



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 33 942 T3** 2010.06.10

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 011 695 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 33 942.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/14625**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 933 345.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/003483**

(86) PCT-Anmeldetag: **15.07.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **28.01.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **22.03.2006**

(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: **04.11.2009**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.06.2010**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 35/00** (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61K 31/335 (2006.01)

A61K 31/165 (2006.01)

A61P 13/08 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

52580 P 15.07.1997 US

(73) Patentinhaber:

**The Regents of the University of Colorado,
Boulder, Col., US**

(74) Vertreter:

HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**SCHMIDT, A., Richard, Arvada, CO 80005, US;
KAULA, F., Norbert, Denver, CO 80262, US**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG EINER NEUROTOXINTHERAPIE ZUR BEHANDLUNG VON PROSTATAERKRANKUNGEN**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein die Behandlung von Prostataerkrankungen, z. B. gut-artiger Prostatahyperplasia (BPH) und Prostatitis. Diese wird durch Verabreichen einer Zusammensetzung erreicht, welche zumindest ein neurotoxisches Bestandteil umfasst, oder durch herkömmliche Therapien.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Viele medizinische Zustände in der Urologie haben ihren Ursprung in einer spastischen Dysfunktion der sakralen Reflexbögen. Beispiele solcher Zustände umfassen Beckenschmerzen (z. B. interstitielle Blasenentzündung, Endometriose, Prostatodynia, Harnröhreninstabilitätssyndrom), Myofaszialelemente des Beckens (z. B. Schließmuskelheber, Dysmenorrhoe, Analfistel, Hämorrhoiden), Harninkontinenz (z. B. instabile Blase, instabiler Schließmuskel), Prostataerkrankungen (z. B. BPH, Prostatitis, Prostatakrebs), wiederkehrende Infektion (zusätzlich zu einer spastischen Lähmung des Schließmuskels) und Harnretention (zusätzlich zu einer Schließmuskelspastik, Hypertrophie der Harnblasenverjüngung) und neurogene Blasendysfunktion (z. B. Parkinson, Verletzung des Rückenmarks, Schlaganfall, MS, Spasmusreflex).

[0003] Die Prostata ist eine teilweise drüsige und teilweise fibromuskuläre Drüse des männlichen Fortpflanzungssystems. Während des Alterungsprozesses neigt die Prostata dazu, sich zu vergrößern (Hypertrophie). Diese Prostatavergrößerung kann zu einer Harnröhrenblockierung und einer Funktionsstörung der Entleerung führen.

[0004] Die Prostatavergrößerung tritt häufig bei älteren Männern auf. Lytton u. a. (Lytton, B., Emery, J. M. und Harvard, B. M. (1973) 99: 639–645) schätzten, dass ein 45 Jahre alter Mann ein 10%iges Risiko für eine Prostataoperation im Alter von 70 hat. Der Volkszählungsbericht der USA schätzt, dass heute 30 Millionen Menschen über 65 Jahre alt sind. Dieser Anteil der Bevölkerung steigt die nächsten 30 Jahre voraussichtlich auf 50 Millionen. Deshalb wird auch die Anzahl der Männer mit Prostatavergrößerung ansteigen. Gemäß vorläufigen Berichten des National Kidney and Urologic Disease Advisory Board wurden im Jahr 1989 in den USA 425.000 Prostataresektionen durchgeführt. Auf der Grundlage der Schätzungen zum Bevölkerungswachstum wird die Anzahl der jährlich durchgeführten Prostataresektionen bis zum Jahr 2020 auf 800.000 pro Jahr ansteigen.

[0005] Die Harnröhre verläuft auf ihrem Weg zur äußeren Harnröhrenöffnung durch die Prostata (prosta-

tische Harnröhre). Die Prostata hat fünf unterschiedliche Lappen, die im Alter von 12 Wochen beim menschlichen Fötus sichtbar sind (Lowsley, O. S., Am. J. Anat. (1912) 13: 299–349). Auch wenn die Lappenabzweigung, die beim Fötus zu finden ist, in der vorpubertären Prostata nicht sichtbar ist, werden die lateral mittleren vorderen und hinteren Lappen verwendet, um die vergrößerte Prostata zu beschreiben.

[0006] Eine etwas neuere Erkenntnis ist, dass die Prostata auch aus mehreren morphologisch unterschiedlichen Zonen besteht (McNeal, J., Urol. Clin. North Am. (1990) 17(3): 477–486). Die Mehrheit des Drüsenvolumens besteht aus der Peripheriezone (ungefähr 70 bis 75%). Der Rest des Drüsenvolumens ist in die Zentralzone (ungefähr 20 bis 25%), die Übergangszone (ungefähr 5 bis 10%) und die die Harnröhre umgebende Drüsenzone (ungefähr 1%) unterteilt.

[0007] McNeal (1990) berichtete, dass BPH sich in der Übergangszone und der die Harnröhre umgebenden Drüsenzone entwickelt, BPH-Knötchen entwickeln sich entweder innerhalb oder unmittelbar angrenzend an die Schließmuskelzone vor der Prostata. Die Übergangszone ist ein kleiner Bereich in der Nähe der Harnröhre, eng verbunden mit dem proximalen Harnröhrenschließmuskel. Das Stroms der Übergangszone ist dicht und kompakt und ist ungewöhnlich anfällig für neurologisch bedingte Störungen der Wachstumssteuerung. Ihre Drüsen durchdringen den Schließmuskel, während die Muskelfasern des Schließmuskels das Übergangsstroms durchdringen. Die die Harnröhre umgebende Drüsenzone hat einen ähnlichen urogenen Hohlraum-Ursprung wie die Übergangszone.

[0008] BPH kann mit erhöhten Mengen an Stroms in Relation zum Epithel einhergehen (Bartsch, G. Muller, H. R., Oberholzer, M., Rohr, H., P., J. Urol. (1979) 122: 487–491). Ein erheblicher Anteil des Stroms ist glatter Muskel (McNeal, 1990), der vom Sympathikus gesteuert wird. Die Kontraktionseigenschaften dieses glatten Muskels könnten für die dynamische Komponente der Blockierung bei BPH verantwortlich sein (Bruschini, H. u. a. (1978), Invest. Urol. 15(4): 288–90; Lepor, H. (1990) Urol. Clin. North Am. 17(3): 651–658).

[0009] Zusätzlich zur Sympathikussteuerung des Prostatastroms ist die Prostata stark innerviert. Die Prostatanervenfasern treten von der hinteren lateralen Seite in die Prostata ein, mit einer Konzentration der Ganglien nahe des Schnittpunkts zwischen der Prostata und der Samenblasen (Maggi, C. A., Ausgabe 1993, Nervous control of the Urogenital System, Harwood Academic Publishers; Higgins, J. R. A. und Gosling, J. A. (1989) Prostate Suppl. 2: 5–16).

[0010] Acetylcholin (ACH), Neuropeptid Y (NPY),

vasoaktives Darmpeptid (VIP) und Noradrenalinfasern wurden in dieser Drüse beschrieben. Ein starkes Nervenengeflecht an ACH-positiven Nervenzellenkörpern ist mit sekretorischen Acini in allen Teilen der Drüse verbunden. Einige der ACH-Fasern enthalten auch NPY-Neuronen. VIP-enhaltende Neuronen wurden als mit ACH-enhaltenden Nervenzellenkörpern verbunden gefunden. Gelegentlich wurden Neuronen zwischen den ACH-verunreinigten Nervenfasern gefunden, was nahe legt, dass sowohl NPY als auch Noradrenalinneuronen glatten Muskel versorgen (Higgins, J. R. A. und Gosling, J. A. (1989) Prostate Suppl. 2: 5–16).

[0011] Autonome Nerven sind gleichmäßig zwischen der Zentral- und der Peripheriezone der Prostata verteilt (Higgins, J. R. A. und Goslin, J. A. (1989) Prostate Suppl. 2: 5–16). Die periphere Neuronensteuerung ist ähnlich. Zusätzlich gibt es keinen Unterschied in der Art der Nervenfasern, die als mit entweder den Epithel- oder Stromaelementen der Drüse verbunden gefunden wurden.

[0012] Die anatomischen Studien der Nervenfasersarten in der Prostata, verbunden mit anderen Studien der Innervierung des Prostatastroma (Brushing H., Schmidt, R. A., Tanagho, E. A. (1978), Invest. Urol 15(4): 288–290; Watanabe, H., Shima, M., Kojima, M., Ohe, H. L. (1989), Pharmacol. Res. 21 (Suppl 2): 85–94) legen nahe, dass die Cholin bedingte Innervierung das Epithelverhalten beeinflusst, während die Adrenalin bedingte Innervierung den Stromatonus (Erregbarkeit) beeinflusst. Diese Beobachtungen gaben Grund zur Anwendung von z. B. Alphablockern bei der Behandlung von BPH. Die Wirkungen der Alphablocker (Downie, J. W. und Bialik, G. J. (1988), J. Pharmacol. Exp. Ther. 246(1): 352–358) können auch zu Verbesserungen der Symptome von BPH beitragen, als Ergebnis einer Abdämpfung des Verhaltens dysfunktional gestreiften Schließmuskels durch die Alphablocker.

[0013] Studien haben ebenfalls gezeigt, dass es mehrere Tachykinine (z. B. Substanz P (SP), Calcitoninen-verwandte Peptide (CGRP), Neurokinin A, Bradykinin, und Nervenwachstumsfaktor (NGF)) gibt, welche den Tonus des glatten Muskels beeinflussen können (Hakanson u. a. (1987), Neuroscience 21(3): 943–950). Neurotransmitter-Rezeptoren wurden überall in der Prostata gemessen (z. B. NPY, VIP, SP, Leu-Enkephalin (L-enk), MetEnkephalin, 5-HT, Somatostatin, Acetylcholinesterase-positive Fasern (ACTH) und Dopamin-Beta-Hydroxylase (DBH) (Crowe, R., Chapple, C. R., Burnstock, G., The Human Prostate Gland: A Histochemical and Immunohistochemical Study of Neuropeptides, Serotonins, Dopamine beta-Hydroxylase and Acetylcholinesterase in Autonomic Nerves and Ganglia). Es liegen Schwankungen in der Rezeptordichte an verschiedenen Stellen der Prostata bei gutartiger Prostatahyperplasie.

[0014] Veränderungen beim elektrophysiologisch aufgezeichneten Zellverhalten und bei der Konzentration von Neuropeptiden innerhalb des Rückenmarks wurden als Nebenfolge eines mechanischen Abklemmens der Schwanzmuskeln einer Ratte, von Katheterstimulation der hinteren Harnröhre und Elektrostimulation eines Peripherienervs gezeigt. Dyssynergien zwischen dem Detrusor und dem Schließmuskel der Harnröhre ist ein deutlicher Befund bei Prostatodynia-Patienten. Es hat sich gezeigt, dass eine Denervierung der Prostata dramatische Veränderungen innerhalb des Prostata-Epithels verursacht. Somit gibt es einen Beweis, dass experimentell verursachte Veränderungen der neurologischen Einflüsse im Kreuzbein, im Rückenmark, der Blase oder der Harnröhre durch mechanische, elektrische, chemische oder thermische (Mikrowelle, Laser) Methoden erzeugt werden können, um einen Reizzustand zu verändern. Jedoch waren bisher keine Versuche bekannt, Neurotoxine für therapeutische Anwendungen zu nutzen.

[0015] Es gibt nur wenig Zusammenhang zwischen dem Grad der Prostatavergrößerung und der Schwere der Symptome. Während 80% der Männer im Alter von 70 eine BPH bei einer transrektalen Ultraschalluntersuchung aufweisen, wünschen nur 20% eine Operation (Coffey, D. S. und Walsh, P. C. (1990) Urol. Clin. North Am. 17(3): 461–475), die Behandlung nach Wahl für BPH (Fowler, F. J. Jr., Wennberg, J. E., Timothy, R. P. (1988) J. Amer. Med. Assoc. 259(20): 3022–3028). Die Symptome der Reizung können weit stärker sein als die Symptome, die aufgrund der Größe der Prostata zu erwarten sind. Die Symptome können sich nach einer chirurgischen Behandlung der BPH durch Verfahren wie eine transurethrale Resektion der Prostata (TURP) (Christensen, Aagaard, M. M. J., Madsen, P. O. (1990) Uroff. Clin. North Am. 17(3): 621–629), eine Erweiterung mittels Ballon (Dowd, J. B. und Smith, J. J. III (1990) Urol. Clin. North Am. 17(3): 671–677) oder Prostata-Hyperthermie (Baert, L., Ameye, F., Willemen, P. u. a. (1990) J. Urol. 144: 1383–1386) verbessern. Jedoch bleiben die Symptome bei 15% aller BPH-Patienten bestehen (Beart, L., Ameye, F., Willemen, P., u. a. (1990) J. Urol. 144: 1383–1386); Wennberg, J. E., Mully, A. G., Hanley, D., Timothy, R. P., Fowler, F. J., Roos, R. P., Barry, M. J. u. a. (1988) J. Amer. Med. Assoc. 259: 3027–3030). Bis zu 25% der BPH-Patienten haben Zusatzbehandlungen in Langzeit-Folgestudien, was nahe legt, dass der chirurgische Ansatz die grundsätzlichen Mechanismen, die BPH erzeugen, d. h. den fehlerhaften neurologischen Einfluss (Steuermechanismus) auf die Integrität des unteren Harnapparats, nicht anspricht.

[0016] Die Notwendigkeit wiederholter Operationen, die Krankheitsziffer und die Sterblichkeit im Zusammenhang mit TURP und die Kosten der Chirurgie haben zur Entwicklung einiger nicht-chirurgischer An-

sätze geführt, wie z. B. die Androgenablation (McConnell, J. D. (1990) Urol. Clin. North Am. 17(3): 661–670) und die Verwendung der oben diskutierten Alphablocker, aber nur wenige medizinische oder chirurgische Behandlungen haben bisher eine Wiederherstellung des Entleerungsverhaltens zum Normalzustand (Fließrate von ungefähr 25 cm³/Sek. und Leervolumen von ungefähr 400 cm³) bewirkt.

[0017] Die vorliegende Erfindung nutzt Neurotoxin, welches ein Botulinumtoxin ist, um Prostatastörungen zu beheben. Zum Beispiel können solche Verfahren verwendet werden, um BPH und verwandte Zustände, wie Prostatitis zu behandeln. Die vorliegende Erfindung kann ebenfalls Auslöser für Veränderungen im zentralen Nervensystem durch nicht-chemische Verfahren einschließlich Biofeedback entfernen, oder durch chemische Verfahren, die BPH und andere urologische Zustände durch die Verabreichung von Substanzen behandeln, welche verschiedene neurologische Aktivitäten blockieren, wie z. B. ausgewählte Neurotoxine.

Ziele und Zusammenfassung der vorliegenden Erfindung

[0018] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Botulinumtoxins in einem Präparat einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung einer Prostatastörung bei einem Säugetier vorgesehen. Es ist bevorzugt, dass das Botulinumtoxin die synaptische Funktion blockiert. Eine solche Blockierung erzeugt eine selektive Denervierung und z. B. eine Verkümmern der Prostata und eine Umkehrung der Reizsymptome, die mit der Prostatavergrößerung einhergehen. In einem Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung verursacht das Neurotoxin eine Dysfunktion des präsynaptischen neuronalen Endes durch spezielle Bindung und Blockade der Acetylcholin-Freigabe an myoneuralen Schnittpunkten. Solch ein Neurotoxin kann z. B. Botulinumtoxin Typ A sein (Botox, Allergan).

[0019] Vorzugsweise ist das Neurotoxin sicher, sehr selektiv und einfach zu verabreichen, auch wenn es mit anderen Therapien kombiniert wird. Es ist außerdem kostengünstig und kann auf Patientenbasis angewandt werden. Andere nützliche Neurotoxine umfassen Capsaicin, Resiniferatoxin und α -Bungotoxin. Das Neurotoxin kann mit jeder beliebigen Einrichtung verabreicht werden. Eine bequeme und örtlich begrenzte Methode der Verabreichung ist die Injektion.

[0020] Eine therapeutisch wirksame Menge des Neurotoxins ist die Dosis, die ausreichend ist, um neuronale Aktivität für zumindest eine Woche zu blockieren, besser 1 Monat, am Besten ungefähr 6 bis 8 Monate oder länger. Die Dosierung kann einzeln oder kumulativ (Reihendosierung) sein und kann einfach durch den Fachmann auf dem Gebiet bestimmt wer-

den. Neurotoxin kann in Reihe verabreicht werden (d. h. einmal pro Monat, einmal alle sechs Monate), so dass die therapeutische Wirkung optimiert werden kann. Solch ein Dosierungszeitplan kann einfach von einem Fachmann auf dem Gebiet auf der Grundlage z. B. der Patientengröße und des zu behandelnden Zustandes bestimmt werden und hängt von vielen Faktoren ab, einschließlich des ausgewählten Neurotoxins, des zu behandelnden Zustands, des Grades der Reizung und anderer Variablen. Ein vorgeschlagener Behandlungsablauf für BPH ist 200 Einheiten alle drei Tage bis zu LD50 für Botox oder ungefähr 2500 Einheiten.

[0021] Die vorgenannten Behandlungsmethoden sollten insbesondere für die Langzeitkontrolle der Prostatastörungen nützlich sein, z. B. bei Symptomen der Prostatavergrößerung ohne die Notwendigkeit eines chirurgischen Eingriffs. Weiterhin bieten die Methoden der vorliegenden Erfindung eine Kontrolle der neurologisch-urologischen Störungen, z. B. BPH und verwandte Zustände, in einer sehr selektiven Weise, ohne die möglichen Nebenwirkungen und Behandlungsfehler, die mit den derzeitigen Behandlungsmodalitäten einhergehen.

Genaue Beschreibung des bevorzugten Ausführungsbeispiels

[0022] Ein Beispiel einer Prostatastörung, mit welcher sich die vorliegende Erfindung befasst, ist die Prostatavergrößerung.

[0023] Die Prostatavergrößerung, die gemäß den Methoden der vorliegenden Erfindung behandelt werden kann, kann eine beliebige Ursache haben. Die vorliegende Erfindung ist insbesondere geeignet für die Behandlung von Prostata-Hyperplasia, insbesondere gutartige Prostata-Hyperplasia. Die vorliegende Erfindung kann auch für die Behandlung der Vergrößerung der Prostata mit einer Entzündung (Prostatitis), insbesondere nicht-bakterielle Prostatitis, eingesetzt werden. Zusätzlich können die Methoden der vorliegenden Erfindung für die Behandlung von Prostatodynia und Prostatakrebs eingesetzt werden.

[0024] Ohne durch die Theorie gebunden zu sein, ist die Basis für die Behandlung der neurologisch-urologischen Zustände die Beseitigung oder Anpassung der Nervenbasis für die dysfunktionale Regulierung des betroffenen Gewebes. Zum Beispiel kann die Anpassung der Nervenbasis der Prostata Drüsen-Dysfunktion durch jedes beliebige, nicht-chirurgische Verfahren, das im Stand der Technik bekannt ist, erreicht werden. Solche Verfahren können z. B. Biofeedback, α -Blocker, pharmakologische Methoden und die Verwendung eines oder mehrerer Neurotoxine umfassen, um die synaptische Funktion in der betroffenen Drüse zu blockieren. Es ist bevor-

zugt, dass Neurotoxin eine lang anhaltende Blockierung der synaptischen Funktion verursacht, vorzugsweise länger als eine Woche, besser länger als ein Monat, am Besten sechs bis acht Monate oder länger. Solche Neurotoxine können z. B. Capsaicin, Resiniferatoxin, α -Bungotoxin, Terodotoxin und Botulinumtoxin umfassen. Botulinumtoxin ist ein gefordertes Neurotoxin gemäß der vorliegenden Erfindung, insbesondere Botulinumtoxin A, insbesondere Botox (Allergan).

[0025] Das Toxin kann in jeder beliebigen, pharmazeutisch akzeptablen Rezeptur in jeder pharmazeutisch akzeptablen Darreichungsform formuliert sein. Solche Darreichungsformen und Rezepturen umfassen Flüssigkeiten, Pulver, Cremes, Emulsionen, Pillen, Pastillen, Zäpfchen, Suspensionen, Lösungen und dergleichen. Das Toxin kann außerdem in jeder beliebigen, pharmazeutisch akzeptablen Darreichungsform, geliefert von jedem beliebigen Hersteller, verwendet werden.

[0026] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung ist das Neurotoxin Botulinumtoxin Typ A. Therapeutisch wirksame Mengen von Botulinumtoxin können alle Mengen oder Dosen unterhalb einer toxischen Dosis sein, z. B. weniger als ungefähr 3000 Einheiten/70 kg männlich, vorzugsweise zwischen 100 Einheiten/70 kg männlich bis 1200 Einheiten/70 kg. Die Dosierung kann als Einzeldosis oder als verteilte Dosis, z. B. verteilt über den Ablauf von 4 Wochen, verabreicht werden.

[0027] Die Neurotoxine der vorliegenden Erfindung können mit jeder beliebigen Einrichtung verabreicht werden. In dem bevorzugten Ausführungsbeispiel der Erfindung wird Botulinumtoxin durch Injektion verabreicht. Das Neurotoxin kann beispielsweise urethroskopisch in die Prostata mit 200 Einheiten bei Einzel- oder Reihendosierung einspritzt werden. Vorzugsweise wird das Neurotoxin alle drei Tage eingespritzt, bis ein therapeutischer Effekt erzielt wird oder bis ungefähr 2500 Einheiten erreicht sind.

[0028] Die folgenden Techniken werden in dieser Erfindung angewandt:

Gewebevorbereitung für Lichtmikroskopie

[0029] Gewebe werden in 6% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer fixiert, bei pH 7,2 für 24 Stunden, in abgestuftem Alkohol und Xylen dehydriert und in Paraffin eingebettet. Querschnitte werden geschnitten und mit passenden Färbemitteln, wie z. B. Hämatoxylin/Eosin, eingefärbt.

Gewebevorbereitung für Elektronenmikroskopie

[0030] Gewebe werden entnommen und in 2,5%

Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer fixiert, bei pH 7,2 für 1 Stunde bei 4°C, dann mit 0,1% Osmium-Tetroxid für eine Stunde bebrütet und in EPON eingebettet. Extrem dünne Querschnitte (80 nm) werden hergestellt und mit Bleicitrat/Uranylacetat eingefärbt und mit einem Elektronenmikroskop (Philips, Modell 201) untersucht.

Einfärbung für Apoptose

[0031] Das Gewebe wird wie oben beschrieben fixiert und eingebettet. Die Gewebe werden de-paraffiniert und reagieren mit Proteinase K (Boehringer). Sie werden weiterhin mit Peroxidase und TDT-Enzym behandelt und in einem Befeuchter bei 37°C für eine Stunde aufbewahrt. Die Querschnitte werden gewaschen und Anti-Digoxigenin-Peroxidase wird für 30 Minuten hinzugegeben, gefolgt von Einfärben mit Nickel-DAB (Di-Aminobenzen).

Immun-Gewebechemische Studien

[0032] Das Vorhandensein der Neuropeptide VIP, SP, NPY, L-Enk und Calcitonin-ge Verwandte Peptide (CGRP) sowie die Äußerung des Umwandlungs-Wachstumsfaktors beta (TGF-beta), des Umwandlungs-Wachstumsfaktors alpha (TGF-alpha), des Epidermal-Wachstumsfaktors (EGF) und des grundlegenden Fibroblast-Wachstumsfaktors (bFGF) werden in Prostatagewebe unter Verwendung geeigneter monoklonaler Antikörper bestimmt. Die Verwendung von Neurotoxinen führt zu einer Verkümmern der Prostata, was durch niedrigere Werte der Wachstumsfaktoren in dem behandelten Prostatagewebe reflektiert werden sollte.

[0033] Querschnitte werden über Nacht bei Raumtemperatur mit primären Antikörpern inkubiert, gefolgt von einer Immun-Einfärbung mit Avidin-Biotin-Peroxidase (Vectastain Elite ABC, Vector Labs, USA). Polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen die Neurotransmitter VIP, CGRP, SP, NPY und L-Enk (Peninsula Labs, USA) wird in diesen Rezepturen verwendet, mit Verdünnungen von 1:8000 bis 1:12000. Immunzytochemische Kontrollen bestehen aus dem Vor-Absorbieren des primären Antiserums mit geeigneten Antigenen, oder deren Substitution mit normalem Serum (Blasi, J., Chapman, E. R., Yamaskai, S., Binz, T., Niemann, H. und Jahre, R. (1993) The EMBO Journal 12: 4821–4828; Black, J. A. und Dolly, J. O. (1986) J. Cell Biol. 103: 535–544; Linial, M. (1995) Is. J. Med. Sci. 31: 591–595). Nach Befestigung auf Objektträgern werden die Querschnitte gegengefärbt mit Eosin, dehydriert und mit einem Deckglas bedeckt.

Westernblot-Analyse des Wachstumsfaktor-Ausdrucks

[0034] Behandelte und unbehandelte Prostatazel-

len-Homogenate werden auf den Ausdruck der Wachstumsfaktoren mittels Westernblot-Analyse untersucht. Zellenhomogenat-Protein wird mittels Elektrophorese auf SDS-PAGE (7%) getrennt, dann elektrophoretisch auf Nitrozellulosepapier über Nacht übertragen (Towbin, H. u. a. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. 76(9): 4350–4379). Das Nitrozellulosepapier wird für eine Stunde bei Raumtemperatur in 0,5%ige nichtfette Trockenmilch, aufgelöst in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung, eingeweicht, und weiterhin über Nacht bei 4°C in Blockierlösung eingeweicht (2% Rinderserum-Albumin in 10 mM Tris/0,15 M NaCl/0,1% Natriumsäure, pH-Wert 7,4). Die Nitrozellulosemembranen werden mit Antikörpern (IgG-Bruchteile von Anti-TGF-beta, Anti-TGF-alpha, Anti-EGF und Anti-bFGF), gereinigt mittels Protein A (1×10^6 cpm/ml) in einem Blockierpuffer für 1 Stunde inkubiert. Die Membran wird mit PBS, die Nonidet P-40 enthält, zwischen den Inkubationen gewaschen. X-O-mat AR2-Film (Kodak) wird auf der Membran bei -70°C belichtet und die Filme werden entwickelt, um den Ausdruck der Wachstumsfaktoren zu untersuchen.

Bestimmung der Ausdrücke c-fos und c-myc

[0035] Ausdrücke von c-fos und c-myc in behandeltem und unbehandeltem Prostatagewebe wird durch eine Northern-Blot-Analyse wie folgt bestimmt. Gewebe wird in einem Lysepuffer für 15 Sekunden, oder bis das Gewebe homogenisiert ist, homogenisiert. Natriumacetat wird hinzugefügt und die Lösung wird durch Umrühren vermischt. Eine gleiche Menge an wassergesättigtem Phenol wird hinzugefügt und durch Umkehrung gemischt, gefolgt von einer Zugabe von Chloroform/Isoamyl-Alkohol. Die Lösung wird 30 Sekunden lang stark verwirbelt und darf sich für 15 Minuten auf Eis setzen. Die Lösung wird 10 bis 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugierung wird die wässrige Phase sorgfältig angesaugt und in ein neues Polypropylenröhrchen gesetzt. Ein Volumen Isopropanol wird zugefügt und die Lösung wird durch Rühren vermischt. Die Lösung wird mindestens 60 Minuten in ein Gefriergerät mit -20°C gelegt, um RNA auszufällen. Nach der Ausfällung wird das Röhrchen 10 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand wird abgegossen, wodurch der RNA-Niederschlag übrig bleibt. Ein ml Ethanol wird zugefügt und das Röhrchen wird weitere 10 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase wird abgeschieden und der Niederschlag wird mit 100% Ethanol mittels Vortexen gewaschen. Der RNA-Niederschlag wird erneut in 0,4 ml Lysepuffer aufgelöst. Das RNA wird durch die Beigabe von 100% Ethanol und Inkubation bei -20°C im Gefriergerät für mindestens 60 Minuten ausgefällt. Die Lösung wird zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Die RNA-Konzentration wird durch Verdünnen von 5 µL der Probe in 995 µL DEPC-Wasser und Messen des Aufnahmeverhältnisses bei 260/280 nm bestimmt.

[0036] Die folgenden Beispiele werden im Wege beschreibender spezieller Ausführungsbeispiele vorge-tragen, ohne dass daran gedacht ist, den Umfang der Erfindung in irgendeiner Weise zu beschränken.

Beispiel 1

Denervierung der Prostata

[0037] Einseitige Denervierung der Prostata wird durch Entfernung der Beckenganglien, welche über der Prostata der Ratte liegen, durchgeführt. Dieser Ansatz erhält die Funktionsintegrität der Blase und der hinteren Harnröhre und beseitigt die Möglichkeit eines Artefakts, der durch starke Störungen des Blutflusses oder des Harnabgangs entsteht. Kontrolltiere werden Scheinoperationen unterzogen, ohne gleichzeitige Denervierung der Prostata. Nach der Denervierung dürfen sich die Tiere erholen und werden behalten, bevor die Prostata entnommen wird. Die Prostata wird konserviert, für die Lichtmikroskopie vorbereitet und histologisch untersucht. Die hauptsächlichsten Befunde sind (1) verringerte Epithelzellenhöhe, in erster Linie aufgrund einer Abnahme in der klaren supranuklearen Zone (aufgrund einer Verringerung der Menge und Größe der Apikalzisternen und des endoplasmatischen Reticulums); (2) bedeutende Veränderungen im Proteinausdruck bei, der SDS-Gelelektrophorese (das endoplasmatische Reticulum ist wichtig für die Proteinsynthese); (3) ein bescheidener Rückgang der Anzahl der sekretorischen Knötchen; (4) ein Anstieg der intrazellulären Vakuolen, der interzellulären Leerräume und eine Verringerung der Mikrozotten auf der Zelloberfläche; und (5) ein deutlicher Anstieg des Gehalts des Nervenwachstumsfaktors (NGF) ipsilateral zur Denervierung relativ zur Kontrollgruppe (188 ± 10 gegenüber 46 ± 20 gegenüber 29 ± 16 pg/g Feuchtgewebe (\pm SD)). NGF beeinflusst bekanntermaßen nur sympathische und sensorische Neuronen. N 15, sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Experimentalgruppe.

Beispiel 2

Wirkung einer Neurotoxininjektion auf eine normale Prostata: Rattenprostata

[0038] Ratten wurden nach dem Zufallsprinzip in drei Gruppen eingeordnet. Die erste Gruppe empfing eine einzelne Akutdosis Botulinumtoxin Typ A (Botox, Allergen) mit 5, 10 oder 15 Einheiten. Diese Tiere wurden eine Woche nach der Injektion getötet. Die zweite Gruppe empfing eine Reihe von 4 wöchentlichen Injektionen mit 5 Einheiten Botulinumtoxin und wurden nach 5 Wochen getötet. Kontrollratten empfangen Injektionen mit Kochsalzlösung. Injektionen wurden als einzelne oder Reiheninjektionen in den linken und/oder rechten Bauchlappen der Prostata durchgeführt. Es sei angemerkt, dass eine Injektion von Methylenblau in einen Lappen der Rattenprosta-

ta eine sofortige Diffusion in den gegenüberliegenden Lappen aufzeigte. Somit gab es eine Verbindung zwischen den Prostatalappen und deshalb konnte der gegenseitige Lappen nicht für eine tatsächliche Vergleichskontrolle verwendet werden.

[0039] Das Gewicht jedes Prostatabauchlappens, die aus gesunden Tieren entnommen wurden, betrug ca. 0,50 Gramm. Alle mit Toxin behandelten Tiere zeigten eine Schrumpfung des Prostatavolumens, zuerst in dem injizierten Lappen, und mit weiteren Injektionen eine Verringerung des Gesamtvolumens. Nach vier aufeinanderfolgenden Injektionen wog der linke Prostatalappen 0,12 bis 0,17 Gramm, während der rechte Lappen 0,10 bis 0,14 Gramm wog. Dies bedeutete eine Verringerung von mehr als zwei Drittel der ursprünglichen Größe.

Beispiel 3

Wirkung einer Neurotoxininjektion auf urologische Störungen: Daten beim Menschen

[0040] Drei Patienten mit hartnäckiger Entleerungsstörung wurden mit Injektionen mit Botulinumtoxin (Botox) wie folgt behandelt. Patient 1 war ein 47 Jahre alter Mann, der als Folge einer Verletzung am Halswirbel (Ebene C6-C7), die er 14 Monate vorher erlitten hatte, inkontinent war. Urodynamische Untersuchungen bei Präsentation zeigten eine Blasenkapazität von 30 cm³ und einen schwachen Schließmuskel (Spitzendruck der Harnröhre von 40 cm Wasser). Er war mit mehreren pharmakologischen Behandlungen nicht erfolgreich und überempfindlich gegenüber Penisklemmen/Kondomen.

[0041] Er erhielt vier Mal wöchentlich 200 Einheiten Botulinumtoxininjektionen in die Blasenverengung mit einer Gesamtdosis von 800 Einheiten. Nach den Injektionen hatte seine Blase eine Kapazität zwischen 300 und 400 cm³ mit Oxybutinin und 150 bis 200 cm³ ohne Oxybutinin. Der Spitzendruck der Blase war 200 cm Wasser vor der Injektion, verglichen mit einem Blasendruck nach der Injektion von 40 cm Wasser. Der Patient war mit einer Penisklemme nach der Behandlung mit Botulinumtoxin kontinent. Zusätzlich verbesserten sich Gehvermögen und Erektionen aufgrund der verringerten Blasenspastizität.

[0042] Patient 3 war ein 65 Jahre alter Mann mit behindernden Perinealschmerzen nach einer Strahlenbehandlung wegen Prostatakrebs. Eine medizinische Therapie war bei dem Patienten nicht erfolgreich. Er wurde mit einer 200 Einheiten-Injektion Botulinumtoxin in den äußeren Harnröhren-Schließmuskel behandelt. Der Patient erfuhr eine dramatische Erleichterung der Hodenschmerzen und hatte erheblich weniger starke Schmerzen im Penis. Erektionen wurden nicht beeinflusst.

Beispiel 4

Bestimmung der kleinsten wirksamen Dosis

[0043] Ratten wurden mit einzelnen und Reihendosen von Botulinumtoxin (Botox) in die Prostatabauchlappen injiziert. Die Prostata wurden in verschiedenen Zeitintervallen „geerntet“ (entnommen), um die kleinste wirksame Dosis sowie die morphologischen und physiologischen Veränderungen, die mit der Zeit stattfinden, zu bestimmen. Die kleinste wirksame Dosis wird als die Dosis definiert, welche eine Abnahme des Prostatavolumens aufzeigt.

[0044] Um die Reaktion auf Elektrofildstimulation zu beurteilen, wurden Präparate zwischen zwei Platinelektroden, die in einem organischen Bad liegen, befestigt. Die Spannung der Präparate wird eingestellt. Eine Stimulation durch die Wandung der Nerven wird unter Verwendung eines Danted Neuro-matic 2000 Stimulators durchgeführt, der einzelne Rechteck-Wellenimpulse bei supramaximaler Spannung mit einer Dauer von 0,8 Millisekunden bei einer Frequenz von 0,5 bis 80 Hz liefert. Die Polarität der Elektroden wird nach jedem Impuls mittels einer Polaritätsänderungseinheit verändert. Die Länge einer Serie beträgt 5 Sekunden und das Intervall der Serie 120 Sekunden. Isometrische Spannung wird unter Verwendung eines Gould Thermofeld-8-Kanal-Recorders aufgezeichnet. Getrennte Experimente werden durchgeführt, um die Vorlastspannung, die optimale Reaktionen erzeugt, zu bestimmen. Zusätzlich wird die Wirkung der Elektrofildstimulation bei Vorhandensein unterschiedlicher Konzentrationen einzelner Neuropeptide bestimmt. Diese Neuropeptide sind 10–20 µM Adrenalin, 10 µM Clonidin, 5–50 mM Regitin, 10 nM–0,1 µM Acetylcholin, 1–3 µM Atropin, 1 nM–10 µM Nifedipin, 1–10 nN VIP und 1–250 nM NPY. Die Wirkung von Nitroprussid (eine Stickstoffoxid freisetzende Substanz) und Methylenblau (ein Guanylat-Zyklase-Inhibitor) auf den Prostata-tonus und die Kontraktion aufgrund der Feldstimulation wird in diesen Geweben ebenfalls untersucht.

Beispiel 5

Wirkung von Botulinumtoxin auf Prostatagewebe bei Ratten: Vergleich von hormonell intakten Ratten mit hormonell gestörten Ratten

[0045] Um zu bestimmen, ob es eine Wechselwirkung zwischen dem Neurotoxin und aus den Hoden stammenden Hormonen gibt, wurden Studien durchgeführt, welche die Wechselwirkung des Neurotoxins mit hormonellen Komponenten untersuchen. Diese Studien verglichen mit Botulinumtoxin behandeltes Prostatagewebe, entnommen von Ratten, die einer Orchiektomie unterzogen wurden (hormonarme Ratten), und Prostatagewebe von mit Botulinumtoxin behandelten Ratten, die keiner Orchiektomie unterzo-

gen wurden. 52 altersgleiche Ratten wurden wie nachfolgend beschrieben behandelt. Vier gesunde Ratten wurden einer Scheinoperation unterzogen, mit Einleitung einer Narkose, Freilegen der Prostata und Infektion von 0,2 cm³ Kochsalzlösung in den linken Bauchlappen der Prostata. Drei Ratten wurden einer bilateralen Orchiektomie ohne Injektion der Prostata unterzogen (Kontrolle des Hormonabbaus), fünf Ratten werden einer Orchiektomie und einer Injektion von 0,2 ml Kochsalzlösung in den linken Bauchlappen unterzogen (Kontrolle des Hormonabbaus und der Operationsbelastung). Vier Gruppen von Ratten erhalten nur Botulinusinjektionen mit 0,5, 1,0, 1,5 und 2,5 Einheiten (hormonell intakte Experimentratten). Sechzehn Ratten wurden einer bilateralen Orchiektomie unterzogen. Acht dieser Ratten werden mit einer einzelnen Injektion mit 2,5 Einheiten Botulinumtoxin in den linken Bauchlappen 5 Wochen nach der Operation behandelt. Alle Ratten wurden nach sechs Wochen getötet und die entnommene Prostata wurde zur Untersuchung wie oben beschrieben präpariert. Eine ähnliche atrophische Wirkung auf das drüsige Zellgewebe wird erwartet.

Beispiel 6

Wirkungen des Botulinumtoxins auf Patienten

[0046] Patienten, die unter gutartiger Prostatahyperplasia, nichtbakterieller Prostatitis oder Prostatodysdynia leiden, werden vor und nach der Behandlung mit Botulinumtoxin untersucht. Patienten können an dieser Studie teilnehmen, wenn sie im Alter zwischen 40 und 80 von BPH betroffen sind, oder wenn sie zwischen 25 und 60 Jahre alt sind und eine nichtbakterielle Prostatitis oder eine Prostatodysdynia diagnostiziert wurde. Bevorzugte Patienten sind solche, die keine guten Operationskandidaten sind. Patienten werden vor der Behandlung mittels Bestimmung der prostata-spezifischen Antigenniveaus (PSA), Evaluierung der urodynamischen Parameter (Zystometrogramm, Harnröhrendruckprofil und Durchflussrate), Bestimmung der Symptompunktzahl gemäß der American Urological Association (AUA) (Barry, M. J. u. a. (1992), J. Urol. 148: 1549–1557), Führung eines Entleerungstagebuchs und Untersuchung der Prostata durch transrektale Ultraschalluntersuchung mit Biopsie (nur bei BPH-Patienten) bewertet. Eine Woche, nachdem die anfängliche Evaluierung beendet ist, werden dem Patienten durch die Harnröhre 200 Einheiten Botulinumtoxin entweder als einzelne unilaterale Injektionen, aufeinanderfolgende unilaterale Injektionen oder bilaterale Injektionen injiziert. BPH-Patienten werden mit TURP behandelt oder werden einer Kontrolle mit TURP-Biopsie 7 Tage nach der Einzelinjektion oder 5 Wochen nach der Reiheninjektion unterzogen. Die entnommenen Prostatagewebe werden zur Untersuchung, wie in Beispielen 1, 2, 3 und 7 bis 10 beschrieben, präpariert. Die Patienten werden nach der Injektion erneut be-

wertet, unter Verwendung der gleichen Parameter wie während der anfänglichen Evaluierung.

[0047] Die vorstehende Beschreibung der Erfindung ist beispielhaft für Zwecke der Darstellung und Erläuterung. Es ist für Fachleute auf dem Gebiet ersichtlich, dass Veränderungen und Modifikationen möglich sind, ohne vom Umfang der Erfindung abzuweichen. Es ist beabsichtigt, dass die nachfolgenden Ansprüche so interpretiert werden, dass sie all diese Änderungen und Modifikationen einschließen.

Patentansprüche

1. Verwendung von Botulinumtoxin bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung einer Prostataerkrankung bei einem Säuger.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung zur Behandlung von Prostatahyperplasia dient.

3. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung zur Behandlung von gutartiger Prostata hyperplasia, Prostatitis, Prostodynia oder Prostatavergrößerung dient.

4. Verwendung gemäß Anspruch 3, wobei die Zusammensetzung zur Behandlung von gutartiger Prostata hyperplasia dient.

5. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung zur Behandlung von Prostatavergrößerung dient.

6. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung zur Behandlung von Prostatakrebs dient.

7. Verwendung gemäß mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Botulinumtoxin Botulinumtoxin vom Typ A ist.

8. Verwendung gemäß mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung eine injizierbare Zusammensetzung ist.

9. Verwendung gemäß Anspruch 8, wobei die Zusammensetzung zur Injektion in die Prostata eines menschlichen Mannes geeignet ist.

10. Verwendung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Zusammensetzung zu einer pharmazeutischen Zubereitung in Form einer Flüssigkeit, eines Pulvers, einer Creme, einer Emulsion, einer Pille, einer Pastille, eines Zäpfchens, einer Suspension oder einer Lösung zubereitet wird.

11. Verwendung gemäß Anspruch 10, wobei die

Zusammensetzung zu einer pharmazeutischen Zubereitung in Form eines Pulvers, einer Creme oder einer Emulsion zubereitet wird.

12. Verwendung gemäss Anspruch 10, wobei die Zusammensetzung zu einer injizierbaren, pharmazeutisch akzeptablen Zubereitung in Form einer Flüssigkeit, einer Emulsion, einer Suspension oder einer Lösung zubereitet wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen