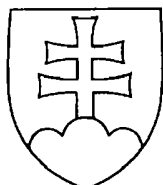


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **8. 11. 2000**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **09/436 208**
09/531 472
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **8. 11. 1999**
20. 3. 2000
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US, US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **4. 3. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **3/2003**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US00/30658**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO01/34117**

(11), (21) Číslo dokumentu:

816-2002

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

A61K 9/14

(71) Prihlasovateľ: **The University of Tennessee Research Corporation, Knoxville, TN, US;**

(72) Pôvodca: **Steiner Mitchell S., Germantown, TN, US;**
Raghow Sharan, Germantown, TN, US;

(74) Zástupca: **PATENTSERVIS BRATISLAVA, a. s., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Použitie antiestrogénu na liečenie rakoviny prostaty**

(57) Anotácia:
Je opísané použitie antiestrogénu alebo jeho analógu, derivátu, izoméru alebo jeho metabolitu, alebo ich farmaceuticky prijateľných solí, esterov alebo N-oxidov na výrobu liečiva na prevenciu rozvoja rakoviny prostaty u jedinca, na zvýšenie doby prežitia jedinca s rakovinou prostaty alebo na liečenie jedinca s rakovinou prostaty.

SK 816-2002 A3

Použitie antiestrogénu na liečenie rakoviny prostaty

Oblasť techniky

Tento vynález sa týka použitia antiestrogénu alebo jeho analógov alebo jeho metabolitov na výrobu liečiva na chemickú prevenciu rakoviny prostaty, najmä na potlačenie alebo inhibíciu latentnej rakoviny prostaty. Činidlo na chemickú prevenciu zabraňuje opätovnému výskytu, potláča alebo inhibuje vývoj rakoviny a lieči rakovinu prostaty.

Doterajší stav techniky

Rakovina prostaty je jednou z najčastejšie sa vyskytujúcich rakovín u mužov v Spojených štátoch, so stotisícami nových prípadov diagnostikovaných ročne. Žiaľ, viac než 60% novo diagnostikovaných prípadov rakoviny prostaty je zistených v patologickom štádiu, s neliečiteľnou alebo nepriaznivou prognózou. Jeden prístup k tomuto problému je zistiť rakovinu prostaty včasnšie prostredníctvom screeningových programov, a tým redukovať počet pokročilej rakoviny prostaty u pacientov. Ďalšou stratégiou však je vyvinúť liečivá na prevenciu rakoviny prostaty. Každý tretí muž nad 50 rokov má latentnú formu rakoviny prostaty, ktorá môže byť aktivovaná do klinickej formy život ohrozujúcej rakoviny prostaty. Časť latentných nádorov prostaty sa zvyšuje v podstate s každým rokom po päťdesiatich rokoch života (5,3 – 14%) až do deväťdesiatich rokov života (40 – 80%). Počet ľudí s latentnou rakovinou prostaty je rovnaký vo všetkých kultúrach, etnických skupinách a rasách, časť klinicky agresívnej rakoviny je značne rozdielna. Toto vyjadruje, že environmentálne faktory môžu zohrávať úlohu pri aktivovaní latentnej rakoviny prostaty. Teda, vývoj stratégií chemickej prevencie rakoviny prostaty môže mať najväčší celkový medicínsky aj ekonomický dopad.

Toremifén je príkladom trifenylakénovej zlúčeniny popísanej v US patentoch č. 4 696 949 a 5 491 173 od Toivola et al., objavy ktorých sú tu zahrnuté referenciou. Parenterálne a lokálne podávanie formulácie obsahujúcej Toremifén cicavcom je popísané v US patente č. 5 571 534 od Jablonen et al. a v US patente č. 5 605 700 od DeGregorio, objavy ktorých sú tu zahrnuté referenciou.

US patent č. 5 595 985 od Labrie, objav ktorého je tu zahrnutý referenciou, tiež popisuje spôsob liečby benígnej hyperplázie prostaty použitím kombinácie inhibítora 5 α -reduktáza zlúčeniny, ktorá viaže a blokuje prístup k androgénovým receptorom. Jedným príkladom zlúčeniny, ktorá blokuje androgénové receptory, je flutamid.

US patenty č. 4 329 364 a 4 474 813 od Neri et al., objavy ktorých sú tu zahrnuté referenciou, popisujú farmaceutické prípravky obsahujúce flutamid na oneskorenie a/alebo prevenciu začiatku rakoviny prostaty. Prípravok môže byť vo forme kapsule, tablety, čípky alebo elixíru. Napriek týmto vývojom existuje pokračujúca potreba činidiel a spôsobov efektívnych pre prevenciu rakoviny prostaty.

Pretože je vysoký výskyt a úmrtnosť na rakovinu prostaty, je naliehavé vyvinúť stratégie chemickej prevencie voči zničujúcemu ochoreniu. Pochopiac tieto faktory, ktoré prispievajú k vývinu rakoviny prostaty zahrňujúce iniciáciu, vznik a vzostup rakoviny prostaty, budú sa uskutočňovať molekulové mechanické záchytné body ako príslušné body zasahovania pre prevenciu alebo zastavenie vývoja rakovinového procesu. Keďže častosť rakoviny prostaty sa rýchlo stupňuje v tom istom veku, keď muži čelia aj ďalším príčinám úmrtnosti, jednoduché spomaľovanie vzostupu adenokarcinómu prostaty môže byť vhodnejšou nákladovo efektívnou zdravotnou stratégiou. Predkladaný vynález je zameraný na uspokojenie tejto potreby.

Ďalej, keďže vnútroepitelová neoplázia prostaty je v priamej príčinnej ceste k rakovine prostaty a jej prítomnosť špecificky znamená zvýšené riziko rakoviny prostaty, muži s diagnózou vnútroepitelovej neoplázie prostaty majú podstatné zmeny v kvalite života. Jedinou cestou na diagnostikovanie vnútroepitelovej neoplázie prostaty je biopsia prostaty. Keď je však urobená diagnóza vnútroepitelovej neoplázie, štandardná lekárska starostlivosť je taká, že pacient musí byť podrobený častým biopsiám a prehliadkam u lekára. Pritom je veľké znepokojenie pacienta aj lekára, pretože diagnóza rakoviny prostaty je neodvratná. Bežne nie je pre pacientov s vnútroepitelovou neopláziou možná liečba.

Podstata vynálezu

Tento vynález sa týka spôsobu prevencie vývoja karcinómu prostaty u jedinca, tento spôsob zahrňuje: podávanie farmaceutického prípravku obsahujúceho antiestrogén, alebo jeho analóg, derivát, izomér a ich metabolit; a ich farmaceuticky prijateľné soli, estery alebo N-oxidy a ich zmesi, cicavcovi.

Tento vynález sa týka spôsobu potlačenia alebo inhibovania rakoviny prostaty u jedinca, tento spôsob zahŕňa: podávanie farmaceutického prípravku obsahujúceho antiestrogén, alebo jeho analóg, derivát, izomér a ich metabolit; a ich farmaceuticky prijateľné soli, estery alebo N-oxidy, a ich zmesi, cicavcovi.

Tento vynález sa týka spôsobu redukovania rizika rozvinutej rakoviny prostaty u jedinca obsahujúceho: podávanie farmaceutického prípravku obsahujúceho antiestrogén, alebo jeho analóg, derivát, izomér a ich metabolit; a ich farmaceuticky prijateľné soli, estery alebo N-oxidy a ich zmesi, cicavcovi.

Tento vynález sa týka spôsobu zvýšenia doby prežitia jedinca majúceho rakovinu prostaty, tento spôsob zahŕňa: podávanie farmaceutického prípravku obsahujúceho antiestrogén, alebo jeho analóg, derivát, izomér a ich metabolit; a ich farmaceuticky prijateľné soli, estery alebo N-oxidy a ich zmesi, cicavcovi.

Tento vynález sa týka spôsobu liečenia jedinca s rakovinou prostaty, tento spôsob zahŕňa: podávanie farmaceutického prípravku obsahujúceho antiestrogén, alebo jeho analóg, derivát, izomér a ich metabolit; a ich farmaceuticky prijateľné soli, estery alebo N-oxidy a ich zmesi, cicavcovi.

Tento vynález sa týka spôsobu redukovania množstva prerakovinových prekursorov lézií adenokarcinómu prostaty u jedinca, tento spôsob zahŕňa: podávanie farmaceutického prípravku obsahujúceho antiestrogén, alebo jeho analóg, derivát, izomér a ich metabolit; a ich farmaceuticky prijateľné soli, estery alebo N-oxidy, a ich zmesi, cicavcovi.

V jednom uskutočnení antiestrogénom je modulátor selektívnych estrogénových receptorov (SERMs), trifenyletylén alebo trifenylalkán. V jednom uskutočnení prerakovinovým prekursorom adenokarcinómu prostaty je vnútroepitelová neoplázia prostaty (PIN). V jednom uskutočnení je prerakovinovým prekursorom adenokarcinómu prostaty vyšší stupeň vnútroepitelovej neoplázie prostaty (PIN).

Predkladaný vynález uskutočňuje bezpečný a efektívny spôsob prevencie vývoja karcinómu prostaty, potlačenie alebo inhibovanie latentnej rakoviny prostaty a je mimoriadne užitočný na liečbu jedincov majúcich zvýšené riziko vyvinutia rakoviny prostaty, napríklad tých, ktorí majú benígnu hyperpláziu prostaty, vnútroepitelovú neopláziu prostaty (PIN), alebo norme nezodpovedajúce vysoké hladiny špecifickej protilátky cirkulujúcej v prostate (PSA), alebo ktorí majú rodinnú dispozíciu rakoviny prostaty.

Prehľad obrázkov na výkresoch

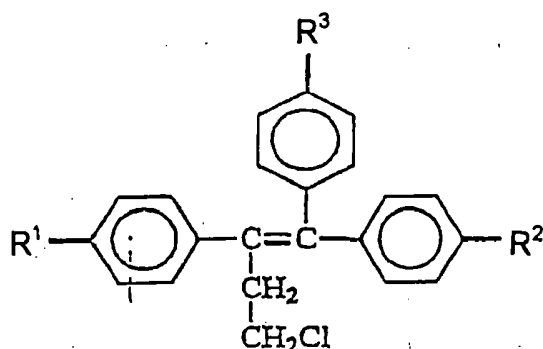
- Obr. 1: Graf zobrazujúci účinky chemickej prevencie Toremifénu v modeli TRAMP,
 Obr. 2A-2C: Sekcie H&E zobrazujúce ventrálne bunky prostaty u bežných myší a rakoviny prostaty u TRAMP myší zahrnutých v tejto štúdii.
 Obr. 3: Účinok Toremifénu na vyvinutie ventrálnej prostaty u TRAMP myší.
 Obr. 4: Účinok Toremifénu na výskyt nádoru u TRAMP myší.
 Obr. 5: Účinok Toremifénu na vyvinutie nádoru v TRAMP modeli.
 Obr. 6A-6B: Porovnanie placebo voči účinkom Toremifénu na rast nádoru.

Podrobný popis vynálezu

Tento vynález uskutočňuje: 1) spôsob prevencie vývoja karcinómu prostaty, 2) spôsoby potlačenia alebo inhibovania rakoviny prostaty, 3) spôsoby redukovania rizika vývoja karcinómu prostaty, a 4) spôsoby zvýšenia doby prežitia jedinca, 5) spôsoby liečenia rakoviny prostaty, 6) spôsoby znižovania vnútroepitelovej neoplázie prostaty a spôsoby znižovania množstva lézií vnútroepitelovej neoplázie prostaty na vysokom stupni vývoja, podávaním činidla chemickej prevencie, ktoré je tu uskutočnené.

V jednom uskutočnení činidlom chemickej prevencie je antiestrogén, jeho analóg, derivát, izomér a ich metabolit. V ďalšom uskutočnení je činidlom chemickej prevencie trifenyalkán alebo jeho analóg, izomér a ich metabolit. V ďalšom uskutočnení je činidlom chemickej prevencie dihydronaftalén, jeho analóg, derivát, izomér a ich metabolit. V ďalšom uskutočnení je činidlom chemickej prevencie benzotiofén alebo jeho analóg, derivát, izomér a ich metabolit. V ďalšom uskutočnení je činidlom chemickej prevencie modulátor selektívnych estrogénových receptorov (SERMs) a jeho analóg, derivát, izomér a ich metabolit. V ďalšom uskutočnení je antiestrogénom nie DNA adukt vytvárajúci antiestrogén a jeho analóg, derivát, izomér a ich metabolit. V jednom uskutočnení je činidlom chemickej prevencie taximofén. V ďalšom uskutočnení je činidlom chemickej prevencie faslodex. V ďalšom uskutočnení je činidlom chemickej prevencie raloxifén.

V jednom uskutočnení týkajúcom sa použitia činidla chemickej prevencie pre zabránenie vývoju karcinómu prostaty, potlačenie alebo inhibovanie rakoviny prostaty, činidlo chemickej prevencie nezahrňuje zlúčeninu, ktorá má vzorec:



(1)

kde R^1 a R^2 , ktoré môžu byť rovnaké alebo rôzne, sú H alebo OH, R^3 je $OCH_2CH_2NR^4R^5$, kde R^4 a R^5 , ktoré môžu byť rovnaké alebo rôzne, sú H alebo alkyl skupina s 1 až 4 atómami uhlíka a analógy a ich metabolity.

Ako je tu ukázané, tamoxifén, faslodex a raloxifén, ktoré sú príkladmi antiestrogénov, je činidlo chemickej prevencie prostaty a činidlo vnútroepitelovej neoplázie prostaty.

Medzistupňové koncové body biomarkerov sú merateľné biologické zmeny v tkanive, ktoré sa vyskytujú medzi začiatočnou a rozvinutou otvorenou neopláziou. Biomakerom sa overí, či sa výsledný koncový bod pri rozsahu rakoviny tiež redukuje predpokladaným činidlom chemickej prevencie. Medzistupňové biomarkery u rakoviny môžu byť zatriedené do nasledujúcich skupín: histologické, proliferčné, diferečné a biochemické markery. U ktorejkoľvek stratégie chemickej prevencie vytvára možnosť histologicky spoznatelných a akceptovaných lézií dôležitý východiskový bod. U prostaty histologický marker je prerakovinovým prekursorom adenokarcinómu prostaty, ktorého príkladom je vnútroepitelová neoplázia prostaty (PIN). PIN sa javí ako chorobná proliferácia v rámci prostatických kanálikov premalígnych ložísk bunkovej dysplázie a karcinóm in situ bez stromálnej invázie. PIN a histologická rakovina prostaty sú morfometricky a fenotypicky podobné. Teda, vyvinutie vysokého stupňa PIN predstavuje dôležitý krok v progresívnej ceste, a podľa toho sa v normálnej prostate vyvíja PIN, histologická rakovina prostaty, invazívna klinická rakovina prostaty a metastázy.

Vnútroepitelová neoplázia prostaty bola ukázaná ako prerakovinová lézia, alebo prekursor adenokarcinómu prostaty. Vnútroepitelová neoplázia prostaty je chorobnou proliferáciou v rámci prostatických kanálikov premalígnych ložísk bunkovej dysplázie a karcinóm in situ bez stromálnej invázie. Vnútroepitelová neoplázia je najpresnejším a najspoľahlivejším markerom vzniku rakoviny prostaty a môže byť použitá ako akceptovateľný koncový bod v pokusoch chemickej prevencie prostaty.

Vnútroepitelová neoplázia prostaty má predpovedaciu hodnotu ako marker adenokarcinómu a jej identifikáciu dokazuje opakovaná biopsia pre súčasný alebo následný invazívny karcinóm. Väčšina štúdií ukazuje, že u pacientov s vnútroepitelovou neopláziou prostaty sa rozvinie karcinóm do 10 rokov. Je zaujímavé, že vnútroepitelová neoplázia prostaty neprispieva k séru PSA, čo nie je prekvapujúce, keďže na rozdiel od rakoviny prostaty, vnútroepitelová neoplázia prostaty nenapadla ešte svalovinu prostaty, aby prepúšťala PSA do prúdu krvi. Teda, vnútroepitelová neoplázia prostaty môže predchádzať aj rakovine prostaty, pokiaľ ide o zvýšenia PSA séra.

V jednom uskutočnení, v ktorom antiestrogény pôsobia ako činidlá chemickej prevencie prostaty, antiestrogény zahŕňujú: trifenyletylény, ktoré zahŕňujú droloxifén, idoxifén, (2)-4-OH-tamoxifén, arzoxifén; chrómany, ako je levomeloxifén a centchróman; benzotiofény, ako je raloxifén a LY 353381; naftalény, ako je CP336 156. V ďalšom uskutočnení činidlo chemickej prevencie zahŕňuje fytoestrogény, ako sú izoflavonoidy zahŕňujúce daidzein, genistein, yenoestrogény; coumentrol; zealralenón, daidzein; apigenín; waemferol; floretín; biochanín A; naringenín; formononetín; ipriflavón; quercetín; a chryzín. V ďalšom uskutočnení činidlo chemickej prevencie zahŕňuje flavonoidy; flavóny, izoflavóny, flavanóny a chalkóny; coumestány; mykoestrogény; laktón rezorcyklovej kyseliny; nafoxidén a equol, a lignán zahŕňujúci enterodiol a enterolaktón. V ďalšom uskutočnení činidlo chemickej prevencie zahŕňuje nasledujúce zlúčeniny: ICI 164 384, ICI 172 780; TAT-59, EM-652 (SCG 57068), EM-800 (SCH570), EM-139, EM-651, EM-776, a peptidového antagonistu ľudských estrogénových receptorov.

Tento vynález uskutočňuje použitie prípravku a farmaceutického prípravku na prevenciu vývoja karcinómu prostaty; potlačenie alebo inhibovanie rakoviny prostaty; redukovanie rizika rozvinutia rakoviny prostaty; zvýšenie doby prežitia jedinca; liečenie rakoviny prostaty; ústup vnútroepitelovej neoplázie prostaty a redukovanie množstva lézií vnútroepitelovej neoplázie prostaty na vysokom stupni vývoja, podávaním činidiel chemickej prevencie, ako sú tu uskutočnené, a nosiča alebo riedidla a/alebo ich farmaceuticky prijateľného nosiča, riedidiel, solím esterov alebo N-oxidov a ich zmesí.

Predkladaný vynález uskutočňuje bezpečný a efektívny spôsob prevencie vývoja karcinómu, potlačenie alebo inhibovanie latentnej rakoviny prostaty a je mimoriadne

užitočný na liečenie jedincov majúci zvýšené riziko rozvinutia rakoviny prostaty, napríklad tých, ktorí majú benígnu hyperpláziu prostaty, vnútroepitelovú neopláziu prostaty (PIN), alebo nie normálne vysokú hladinu špecifickej protilátky cirkulujúcej v prostate (PSA), alebo ktorí majú rodinnú dispozíciu rakoviny prostaty. V jednom uskutočnení je jedincom cicavec. V ďalšom uskutočnení je jedincom človek.

Vynález obsahuje čisté (Z)- a (E)-izoméry zlúčenín a ich zmesi, ako aj čisté (RR, SS)- a (RS, SR)-enantiomérne páry a ich zmesi.

Vynález zahrňuje farmaceuticky akceptovateľné soli amino-substituovaných zlúčenín s organickými alebo anorganickými kyselinami, napríklad, kyselinu citrónovú a kyselinu chlorovodíkovú. Vynález tiež zahrňuje N-oxidy amino-substituentov zlúčenín vzorca (I). Farmaceuticky prijateľné soli môžu byť pripravené aj z fenolových zlúčenín reagovaním s anorganickými zásadami, napríklad hydroxidom sodným. Taktiež estery fenolových zlúčenín môžu byť vyrobené s alifatickými a aromatickými karboxylovými kyselinami, napríklad esterami kyseliny octovej a kyseliny benzoovej.

Ako sa tu používa, farmaceutický prípravok znamená terapeuticky účinné množstvá činidla spolu s vhodnými riedidlami, konzervačnými látkami, rozpúšťajúcimi látkami, emulgačnými činidlami, adjuvansami a/alebo nosičmi. „Terapeuticky účinné množstvo“, ako sa tu používa, znamená také množstvo, ktoré zabezpečuje terapeutický účinok za daných podmienok a podávacieho režimu. Také prípravky sú kvapaliny alebo lyofilizované alebo inak vysušené formulácie a zahrňujú riedidlá s rôznym obsahom pufru (napríklad Tris-HCl, acetát, fosfát), pH a iónovú silu, aditíva ako je albumín alebo želatína pre zabránenie absorpcie na povrchoch, detergenty (napríklad Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, soli kyseliny žlčovej), rozpúšťajúce činidlá (napríklad glycerol, polyetylén glycerol), antioxidanty (napríklad kyselina askorbová, metadvojsíran sodný), konzervačné látky (napríklad Thimerosal, benzylalkohol, parabény) látky zväčšujúce objem alebo modifikátory tonusu (napríklad laktóza, manitol), kovalentné pripojenie polymérov, ako je napríklad polyetylénglykol k proteínom, vytvorenie komplexov s iónmi kovov, alebo začlenenie látky do alebo na časticové prípravky polymérnych zlúčenín, ako je polymliečna kyselina, polyglykolová kyselina, hydrogély, atď., alebo na lipozómy, mikroemulzie, micely, jednolamelárne alebo mnoholaminárne nosiče, erytrocytové línie alebo sféropasty. Také prípravky budú vplývať na fyzikálny stav, rozpustnosť, stabilitu, rýchlosť uvoľnenia in vivo, a rýchlosť odstránenia in vivo. Kontrolované alebo plynulé

uvolňovacie prípravky zahrňujú formuláciu lipofilných depotov (napríklad mastných kyselín, voskov, olejov). Taktiež sú týmto vynálezom zahrnuté časticové prípravky potiahnuté polymérmi (napríklad poloxamérmi alebo poloxamínmi). Ďalšie uskutočnenia prípravkov tohto vynálezu začleňujú časticové formy ochranných povlakov, proteázové inhibítory alebo zosilňovače prenikania pre rôzne cesty podávania zahrňujúce parenterálnu, pulmorálnu, nasálnu alebo orálnu. V jednom uskutočnení farmaceutický prípravok je podávaný parenterálne, parakancerálne, transmukosálne, transdermálne, intramuskulárne, intravenózne, intradermálne, subkutánne, intraperitoneálne, intraventrikulárne, intrakraniálne a intratumorálne. Dávka môže byť v rozmedzí 5 - 80 mg/deň. V ďalšom uskutočnení je dávka v rozmedzí 35 - 66 mg/deň. V ďalšom uskutočnení je dávka v rozmedzí 40 - 60 mg/deň. V ďalšom uskutočnení je dávka v rozmedzí 45 - 60 mg/deň. V ďalšom uskutočnení je dávka v rozmedzí 15 - 25 mg/deň. V ďalšom uskutočnení je dávka v rozmedzí 55 - 65 mg/deň. V ďalšom uskutočnení je dávka 55 - 65 mg/deň. V ďalšom uskutočnení je dávka 45 - 60 mg/deň. Dávka môže byť 60 mg/deň. Dávka môže byť 20 mg/deň. Dávka môže byť 45 mg/deň. Tableta pre orálne podávanie obsahujúca 88,5 mg činidla chemickej prevencie, ktoré je ekvivalentné 60 mg činidla chemickej prevencie.

Ďalej, ako je tu použitý, farmaceuticky prijateľný nosič, je dobre známy odborníkom v stave techniky a zahrňuje, ale nie je obmedzený, 0,01 – 0,1 M a prednostne 0,05 M fosfátového pufru alebo 0,8% fyziologický roztok. Navyše, takéto farmaceuticky prijateľné nosiče môžu byť vodné alebo nevodné roztoky, suspenzie a emulzie. Príklady nevodných rozpúšťadiel sú propylénglykol, polyetylénglykol, rastlinné oleje, ako je olivový olej, a injektovateľné organické estery, ako je etyloléat. Vodné nosiče zahrňujú vodu, alkohol/voda roztoky, emulzie alebo suspenzie, vrátane soľných alebo pufrových prostredí. Parenterálne vehikulá zahrňujú roztok chloridu sodného, Ringerovu dextrózu, dextrózu a chlorid sodný, laktované Ringerove alebo fixné oleje. Intravenózne vehikulá zahrňujú fluidné alebo výživové doplnovače, elektrolytové doplnovače, ako sú tie, ktoré sú na báze Ringerovej dextrózy, a podobne. Taktiež môžu byť prítomné konzervačné látky a ďalšie aditíva, ako sú napríklad antimikrobiálne látky, antioxidanty, kolaciačné činidlá, inertné plyny a podobne.

Pojem „adjuvans“ znamená zlúčeninu alebo zmes, ktorá zvyšuje imunitnú reakciu na antigén. Adjuvans môže slúžiť ako tkanivový depot, ktorý pomaly

uvolňuje antigén a tiež ako lymfoidný systémový aktivátor, ktorý nešpecificky zvyšuje imunitnú odpoveď (Hood et al., *Immunology, Second Ed.*, 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, str. 384). Často primárny imunologický test so samotným antigénom v neprítomnosti adjuvansu nebude vyvolávať humorálnu alebo celulárnu imunitnú odpoveď. Adjuvans zahrňuje, ale nie je obmedzený, úplný Freundov adjuvans, neúplný Freundov adjuvans, saponín, minerálne gely, ako je hydroxid amónny, povrchovo aktívne látky, ako je lyzolecitín, plurónové polyoly, polyanióny, peptidy, olejové alebo uhl'ovodíkové emulzie, kľúčové prísavné hemokyaníny, dinitrofenol a potenciálne užitočný ľudský adjuvans, ako je BCG (*bacille Calmette-Guerin*) a *Corynebacterium parvum*. Prednostne je adjuvans farmaceuticky prijateľný.

Kontrolované alebo plynulé uvoľňovacie prípravky zahrňujú formuláciu v lipofilnom depote (napríklad masťné kyseliny, vosky, oleje). Taktiež sú týmto vynálezom zahrnuté časticové prípravky potiahnuté polymérmi (napríklad poloxamérmi alebo poloxamínmi) a zlúčenina združená s protilátkami zameraná proti tkanivovo-špecifickým receptorom, ligandy alebo protilátky alebo spojené s tkanivovo-špecifickými receptormi. Iné uskutočnenia prípravkov tohto vynálezu začleňujú časticové formy ochranných povlakov, proteázové inhibítory alebo zosilňovače prenikania pre rôzne cesty podávania, zahrňujúce parenterálne, pulmorálne, nasálne alebo orálne. Zlúčeniny modifikované kovalentným pripojením vo vode rozpustných polymérov, ako je polyetylén glykol, kopolymérov polyetylén glykolu a polypropylén glykolu, karboxymetylcelulózy, dextránu, polyvinylalkoholi, polyvinylpyrolidónu alebo polyprolínu sú známe tým, že vykazujú podstatne dlhšie polčasy rozkladu v krvi po intravenóznom injektovaní než zodpovedajúce nemodifikované zlúčeniny (Abuchowski et al., 1981, Newmark et al., 1982, a Katre et al., 1987). Takéto modifikácie môžu zvyšovať ak rozpustnosť zlúčenín vo vodnom roztoku, eliminovať zhlukovanie, zvyšovať fyzikálnu a chemickú stabilitu zlúčeniny, a väčšmi redukovať imunogenickosť a reaktivnosť zlúčeniny. Ako výsledok môže byť požadovaná in vivo biologická aktivita dosiahnutá podávaním takýchto abduktov zlúčeniny polyméru menej často alebo v menších dávkach než s nemodifikovanou zlúčeninou.

V ešte ďalšom uskutočnení farmaceutický prípravok môže byť dodaný v kontrolovanom uvoľňovacom systéme. Napríklad, činidlo môže byť podávané použitím intravenózneho infúzie, implantovateľnej osmotickej striekačky,

transdermolnej náplasti, lipozómov alebo inými druhmi podávania. V jednom uskutočnení môže byť použitá striekačka (viď Langer, supra, 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 ďalšom uskutočnení môžu byť použité polymérne materiály. V ešte ďalšom uskutočnení kontrolovaný uvoľňovací systém môže byť umiestnený v blízkosti terapeutického cieľa, t.j. mozgu, takto vyžadujúc len frakciu systémovej dávky (viď napríklad Goodson, v Medical Applications of Controlled Release, supra, zväzok 2, strany 114-138 (1984). Prednostne je kontrolovaná zvolňovacia jednotka zavedená do jedinca v blízkosti miesta nevhodného pre imunitnú aktiváciu alebo nádoru. Ďalšie kontrolované uvoľňovacie systémy sú rozoberané v preskúmaní urobenom Langerom (Science 249:1527-1533 (1990).

Spôsob podľa predkladaného vynálezu na prevenciu vývoja karcinómu prostaty zahŕňa podávanie farmaceutického prípravku obsahujúceho činidlo chemickej prevencie alebo metabolitu alebo ich soli, cicavcovi. Farmaceutický prípravok môže obsahovať činidlo chemickej prevencie samostatné, alebo môže ďalej zahŕňať farmaceuticky prijateľný nosič, a môže byť v pevnej alebo kvapalnej forme, ako sú tablety, prášky, kapsule, pilule, roztoky, suspenzie, elixíry, emulzie, gély, krémy, alebo čípky, vrátane rektálnych a uretrálnych čípok. Farmaceuticky prijateľné nosiče zahŕňujú arabskú gumu, škroby, cukry, celulózoové látky, a ich zmesi. Farmaceutický prípravok obsahujúci činidlo chemickej prevencie môže byť podávané jedincovi, napríklad subkutánnou implantáciou piluly; v ďalšom uskutočnení pilula umožňuje kontrolované podávanie činidla chemickej prevencie počas časového obdobia. Prípravok môže byť podávaný aj intravenóznym, intraarteriálnym alebo intramuskulárnym injektovaním kvapalného prípravku, orálnym podávaním kvapalného alebo pevného prípravku, alebo lokálnou aplikáciou. Podávanie môže byť vykonané aj použitím rektálneho čípku alebo uretrálneho čípku. Farmaceutický prípravok môže byť tiež parenterálna formulácia; v jednom uskutočnení formulácia obsahuje lipozóm, ktorý zahŕňa komplex činidla chemickej prevencie, ako je napríklad Toremifén a cyklodextrínová zlúčeninu, ako sú popísané v už citovanom US patente č. 5 571 534 od Jablonen et al.

Farmaceutické prípravky tohto vynálezu môžu byť pripravené známym rozpúšťaním, zmiešaním, granulovaním, alebo tablety vytvárajúcimi procesmi. Pre orálne podávanie sú činidlá chemickej prevencie alebo ich fyziologicky tolerované

deriváty, ako sú soli, estery, N-oxidy, a podobne zmiešané s aditívami obvyklými pre tento účel, akú sú vehikulá, stabilizátory alebo inertné riedidlá, a konvertované obvyklými spôsobmi na vhodnú formu podávania, ako sú tablety, potiahnuté tablety, tvrdé a mäkké želatinové kapsuly, vodné, alkoholové alebo olejové roztoky. Príklady vhodných inertných vehikulov sú konvenčné tabletové bázy, ako je laktóza sacharóza alebo obilný škrob v kombinácii so spojivami, ako je achát, obilný škrob, želatina alebo rozkladajúcimi činidlami, ako je obilný škrob, zemiakový škrob, alginová kyselina, alebo s mazivami, ako je stearová kyselina alebo stearát horečnatý. Príkladmi vhodných olejových vehikulov alebo rozpúšťadiel sú rastlinné alebo živočíšne oleje, ako je slnečnicový olej alebo olej z rybej pečene. Prípravky môžu byť uskutočnené ako suché aj ako vlhké granule. Pre parenterálne podávanie (subkutánne, intravenózne, intraarteriálne alebo intramuskulárne injektovanie) činidlá chemickej prevencie alebo ich fyziologicky tolerované deriváty, ako sú soli, estery, N-oxidy a podobne, sú konvertované na roztok, suspenziu alebo emulziu, ak je to žiadúce s látkami obvyklými a vhodnými na tento účel, napríklad s rozpúšťajúcimi látkami alebo pomocnými látkami. Príkladmi sú: sterilné kvapaliny, ako je voda a oleje, s alebo bez pridania povrchovo aktívnej látky alebo iného farmaceuticky prijateľného adjuvansa. Ilustratívne oleje, sú tie, ktoré sú z ropy, živočíšne, rastlinné alebo syntetického pôvodu, napríklad olej podzemnice olejnej, sójový olej, alebo minerálne oleje. Vo všeobecnosti sú voda, soľanka, vodná dextróza a od nej príslušné roztoky cukrov, a glykoly, ako sú propylénglykoly alebo polyetylénglykol, preferované kvapalné nosiče, najmä pre injektovateľné roztoky.

Prípravky farmaceutických prípravkov, ktoré obsahujú aktívnu zložku sú dobre chápané v stave techniky. Typicky takéto prípravky sú pripravené ako aerosol polypeptidu dodaný do nosného hrtana alebo ako injektovateľné, buď ako kvapalné roztoky alebo suspenzie, avšak môžu byť pripravené pevné formy vhodné do roztokov alebo suspenzií, ktoré sú pred injektovaním kvapalné. Prípravky môžu byť aj emulgované. Aktívna terapeutická zložka je často zmiešaná s excipientami, ktoré sú farmaceuticky prijateľné a kompatibilné s aktívnou zložkou. Vhodné excipienty sú, napríklad voda soľný roztok, dextróza, glycerol, etanol, alebo podobne a ich kombinácie. Popri tom, ak je to žiadúce, prípravok môže obsahovať menšinové množstvá pomocných látok, ako sú zvlhčovacie alebo emulgačné činidlá, pH pufrové činidlá, ktoré zvyšujú účinnosť aktívnej zložky.

Aktívna zložka môže byť formulovaná v prípravku vo formách neutralizovaných farmaceuticky prijateľných solí. Farmaceuticky prijateľné soli zahrňujú soli s pridaním kyseliny (vytvorené s voľnými aminoskupinami polypeptidu alebo molekulami protilátok) a ktoré sú vytvorené s anorganickými kyselinami, ako je napríklad chlorovodíková alebo fosforečná kyselina, alebo také organické kyseliny, ako je napríklad octová, šťavelová, vínna, mandľová kyselina a podobne. Soli vytvorené z voľných karboxylových skupín môžu byť tiež odvodené od anorganických zásad, ako je napríklad hydroxid sodný, draselný, amónny, vápenatý alebo železitý, a takých anorganických zásad ako izopropylamín, trimetylamín, 2-etylaminooetanol, histidín, prokain a podobne.

Pre miestne podávanie pre povrchy organizmu sa používajú napríklad krémy, gely, kvapky a podobne, činidlá chemickej prevencie alebo ich fyziologicky tolerované deriváty, ako sú soli, estery, N-oxidy, a podobne, ktoré sú pripravené a použité ako roztoky, suspenzie alebo emulzie vo fyziologicky prijateľnom riedidle s alebo bez farmaceutického nosiča.

V ďalšom uskutočnení aktívna zlúčenina môže byť dodaná ako mechúrik, v časticovom lipozóme (viď Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, strany 353-365 (1989); *ibid.*, strany 317-327; viď všeobecne tamtiež).

Farmaceutické prípravky predkladaného vynálezu sú značne užitočné na liečbu jedinca majúceho zvýšené riziko rozvinutia rakoviny prostaty. Vysokorizikovní jedinci zahrňujú, napríklad tých, ktorí majú benígnu hyperpláziu prostaty, vnútroepitelovú neopláziu prostaty (PIN), alebo nie normálne vysokú hladinu špecifickej protilátky cirkulujúcej v prostate (PSA), alebo ktorí majú rodinnú dispozíciu rakoviny prostaty.

Ďalej, činidlo chemickej prevencie môže byť podávané v kombinácii s ďalšími cytokínmi alebo rastovými faktormi zahrňujúcimi, ale neobmedzenými na ne: IFN γ alebo α , IFN- β ; interleukín (IL) 1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, faktor nádorovej nekrózy (TNF)- α , TNF- β , faktor stimulujúci granulocytové kolónie (G-CSF), granulocyt/makrofág CSF (GM-CSF); vedľajšie molekuly, vrátane členov integrínového naddruhu a členov Ig naddruhu, ako sú, ale neobmedzujú sa na ne, LFA-1, LFA-3, CD-22 a B7-1, B7-2 a ICAM-1 T bunkové ko-stimulačné molekuly.

Činidlo chemickej prevencie môže predchádzať alebo nasledovať liečbu DNA poškodzujúcim činidlom v rozmedzí intervalov od minút až po týždne. DNA poškodzujúce činidlá alebo faktory sú známe odborníkom v stave techniky a znamená akúkoľvek chemickú zlúčeninu alebo spôsob liečby, ktorý vyvoláva pri aplikovaní na bunku poškodenie DNA. Takéto činidlá a faktory zahŕňujú ožarovanie a vlny, ktoré vyvolávajú poškodenie DNA, ako je gama žiarenie, rönténové lúče, UV-žiarenie, mikrovlny, elektrónové emisie a podobne. Škála chemických zlúčenín, tiež popísaných ako „činidlá chemickej prevencie“ pôsobia na vyvolanie poškodenia DNA, všetky z nich sú uvažované ako užitočné v kombinovaných spôsoboch liečby, ktoré sú tu popísané. Činidlá chemickej prevencie predpokladané ako užitočné zahŕňujú napríklad adriamycín, 5-fluorouracil, (5FU), etopizid (VP-16), kamptotecín, aktinomycín-D, mitomycín C, cisplatin (CDDP) a snáď aj peroxid vodíka. Vynález tiež obsahuje použitie kombinácie jednej alebo viacerých DNA poškodzujúcich činidiel, či na báze žiarenia alebo skutočné zlúčeniny, ako je použitie rönténových lúčov s cisplatinom alebo použitie cisplatinu s etopozidom.

V ďalšom uskutočnení sa môže ožarovať lokalizované miesto nádor u DNA poškodzujúcim ožarovaním, ako sú rönténové lúče, UV-svetlom, gama lúčami alebo mikrovlnami. Alternatívne, nádorové bunky môžu byť kontaktované DNA poškodzujúcim činidlom podávaním jedincovi terapeuticky účinného množstva farmaceutického prípravku obsahujúceho DNA poškodzujúcu zlúčeninu, ako je adriamycín, 5-fluorouracil, etopozid, kamptotecín, aktinomycín-D, mitomycín C, alebo prednostnejšie cisplatin. Činidlá, ktoré poškodzujú DNA tiež zahŕňujú zlúčeniny, ktoré interferujú s DNA replikáciou, mitózou a chromozomálnou segregáciou. Také činidlá chemickej prevencie zahŕňujú adriamycín, tiež známy ako doxorubicín, etopozid, verapamil, podofylotoxín a podobne.

Ďalšie faktory, ktoré spôsobujú poškodenie DNA a sú extenzívne použité zahŕňujú tie, čo sú všeobecne známe ako gama lúče, rönténové lúče, a/alebo smerované dodanie rádioizotopov na nádorové bunky. Iné formy DNA poškodzujúcich faktorov sú tiež zahrnuté, ako sú mikrovlny a UV žiarenie. Je najpravdepodobnejšie, že všetky tieto faktory pôsobia na široký rozsah poškodenia DNA, na prekursor DNA, replikáciu a nápravu DNA a zoskupenie a udržiavanie chromozómov.

Ako môže byť okamžite ocenené odborníkom v stave techniky, spôsoby a farmaceutické prípravky predkladaného vynálezu sú značne vhodné na podávanie cicavcom, prednostne ľuďom.

Nasledujúce príklady sú prezentované pre úplne ilustrovanie prednostných uskutočnení tohto vynálezu. Nemali by byť však zostavené takým spôsobom, aby obmedzovali široký rozsah tohto vynálezu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1: Transgénový adenokarcinóm prostaty myší

Štúdiá chemickej prevencie rakoviny prostaty bola brzdená nedostatkom príslušných modelov zvierat. Nedávny rozvoj transgénového adenokarcinómu prostaty myšieho (TRAMP) modelu umožňuje štúdiu chemickej prevencie. V TRAMP modeli, ktorý je popísaný u Greenberg et al., Prostate cancer in a transgenic mouse, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1995, zväzok 92, strany 3439-3443, PB-SV40 veľký T-antigénový (PB-Tag) transgén je expresovaný špecificky v epitelových bunkách myšej prostaty. Ako výsledok, tento model má niekoľko výhod presahujúcich súčasne existujúce modely: 1) myši vyvinuli progresívne formy epitelovej hyperplázie prostaty skôr než za 10 týždňov a invazívny adenokarcinóm okolo 18 týždňov veku; 2) metastázové rozšírenie rakoviny prostaty modelov napodobujúcich ľudskú rakovinu prostaty s obvyklými miestami metastáz, ktorými sú lymfatické uzliny, pľúca, ľadviny, nadľadvinka a kosti; 3) rozvinutie, ako aj postup rakoviny prostaty môže pokračovať po relatívne krátky čas 10-30 týždňov; nádory vzniknú s 100 % častotou; a) zvieratá môžu byť screenované na prítomnosť transgénu rakoviny prostaty pred vznikom klinickej rakoviny prostaty pre priamu testovaciu liečbu s Toremifénom, ktoré môže meniť vývoj rakoviny prostaty.

TRAMP transgénový myší model je vynikajúcim in vivo modelom pre determinovanie mechanizmov iniciácie a podporení rakoviny prostaty a pre testovanie efektívnosti potenciálneho Toremifénu. Tieto myši progresívne rozvinuli epitelovú hyperpláziu prostaty, PIN, a potom rakovinu prostaty v krátkom časovom období (<17 týždňov).

Liečba chemickou prevenciou hybridu TRAMP myší je iniciovaná 30 dní postnatálne, použitím Toremifénu pri hladine asi 0,5-50 mg/kg hmotnosti jedinca/deň, prednostne 6-30 mg/kg hmotnosti jedinca/deň. Toremifén sú konvenčne spravované do 21-dňových a 90-dňových pilulách (pripravených Innovative Research of America,

Sarasota, FL) a dodaných ako subkutánne implantáty. Kontrolné zvieratá dostali placebo implantáty. V každej skupine, ktorá bola liečená liečivom, boli zvieratá usmrtené v 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40 a 50 týždňov veku, kým sa rozvinul hmatateľný nádor. Krv bola odobratá a daná do krvnej banky po časový bod liečby pre vyhodnotenie zmien testosterónu a estradiolu v sére. Tkanivá prostaty sú uložené na morfometrické, histologické a molekulárne štúdie.

Zahrnuté boli nasledujúce testovacie postupy:

- 1) Analýza celkového usporiadania prostaty je vykonaná viacnásobne pre zistenie zmien v kanálikovej morfológii prostaty počas času bez a s liečbou; príklady sú ukázané na Obr. 2. Tkanivové sekcie sú hodnotené histologicky s H&E a Masson-trichómovým štandardným sfarbením. Je stanovený a klasifikovaný vývoj PIN (I-slabý až III-kritický).
- 2) Je meraný estradiol v sére a celkové hladiny testosterónu (RIA) v každom intervale veku pre stanovenie všetkých zmien u týchto hormónov ako výsledok Toremifénu.

Príklad 2: Analýza imunohistochemických údajov

Mikroskopické obrazy každej tkanivovej sekcie sú hodnotené použitím počítačovej (Mac 9500.-I 32 počítača a monitora) obrazovej kvantifikácie (NIH-Image 1,6 PPC) použitím Kodak DCS 460 fotoaparátu na Nikon Microphot-FX mikroskope a kvantifikované použitím analýzy farebného kvantitatívneho systémového obrazu (IPLab Spectrum 3,1, Scanalytics, Inc., VA), ktorý rozlišuje farebné diferencie prostaty. Prahy sú predložené na identifikáciu rôznych tkanivových zložiek prostaty. Hustoty oblasti pixelov zodpovedajúce každému z týchto tkanivových zložiek sú vypočítané pre každé celé zobrazenie farebného monitora. Celkom 5 zobrazení na sekciu prostaty je spriemerovaných. Imunohistochemické obrazy môžu byť digitalizované a kvantifikované pre umožnenie štatistického hodnotenia determinovaním korelačných koeficientov vzoriek a pravdepodobnosti (2-záverové).

Príklad 3: Štúdia aktivity chemickej prevencie

Štúdia mala za cieľ testovanie účinnosti Toremifénu u TRAMP transgénových zvierat (PBT ag X FVBwt) (uskutočnil Dr. Norman Greenberg, Baylor College of Medicine, TX). Tieto myši ukázali predbežné znaky rakoviny skôr než za 10 týždňov. TRAMP transgénové samčie vrhy boli screenované na veľký T ag transgén

a pozitívni samci boli použiti pri štúdií. Antiestrogénový Toremifén, ktorý bol testovaný na jeho možné účinky chemickej prevencie, bol začlenený v pilulách vyrobených na objednávku (Innovative Research of America, Sarasota, FL), a liečba chemickej prevencie myší bola iniciovaná postnatálne v 30 dňoch (priemerná hmotnosť myší 14 g). Štyri skupiny 10-12 zvierat dostali subkutánne implantácie Toremifénu obsahujúcich pilúl s 90-dňovým uvoľňovaním. Dávka difúzovateľného liečiva, prispôbena pre rastových zmien hmotnosti, bola navrhnutá pre dodanie buď nízkej dávky (6 mg/kg) alebo vysokej dávky (30 mg/kg) Toremifénu. Kontrolné zvieratá (n=10) dostali placebo implantáty. Účinnosť liečby bola meraná neprítomnosťou vytvorenia hmatateľného nádoru. Nádory myšacej prostaty boli uložené a hodnotené molekulárnymi a histologickými technikami.

Použitím TRAMP transgénového modelu rakoviny prostaty, v ktorom každé zviera, ktoré zdedí gén rakoviny prostaty rozvinie rakovinu prostaty, bolo ukázané, že Toremifén zvyšuje latentnosť aj znižuje výskyt rakoviny prostaty.

Ako je ukázané na Obr. 1, účinky nízkej aj vysokej dávky Toremifénu boli efektívne. Vytvorenie nádoru pri ventrálnej prostate TRAMP myší bolo zaznamenané v 17. týždni pri placebo skupine (n=10), v 19. týždni pri vysokej dávke Toremifénom liečenej skupine (n=12) a v 28. týždni pri nízkej dávke Toremifénom liečenej skupine (n=12). Teda, 5 liečení Toremifénom podstatne zvýšilo latentnú dobu až do 11 týždňov pri rozvinutí rakoviny pri ventrálnej prostate TRAMP myší.

Keďže Toremifénom liečené zvieratá nedosiahli 50% vývojový bod nádoru počas doby štúdie, čas, v ktorom 25% zvierat malo nádory bol porovnaný medzi skupinami. Nádory boli hmatateľné v 25% z 10 zvierat v 23. týždni u placebo skupiny a 30.-31. týždni u skupín s vysokou a nízkou dávkou Toremifénu, oneskorenie 7-8 týždňov. Nízka dávka Toremifénu aj vysoká dávka Toremifénu oproti placebo boli výrazné pomocou záznamového zoradenia a Wilcoxonovej štatistickej analýzy, ako je ukázané v Tabuľke 1 nižšie.

Tabuľka 1

Štatistická analýza

	Log-rad	Wilcoxon
	P	p
Nízka dávka Toremifénu oproti placebo	0,0003*	0,0004*
Vysoká dávka Toremifénu oproti placebo	0,0017*	0,0071*

*hodnota $P < 0.05$

V 33. týždni bol bod, kedy sa u všetkých kontrolných zvierat rozvinuli nádory, 72% s nízkou dávkou a 60% s vysokou dávkou Toremifénu liečených zvierat bolo ešte stále bez nádoru. Teda, liečba Toremifénom pri nízkych aj vysokých dávkach mala za dôsledok väčšmi znížený výskyt nádorov pri ventrálnej prostate TRAMP myší. Tieto údaje ukázali, že výskyt rakoviny prostaty bol výrazne znížený a zvýšená bola latentná doba.

Ako už bolo povedané, podávanie Toremifénu vytvára podstatné účinky chemickej prevencie proti nádorom pri ventrálnej prostate TRAMP myší. Tento výsledok je podnecujúci pre podobný prínosový efekt na ľudských jedincov, ktorí ktorých prostate nezahŕňa segment zodpovedajúci ventrálnej prostate hlodavcov.

Príklad 4: Histologické vyšetrenie tkaniva prostaty

Nádory s placebo a s vysokou dávkou Toremifénu liečených skupín odobraté v čase hmatateľnosti boli hodnotené histologicky. Obr. 2A je H&E sekcia ventrálnej prostaty 17 týždňových normálnych dospelých myší. Obr. 2B, sekcia ventrálnej prostaty placebom liečených 16 týždňových TRAMP myší, ukazuje, že na rozdiel od normálnej štruktúry prostaty zobrazenej na Obr. 2A, ventrálna prostata TRAMP myší je charakterizovaná povlakmi nediferenciovaných, anaplastických buniek s vysokým mitotickým indexom. Naopak, ako je ukázané na Obr. 2C, prostata Toremifénom liečených 30 týždňových TRAMP myší si zachováva viac normálnej glandulárnej stavby a má nádory s viac diferenciovanou štruktúrou, mitotický index je oveľa nižší než je u placebom liečených zvierat. Tieto výsledky indikujú, že Toremifén, hoci v nízkych dávkach, je schopný potlačiť vyvinutie rakoviny prostaty v TRAMP modeli.

Western škrvnová analýza: Tkanivá prostaty (dorzolaterálne a ventrálne laloky) boli uložené v 10. týždňoch veku, udržiavané v zmrazenom stave v kvapalnom N₂ a uložené pri -80°C. Tkanivové lyzáty boli pripravené použitím RIPA pufru (150 mM NaCl, 1% NP40, 0,5% deoxycholát, 0,1% SDS a 50 mM Tris, pH 7,5) obsahujúceho zmiešanie proteázových inhibítorov (Pefabloc, aprotin, bestatin, leupeptín a pepstain) a fosfatázový inhibítor Na₃VO₄ (10 mM). Homogenát bol centrifugovaný pri 14 000x g pri 4°C po dobu 10 minút a lyzáty boli uložené pri -80°C.

Proteinové koncentrácie boli determinované použitím Bradfordového rozboru proteínov (Bio-Rad). Tkanivové lyzáty boli zavedené n 7,5% polyakrylamínové gely, proteíny (40µg/pruh) separované pomocou SDS-PAGE a elektroforeticky prenesené

do nitrocelulóзовých membrán (0,2µg, Bio-Rad, Hercules, CA) v prenosnom pufrí (192 mM glycín, 25 mM Tris-HCl a 20% metanol). Nádorové tkanivo prostaty TRAMP bolo použité ako pozitívna kontrola. Chemiluminiscentné Cruz markery (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) boli použité ako štandardy molekulovej hmotnosti. Škvŕny boli zaistené cez noc pri 4°C v BLOTTO (6% netučnom sušenom lieku v 1X TBS) a inkubované s chrenovou peroxidázou (HRP)-konjugovanou so sekundárnou protilátkou (1:5000) po dobu 1 hodiny pri 25°C. Imunoreakčné proteiny boli vizualizované na autoradiografický film použitím zvýšenej chemiluminiscenčného (ECL) systému (APB, Piscataway, NJ). Expresia aktínových proteínov bola použitá na normalizovanie Tag výsledkov. Na tento účel bola vyššie uvedená membrána ponorená do pufru zbaveného prchavých zložiek (100 mM 2-merkaptoetanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7) a inkubovaná pri 50°C po dobu 30 minút občasným premiešavaním. Po blokovaní bola membrána opätovne preniknutá aktínovou primárnou protilátkou (1:2500, Chemicon, Temecula, CA), po čom nasledovala (HPP)-konjugovaná sekundárna protilátka (1:10000). Po ELC detekcii boli intenzity pásov kvantifikované použitím Adobe Photoshop 5,0 Acquisition a ImageQuant Analysis (Molecular Dynamics) systémov.

Príklad 5: Použitie účinnosti chemickej prevencie Toremifénu proti rakovine prostaty pri modeli TRAMP myši

Tento experiment potvrdzuje a ukazuje účinnosť chemickej prevencie Toremifénu. Táto predkladaná štúdia je zameraná na histologické a molekulárne zmeny spojené s rozvinutím rakoviny prostaty u kontrolných zvierat a mechanizmus Toremifénu s TRAMP zvieratami, ktoré sú chované, screenované a liečené plynulým uvoľňovaním pilúl liečiva. Vo vopred stanovených časoch, boli skupiny 5 zvierat usmrtené a ich prostaty boli odoberaté na analýzu. Žľazy prostaty boli hodnotené na prítomnosť nádoru pomocou histológie, celkovej pitvy a imunohistochemie veľkého T-antigénu. Liečby placebom a Toremifénom boli ukončené v 7, 10, 15 a 20 týždni a výsledky sú popísané nižšie.

Výsledky: Celkové usporiadanie prostaty po 7, 10, 15 a 20 týždňoch u rôznych skupín boli ukončené. Analýza celkového usporiadania odhalila, že placebom liečené myši rozvinuli nádor prostaty v 15-20 týždňoch veku podobne ako v predchádzajúcej pilotnej štúdii. Navyše, Toremifénom liečené zvieratá mali oneskorenie vo výskyte rakoviny prostaty do 20 týždňov (Obr. 3). Po 20 týždňoch bolo jasné oneskorenie vo

výskyte nádoru u Toremifénom liečenej skupiny až do 35. Týždňa (Obr. 4). Tieto údaje potvrdzujú, že aj keď išlo o viac senzitívne stanovenie vývoja nádoru, Toremifén vykazoval aktivitu chemickej prevencie. Pri histologickom hodnotení boli vzorky tkaniva fixované, spracované a uložené v parafíne. Sekcie (5µM hrúbky) boli odrezané a sfarbené pomocou H&B spôsobu. Toremifén inhiboval rozvinutie kanálikov a diferenciáciu tkaniva (porovnaj nádor prostaty u 17 týždňových TRAMP myší oproti neupravenému typu (obr. 4); Histológia prostaty liečenej Toremifénom oproti placebo v 15. týždňoch (Obr. 6). Kvalitatívne, imunohistochemia placebom a Toremifénom liečených tkanív ukázala prítomnosť T-antigénu u ventrálnej prostaty. Teda vidieť, že aktivita chemickej prevencie pomocou Toremifénu neukázala, že je v TRAMP modeli prostredníctvom probazín promótoru.

Záver: Schopnosť Toremifénu zabráňovať výskytu rakoviny prostaty v TRAMP modeli bola potvrdená využitím citlivejších techník pre prístup k vytvoreniu nádoru. Mechanizmus účinkov chemickej prevencie Toremifénu sa neukázal, že je prostredníctvom straty transgénu u veľkého T-antigén proteínu.

Príklad 6: Toremifén vyvoláva ústup zistených nádorov ľudskej rakoviny prostaty v modeli holých myší

Rakovina prostaty súčasne ostáva najrozšírenejšie diagnostikovanou rakovinou u amerických mužov. Ostávajú však otázky o etiológii a liečbe ochorenia, najmä v pokročilých formách. Hormonálna terapia ostáva štandardným spôsobom pri vratnej a pokročilej rakovine prostaty napriek všeobecnému vývoju hormónom odolávajúcemu ochoreniu. Teda sú nevyhnutné nové prístupy prevencie a liečby rakoviny prostaty pre upravenie zvyšujúceho sa počtu mužov, u ktorých bolo toto ochorenie diagnostikované. Experimenty a výsledky demonštrujú, že Toremifén potláča na hormóny citlivý LNCaP rast nádoru u athymických holých myší.

Materiály a spôsoby: Milión LNCaP buniek V Matrogeli bol injektovaný do každého boku athymických holých myší. Celkom 40 myší bolo injektovaných. Po približne 3-4 týždňoch sa rozvinuli viditeľné nádory. Po zaznamenaní veľkosti nádorov dvojrozmerné boli myši rozdelené do placebo skupiny a liečenej skupiny na základe rovnakej intenzity nádorov. Jeden pilula (placebo oproti Toremifén 35 mg) bola subkutánne implantovaná medzi lopatkami každej myši. Každý týždeň boli zaznamenané merania veľkosti nádoru. Objem nádoru bol vypočítaný (objem nádoru

= $0,5(L + W) \times L \times W \times 0,5236$, kde L= dĺžka nádoru a W= šírka). Objem nádoru v čase implantácie pilúl slúžil ako bod referencie pre budúce porovnanie menenia sa veľkosti nádorov. Každý týždeň boli zaznamenané menenie sa veľkosti každého nádoru ako percento rozdielu pôvodného merania pri implantácii pilúl.

Výsledky: Z 78 injektovaných miest nádoru 55 (70%) vyústilo do nádorov primeraného objemu pre hodnotenie. Celkom 50 nádorov (24 placebom a 26 Toremifénom liečených zvierat) sa hodnotilo. Stredné objemy nádorov v čase implantácie pilúl boli podobné u skupín Toremifénu a placebo ($1,90 \text{ mm}^3$ a $1,72 \text{ mm}^3$). Stredný objem nádoru sa znížil na $1,68 \text{ mm}^3$ u Toremifénovej skupiny (-22 mm^3), pričom stredný objem nádoru sa zvýšil na $2,33 \text{ mm}^3$ u placebo skupiny ($+0,61 \text{ mm}^3$). Stredná hladina PSA séra bola vyššia u placebo skupiny ($30,80 \text{ ng/ml}$) než u Toremifénovej skupiny ($2,80 \text{ ng/ml}$), ale toto nebolo štatisticky významné ($p=0,755$). Celkové hladiny testosterónu v sére boli $2,18 \text{ ng/ml}$ u placebo skupiny ($n=17$) a $2,96 \text{ ng}$ u Toremifénovej skupiny ($n=19$).

Dve myši uhynuli skoro po implantácii pilúl pre smrteľné zranenie od iných myší. Jedna myš liečená Toremifénom bola vylúčená zo štúdie pre veľké krvácanie nádoru a rozvinutý hematóm. Všetky myši rozvinuli viditeľné nádory jednostranne alebo dvojstranne. Každý nádor bol sledovaný nezávisle na trvaní štúdie. Dvadsať štyri nádorov bolo liečených placebom a 28 nádorov bolo liečených Toremifénom. Výsledky sú ukázané v tabuľke 2 a Obr. 6A a 6B.

Tabuľka 2

<i>Placebo skupina</i>		
<u>týždne N =</u>		<u>% zmeny objemu vzhľadom na deň 0 liečby</u>
3	11	9,44
4	8	115,27
5	8	271,71
6	8	600,88
<i>Toremifén</i>		
<u>týždne N =</u>		<u>% zmeny objemu vzhľadom na deň 0 liečby</u>
3	11	-34,58
4	7	-61,01
5	7	-74,51
6	5	-61,72

Sledujúci interval bude rozšírený na súčasne zaznamenanú populáciu a v súčasnosti sú zbierané údaje o ďalších zvieratách.

Záver: Toremifén inhibuje a indukuje ústup zistených LNCaP nádorov. Hoci mechanizmus, ktorým Toremifén vykazuje tento účinok je neznámy, schopnosť produkovať tieto efekty podporuje použitie Toremifénu ako liečby rakoviny prostaty a na prevenciu opakovaného výskytu rakoviny prostaty u pacientov s vysokým rizikom so zistenými mikrometastázami rakoviny prostaty.

Príklad 7: Toremifén spôsobuje ústup HGPIV vo fáze IIa klinických pokusov chemickej prevencie ľudskej rakoviny prostaty

Efekty chemickej prevencie Toremifénu proti rakovine prostaty tu boli reprodukovateľne dokázané na dobre stanovenom zvieracom modeli spontánnej ľudskej rakoviny prostaty. Toto predstavuje prvú zlúčeninu pre demonštrovanie aktivity chemickej prevencie proti rakovine prostaty. Navyše, vysoký stupeň PIN (HGPIV) bol stanovený a čas testovaný ako prekursor lézie u ľudskej rakoviny prostaty tiež známej ako latentná rakovina prostaty.

Následne je HGPIV použitý ako stredný koncový bod, alebo zastupujúci koncový bod u ľudskej rakoviny prostaty. V skutočnosti NCI teraz odporúča, že PIN by mal byť použitý ako stredný koncový bod, alebo zastupujúci koncový bod u ľudskej rakoviny prostaty.

Fáza IIa bola vykonaná ako otvorená označená nenáhodná jednocentrová štúdia so 17 ľudskými jedincami. V tomto protokole pacienti s prevedenou biopsiou PIN sú liečení 60 mg Toremifénu denne, po dobu 4 mesiacov. Po 4 mesiacoch bola pacientom urobená znovu biopsia (8 biopsií) a znovu bol stanovený stav PIN. Dvadsať jeden pacientov bolo začlenených do štúdie na jej začiatku a 16 pacientov ju ukončilo. Súhrn patologických zistení biopsií prostaty u týchto 16 pacientov ukázal, že 12 pacientov malo ústup PIN na benígne alebo atrofické tkanivo prostaty; 12 zo 16 (75%) pacientov malo úplnú reakciu. Z ostávajúcich 4 pacientov mali 3 pacienti rakovinu prostaty, ale množstvo PIN bolo redukované, a 1 pacient mal stabilné ochorenie, ale epitel PIN ukázal atrofické alebo degeneratívne zmeny.

Patologické hodnotenie odhalilo celkové zmiznutie PIN s atrofickými zmenami v epitеле prostaty. Pacient neutrpeli žiadnu akútnu alebo chronickú toxicitu, kým užívali Toremifén. PSA v sére, voľný testosterón v sére, celkový testosterón v sére

a estradiol v sére ostali v normálnom rozmedzí. Kvalita života bola nezmenená vrátane žiadneho pôsobenia na potenciu a libido. Potom tieto výsledky ukazujú úlohu Toremifénu pri chemickej prevencii prostaty.

Výsledky ukazujú, že Toremifén redukuje PIN, ktorá teda priamo prenáša na zníženie výskytu a predĺženie latentnosti rakoviny prostaty a prevenciu vyvinutia rakoviny prostaty. Nakoniec, u Toremifénu bolo zistené, že výrazne vyvoláva TGF syntézu v ľudských stromálnych fibroplastových bunkách.

Príklad 8: Úloha činidiel chemickej prevencie: Tamoxifén citrát a Raloxifén (SERMs) a Faslodex (čistý antiestrogén ICI 182 780) pri prevencii vyvinutia rakoviny prostaty

Experimentálny model: Liečba chemickou prevenciou u myší bola iniciovaná postnatálne v 30 dňoch. Tri skupiny 50 hybridov TRAMP samčích myší boli liečené buď antiestrogénmi Tamoxifén citrátom, alebo Raloxifén (SERMs) alebo Faslodex (čistý antiestrogén ICI 182 780). Liečivá sú získané ako vyrobené na objednávku piluly s plynulým uvoľňovaním (Innovative research of America, Sarasota, FL) a dodané ako subkutánne implantáty (viď predbežné údaje). Kontrolné zvieratá dostali placebo implantát bez farmakologickej aktivity. Zvieratá (n=10) sú usmrtené v periodických intervaloch, v 10. 15. 20. 25. a 30. týždni veku a účinnosť liečby, vedúca buď k neprítomnosti vytvorenia nádoru alebo redukcii veľkosti nádoru, ak je prítomný, je stanovená porovnaním s placebo kontrolnými zvieratami. Krv je odobratá na hodnotenie zmien androgénov a estrogénov v sére pri každej liečbe. Tkanivá prostaty je zabezpečené na: a) monometrické štúdie; b) histologické štúdie tkanivo bude fixované v 10% pufovom formalíne, spracované a uložené v parafíne; c) molekulové štúdie tkanivá sú zmrazené v kvapalnom dusíku a uložené pri -70°C. Zaznamenané sú tiež nekropsie a údaje o prežití.

Výsledky experimentu odhaľujú relatívnu účinnosť chemickej prevencie rôznych antiestrogénov pri oneskorení alebo prevencii rakoviny prostaty v TRAMP modeli. Morfológické štúdie indikujú hrubé zmeny, ak nejaké sú, pri rozvinutí veľkosti prostaty a kanálikovom obraze ako výsledok každej liečby. Sekcie parafínovaného tkaniva sú sfarbené použitím štandardných H&E techník pre histologické zmeny, ako je PIN, ktorá bude stanovená monitorovaním vzhľadu prekarcinómových lézií ako prekursor adenokarcinómu prostaty. Hladiny estradiolu a celkového testosterónu v sére sú merané v každom vekovom intervale na stanovenie všetkých zmien týchto hormónov, a či tieto zmeny korelujú alebo nekorelujú so zmenami PIN. Hladiny

peptidov rastového hormónu TGF, TGF 1, TGF 3 a bFGF sú vo vzorkách prostaty odobratých v každom intervale kvantitatívne. Zodpovedajúce peptidy rastového faktoru receptorov sú tiež stanovené na EGFR a TGF RI a RII.

Tabuľka 3

Účinky modulátorov selektívnych estrogénových receptorov (SERMs) na prevenciu rakoviny prostaty v TRAMP modeli

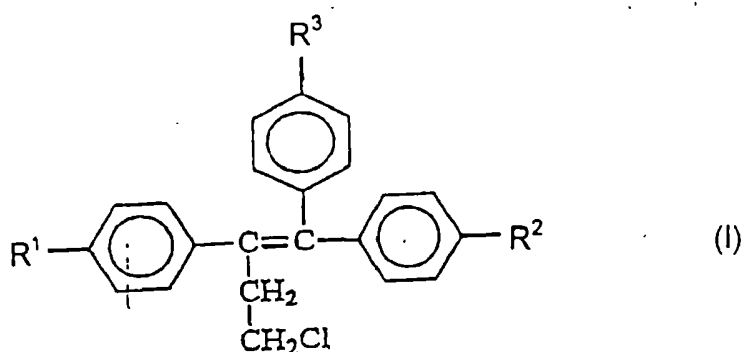
SERM	Dávka	20 týždňov # nádory	20 týždňov (% nádorov)
Placebo	-	5/5	100%
Toremifén	20 mg/kg/deň	1/7	14,2%
Tamoxifén	20 mg/kg/deň	2/9	22%
Raloxifén	20 mg/kg/deň	3/10	30%
*Faslodex (ICI 128 780)	*10 mg/kg/deň	8/11	72%

Zvieratá boli usmrtené v 20.týždni a žľazy prostaty boli hodnotené analýzou celostúpania a histologicky.

*Faslodex je čistý antiestrogén a jeho relatívna potencia je 2-násobná oproti iným SERM, potom 10 mg/kg/deň Faslodex = 20 mg/kg/deň SERM.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použitie antiestrogénu, alebo jeho analógu, derivátu, izoméru alebo jeho metabolitu, alebo ich farmaceuticky prijateľných solí, esterov alebo N-oxidov na výrobu liečiva na prevenciu rozvoja rakoviny prostaty u jedinca, na zvýšenie doby prežitia jedinca s rakovinou prostaty alebo na liečenie jedinca s rakovinou prostaty, za predpokladu, že tento antiestrogén je iný ako zlúčenina vzorca



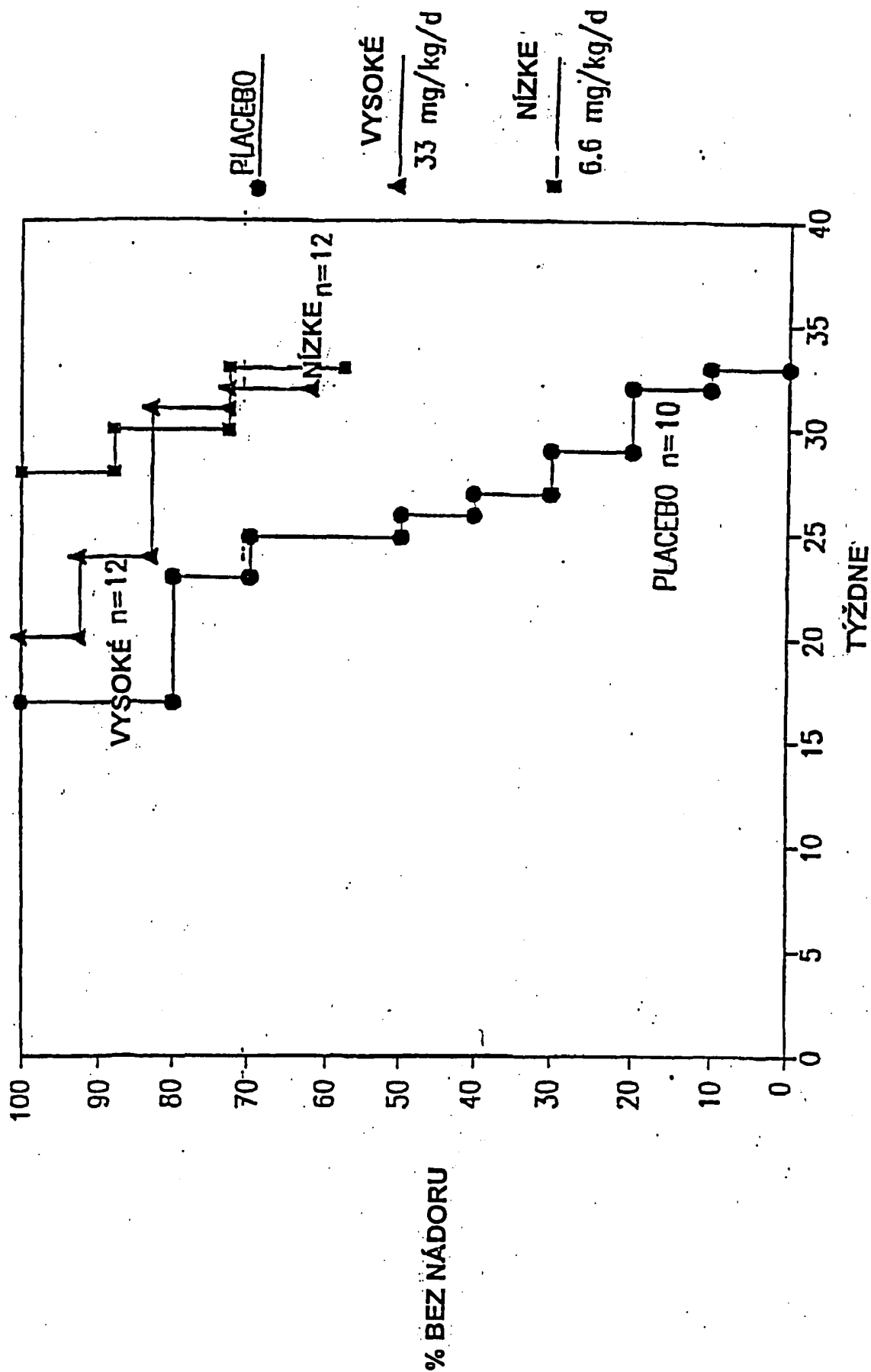
kde R^1 a R^2 , ktoré sú rovnaké alebo rôzne, sú vodík alebo OH,
 R^3 je $OCH_2CH_2NR^4R^5$, kde R^4 a R^5 , ktoré sú rovnaké alebo rôzne, sú vodík alebo alkylová skupina s 1 až 4 atómami uhlíka.

2. Použitie podľa nároku 1, v ktorom sa prevencia rozvoja rakoviny prostaty u jedinca uskutočňuje znižovaním rizika rozvoja rakoviny prostaty alebo znižovaním množstva predrakovinových prekursorov rakoviny prostaty alebo rakovina prostaty je ošetrená u jedinca potlačením alebo inhibíciou latentnej rakoviny prostaty.
3. Použitie podľa nároku 1 alebo 2, v ktorom jedinec má predrakovinové prekursorov adenokarcinómu prostaty a nemá rakovinu prostaty.
4. Použitie podľa nároku 3, v ktorom predrakovinové prekursorov adenokarcinómu prostaty sú vnútroepitelové neoplázie prostaty.

5. Použitie podľa nárokov 1 až 4, v ktorom antiestrogén je selektívny receptorový modulátor, trifenyletylén alebo trifenylalkán.
6. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 5, v ktorom liečivo obsahuje farmaceuticky prijateľný nosič vybraný zo skupiny obsahujúcej arabskú gumu, škrob, cukor, celulóзовú látku a ich zmesi.
7. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6, kde liečivo je podávané jedincovi subkutánnym implantovaním piluly obsahujúcej toto liečivo.
8. Použitie podľa nároku 7, v ktorom pilula poskytuje riadené uvoľňovanie liečiva.
9. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6, v ktorom je liečivo podávané intravenózne, intraarteriálne alebo intramuskulárne injektovaním farmaceutického prípravku v kvapalnej forme jedincovi, alebo v ktorom je liečivo jedincovi podávané orálne podávaním kvapalného alebo pevného prípravku obsahujúceho farmaceutický prípravok.
10. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 9, v ktorom liečivo je pilula, tabletká, kapsula, roztok, suspenzia, emulzia, elixír, gél, masť alebo čapík.
11. Použitie podľa nároku 10, v ktorom čapík je rektálnym čapíkom alebo uretálnym čapíkom.
12. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6, v ktorom je liečivo parenterálnou alebo topickou formuláciou.
13. Použitie podľa nároku 12, v ktorom parenterálna formulácia zahŕňa lipozóm obsahujúci komplex antiestrogénovej zlúčeniny a cyklodextrínovej zlúčeniny.
14. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 13, v ktorom liečivo je liečivo podávané v dávke okolo 0,5 mg/kg hmotnosti jedinca a deň až okolo 80 mg/kg hmotnosti jedinca a deň antiestrogénu.

15. Použitie podľa nároku 14, v ktorom je dávka okolo 10 mg/kg hmotnosti jedinca a deň až okolo 60 mg/kg hmotnosti jedinca a deň.
16. Použitie podľa nároku 15, v ktorom je dávka okolo 20 mg/kg hmotnosti jedinca a deň až okolo 60 mg/kg hmotnosti jedinca a deň.
17. Použitie podľa nároku 16, v ktorom je dávka okolo 60 mg/kg hmotnosti jedinca a deň alebo okolo 20 mg/kg hmotnosti jedinca a deň.

1/6

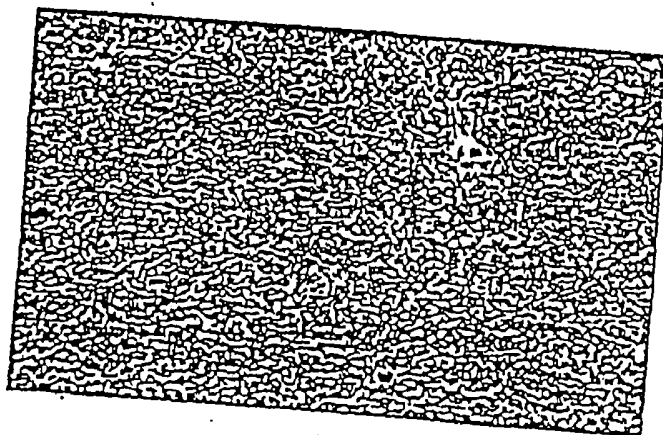


Obr. 1

2/6



A.

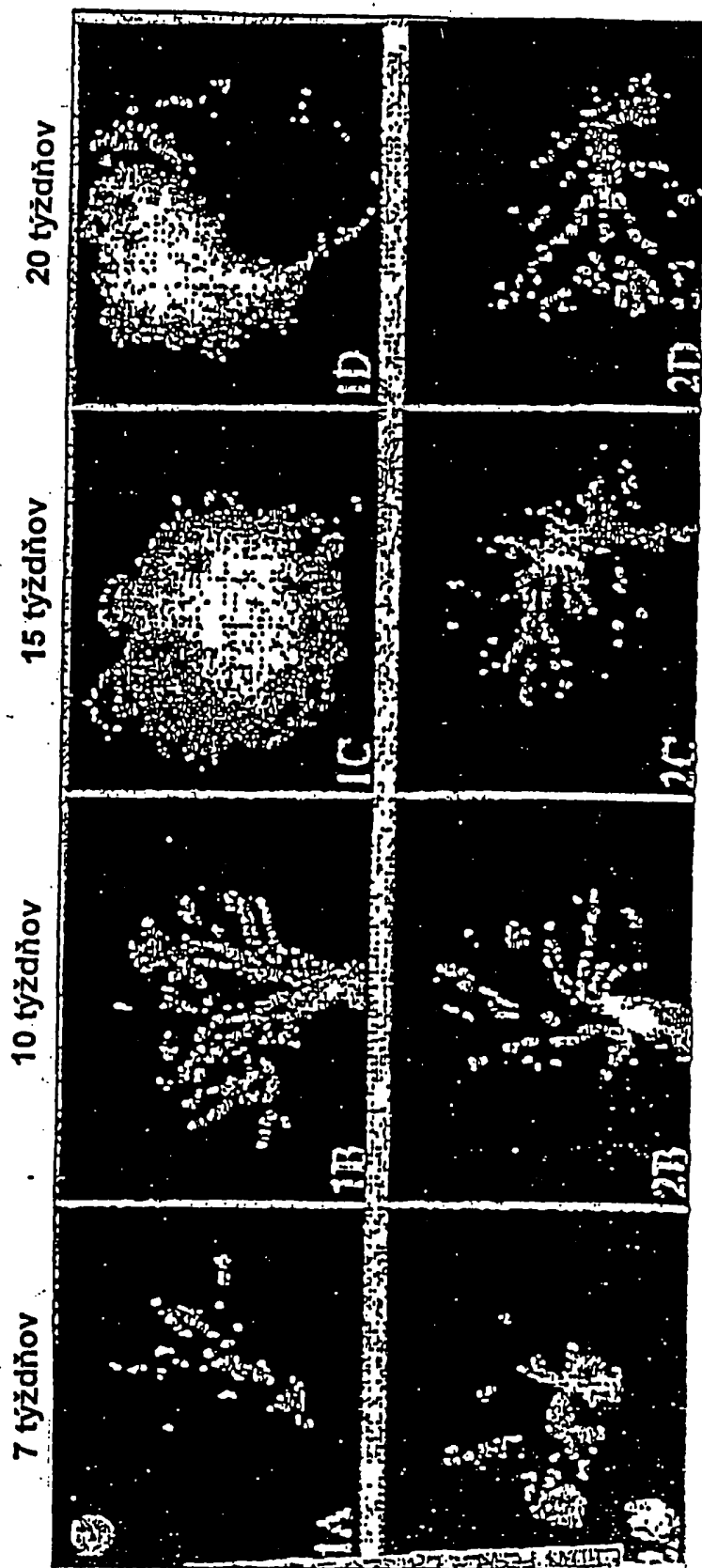


B.



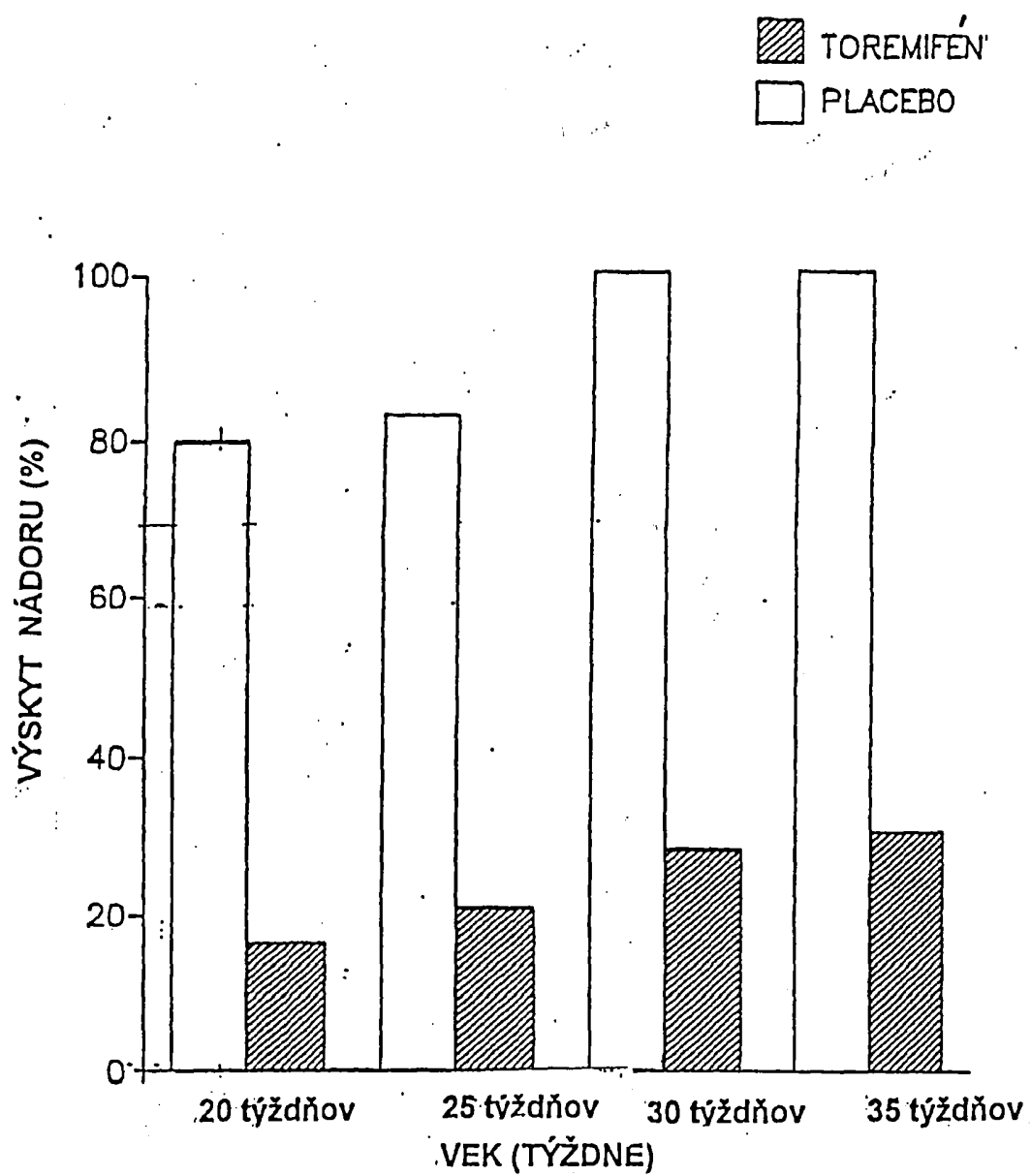
C.

Obr. 2



Obr. 3

4/6

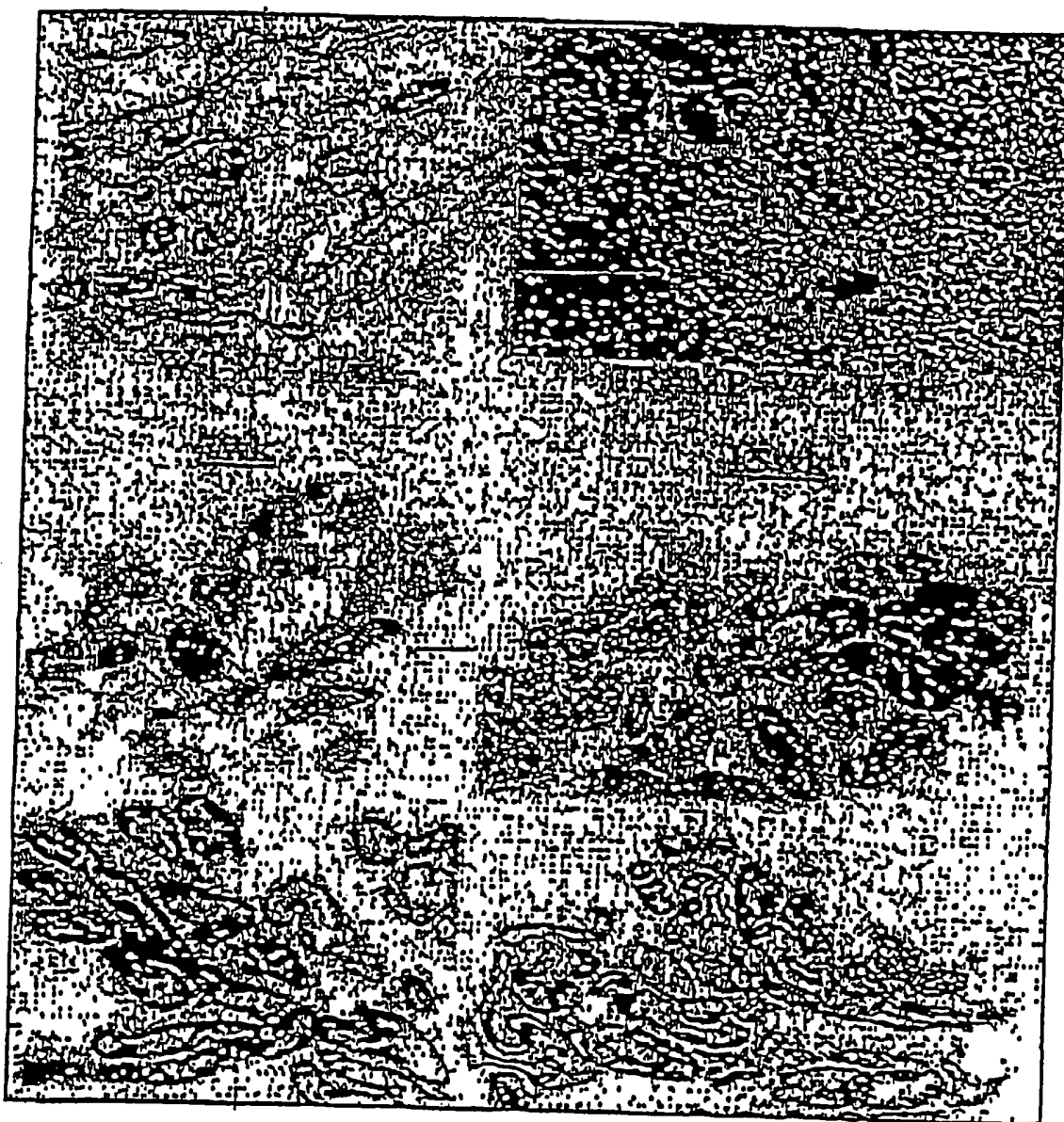


Obr. 4

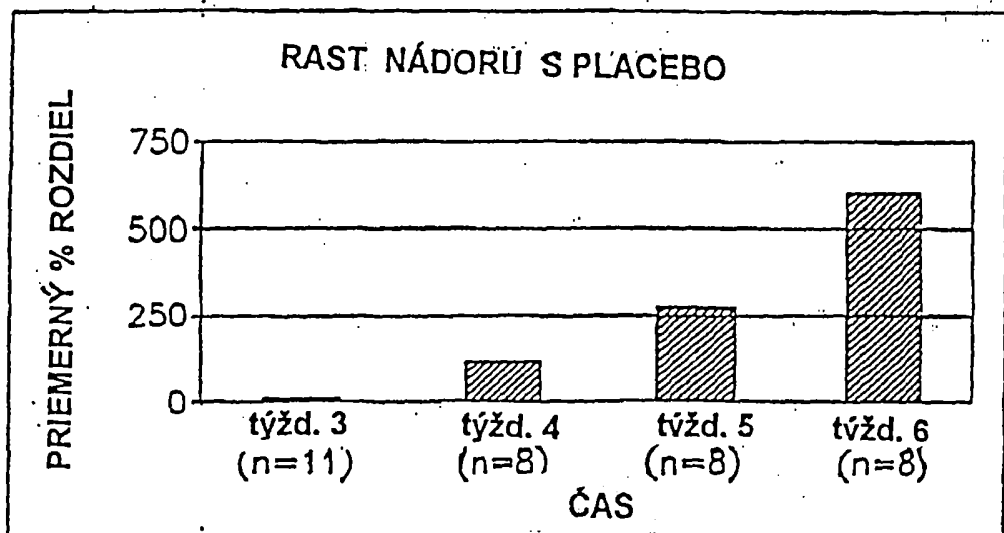
5/6

PLACEBO

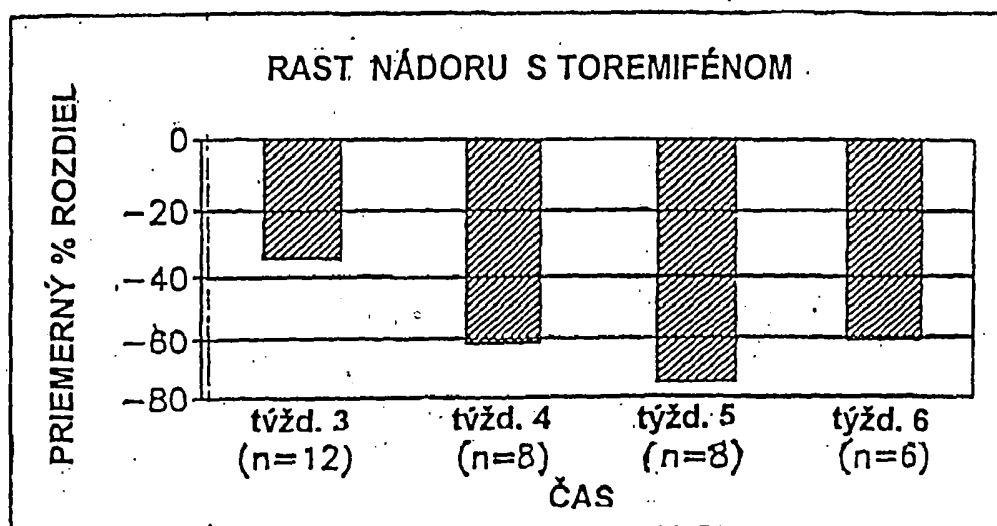
TOREMIFEN



6/6



ČAS PO LIEČBE	% ZMENY VZHL'ADOM KU DŇU 0
TÝŽDEŇ 3 (n=11)	9.44
TÝŽDEŇ 4 (n=8)	115.27
TÝŽDEŇ 5 (n=8)	271.71
TÝŽDEŇ 6 (n=8)	600.88



ČAS PO LIEČBE	% ZMENY VZHL'ADOM KU DŇU 0
TÝŽDEŇ 3 (n=12)	-34.58
TÝŽDEŇ 4 (n=8)	-61.01
TÝŽDEŇ 5 (n=8)	-74.51
TÝŽDEŇ 6 (n=6)	-61.72

Obr. 6