby jsou známy odborníkům v oboru. Činidla nebo faktory poškozující DNA jsou známy odborníkům v oboru a patří mezi ně jakákoliv chemická sloučenina nebo proces, který poškozuje DNA, když je aplikována na buňku. Mezi taková činidla a faktory patří radiace a vlny poškozující DNA, jako je γ -záření, záření X, UV záření, mikrovlny, elektrony a podobně. Různé chemické sloučeniny, též označované jako "chemoterapeutická činidla", indukují poškození DNA, a tyto sloučeniny mohou být použity v kombinované léčbě podle předkládaného vynálezu. Mezi použitelná chemoterapeutická činidla patří například adriamycin, 5-fluorouracil (5FU), etoposid (VP-16), camptothecin, aktinomycin D, mitomycin C, cisplatina (CDDP) a peroxid vodíku. Vynález také zahrnuje použití kombinace více činidel poškozujících DNA, ať na bázi záření, nebo na bázi sloučenin, jako je například použití záření X s cisplatinou nebo použití cisplatiny s etoposidem.

V jiném provedení je možno ozařovat lokalizovaný nádor zářením poškozujícím DNA, jako je záření X, UV záření, gamma-záření a mikrovlny. Alternativně mohou být nádorové buňky kontaktovány s činidlem poškozujícím DNA tím, že jedinci je podáno terapeuticky účinné množství farmaceutického přípravku obsahujícího sloučeninu poškozující DNA, jako je adriamycin, 5-fluorouracil, etoposid, camptothecin, aktinomycin D, mitomycin C a nejlépe cisplatina. Činidly poškozujícími DNA

jsou také sloučeniny interferující s replikací DNA, mitosou a segregací chromozomů. Mezi takové chemoterapeutické sloučeniny patří adriamycin, též známý jako doxorubicin, etoposid, verapamil, podofylotoxin a podobně.

Jinými faktory, které způsobují poškození DNA a které jsou značně používány, jsou γ -záření, záření X a/nebo přímé podání radioizotopů k nádorovým buňkám. Jsou zahrnuty také jiné faktory poškozující DNA, jako jsou mikrovlny a UV záření. Je pravděpodobné, že všechny tyto faktory poškozují DNA, prekursory DNA, replikaci a reparaci DNA a sestavování a udržování chromosomů.

Odborníkům v oboru bude jasné, že způsoby a farmaceutické prostředky podle předkládaného vynálezu jsou zejména vhodné pro podání savcům, výhodně lidem.

Následující příklady dále ilustrují výhodná provedení předkládaného vynálezu. Tyto příklady však nijak neomezují rozsah předkládaného vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Myší transgenní adenokarcinom prostaty

Studování chemoprevence karcinomu prostaty bylo narušeno chyběním vhodného zvířecího modelu. Nedávný vývoj myšího modelu transgenního adenokarcinomu prostaty (TRAMP) umožnil studování chemoprevence. V TRAMP modelu, který je popsán v Greenberg et al., Prostate cancer in transgenic mouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, svazek 92, strany 3439-3443, je transgen pro PB-SV40 velký T antigen (PB-Tag) exprimován specificky v epitelových buňkách myší prostaty. V důsledku

toho má tento model několik výhod oproti existujícím modelům:

1) u myši se vyvíjejí progresivní formy hyperplasie prostatického epitelu již v 10 týdnech věku a invazivní karcinom vzniká ve věku 18 týdnů; 2) metastatické šíření karcinomu prostaty napodobuje lidský karcinom prostaty s obvyklými metastasami do mízních uzlin, plic, ledvin, nadledvin a kostí; 3) vznik, stejně jako progresse karcinomu prostaty může být sledována během relativně krátkého období 10-30 týdnů; 4) nádor vzniká se 100% frekvencí; a 5) zvířata mohou být testována na přítomnost transgenu pro karcinom prostaty před vznikem klinického karcinomu prostaty, což umožňuje přímé testování toho, zda léčba toremifenem mění karcinogenesi v prostatě.

TRAMP transgenní myši model je vynikající in vivo model pro stanovení mechanismu iniciace a promoce karcinomu prostaty a pro testování účinnosti Toremifenu. U těchto myši se progresivně vyvíjí hyperplasie prostatického epitelu, PIN a prostaty během krátké doby (<17 týdnů).

Chemopreventivní léčba hybridních TRAMP myši se zahajuje 30. den po narození, za použití Toremifenu v dávce přibližně 0,5-50 mg/kg hmotnosti jedince a den, výhodně přibližně 6-30 mg/kg jedince a den. Toremifen je výhodně připraven ve formě 21-denních a 90-denních pelet (Innovative Research of America, Sarasota, FL), které jsou podány podkožní implantací. V každé léčené skupině jsou zvířata utrácena v 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40 a 50 týdnu věku do doby vzniku hmatného nádoru. Krev se odebírá a smísí pro každou hodnocenou dobu za účelem hodnocení změn sérového estradiolu a testosteronu. Prostatické tkáně se odeberou pro morfologické, histologické a molekulární testy.

V testu se použije následující postup:

1) Proveďte se analýza sériových řezů prostatou pro detekci změn v morfologii ductů prostaty za určitou dobu s a bez léčby; příklady jsou uvedeny na obr. 2. Tkáňové řezy se hodnotí histologicky barvením H&E a Masson-trichomovým barvením. Hodnotí a skóruje se výskyt PIN (I-slabý až III-významný).

2) Pro každý hodnocený věk se stanoví sérové koncentrace estradiolu a celkového testosteronu (RIA) pro hodnocení změn těchto hormonů vzniklých v důsledku podávání Toremifenu.

Příklad 2: Analýza imunohistochemických dat

Mikroskopické obrazy každého tkáňového řezu se hodnotí za použití počítačové (Mac 9500-I 32 počítač a monitor) kvantifikace obrazu (NIH-Image 1,6 PPC) za použití Kodak DCS 460 kamery na Nikon Microphot-FX mikroskopu a kvantifikace se provede za použití barevného kvantifikačního systému pro analýzu obrazu (IPLab Spectrum 3.1, Scanalytics, Inc., VA), který rozpoznává barevné změny barvených tkáňových řezů. Prahy jsou nastaveny pro identifikaci různých tkáňových složek prostaty. Plocha pixelových densit odpovídajících každé z těchto tkáňových složek se vypočte pro každý celý obraz na barevném monitoru. Vypočte se průměr z celkem 5 obrazů pro řez prostatou. Imunohistochemické zobrazení může být digitalizováno a kvantifikováno pro účely statistického hodnocení za použití stanovení koeficientů a pravděpodobnosti korelace vzorku 2-cestné).

Příklad 3: Testování chemopreventivní aktivity

byl proveden test pro hodnocení účinnosti toremifenu u TRAMP transgenních zvířat (PB-Tag x FVBwt) (od Dr. Norman Greenberg, Baylor College of Medicine, TX). Tyto myši mají

předběžné příznaky karcinomu již v 10 týdnech. TRAMP transgenní samci se testovaly na velký Tag transgen a pozitivní samci se použili v tomto testu. Antiestrogen toremifen, který byl testován na možné chemopreventivní účinky, se zapracoval do pelet (Innovative Research of America, Sarasota, FL) a chemopreventivní léčba myší se zahájila 30 dnů po narození (průměrná hmotnost myší byla 14 g). Čtyřem skupinám po 10-12 myších se provedla podkožní implantace toremifenových pelet s 90-denním uvolňováním. Difundovatelná dávka léku, upravená podle změn hmotnosti při růstu, byla navržena buď jako nízká dávka (6 mg/kg), nebo jako vysoká dávka (30 mg/kg) toremifenu. Kontrolním zvířatům (n=10) se aplikovaly implantáty placebo. Účinnost léčby se měřila jako nepřítomnost tvorby hmatných nádorů. Myší nádory prostaty se odebraly a hodnotily se molekulárními a histologickými technikami.

Za použití TRAMP transgenního modelu karcinomu prostaty, ve kterém se u každého zvířete, které zdědí gen pro karcinom prostaty, vyvine karcinom prostaty, bylo prokázáno, že toremifen jak zvyšuje latenci, tak snižuje incidenci karcinomu prostaty.

Jak je uvedeno na obr. 1, byla nízká i vysoká dávka toremifenu stejně účinná. Tvorba nádorů ve ventrální prostatě TRAMP myší byla zaznamenána v 17. týdnu v placebo skupině (n=10), v 19 týdnu ve skupině léčené vysokou dávkou toremifenu (n=12) a ve 28 týdnu ve skupině léčené nízkou dávkou toremifenu (n=12). 5 týdenní léčba toremifenem tedy významně zvyšuje periodu latence vzniku karcinomu ve ventrální prostatě TRAMP myší o 11 týdnů.

Protože zvířata léčená toremifenem nedosáhla 50% vzniku nádorů během testu, byla mezi skupinami srovnávána doba, ve které vznikly nádory u 25% zvířat. Nádory byly palpovatelné u 25% z 10 zvířat v týdnu 23 v placebo skupině a v 30-31 týdnu ve skupině léčené vysokou a nízkou dávkou toremifenu, což znamená oddálení o 7-8 týdnů. Jak nízká, tak vysoká dávka toremifenu vs placebo byly statisticky signifikantní podle log rank a Wilcoxonova statistického testu, jak je uvedeno v následující tabulce 1.

Tabulka 1: Statistická analýza

	Log-Rank (p)	Wilcoxon (p)
Nízká dávka toremifenu vs placebo	0,0003 *	0,0004 *
Vysoká dávka toremifenu vs placebo	0,0017 *	0,0071 *

* signifikance $p < 0,05$

V týdnu 33, kdy se u všech kontrolních zvířat vyvinuly nádory, bylo 72% zvířat ve skupině s nízkou dávkou a 60% zvířat ve skupině s vysokou dávkou toremifenu stále bez nádorů. Tak vedla léčba toremifenem v nízké i vysoké dávce ke značnému snížení incidence nádorů ventrální prostaty TRAMP myši. Tato data ukazují, že incidence karcinomu prostaty byla významně snížena a že byla zvýšena perioda latence.

Jak již bylo uvedeno, má podávání toremifenu významné chemopreventivní účinky vůči nádorům ventrální prostaty TRAMP myši. Tyto výsledky ukazují na možné podobné účinky u člověka, jehož prostata obsahuje segment odpovídající ventrální prostatě hlodavců.

Příklad 4: Histologické vyšetření prostatické tkáně

Nádory ve skupinách léčených placebem a vysokou dávkou toremifenu odebrané v době palpce byly hodnoceny histologicky. Obr. 2A je H&E řez ventrální prostaty 17-týdenní normální dospělé myši. Obr. 2 je řez ventrální prostaty 16-týdenní TRAMP myši léčené placebem a ukazuje, že oproti normální struktuře prostaty zobrazené na obr. 2A je ventrální prostata TRAMP myši charakterizovaná vrstvami nediferencovaných, anaplastických buněk s vysokým mitotickým indexem, Naopak, jak je uvedeno na obr. 2C, prostata 30-týdenní TRAMP myši léčené toremifenem si zachovává většinu normální glandulární architektury a má nádory s více diferencovanou strukturou, jejichž mitotický index je mnohem nižší než u zvířat léčených placebem. Tyto výsledky ukazují, že toremifen, i při nízkých dávkách, je schopen potlačovat karcinogenesi v prostatě v TRAMP modelu.

Westernový přenos: Tkáně prostaty (dorsolaterální a ventrální lalok) se odebraly v 10. týdnu věku, zmrazily se ponořením do N_2 a uskladnily se při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tkáňové lyzáty se připravily za použití RIPA pufru (150 mM NaCl, 1% NP40, 0,5% deoxycholátu, 0,1% SDS a 50 mM Tris, pH 7,5) obsahujícího směs inhibitorů proteasy (Pefablock, aprotinin, bestatin, leupeptin a pepstain) a inhibitoru fosfatasy Na_3VO_4 (10 mM). Homogenát se odstředil při $14000 \times g$ při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ během 10 minut a lyzáty se uskladnily při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Koncentrace proteinu se určily za použití Bradfordova proteinového testu (Bio Rad). Tkáňové lyzáty se vnesly na 7,5% polyakrylamidové gely, proteiny ($40\text{ }\mu\text{g/dráhu}$) se separovaly SDS-PAGE a elektroforeticky se přenesly na nitrocelulosové membrány ($0,2\text{ }\mu\text{m}$, Bio-Rad, Hercules, CA) v transferovém pufru

(192 mM glycinu, 25 mM Tris-HCl a 20% methanolu). Nádorová tkáň z TRAMP prostaty se použila jako pozitivní kontrola. Chemiluminiscentní Cruz markery (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) se použily jako markery molekulové hmotnosti. Bloty se blokovaly přes noc při 4 °C v BLOTTO (6% odtučněné sušené mléko v 1x TBS) a inkubovaly se s primární protilátkou proti velkému T antigenu (Pab 101 myší monoklonální protilátka, 1:200, Santa Cruz Biotechnology) po dobu 2 hodin při teplotě místnosti. Bloty se promyly (3x) TTBS (0,05% Tween 20, 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl) a inkubovaly se s sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou (HRP) (1:5000) po dobu 1 hodiny při teplotě 25 °C. Imunoreaktivní proteiny se vizualizovaly na autoradiografickém filmu za použití systému se zesílenou chemiluminiscencí (ECL) (APB, Piscataway, NJ). Expres proteinu aktinu se použila pro normalizaci výsledků Tag. Pro tento účel se výše uvedené membrány ponořily do pufru (100 mM 2-merkaptotethanolu, 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7) a inkubovaly se při teplotě 50 °C po dobu 30 minut s občasným mísením. Po blokování se membrána znovu sondovala primární protilátkou proti aktinu (1:2500, Chemicon, Temecula, CA) a potom sekundární protilátkou konjugovanou s HRP (1:10000). Po ECL detekci se intenzity proužků kvantifikovaly za použití Adobe Photoshop 5.0 Acquisition a ImageQuant Analysis (Molecular Dynamics) systémů.

Příklad 5: Použití chemopreventivních účinků toremifenu proti karcinomu prostaty v TRAMP myším modelu

Tento pokus potvrzuje a demonstruje chemopreventivní účinnost toremifenu. Tento pokus byl zaměřen na histologické a molekulární změny asociované s vývojem karcinomu prostaty u kontrolních zvířat a na mechanismus účinku toremifenu u TRAMP zvířat, která jsou léčena peletami obsahujícími toremifen

s řízeným uvolňováním. V předem stanovených dobách se skupiny 5 zvířat utratily a jejich prostaty se odebraly pro analýzu. Prostaty se hodnotily na přítomnost nádoru histologicky, disekcí celé prostaty a imunohistochemickým vyšetřením na velký T antigen. Doposud byla léčba placebem a toremifenem dokončena pro 7, 10, 15 a 20 týden a výsledky jsou uvedeny dále.

Výsledky: Byly dokončeny vyšetření prostaty pro 7, 10, 15 a 20 týden. Analýza prostat ukázala, že u myši léčených placebem se vyvíjely nádory prostaty ve věku 15-20 týdnů, což je podobné jako v předešlé pilotní studii. Dále, myši léčené toremifenem měly oddálení výskytu karcinomu prostaty až o 20 týdnů (obr. 3). Ve 20 týdnů je patrné výrazné oddálení výskytu nádorů ve skupině léčené toremifenem až do 35 týdnů (obr. 4). Tato data potvrzují, že i při citlivějším hodnocení tumorigenicity vykazuje toremifen chemopreventivní aktivitu. Pro histologické hodnocení se tkáňové řezy fixovaly, zpracovaly se a ponořily se do parafinu. Řezy (tloušťky 5 μm) se podkožně implantovaly mezi lopatky každé myši. Prováděla se týdenní měření velikosti nádorů. Objem nádoru se vypočetl podle následujícího vzorce (objem nádoru = $0,5 (L + W) \times L \times W \times 0,5236$, kde L = délka nádoru a W = šířka nádoru). Objem nádoru v době implantace pelety sloužil jako referenční bod pro budoucí srovnání variace velikosti těchto nádorů. Týdenní variace objemu každého nádoru se zaznamenávaly jako procento změny od původního měření v době implantace pelety.

Výsledky: Ze 78 míst injekce v nádoru dosáhlo 55 (70%) nádorů objemu dostatečného pro hodnocení. Hodnotilo se celkem 50 nádorů (24 u zvířat léčených placebem a 26 toremifenem). Průměrné objemy nádorů v době implantace pelety byly podobné ve skupinách léčených toremifenem a placebem ($1,90 \text{ mm}^3$ a $1,72$

mm², v příslušném pořadí). Průměrný objem nádoru se snížil na 1,68 mm³ ve skupině léčené toremifenem (-0,22 mm³), zatímco ve skupině léčené placebem se průměrný objem nádoru zvýšil na 2,33 mm³ (+0,61 mm³). Průměrná sérová koncentrace PSA byla vyšší ve skupině léčené placebem (3,80 mg/ml) než ve skupině léčené toremifenem (2,80 ng/ml), ale tento rozdíl nebyl statisticky signifikantní (p=0,755). Celkové sérové koncentrace testosteronu byly 2,18 pro placebo skupinu (n=17) a 2,96 ng/ml pro toremifenovou skupinu (n=19).

Dvě myši pošli časně po implantaci v důsledku smrtelného pokousání jinou myší. Jedna myš léčená toremifenem byla vyloučena ze studie v důsledku excesivní hemorhagie z nádoru a vzniku hematomu. U všech myší vznikly viditelné nádory unilaterálně nebo bilaterálně. Každý nádor byl po dobu trvání pokusu sledován nezávisle. 24 nádorů bylo léčeno placebem a 28 nádorů bylo léčeno toremifenem. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2 a na obr. 6A a 6B.

Tabulka 2

Skupina léčená placebem		
týden	n	% změna objemu vzhledem ke dnu 0 léčby
3	11	9,44
4	8	115,27
5	8	271,71
6	8	600,88

Skupina léčená toremifenem		
týden	n	% změna objemu vzhledem ke dnu 0 léčby
3	11	-34,58
4	7	-61,01
5	7	-74,51
6	5	-61,72

Sledování uvedené populace bylo prodlouženo a nyní se sbírají data pro další zvířata.

Závěr: Toremifen inhibuje a indukuje regresi rozvinutých LNCaP nádorů. Ačkoliv je mechanismu účinku toremifenu neznámý, podporují tyto výsledky použití toremifenu jako činidla pro léčbu karcinomu prostaty a pro prevenci recidivy karcinomu prostaty u vysoce rizikových pacientů s mikrometastasami karcinomu prostaty.

Příklad 7: Toremifen způsobuje regresi HGPIN ve fázi II klinické studie chemoprevence karcinomu prostaty u člověka

Chemopreventivní účinky toremifenu na karcinom prostaty byly reprodukovatelně demonstrovány v obecně přijímaném zvířecím modelu spontánního lidského karcinomu prostaty. Tato sloučenina je první sloučeninou, u které byla prokázána chemopreventivní účinnost proti karcinomu prostaty. Dále, grade PIN (HGPIN) se považuje za prekursorovou lézi pro lidský karcinom prostaty, též známá jako latentní karcinom prostaty

Proto se HGPIN používá jako intermediární znak nebo zástupný znak pro lidský karcinom prostaty. NCI nyní skutečně doporučuje, aby byla PIN používána jako intermediární znak nebo zástupný znak pro lidský karcinom prostaty.

Byla provedena fáze IIa otevřené značené nerandomizované jednocentrové studie s 17 lidskými pacienty. V tomto protokolu byly pacienti s biopticky ověřenou PIN léčeni 60 mg toremifenu, denně po dobu 4 měsíců. Po 4 měsících byla opakována biopsie (8 biopsií) a přehodnotil se status PIN. 21 pacientů bylo zařazeno do studie a 16 pacientů dokončilo

studii. Souhrn patologických nálezů z biopsií prostaty od těchto 16 pacientů ukázal, že 12 pacientů mělo regresi PIN na benigní nebo atrofickou prostatickou tkáň; proto mělo 12 z 16 (75%) pacientů kompletní odpověď. ze zbývajících 4 pacientů měly 3 karcinom prostaty, ale množství PIN bylo redukováno, a 1 pacient měl stabilní onemocnění, ale PIN epitel vykazoval atrofické a degenerativní změny.

Patologické vyšetření ukázalo kompletní vymizení PIN s atrofickými změnami v epitelu prostaty. Pacienti neměly žádné akutní nebo chronické toxické změny při užívání toremifenu. Sérový PSA, sérový volný testosteron, sérový celkový testosteron a sérový estradiol zůstávaly v normálním rozmezí. Kvalita života byla nezměněna, včetně toho, že nebylo ovlivněno libido ani potence. Tak tyto výsledky demonstrují chemopreventivní roli toremifenu na prostatu.

Výsledky demonstrují, že toremifen redukuje PIN, , což se přímo odráží ve snížení incidence a prodloužení latence karcinomu prostaty a v prevenci karcinogenese v prostatě. Dále bylo zjištěno, že toremifen významně indukuje syntézu TGF v lidských stromálních fibroblastech.

Příklad 8: Role chemopreventivních činidel: Antiestrogeny: tamoxifen citrát a raloxifen (SERM) a faslodex (čistý antiestrogen ICI 182,780) v prevenci karcinogenese v prostatě

Design pokusu: Chemopreventivní léčba myší se zahájí 30 dnů po narození. Tři skupiny 50 hybridních TRAMP myší se léčí buď antiestrogenem tamoxifencitrátem nebo raloxifenem (SERM), nebo faslodexem (čistým antiestrogenem ICI 182780). Léky se připraví jako standardní pelety s prodlouženým uvolňováním (Innovative Research of America, Sarasota, FL) a podají se

jako podkožní implantáty (viz předběžná data). Kontrolním zvířatům se podají implantáty obsahující placebo bez farmaceutické aktivity. Zvířata ($n=10$) se utrácují v periodických intervalech 10, 15, 20, 25 a 30 týdnů věku a účinnost léčby vedoucí buď k absenci tvorby nádoru nebo k redukci velikosti nádoru se hodnotí srovnáním s kontrolními zvířaty léčenými placebem. Krev se odebírá pro hodnocení změn v sérových androgenech a estrogenech pro každou terapii. Tkáně prostaty se uschovají pro: (a) morfometrické testy; (b) histologické testy tkání fixovaných v 10% pufrovaném formalinu, zpracovaných a ponořených do parafinu; (c) pro molekulární studie se tkáně zmrazí v kapalném dusíku a uskladní se při -70°C . Také se zaznamenávají pitvy a data přežívání.

Výsledky pokusu ukázaly relativní chemopreventivní účinnost různých antiestrogenů v oddálení nebo prevenci vzniku karcinomu prostaty v TRAMP modelu. Morfologické vyšetření ukázalo makroskopické změny, pokud byly přítomny, ve velikosti prostaty a charakteru ductů pro každou léčbu. Parafinizované tkáňové řezy se barvily za použití standardní H&E techniky pro zobrazení histologických změn, jako je PIN, které se hodnotily pro sledování vzniku prekancerózních lézí jako prekursorů adenokarcinomu prostaty. Sérové koncentrace estradiolu a celkového testosteronu se měřily pro každý časový interval pro hodnocení jakýchkoliv změn v těchto hormonech a pro stanovení toho, zda korelují či nekorelují se změnami v PIN. V daných intervalech se měřily koncentrace peptidových růstových faktorů TGF, TGF1, TGF3 a β FGF. Příslušné receptory pro peptidové růstové faktory se také hodnotily pro EGFR a RGF RI a RII.

Tabulka 3: Vlivy selektivních modulátorů estrogenních receptorů (SERM) na prevenci karcinomu prostaty v TRAMP modelu

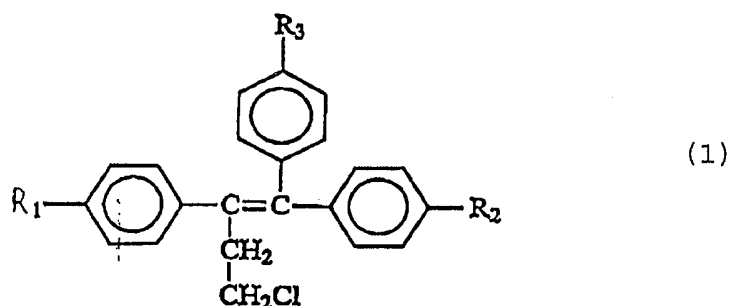
SERM	Dávka	nádory ve 20 týdnu	20 týden (%nádorů)
Placebo	-	5/5	100%
Toremifen	20 mg/kg/den	1/7	14,2%
Tamoxifen	20 mg/kg/den	2/9	22%
Raloxifen	20 mg/kg/den	3/10	30%
* Faslodex (ICI 128,780)	* 10 mg/kg/den	8/11	72%

* Faslodex je čistý antiestrogen a jeho relativní účinnost je 2-násobná ve srovnání s jinými SERM, proto 10 mg/kg/den Faslodexu = 20 mg/kg/den SERM.

Zvířata se utratila ve 20 týdnu a prostaty se hodnotily morfológickou a histologickou analýzou.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití anti-estrogenu, nebo jeho analogu, derivátu, izomeru a metabolitu nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí, esterů, N-oxidů nebo jejich směsi pro přípravu léčiva pro prevenci karcinogenese prostaty u jedince, pro zlepšení přežívání u jedince s karcinomem prostaty, nebo pro léčení jedince s karcinomem prostaty;
za podmínky, že uvedený anti-estrogen je jiný než sloučenina vzorce (1)



kde R_1 a R_2 , které mohou být stejné nebo různé, jsou H nebo OH, R_3 je $OCH_2CH_2NR_4R_5$, kde R_4 a R_5 , které mohou být stejné nebo různé, jsou H nebo alkylová skupina obsahující 1 až 4 atomy uhlíku.

2. Použití podle nároku 1, přičemž prevence karcinogenese prostaty u jedince se dosáhne snížením rizika vzniku karcinomu prostaty u jedince nebo snížením množství prekancerosních prekursorů karcinomu prostaty nebo karcinom prostaty je ošetřen supresí nebo inhibicí latentního karcinomu prostaty u jedince.

3. Použití podle nároku 1 nebo 2, přičemž osoba má prekancerosní prekursory adenokarcinomu prostaty a nemá karcinom prostaty.

4. Použití podle nároku 3, kde prekancerózní prekursory adenokarcinomu prostaty jsou prostatická intraepitelová neoplasie (PIN).
5. Použití podle nároků 1 až 4, kde anti-estrogenem je selektivní modulátor estrogenového receptoru (SERM), trifenylethylen nebo trifenylalkan.
6. Použití podle kteréhokoliv z nároku 1 až 5, kde uvedený farmaceutický přípravek obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič, přičemž uvedený nosič je vybrán ze skupiny zahrnující klovatinu, škrob, sacharid, celulosový materiál a jejich směsi.
7. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, přičemž uvedené léčivo se podává jedinci podkožní implantací pelety obsahující uvedené léčivo.
8. Použití podle nároku 7, kde uvedená peleta poskytuje řízené uvolňování léčiva.
9. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, kde uvedené léčivo se podává jedinci intravenózně, intraarteriálně nebo intramuskulárně injekcí v kapalné formě nebo se léčivo podává orálně v kapalné nebo pevném přípravku obsahujícího uvedené léčivo.
10. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9, kde uvedené léčivo je vybráno ze skupiny zahrnující pelety, tablety, kapsle, roztoky, suspenze, emulze, elixíry, gely, krémy a čípky.
11. Použití podle nároku 10, kde uvedený čípek je rektální čípek nebo uretrální čípek.

12. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, uvedené léčivo je parenterální přípravek.

13. Použití podle nároku 12, kde uvedený parenterální přípravek obsahuje liposom obsahující komplex uvedené anti-estrogenové sloučeniny a cyklodextrinové sloučeniny.

14. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 13, kde uvedené léčivo se podává v dávce přibližně 0,5 mg/kg hmotnosti jedince a den až přibližně 80 mg/kg hmotnosti jedince a den.

15. Použití podle nároku 14, kde uvedená dávka je přibližně 10 mg/kg hmotnosti jedince a den až přibližně 60 mg/kg hmotnosti jedince a den.

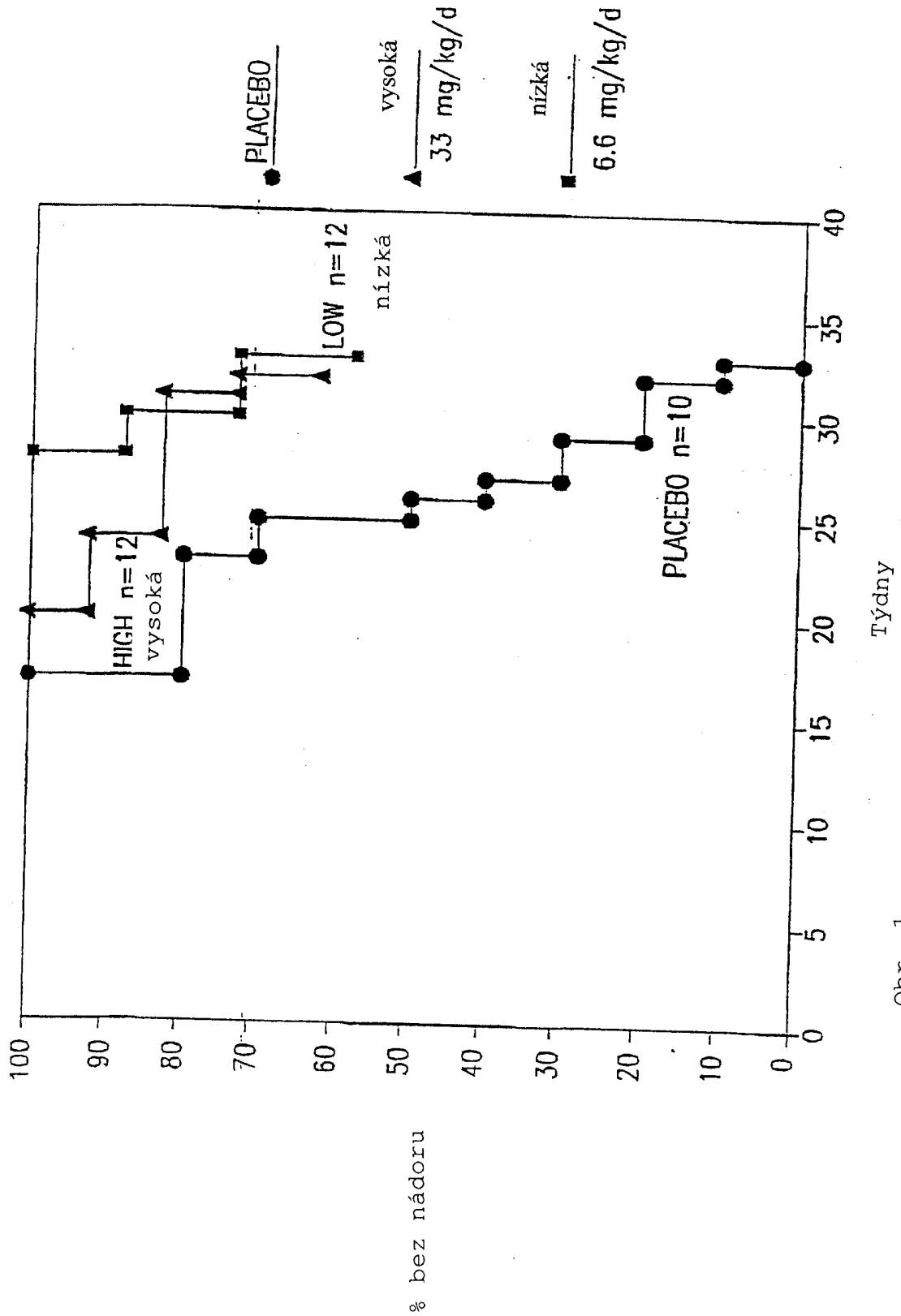
16. Způsob podle nároku 15, kde uvedena dávka je 20 mg/kg hmotnosti jedince a den až přibližně 60 mg/kg hmotnosti jedince a den.

17. Použití podle nároku 16, kde uvedena dávka je přibližně 60 mg/kg hmotnosti jedince a den nebo 20 mg/kg jedince a den.

01.07.02

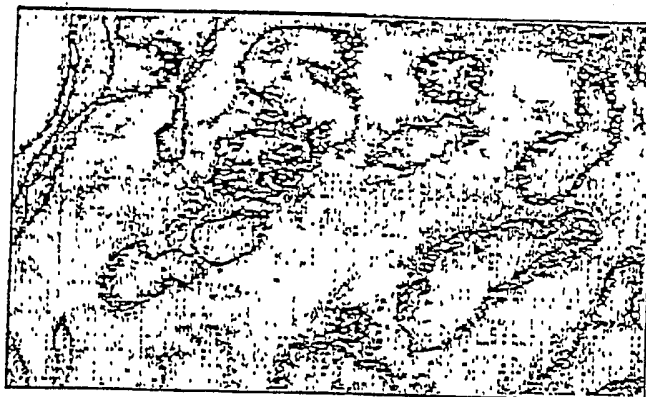
PV 2002 - 1763

1/6

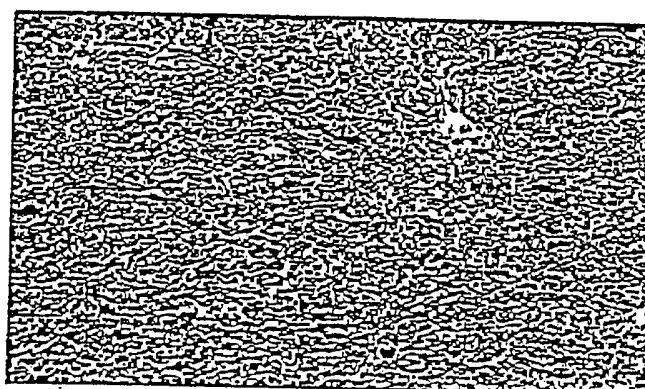


Obr. 1

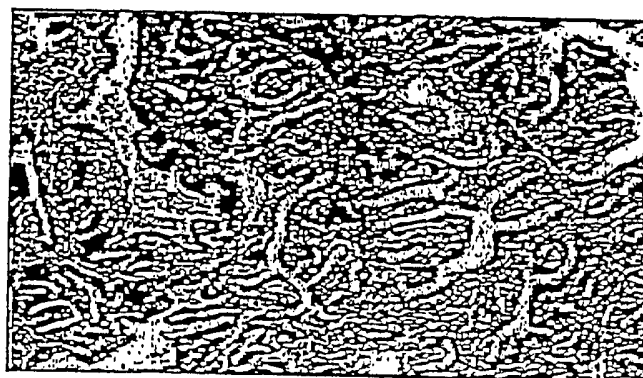
2/6



A.



B.



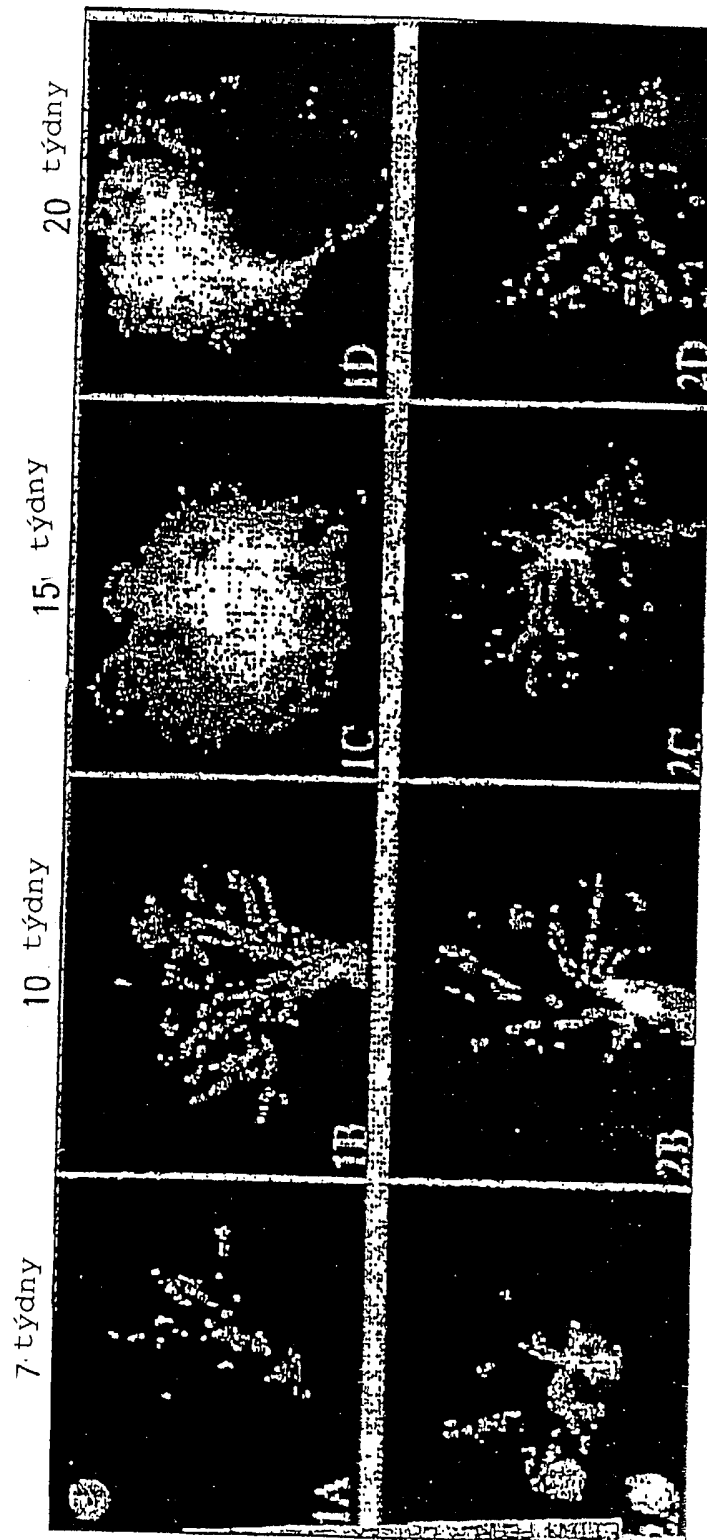
C.

FIG.2

01.07.00

PV 2002 - 1463

3/6

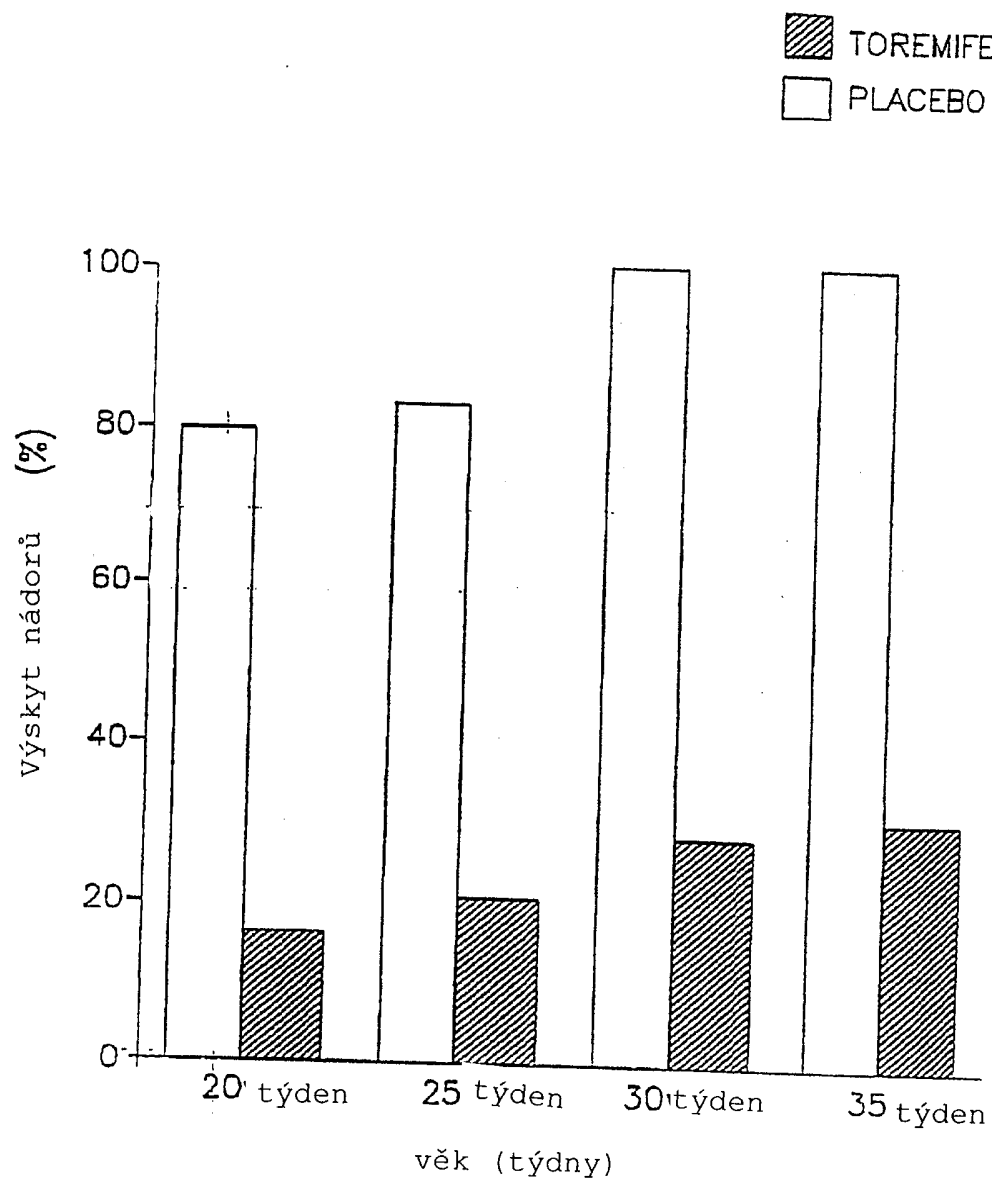


Obr. 3

01.07.02

TV 2002-1763

4/6

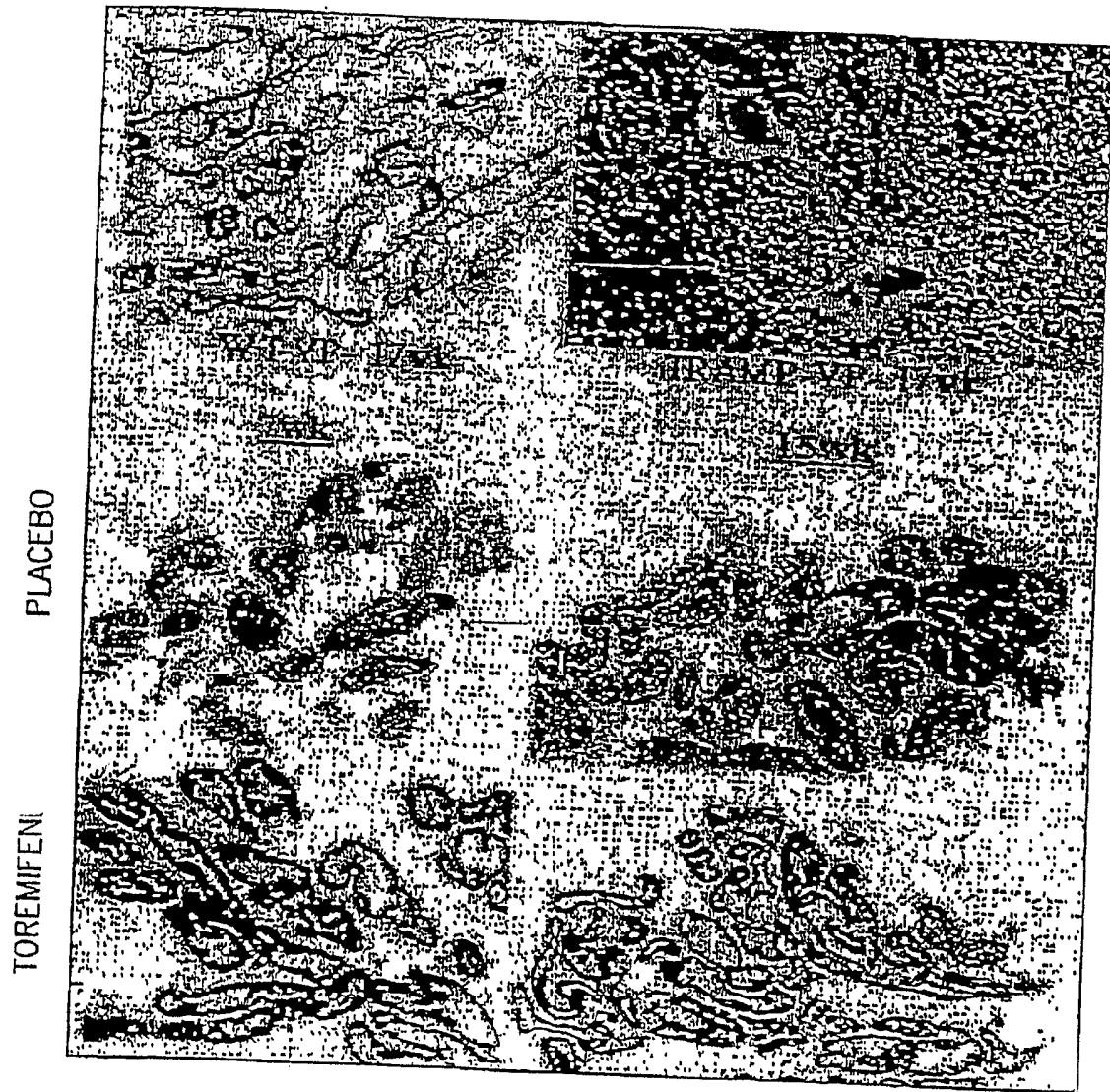


Obr. 4

01.07.02

PV 2002 - 1463

5/6

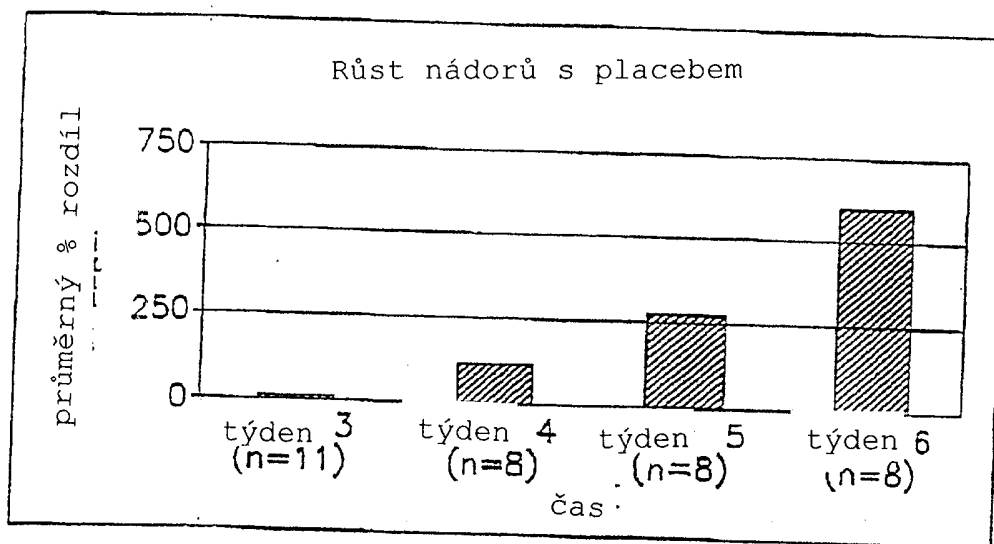


Obr. 5

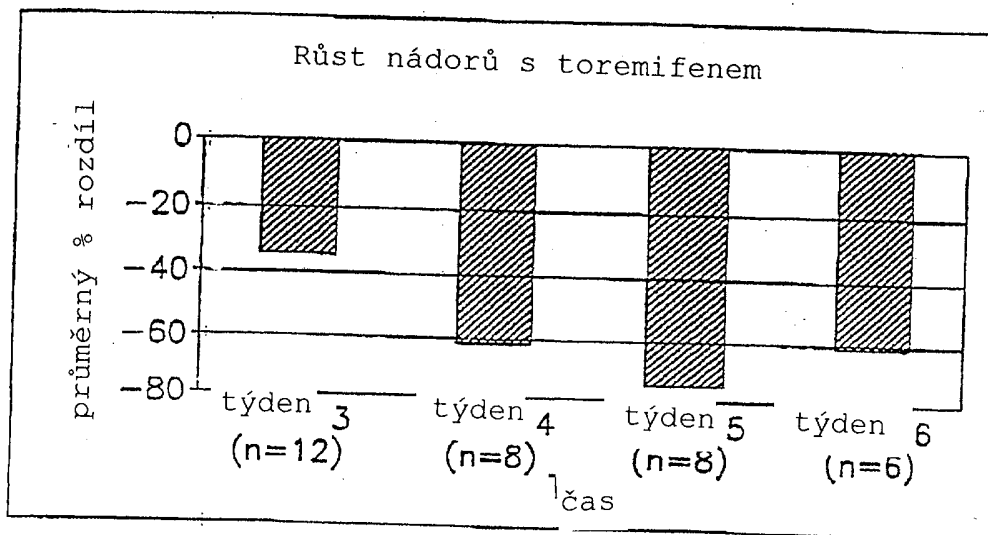
01.07.02

PV 2002-1763

6/6



doba po léčbě		% změna proti dnu 0
týden	3 (n=11)	9,44
týden	4 (n=8)	115,27
týden	5 (n=8)	271,71
týden	6 (n=8)	600,88



doba po léčbě		% změna proti dnu 0
týden	3 (n=12)	-34,58
týden	4 (n=8)	-61,01
týden	5 (n=8)	-74,51
týden	6 (n=6)	-61,72