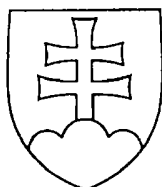


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **7. 5. 1999**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/084 602**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **7. 5. 1998**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **6. 8. 2002**
Vestník ÚPV SR č.: **8/2002**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **PCT/US99/10146**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **WO99/56739**

(11), (21) Číslo dokumentu:

1664-2000

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

A61K 31/135

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

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

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

(54) Názov: **Spôsob chemoprevencie rakoviny prostaty**

(57) Anotácia:
Použitie účinnej dávky chemopreventívnej látky, toremifénu alebo jeho analógov a metabolitov na prípravu farmaceutického prípravku na zabránenie recidívy, potlačenia alebo inhibície karcinogenézy v prostate, na potlačenie alebo na inhibíciu latentnej rakoviny prostaty a na liečenie jedincov so zvýšeným rizikom vývoja rakoviny prostaty, napríklad tých jedincov, ktorí majú hyperpláziu prostaty, intraepiteliálnu neopláziu prostaty alebo abnormálne vysoké hladiny cirkulujúcich špecifických protilátok proti prostate, alebo ktorí majú rodinnú anamnézu rakoviny prostaty.

Spôsob chemoprevencie rakoviny prostaty

Oblasť techniky

Tento vynález sa týka chemoprevencie rakoviny prostaty a predovšetkým spôsobu podania účinnej dávky látky jedincovi pre zabránenie recidívy ochorenia, potlačenie alebo inhibíciu karcinogenézy prostaty.

Súčasný stav techniky

V USA je rakovina prostaty jednou z najčastejších rakovinových ochorení u mužov, ročne je diagnostikovaných niekoľko stotisíce nových prípadov. Viac ako šesťdesiat % novo diagnostikovaných prípadov rakoviny prostaty je v pokročilom štádiu, bez možnosti liečenia a s beznádejnou prognózou. Jedným spôsobom riešenia tohoto problému je zistenie rakoviny prostaty skôr, cez skriningové programy, a tým zaistenie zníženia počtu pacientov v pokročilom štádiu rakoviny prostaty. Iným prístupom je vývoj liečiv pre prevenciu rakoviny prostaty. Jedna tretina všetkých mužov nad päťdesiat rokov má latentnú formu rakoviny prostaty, ktorá môže byť aktivovaná na život ohrozujúcu klinickú formu rakoviny prostaty. Ukázalo sa, že frekvencia latentných nádorov prostaty sa podstatne zvyšuje každou dekádou života od päťdesiateho roku života (5,3 až 14 %) do deväťdesiateho roku života (40 až 80 %). Počet ľudí s latentnou formou rakoviny prostaty je rovnaký u všetkých etnických skupín a rôznych rás, ale frekvencia klinicky agresívnej rakoviny sa značne líši. Znamená to, že enviromentálne faktory môžu mať úlohu pri aktivácii latentnej rakoviny prostaty. Preto vývoj chemoprevencie voči rakovine prostaty môže mať nielen dopad zdravotný ale aj ekonomický.

Rakovina prostaty sa vyznačuje vysokou incidenciou a úmrtnosťou. Preto je veľmi žiadúci vývoj chemoprevencie voči tejto devastujúcej chorobe. Poznanie faktorov, ktoré prispievajú ku karcinogénze prostaty vrátane začiatku, podpory aktivácie a postupu rakoviny prostaty, poskytne kľúč k molekulárnemu mechanizmu rozlúštenia vhodných bodov zásahu pre prevenciu alebo zastavenie procesu karcinogénzy. Naliehavo potrebné sú nové prístupy pre zníženie výskytu rakoviny prostaty ako aj zastavenie alebo vyvolanie regresie latentnej rakoviny prostaty. Nakoľko frekvencia rakoviny prostaty dramaticky stúpa vo veku, keď muž je vystavený iným príčinám úmrtnosti, vhodnou a finančne menej náročnou zdravotnou stratégiou môže byť jednoduché spomalenie progresie adenokarcinómu prostaty.

Pre chemoprevenciu rakoviny prostaty sa používajú rôzne prístupy. Greenwald, „Expanding Horizons in Breast and Prostate Cancer Prevention and Early Detection“ v J. Cancer Education, 1993, zv. 8, č. 2, strany 91-107, popisuje testovanie inhibítorov 5 α -reduktázy, ako je finasterid, pre prevenciu rakoviny prostaty. Brawley a spol., „Chemoprevention of Prostate Cancer“ v Urology, 1994, zv. 43, č. 5, tiež popisuje inhibítory 5 α -reduktázy a tiež difluorometylornitín a retinoidy, ako možné chemopreventívne látky.

Kelloff a spol., „Introductory Remarks: Development of Chemopreventive Agents for Prostate Cancer“ v Journal of Cellular Biochemistry, 1992, Supplement 16H: 1-8, popisuje predklinické štúdie v Národnom ústave pre rakovinu uskutočnené so siedmimi látkami: all-trans-N-(4-hydroxyfenyl)retinamid, difluorometylornitín, dehydroepiandrosterón, liarozol, lovastatin, oltipraz a finasterid.

Lucia a spol., „Chemopreventive Activity of Tamoxifen, N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide, and the Vitamin D Analogue Ro24-553 1 for Androgen-promoted Carcinomas of the Rat Seminal Vesicle and Prostate“ v Cancer Research, 1995, zv. 55, strany 5621 až 5627, oznamuje chemoprevenciu rakovín prostaty u Lobund-Wistar potkanov pôsobením tamoxifenu, modulátora estrogénovej odpovede.

Ako popisuje Potter a spol., „A mechanistic hypothesis for DNA adduct formation by tamoxifen following hepatic oxidative metabolism“ v Carcinogenesis, 1994 zv. 15, č. 3, strany 439 až 442, tamoxifen spôsobuje rakovinu pečene potkanov, čo sa pripisuje tvorbe kovalentných aduktov DNA. Táto práca tiež popisuje analóg tamoxifenu - toremifen, ktorý vykazuje omnoho nižšiu tvorbu aduktov DNA v pečeni, preto nie je karcinogénny.

Toremifen je príkladom trifenylalkénovej zlúčeniny popísanej v U.S. patente č. 4,696,949 a 5,491,173 autorov Toivola a spol., ktoré sú tu zahrnuté do literárnych odkazov. Par-enterálne a lokálne podanie cicavcom zmesí s obsahom toremifenu sú popísané v U.S. patente č. 5,571,534 autorov Jalonen a spol. a v U.S. patente č. 5,605, 700 autorov DeGregorio a spol., ktoré sú tu zahrnuté do literárnych odkazov.

Zmesi obsahujúce toremifen pre odvrátenie rezistencie voči mnohým liekom proti rakovinovým bunkám, ako cytotoxický liek, je popísaný v U.S. patente č. 4,990,539 autorov Harris a spol., ktorý je tu zahrnutý do literárnych odkazov. U.S. patenty č. 5,595,722 a 5,599,844 autorov Grainger a spol., ktoré sú tu zahrnuté do literárnych odkazov, popisujú spôsoby identifikácie látok, ktoré zvyšujú hladiny TGFP a zmesi pre orálne podávanie, ktoré obsahujú aktivátory TGFP a stimulatory produkcie TGFP pre prevenciu alebo liečenie stavov charakterizovaných abnormálnou proliferáciou buniek hladkých svalov, napríklad, poranenie ciev. Uvedené látky pre zvýšenie hladín TGFP sú tamoxifen a jeho analóg toremifen.

U.S. patenty č. 5,629,007 a 5,635,197 autorov Audia a spol., ktoré sú tu zahrnuté do literárnych odkazov, popisujú spôsob prevencie rozvoja rakoviny prostaty a rizika rozvoja tejto rakoviny, napríklad tak, že pacientovi s benígnou hyperpláziou prostaty je podaná zlúčenina oktahydrobenzo[f]chinolín-3-onu.

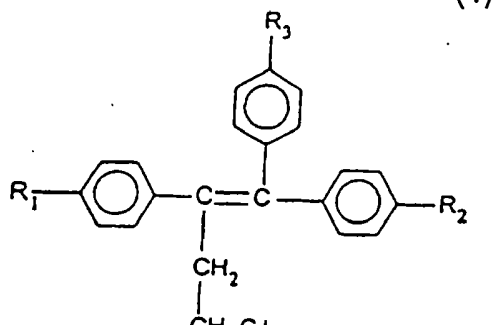
U.S. patent č. 5,595,985 autora Labrie, ktorý je tu zahrnutý do literárnych odkazov, tiež popisuje spôsob liečenia benígnej hyperplázie prostaty použitím kombinácie inhibítora 5 α -reduktázy a zlúčeniny, ktorá sa viaže a blokuje receptory pre androgény. Jedným príkladom takejto zlúčeniny, ktorá blokuje receptory pre androgény je flutamid.

U.S. patenty č. 4,329,364 a 4,474,813 autorov Neri a spol., ktoré sú tu zahrnuté do literárnych odkazov, popisujú farmaceutické prípravky s obsahom flutamidu pre oddialenie a/alebo prevenciu nástupu rakoviny prostaty. Prípravok môže byť vo forme kapsuly, tablety, čípku alebo elixíru. Napriek týmto pokrokom existuje naďalej potreba látok a účinných spôsobov pre prevenciu rakoviny prostaty. Predkladaný vynález chce naplniť túto potrebu.

Podstata vynálezu

Tento vynález poskytuje pôsob chemoprevencie rakoviny prostaty a predovšetkým poskytuje spôsob podania účinnej dávky chemopreventívnej látky jedincovi, toremifenu a jeho analógov a metabolitov, pre zabránenie recidívy, pre liečenie, potlačenie alebo inhibíciu rakoviny prostaty.

Predkladaný vynález obsahuje spôsob pre prevenciu vzniku nádoru v prostate. Tento vynález zahŕňa podávanie farmaceutického prípravku cicavcom, ktorý obsahuje chemopreventívnu látku vzorca:



kde R_1 a R_2 , ktoré môžu byť rovnaké alebo rozdielne, sú H alebo OH, R_3 je $OCH_2CH_2NR_4R_5$, kde R_4 a R_5 , ktoré môžu byť rovnaké alebo rozdielne, sú H alebo alkylová skupina s 1 až 4 atómmi uhlíka;

a ich farmaceuticky prijateľný nosič, rozpúšťadla, soli, estery, alebo N-oxidy a ich zmes.

Predkladaný vynález poskytuje bezpečný a účinný spôsob pre potlačenie alebo inhibíciu latentnej rakoviny prostaty a je predovšetkým užitočný pre jedincov so zvýšeným rizikom rozvinutia rakoviny prostaty, napríklad, pre tých, ktorí majú benígnu hyperpláziu prostaty, intraepiteliálnu neopláziu prostaty (PIN), alebo abnormálne vysokú hladinu cirkulujúcich špecifických protilátok (PSA), alebo pre tých, ktorí majú rodinnú anamnézu rakoviny prostaty.

Popis obrázkov

Obrázok 1: Znázornenie chemopreventívnych účinkov toremifenu na modeli TRAMP.

Obrázky 2A až 2C: H a E rezy znázorňujúce bunky prednej prostaty u normálnej myši a rakovinu prostaty u TRAMP myši zahrnuté do štúdie.

Obrázok 3: Účinok Toremifenu na vývoj rakoviny v prednej prostate u TRAMP myši.

Obrázok 4: Účinok Toremifenu na výskyt nádorov u TRAMP myši.

Obrázok 5: Účinok Toremifenu na vývoj nádora u TRAMP modelu.

Obrázky 6A až 6B: Porovnanie placebo voči účinkom Toremifenu na rast nádora.

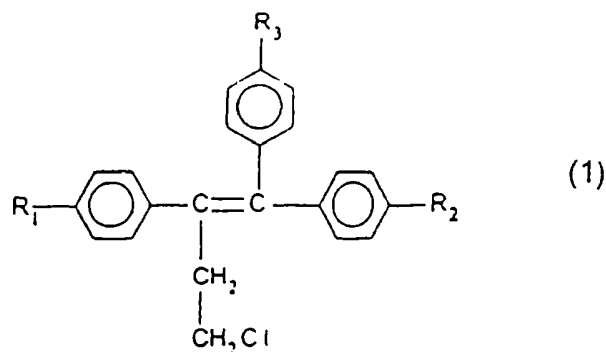
Podrobný popis vynálezu

Tento vynález poskytuje spôsob pre prevenciu karcinogenézy v prostate; 2) spôsoby pre potlačenie alebo inhibíciu

rakoviny prostaty; 3) spôsoby pre zníženie rizika rozvoja rakoviny prostaty; 4) spôsoby pre zvýšenie prežívania jedin-
cov po použití chemopreventívnej látky pre prostatu, toremi-
fenu, jeho analógov a metabolitov.

Ako je tu ukázané, Toremifen je chemopreventívnou látkou pre prostatu. V uskutočnených pokusoch, prostaty boli vyreza-
né a vyhodnotené histologicky a celkovou analýzou. Toremifen
bol tiež hodnotený pri liečení rakoviny prostaty jeho pôso-
bením na LNCaP xenoimplantáty v holej myši. Ako je ukázané,
hodnoty sú veľmi výrazné, Toremifen nielen inhiboval rast,
ale bol aj schopný vyvolať regresiu nádorov.

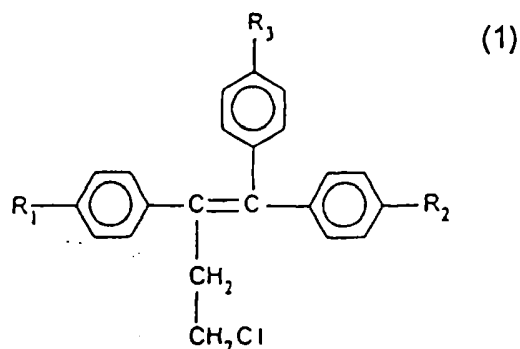
Predkladaný vynález sa týka spôsobu prevencie vzniku
rakoviny prostaty. Vynález zahŕňa podávanie farmaceutického
prípravku cicavcovi s obsahom chemopreventívnej látky vzorca:



kde R_1 a R_2 , ktoré môžu byť rovnaké alebo rozdielne, sú H alebo OH, R_3 je $OCH_2CH_2NR_4R_5$, kde R_4 a R_5 , ktoré môžu byť rovnaké alebo rozdielne, sú H alebo alkylová skupina s 1 až 4 atómami uhlíka;

a ich farmaceuticky prijateľný nosič, rozpúšťadla, soli, estery, alebo N-oxidy a ich zmes.

Tento vynález poskytuje použitie farmaceutickej kompo-
zície pre prevenciu recidívy, potlačením alebo inhibíciou
vzniku rakoviny prostaty, alebo zvýšenie prežívania jedinca
s rakovinou prostaty, obsahujúcu chemopreventívnu látku
vzorca:



kde R_1 a R_2 , ktoré môžu byť rovnaké alebo rozdielne, sú H alebo OH, R_3 je $OCH_2CH_2NR_4R_5$, kde R_4 a R_5 , ktoré môžu byť rovnaké alebo rozdielne, sú H alebo alkylová skupina s 1 až 4 atómmi uhlíka;

a ich farmaceuticky prijateľný nosič, rozpúšťadla, soli, estery, alebo N-oxidy a ich zmes.

Predkladaný vynález poskytuje bezpečný a účinný spôsob pre potlačenie alebo inhibíciu latentnej rakoviny prostaty a predovšetkým je účinný pre liečenie jedincov so zvýšeným rizikom vývoja rakoviny prostaty, napríklad tých, ktorí majú benígnu hyperpláziu prostaty, intraepiteliálnu neopláziu prostaty (PIN), alebo abnormálne vysoké hodnoty cirkulujúcich špecifických protilátok voči prostate (PSA), alebo u jedincov s rodinnou anamnézou rakoviny prostaty.

Zlúčenina 4-chlór-1,2-difenyl-1-[4-[2-(N,N-dimetylamino)etoxy]fenyl]-1-butén vzorca (I), kde R_1 a R_2 sú každý H a R_4 a R_5 sú každý metyl, sa nazýva toremifen. Ukázalo sa, že toremifen je bezpečný a účinný ako protinádorová látka a vykazuje hormonálne účinky ako estrogénna alebo anti estrogénna látka, v závislosti na použitej dávke. Metabolity toremifenu sú tiež biologicky aktívne.

Tento vynález poskytuje tiež použitie analógov toremifenu alebo jeho metabolitov, ktoré sú dobre známe odborníkom. Príkladmi chemopreventívnych látok vzorca (I) sú:

4-chlór-1,2-difenyl-1-[4-[2-(N-metylamino)etoxy]fenyl]-1-butén; 4-chlór-1,2-difenyl-1-[4-[2-(N,N-dietylamino)etoxy]fenyl]-1-butén; 4-chlór-1,2-difenyl-1-[4-(aminoetoxy)fenyl]-1-butén; 4-chlór-1-(4-hydroxyfenyl)-1-[4-[2-(N,N-dimetylamino)etoxy]fenyl]-2-fenyl-1-butén; 4-chlór-1-(4-hydroxyfenyl)-1-[4-[2-(N-metylamino)etoxy]fenyl]-2-fenyl-1-butén; a 4-chlór-1,2-bis(4-hydroxyfenyl)-1-[4-[2-(N,N-dimetylamino)etoxy]fenyl]-1-butén.

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

Zlúčeniny látky vzorca (I) môžu byť pripravené podľa spôsobu už popísaného vo vyššie citovaných U.S. patentoch č. 4,696,949 a 5,491,173 autorov Toivola a spol.

Vynález zahrňuje farmaceuticky prijateľné soli amino substituovaných zlúčenín s organickými a anorganickými kyselinami, napríklad s kyselinou citrónovou a kyselinou chlorovodíkovou. Vynález tiež zahrňuje N-oxidy amino substituentov zlúčenín vzorca (I). Farmaceuticky prijateľné soli môžu byť tiež pripravené z fenolových zlúčenín pôsobením anorganických zásad, napríklad hydroxidu sodného. Môžu byť tiež pripravené estery fenolových zlúčenín s alifatickými alebo aromatickými karboxylovými kyselinami, napríklad kyselinou octovou a esterami kyseliny benzoovej.

Ako sa tu používa, „farmaceutická kompozícia“ znamená terapeuticky účinné množstvá látky spolu s vhodnými riedidlami, ochrannými látkami, rozpúšťadlami, emulgátormi, doplnkami a/alebo nosičmi. „Terapeuticky účinné množstvo“ sa týka množstva, ktoré vykazuje terapeutický účinok pre daný stav a režim podávania. Takéto kompozície sú kvapalné alebo lyofilizované alebo suché zmesi a obsahujú rozpúšťadla s rôznym obsahom pufru (napríklad Tris-HCl, acetát, fosfát), s rôznou

hodnotou pH a iónovou silou, aditíva ako albumín alebo želatína pre zabránenie absorpcie na povrchy, detergenty (napríklad Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, soli žlčových kyselín), solubilizačné látky (napríklad glycerol, polyetylén glycerol), antioxidačné látky (napríklad kyselina askorbová, metabisulfid sodný), ochranné látky (napríklad Thimerosal, benzylalkohol, parabény), látky podporujúce trávenie a meniče tonusu (napríklad laktóza, manitol), kovalentné pripojenia polymérov ako polyetylén glykol na proteín, komplexy s iónmi kovov, alebo inkorporácia materiálu do- alebo na prípravky polymérnych zlúčenín ako kyselina polylaktónová, kyselina polyglykolová, hydrogély a podobne, alebo na lipozómy, mikroemulzie, micely, unilamelárne alebo multilamelárne častice, membrány erytrocytov, alebo sferoplasty. Takéto kompozície ovplyvnia fyzikálny stav, rozpustnosť, stabilitu, rýchlosť uvoľňovania *in vivo*, a rýchlosť vymiznutia *in vivo*. Kontrolované alebo nepretržité uvoľňovanie kompozícií zahrňuje vytvorenie lipofilných zásob (napríklad mastné kyseliny, vosky, oleje). Vynález zahrňuje kompozície pokryté polymermi (napríklad poloxaméry alebo poloxamíny). Kompozície podľa vynálezu môžu obsahovať určité ochranné obaly, inhibítory proteáz alebo urýchľovače prieniku pre rôzne cesty podania, vrátane parenterálneho, pulmonálneho, nazálneho a orálneho. Farmaceutická kompozícia môže byť podávaná parenterálne, transmukozálne, transdermálne, intramuskulárne, intravenózne, intradermálne, subkutánne, intraperitoneálne, intraventrikulárne, intrakraniálne a do nádoru.

Ďalej výraz „farmaceuticky vhodný nosič“ je dobre známy odborníkom. Neobmedzene to môže byť 0,01 až 0,1 M a výhodne 0,05 M fosfátový pufer alebo 0,8 % solný roztok. Okrem toho takéto farmaceuticky prijateľné nosiče môžu byť vodné, alebo nevodné roztoky, suspenzie a emulzie. Príkladmi nevodných

rozpúšťadiel sú propylén glykol, polyetylén glykol, rastlinné oleje ako olivový olej, injikovateľné organické estery ako etyl oleát. Vodné nosiče sú voda, alkohol/vodné roztoky, emulzie alebo suspenzie vrátane soľných a pufrovaných médií. Pomocné látky pre parenterálne podávanie zahrňujú roztok chloridu sodného, Ringerov roztok s dextrózou, dextróza a chlorid sodný, Ringerov roztok s laktózou, alebo oleje. Pomocné látky pre intravenózne podávanie zahrňujú kvapalinu a doplnky výživy, doplnky elektrolytov ako sú Ringerov roztok s dextrózou a podobne. Môžu byť prítomné aj ochranné látky a iné doplnky, napríklad antimikrobiálne látky, antioxidačné látky, chelatačné látky, inertné plyny a podobne.

Výraz „adjuvant“ sa vzťahuje na zlúčeninu alebo zmes, ktorá zvyšuje imunitnú odpoveď na antigén. Adjuvant môže pôsobiť ako zásoba, ktorá pomaly uvoľňuje antigén a tiež ako aktivátor lymfatického systému, ktorý nešpecificky zvyšuje imunitnú odpoveď (Hood a spol., *Immunology, Second Ed.*, 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, str. 384). Prvotne vyvolaná reakcia so samotným antigénom, v neprítomnosti adjuvantu, nevyvolá humorálnu alebo bunkovú imunitnú odpoveď. Adjuvant zahrňuje, ale nie je obmedzený na kompletne Freundovo činidlo, neúplné Freundovo činidlo, saponín, minerálne gély ako hydroxid hlinitý, povrchovo aktívne látky ako lyzolecitín, pluronové polyoly, polyanióny, peptidy, emulziu oleja alebo uhľovodíkov, hemokyaníny, dinitrofenol a prípadne užitočný ľudský adjuvant ako BCG (*bacille Calmette-Guérin*) a *Corynebacterium parvum*. Je výhodné, keď adjuvant je farmaceuticky prijateľným.

Kontrolované alebo nepretržité uvoľňovanie kompozícií zahrňuje zmesi v lipofilných zásobách (napríklad masné kyseliny, vosky, oleje). Vynález tiež zahrňuje určité kompozície pokryté polymérmi (napríklad poloxaméry alebo poloxamí-

ny) a zlúčeninu spojenú s protilátkami voči tkanivovo špecifickým receptorom, s ligandami alebo antigénmi alebo zlúčeninu spojenú s ligandami pre tkanivovo špecifické receptory.

Iné uskutočnenie kompozícií podľa predkladaného vynálezu zahrňuje určité formy ochranného pokrytia, inhibítory proteáz alebo urýchlovače prieniku pre rôzne cesty podávania, vrátane parenterálneho, pulmonálneho, nazálneho a orálneho. Zlúčeniny modifikované kovalentným pripojením polymérov rozpustných vo vode ako polyetylén glykol, kopolyméry polyetylén glykolu a polypropylén glykolu, karboxymetylcelulózy, dextranu, polyvinyl alkoholu, polyvinylpyrolidonu alebo polyprolínu sú známe, že po intravenózne injekcii vykazujú podstatne dlhší polčas v krvi ako príslušné, nemodifikované zlúčeniny (Abuchowski a spol., 1981; Newmark a spol., 1982; a Katre a spol., 1987). Takéto modifikácie môžu tiež zvýšiť rozpustnosť zlúčenín vo vodných roztokoch, zabrániť agregácii, zvýšiť fyzikálnu a chemickú stabilitu zlúčeniny a významne znížiť imunitnú odpoveď a reakciu na zlúčeninu. Výsledkom je, že požadovaná *in vivo* biologická aktivita môže byť dosiahnutá podaním takejto zlúčeniny s polymérom v nižšej dávke a menej často, ako pri podaní nemodifikovanej zlúčeniny.

V inom uskutočnení môže byť farmaceutická kompozícia dodávaná systémom kontrolovaného uvoľňovania. Napríklad, látka môže byť podaná intravenóznou infúziou, implantovanou osmotickou pumpou, transdermálnou náplastou, lipozómami, alebo inými spôsobmi podania. Môže byť použitá pumpa (pozri Langer, vyššie; Sefton, CRC Crit. Reff. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald a spol., Surgery 88:507 (1980); Saudek a spol., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)). Pri inom uskutočnení môžu byť použité polymérne materiály. Kontrolované uvoľňovanie môže byť umiestnené do blízkosti terapeutického cieľa, napríklad do mozgu, čím sa vyžaduje len časť dávky podanej

systémovo (pozri napríklad Goodson v Medical Application of Controlled Release, vyššie, zv. 2, str. 115-138 (1984)). Výhodne je zariadenie na kontrolované uvoľňovanie zavedené jedincovi v blízkosti miesta neprimeranej imunitnej odpovede alebo nádoru. Iné kontrolované uvoľňovacie systémy sú popísané v prehľade Langer (Science 249:1527-1533 (1990)).

Spôsob podľa predkladaného vynálezu pre prevenciu vzniku rakoviny prostaty obsahuje podanie farmaceutického prípravku ľudskému jedincovi, ktorý obsahuje chemopreventívnu látku alebo jeho metabolit alebo jeho soľ. Farmaceutický prípravok môže obsahovať len chemopreventívnu látku, alebo môže ďalej zahŕňať farmaceuticky prijateľný nosič. Môže byť v pevnej alebo kvapalnej forme ako tablety, prášky, kapsule, pelety, roztoky, suspenzie, elixíry, emulzie, gély, krémy alebo čípky, vrátane rektálnych a uretrálnych čípkov. Farmaceuticky prijateľné nosiče sú gumi, škroby, cukry, celulózy a ich zmesi. Farmaceutický prípravok obsahujúci chemopreventívnu látku môže byť podávaný jedincovi, napríklad, subkutánnou implantáciou pelety; peleta môže mať kontrolované uvoľňovanie chemopreventívnej látky počas určitého času. Prípravok môže byť podaný intravenóznou, intraarteriálnou, alebo intramuskulárnou injekciou roztoku prípravku, orálne vo forme kvapaliny alebo pevného prípravku, alebo lokálnym podaním. Podanie môže byť tiež vo forme rektálnych čípkov alebo uretrálnych čípkov. Farmaceutický prípravok môže byť tiež parenterálna zmes; v jednom uskutočnení zmes obsahuje lipozóm, ktorý zahŕňa komplex chemopreventívnej látky ako takej, napríklad toremifen, a zlúčeninu cyklodextrinu, ako bolo popísané už v citovanom U.S. patente č. 5,571,534 autorov Jalonen a spol.

Farmaceutické prípravky podľa vynálezu môžu byť pripravené rozpustením, miešaním, granuláciou alebo tabletovaním. Pre orálne podanie, chemopreventívne látky alebo ich fyziolo-

gicky tolerované deriváty ako sú soli, estery, N-oxidy a podobne, sú zmiešané s aditívami bežnými pre tento účel, ako sú vehikula, stabilizátory alebo iné riedidlá, a premenené bežnými spôsobmi na vhodnú formu pre podanie, ako tablety, potiahnuté tablety, tvrdé alebo mäkké želatínové kapsuly, vodné, alkoholové alebo olejové roztoky. Pre bežné tablety sú vhodné vehikula napríklad laktóza, sacharóza, alebo kukuričný škrob v kombinácii s väzobnými látkami ako agát, kukuričný škrob, želatína, alebo dezintedrátory ako kukuričný škrob, zemiakový škrob, kyselina alginová, alebo mazivami ako je kyselina steárová alebo stearan draselný. Príkladmi vhodných vehikúl alebo rozpúšťadiel sú rastlinné alebo živočíšne oleje ako slnečnicový olej, alebo olej z pečene rýb. Prípravky môžu byť vlhké alebo suché granuly. Pre parenterálne podanie (subkutánna, intravenózna, intraarteriálna, alebo intramuskulárna injekcia), chemopreventívne látky a ich fyziologicky tolerované deriváty ako sú soli, estery, N-oxidy a podobne, sú premenené na roztoky, suspenzie alebo emulzie, podľa potreby s látkami bežnými a vhodnými pre tieto účely, napríklad so solubilizátormi alebo inými prídavnými látkami. Príkladmi sú: sterilné kvapaliny ako voda a oleje, s- alebo bezpridania povrchovo aktívnej látky a iných farmaceuticky prijateľných pomocných látok. Príkladmi olejov sú vazelína, živočíšny, rastlinný alebo syntetický olej, napríklad arašidový olej, sójový olej alebo minerálny olej. Výhodnými vodnými nosičmi pre injekčné roztoky sú voda, soľný roztok, dextróza vo vode a podobne, roztoky cukrov, roztoky glykolov ako propylén glykoly alebo polyetylén glykoly.

Príprava farmaceutických kompozícií, ktoré obsahujú aktívnu zložku je dobre známy v odbore. Takéto kompozície sú typicky pripravované vo forme polypeptidového aerosolu určeného pre dodanie do nosohrtana, alebo injekcie vo forme kva-

palných roztokov alebo suspenzií. Môžu však byť pripravené pevné formy v kvapalinách pre injekčné podávanie alebo pre suspenzie. Prípravok môže byť tiež emulgovaný. Aktívna terapeutická zložka je často zmiešaná s vehikulom, ktoré je farmaceuticky prijateľné a kompatibilné s aktívnou zložkou. Vhodné vehikula sú napríklad, voda, solný roztok, dextróza, glycerol, etanol a podobne, a ich kombinácie. Okrem toho, keď je žiadúce, kompozícia môže obsahovať pomocné látky ako sú zvlhčovadlá alebo emulgátory, látky upravujúce pH, čím sa zvyšuje účinnosť aktívnej zložky.

Aktívna zložka môže byť zabudovaná do kompozície vo forme neutrálnej, farmaceuticky prijateľnej soli. Farmaceuticky prijateľné soli sú adičné soli kyselín (vytvorené s voľnými amino skupinami polypeptidu alebo molekuly proti-látky) a tiež anorganických kyselín. Príkladmi anorganických kyselín sú kyselina chlorovodíková, fosforečné kyseliny, príkladmi anorganických kyselín sú kyselina octová, oxalová, tartarová, mandelová a podobne. Soli vytvorené z voľných karboxylových skupín môžu byť odvodené od anorganických zásad, napríklad hydroxidu sodného, draselného, amónneho, vápenatého alebo železnatého a takých organických zásad ako sú izopropylamín, trimetylamín, 2-etylamo etanol, histidín, prokain a podobne.

Pri lokálnom podávaní na telesný povrch, napríklad krémov, gélov, kvapiek a podobne, chemopreventívne látky alebo ich fyziologicky dobre tolerované deriváty ako sú soli, estery, N-oxidy a podobne, sú pripravené a aplikované ako roztoky, suspenzie alebo emulzie vo fyziologicky prijateľnom rozpúšťadle s prítomným alebo neprítomným nosičom.

V inom uskutočnení vynálezu aktívna zlúčenina môže byť dodávaná vo vezikule lipozómu (pozri Langer, Science 249: 1527-1533 (1990); Treat a spol., v *Liposomes in the Therapy*

of Infectious Diseases and Cancer, Lopez-Berestein a Fidler (vyd.), Liss, New York, str. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *tamtiež*, str. 317-327).

Farmaceutické kompozície podľa predkladaného vynálezu sú predovšetkým užitočné pre liečenie jedinca so zvýšeným rizikom vývoja rakoviny prostaty. Vysoko rizikovní jedinci sú napríklad tí, ktorí majú benígnu hyperpláziu prostaty, intraepiteliálnu neopláziu prostaty (PIN), alebo abnormálne vysokú hladinu cirkulujúcich špecifických protilátok voči prostate (PSA), alebo majú rodinnú anamnézu rakoviny prostaty.

Chemopreventívna látka voči rakovine prostaty môže byť podávaná v kombinácii s inými cytokínmi alebo rastovými faktormi, ako sú, nie však obmedzene: IFN- γ alebo α , IFN- β ; interleukín (IL) 1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, nekrotizačný faktor nádoru (TNF-tumor necrosis factor) α , TNF- β , stimulačný faktor kolónie granulocytov (G-CSF - granulocyte colony stimulating factor), granulocyty/makrofágy CSF (GM-CSF); ďalšie molekuly vrátane členov superrodiny integrínov a členov superrodiny imunoglobulínov (Ig) ako sú, neobmedzene, LFA-1, LFA-3, CD22 a B7-1, B7-2 a ICAM-1 kostimulačné molekuly T buniek.

Podávanie chemopreventívnej látky môže predchádzať alebo nasledovať po podávaní látky poškodzujúcej DNA v intervaloch niekoľkých minút až týždňov. Protokoly a spôsoby sú dobre známe odborníkom. Látky, alebo faktory poškodzujúce DNA sú dobre známe odborníkom a je to akákoľvek chemická zlúčenina, ktorá keď sa dostane do bunky, spôsobí liečebné poškodenie DNA. Takéto látky a faktory sú ožiarenie a vlnenie, ktoré indukujú poškodenie DNA, ako sú gama žiarenie, rontgenové žiarenie, UV-žiarenie, mikrovlnné žiarenie, elektrická emisia a podobne. Veľké množstvo chemických zlúčenín, tiež nazývaných „chemoterapeutické látky“ spôsobuje poškodenie DNA, a

všetky tieto látky môžu byť použité v kombinovanom spôsobe liečby podľa predkladaného vynálezu. Chemoterapeutické látky zahrňujú napríklad, adriamycin, 5-fluorouracil (5FU), etoposid (VP-16), kaptotecin, aktinomycin D, mitomycin C, cisplatin (CDDP) a dokonca aj peroxid vodíka. Vynález uvažuje použiť kombináciu jednej alebo viacerých látok spôsobujúcich poškodenie DNA, či už na základe ožiarenia alebo skutočnej zlúčeniny, ako je použitie rontgenových lúčov s cisplatinom alebo použitie cisplatinu s etoposidom.

V inom uskutočnení vynálezu je možné ožiariť lokalizovaný nádor žiarením poškodzujúcim DNA, ako je rontgenové žiarenie, UV svetlo, gama lúče a dokonca aj mikrovlnné žiarenie. Je tiež možné, aby sa nádorové bunky dostali do styku s látkou poškodzujúcou DNA tak, že jedincovi sa podá terapeuticky účinné množstvo farmaceutickej kompozície s obsahom zlúčeniny poškodzujúcej DNA, ako sú adriamycin, 5-fluorouracil, etoposid, kaptotecin, aktinomycin-D, mitomycin C, alebo výhodnejšie cisplatin. Látky, ktoré poškodzujú DNA sú tiež látky, ktoré zasahujú do replikácie DNA, mitózy a delenia chromozómov. Takéto chemoterapeutické zlúčeniny zahrňujú adriamycin, známy tiež ako doxorubicin, etoposid, verapamil, podofylotoxin a podobne. Iné faktory, ktoré spôsobujú poškodenie DNA, a ktoré sa intenzívne používajú zahrňujú tie, ktoré sa spoločne označujú ako gama lúče, rontgenové žiarenie a/alebo priame podanie rádioizotopov do nádorových buniek. Inými formami faktorov poškodzujúcich DNA sú mikrovlnné žiarenie a UV žiarenie. Je veľmi pravdepodobné, že všetky tieto faktory spôsobujú široký rozsah poškodenia DNA, prekursorov DNA, replikácie a opravy DNA a zloženia chromozómov.

Odborníci ocenia, že spôsoby a farmaceutické kompozície podľa predkladaného vynálezu sú predovšetkým vhodné pre podanie cicavcom, výhodne ľudskému jedincovi.

Medziprodukty biomarkerov sú merateľné biologické zmeny v tkanive, ktoré sa vyskytujú medzi zahájením a rozvojom klinicky zistenej neoplázie. Predpokladá sa, že modulácia jedného alebo viacerých medziproduktov biomarkerov chemopreventívnou látkou môže zaznamenávať skutočnú inhibíciu kar-
cinogenézy. Biomarker by bol hodnotený vtedy, keď metabolit a výskyt rakoviny, sú po pôsobení chemopreventívnej látky tiež znížené. Biomarkery rakoviny môžu byť nasledovné: histológia, proliferácia, diferenciácia a biochemické markery. V mnohých chemopreventívnych prístupoch je dôležité počiatočné histolo-
gické rozlíšenie prijateľných predrakovinových lézií. Pre prostatu je možným histologickým markerom intraepiteliálna neoplázia prostaty (PIN), ktorá je prekanceróznym prekursorom adenokarcinómu prostaty. PIN sa javí ako abnormálna prolifera-
cia v kanálikoch prostaty predrakovinového miesta vo forme dysplázie buniek a rakoviny in situ bez vniknutia do stromy. PIN a histologická rakovina prostaty sú morfometricky a fenotypicky rovnaké. Takže vývoj PIN vysokého stupňa môže predstavovať dôležitý krok progresie, keď normálna prostata vyvinie PIN, histologickú rakovinu prostaty, invazívnu rako-
vinu prostaty a metastázy.

Pre úplnejšie zobrazenie výhodných uskutočnení vynálezu sú uvedené nasledujúce príklady. Nemali by byť chápané ako obmedzujúce široký cieľ vynálezu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1: Adenokarcinóm prostaty transgéennej myši

Štúdiu chemoprevencie rakoviny prostaty bránil nedostatok vhodných zvieracích modelov. Nedávny vývoj transgéennej myši s modelom adenokarcinómu prostaty (TRAMP) dáva možnosť

študovať chemoprevenciu. V TRAMP modeli, ktorý popísali Greenberg a spol., „Prostate cancer in a transgenic mouse“, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, zv. 92, strany 3439–3443, je v epiteliálnych bunkách myšej prostaty špecificky expri-movaný PB-SV40 veľký T antigén (PB-Tag). Výsledkom je, že tento model má niekoľko výhod v porovnaní s existujúcimi modelmi: 1) myši vyvinú progresívne formy epiteliálnej hyper-plázie prostaty vo veku 10 týždňov a invazívny adenokarcinóm vo veku asi 18 týždňov; 2) rozširovanie metastáz rakoviny prostaty napodobňuje rakovinu prostaty u ľudí s rovnakými miestami metastáz ako sú lymfatické uzliny, pľúca, oblička, nadoblička a kosť; 3) vývoj a rovnako aj postup rakoviny prostaty sa uskutoční v priebehu relatívne krátkeho času 10 až 30 týždňov; 4) výskyt nádorov je 100 %; a 5) transgénne zvieratá môžu byť vyšetrené na prítomnosť rakoviny prostaty pred nástupom klinickej formy rakoviny prostaty, čím je možné priamo testovať účinok chemopreventívnych látok, ktoré môžu meniť vznik rakoviny v prostate.

TRAMP model transgénnej myši je vynikajúci *in vivo* model pre určenie mechanizmov zahájenia a rozvoja rakoviny prostaty a pre testovanie účinnosti možných chemopreventívnych látok. Myši progresívne vyvinú epiteliálnu hyperpláziu prostaty, PIN a potom rakovinu prostaty v priebehu krátkeho času (< 17 týždňov).

Podávanie chemopreventívnej látky hybridnej TRAMP myši je zahájené vo veku 30 dní, koncentrácia chemopreventívnych látok je v dávke 0,5 až 50 mg/kg hmotnosti myši denne, výhodne 6 až 30 mg/kg hmotnosti myši denne. Chemopreventívne látky sú vhodne podané vo forme podkožných implantátov ako 21-dňové a 90-dňové pelety (pripravené Innovative Research of America, Sarasota, FL). Kontrolné zvieratá dostali placebo implantáty. V každej skupine boli zvieratá usmrtené vo veku

5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40 a 50 týždňov pred tým, ako sa vyvinul hmatateľný nádor. Odobrala sa krv pre vyhodnotenie zmien v obsahu sérového testosterónu a estradiolu. Pre histologické a molekulárne štúdie sa odobralo tkanivo prostaty.

Vykonalí sa nasledujúce skúšky:

1) Analýza celej prostaty pre zistenie zmien morfológie kanálikov prostaty v závislosti na čase po podávaní, alebo bez podávania; príklady sú zaznamenané na Obrázku 2. Rezy tkaniva sú histologicky vyhodnotené H a E a Masson-trichom štandardným farbením. Stanoví sa prítomnosť PIN a vyhodnotí sa stupeň (1- mierny až do 3- ťažký).

2) Meranie hladín estradiolu a testosterónu v sére (RIA) v každom vekovom intervale pre stanovenie zmien týchto hormónov ako výsledok pôsobenia chemopreventívnych látok.

Príklad 2: Imunochemické analýzy

Mikroskopický obraz každého rezu bol hodnotený počítačom (Mac9500-132 počítač a monitor), pre kvantitatívne vyhodnotenie obrazu (NIH-Image 1,6 PPC) bola použitá Kodak DCS 460 kamera pripojená k Nikon Microphot-FX mikroskopu. Kvantifikácia bola založená na analýze sfarbenia (IPLab Spectrum 3,1, Scanalytics, Inc., VA), čím sa rozlíšili rozdiely vo farbe zafarbených rezov tkaniva. Hranice rozlišovania boli nastavené tak, aby sa rozoznávali rôzne zložky tkaniva prostaty. Je vypočítaná plocha hustoty každých zložiek týchto tkanív. Vypočíta sa priemer z piatich záberov. Imunohistochemické obrázky? môžu byť digitalizované a kvantifikované, čo umožní štatistické vyhodnotenie vzorky vyjadrené korelačným koeficientom a pravdepodobnosťou (dvojcestná analýza).

Príklad 3: Chemoprotektívna aktivita

Uskutočnila sa skúška účinnosti chemoprotektívnych látok u TRAMP transgénnych myší (PBTag X FVCwt) (od Dr. Normana, Greenberg, Baylor College of Medicine, TX). Tieto myši vykazovali príznaky rakoviny už vo veku 10 týždňov. TRAMP transgénne myši boli testované na prítomnosť Large T ag transgénu. V pokusoch boli použité pozitívni myši samci. Pre možné chemoprotektívne účinky bola testovaná antiestrogénna aktivita toremifenu, ktorý bol inkorporovaný do bežných peliet (Innovative Research of America, Sarasota, FL). Chemoprotektívne pôsobenie u myší bolo zahájené tridsiaty postnatálny deň (priemerná hmotnosť myší bola 14 g). 10 až 12 zvierat v štyroch skupinách dostalo subkutánne implantáty peliet s obsahom 90-dňového uvoľňovania toremifenu. Uvoľňovaná dávka liečiva, prispôbená zmenám rastu, hodnoteného hmotnosťou, bola upravená buď na dodávanie nízkej dávky toremifenu (6 mg/kg) alebo vysokej dávky (30 mg/kg). Kontrolné zvieratá ($n = 10$) dostali placebo pelety. Účinnosť liečenia bolo hodnotené neprítomnosťou hmatateľného nádoru. Myšie nádory prostaty boli vybraté a hodnotené molekulárnymi a histologickými metódami.

Použitím TRAMP transgénneho modelu rakoviny prostaty, kde každé zviera vyvinie dedične rakovinu prostaty, sa dokázalo, že toremifen zvyšuje latenciu a aj pokles výskytu rakoviny prostaty.

Ako zaznamenáva Obrázok 1, obe dávky, vysoká aj nízka, boli účinné. Tvorba nádorov v prednej prostate TRAMP myši bola pozorovaná v 17 týždni veku u placebo skupiny ($n=10$), vo veku 19 týždňov pri použití vysokej dávky toremifenu ($n=12$) a vo veku 28 týždňov pri pôsobení nízkej dávky toremifenu ($n=12$). Toremifen významne zvýšil latenciu vývoja rakoviny v prednej prostate TRAMP myši až do veku 11 týždňov.

Hoci sa počas trvania pokusu u myší liečených toremifenom nedosiahol 50 % výskyt nádorov, čas, kedy 25 % zvierat malo nádor, bol porovnávaný medzi skupinami. 25 % nádorov z 10 zvierat bolo hmatateľných v 23. týždni u placebo skupiny a v 30. až 31. týždni u skupín s nízkou aj vysokou dávkou toremifenu, čo predstavuje posun o 7 až 8 týždňov. Štatistická analýza Wilcoxonovým testom ukázala významné rozdiely medzi vysokou aj nízkou dávkou toremifenu oproti placebo skupine, tak ako zaznamenáva Tabuľka 1.

Tabuľka 1 - Štatistická analýza

	hodnota P	Wilcoxon P
Nízka dávka toremifenu vs placebo	0,0003*	0,0004*
Vysoká dávka toremifenu vs placebo	0,0017*	0,0071*

* významnosť $P < 0,05$

V 33. týždni, keď všetky kontrolné zvieratá mali nádory, 72 % zvierat liečených nízkou dávkou toremifenu a 60 % zvierat liečených vysokou dávkou toremifenu boli stále bez nádorov. Znamená to, že podávanie toremifenu v nízkej aj vysokej dávke spôsobilo veľký pokles výskytu nádorov v prednej prostate TRAMP myší.

Tieto výsledky, získané v súhlase s predkladaným vynálezom, sa nepredpokladali na základe predchádzajúcej publikácie Lucia a spol., ktorí popisujú podávanie dvoch dávok tamoxifenu, blízkeho štrukturálneho analógu toremifenu, Lobund-Wistar potkanom s rakovinou prostaty vyvolanou podávaním kombinácie iniciátora a promótoru. Lucia a spol., popisujú, že len 20 až 26 % zvierat po podávaní nízkej dávky a 32 až 50 % zvierat po podávaní vysokej dávky tamoxifenu boli bez nádorov v prednej prostate. Treba poznamenať, že predná pros-

tata hlodavcov, na rozdiel od zadnej prostaty, nemá žiaden podobný segment v prostate ľudského jedinca.

Lucia a spol. ďalej uvádzajú, že použitá kombinácia iniciátor-promótor účinná pre vývoj rakoviny v prednej prostate pokusných zvierat, bola neúčinná vo vyvolaní rakoviny v zadnej prostate. Preto neexistuje dôvod predpokladať chemopreventívny účinok na nádory v zadnej prostate podaním tamoxifenu Lobund-Wistar potkanom alebo ľuďom.

Ako už bolo uvedené, podanie toremifenu spôsobuje podstatný chemopreventívny účinok voči nádorom prednej prostaty TRAMP myši. Tento výsledok je povzbudivý pre podobné užitočné účinky u ľudských jedincov, ktorých prostata neobsahuje segmenty zodpovedajúce zadnej prostate hlodavcov.

Príklad 4: Histológia tkaniva prostaty

V čase palpačného zistenia tumorov u placebo skupiny a u skupiny zvierat liečených vysokou dávkou toremifenu boli nádory histologicky vyšetrené. Obrázok 2A je HaE rez zadnej prostaty 17-týždňovej normálnej dospeléj myši. Obrázok 2B je rez zadnej prostaty placebo 16-týždňovej TRAMP myši a zaznamenáva, že oproti normálnej štruktúre zvieraťa na Obrázku 2A, zadnú prostatu TRAMP myši charakterizuje vrstva nediferencovaných, anaplastických buniek s vysokým mitotickým indexom. Naproti tomu, ako zaznamenáva Obrázok 2C, prostata 30-týždňových TRAMP myši liečených toremifenom vykazuje normálnu štruktúru žľazy a nádory majú diferenciovanú štruktúru, mitotický index je nižší ako u placebo liečených zvierat. Tieto výsledky naznačujú, že toremifen aj v nízkych dávkach je schopný potlačiť karcinogézu v prostate u TRAMP myši.

**Príklad 5: Použitie chemopreventívnej účinnosti
Toremifenu voči rakovine prostaty u modelu
TRAMP myši**

Tento pokus potvrdil a dokázal chemopreventívnu účinnosť toremifenu. Predkladaná štúdia bola zameraná na histologické a molekulárne zmeny spojené s vývojom rakoviny prostaty u kontrolných zvierat a mechanizmus chemopreventívneho pôsobenia toremifenu u TRAMP myši, ktoré boli chované, depistované a liečené nepretržitým uvoľňovaním liečiva z peliet. Vo vopred stanovenom čase boli usmrtené skupiny 5 zvierat a ich prostaty boli odobraté pre analýzu. Žlazy prostaty boli hodnotené na prítomnosť nádoru histologicky a v anatomickej vzorke bol imunohistochemicky hodnotený veľký T antigén. Pôsobenie Toremifenu bolo hodnotené v 7, 10, 15 a 20 týždni. Výsledky sú popísané nižšie.

Výsledky: Analýza vzoriek prostaty v 7, 10, 15, a 20 týždni ukázala, že u placebo skupiny myši sa vyvinuli nádory vo veku 15 až 20 týždňov, čo je v súhlase s predchádzajúcou pilotnou štúdiou. Avšak Toremifenom liečené zvieratá vykazovali oddialenie výskytu rakoviny prostaty až do veku 20 týždňov (Obrázok 3). Vo veku 20 týždňov je prítomné výrazné oddialenie výskytu nádorov u skupín liečených Toremifenom, ktoré pretrvávajú až do 35 týždňov (Obrázok 4). Tieto výsledky potvrdzujú, že dokonca aj pri citlivejšom stanovení tumorigenicity, Torememifen má chemopreventívnu účinnosť. Pre histologické vyšetrenie boli vzorky fixované, spracované a zaliate v parafíne. Rezy (hrúbky 5 µm) boli narezané a zafarbené bežným HaE spôsobom. Toremifen inhiboval vývoj kanálik a diferenciáciu tkaniva (porovnanie s nádorov prostaty 17 týždňov starých TRAMP myši vs. divoký typ (Obrázok 4)); b) Kvantitatívne a imunohistochemické vyšetrenie rezov ukázalo, že vo veku 15 týždňov (Obrázok 5) placebo a toremifenom lie-

čené tkanivá vykazujú prítomnosť T-antigénu v prednej prostate. Zdá sa, že chemopreventívna aktivita Toremifenu nie je výsledkom potlačenia probasin promótoru u TRAMP modelu.

Záver: Použitím citlivejších metód na stanovenie tvorby nádorov bola potvrdená schopnosť Toremifenu predchádzať rakovine prostaty u TRAMP modelu. Zdá sa, že mechanizmus chemopreventívneho pôsobenia Toremifenu nie je výsledkom straty transgénu pre veľký T-antigénový proteín.

Príklad 6: Toremifen indukuje regresiu ľudských nádorov prostaty v modeli nude myši

U amerických mužov zostáva rakovina prostaty najrozšírenejšou diagnostikovanou rakovinou. Nezodpovedané však zostávajú otázky týkajúce sa etiológie a liečenia tohoto ochorenia, predovšetkým jeho pokročilých štádií. Napriek recidíve a postupujúcej rakovine prostaty a napriek všeobecnému vývoju odolnosti ochorenia voči hormonálnej liečbe, hormonálna terapia zostáva štandardným spôsobom liečenia. Pre prevenciu a liečenie rakoviny prostaty sú preto potrebné nové prístupy, aby bolo možné sa prispôsobiť zvýšenému počtu mužov s diagnózou tohoto ochorenia. Pokusy a nižšie uvedené výsledky ukazujú, že toremifen potlačuje rast nádorov citlivých na LNCaP u beztýmusovej nude myši.

Materiál a metódy: jeden milión LNCaP buniek v Mitrigel boli injikované subkutánne atymickým nude myšiam. Celkovo bolo injikovaných 40 myší. Po približne 3 až 4 týždňoch sa vyvinuli viditeľné nádory. Na základe rovnakých rozmerov nádorov vyhodnotených dvojrozmerným ukazovateľom nádorov, boli myši rozdelené do dvoch skupín. Medzi lopatky každej myši bola subkutánne implantovaná jedna peleta (placebo alebo toremifen 35 mg). Týždenne sa merala veľkosť nádora. Bol vypočítaný objem nádora (objem nádora = $0,5 (L+W) \times L \times E \times 0,5236$, kde

L=dĺžka nádora a W=šírka nádora). Veľkosť nádora v čase implantácie bola porovnávacou hodnotou. Pre porovnanie rozdielov vo veľkosti nádorov. boli zaznamenávané týždenné zmeny vo veľkosti nádorov a vyjadrili sa ako rozdiely od pôvodných veľkostí v čase implantácie pelety.

Výsledky: Dve myši uhynuli po implantácii pelety v dôsledku poranení od inej myši. Jedna myš liečená toremifenom bola vylúčená zo štúdie z dôvodu mohutného krvácania nádoru a vývoja hematómu. Všetky myši vyvinuli viditeľné jednostranné alebo obojstranné nádory. Každý nádor bol sledovaný samostatne. Dvadsať štyri nádorov bolo liečených placebo a dvadsať osem nádorov bolo liečených toremifenom. Výsledky zaznamenáva Tabuľka 2 a Obrázky 6A a 6B.

Tabuľka 2

Placebo

týždeň	n	relatívne % zmeny objemu (pred liečením)
3	11	9,44
4	8	115,27
5	8	271,71
6	8	600,88

TOREMIFEN

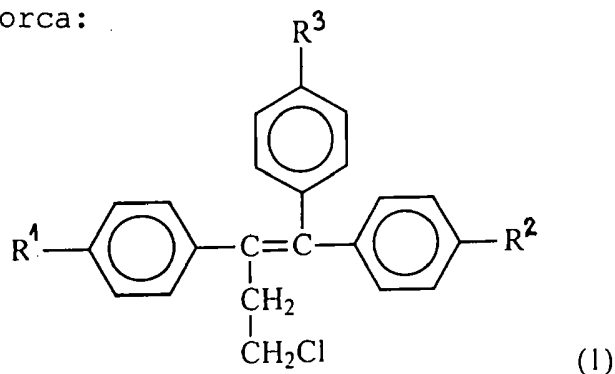
týždeň	n	relatívne % zmeny objemu (pred liečením)
3	11	-34,58
4	7	-61,01
5	7	-74,51
6	5	-61,72

Sledovanie bude rozšírenie na bežnú populáciu a v súčasnosti sú vyhodnocované výsledky s dodatočnými zvieratami.

Záver: Toremifen inhibuje a indukuje regresiu existujúcich LNCaP nádorov. Nie je známy mechanizmus, ktorým toremifen vykazuje účinok. Schopnosť vykazovať takéto účinky podporuje použitie Toremifenu pre liečenie rakoviny prostaty a pre zabránenie recidívy rakoviny prostaty a na zabránenie recidívy rakoviny prostaty u pacientov s vysokým rizikom mikrometastáz rakoviny prostaty.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

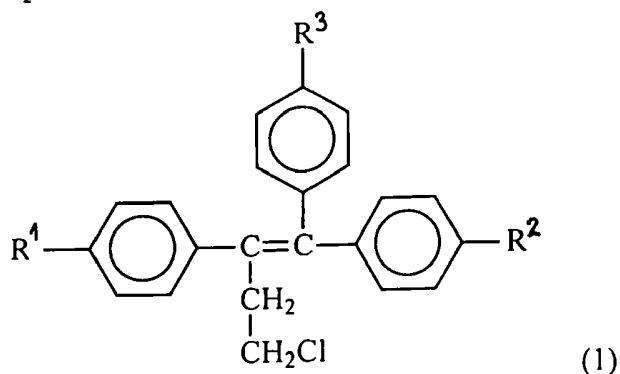
1. Použitie chemopreventívnej látky na prípravu farmaceutického prípravku na prevenciu karcinogenézy prostaty cicavcov, kde chemopreventívna látka obsahuje zlúčeninu vzorca:



- kde R^1 a R^2 , ktoré môžu byť rovnaké alebo rozdielne, sú H alebo OH, R^3 je $OCH_2CH_2NR^4R^5$, kde R^4 a R^5 , ktoré môžu byť rovnaké alebo rozdielne, sú H alebo alkylová skupina s 1 až 4 atómami uhlíka;
alebo jej farmaceuticky prijateľná soľ, ester, alebo N-oxid a ich zmes.
2. Použitie podľa nároku 1, kde farmaceutický prípravok ďalej obsahuje farmaceuticky prijateľný nosič.
 3. Použitie podľa nároku 2, kde nosič je vybraný zo skupiny zahrňujúcej gumu, škrob, cukor, celulóзовý materiál a ich zmes.
 4. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 3, kde farmaceutický prípravok je vo forme pre subkutánnu implantáciu pelety jedincovi.
 5. Použitie podľa nároku 4, kde peleta je vo forme pre kontrolované uvoľňovanie farmaceutického prípravku v určitom čase.

6. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 3, kde farmaceutický prípravok je v kvapalnej forme pre intravenózne, intraarteriálne alebo intramuskulárne podanie.
7. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 3, kde farmaceutický prípravok je vo forme pevnej alebo kvapalnej pre orálne podanie.
8. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 3, kde farmaceutický prípravok sa aplikuje lokálne na kožu jedinca.
9. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 3, kde farmaceutický prípravok je vybratý zo skupiny obsahujúcej peletu, tabletu, kapsulu, roztok, suspenziu, emulziu, elixír, gél, krém a čípok.
10. Použitie podľa nároku 9, kde čípkom je čípok do konečníka alebo uretrálny čípok.
11. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 3, kde farmaceutickým prípravkom je parenterálna zmes.
12. Použitie podľa nároku 11, že parenterálna zmes zahŕňa lipozóm obsahujúci komplex chemopreventívnej látky a zlúčeniny cyklodextrínu.
13. Použitie podľa niektorého z predchádzajúcich nárokov, kde chemopreventívna látka obsahuje toremifén, jeho N-oxid, jeho farmaceuticky prijateľné soli a ich zmesi.
14. Použitie podľa niektorého z predchádzajúcich nárokov, kde chemopreventívna látka je obsiahnutá v množstvách od 0,5 mg/kg hmotnosti/deň do 50 mg/kg hmotnosti/deň.

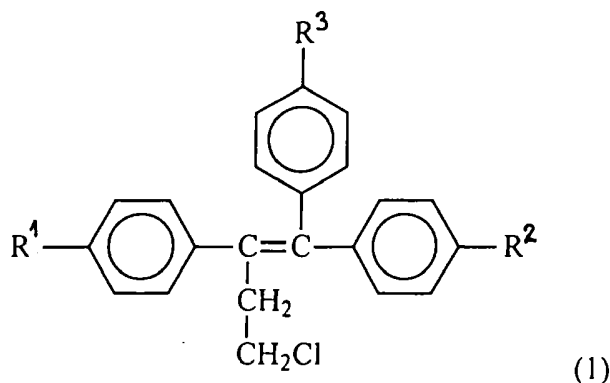
15. Použitie podľa nároku 14, kde chemopreventívna látka je v množstve od 6 mg/kg telesnej hmotnosti jedinca/deň do 30 mg/kg hmotnosti jedinca/deň.
16. Použitie podľa niektorého z predchádzajúcich nárokov, kde jedinec má zvýšené riziko pre rakovinu prostaty.
17. Použitie podľa nároku 16, kde jedinec má benígnu hyperpláziu prostaty, intraepiteliálnu neopláziu prostaty, alebo abnormálne vysokú hladinu cirkulujúcich špecifických protilátok voči prostate.
18. Použitie chemopreventívnej látky na prípravu farmaceutického prípravku na prevenciu recidívy, potlačenia, alebo inhibície karcinogenézy v prostate, alebo zvýšeného prežívania jedinca s rakovinou prostaty, kde chemopreventívna látka zahŕňa zlúčeninu vzorca:



kde R^1 a R^2 , ktoré môžu byť rovnaké alebo rozdielne, sú H alebo OH, R^3 je $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NR}^4\text{R}^5$, kde R^4 a R^5 , ktoré môžu byť rovnaké alebo rozdielne, sú H alebo alkylová skupina s 1 až 4 atómami uhlíka;

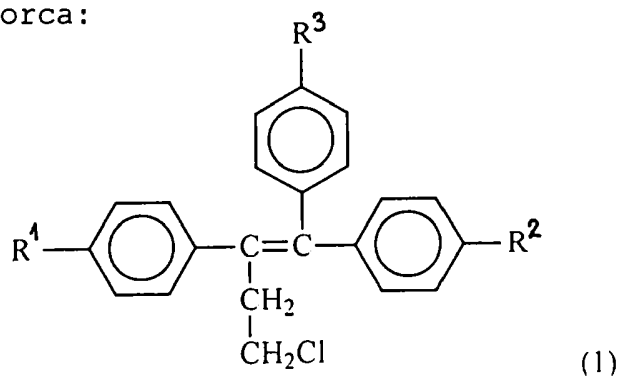
a jej farmaceuticky prijateľná soľ, ester, alebo N-oxid a ich zmes.

19. Použitie chemopreventívnej látky na prípravu farmaceutického prípravku na potlačenie alebo inhibíciu prekancerózných poškodení rakoviny prostaty, kde chemopreventívna látka zahŕňa zlúčeninu vzorca:



kde R^1 a R^2 , ktoré môžu byť rovnaké alebo rozdielne, sú H alebo OH, R^3 je $OCH_2CH_2NR^4R^5$, kde R^4 a R^5 , ktoré môžu byť rovnaké alebo rozdielne, sú H alebo alkylová skupina s 1 až 4 atómami uhlíka;
a jej farmaceuticky prijateľná soľ, ester, alebo N-oxid a ich zmes.

20. Použitie chemopreventívnej látky na prípravu farmaceutického prípravku na liečenie prekancerózných poškodení prostaty, kde chemopreventívna látka zahŕňa zlúčeninu vzorca:

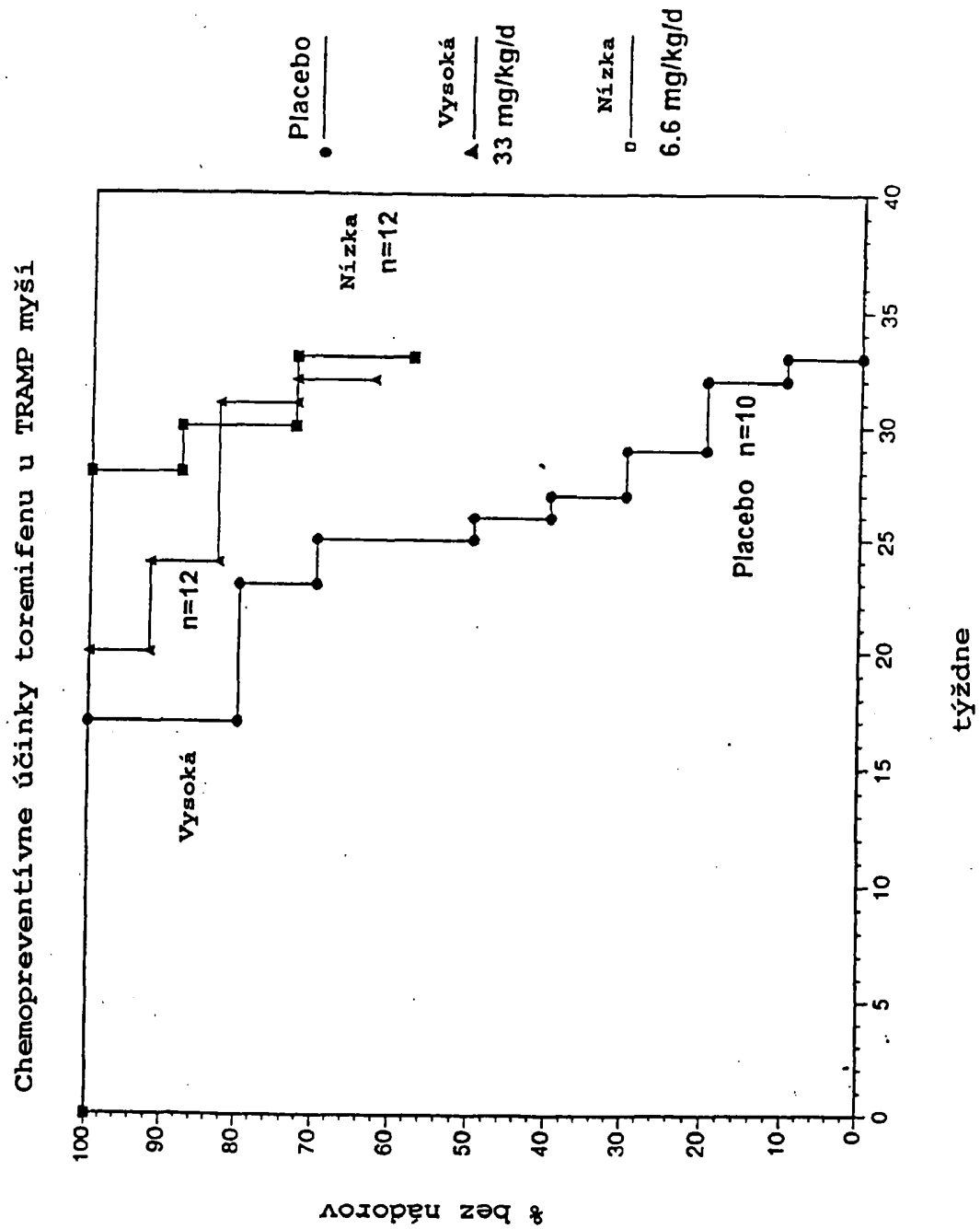


kde R^1 a R^2 , ktoré môžu byť rovnaké alebo rozdielne, sú H alebo OH, R^3 je $OCH_2CH_2NR^4R^5$, kde R^4 a R^5 , ktoré môžu byť rovnaké alebo rozdielne, sú H alebo alkylová skupina s 1 až 4 atómami uhlíka;
a jej farmaceuticky prijateľná soľ, ester, alebo N-oxid a ich zmes.

21. Použitie podľa nároku 19 alebo 20, kde prekancerózne poškodenie je prekanceróznym prekursorom adenokarcinómu prostaty.

22. Použitie podľa nároku 21, kde prekancerózný prekursor adenokarcinómu prostaty je intraepiteliálna neoplázia prostaty.
23. Použitie podľa nároku 22, kde intraepiteliálna neoplázia prostaty je vysoká intraepiteliálna neoplázia prostaty.
24. Použitie podľa niektorého z nárokov 19 až 23, kde farmaceutický prípravok ďalej obsahuje prijateľný nosič alebo riedidlo.

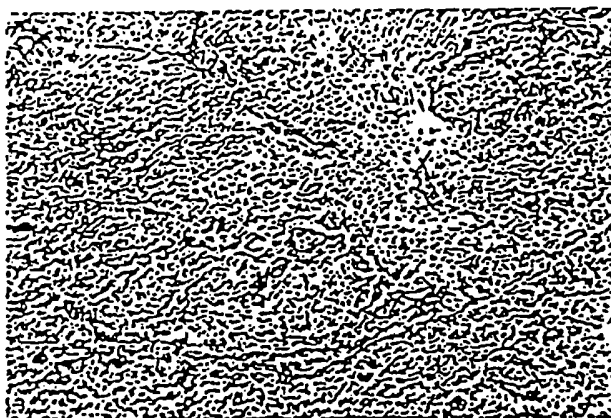
OBRAZOK 1



OBRÁZOK 2



A. Predná prostata normálnej dospeljej myši vo veku 17 týždňov (zväčšenie 200 x)



B. Adenokarcinóm prostaty placebo liečených TRAMP myši vo veku 16 týždňov (zväčšenie 200 x)



C. Adenokarcinóm prostaty TRAMP myši liečených toremifenom vo veku 30 týždňov (zväčšenie 200 x)

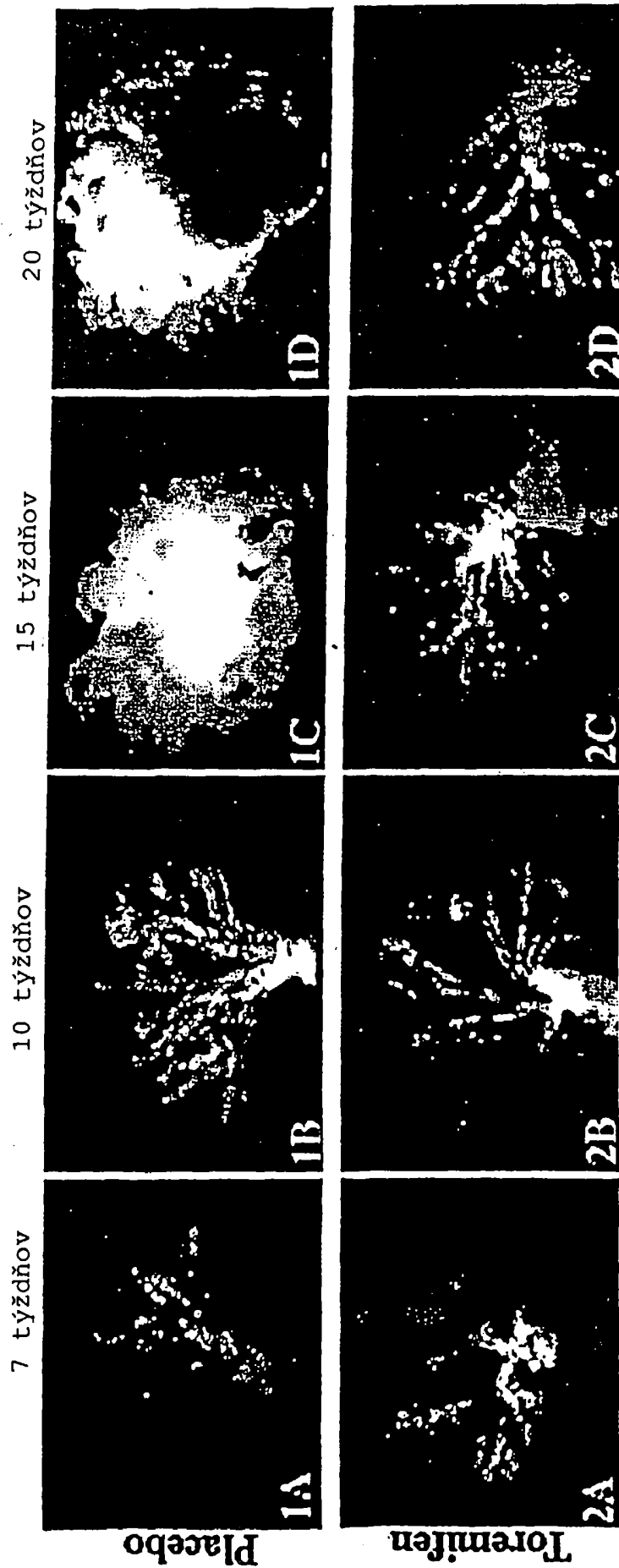
23.02.01

PP 1664-2000

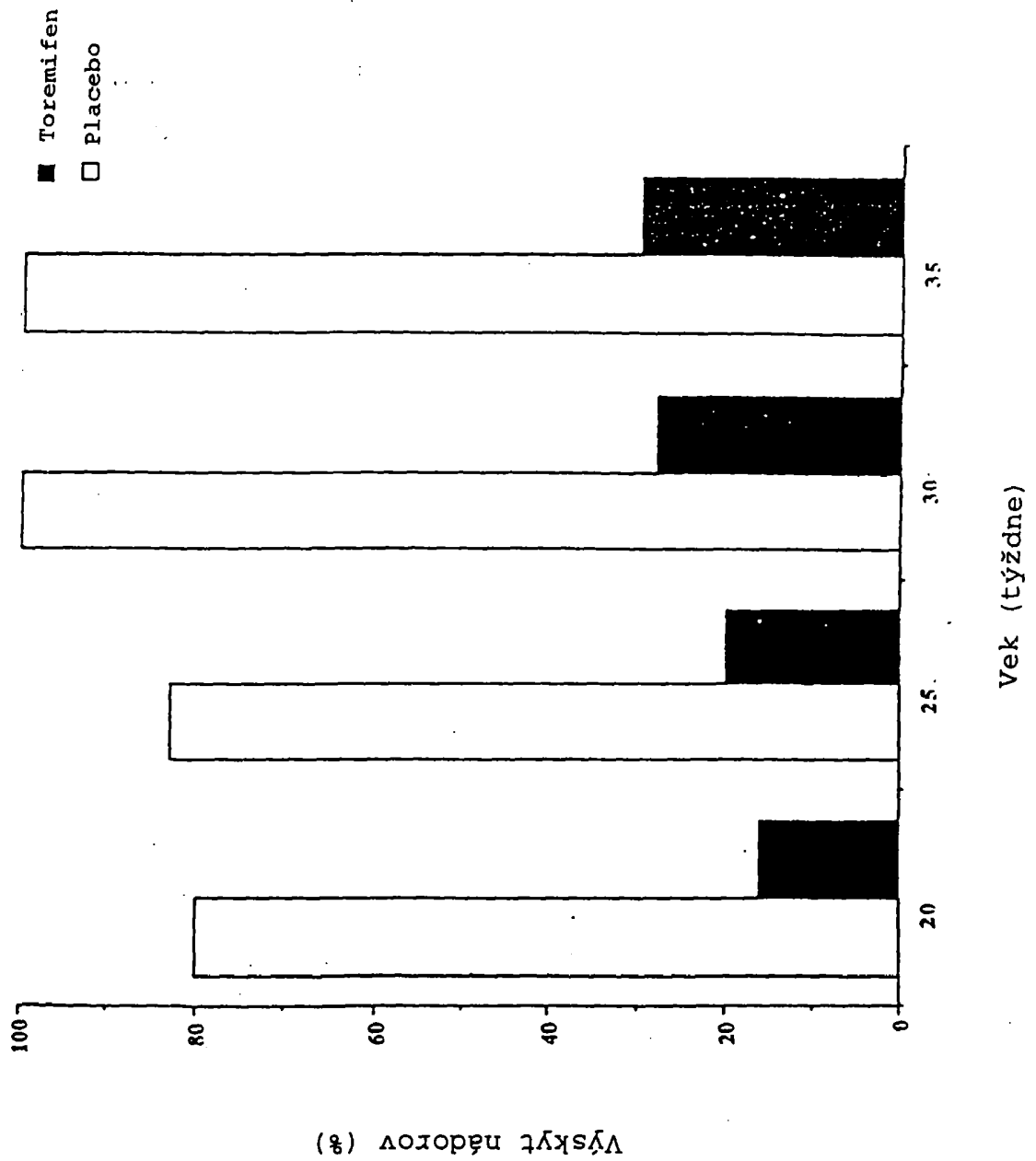
OBRÁZOK 3

3/6

Účinok toremifenu na vývoj prednej postaty u TRAMP myši



OBRÁZOK 4

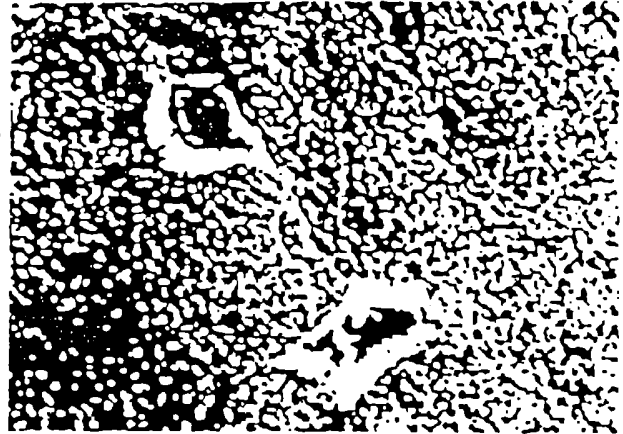


OBRÁZOK 5

5/6



WT-Vp-17 týždňov

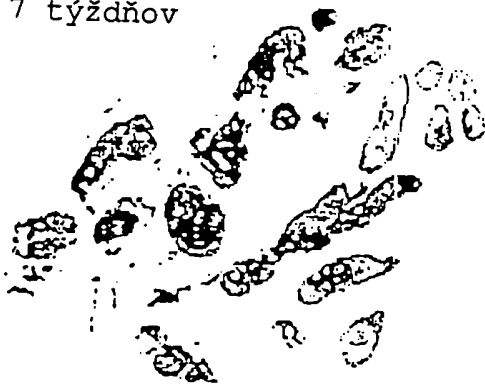


TRAMP-Vp-17 týždňov

7 týždňov

15 týždňov

Placebo



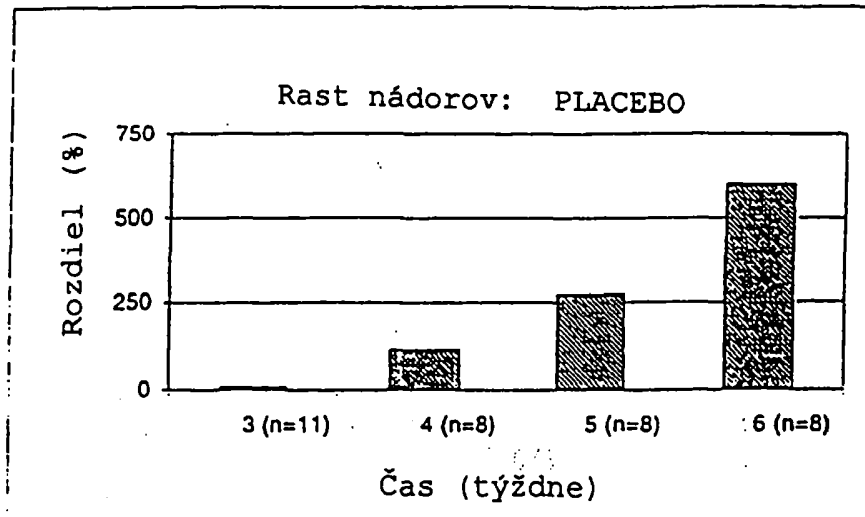
Toremifen



Účinok toremifenu na vývoj nádora v TRAMP myši
(H a E farbenie tkaniva prostaty)

OBRÁZOK 6

6/6



Interval po podávaní

% zmeny oproti dňu 0

Týždeň 3 (n=11)

9,44

Týždeň 4 (n=8)

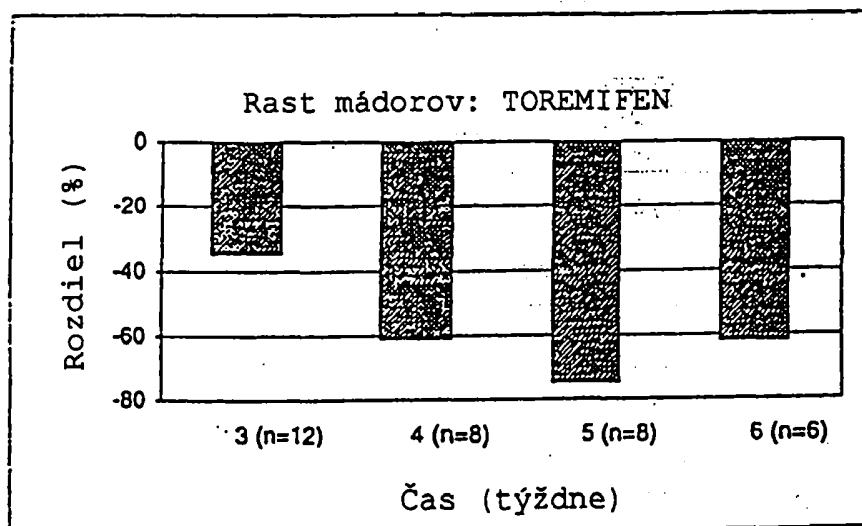
115,27

Týždeň 5 (n=8)

271,71

Týždeň 6 (n=8)

600,88



Interval po podávaní

% zmeny oproti 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