NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **309225** (13) B1

(51) Int Cl[7] A 61 K 31/135, A 61 P 35/00

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19943669	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1993.03.25, PCT/FI93/00119
(22) Inng. dag	1994.09.30	(85) Videreføringsdag	1994.09.30
(24) Løpedag	1993.03.25	(30) Prioritet	1992.04.03, GB, 9207437
(41) Alm. tilgj.	1994.09.30		
(45) Meddelt dato	2001.01.02		

(71) Patenthaver Orion-yhtymä OY, Orionintie 1, SF-02200 Esbo, FI
(72) Oppfinner Michael William Degregorio, Granite Bay, CA, US
Kauko Oiva Antero Kurkela, Esbo, FI
(74) Fullmektig Onsagers AS, 0103 Oslo

(54) Benevnelse **Transdermalt preparat som omfatter som aktiv bestanddel toremifen eller en av dens metabolitter, preparatet til bruk ved behandling og anvendelse av den aktive bestanddel til fremstilling av et transdermalt preparat**

(56) Anførte publikasjoner EP B1 95875, US 4990538

(57) Sammendrag

Topiske preparater inneholdende som aktiv bestanddel toremifen eller en av dets metabolitter N-demetyltoremifen eller 4-hydroksytoremifen eller deres farmasøytisk aksep-table ikke-toksiske salter er anvendelige for behandling av kreft lokalisert i huden eller i en kort avstand fra huden, som f.eks. metastatiske lesjoner ved brystkreft. De kan også anvendes ved hjelpemiddelterapi av brystkreft og ved reversering av mulitmedikamentresistens av kreft-celler mot cytotoksiske medikamenter. Slike lokal-preparater er av særlig interesse ved behandling av melanom, lymfom, Kaposis sarkom og mycosis fungoides.

Denne oppfinnelse vedrører lokalpreparater inneholdende som aktiv bestanddel toremifen eller en av dens metabolitter N-demetyltoremifen (4-kloro-1,2-difenyl-[4-[2-(N-metylamino)-etoksy]fenyl]-1-buten eller 4-hydroksytoremifen [4-klor-1-(4-hydroksyfenyl)-2-fenyl-1-[4-[2-(N,N-dimetylamino)etoksy]-fenyl]-1-buten) eller deres farmasøytiske akseptable ikke-toksiske salter. Anvendelsen av slike lokalpreparater f.eks. for behandling av kreft lokalisert i huden eller i kort avstand fra huden, som f.eks. metastaselesjoner ved brystkreft er også innenfor rammen av denne oppfinnelse. Dessuten er anvendelse av disse lokalpreparater for hjelpeterapi ved brystkreft samt deres anvendelse for reversering av multimedikamentresistens av cancerceller mot cytotoksiske medikamenter også innenfor rammen av denne oppfinnelse. Lokaladministrering av toremifen eller dens metabolitter er av særlig interesse ved behandling av melanom, lymfom, Kaposis sarkom og mycosis fungoides. Oppfinnelsen angår også anvendelse av toremifen eller dens ovennevnte metabolitter til fremstilling av et transdermalt preparat.

Tamoksifen og toremifen er trifenyletylenantiøstrogener som anvendes ved behandling av østrogenreseptorpositiv brystkreft. Disse medikamenter er de hyppigst foreskrevne som endokrint middel for behandling av brystkreft. Tamoksifen og toremifen inhiberer østrogenindusert vekst ved konkurrerende antagonisme av tumorøstrogenreseptorer (ER). Antiøstrogenterapi er effektiv til å forlenge en sykdomsfri tilstand og generell overleving for kvinner etter primær kirurgi. Antiøstrogenterapi forsinker tilbakefall og forlenger overleving hos pasienter med primær brystkreft som undergår hjelpeterapi etter mastektomi. Ca to tredjedeler av pasienter med østrogenreseptor (ER) positiv metastatisk brystkreft vil ha en temporær bedring på tamoksifen. Selv om tamoksifen blir betraktet som et relativt godartet medikament antyder nytt bevismateriale at kvinner som får tamoksifen som hjelpeterapi kan ha økt risiko for utvikling av endometriale neoplasmer (Fornander T. et al, Lancet 1989, 21:117-120). Histopatologi identifiserer disse tumorer som infiltrerende endometriale tumorer uten relasjon til brysttumormetastase. De faktorer som bidrar til denne økede risiko er ikke vel forstått. Flere studier har imidlertid forbundet endometrial cancer til midler med østrogenaktivitet (Smith Dc et al, Northern England J. Med. 1975; 293: 1164-67).

Utviklingen av multimedikamentresistens (MDR: Multi Drug Resistance) er en av hovedmekanismene hvorved cancer blir motstandsdyktig mot kjemoterapeutiske midler, særlig antracykliner og vinkaalkaloidene. Klassisk MDR henger sammen med overekspresjon av et MDR-1-gen som koder for et plasmamembran P-glykoprotein (p170). Ekspresjonen av MDR-1-genet blir antatt å henge sammen med en nedsatt cellulær akkumulering av medikament pga. en aktiv avhengig utstrømmingsmekanisme.

Selv om mange midler innbefattet verapamil, trifluoperitinene, og cyklosporinene er blitt vist å reversere multimedikamentresistens in vitro, vil de fleste midler ikke oppnå tilstrekkelig høy in vivo konsentrasjon til å reversere uten betydelig toksisitet for pasienten. Dette er særlig viktig for verapamil som er forbundet med signifikant kardiotoksisitet.

De ikke-steroidale trifenyletylenantiøstrogener har demonstrert in vitro kjemosensibiliserende aktivitet tilsynelatende uten relasjon til sine antiøstrogeneffekter. Toremifen og dens metabolitter N-demetyltoremifen og 4-hydroksytoremifen er eksempler på nye trifenyletylener som har kjemosensibiliserende aktivitet i MDR-positive celler ved konsentrasjoner som oppnås hos mennesker uten signifikant toksisitet. Toremifen synes å være unik ved at konsentrasjoner som reverserer resistensen in vitro (5 μM) kan oppnås in vivo etter oral terapi uten betydelig toksisitet (Wiebe VJ et al, Cancer Chemoter Pharmacol, 1990, 25: 247-251). Plasmakonsentrasjoner av toremifen og N-demetyl-toremifen etter store orale doser er av størrelsesorden 10 μM. Plasmakonsentrasjoner kan imidlertid ikke reflektere den effektive anti-MDR-aktivitet på tumornivå. Selv om den systemiske toksisitet ved høye doser av toremifen (400 mg/dag) vanligvis er begrenset til svimmelhet, kvalme og hetetokter, kan kombinasjonsterapi med andre cytotoksiske midler forandre den systemiske toksisitetsprofil.

Metoder til å øke tumorkonsentrasjonen av toremifen eller dens metabolitter og som samtidig minimaliserer systemisk eksponering, kan derfor forbedre effektiviteten av anti-MDR-terapi med disse medikamenter.

Det er derfor hensikten å tilveiebringe slike metoder som forbedrer anti-MDR-terapien. Denne hensikt er oppnådd med foreliggende oppfinnelse kjennetegnet ved det som fremgår av de vedlagte krav.

Det er nå blitt funnet at lokaladministrering av toremifen og dens metabolitter kan anvendes for å oppnå svært høye lokale tumorkonsentrasjoner uten risiko for systemisk toksisitet. Slike lokalpreparater av toremifen og dens metabolitter er anvendelige ved behandling av kreft lokalisert i huden eller i kort avstand fra huden, slik som melanom, lymfom, Kaposis sarkom, mycosis fungoides og lokaliserte metastatiske lesjoner ved brystkreft. Dessuten kan lokaladministrering føre til en effektiv fremgangsmåte til å forhindre tilbakefall av brystkreft hos høyrisikopasienter og samtidig minimalisere risikoen for endometriale tumorer og systemisk toksisitet.

Transdermal administrering av toremifen og dens metabolitter kan gjennomføres hovedsakelig på to forskjellige måter: (i) ved å blande den terapeutisk aktive for-

bindelse eller dens ikke-toksiske farmasøytiske akseptable salt med egnede farmasøytiske bærere og eventuelt penetreringsforbedringsmidler under dannelse av salver, emulsjoner, lotioner, løsninger, kremer, geler eller lignende, hvor fortrinnsvis en mengde av nevnte preparat blir påført på et bestemt område av huden, eller (ii) ved å inkorporere den terapeutisk aktive substans i plasteret eller transdermale avgivelsessystemer ifølge kjent teknologi.

Eksempler på egnede eksipienter omfatter dem som er vel kjent i den farmasøytiske teknologi for fremstilling av lokalformuleringer som f.eks. DMSO, vegetabilske og animalske oljer, ikke-flyktige fettalkoholer, syrer, estere, f.eks. cetostearylalkohol og cetylalkohol; flyktige alkoholiske forbindelser, f.eks. etanol eller isopropanol; glykoler og glykoletere, polyetylenglykol, polypropylenglykol, glycerol og glyceroletere, cellulosederivater, f.eks. metylcellulose eller karboksymetylcellulose. Emulgeringsmidler, f.eks. sorbitanstearat eller polysorbat 60, og konserveringsmidler og penetreringsforbedringsmidler kjent i teknologien kan også inkluderes.

Oppløsningsegenskapene i vandige medier av toremifen og dens metabolitter kan forbedres signifikant ved kompleksering av medikamentsubstansen ved cyklodekstriner. Cyklodekstriner (inklusive alfa, beta og gamma cyklodekstriner og deres derivater) er alle cykliske oligomerer av glykose. Cyklodekstrinene kan danne inklusjonskomplekser med medikamenter, ved at medikamentmolekylet blir inkludert i de lipofilsøkende hulrom av cyklodekstrinmolekylet. Cyklodekstrinene vil derfor effektivt solubilisere lipofile medikamenter i vandige medier. Anvendelsen av cyklodekstriner på det farmasøytiske området er beskrevet f.eks. i Drug Development and Industrial Pharmacy, 17 (11), 1503-1549, 1991.

Doseområde for toremifen eller dens metabolitter for forebyggende/hjelpeterapi er av størrelsesorden 1-200 mg/dag/person hos mennesker avhengig av medikamentets biotilgjenelighet. Den foretrukne dose ville være nær til en hjelpemiddel oraldose på 60 mg/dag, eller en enkelt ukentlig dose på 300-500 mg/plaster. For høydose kort forløp toremifen (eller toremifenmetabolitt) antydes en dose på 400-1000 mg/dag; fortrinnsvis 500-600 mg/dag.

EKSPERIMENTER

Følgende utstrakte studier ble utført for å bekrefte den foreliggende oppfinnelse:

Eksperiment 1 beskriver vevsfordeling av toremifen og dens metabolitter etter kort forløp høy dose lokal vs intraperitoneal (IP) administrering til mus, samt vevsfordelining av antiøstrogene doser av toremifen og dens metabolitter etter enkeltdose lokal vs, IP-administrering.

Eksperiment 2 beskriver effektiviteten av toremifen og dens metabolitter etter lokal administrering for å forhindre brystkrefttumorvekst hos mus.

Eksperiment 3 beskriver effektiviteten av høy dose lokalt administrert toremifen til å øke doksorubisincytotoksisiteten i MDR-tumorer hos mus.

Eksperiment 4 beskriver effektiviteten av toremifen og dens metabolitter etter lokal administrering til å forhindre lymfomavekts hos bavian.

Eksperiment 5 beskriver vevsfordeling av toremifen etter lokal administrering i Monodelphis domestica og den cytostatiske effekt av toremifen i melanomcellelinjer.

I tegningene skal

Fig. 1 viser resultatene av kloningsstudier utført på tumorer skåret ut fra mus behandlet med lokal og intreperitonial toremifen,

Fig. 2 viser resultatene av kloningsstudier utført på tumorer skåret ut fra mus behandlet med og uten lokal toremifen,

Fig. 3a viser responsen observert i bavian høyre inguinale lymfom behandlet med lokal toremifen, og

Fig. 3b viser responsen observert i det ubehandlede venstre lymfom hos bavianen.

Eksperiment 1

Metoder:

Seksten atymiske nakne hunmus ble injisert med en 20-gauge nål subkutant med

5 X 10^6 MDA A-1-celler i det venstre skapulære området. Tumorene fikk vokse i tre uker før behandling.

For IP administrering ble toremifencitrat slemmet opp i jordnøttolje. Hver av de tre mus ble injisert IP ved anvendelse av en 18-gauge nål med 50 µl, under avgivelse av 1mg/dag i fem dager. Topisk toremifen ble administrert i en blanding av DMSO/ETOH/meylcellulose/vann (10:25:7:58) med en dose på 2,5 mg/dyr/dag i fem dager. Toremifencitrat ble først løst i DMSO og deretter fortynnet i blandingen av ETOH, metylcellulose og vann. Alle mus ble avlivet på den femte dag av behandlingen to timer etter sluttdosen. Blodprøver ble oppsamlet med kapillær pipette etter åpning av kar i akselhulen, og plassert i hepariniserte sentrifugerør. Hjerne, lever og uterus ble fjernet kirurgisk og plassert i adskilte rør.

Enkeltdose toremifen ble administrert IP som beskrevet ovenfor, eller topisk med DMSO/ETOH/metylcellulose/vann som fortynningsmiddel. Dosen av IP eller topisk toremifen var 500 µg. Vevsprøver ble oppsamlet som ovenfor.

Alle blodprøver ble sentrifugert ved 1000 g. Plasma ble oppsamlet, målt for volum og plassert i rene ekstraksjonsrør. Alle gjenværende vevsprøver ble veid, plassert i ekstraksjonsrør og tilsatt en intern standard, nafoksidin. Vevene ble inngående homogenisert før tilsetning av 6 ml ekstraksjonsvæske. Prøvene ble oppsamlet og tørket som beskrevet nedenfor. Før injisering på HPLC-kolonnen, ble hver prøve rekonstituert med 200 µl metanol. Alle prøver ble plassert i en kvartskuvette for UV-aktivering. Hjerneprøvene krevde filtrering med engangssprøytefiltere. Konsentrasjonene av toremifen ble beregnet for alle prøver basert på standardkurven.

Toremifen og dens metabolitter ble kvantifisert ved høytrykksvæskekromatografi (HPLC).

Resultater

Tabell 1 viser at lokalt behandlede tumorer hadde 150 ganger høyere konsentrasjoner av toremifen samtidig som de hadde en lavere serumkonsentrasjon på 2,5 ganger dosen ved intraperitonial administrering. Dette indikerte en klar farmakologisk fordel. Det var interessant at musene som fikk lokal toremifen hadde en-tidel av konsentrasjonene i uterus sammenlignet med dem som fikk IP toremifen. I leveren viste også de lokalt behandlede mus lavere toremifenkonsentrasjoner hvilket antydet mindre systemisk fordeling. Toremifenkonsentrasjonene i hjernevevet var ekvivalente.

Tabell 2 viser at de lokalt behandlede tumorer hadde større konsentrasjon av N-demetyltoremifen samtidig som de hadde en lavere serumkonsentrasjon. Dette viser at MDA A-1 tumorceller kan metabolisere toremifen. Det var i alt vesentlig ingen forskjell i konsentrasjonen i leveren mellom de intraperitonialt og lokalt behandlede tumorer. Hjernene og uteri fra de lokalt behandlede mus viste også lavere N-demetyltoremifenkonsentrasjon enn den IP behandlede gruppe.

Tabell 3 viser at de lokalt behandlede tumorer hadde høyere konsentrasjoner av trans 4-hydroksytoremifen enn dem behandlet IP. Denne metabolitt er den mest potente anitøstrogene metabolitt. Serumnivået i de lokalt behandlede tumorer var lavere, mens konsentrasjonene i hjernen var identiske.

Vi undersøkte også in vitro opptaket av toremifen i MCF-7 ER+ cellene ved effektive antiøstrogene medikamentdoser og sammenlignet disse studier med resultatene fra in vivo fordelingsstudiene beskrevet ovenfor. Etter 20 timers

inkubering med 6,6 μM toremifen, ble cellene vasket, telt, veid, og cellulære toremifenkonsentrasjoner ble målt ved HPLC. Konsentrasjonen av toremifen (μg/mg) er vist i tabell 4.

Ved sammenligning med toremifenkonsentrasjoner oppnådd i tumorer etter lokal og intraperitonial administrasjonsvei, ser man de største konsentrasjoner etter lokal administrering av toremifen. Lokal administrering resulterte i mer enn 7 ganger toremifenkonsentrasjonen funnet etter in vitro eksponering, og mer enn 150 ganger den som ble funnet etter intraperitonial injeksjon. Disse resultater antyder at konsentrasjonene av toremifen lett kan oppnås etter lokal administrering til subkutane tumorer, mens intraperitonial administrering var 1/20 av opptaksdata in vitro, og således antydet en ytterligere kinetisk fordel ved lokal terapi.

Tabell 5 viser toremifenkonsentrasjonene etter en enkelt dose av 500 μg IP vs 500 μg administrert lokalt. DMSO og metylcellulose ble anvendt som fortynningsmidler. Begge lokalt administrerte fremgangsmåter hadde lignende tumornivå sammenlignet med IP, men hadde mye lavere systemisk fordeling. Denne trende ble bemerket i både serum og uterus.

Diskusjon:

I dette eksperiment viste vi at toremifen lett undergår transdermal penetrering og oppnår svært høye tumorkonsentrasjoner samtidig som det begrenser systemisk eksponering. Det er interessant at selv om mer toremifen kunne avgis lokalt til tumorene, var serumkonsentrasjonene mye lavere hvilket indikerte en signifikant terapeutisk fordel for lokal avgivelse av toremifen. Dessuten var både de aktive N-demetyl- og 4-hydroksymetabolittene av toremifen tilstede i større konsentrasjoner i tumorvev etter lokal avigivelse enn IP, hvilket antyder at metabolismen til disse aktive metabolitter også kan foregå på vevsnivå i stedet for utelukkende i leveren.

Uterus og leveren har mye lavere toremifenkonsentrasjoner etter lokal avgivelse enn IP, hvilket gir ytterligere bevis for redusert systemisk eksponering med lokal terapi. Reduserte uterin eksponering kan være en signifikant klinisk fordel pga. den potensielle risiko for sekundære tumorer som skyldes antiøstrogenene. Etter forlenget hjelpemiddelbehandling med tamoksifen, er det rapportert endometrisk dysplasi, blødning, polyppdannelse og tumorer (Nuovo MA et al, Int J Gyn Pathol 1989; 8: 125-131). Tamoksifenmetabolitter (bisfenol og metabolitt E) etter tamoksifenterapi som er tilstede i livmorvev kan potensielt ha sammenheng med utvikling av sekundære uterine neoplasmer (Nuovo MA et al, Int J Gyn Pathol 1989; 21: 117-120). Lokal administrering av toremifen kan omgå potensiale for disse sideeffekter.

Eksperiment 2

Metoder:

I denne studie ble 12 mus transplantert med MCF-7 celler og fikk vokse inntil det ble påvist en liten tumor i alle mus (større enn 1 mm^3). På dette tidspunkt ble musene delt i tre grupper, hver på fire mus. En gruppe fikk fortynningsmiddelet alene (DMSO, 20 µl) lokalt, den andre gruppe fikk 500 µg av 4-OH-toremifen ved lokal administrering, og den tredje fikk 500 µg/dag av toremifen ved lokal administrering. Alle musene fikk den samme mengde fortynningsmiddel/dag (20 µl). Studien ble vurdert etter 15 dagers behandling.

Resultater:

Alle fire kontrollmus hadde utviklet tumorer (> 6 x 8 mm). I de andre grupper var det bare en mus i 4-OH-toremifengruppen som utviklet en liten tumor (< 2 x 1 mm). Dette eksperiment viser klart at lokal administrering av 4-OH-toremifen eller toremifen forhindret tumorvekst.

Diskusjon:

Dette eksperiment demonstrerer klart at hjelpemiddeldoser av lokalt administrert toremifen eller dens metabolitter kan forhindre brystcancertumorvekst i en in vivo musemodell. Dette resultat sammenkoblet med den kinetiske fordel av lokal administrering (eksperiment 1) antyder at lokal toremifen kan oppnå den ønskede antiøstrogene effekt uten systemisk fordeling.

Eksperiment 3

Metoder:

Toremifencitrat for lokal administrering ble løst i 1,0 ml dimetylsulfoksid (DMSO) hvilket resulterte i en løsning som avgir 2,5 mg toremifen/60 µl. Medikamentet ble påført dråpevis til hudoverflaten direkte og omkring tumoren. Hver dråpe fikk fordampe fullstendig. Denne behandling ble administrert en gang om dagen på samme tid i til sammen fem dager. Alle mus ble avlivet på den femte dag av behandlingen to timer etter sluttdosen. Tumorene ble oppsamlet sterilt og bearbeidet for klonogen analyse.

Etter toremifen administrering ble tumorene skåret ut, og en porsjon av hver tumor ble ekstrahert for HPLC-analyse. Den gjenværende del ble klonet etter 1 times eksponering for doksorubicin 1 µg/ml. Den prosentvise inhibering ble bestemt etter 14 dager, og plottet mot toremifenkonsentrasjonen i hver individuelle tumor.

Resultater:

Figur 1 viser resultatene av kloningsstudier gjennomført på tumorene skåret ut fra mus behandlet med lokal og intraperitonial toremifen. Som vist i diagrammet var det god korrelasjon mellom prosent inhibering og cellulær toremifenkonsentrasjon etter 14 dager (r=0,77). Dessuten oppnådde alle tre lokalt behandlede tumorer > 30 % inhibering, mens alle tre intraperitonialt behandlede tumorer hadde mindre enn 30 % inhibering.

Figur 2 viser resultatene av kloningsstudier gjennomført på tumorer skåret ut fra mus behandlet med og uten lokal toremifen. Den øvre kurve viser en tumor som er resistent mot doksorubicin i en mus ikke behandlet med toremifen. De nedre to kurver viser tumorer som ble behandlet med toremifen. Åpenbart synes toremifen å sensibilisere disse MDR MDA A-1 tumorer for doksorubicin.

Diskusjon:

Disse resultater antyder at jo høyere oppnåelige tumor toremifenkonsentrasjoner som kan sees med lokal toremifen in vivo, jo høyere vil den synergistiske effekt være til å reversere den ervervede medikamentresistens mot doksorubicin.

Eksperiment 4

Metoder

Topisk toremifenterapi av en 15 år gammel hunbavian med spontant ikke-Hodgkins lymfom ble evaluert. Forstørrede lymfeknuter med diametere på 1-2 cm var åpenbare i begge lyskene. Toremifen ble løst i en blanding av dimetylsulfoksid, etanol og metylcellulose. I løpet av et tidsrom på 8 dager ble til sammen 1,4 g toremifen påført primært på den høyre tumorregion. Etter 15 dager fra starten av lokalterapien ble det instituert oral behandling med 1 g toremifen på dagene 15, 17, 19 og 23, med en samlet dose på 4 g. På dag 25 etter starten av behandlingen ble topisk terapi av høyre lyske reinstituert under fortsettelse av den orale behandling. I løpet av dette tidsrom ble det administrert transdermarlt til sammen 1,4 g toremifen og 11 g oralt. Responsen på terapien ble bestemt ved måling av tumorenes størrelse på to perpendikluære dimensjoner.

Resultater

Responsen på terapien er gitt i fig. 3a og 3b. En klar respons ble observert i det behandlede høyre inguinale lymfom, mens det ubehandlede venstre lymfom økte i størrelse i løpet av den topiske behandlingsperiode. Under den orale toremifenterapi stabiliserte det venstre inguinale lymfom seg, mens det høyre inguinale lymfom begynte å vokse igjen. Følgelig ble topisk toremifenterapi reinstituert på denne tumor. I likhet med den opprinnelige respons på lokal terapi gikk lymfomet tilbake fra et tumorareale på 476 mm^2 til 24 mm^2.

Behandlingen av et regionalt T-celle lymfom hos en hunbavian viste at lokal toremifen kan frembringe en in vivo antitumorrespons.

Eksperiment 5

Metoder

Toremifen i form av toremifencitrat ble først løst i DMSO, hvoretter det ble tilsatt til 3 % metylcellulose i etanol til en sluttkonsentrasjon på 1 mg/ml.

Seks hanner av Monodelphis domestica ble gitt toremifen topisk i 5 dager. Dosen var 0,5 mg/dag i 3 dyr og 1 mg/dag i 3 dyr. Toremifen ble påført lokalt på barbert hud på et overflateareale av 1 cm^2 nederst på ryggen. På dag 5 ble dyrene avlivet, og konsentrasjonen av toremifen og dens metabolitter ble målt i plasma, hud, testikler, lever, øyer, hjerne og hjerte.

Tre humane melanomcellelinjer (TD 36, TD30A og SK-MEL-31) og tre eksperimentelle cellelinjer (TD 1.4, TD 7.2 og TD 8) avledet fra UVB-induserte

melanocytiske nevi i Monodelphis domestica ble dyrket in vitro for å bestemme de cytostatiske IC-50 verdier for toremifen. Den metastatiske melanomcellelinje, SK-MEL-31, ble fremskaffet fra American Type Culture Collection (Rockville, MD). To ytterligere humane cellelinjer ble avledet fra deler av kirurgisk utskårne overflatespredende melanomer med stor diameter. TD 1.4 ble utviklet fra et godartet melanom, mens TD 7.2 og TD 8 ble avledet fra melanocytiske hyperplasier. IC-50 verdier ble bestemt utifra semi-log diagrammer av prosent celleoverleving vs konsentrasjonen av toremifencitrat.

Resultater

De gjennomsnittlige plasma- og vevskonsentrasjoner av toremifen i 6 dyr etter topisk administrering av 0,5 og 1 mg/dag i 5 dager er gitt i tabell 6. Toremifenkonsentrasjonen i hud var mer enn 500 ganger sammenlignet med annet vev.

50 % vekstinhiberende konsentrasjoner (IC-50) av de humane og eksperimentelle cellelinjer for toremifen er vist i tabell 7. Den vekstinhiberende effekt av toremifen var svært lik i alle seks cellelinjer av melanocytisk opprinnelse. IC-50 verdiene var i et område fra 5,8-9,6 μM.

Diskusjon

I dette eksperiment viste vi at toremifen har en klar cytostatisk effekt på humane og eksperimentelle melanomatøse cellelinjer in vitro. Selv om det ble observert en cytostatisk effekt i alle cellelinjer, var de konsentrasjoner som var nødvendige for å frembringe denne effekt relativt høye. Topisk administrering av toremifen frembringer imidlertid hudkonsentrasjoner som er langt over disse in vitro konsentrasjoner, hvilket antyder at det kunne oppnås en klar cytostatisk effekt på kutant melanom in vivo.

Tabell 1. Toremifenkonsentrasjoner etter 5 dager av IP vs lokalbehandling med toremifen.

Vev	IP	Topisk	Topisk/IP
Tumor (µg/g)	7,08 (3,55 - 1,86)	1087,34 (23,47 1924,77)	153,58
Serum (µg/ml)	4,37 (0,1 - 12,79)	1,00 (0,46 - 1,84)	0,23
Hjerne (µg/g)	1,85 (1,17 - 2,20)	1,45 (1,29 - 1,61)	0,78
Livmor (µg/g)	29,97 (26,47 - 35,90)	2,94 (2,33 - 3,53)	0,10
Lever (µg/g)	14,25 (11,2 - 18,60)	4,21 (3,46 - 5,62)	0,30

Tabell 2. N-demetyltoremifenkonsentrasjoner etter IP vs lokal behandling.

Vev	IP	Topisk	Topisk/IP
Tumor (µg/g)	1,27 (0,88 - 1,74)	8,43 (1,15 - 13,86)	6,64
Serum (µg/ml)	0,18 (0,10 - 0,30)	0,08 (0,06 - 0,09)	0,44
Hjerne (µg/g)	0,49 (0,26 - 0,73)	0,29 (0,0 - 0,49)	0,59
Livmor (µg/g)	1,18 (1,02 - 1,51)	0,56 (0,38 - 0,76)	0,47

Lever (µg/g)	0,94 (0,92 - 0,98)	0,92 (0,80 - 1,10)	0,98

Tabell 3. Trans 4-hydroksytoremifenkonsentrasjoner etter IP vs topisk behandling.

Vev	IP	Topisk	Topiskl/IP
Tumor (µg/g)	0,88 (0,64 - 1,06)	2,33 (0,82 - 3,26)	2,65
Serum (µg/ml)	0,16 (0,12 - 0,20)	0,10 (0,04 - 0,17)	0,63
Hjerne (µg/g)	0,35 (0,22 - 0,43)	0,35 (0,31 - 0,40)	1,00
Livmor (µg/g)	0,83 (0,46 - 1,05)	0,70 (0,50 - 0,80)	0,84
Lever (µg/g)	0,60 (0,56 - 0,66)	0,98 (0,51 - 1,43)	1,63

Tabell 4. Sammenligning av cellekonsentrasjoner av toremifen etter in vitro eksponering, intraperitonialinjekson og topisk administrering.

Prøve	Administrasjonsmåte	Toremifenkonsentrasjon
In vitro (cellepelleter)	Direkte påføring	0,149 µg/mg
In vivo (tumor)	Intraperitonialinjeksjon	0,007 µg/mg
In vivo (tumor)	Topisk administrering	1,087 µg/mg

Konsentrasjonene er gjennomsnitt av tre bestemmelser.

Tabell 5. Toremifenkonsentrasjoner etter en enkelt dose IP vs topisk behandling med toremifen (500 µg) i DMSO eller metylcellulose.

Vev	IP	DMSO	MC	DMSO/IP	MC/IP
Tumor (µg/g)	2,57 1,64-4,46	4,65 3,41-6,96	1,80 0,95-3,10	1,81	0,70
Serum (µg/ml)	0,09 0,04-0,14	0,03 0,004-0,04	0,02 0,00-0,04	0,33	0,22
Livmor (µg/g)	23,60 13,58-40,17	0,92 0,66-1,35	1,10 0,64-1,92	0,04	0,05

Tabell 6. Gjennomsnittlig konsentrasjon av toremifen i plasma (nmol/ml) og forskjellige vev (nmol/g) etter topisk toremifenadministrering av 0,5 og 1 mg/dag i 5 dager i 6 Monodelphi domestica-hanner.

	0,5 mg/dag	1 mg/dag
Plasma	0	0
Hud	1296,40 ± 1003,93	1237,35 ± 768,90
Lever	1,07 ± 0,69	3,60 ± 2,23
Testikler	1,52 ± 2,13	0,52 ± 0,05
Hjerne	0,82 ± 0,99	0,82 ± 0,62
Øyne	0	0,17 ± 0,05
Hjerte	0	0,21 ± 0,16

Tabell 7. IC-50 verdier for de humane og eksperimentelle melanomcellelinjer for toremifen.

	Cellelinje	IC-50 (μM)
Humane	TD 36	5,8
	TD 30 A	7,7
	SD-MEL-31	8,1
Eksperimentelle	TD 8	7,7
	TD 1,4	9,3
	TD 7,2	9,6

PATENKRAV

1. Transdermalt preparat,
karakterisert ved at det omfatter som aktiv bestanddel toremifen eller en av dens metabolitter N-demetyltoremifen (4-klor-1,2-difenyl-[4-[2-(N-metylamino)etoksy]fenyl]-1-buten) eller 4-hydroksytoremifen(4-klor-1-(4-hydroksyfenyl)-2-fenyl-1-[4-[2-(N,N-dimetylamino)etoksy]fenyl]-1-buten) eller et farmasøytisk akseptabelt ikke-toksisk salt derav, sammen med en eller flere farmasøytisk akseptable eksipienter.

2. Preparat ifølge krav 1,
karakterisert ved at det er i form av en salve, emulsjon, lotion, løsning, gel eller krem.

3. Preparat ifølge krav 1,
karakterisert ved at preparatet er et transdermalt plasteravgivelsessystem.

4. Preparat ifølge krav 2 eller 3,
karakterisert ved at den aktive bestanddel er i form av et kompleks av cyklodekstrin eller et cyklodekstrinderivat.

5. Preparat ifølge hvilket som helst av kravene1-4,
karakterisert ved at den aktive bestanddel er toremifen eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

6. Transdermalt preparat til bruk ved behandling av brystkreft, melanom, lymfom, Kaposis sarkom, mycosis fungoides, i adjuvansterapi for brystkreft og til reversering av mulitmedikamentresistens av kreftceller mot cytotoksiske medikamenter,
karakterisert ved at det består av toremifen eller en av dens metabolitter N-demetyltoremifen (4-klor-1,2-difenyl-[4-[2-(N-metylamino)-etoksy]fenyl]-1-buten) eller 4-hydroksytoremifen(4-klor-1-(4-hydroksyfenyl)-2-fenyl-1-[4-[2-(N,N-dimetylamino)etoksy]fenyl]-1-buten) eller et farmasøytisk akseptabelt ikke-toksisk salt derav, sammen med en eller flere farmasøytisk akseptable eksipienter.

7. Anvendelse av toremifen eller en av dens metabolitter N-demetyltoremifen (4-klor-1,2-difenyl-[4-[2-(N-metylamino)etoksy]fenyl]-1-buten) eller 4-hydroksytoremifen(4-klor-1-(4-hydroksyfenyl)-2-fenyl-1-[4-[2-(N,N-dimetyl-amino)etoksy]fenyl]-1-buten) eller et farmasøytisk akseptabelt ikke-toksisk salt derav, sammen med en eller flere farmasøytisk akseptable eksipienter, til fremstilling av et transdermalt preparat ifølge krav 1-5 til behandling av brystkreft, melanom, lymfom, Kaposis sarkom, mycosis fungoides eller til å reversere multimedikamentresistensen av kreftceller mot et cytotoksisk medikament.

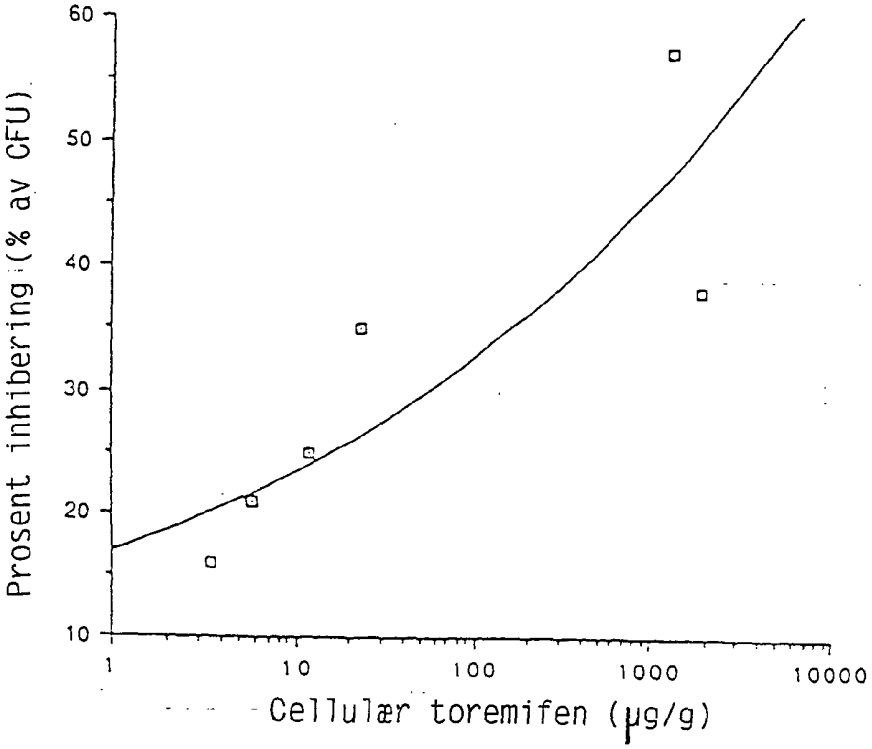
Prosent inhibering (% av CFU)
60
50
40
30
20
10
1
10
100
1000
10000
Cellulær toremifen (µg/g)

FIG. 1

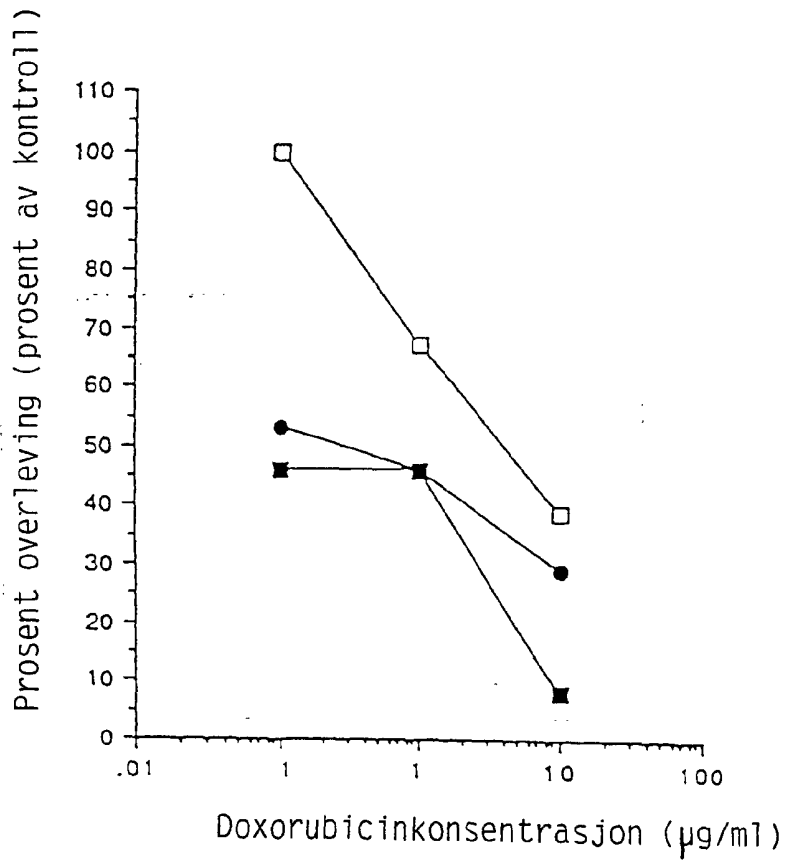
Prosent overleving (prosent av kontroll)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
.01
1
1
10
100
Doxorubicinkonsentrasjon (µg/ml)

FIG. 2

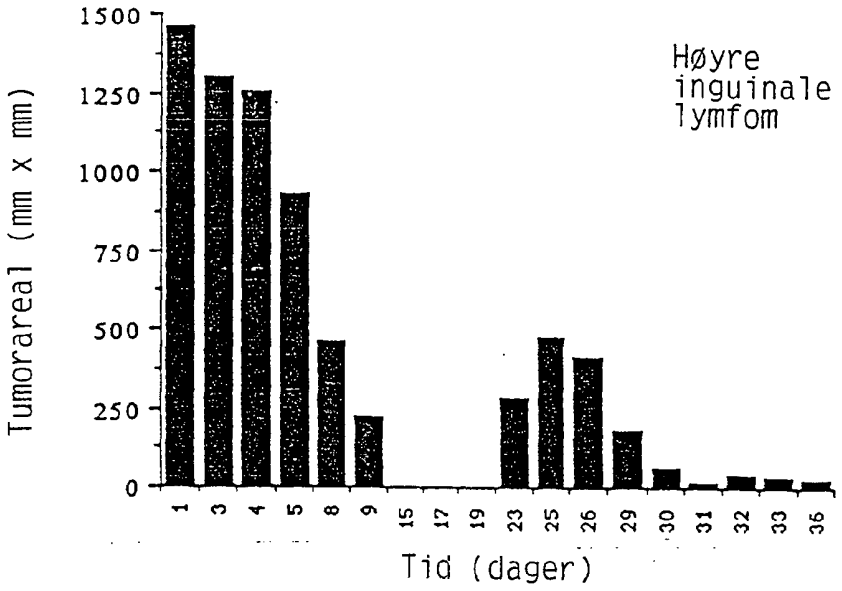
Tumorareal (mm x mm)
1500
1250
1000
750
500
250
0
1 3 4 5 8 9 15 17 19 23 25 26 29 30 31 32 33 36
Tid (dager)
Høyre
inguinale
lymfom

FIG. 3a

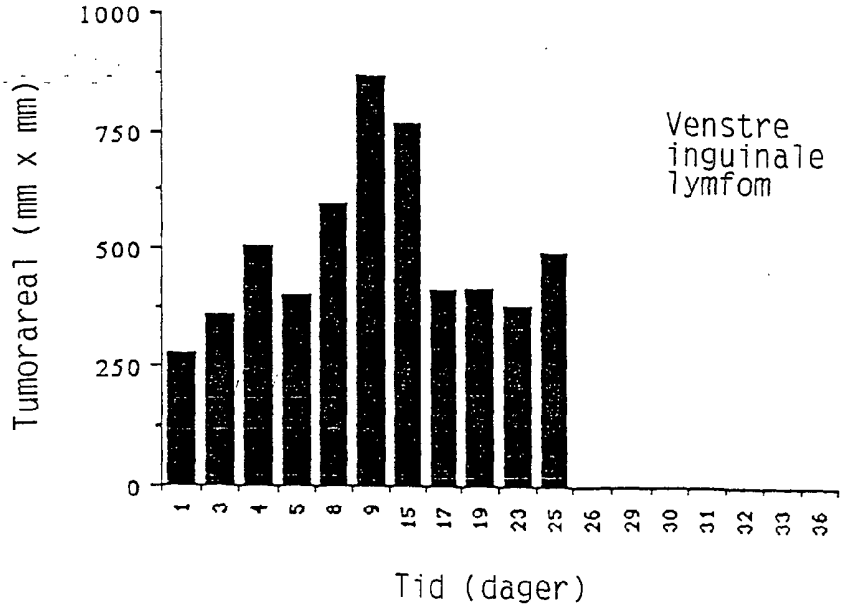
Tumorareal (mm x mm)
1000
750
500
250
0
1 3 4 5 8 9 15 17 19 23 25 26 29 30 31 32 33 36
Tid (dager)
Venstre
inguinale
lymfom

FIG. 3b