

Cytotoksicitet og genetiske forandringer i kastrationsresistent human prostatacancer ved behandling med højdosis vitamin C infusioner

- et klinisk fase II studie

| | |
|---|----|
| Cytotoksicitet og genetiske forandringer i kastrationsresistent human prostatacancer ved behandling med højdosis vitamin C infusioner | 1 |
| 1. Projektoplysninger: | 2 |
| 1.2 Projektgruppen: | 3 |
| 2. Populærvidenskabelig beskrivelse: | 4 |
| 3. Videnskabelig protokol: | 5 |
| 3.1 Introduktion: | 5 |
| 3.2 Baggrund – vitamin C som middel mod cancer | 5 |
| 3.3 Vitamin C – egenskaber og virkning | 6 |
| 3.2.1 Genekspressionsændringer ved VC behandling | 8 |
| 3.2.2 Oxidativ DNA-skade | 8 |
| 3.3 Studier af vitamin c som middel mod cancer | 8 |
| 3.3.1 Epidemiologiske studier: | 8 |
| 3.3.2 Kliniske studier | 8 |
| 3.3.3 Cellestudier | 9 |
| 3.3.3.1 Cancercellestudier | 9 |
| 3.3.3.2 Prostatacancer – in vitro studier | 9 |
| 3.3.3.3 Dyremodeller | 9 |
| 3.3.3.4 Metaanalyse | 9 |
| 4. Arbejdshypotese | 10 |
| 4.1 Rationale for de valgte metoder | 10 |
| 4.2 Rationale for tilvalgte studier | 10 |
| 5. Metode og materiale: | 11 |
| 5.1 Design: | 11 |
| 5.2 Effektmåling: | 11 |
| 5.3 Dosiskrav til Investigational medical product (IMP) | 13 |
| 5.4 Baseline parametre: | 14 |
| 6. Behandlingsprotokol: | 14 |
| 6.1 Behandling: | 14 |
| 6.2 Materiale | 15 |
| 6.2.1 Rekruttering: | 15 |
| 6.2.2 Registrerede data: | 16 |
| 6.2.3 Biobank | 17 |
| 6.3 Inklusionskriterier: | 17 |
| 6.4 Eksklusionskriterier: | 18 |
| 6.5 Forsøgspersonernes tidsforbrug i studiet: | 18 |
| 7. Targets: | 19 |
| 8. Sikkerhed | 19 |
| 8.1 Vitamin C (IMP) infusioner: | 19 |
| 8.2 Prostatabiopsier: | 21 |

| | |
|---|----|
| 8.3 Radionucleotid knoglescintigrafi: | 21 |
| 8.4 Forsikring: | 22 |
| 8.5 Forsinket henvisning til kemoterapi:..... | 22 |
| 8.6 Procedurer for uønskede og alvorlige uønskede hændelser:..... | 22 |
| 8.7 Rapportering af bivirkninger og hændelser | 23 |
| 8.7.1 Afslutning af forsøget før tid: | 23 |
| 8.8 Suspected unexpected adverse reaction (SUSAR)..... | 23 |
| 9. Investigational medical product (IMP): | 24 |
| 10. Effektmål og beskrivelse af anvendte metoder | 25 |
| 10.1 PSA, knoglemarkører og andre venøse blodprøver | 25 |
| 10.1.1 YKL-40 og CRP..... | 25 |
| 10.2 Radionucleotid knoglescintigrafi (RBS):..... | 25 |
| 10.3 Klinisk observation: | 26 |
| 10.4 Urinanalyse for oxidative DNA-skade:..... | 26 |
| 10.5 Overlevelsesanalyse og statistiske metoder: | 26 |
| 10.5.1 Styrkeberegning for detektering af PSA-ændringer: | 26 |
| 10.5.2 Styrkeberegning til detektering af ændringer i knoglemetastasebyrde..... | 27 |
| 10.5.3 Styrkeberegning til detektering af ændringer i knoglemarkører:..... | 27 |
| 10.5.4 Styrkeberegning vedrørende microarray analyse..... | 27 |
| 10.6 Vitamin C farmakokinetik: | 28 |
| 10.7 Micro array genekspressionsanalyse:..... | 28 |
| 10.7.2 Genekspressionsanalyse fra lymfocytter..... | 28 |
| 10.8 Histopathologi:..... | 29 |
| 10.9 Laser Capture Microdissection: | 29 |
| 11. Source data management – CRF listing | 29 |
| 12. Ethiske overvejelser: | 29 |
| 13. Ressourcer | 30 |
| 14. Økonomi..... | 31 |
| 15. Tidsplan..... | 31 |
| 16. Registrering:..... | 32 |
| 17. Publikation og rettigheder:..... | 32 |
| 18. Interessekonflikter:..... | 32 |
| 19. Referencer | 33 |
| 20. Bilag..... | 39 |

1. Projektoplysninger:

Projekt startdato: 1. august 2007

Projektstitel (fuld): Evaluering af cytotoxicitet og genetiske ændringer ved højdosis Vitamin C infusioner i kastrationsresistent, metastaserende human prostatacancer

Projektstitel (kort) : C-vitamin til behandling af prostatakræft

Projektstitel (engelsk – fuld): Evaluation of cytotoxicity and genetic changes of high dose vitamin C infusions in castration resistant metastatic human prostate cancer.

Projektstitel (engelsk – kort): Vitamin C as an anti-cancer drug

Projektstatus (juli 2011)

Finansiering: Tilsagn fra Kirsten og Freddy Johansens Fond på 3.947.446 kr

Godkendelse, Regionale Videnskabsetiske Komite: Opnået pr 14. april 2009. Nr H-C-2009-018

Godkendelse, Lægemedelstyrelsen: Opnået 2. februar 2010, Nr 2612-3978

Starttilladelse GCP-enhed: Opnået 17. november 2010

EudraCT nummer: 2008-008692-33

Internt projektnummer: 2008-242

1.2 Projektgruppen:

Investigator og sponsor

Kári Mikines, overlæge, dr. med., Urologisk Afdeling H, Herlev Hospital, Danmark

Kontaktinformation:

Herlev Ringvej 75, DK-2730 Herlev Danmark

Tlf: +45 38683868 lokal 82092

e-mail: mikines@dadlnet.dk

co-investigatører:

Martin Højgaard, læge, Urologisk Afdeling H, Herlev Hospital, Danmark

Kontaktinformation:

Herlev Ringvej 75, DK-2730 Herlev Danmark

Tlf: +45 38683868 lokal 82042

e-mail: marhoj01@heh.regionh.dk

Torben Kjær Nielsen, læge, Urologisk Afdeling H, Herlev Hospital, Danmark

Kontaktinformation:

Herlev Ringvej 75, DK-2730 Herlev Danmark

Tlf: +45 38683868 - Direkte +45 38689821

e-mail: tokjni01@heh.regionh.dk

Jens Lykkesfeldt, Professor, dr. med, PhD, Afdeling for veterinær patobiologi, Biomedicinsk Fakultet, Københavns Universitet

Kontaktinformation:

Ridebanevej 9, bygning 1-62, 1870 Frederiksberg C, Danmark

Tlf.: +45 35333163

e-mail: jopl@life.ku.dk

Henrik E. Poulsen, Professor, overlæge, dr. med., Klinisk, farmakologisk afdeling, Rigshospitalet, Danmark

Kontaktinformation:

Tagensvej 20, 2200 København N, Danmark

Tlf: +45 35457671

e-mail: hepo@rh.dk

GCP-monitorering:

GCP Enheden v. Carsten Nielsen

Bispebjerg Hospital

Bispebjerg Bakke 23, bygn. 51, 3.sal

2400 København NV

Tlf.: +45 35313884

e-mail: carsten.nielsen@regionh.dk

Øvrige involverede afdelinger:

Klinisk Fysiologisk Afdeling Z
Herlev Hospital
Herlev Ringvej 75
2730 Herlev
Danmark

Klinisk Biokemisk Afdeling
Rigshospitalet
Blegdamsvej 9
2100 København Ø
Danmark

2. Populærvidenskabelig beskrivelse:

Kan c-vitamin-infusion forlænge livet for patienter med udbredt prostatakraft

Prostatakraft er den hyppigste kræftform (hudkræft undtaget) blandt mænd i USA, med ca. 30.000 nye tilfælde om året. I Danmark registreres ca. 3.000 nye tilfælde årligt. Ved udbredt sygdom uden mulighed for helbredelse, er standardbehandlingen kastration, enten medicinsk eller kirurgisk. Dette medfører en midlertidig bedring i sygdommen, ofte af 2-3 års varighed, hvorefter kræften igen blusser op. Sygdommen betegnes da som kastrationsrefraktær og er karakteriseret af betydelig sygdom og ultimativt død i løbet af 2-3 år.

C vitamin som kræftmiddel

I 1970'erne offentliggjordes adskillige studier, som hævdede at højdosis c vitaminbehandling givet som infusion direkte i blodet, forlængede livet for håbløst syge kræftpatienter op til 3 gange. Disse studier var kontroversielle og blev retteligt kritiseret for manglende lodtrækning mellem behandlede og ikke behandlede samt en række andre metodefejl. Efterfølgende blindede lodtrækningsstudier kunne ikke påvise nogen effect af c-vitaminbehandling til patienter med fremskreden kræftsygdom. Der var dog en væsentlig forskel på de to række af studier, da de oprindelige studier anvendte intravenøs c-vitaminbehandling og de senere studier benyttede tabletbehandling. En direkte sammenligning af de to studierækker er derfor ikke mulig.

C-vitamin givet som infusion i blodbanen som behandling anvendes i dag kun i privat regi, og har nogen popularitet blandt kræftpatienter både nationalt og internationalt.

Studier har vist, at i cellekulturer med almindelige celler og cancerceller, vokser cancercellerne betragteligt dårligere, hvis der tilsættes høje koncentrationer af c-vitamin. I 2008 offentliggjortes forsøg på mus, hvor indopererede kræftsvulster skrumpede efter indgift af c-vitamin koncentrat i dyrenes bughule. De anvendte koncentrationer af c-vitamin i celle- og dyreforsøgene, kan kun opnås i den menneskelige organisme vha. intravenøs indgift.

I USA er der i 2008 og 2009 planlagt de første regelrette studier af c-vitaminterapi til kræftpatienter.

Effekten af højdosis c-vitaminbehandling på kræftceller er endnu uafklaret, men voldsomt diskuteret og behandlingen er udbredt blandt alternativt orienterede læger. Virkningen af højdosis c-vitamin behandling er til dato ikke undersøgt i et prospektivt, kontrolleret studie på kræftpatienter udført efter nutidige standarder.

Formålet med dette studie er at undersøge effekten af behandlingen på patienter med udbredt og

kastrationsresistent prostatakraft. Studiet skal belyse c-vitamins indvirken på overlevelsen, sygeligheden, ændringer i arvematerialet og biokemiske markører.

Metode og materiale:

80 forsøgspersoner med kastrationsresistent prostatakraft indgår i studiet. Alle forsøgspersoner modtager 1 ugentlig infusion med c-vitamin i 12 uger. Forsøgspersonerne er deres egne kontroller mht. ændringer i biomarkører (PSA, bALP, PINP mv), arvemateriale og helbredstilstand. Som mål for behandlingens effekt anvendes den følsomme biomarkør PSA, ændringer i skelettets kræftmængde samt andre biokemiske markører. Væv og urin opsamles til analyse af ændringer i arvemateriale og måling af såkaldt oxidative skader på arvematerialet.

Konsekvenser af studiet:

Såfremt der kan påvises en gavnlig effekt af c-vitaminbehandling ved behandling af prostatakraft, vil dette fund kræve yderligere og store studier. Hvis det viser sig, at c-vitamininfusioner kan forlænge livet, vil det betyde en mindre revolution indenfor lindrende kræftbehandling, i det man så ville kunne tilbyde mange patienter en billig, bivirkningsfattig og let tilgængelig behandling. Informationerne fra vævs-, urin og blodprøver indsamlet i studiet vil give ny, unik viden om ændringer i kroppen og kræftceller i forbindelse med antioxidanter. Hvis der ikke findes nogen effekt af behandlingen, vil kræftpatienter og sundhedspersonale verden over kunne rådgives i deres valg af alternative terapier

3. Videnskabelig protokol:

3.1 Introduktion:

Prostatacancer (PCa) er den hyppigste, ikke-cutane cancer blandt mænd i USA med c. 300.000 nye tilfælde og 3.000 nye tilfælde i Danmark årligt(1). Risikofaktorer er familiær disposition, race, livsstil og kost, med animalsk fedtstof som mulig risikofaktor og bl.a. tomat som mulig beskyttelse mod PCa, men nogen generel risikomodel for sygdommens udvikling eksisterer ikke(2). Ved metastatisk sygdom er kurativ behandling ikke mulig. Her er hjørnestenen i behandling androgen ablation (AA), i form af medicinsk eller kirurgisk kastration, hvilket oftest medfører hurtig regression af canceren. Med tiden ophører effekten af kastrationen, og sygdommen progredierer med et oftest hurtigt forløb præget af morbiditet i form af symptomgivende knoglemetastaser og symptomer fra urinvejene. Dette stadie af sygdommen kaldes det kastrationsresistente (tidl. hormonrefraktære) stadie, med en median overlevelse på 6-18 måneder(3). Palliativ behandling med kemoterapi (docetaxel) har en lille livsforlængende og symptomlindrende effekt.(4). Ikke alle patienter kan, eller vil, modtage pallierende kemoterapi, og for mange patienter med kastrationsresistent (KR) PCa er den palliative behandling begrænset til analgetika, prednisolon og bisphosphonater.(5)

3.2 Baggrund – vitamin C som middel mod cancer

Brugen af antioxidanter og kosttilskud i cancerbehandlingen har altid været omdiskuteret. Fødeemner med højt indhold af anti-oxidanter er i nogle studier vist at have en vis cancerbeskyttende effekt (6), og lave niveauer af VC er blevet korreleret til øget risiko for ventrikelcancer(7). I en population på 7071 mænd og kvinder fandtes risikoen for cancerrelateret død

størst blandt individerne med VC-niveau i nederste kvartil. Om en kost rig på frugt og grønt har beskyttende effekt over PCa er delvist uafklaret, men tomater og tomatprodukter synes at yde nogen beskyttelse mod at udvikle PCa(8). Mænd, som indtog dagligt multivitamin og antioxidanttilskud, havde mindre PCa risiko i SU.VI.MAX undersøgelsen(9), mens der ikke fandtes nogen beskyttende effekt af VC mht. PCa-udvikling hos 29361 mænd med 8 års follow-up(10). Andre studier har heller ikke kunne finde en beskyttende effekt af VC i forhold til udvikling af VC(11), og i et prospektivt studie viste høje VC-niveauer ikke have nogen præventiv effekt på PCa-udvikling(12). Ikke desto mindre er VC særdeles populært som kosttilskud, og i en kohorte af amerikanske PCa-patienter, anvendte ca. 33% VC tilskud(13)

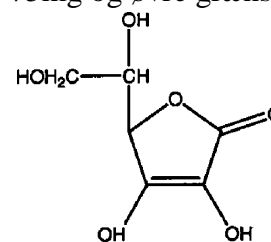
VC i megadoser (over 1g/dag) til patienter med dissemineret og terminal cancersygdom blev for alvor gjort populært af Cameron, Campbell(14) og Pauling et al., som hævdede at kunne forlænge livet 3 fold, ved behandling med VC intravenøst (10g/dag)(15). Studierne blev efterfølgende kritiseret for metodologiske fejl, herunder manglende randomisering, manglende blinding og retrospektive kontrolpatienter.(16) Efterfølgende randomiserede studier fra Mayo Clinic kunne ikke genfinde de forlængede overlevelsestider, ej heller nogen anden positiv effekt ved behandling med peroralt VC tilskud (10g/dag).(17;18).

På trods af manglende evidens for VC effekt på cancer, indtages VC af mange cancerpatienter som kosttilskud. Intravenøs behandling med VC som alternativ cancerbehandling tilbydes i ind- og udland af læger og klinikker i privat regi(19;20). Det anslås at 10.000 patienter i USA årligt modtager VC infusioner for varierende lidelser, herunder cancer(21), og i Danmark tilbydes behandlingen af mindst 6 klinikker(22).

3.3 Vitamin C – egenskaber og virkning

VC er en non-enzymatisk, hydrophil antioxidant og er det hyppigst indtagne kosttilskud i USA. VC kan ikke syntetiseres de novo i mennesket og må derfor indtages via fødeemner eller som kosttilskud. Den anbefalede daglige tilførsel (ADT) i de nordiske lande er 75mg og øvre grænse for indtag er sat til 1000mg/dag. (23)

VC har konstitutionsformlen $C_6H_8O_6$ og strukturen: Molvægten er 176,13g/mol. Vitamin C betegnes også 'ascorbin syre' og den reducerede form 'ascorbat'.



VC udøver sine mulige kemiske beskyttelse ved at beskytte DNA mod oxidativ skade fra frie radikaler og hindrer lipid peroxidation af cellemembraner(24;25). VC inducerer også øget aktivitet af NK-celler (26) og leucocytter(27).

Det fysiologiske niveau af ekstracellulært VC/ascorbat er $25\mu M$. Ved høje perorale doser, er den maksimale VC koncentration stramt reguleret med $80\mu M$ som øvre grænse, der kun nås i peaks. Steady state koncentrationer på ca. $70\mu M$ er opnået med VC-tilskud på mellem 500mg og 2500mg/dag, hvilket gav kortvarige peaks på $220\mu M$ ved maksimale perorale koncentrationer(28)

Ud over at fungere som antioxidant beskyttende mod mutationer, kan VC muligvis fungere som pro-oxidant in vivo og in vitro(29) med cytotoxiske egenskaber. Om VC fungerer som oxidant

eller reduktant afhænger af en række variable, herunder VC koncentrationen, katalytiske faktorer, reagenser og mikromiljøet(30)

Den potentielt cytotoxiske effekt af VC på cancerceller er ikke fuldt afdækket. Chen et al. har foreslået, at VC kan fungere som pro-drug for H_2O_2 dannelse i ekstracellulært væv med apoptose af cancerceller til følge, mens almindelige celler består. Det reducerede VC (ascorbat) kan oxideres til en semidehydroascorbat eller dehydroascorbat, som igen via enzymatisk reaktion kan konverteres tilbage til ascorbat. I denne proces dannes H_2O_2 som biprodukt i forbindelse med cyklussen(31) Sammenhængen mellem H_2O_2 og VC er også undersøgt af Riviere et al., som fandt, at Jurkatceller udsat for høje ascorbatkoncentrationer udviste øget H_2O_2 -induceret oxidativ DNA-skade (32). Dannelse af H_2O_2 fra VC-cyklussen er muligvis afhængig af tilstedeværelsen af ioner fra overgangsmetallerne, og i særdeleshed reagenserne til redoxprocesserne i cyklussen(33) eller alkalimetaller, hvorved der kan produceres H_2O_2 eller andre reaktive oxygen forbindelser(34). Øget H_2O_2 efter VC indgift er fundet i dyremodeller, hvor koncentrationer af VC på $150\mu M$ øgede H_2O_2 -mængden i tumorers extracellulærvæske, mens H_2O_2 forblev normal i blodet.(35)

Øget intracellulært H_2O_2 /reaktive oxygenforbindelser kan føre til øget membranlipid peroxidation, oxidativ DNA-skade og inducere apoptose. Dette er vist af Lee et al., hvor extracellulære VC-koncentrationer på 1,4-3,4mM (opnåelige ved peroralt VC-tilskud) inducerede øget aktivitet i bl.a. den hydroxid-afhængige lipid-peroxidation.(34). Den øgede H_2O_2 produktion ved indgift af VC ses ikke i blod eller normale celler pga. normal catalaseaktivitet, mens celler med ike-intakt catalaseaktivitet er mere følsomme for øgede H_2O_2 -koncentrationer. Catalase er et tetramerisk enzym, som katalyserer omdannelsen af H_2O_2 til H_2O og O_2 (36). Cancerceller udviser til katalasemangel, i modsætning til normale celler.

Hydrogenperoxid/catalasemodellen er kun påvist in vitro, og det er muligt, at evt. genereret H_2O_2 in vivo i tumorvæv alligevel ville blive omdannet til vand og ilt af allestedsnærværende catalase fra raskt omgivende væv. Intracellulære koncentrationer af H_2O_2 genereret af ascorbat-cykling er ikke blevet bestemt in vivo.

Cancerceller behandlet med VC har udvist nedsat thymidin-inkoopering i DNAet, en effekt som tilsætning af catalase ophæver, hvilket kunne indikere, at VC udøver en direkte DNA-medieret effekt på cancerceller eller en indirekte H_2O_2 -medieret effekt.(37)

Op til 30% af patienter med dissemineret cancer har biokemisk VC mangel(38) Nedsat VC kan være tegn på dårlig ernæringstilstand, men kan også afspejle et øget oxidativt stress med øget forbrug af antioxidant. Nedsat plasma-VC er fundet associeret med øget mængde leucocyter, thrombocyter og CRP – alle surrogatmarkører for oxidativt stress.

Det er muligt, at højdosis VC behandling kan inducere genekspressionsændringer i gener involveret i redoxprocesser med mulig øget apoptose til følge i cancerceller. Det angiogenese-inducerende HIF-system inhiberes af VC (39), og det er blevet foreslået, at VC kan inhibere transferrinreceptoren i visse cancerceller medførende nedsatte intracellulære jernkoncentrationer og efterfølgende apoptose(40;41). Der er til dato ikke udført nogen genekspressionsstudier in vivo på VC's effekt.

Mulige ændringer i redox-og prooxidativt associerede celleprocesser i relation til højdosis VC behandling kan undersøges vha. de nedennævnte metoder:

3.2.1 Genekspressionsændringer ved VC behandling

Vha. Affymetrix U133 Plus 2.0 GeneChip(R)

(<http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/hgu133plus.affx>), kan hele genomet i det udtagne væv undersøges på mRNA-niveau. Ved at sammenligne genekspressionen før og efter behandlingen med VC, kan kandidatgener og processer for redox- og prooxidative processer identificeres. Undersøgelsen kan udføres på homogeniserede biopsier eller selektivt på maligne celler vha. isolering med laserdissektion(42)

3.2.2 Oxidativ DNA-skade

Oxidativ DNA-skade er et meget hyppigt fænomen i cancer, og hypotetisk set burde højdosis VC behandling af cancer reducere denne beskadigelse. Ved at måle ændringer i 8-oxo-guanineniveauet i døgnurin før og under VC-behandling vha. HPLC (high power liquid chromatography) massespektrometry, kan det be- eller afkræftes om den oxidative skade ændres ved VC behandling.(43)

3.3 Studier af vitamin c som middel mod cancer

3.3.1 Epidemiologiske studier:

Epidemiologiske studier på den cancerpræventive effekt af VC har ikke kunne vise nogen korrelation mellem p-VC og PCa incidensen i adskillige prospektive kohorter(44;45)

3.3.2 Kliniske studier

Adskillige studier, som må betegnes som fase II studier uden regelrette kontroller, fandt at højdosis VC IV forlængede overlevelsen for terminale cancerpatienter op til 3 gange(15) og nedsatte morbiditeten.

IV VC har også været brugt som adjuverende behandling til kemoterapi, ud fra rationalet om, at anti oxidanter potentiører cytotoxiciteten af kemoterapeutika.(46). VC har været anvendt som adjuverende behandling til patienter med metastatisk ovariecancer, hvor ugentlige doser på op til 60g i over 40 uger tolereredes(47).

I et randomiseret studie, hvor der blev givet peroralt selen, Q10, vitamin E og VC, fandtes ingen påvirkning af PSA eller hormonniveauer hos patienter med med hormon naiv PCa(48)

I et prospektivt case studie, blev der til terminale cancerpatienter givet to ugentlige infusioner med VC og peroralt VC tilskud uden bivirkninger.(49). Manglende kontroller og meget kort behandlingsperiode, gør det svært at drage definitive konklusioner på dette studie. I et andet case studie rapporteredes om 3 cancerpatienter (B-cellelymfom, blærecancer og renalcellecarcinom), som modtog IV VC behandlinger på mellem 15 og 65g ugentligt i over 6 måneder. Der fandtes langtids remission for alle 3 patienter, om end alle patienter havde modtaget konventionel behandling, der kunne forklare denne remission.(50)

Bortset fra studierne i 1970'erne af Cameron et al., hvor der indgik ganske få ptt. med PCa, eksisterer der ikke nogen kliniske studier af IV VC's effekt på PCa, og generelt er studierne angående VC og human cancer præget af et lille materiale, manglende randomisering/blinding og få korrelerede undersøgelser.

3.3.3 Cellestudier

3.3.3.1 Cancercellestudier

Nekrose og apoptose er vist i neuroblastom og melanomceller udsat for VC i koncentrationer på 0,1-1,0mM ascorbat og samtidig øget aktivitet af semidehydroascorbarreduktasen(31). En række andre cancercellelinier har også udvist følsomhed overfor VC koncentrationer opnåelige in vivo ved IV administration. EC_{50} i cancerceller er nået med VC koncentrationer på 5mM, mens normale, humane celler var upåvirkede ved VC koncentrationer på op til 20mM. De nævnte koncentrationer ville kunne nås hos mennesker ved IV administration.(51)

3.3.3.2 Prostatacancer – in vitro studier

Den cytotoxiske effect af VC er undersøgt på de androgenfølsomme cellelinier DU-145 og PC-3, og celledød fandtes ved VC-koncentrationer på 2,45mM, og tilsætning af catalase eliminerede den cytotoxiske effekt(52). $CD50$ koncentrationer ved VC-behandling af andre urologiske cancercellelinier under lignede betingelser var i området fra 0,9mM til 6mM(53). Den androgenfølsomme LAPC-4 prostatacancercelle udviste nedsat proliferation og nedsat PSA-ekspression allerede ved 400 μ M VC, og ligeledes revertering af processen ved tilsætning af catalase.(54). PC-3, LNCaP og DU-145 prostatacancerceller udviste også nedsat vækst ved VC-koncentrationer i området 1-10mM i et catalasefrit medium(37;55).

Kombinationsbehandling med både vitamin E og C reducerede cellevækst og ekspressionen af oncogenet *survivin* i Alva-101 (knoglemetastase, PC-derivat) og DU-145 prostatacancerceller(56)

3.3.3.3 Dyremodeller

Generelle toksikologiske studier på pattedyr med manglende VC syntese (marsvin), har vist at doser på op til 500mg/kg/dag givet som bolus parenteralt ikke medfører bivirkninger eller organotoksicitet på kort sigt. Doser på 2,5g/kg/dag over en 6 dages periode gav ikke nogen mikro- eller makroskopisk organskade på marsvin(57).

Antitumoreffekten af VC på melanoma-xenograft på mus blev undersøgt allerede i 1980. Den observerede cytotoxiske effekt i denne model kan skyldes særlige forhold i melanomcellerne, hvor VC inducerer øget koncentration af intracellulært kobber med apoptose til følge.(58)

En kombination af re-transfektion med det mulige anti-oxidant regeneration tumorsuppressorgen 101F6 og VC behandling, nedsatte væksten af både lungecancerceller (H1299 og H322) in vitro såvel som i tumorstørrelse på muse-xenograftmodel.

Det nyeste studie i rækken fra 2008 har vist nedsat vækst og reduktion i tumorstørrelse på 41-53% i 3 forskellige xenograft tumorer (pancreascancer, ovariecancer og glioblastom) i athymiske hunmus. Musene blev behandlet med 4g/kg VC intraperitonealt uden bivirkninger.(35)

3.3.3.4 Metaanalyse

En nyere metaanalyse af VC og vitamin Es cancerforebyggende og helbredende effect konkluderede, at de to omtalte vitaminer ikke havde nogen effekt på en række forskellige cancersygdomme(59)

Årsager til divergerende resultater

Forskelle i maksimale plasma-VC koncentrationer afhænger af administrationsvejen. De forsøg, som har påvist cytotoxisk effekt af VC, er alle opnået i modeller med VC-koncentrationer, som kun kan nås ved IV administration. Den manglende anticancer effekt i studierne, hvor der undersøgte på perorale tilskuds effekt, kan skyldes, at Vc-koncentrationer i plasma og ekstracellulærvæske ikke er nået.

Forsøgsresultater opnået in vitro kan ikke nødvendigvis ekstrapoleres til in vivo omstændigheder, specielt må det forventes, at omsætningen af hydrogenperoxid in vivo fra det omkringliggende, raske væv, vil være større, end det observerede in vitro.

4. Arbejdshypotese

Primære arbejdshypotese (H_0 hypotese):

Ugentlige, højdosis vitamin C infusioner medfører ikke PSA-fald i kastrationsresistent, metastatisk, human prostatacancer.

Sekundære hypoteser:

Ugentlige, højdosis vitamin C infusioner har ikke indflydelse på overlevelsestid, performance, oxidativ DNA-skade og tumorbyrde i skelettet på kastrationsresistent, metastatisk, human prostatacancer.

4.1 Rationale for de valgte metoder

Evidensen for brug af IV, højdosis vitamin C til behandling af dissemineret cancersygdom er tvivlsom. Evidensen er baseret på en række kasuistiske studier og studier uden regelrette kontroller. Resultater opnået in vitro mht. apoptose, cytotoxicitet og pro-oxidativ effekt er kun reproduceret i meget få in vivo modeller og aldrig i et klinisk studie på et humant materiale. Det eneste randomiserede, kliniske studie fandt ikke nogen effekt, omend adækvate plasma-VC koncentrationer næppe opnåedes. I det aktuelle studie anvendes forsøgspersoner med samme type cancer i samme kliniske stadie. Selv om PCa besidder en vis heterogenicitet, giver designet rig mulighed for uniform monitorering af behandlingsresponsen ved at undersøge faktorer som overlevelse, standard biomarkører (PSA, basiske fosfataser) og eksperimentiel kvantificering af knoglescintigrafier.

Der anvendes et single arm – single center design til dette første studie, da antallet af nødvendige forsøgspersoner er relativt lavt i forhold til et randomiseret studie. Behandlingstiden på 12 uger tillader nok tid til at detektere et eventuelt behandlingsrespons. Den korte behandlingstid vil øge compliance og mindske antallet af drop-outs.

Senere, randomiserede fase III studier som multicenterstudier med langt flere forsøgspersoner, kan iværksættes med udgangspunkt i dette studie, såfremt der findes nogen gavnlig effekt af VC behandlingen.

4.2 Rationale for tilvalgte studier

Det anvendte design giver rig mulighed for at indsamle blodprøver under behandlingen og kan bidrage med værdifuld viden om VC-farmakokinetikken hos ældre cancerpatienter. Vævsprøverne bruges til at bestemme de genetiske ændringer i PCa ved udsættelse for antioxidanter, og de genetiske ændringer generelt i forbindelse med kastrationsresistent PCa.

5. Metode og materiale:

5.1 Design:

Fase II single arm klinisk studie, hvor alle forsøgspersoner modtager aktiv behandling (Vitamin C). Dette er et enkelt-center studie.

Alle forsøgspersoner skal modtage 12 ugers behandling med ugentlige infusioner af Vitamin C.

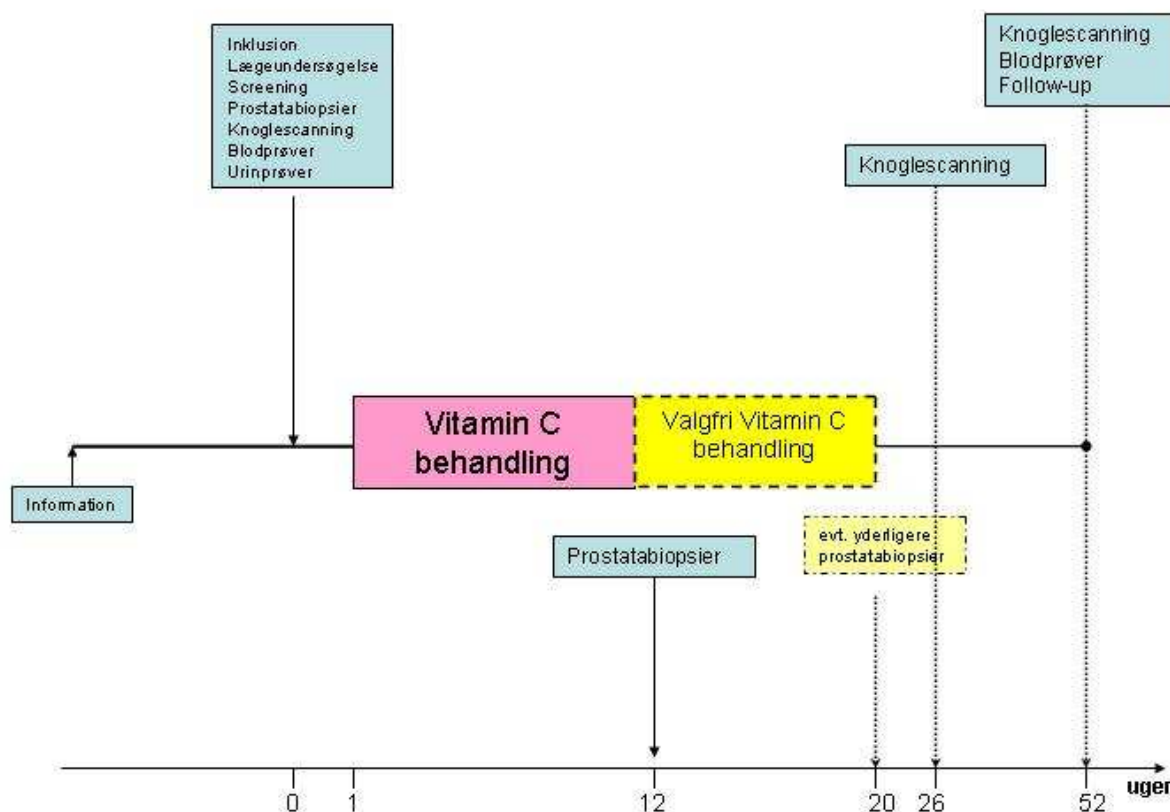
Efter de 12 ugers behandling, kan forsøgspersonerne vælge at fortsætte med behandlingen i yderligere 8 uger, såfremt følgende krav er opfyldt:

Mindst 50% reduktion i baseline PSA efter 12 uger

Ingen SAE

Har givet informeret samtykke til den resterende del af behandlingerne

Har givet informeret samtykke til de yderligere vævs- og blodprøver



Figur 1: Tidslinie og design af studiet, inkl. den valgfrie ekstra behandlingsperiode

5.2 Effektmåling:

Prostata-specifikt antigen:

Responset i løbet af behandlingsperioden følges via PSA. Plasma-PSA korrelerer med tumorbyrden i de fleste tilfælde af PCa, og guidelines fra National Cancer Institute anbefaler en 50% reduktion i PSA som mål for anti-tumor-effekt(60). PSA-reduktion i forbindelse med kemoterapi korrelerer med overlevelsestiden(61). I TAX-327-studiet er der påvist korrelation mellem PSA-respons

(mindst 50% reduktion i forhold til baseline), quality-of-life(QoL)-respons og smerterespons, i forbindelse med kemoterapibehandling af kastrationsresistent PCa(62). I et retrospektivt materiale kunne en 30% PSA-reduktion i et 2-arms kemoterapistudie anvendes som surrogatmål(63) PSA negative og neuroendokrint differentierede carcinomer udgør en lille andel af alle tilfælde af PCa og udviser ikke øgede PSA-niveauer(64;65), og følgelig inkluderes sådanne patienter ikke.

Radionucleotide knoglescintigrafi(RBS):

Sammenligning af ossøse metastasers udbredelse før og efter behandling, kan sammenlignes med flere metoder baseret på tolkningen af RBS(66).

Tilvækst af knoglemetastaser i tidligere randomiserede undersøgelser er fundet associeret med dårligere overlevelse ved behandling af kastration-resistent PCa(67). I hormon-naiv PCa er regression af knoglemetastasebyrden ved kastration også korreleret til overlevelsen(68).

TAX327-studiet viste også, at progression på knoglescintigrafi var en selvstændig risikofaktor for øget risiko for død.(4)

Kvantificeringsmetoderne til måling af progression af knoglemetastaser på knoglescintigrafien er multiple, og endnu er ingen af disse metoder testet som surrogatparameter for overlevelse.

Sygdomsudbredelsen kan kvantificeres vha. manuel vurdering og indplacering på en ordinalskala(69) eller udmåling af areal vha. computersoftware(68;70). Der planlægges i dette studie anvendelse af et eksperimentelt, neuralt netværksbaseret computersystem til opmåling og kvantificering af knoglemetastaserne(71). Denne computerbaserede beregning af knoglemetastasebyrden forventes at give en langt mere reproducerbar vurdering af knoglemetastasebyrden og ændringerne i denne over tid. Metoden er aktuelt underkastet et retrospektivt studie på et patientmateriale bestående af prostatacancerpatienter.

ECOG-performance score:

Et klinisk valideret, enkelt system til at vurdere forsøgspersonens almentilstand på en ordinalskala.(72)

EORCT-Score

Et klinisk valideret system til at vurdere forsøgspersonens selvrapporterede almentilstand og sygdomsspecifikke parametre på en ordinalskala.(73)

Oxidativ DNA-skade:

In vitro og xenograft studier på hormon-naive prostatacancer celler har vist, at produkter som følge af oxidativ DNA-skade (8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin (8-oxo-dG) cyclisk pyrimidopurinon N-1, N(2) malondialdehyde-2'-deoxyguanosin (M(1)dG) falder ved tilsætningen af antiandrogenet flutamid(74).

Studier på lungecancer i forbindelse med kemoterapi har vist, at nedsat oxidativ DNA-skade i forbindelse med behandling med cytotoxiske stoffer korreleres med tidligere progression i sygdommen.(75).

Peroralt indtag af Vitamin C synes ikke at have nogen indflydelse på niveauet af oxidativ DNA-skade hos raske, (76), mens oxidativ DNA-skade i relation til intravenøs vitamin C-behandling aldrig er blevet undersøgt.

Målingen af oxidativ DNA-skade tjener primært et eksplorativt formål. Muligvis vil en vurdering af den oxidative DNA-skade sammen med microarraystudier kunne afgøre om en eventuel cytotoxisk effekt af vitamin C på cancer celler skyldes pro-oxidative eller anti-oxidative virkningsmekanismer.

Cancerpatienter har ofte forhøjede markører for oxidativ DNA-skade(77), og med baggrund i ovenstående er det derfor relevant at afklare indflydelsen af højdosis antioxidant behandling til denne patientgruppe.

Basisk fosfatase:

Progression i niveauet af basisk fosfatase er en selvstændig risikofaktor for tidlig død ved behandling med taxotere. I en cox proportional hazards analyse af TAX327-patientmaterialet, steg HR med 1,39 for hver log (IU/L) stigning i basisk fosfatase. (4)

Knoglemarkører: bALP, PINP og NTX:

I eksplorativt øjemed måles en række knoglemarkører før, under og efter behandlingen, for at undersøge knogleabsorption og knogledannelse i behandlingsforløbet. Der er valgt 3 markører, som i studier har vist sig korrelerbare til metastasebyrde, performance og overlevelse.

Urin N-telopeptid (NTx) er en markør for osteoclastaktivitet, forbundet med nedsat overlevelse i kastrationsresistent PCa(78), mens knogle-specifik basisk fosfatase (bALP) er markør for osteoblastaktivitet, også med prædiktiv værdi for overlevelsen i kastrationsresistent PCa(79) og udbredelsen af skeletale metastaser bedømt på knoglescintigrafi (80).

Høje niveauer af Pro-collagen type-I N-Terminal Propeptid (PINP) er ligeledes fundet associeret til kortere overlevelse i et materiale på 106 patienter med kastrationsresistent PCa(81)

mRNA-ekspressionsændringer vha. microarrays:

Denne analysemetode tjener et eksplorativt formål. Der er ikke tidligere udført microarrayanalyser på højdosis antioxidant behandling af disseminerede cancere i et humant materiale, hvorfor microarrayanalysen ikke kan tjene som effektparameter for behandlingen.

5.3 Dosiskrav til Investigational medical product (IMP)

Investigational medical product er Vitamin C (ascorbinsyre)

For at opnå de påkrævede p-VC koncentrationer på 5-10mM, skal VC indgives intravenøst. En ugentlig infusion på 10g VC med en rate på 250mg/minut er fundet sikker i cancerpatienter(14). Farmakokinetiske data fra infusioner på 1,25g VC i raske forsøgspersoner gav p-VC koncentrationer på ca. 1,2mM. Disse data blev ekstrapoleret til, at en dosis på 10g VC IV skulle give p-VC på ca. 6mM. (82). Der er kun få studier på humant materiale, men kasuistisk har IV VC doser på 15-65g givet p-VC i området 5-15mM uden bivirkninger i patienten. Selv om nogle kasuistiske meddelelser og en del alternative behandlere brugere højere doser og hyppigere administration, må det formodes, at en ugentlig VC infusion på 60g bør give en reduktion i PSA og ændringer i sekundære effektparametre (knoglescintigrafi, genekspressionsanalyse, oxidativ DNA-skade), såfremt behandlingen har en cytotoxisk effekt.

Forsøgspersonerne skal modtage en ugentlig infusion med 60g vitamin c i 10 uger, forudgået af af en dosis-eskalering over 2 uger med en ugentlig infusion på 5g første uge og 30g anden uge.

En ugentligt dosis på 60g vitamin c er valgt, for at opnå tilstrækkeligt høje p-VC koncentrationer men samtidig fastholdes en dosis, som anses værende sikker og gennemprøvet.

Plasma-VC måles 1 min før og 30 minutter efter infusionens afslutning, hermed sikres, at adækvat VC koncentration er opnået og data til farmakokinetik registreres.

Forsøgspersonerne undersøges biokemisk efter uge 3, 6,9, 12, 12, (16,) 20, 26 og 52 med 'baseline parametre' (se tabel B), hvorved der indsamles data og eventuelle bivirkninger (vitamin C mangel, elektrolytderangement, hæmolyse, anæmi) kan korrigeres. For at undgå hypotetisk VC mangel efter forsøgets ophør, modtager alle forsøgspersoner peroralt VC tilskud på 500mg i 26 uger(83)

Forsøgsmedicin:

Uge 1: 5g VC IV ugentligt og 500mg VC p.o. dagligt

Uge 2: 30g VC IV ugentligt og 500mg VC p.o. dagligt

Uge 3-12: 60g VC IV ugentligt og 500mg VC p.o. dagligt

Uge 13-26: 500mg VC p.o. dagligt

Forsøgsmedicin for forsøgspersoner, som modtager yderligere 8 ugers behandling:

Uge 1: 5g VC IV ugentligt og 500mg VC p.o. dagligt

Uge 2: 30g VC IV ugentligt og 500mg VC p.o. dagligt

Uge 3-20: 60g VC IV ugentligt og 500mg VC p.o. dagligt

Uge 21-26: 500mg VC p.o. dagligt

5.4 Baseline parametre:

Følgende parametre måles før VC behandlingen

- Plasma-VC
- Leucocytter
- Na⁺ og K⁺
- Jern, transferrin og Ferritin
- PSA
- Haemoglobin
- Basisk fosfatase, bALP, PINP og NTx
- LDH
- ASAT/ALAT/Albumin
- se-Ca²⁺
- se-testosteron (2 mdr. gammel værdi accepteres)
- ECOG performance status
- EORCT Core + P25
- Screening for G-6-P dehydrogenase mangel
- Radionucleotide knoglescintigafi
- Døgnurinalyse (8-oxo-guanine)

6. Behandlingsprotokol:

6.1 Behandling:

Alle forsøgspersoner modtager ugentlige (6-8 dages mellemrum) infusioner i 12 uger, i alt 12 infusioner.

Intravenøs Vitamin C behandling:

Gives som infusion med Na-ascorbat sv.t. 60 gram ascorbinsyre (L-ascorbate, ca. 500mg/ml) med pH 7,0, opløst i 1000ml sterilt vand mhp. fysiologisk osmolaritet.

Forsøgsmedicinen (Na-ascorbat) leveres i 50ml glas etiketteret jf. annex 13 i GMP-regelsættet.(84) Umiddelbart inden infusion i forsøgspersonen tilsættes forsøgsmedicinen til infusionsposen indeholdende 881 ml sterilt vand (leveres som 1031 ml, hvor der aspireres 150 ml inden tilsætningen) vha. aseptisk teknik, blandes og infunderes inden for 3 timer. Osmolariteten i opløsningen er beregnet til 681 mmol/L.

Det totale volumen på 1001 ml infunderes med en rate på 1000mg/minut intravenøst i en vene på armen, hver infusion tager 60 minutter.

Af sikkerhedsmæssige årsager startes med 2 ugers dosiseskalering:

1. infusion (uge 1): 5,0g ascorbat i 500ml isotonisk glukose (infunderes over 30 min)
2. infusion (uge 2): 30,0g ascorbat i 500ml sterilt vand

I litteraturen er det beskrevet at op til 1 g / min anses som sikkert(85), såfremt patienterne observeres tæt, hvilket allerede er tilfældet.

Såfremt der optræder lokalirritation på infusionssted reduceres indløbshastigheden til 0,75 g/min og 0,5 g/min

30 minutter efter infusionens afslutning udtages en venøs blodprøve, der undersøges for hæmolyse efter første og 3. infusion (se tabel 1). P-VC måles 1 min før infusionens afslutning og 30 min efter hver infusion. Der foretages yderligere blodprøveanalyser jf. se tabel 1..

Peroralt VC tilskud:

Der udleveres i stedet 200 stk. tabletter **C-tabs, Multi-tabs ®, depottablet 500 mg** (ATC-kode: A 11 GA 01, MT nummer 6222693) til hver forsøgsperson.

De 200 tabletter (2 glas) udleveres i den originale emballage ved forsøgets start i uge 1. Forsøgspersonen skal tage 1 tablet dagligt i 26 uger, i alt 182 tabletter svarende til 91 gram vitamin C.

Ved besøget i uge 26 indsamles de 2 udleverede glas igen og antallet af tilbageværende tabletter noteres.

6.2 Materiale

Antal forsøgspersoner: 80

Alder: >18 år

Køn: mænd

6.2.1 Rekruttering:

Direkte rekruttering via læger. Der rekrutteres fra patienter i kontakt med Urologisk Afdeling, Herlev Hospital samt underafdelinger heraf. Der averteres offentligt efter forsøgspersoner jf.

tillægsprotokol 1 på afdelingens og projektgruppens hjemmeside, ved opslag i afdelingen og via cancer.dk.

Ved det daglige kliniske arbejde i urologisk ambulatorium finder forsøgsansvarlig læge og co-investigators egnede forsøgspersoner. Disse informeres i et samtalerum om muligheden for at indgå i et klinisk forsøg. Der orienteres kort mundtligt om det kliniske forsøg, udleveres skriftlig information og derefter aftales ny tid til informationssamtale minimum 24 timer senere. Potentielle forsøgspersoner orienteres om muligheden for at medbringe bisidder.

- Såfremt der ikke ønskes betænkningstid, kan samtykke indhentes i forbindelse med første samtale.
- Forsøgspersonens ret til ikke-viden respekteres.
- Der rekrutteres kun deltagere, der egenhændigt kan give informeret samtykke.
- Såfremt der tilkommer nye oplysninger om risici/bivirkninger ved forsøget, informeres deltagerne herom, og der skal indhentes samtykke på ny.
- Såfremt der fra Sundhedsstyrelsen godkendes behandlings- eller diagnostikmodaliteter, der kan finde direkte anvendelse i allerede analyserede prøver fra forsøgspersonerne, vil forsøgspersonerne blive informeret herom.

Samtykke skal indhentes senest ved starten af besøget i uge 0 (inklusion)

Alle forsøgspersoner følges i ambulant regi.

6.2.2 Registrerede data:

- Alder
- Køn
- CPR-nummer
- Gleason sum
- Baseline parametre som defineret i tabel 1
- Tidligere/nuværende Pca-behandlinger
- LHRH agonist
- Orchiectomi
- Biculatamid
- Bisphosphonater
- Ekstern strålebehandling af prostata/visceral metastaser/ossøse metastaser
- Kirurgisk dekompression af knoglemetastaser
- Tidligere intenderet radikal behandling

Bivirkninger og hændelser relateret til VC behandlingen registreres og rapporteres til sponsor/investigator.

Alle Adverse Events (AE), Adverse Drug Reaction (ADR), Serious Adverse Events (SAE), Serious Adverse Drug Reactions (SADR), Adverse Drug Reactions (ADR) og Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction (SUSAR) registreres og indrapporteres til Lægemiddelstyrelsen jf. afsnit 8.7 og 8.8.

En tilstande angående forventelige serious adverse events er foruddefineret i afsnit 8.7, og vil blive registreret som beskrevet i dette afsnit.

Som reference for, om en SAR skal klassificeres som SUSAR anvendes:

- a) de beskrevne forventelige bivirkninger i sikkerhedsafsnittet (hele afsnit 8)
- b) bivirkninger beskrevet i produktresumé for 'C-tabs, Multi-tabs ®, depottablet 500 mg' Markedsføringstilladelsesnummer 6222693. Bivirkninger og risici er beskrevet i produktresuméets 4.4, 4.5, 4.8 og 4.9

SAR, som ikke omfattes af ovennævnte, defineres som SUSAR.

Registrering foregår på case report forms samt i forsøgspersonens journal.

Rapportering foregår som beskrevet i afsnit 8.7

6.2.3 Biobank

Alle udtagne vævsprøver opbevares, med forsøgspersonernes accept, i en biobank til senere forskningsformål, dette kunne være til eksempelvis proteinekspresionsanalyse eller fornyet ekstraktion af materiale såfremt nye teknikker bliver tilgængelige.

Biobanken placeres på Herlev Hospital, Urologisk Afdeling H. Ansvarlig er sponsor-investigator.

Biologisk materiale (prostatabiopsier, blodprøver) fra forsøgspersoner, der vælger at udgå af projektet, vil fortsat blive opbevaret i biobanken til anvendelse i aktuelle projekt, såfremt førnævnte forsøgspersoner samtykker til dette.

Indholdet i biobanken vil ikke blive udleveret til 3. mand.

Indholdet i biobanken destrueres senest 10 år efter projektets afslutning.

Såfremt det i biobanken opbevarede væv ønskes anvendt til nye studier, skal der på ny blive søgt om godkendelse fra Videnskabsetisk Komité og Datatilsynet.

6.3 Inklusionskriterier:

Køn: mænd

Skal selvstændigt give informeret samtykke

alder >18 år

Biopsiverificeret PCa

Gleason sum ≥ 6

PSA > 10ng/ml på diagnostidspunktet(ingen PSA-negative cancers)

Ingen overvejende neuroendocrin differentiering

Metastatisk PCa defineret som extranodale (viscerale) eller knoglemetastaser bestemt ved knoglescintigrafi, billeddannende undersøgelser eller palpabel metastase

Kastrationsresistent sygdom defineret som mindst to stigninger i PSA med mindst 10% stigning med minimum 1 uges mellemrum indenfor de seneste 6 måneder

P-testosteron i kastratniveau (<50ng/dl)

Forsøgspersonerne skal alle have modtaget kastrationsbehandling, enten ved orchiectomi eller LHRH antagonist/agonist, med mulighed for tillæg (og evt. seponering) af antiandrogen (bicalutamid)

ECOG performance status 0-2

Negativ screeningstest for glucose-6-phosphat dehydrogenasemangel

Normal eller subnormal nyrefunktion (se-creatinin $>200\mu\text{M}$) og ingen anamnese med tidligere nyresvigt.

Bisphosponat og prednisonbehandling tilladt

Ekstern strålebehandling af metastaser tilladt

S-testosteron:

Inklusionskriterium er s-testosteron $<1,7$ nmol/L (sv.t. 50 ng/dL), dvs. i kastratniveau.

Såfremt der foreligger en s-testosteron der er foretaget for mindre en 2 måneder siden kan en ny udelades, såfremt forsøgspersonen forsat i behandling med samme medicinske kastration (LHRH-agonist/antagonist), eller forsøgspersonen er kirurgisk kastreret

PSA-stigning:

Dette nu tolkes som samlet stigning fra baselineværdien på 10%, dog med betinget baselineværdi på minimum 2,0 ng/mL. Mulige forsøgspersoner, som får seponeret behandling med bicalutamid indenfor 6 uger fra screeningtidspunktet, skal have foretaget ny PSAmåling efter 6 uger fra seponeringstidspunktet, og herefter have 2 på hinanden følgende PSA-stigninger jf. protokollen for at opfylde inklusionskriterierne. Hos 20% ses efter bicalutamidseponering en midlertidigt PSA-reduktion (antiandrogen discontinuation response). Dette glæder dog ikke såfremt PSAreduktionen på bicalutamid tidsmæssigt har været under 3 mdr. eller såfremt der ikke har været respons på bicalutamid.

Ovenstående retningslinje er i overensstemmelse med PCWG2(86).

6.4 Eksklusionskriterier:

Bivirkninger og hændelser i relation til IMP (se bivirknings- og AE-afsnittet)

Dårlig almentilstand, som ikke tillader ambulant behandling

Læge eller patientønske om anden intervention (kemoterapi)

Synkrone cancere (non-melanom hudcancer undtaget)

Kemoterapi med taxotere eller lignende stoffer givet før eller under IMP behandling

Allergi overfor IMP eller additiver

Anamnese med oxalatnyresten

Anamnese med hæmochromatose

Større kirurgisk indgreb op til 4 uger før forsøgsstart (def.: indlæggelsestid > 2 dage)

Aktiv hjertekarsygdom (CCS >2 NYHA >2), AMI indenfor 6 måneder

Deltagelse i andre kliniske forsøg med farmaka under behandlingen med IMP

Ved drop-outs eller eksklusioner inkluderes ikke nye forsøgspersoner.

Data fra drop-outs/ekskluderede anvendes ikke til beregning af primære og sekundære mål, men alle data anvendelige til eksplorative formål (micro-arrays mv.) opbevares mhp. senere analyse, såfremt forsøgspersonerne samtykker hertil.

Ekskluderede og drop-outs, som har påbegyndt behandling med IMP, modtager fulde 26 ugers behandling med p.o. VC tilskud og p-VC måles efter 26 uger.

6.5 Forsøgspersonernes tidsforbrug i studiet:

Følgende tidsforbrug skønnes:

1-2 uger til inklusion og screening

12-20 uger med behandling med IMP og samlet follow up tid på 52 uger.

I alt 54 uger pr. forsøgsperson.

7. Targets:

Primært:

At evaluere PSA ændringer i forbindelse med behandling med IMP efter 12, 20, 25 og 52 uger.

Sekundære:

Median overlevelse af forsøgspersoner sammenlignet med overlevelsen i Docetaxel-studier(87) (def. overlevelsestid fra diagnose hormonrefraktær sygdom til død)

ECOG performance status før behandling og ved 12, 20, 26 og 52 uger

Udbredelse af knoglemetastaser målt ved RBS før behandling og efter 12, 26 og 52 uger

Basisk fosfataseændringer før behandling og efter 12, 20, 26 og 52 uger

PINP, Ntx og knoglespecifik basisk phosphatase ændringer før behandling og efter 12, 20, 26 og 52 uger

Genekspressionsændringer før behandling og efter 12 og muligvis 20 uger

Ændringer i oxidativ DNA-skade før behandling og efter 12 og muligvis 20 uger

Ændringer i EORCT-score ved 0 og 12 uger

Tertiære

Opnå farmakokinetiske data vedrørende vitamin c givet intravenøst på cancerpatienter med dissemineret sygdom

Efter PCWG2(86) måles hæmoglobin, LDH, basisk fosfatase og PSA med 3 ugerscyklus (PSA dog undtaget i uge 3 grundet biopsi) samt ved follow-up.

8. Sikkerhed

8.1 Vitamin C (IMP) infusioner:

Der er ikke observeret øget mortalitet af peroralt administreret VC.(88). Bivirkninger til p.o. VC i store doser (op til 15g/dag) er rapporteret i form af oxaluri, mave-tarmgener, glycosuri og træthed. Doser på 1-2g p.o. har ikke afstedkommet gener.(89;90)

Vitamin C mangel efter ophør med infusionsbehandling er nævnt som mulig bivirkning i produktbladet for VC. Evidensen for dette er ikke velundersøgt(83). Alle forsøgspersoner modtager p.o. VC tilskud (500mg/dag) fra dagen for den første infusion og indtil uge 26 i studiet.

Der er et kasuistisk tilfælde med oxalatnyresten som komplikation til store VC doser, komplikationen må betragtes som særdeles sjælden, og et stort prospektivt studie har ikke vist øget risiko for nyresten hos mænd, som indtog >1500mg VC po dagligt,(91). Andre studier indikerer, at oxaluri indtræder ved p.o. VC-doser på 1-2 gram/dagligt(92). Langtids IV administration af VC til hæmodialysepatienter (750mg/uge) har ikke medført nyrestensdannelse(93).

På kasuistisk niveau er der ikke beskrevet alvorlige bivirkninger af IV VC doser på 1,25g til raske forsøgspersoner(82). Doser på op til 60g givet til cancerpatienter er også tålt uden øget morbiditet(14;15;50). Riordan et al. infunderede ugentligt VC doser fra 57,5g til 115g til 6 cancerpatienter i 13 uger uden bivirkninger. En af disse patienter nåede peakkoncentrationer på 158mg VC/dl (8,97mM VC)(19). Et nyligt single center fase-I dosiseskaleringsstudie med 3

ugentlige VC infusioner (0,4-1,5g /kg) til 24 cancerpatienter fandt kun få og milde bivirkninger (hovedpine, kvalme, svimmelhed, træthed, rødme og maveproblemer) og ingen ikke-reversible hændelser(94).

Aktuelt anvendes i privat regi i Danmark et regime med intravenøs administration af vitamin c i doser på op til 100g over 2-3 timer, uden andre bivirkninger end tørst og risiko for væskeoverskud i patienter med hjerteinsufficiens. En dansk kvinde med ovariecancer har modtaget 715 infusioner med vitamin c i doser fra 25-100g ugentligt i en periode på 3 år, uden observerede systemiske bivirkninger.(95)

Kredsløbsbivirkninger:

Væskeoverskud og væskeretention kan for hjertesygge repræsentere et helbredsproblem, hvorfor forsøgspersoner med NYHA>2 og/eller nedsat nyrefunktion ikke inkluderes. Ved kontrol af elektrolytstatus, klinisk undersøgelse for ødemer og lungestase og aktiv udspørgen til åndenød (se CRF) sikres mod helbredstruende væskeoverskud.

Hemolysis:

Forsøgspersoner med Glucose-6-phosphat dehydrogenase mangel (G-6-PDM) kan ikke indgå i studiet pga. risiko for hæmolyse.(96). Screening for G-6-PDM udføres som rutineundersøgelse vha. en venøs blodprøve på Klinisk Biokemisk Afdeling, Herlev, Danmark.

Hæmolyse hos personer uden G-6-PDM er lidet sandsynlig, omend forsigtighed bør udvises ved infusion af potentielt prooxidative stoffer. Der er en hypotetisk risiko for, at en evt. cytotoxisk effekt af IMP kan medføre tumor-lysis-syndrom, om end dette syndrom er meget sjældent i PCa(97). P-LDH måles efter hver infusion for at kunne detektere hæmolyse.

Sikkerhed af IMP:

Den infunderede mængde Na-ascorbat er hypertont med tilførsel af 340mmol Na⁺ ved infusion af 60 gram Na-ascorbat, og vil afstedkomme tørst. Forsøgspersoner opfordres til at drikke rigeligt pr. os. Natrium, ascorbat og vand udskilles renalt, og med en infusionshastighed på 340mmol Na⁺/time i 1001ml vand kan hjerte-nyre raske forsøgspersoner udskille denne væske og elektrolytoverskud med øget diurese.

Den infunderede opløsning (60 gram Na-ascorbat i 1001 isotonisk glucose) anses for fysiologisk sikker ud fra følgende betragtninger:

- pH – neutralt pH med stor bufferkapacitet
- volumen – 1001 ml infunderet over 1 time i forsøgspersoner uden anamnese med inkompenenseret hjertesygdom, iskæmisk hjertesygdom eller nyresvigt anses for et sikkert volumen
- ascorbatdosis – erfaringerne er belyst i 'sikkerheds'afsnittet
- additiver – glucose og vand tolereres i nævnte doser. Da IMP leveres i hætteglas til engangsbrug, er der ikke krav om konserveringsmidler

De beskrevne sikkerhedsprocedurer i aktuelle studier er sammenlignelige med det nylige fase-1 studier på IV VC af Hoffer et al.(94)

Første og anden dosering er stadig af sikkerhedshensyn testdoser. I uge 1 anvendes 5 g (indgivet over 30 min) opløst i 500 mL isoton glucose, dvs. uændret ift. godkendt protokol og i uge 2

anvendes 50% af måldosis (indgivet ved normal hastighed), dvs. 30 gram opløst i 500 mL steriltvand mhp samme osmolaritet som måldosis.

Tilstande med øget jernabsorption (hæmokromatose).

Ved besøg 0 / prestudy måles p-jern, p-transferrin og p-ferritin, og transferrinmætningen beregnes som: $\text{Transferrinmætning} = ((p\text{-jern} / (2 \times p\text{-transferrin})) \times 100)$.

Såfremt denne ligger <55% har patienten for ikke hæmokromatose.

Jernophobning monitoreres med p-ferritin i uge 3,6,9,12, (16 - for pt. som fortsætter med C-vitamin infusioner), 20,26 og 52, og såfremt denne ikke overstiger 1000 ug/l, gøres ikke yderligere tiltag idet patienter med cancer vanligvis har forhøjet ferritinniveau (normal op til 300) og risikoen for udvikling af leversygdom ikke er til stede ved ferritinniveauer under 1000 ug/l¹.

Blodprøverne s-haptoglobin og bilirubin udgår af parameteren ”jernstatus” (fra tabel 1 og 2 i tilføjelse 6 af 16/9-2010), idet der monitoreres med ferritin jf. ovenstående.

Såfremt investigator i øvrigt skønner stigningen markant, men under ovennævnte grænse, kan der suppleres med p-jern, p-transferrin, p-ferritin og p-transferrinreceptor mhp. diagnostik på mistanke om jernophobning af hensyn til sikkerheden.

Andre bivirkninger:

Der er en lille risiko for kemisk thrombophlebitis ved indstiksstedet i armvenen. Personlige samtaler med patienter, som har modtaget VC infusioner indikerer, at selv patienter med skrøbeligt bindevæv og vener pga. dårlig almentilstand og kemoterapi, sjældent oplever thrombophlebit sekundært til infusionerne. Der er i produktresuméet for ascorbinsyre beskrevet risiko for kemisk cystitis, denne komplikation har ikke kunne genfindes i litteraturen.

Da den infunderede opløsning er hyperton, oplever mange tørst i forbindelse med infusionerne, og forsøgspersonerne opfordres til at drikke rigeligt under og efter behandlingen.

8.2 Prostatabiopsier:

Prostatabiopsier til genekspressionsanalyse udhentes vha. 18G nåle, ultralydsvejledt transrektal ultralydsskanning (TRUS). Der udtages 4 biopsier ved hver biopsitagning. Alle forsøgspersonerne har tidligere fået foretaget undersøgelsen som led i deres primære cancerudredning. Metoden er en rutineprocedure i urologiske og radiologiske afdelinger med få bivirkninger (hæmaturi, hæmatokesi, ubehag og infektionsrisiko). Infektionsrisikoen er ca. 0,5%, og alle forsøgspersoner gives antibiotikaproylaxse i form af tb. ciproxin 500mg *2.(98)

8.3 Radionucleotid knoglescintigrafi:

Knoglescintigrafi udføres som rutineundersøgelse på Klinisk Fysiologisk Afdeling, Herlev Hospital. En scintigrafi består af injektion af sporstof (Tc^{99}), fordeling af sporstoffet og ophold foran gammakamera, i alt et tidsforbrug på ca. 3 timer.

Der er ingen særlige risici eller ubehag, og den administrerede radioaktivitet (4-5mSv/scintigrafi) medfører ikke øget risiko for forsøgspersonernes helbred, specielt ikke når deres alder, morbiditet og forventede overlevelse tages i betragtning.

8.4 Forsikring:

Alle forsøgspersoner (eller efterladte) er dækket af Patientforsikringen (Patientforsikringen, lov 547 af 24/06/2005, kap. 3, §19), såfremt de påføres permanent skade i forbindelse med forsøgsdeltagelsen.

8.5 Forsinket henvisning til kemoterapi:

For at undgå hildet behandling og eventuel forsinket henvisning til andre behandlinger, som ville medføre eksklusion fra pågældende studie, sikres forsøgspersonerne uvildig kontrol. Alle forsøgspersoner fortsætter deres normale, ambulante kontrolforløb i Urologisk Ambulatorium, Herlev Hospital hos en læge, som ikke er tilknyttet aktuelle studie. En eventuel beslutning om at tilbyde forsøgspersonen kemoterapi vil i givet fald blive taget af en uafhængig læge. Som udgangspunkt kontrolleres patienter med prostatacancer hver 3. måned i det normale ambulante forløb.

8.6 Procedurer for uønskede og alvorlige uønskede hændelser:

I hvert enkelt tilfælde vurderes det, om hændelsen er relateret til IMP (serious adverse drug reaction (SADR)). Der er ikke nogen specifik antidot til IMP, hvorfor behandling af eventuelle bivirkninger vil være symptomatisk.

Serious adverse events (SAE), serious adverse drug reactions (SADR) og suspected unexpected serious adverse reaction (SUSAR) defineres i henhold til ICH-GCP(99) guidelines.

Hændelser, som medfører indlæggelse, forlængelse af indlæggelse, død, er livstruende eller resulterer i betydelige eller vedvarende invaliditet eller uarbejdsdygtighed, klassificeres som SAE. Såfremt sammenhæng mellem behandling med IMP og hændelse ikke kan udelukkes, klassificeres denne som SADR eller SUSAR.

Undtagelser:

Da forsøgspersonspopulationen er cancerpatienter med forventelig høj morbiditet og nogen mortalitet, må en del udsving i helbredstilstand og biokemiske parametre forventes, som en naturlig del af deres sygdom. Nedenstående fund betragtes ikke som SADR, SUSAR eller SADR, men som AE eller SAE:

Hæmoglobin

Anæmi er en almindeligt forekommende observation hos patienter med dissemineret cancersygdom, kendt som anæmi ved kronisk sygdom. Anæmien er typisk let til moderat med Hgb = 5,5 - 6,5 mmol/L

Adverse event (AE) klassificeres som Hgb <8,0 mmol/L, og indrapporteres til lægemiddelstyrelsen ved forsøgets afslutning.

Serious adverse events (SAE) klassificeres som Hgb < 4,5 mmol/L eller 4,5 > Hgb < 6,0 mmol/L med samtidige anæmisymptomer som medfører indlæggelse og blodtransfusion. Denne indrapporteres sammen med vanlig årlig afrapportering til Videnskabetisk Komite og Lægemiddelstyrelsen. Mistanke om relation til IMP (SADR eller SUSAR) rejses ved Hgb-fald på >0,1 mmol/L pr. dag og/eller samtidig biokemiske tegn på hæmolyse.

Elektrolytderangement (Na⁺, K⁺, Ca²⁺):

Mindre:

Definition: fravær af kliniske symptomer (feber, hypo/hyperrefleksi, abnorm tørst, tremor, nedsat muskelkraft, lammelser, cerebral sløring, abnormt EKG, oliguri/anuri/polyuri) og Na⁺ (130-160mM), K⁺ (3,0-5,5mM), Ca²⁺ (1,02mM-1,45mM) (abnorme Ca²⁺ værdier kan accepteres, såfremt disse har været kendt ved inklusionen).

Behandling:

Ingen, en del variation i elektrolytværdier må forventes i populationen pga. infusioner med IMP, svingende aktivitet i grundmorbus og eventuel sideløbende behandling med bisphosphonater.

Prostatainfektion:

Definition: Temperatur >38,0°C, ømhed af prostata eller klinisk mistanke om infektion indenfor 7 dage efter bioptering af prostata.

8.7 Rapportering af bivirkninger og hændelser

Alle bivirkninger og hændelser (ADR, AE, SADR, SAE) indrapporteres årligt til Lægemiddelstyrelsen.

ADR, SADR, AE og SAE vurderes ud fra NCI-CTEP adverse events reporting guidelines og rapporteres via sponsor-investigator til Lægemiddelstyrelsen vha. LMS formular (<http://www.laegemiddelstyrelsen.dk/1024/visLSArtikel.asp?artikelID=11519>)

8.7.1 Afslutning af forsøget før tid:

Forsøgspersonerne ekskluderes fra protokollen i tilfælde af:

- IMP-relaterede serious adverse events
- Intolerable bivirkninger til prostatabiopsier
- Hastigt aftagende performance, som ikke tillader ambulant forløb

Såfremt standardbehandlingen for hormonrefraktær prostatacancer ændres og denne behandling ikke tillader inklusion i aktuelle protokol.

Bivirkninger:

Nedenstående bivirkninger registreres, men medfører som udgangspunkt ikke eksklusion af forsøget:

- Mindre elektrolderangement
- Lokalt ødem
- Mave-tarmgener (flatus, obstipation, kvalme)
- Træthed
- Oxaluri
- Lokal thrombophlebit

8.8 Suspected unexpected adverse reaction (SUSAR)

SUSAR's rapporteres elektronisk til

<http://www.laegemiddelstyrelsen.dk/1024/visLSArtikel.asp?artikelID=10964>

(Lægemiddelstyrelsen) af sponsor-investigatør inden 7 dage. SUSARs dokumenteres på relevante CRF.

Rapporteringsperiode:

Der rapporteres til sidste dage i forsøgets uge 26. IMP elimineres hurtigt, og der forventes ikke nogen blivende effekt af stoffet. Desuden er forsøgspersonerne uheldeligt syge cancerpatienter, hvorfor der må forventes en del events som en naturlig del af sygdomsprogressionen.

9. Investigational medical product (IMP):

Fremstilling:

Al produktion, pakning og etikettering varetages af Centralapoteket, Region Hovedstaden, Danmark (Region Hovedstadens Apotek, Steril Serieproduktion, Juliane Maries Vej 16, 2100 København Ø, Danmark).

Fremstiller autorisationskode: 389

Isotonisk glucose (Glucose Isotonisk SAD ATC: B05BA03) anskaffes fra Centralapoteket, Region Hovedstaden, Danmark.

Sterilt vand skaffes fra producenten B.Braun efter ansøgning om importtilladelse fra Lægemiddelstyrelsen

Specifikation af IMP:

960 flasker indeholdende 20g Na-ascorbat (500mg/ml) 40ml (refereret som 'Active additive, 20g')

pH af 20,0 gram Na-ascorbat (0,1136 mol) opløst i vand til et volumen på 40ml er ca. 7,0.

Bestilling og opbevaring:

Ved administration af 5,0g, 30,0 og 60,0g Na-ascorbat i dosiseskalering doseres fra opløsningen indeholdende 20g Na-ascorbat.

Efter levering af hvert batch opbevares dette i Urologisk Ambulatorium, HA122, Herlev Hospital ved 2-8 grader C i alarmovervåget, aflåst køleskab indtil brug.

Bestilling og opbevaring:

Isoton glucose tages fra Urologisk Afdelings normale lager.

Vitamin C er kun stabilt, såfremt det opbevares skærmet for UV stråler, hvorfor Vitamin C opløsningen opbevares i forsejlet flaske indtil umiddelbart før infusionen. Her tilsættes den infusionsposen med isotonisk glucose og infunderes indenfor 3 timer. Der bruges en steril 50cc sprøjte og aseptisk teknik til at tilsætte 'active additive' til opløsningen.

Efter levering af hvert batch opbevares dette i Urologisk Ambulatorium, HA122, Herlev Hospital ved stuetemperatur indtil brug.

Compliance:

Al forsøgsmedicin, fraset peroralt vitamin c tilskud, gives som intravenøs infusion, og denne administration dokumenteres på CRF.

Al udleveret medicin (peroralt vitamin c tilskud) dokumenteres, og ved follow-up besøget i 26. uge indsamles glasset og evt. ikke-forbrugt medicin noteres.

10. Effektmål og beskrivelse af anvendte metoder

10.1 PSA, knoglemarkører og andre venøse blodprøver

Alle blodprøver ekskl. p-VC og G-6-PDH udføres som rutineblodprøver på Klinisk Kemisk Afd., Herlev Hospital.

Serum-PINP, bALP og YKL-40 blodprøver skal dog centrifugeres og fryses ved -80grader umiddelbart efter udtagningen, inden efterfølgende analyse vha. ELISA.

Urin-NTx prøver fryses i portioner af 2ml umiddelbart efter prøveafgivningen.

Totalt blodvolumen afgivet af forsøgspersonerne:

10 uger: 133 ml

20 uger: 230 ml

52 uger: 277 ml

Tallene er kumulative, og den samlede mængde blod afgivet til analyser er ca. 277ml på et år, hvilket ikke udgør nogen helbredsrisiko for forsøgspersonerne.

10.1.1 YKL-40 og CRP

For at kvantificere det inflammatoriske respons før, under og efter behandlingen, måles markørerne YKL-40 og CRP (C-reaktivt protein) i uge 0, 12, 20 og 26.

Forhøjede niveauer af fornævnte inflammationsmarkører har vist sig at være associeret med senere udvikling af bl.a. mamma- og coloncancer. Der synes at være nogen specificitet forbundet med de to markører.

Udviklingen i inflammationsmarkører i dissemineret prostatacancer i forbindelse med antioxidantbehandling har ikke tidligere været undersøgt.

Undersøgelserne kan udføres på det i forvejen planlagte udtagne blodvolumen og medfører ikke yderligere ubehag for forsøgspersonerne. Analysen foretages på KBA, Herlev.

10.2 Radionucleotid knoglescintigrafi (RBS):

RBS udføres som standardprocedure på Klinisk Fysiologisk Afdeling, Herlev Hospital. Tc⁹⁹-HDP RBS kan bruges som markør for mængden af ossøse metastaser. Traditionelt har 2 metoder været anvendt til at vurdere mængden af knoglemetastaser på RBS:

- a. Diskret semi-kvantitativ gradering a.m. Soloway med inddeling i graderne I-IV(69)
- b. % PABS (positive area on bone scan) eller BSI (bone scan index), som ved manuel udmåling og indtastning i custom software(70;100)

En tredje metode, som omfatter kvantificering af total tumorbyrde, knoglespecifik distribution og antal hotspots er aktuelt under udvikling af Exini Diagnostics AB, Sverige Urologisk Afdeling, Herlev Hospital. Metoden er baseret på neurale netværk til computer-assisted-diagnosis og almindelige RBS kan inputtes i interfacet.

10.3 Klinisk observation:

ECOG-performance score bestemmes ved aktiv udspørgen og grov klinisk undersøgelse ved hvert besøg.

Kliniske observationer for cerebral funktion, ødemtendens, hjerte-lungestatus, smerter, cutane forandringer og vitalparametre (blodtryk/puls) dokumenteres ved hvert besøg.

Anamnestisk information om ovennævnte parametre sikre ved aktiv udspørgen.

10.4 Urinanalyse for oxidative DNA-skade:

8-oxo-guanin-nivauer måles i døgnurin under behandlingen med vitamin c, vha high power liquid chromatography (HPLC) tandem mass spectrometry(43). Forsøgspersoner får udleveret beholdere til opsamling ved inklusionen og i uge 11, således at døgnurin indsamles umiddelbart før uge 1 og uge 12. Forsøgspersoner, som fortsætter i uge 13-20, skal opsamle og aflevere døgnurin umiddelbart før sidste behandling med vitamin c i uge 20.

10.5 Overlevelsesanalyse og statistiske metoder:

Information om et- og femårsoverlevelsen kan ekstraheres fra journalmateriale og Landspatientregistret, selv efter studiet er ophørt.

Kaplan-Meyer life-test bruges til sammenligning af overlevelsestider mellem stratificerede grupper, typisk non-supervised clustering af genekspressionsprofiler.

En Cox proportional hazards anvendes til bestemmelse af hazard ratios mellem grupper mht. demografi og surrogatmarkører.

Effektparametrenes (PSA, basisk fosfatase, ændringer i skelettets tumorbyrde) betydning i forbindelse med vitamin c behandling kan estimeres vha. multivariat regression, typisk i en Cox proportional hazards model. Materialets størrelse (80) muliggør dog ikke en model med mange variable.

Før- og efterbehandlingsanalyse af de nævnte effektparametre kan udføres vha. en ikke-parametrisk test, typisk Wilcoxon eller Mann-Whitney.

Styrkeberegning:

Der er ikke nogen tidligere studier, hvorfra responset af PCa ved VitC behandling kan estimeres.

Som nulhypotese i styrkeberegningen antages derfor, at PSA-respons efter 12 uger ikke adskiller sig fra Docetaxel-behandling, som beskrevet i TAX-327 studiet(87)

10.5.1 Styrkeberegning for detektering af PSA-ændringer:

$\alpha = 0,05$ (tosidet)

$\beta=0,2 \leftrightarrow \text{Power} = 1-0,2 = 0,8$

Standard afvigelsen af PSA ved inklusion (s): De fleste forsøgspersoner antages at have PSA mellem 10 og 150ng/ml ved inklusion. Antages PSA at være normalfordelt i populationen, sættes standard afvigelsen til 30ng/ml.

MiReDif (mindste relevante difference) δ : 50ng/ml

Antal krævede forsøgspersoner bestemmes ud fra standardnomogrammer(101) og givet de ovennævnte antagelser, kræves ca. 80 forsøgspersoner for at påvise en MiReDif af PSA på 50ng/ml.

10.5.2 Styrkeberegning til detektering af ændringer i knoglemetastasebyrde

Der ligger ikke tidligere undersøgelser med kvantificering af knoglemetastaser som effektparameter i behandlingen af prostatacancer. Tidligere studier har brugt semi-kvantitative metoder så som mere eller mindre end 5 hotspots eller rent kvalitative vurderinger (progression/ikke progression). Den påtænkte metode måler den procentuelle involvering i procent af det samlede skelet. MiReDif sættes her til fraktionen 0,025, svarende til at en 2,5%-point ændring i knoglemetastasebyrden er klinisk relevant.

Standard afvigelsen af den procentuelle involvering er ikke vel belyst, men i studiet af Erdi et. al.(70) fandtes en standardafvigelse af bone scan index (BSI) på 0,0345 i et forholdsvis lille materiale.

$\alpha = 0,05$ (tosidet)

$\beta=0,2 \leftrightarrow \text{Power} = 1-0,2 = 0,8$

S: 0,0345

Standard variation: $0,025/0,0345 = 0,72$

Antal krævede forsøgspersoner bestemmes ud fra standardnomogrammer(101) og givet de ovennævnte antagelser, kræves ca. 65 forsøgspersoner for at påvise en MiReDif af BSI på 0,02.

Beregningen er behæftet med den usikkerhed, at standardafvigelsen på BSI bygger på et meget lille materiale. Denne styrkeberegning skal ses i lyset af, at studiet har et overvejende eksplorativt sigte.

10.5.3 Styrkeberegning til detektering af ændringer i knoglemarkører:

Basisk phosphatase, knoglespecifik basisk phosphatase, NTx og PINP udviser stor variation i tidligere materialer, med standard-afvigelser af en sådan størrelse, at påvisning af klinisk relevante differencer ikke nødvendigvis kan påvises. Der i et materiale fra Brasso et al på 153 patienter kunne påvises signifikante forskelle i bALP samt PINP afhængig af metastasebyrden på knoglescintigrafi(80). Om der kan påvises signifikante forskelle i et materiale på 80 patienter er usikkert, men måling af de beskrevne biomarkører tjener primært et eksplorativt formål, hvor de er medtaget.

10.5.4 Styrkeberegning vedrørende microarray analyse

Der er ikke tidligere lavet microarrays i forbindelse med antioxidantbehandling af cancer.

Microarrays har heller ikke været anvendt i kliniske studier på prostatacancer til segmentering af respons.

I langt de fleste studier indenfor prostatacancer og andre solide tumorer, hvor RNA-ekspressions microarrays anvendes til at segmentere forskellige grupper (unsupervised clustering), indgår kun et lille antal patienter, typisk 12-30 (102;103).

Principielt set skal en styrkeberegning på genekspression udføres på hver enkelt gen, men da variansen af genekspression for de forskellige gener i hos patienter med kastrationsresistent prostatacancer ikke kendes, kan denne beregning ikke udføres.

Som tommelfingerregel betragtes datasæt med mere 30 "samples" dog som store, og i da der i dette forsøg tænkes anvendt mere end 160 samples, må datasættet betegnes som stort, det eksplorativt formål taget i betragtning.

En variansratio på 4.0 mellem den naturlige varians af genet og varians som følge af måleusikkerhed, vil typisk kræve ca. 50 samples(104) ved $\alpha = 0,01$ (tosidet) og $\beta=0,05 \leftrightarrow \text{Power} = 1-0,05 = 0,95$ for at kunne påvise forskellige niveauer af genekspression.

10.6 Vitamin C farmakokinetik:

Venøse blodprøver til bestemmelse af p-VC udtages bedside ved de beskrevne besøg (se tabel 1). Blodprøver udtages ca. 30 minutter efter infusionen er tilendebragt.

Alle blodprøver til bestemmelse af p-VC behandles som beskrevet i bilaget 'VCSampling_bedside' og der dokumenteres på CRF. Behandlede prøver opbevares ved -80°C i op til 5 år uden tab af ascorbat. Prøverne analyseres vha. HPLC(105)

10.7 Micro array genekspressionsanalyse:

Cancervæv fra prostatabiopsier isoleres vha. LCM og der gøres efterfølgende mRNA isolation og amplifikation før genekspressionsanalyse med Affymetrix Gene Chips U-133A 2.0.

RNA-amplifikation, hybridisering og microarrayanalyse gøres på RH Microarray Center, Klinisk Kemisk Afdeling, Rigshospitalet (www.rh-microarray.com). Analyse, normalisering, clustering mv. gøres vha. dChip softwaren

Inter-array normalisering kan gøres via vævsprøverne fra de ubehandlede forsøgspersoner. Alternativt haves en biobank i Urologisk Afdeling, Herlev Hospital, med vævsprøver fra andre stadier af PCa.

Genekspressionsanalysen kan bruges til at identificere differentielt regulerede gener i relation til behandlingen med vitamin C. Kandidatgener kan valideres på andre platforme (RT-PCR/Western Blot) og efterprøves i andre studier/modeller.

Ved anvendelse af unsupervised analyse af alle data og korrelation af disse til klinisk respons og cancerfænotype, kan genetiske netværk for PCa-response på antioxidantterapi etableres. Hermed er yderligere down-stream analyser af cancerresponset muligt.(106)

Genekspressionsanalysen kan bruges til profilering af forsøgspersoner med godt og dårligt respons på behandlingen, med henblik på evt. senere stratificering af patienter.

10.7.2 Genekspressionsanalyse fra lymfocytter

Til kortlægning af forsøgspersonernes ikke-tumorrelaterede arvemateriale anvendes genekspressionsanalyse på RNA ekstraheret fra lymfocytter i helblod.

Der anvendes PAX-Gene RNA Blood glas (107) til opsamling af fuldblod fra forsøgspersonerne. De 2.5ml, som glasset indeholder analyseres down-stream af 3. part (Aros, Aarhus, DK). Der kan fra de 2.5ml fuldblod udvindes mere end 1 picogram RNA.

Dette RNA analyseres vha. Affymetrix ST 1.0 Gene Chips®, hvortil der skal bruges 100ng RNA.

10.8 Histopathologi:

Hver 18G biopsi placeres med det samme i 1ml RNAlater (Ambion, Austin, USA) og inkuberes ved 4°C i ca. 12 timer, inden prøverne overføres til -20°C eller -80°C, hvor de kan opbevares i mindst 5 år uden tab af RNA. Prøverne kan ved analyse fikseres i Tissue-Tek(R) OCT ved -80°C, skæres i 8µM snit og farves med H&E til almindelig histopatologi (gleason sum).(108) Resten af vævsprøven kan opbevares ved -80°C til senere LCM og RNA-ekstraktion.(109)

10.9 Laser Capture Microdissection:

LCM udføres på 5-8µM snit af prostatabiopsier indstøbt i Tissue-Tek OCT. Efterfølgende placering på microslides, farvning og dehydrering sker jf. Arcturus protokollen(110). RNA udbytte og RIN måles på Agilent Bioanalyser inden analyse på microarrays.

11. Source data management – CRF listing

Nedenfor følger liste med CRF-dokumenter. I parentes er angivet placering af source data (Kildedata). Der planlægges eCRF i samarbejde med GCP-enheden, Region Hovedstaden. eCRF via Open Clinica tillader direkte input i database med audit trail, og output i .csv-format til SAS eller SPSS.

- a) Demografi (Kildedata: journal)
- b) Medicinstatus (Kildedata: journal)
- c) Tidligere behandling (Kildedata: journal)
- d) Tidligere behandling, prostatacancer (Kildedata: journal)
- e) Venøse blodprøver (Kildedata: web-ice/LABKA Herlev Hospital, Klinisk Kemisk Afd. RH)
- f) Inklusion og eksklusion (Kildedata: journal)
- g) Kliniske observationer (Kildedata: CRF)
- h) Forsøgsmedicin - infusioner (Kildedata: CRF)
- i) Billeddiagnostiske data (Kildedata: journal)
- j) Microarray data (Kildedata: dChip output)
- k) Histopathologidata (Kildedata: journal)
- l) Serious adverse events (SAEs) (Kildedata: journal)
- m) Suspected unexpected serious adverse reactions (SUSARs) (Kildedata:journal)
- n) Vitamin C målinger (Kildedata: målinger, Life KU)
- o) Knoglescintigrafidata (Kildedata: Proscan Software)
- p) End-of-study (Kildedata: CRF)
- q) Project medications – vitamin C oral supplements (Kildedata: CRF)

Alle CRF er på dansk og al dataregistrering gøres på dansk.

12. Etiske overvejelser:

De forventede bivirkninger til højdosis Vitamin C behandling er beskrevet i protokollen, og graden og frekvensen af bivirkninger må forventes at være minimal. Endvidere er der planlagt en væsentlig grad af monitorering af forsøgspersonernes kliniske og biokemiske tilstand. Forsøgsbehandlingen må på den baggrund konkluderes at være meget sikker og skånsom.

Det beskrevne studie belyser et relevant og meget anvendt stof, som på trods af dette ikke er velundersøgt. Dette studie vil være det første af sin art, som undersøger effekten af vitamin c på en meget udbredt cancerform (prostatacancer). Såfremt der findes en cancerledræbende effekt

af stoffet, vil det afstedkomme større, randomiserede studier med mulig stor betydning for den palliative cancermedicin.

I betragtning af, at Vitamin C infusioner allerede benyttes som palliativ terapi af alternativ orienterede behandlere, er det vigtigt at vurdere effekten af denne behandling på et oplyst, videnskabeligt grundlag, for at kunne rådgive patienter og behandlere om denne terapiform.

Et grundigt, klinisk studie kan give videnskaben bedre indsigt i vitamin C's virkning på maligne celler, specielt prostatacancer, og de eksplorative mål i studiet kan danne baggrund for yderligere forskning i humane modeller.

Ubehag og bivirkninger for forsøgspersonerne

- Ugentlige ambulatoriebesøg
- Anlæggelse af IV-adgang og risiko for phlebitis
- Blodprøvetagning
- Tidsforbrug ved ambulante besøg (ca. 2 timer)
- Mulige bivirkninger (hovedpine, kvalme, mave-tarmgener, træthed)
- Hypotetisk risiko for nyresten
- Minimal risiko for hæmolyse, ødemer og hjertepåvirkning
- Ubehag og infektionsrisiko ved prostatabiopsier
- Tidsforbrug ved knoglescintigrafi (4 x 2 = 8 timer)

Potentielle gevinster for videnskaben

- Undersøgelse af cytotoxicitet af vitamin c i et humant prostatacancermateriale
- Unikke data om genekspression i kastrationsresistent PCa før og efter antioxidantterapi
- Farmakokinetiske data om Vitamin C i ældre cancerpatienter

Potentielle goder for den enkelte forsøgsperson:

- Såfremt behandlingen virker: bedret overlevelse og sygdomsreduktion med et minimum af bivirkninger
- Tættere overvågning af forsøgspersonerne kan øge sandsynligheden for rettidig intervention og evt. visitation til 2nd og 3rd line terapi
- Data fra genekspressionsanalyse kan hypotetisk bruges i senere, eksperimentielle behandlinger.

13. Ressourcer

Rekrutteringsgrundlag og fysiske rammer:

Urologisk Afdeling, Herlev Hospital, er det største urologiske center i Skandinavien med et optageområde på over 1 million mennesker. Der gennemføres over 35.000 ambulante besøg årligt. Mindst 700 nye tilfælde af PCa diagnosticeres årligt i afdelingen, med et estimeret lidt mindre antal progressioner til hormonrefraktær sygdom.

En stor del af patienterne med kastrationsresistent PCa vil på et tidspunkt komme i betragtning til kemoterapi eller anden 3rd line terapi. Der er dog gode muligheder for at rekruttere forsøgspersoner til protokollen, som endnu ikke er symptomatiske nok til andre behandlinger, som ikke har tilstrækkelig performance, eller som ikke ønsker kemoterapi.

Den relativt korte behandlingsperiode (12 uger) giver et vindue, hvori patienter kan rekrutteres inden de når at blive kandidater til kemoterapi. Muligheden for forlængelse af behandlingsperioden kan give flere data og længere observationstid.

Urologisk Afdeling har alle de nødvendige logistiske og lokalemæssige faciliteter til gennemførelse af et fase-II studie, herunder udstyr til infusioner, observation, vævsprøvetagning og sengefaciliteter til evt. indlæggelseskrævende bivirkninger. Afdelingen har klinisk og laboratoremæssig erfaring i bioptering og laserdissektion af prostatavæv.

Projektet er indrettet således, at danner baggrund for et 3-årigt ph.d. studium. Der ansættes til dette formål en læge som klinisk assistent, som har medansvar for projektets daglige drift og med direkte reference til sponsor-investigatør.

PhD-stillingen vil endeligt blive slået op, når der er tilvejebragt midler til at starte projektet.

Biokemi, histologi og genekspressionsanalyse:

Klinisk Farmakologisk Afd., Rigshospitalet og Afdeling for Veterinær Patobiologi, KU Life, har lang erfaring med vitamin C analyser, genekspressionsanalyse og cellestudie på antioxidant.

Urologisk Afd., Herlev Hospital, har laboratoriefaciliteter til laserdissektion og RNA isolation.

Good Clinical Practice:

Urologisk Afdeling, Herlev Hospital, har stor erfaring med kliniske forsøg, og der foregår pt. ca. 10 kliniske forsøg i fase II-III på afdelingen, herunder 4 indenfor prostatacancer. Ekstern GCP-vejledning og monitorering er tilgængeligt via GCP-enheden, Region Hovedstaden.

Aktindsigt:

Der gives via fuldmagt fra forsøgspersoner aktindsigt i patientjournaler og andet projektrelateret materiale til GCP-enheden, Region Hovedstaden, Lægemiddelstyrelsen, Datatilsynet og Videnskabsetiske Komiteer.

14. Økonomi

Det samlede budget er på ca. 4.300.000 Dkr.

Se vedlagte budget for detaljer.

Der er bevilget 3.947.446 kr. fra Kirsten og Freddy Johansens Fond.

Der er bevilget 120.000 kr fra Region Hovedstaden til dækning af Ph.D.-studieafgiften.

Der ydes ikke honorar til forsøgspersoner.

Der udbetales løn efter vanlig overenskomstmæssig takst til VIP og TAP-personale nævnt i budgettet.

15. Tidsplan

2009: Fondsansøgninger, godkendelse fra relevante myndigheder, implementering af GCP-procedurer, fremstilling af forsøgsmedicin.

2010: Inklusion og behandling af forsøgspersoner

2012: 3.-4. kvartal – sidste behandling af sidste forsøgsperson

2013: 1 års follow-up, genekspressionsanalyser
2013-2014: Dataanalyse, sammenskrivning og publicering.

16. Registrering:

Projektet skal anmeldes og godkendes ved følgende myndigheder/organisationer:
De Videnskabetiske komiteer for Region Hovedstaden
EudraCT – EU Community Clinical Trial System
Clinical Trials (<http://clinicaltrials.gov>)
Lægemiddelstyrelsen
Datatilsynet

17. Publikation og rettigheder:

Alle resultater, såvel positive som negative fund inkl. farmakokinetiske data vil blive forsøgt publiceret i internationale, peer-reviewed tidsskrifter.
Forfattere vil være investigator og co-investigators. Forfatterrækkefølge aftales internt, sponsor-investigator beslutter rækkefølgen, såfremt der er uoverensstemmelser.
Alle data indsamlet i dette studie, inklusiv data fra biokemi, vævsanalyser, microarrays og lignende tilhører de i protokollen nævnte investigatorers respektive afdelinger.

18. Interessekonflikter:

Ingen af investigatorene eller sponsor har private, kommercielle interesser i behandlingsmodaliteter eller farmaceutiske produkter anvendt i dette studie.
Ingen medlemmer af projektgruppen modtager økonomisk støtte fra private virksomheder med kommercielle interesser i vitamin c.
Det omtalte projekt er baseret på ikke-kommerciel finansiering.

19. Referencer

- (1) Sundhedsstyrelsen. Cancerregistret 2005-2006. 2008 Nov 1.
- (2) Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho SM, Landolph J et al. Human prostate cancer risk factors. *Cancer* 2004 November 15;101(10 Suppl):2371-490.
- (3) Halabi S, Small EJ, Kantoff PW, Kattan MW, Kaplan EB, Dawson NA et al. Prognostic Model for Predicting Survival in Men With Hormone-Refractory Metastatic Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2003 April 1;21(7):1232-7.
- (4) Armstrong AJ, Garrett-Mayer ES, Yang YCO, de Wit R, Tannock IF, Eisenberger M. A Contemporary Prognostic Nomogram for Men with Hormone-Refractory Metastatic Prostate Cancer: A TAX327 Study Analysis. *Clinical Cancer Research* 2007 November 1;13(21):6396-403.
- (5) Mike S, Harrison C, Coles B, Staffurth J, Wilt TJ, Mason MD. Chemotherapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;(4):CD005247.
- (6) Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, Rissanen A, Aromaa A, Heinonen OP et al. Dietary antioxidants and the risk of lung cancer. *Am J Epidemiol* 1991 September 1;134(5):471-9.
- (7) You WC, Zhang L, Gail MH, Chang YS, Liu WD, Ma JL et al. Gastric dysplasia and gastric cancer: Helicobacter pylori, serum vitamin C, and other risk factors. *J Natl Cancer Inst* 2000 October 4;92(19):1607-12.
- (8) Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995 December 6;87(23):1767-76.
- (9) Meyer F, Galan P, Douville P, Bairati I, Kegle P, Bertrais S et al. Antioxidant vitamin and mineral supplementation and prostate cancer prevention in the SU.VI.MAX trial. *Int J Cancer* 2005 August 20;116(2):182-6.
- (10) Kirsh VA, Hayes RB, Mayne ST, Chatterjee N, Subar AF, Dixon LB et al. Supplemental and dietary vitamin E, beta-carotene, and vitamin C intakes and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2006 February 15;98(4):245-54.
- (11) West DW, Slattery ML, Robinson LM, French TK, Mahoney AW. Adult Dietary Intake and Prostate Cancer Risk in Utah: A Case-Control Study with Special Emphasis on Aggressive Tumors. *Cancer Causes & Control* 1991 March;2(2):85-94.
- (12) Berndt SI, Carter HB, Landis PK, Hallfrisch J, Rohrmann S, Metter EJ et al. Prediagnostic plasma vitamin C levels and the subsequent risk of prostate cancer. *Nutrition* 2005 June;21(6):686-90.
- (13) Wiygul JB, Evans BR, Peterson BL, Polascik TJ, Walther PJ, Robertson CN et al. Supplement use among men with prostate cancer. *Urology* 2005 July;66(1):161-6.
- (14) Cameron E, Campbell A. The orthomolecular treatment of cancer. II. Clinical trial of high-dose ascorbic acid supplements in advanced human cancer. *Chem Biol Interact* 1974 October;9(4):285-315.
- (15) Cameron E, Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976 October;73(10):3685-9.
- (16) Cameron E, Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978 September;75(9):4538-42.

- (17) Creagan ET, Moertel CG, O'Fallon JR, Schutt AJ, O'Connell MJ, Rubin J et al. Failure of high-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy to benefit patients with advanced cancer. A controlled trial. N Engl J Med 1979 September 27;301(13):687-90.
- (18) Moertel CG, Fleming TR, Creagan ET, Rubin J, O'Connell MJ, Ames MM. High-dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who have had no prior chemotherapy. A randomized double-blind comparison. N Engl J Med 1985 January 17;312(3):137-41.
- (19) Riordan NH, Riordan HD, Meng X, Li Y, Jackson JA. Intravenous ascorbate as a tumor cytotoxic chemotherapeutic agent. Med Hypotheses 1995 March;44(3):207-13.
- (20) Riordan HD, Hunninghake RB, Riordan NH, Jackson JJ, Meng X, Taylor P et al. Intravenous ascorbic acid: protocol for its application and use. P R Health Sci J 2003 September;22(3):287-90.
- (21) Levine M. Estimate of intravenous vitamin c use in cancer patients in the USA. 2007.
Ref Type: Personal Communication
- (22) www.pluslife.dk. Orthomolecular physicians in Denmark. 2007. 10-10-2007.
Ref Type: Internet Communication
- (23) Becker W. [New Nordic nutrition recommendations 2004. Physical activity as important as good nourishing food]. Lakartidningen 2005 September 26;102(39):2757-2.
- (24) Noroozi M, Angerson WJ, Lean ME. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. Am J Clin Nutr 1998 June;67(6):1210-8.
- (25) Cooke MS, Evans MD, Podmore ID, Herbert KE, Mistry N, Mistry P et al. Novel repair action of vitamin C upon in vivo oxidative DNA damage. FEBS Lett 1998 November 20;439(3):363-7.
- (26) Heuser G, Vojdani A. Enhancement of natural killer cell activity and T and B cell function by buffered vitamin C in patients exposed to toxic chemicals: the role of protein kinase-C. Immunopharmacol Immunotoxicol 1997 August;19(3):291-312.
- (27) Bergman M, Salman H, Djaldetti M, Fish L, Punsky I, Bessler H. In vitro immune response of human peripheral blood cells to vitamins C and E. The Journal of Nutritional Biochemistry 2004 January;15(1):45-50.
- (28) Levine M, Wang Y, Padayatty SJ, Morrow J. A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. Proc Natl Acad Sci U S A 2001 August 14;98(17):9842-6.
- (29) Podmore ID, Griffiths HR, Herbert KE, Mistry N, Mistry P, Lunec J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. Nature 1998 April 9;392(6676):559.
- (30) Halliwell B. The antioxidant paradox. The Lancet 2000 April 1;355(9210):1179-80.
- (31) De L, V, Melino G, Savini I, nnicchiarico-Petruzzelli M, Finazzi-Agro A, Avigliano L. Cell death by oxidative stress and ascorbic acid regeneration in human neuroectodermal cell lines. Eur J Cancer 1995;31A(4):463-6.
- (32) Riviere J, Ravanat JL, Wagner JR. Ascorbate and H2O2 induced oxidative DNA damage in Jurkat cells. Free Radical Biology and Medicine 2006 June 15;40(12):2071-9.
- (33) Poljsak B, Raspor P. The antioxidant and pro-oxidant activity of vitamin C and trolox in vitro: a comparative study. J Appl Toxicol 2007 June 20.
- (34) Lee SH, Oe T, Blair IA. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. Science 2001 June 15;292(5524):2083-6.

- (35) Chen Q, Espey MG, Sun AY, Pooput C, Kirk KL, Krishna MC et al. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. PNAS 2008 April 8.
- (36) MatEs JM, Perez-Gomez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. Clinical Biochemistry 1999 November;32(8):595-603.
- (37) Maramag C, Menon M, Balaji KC, Reddy PG, Laxmanan S. Effect of vitamin C on prostate cancer cells in vitro: effect on cell number, viability, and DNA synthesis. Prostate 1997 August 1;32(3):188-95.
- (38) Mayland CR, Bennett MI, Allan K. Vitamin C deficiency in cancer patients. Palliat Med 2005 January;19(1):17-20.
- (39) Jones DT, Trowbridge IS, Harris AL. Effects of Transferrin Receptor Blockade on Cancer Cell Proliferation and Hypoxia-Inducible Factor Function and Their Differential Regulation by Ascorbate. Cancer Res 2006 March 1;66(5):2749-56.
- (40) Kang JS, Cho D, Kim YI, Hahm E, Kim YS, Jin SN et al. Sodium ascorbate (vitamin C) induces apoptosis in melanoma cells via the down-regulation of transferrin receptor dependent iron uptake. J Cell Physiol 2005 July;204(1):192-7.
- (41) Carosio R, Zuccari G, Orienti I, Mangraviti S, Montaldo PG. Sodium ascorbate induces apoptosis in neuroblastoma cell lines by interfering with iron uptake. Mol Cancer 2007;6:55.
- (42) Best CJ, Gillespie JW, Englert CR, Swalwell JI, Pfeifer J, Krizman DB et al. New approaches to molecular profiling of tissue samples. Anal Cell Pathol 2000;20(1):1-6.
- (43) Weimann A, Belling D, Poulsen HE. Measurement of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxo-2'-deoxyadenosine in DNA and human urine by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. Free Radic Biol Med 2001 April 1;30(7):757-64.
- (44) Huang HY, Alberg AJ, Norkus EP, Hoffman SC, Comstock GW, Helzlsouer KJ. Prospective Study of Antioxidant Micronutrients in the Blood and the Risk of Developing Prostate Cancer. Am J Epidemiol 2003 February 15;157(4):335-44.
- (45) Eichholzer M, Stahelin HB, Ludin E, Bernasconi F. Smoking, plasma vitamins C, E, retinol, and carotene, and fatal prostate cancer: seventeen-year follow-up of the prospective basel study. Prostate 1999 February 15;38(3):189-98.
- (46) Chinery R, Brockman JA, Peeler MO, Shyr Y, Beauchamp RD, Coffey RJ. Antioxidants enhance the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in colorectal cancer: a p53-independent induction of p21WAF1/CIP1 via C/EBPbeta. Nat Med 1997 November;3(11):1233-41.
- (47) Drisko JA, Chapman J, Hunter VJ. The Use of Antioxidants with First-Line Chemotherapy in Two Cases of Ovarian Cancer. J Am Coll Nutr 2003 April 1;22(2):118-23.
- (48) Hoenjet KMJL, Dagnelie PC, Delaere KPJ, Wijckmans NEG, Zambon JV, Oosterhof GON. Effect of a Nutritional Supplement Containing Vitamin E, Selenium, Vitamin C and Coenzyme Q10 on Serum PSA in Patients with Hormonally Untreated Carcinoma of the Prostate: A Randomised Placebo-Controlled Study. European Urology 2005 April;47(4):433-40.
- (49) Yeom CH, Jung GC, Song KJ. Changes of terminal cancer patients' health-related quality of life after high dose vitamin C administration. J Korean Med Sci 2007 February;22(1):7-11.
- (50) Padayatty SJ, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, Hoffer LJ, Levine M. Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. CMAJ 2006 March 28;174(7):937-42.

- (51) Chen Q, Espey MG, Sun AY, Lee JH, Krishna MC, Shacter E et al. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. PNAS 2007 May 22;104(21):8749-54.
- (52) Venugopal M, Jamison JM, Gilloteaux J, Koch JA, Summers M, Hoke J et al. Synergistic antitumor activity of vitamins C and K3 against human prostate carcinoma cell lines. Cell Biol Int 1996 December;20(12):787-97.
- (53) Venugopal M, Jamison JM, Gilloteaux J, Koch JA, Summers M, Giammar D et al. Synergistic antitumor activity of vitamins C and K3 on human urologic tumor cell lines. Life Sci 1996;59(17):1389-400.
- (54) Wang MH, breu-Delgado Y, Young CYF. Effects of vitamin C on androgen receptor mediated actions in human prostate adenocarcinoma cell line LAPC-4. Urology 2003 July;62(1):167-71.
- (55) Menon M, Maramba C, Malhotra RK, Seethalakshmi L. Effect of vitamin C on androgen independent prostate cancer cells (PC3 and Mat-Ly-Lu) in vitro: involvement of reactive oxygen species-effect on cell number, viability and DNA synthesis. Cancer Biochem Biophys 1998 June;16(1-2):17-30.
- (56) Gunawardena K, Campbell LD, Meikle AW. Combination therapy with vitamins C plus E inhibits survivin and human prostate cancer cell growth. Prostate 2004 May 15;59(3):319-27.
- (57) Demole V. On the physiological action of ascorbic acid and some related compounds. Biochem J 1934;28(3):770-3.
- (58) Bram S, Froussard P, Guichard M, Jasmin C, Augery Y, Sinoussi-Barre F et al. Vitamin C preferential toxicity for malignant melanoma cells. Nature 1980 April 17;284(5757):629-31.
- (59) Coulter ID, Hardy ML, Morton SC, Hilton LG, Tu W, Valentine D et al. Antioxidants Vitamin C and Vitamin E for the Prevention and Treatment of Cancer. Journal of General Internal Medicine 2006;21(7):735-44.
- (60) Bubley GJ, Carducci M, Dahut W, Dawson N, Daliani D, Eisenberger M et al. Eligibility and response guidelines for phase II clinical trials in androgen-independent prostate cancer: recommendations from the Prostate-Specific Antigen Working Group. J Clin Oncol 1999 November;17(11):3461-7.
- (61) Scher HI, Kelly WM, Zhang ZF, Ouyang P, Sun M, Schwartz M et al. Post-therapy serum prostate-specific antigen level and survival in patients with androgen-independent prostate cancer. J Natl Cancer Inst 1999 February 3;91(3):244-51.
- (62) Berthold DR, Pond GR, Roessner M, de WR, Eisenberger M, Tannock AI. Treatment of hormone-refractory prostate cancer with docetaxel or mitoxantrone: relationships between prostate-specific antigen, pain, and quality of life response and survival in the TAX-327 study. Clin Cancer Res 2008 May 1;14(9):2763-7.
- (63) Petrylak DP, Ankerst DP, Jiang CS, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN, Jr. et al. Evaluation of prostate-specific antigen declines for surrogacy in patients treated on SWOG 99-16. J Natl Cancer Inst 2006 April 19;98(8):516-21.
- (64) Birtle AJ, Freeman A, Masters JR, Payne HA, Harland SJ. Clinical features of patients who present with metastatic prostate carcinoma and serum prostate-specific antigen (PSA) levels < 10 ng/mL: the "PSA negative" patients. Cancer 2003 December 1;98(11):2362-7.
- (65) Sciarra A, Mariotti G, Gentile V, Voria G, Pastore A, Monti S et al. Neuroendocrine differentiation in human prostate tissue: is it detectable and treatable? BJU International 2003;91(5):438-45.
- (66) Clamp A, Danson S, Nguyen H, Cole D, Clemons M. Assessment of therapeutic response in patients with metastatic bone disease. The Lancet Oncology 2004 October;5(10):607-16.

- (67) Imbriaco M, Larson SM, Yeung HW, Mawlawi OR, Erdi Y, Venkatraman ES et al. A new parameter for measuring metastatic bone involvement by prostate cancer: The bone scan index. Clin Cancer Res 1998;4(7):1765-72.
- (68) Yahara J, Noguchi M, Noda S. Quantitative evaluation of bone metastases in patients with advanced prostate cancer during systemic treatment. BJU International 2003;92(4):379-84.
- (69) Soloway MS, Hardeman SW, Hickey D, Raymond J, Todd B, Soloway S et al. Stratification of patients with metastatic prostate cancer based on extent of disease on initial bone scan. Cancer 1988 January 1;61(1):195-202.
- (70) Erdi YE, Humm JL, Imbriaco M, Yeung H, Larson SM. Quantitative bone metastases analysis based on image segmentation. J Nucl Med 1997 September;38(9):1401-6.
- (71) Sadik M, Jakobsson D, Olofsson F, Ohlsson M, Suurkula M, Edenbrandt L. A new computer-based decision-support system for the interpretation of bone scans. Nucl Med Commun 2006 May;27(5):417-23.
- (72) Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET et al. Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. American Journal of Clinical Oncology 1982;5:649-55.
- (73) Aaronson NK, Ahmedzai S, Bergman B, Bullinger M, Cull A, Duez NJ et al. The European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C30: a quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology. J Natl Cancer Inst 1993 March 3;85(5):365-76.
- (74) Pathak S, Singh R, Verschoyle RD, Greaves P, Farmer PB, Steward WP et al. Androgen manipulation alters oxidative DNA adduct levels in androgen-sensitive prostate cancer cells grown in vitro and in vivo. Cancer Letters 2008 March 8;261(1):74-83.
- (75) Lin CS, Wang LS, Tsai CM, Wei YH. Low copy number and low oxidative damage of mitochondrial DNA are associated with tumor progression in lung cancer tissues after neoadjuvant chemotherapy. Interact CardioVasc Thorac Surg 2008 December 1;7(6):954-8.
- (76) Huang HY, Helzlsouer KJ, Appel LJ. The Effects of Vitamin C and Vitamin E on Oxidative DNA Damage: Results from a Randomized Controlled Trial. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2000 July 1;9(7):647-52.
- (77) Caliskan-Can E, Firat H, Ardic S, Simsek B, Torun M, Yardim-Akaydin S. Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and its relationship with lipid peroxidation and antioxidant vitamins in lung cancer. Clin Chem Lab Med 2008;46(1):107-12.
- (78) Brown JE, Cook RJ, Major P, Lipton A, Saad F, Smith M et al. Bone turnover markers as predictors of skeletal complications in prostate cancer, lung cancer, and other solid tumors. J Natl Cancer Inst 2005 January 5;97(1):59-69.
- (79) Coleman RE, Major P, Lipton A, Brown JE, Lee KA, Smith M et al. Predictive value of bone resorption and formation markers in cancer patients with bone metastases receiving the bisphosphonate zoledronic acid. J Clin Oncol 2005 August 1;23(22):4925-35.
- (80) Brasso K, Christensen IJ, Johansen JS, Teisner B, Garnero P, Price PA et al. Prognostic value of PINP, bone alkaline phosphatase, CTX-I, and YKL-40 in patients with metastatic prostate carcinoma. Prostate 2006 April 1;66(5):503-13.
- (81) Johansen JS, Brasso K, Iversen P, Teisner B, Garnero P, Price PA et al. Changes of biochemical markers of bone turnover and YKL-40 following hormonal treatment for metastatic prostate cancer are related to survival. Clin Cancer Res 2007 June 1;13(11):3244-9.

- (82) Padayatty SJ, Sun H, Wang Y, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A et al. Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Ann Intern Med* 2004 April 6;140(7):533-7.
- (83) Tsao CS, Salimi SL. Evidence of rebound effect with ascorbic acid. *Medical Hypotheses* 1984 March;13(3):303-10.
- (84) European Commission. Good Manufacturing Practices - ANNEX 13. Rue de la Loi 200, B-1049 Bruxelles/Wetstraat 200, B-1049 Brussel - Belgium: European Commission; 2003 Jul 1.
- (85) Hunninghake RE, Jackson JA, Hyland. The Riordan Protocol. The Riordan Clinic 2009; Available from: URL: http://www.riordanclinic.org/research/vitaminc/Riordan_IVC_Protocol.pdf
- (86) Scher HI, Halabi S, Tannock I, Morris M, Sternberg CN, Carducci MA et al. Design and end points of clinical trials for patients with progressive prostate cancer and castrate levels of testosterone: recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. *J Clin Oncol* 2008 March 1;26(7):1148-59.
- (87) Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *New England Journal of Medicine* 2004;351(15):1502-12.
- (88) Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in Randomized Trials of Antioxidant Supplements for Primary and Secondary Prevention: Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* 2007 February 28;297(8):842-57.
- (89) Elmore AR. Final report of the safety assessment of L-Ascorbic Acid, Calcium Ascorbate, Magnesium Ascorbate, Magnesium Ascorbyl Phosphate, Sodium Ascorbate, and Sodium Ascorbyl Phosphate as used in cosmetics. *Int J Toxicol* 2005;24 Suppl 2:51-111.
- (90) Cook JD, Watson SS, Simpson KM, Lipschitz DA, Skikne BS. The effect of high ascorbic acid supplementation on body iron stores. *Blood* 1984 September;64(3):721-6.
- (91) Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. A Prospective Study of the Intake of Vitamins C and B6, and the Risk of Kidney Stones in Men. *The Journal of Urology* 1996 June;155(6):1847-51.
- (92) Massey LK, Liebman M, Kynast-Gales SA. Ascorbate Increases Human Oxaluria and Kidney Stone Risk. *Journal of Nutrition* 2005 July 1;135(7):1673-7.
- (93) Chan D, Irish A, Dogra G. Efficacy and safety of oral versus intravenous ascorbic acid for anaemia in haemodialysis patients. *Nephrology (Carlton)* 2005 August;10(4):336-40.
- (94) Hoffer LJ, Levine M, Assouline S, Melnychuk D, Paddayatty SJ, Rosadiuk K et al. Phase I clinical trial of i.v. ascorbic acid in advanced malignancy. *Ann Oncol* 2008 June 9;mdn377.
- (95) Hancke C. Practices of intravenously administered sodium ascorbate in a Danish clinic. 2007. Ref Type: Personal Communication
- (96) Rees DC, Kelsey H, Richards JD. Acute haemolysis induced by high dose ascorbic acid in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *BMJ* 1993 March 27;306(6881):841-2.
- (97) Sorscher SM. Tumor lysis syndrome following docetaxel therapy for extensive metastatic prostate cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004 August;54(2):191-2.
- (98) Djavan B, Margreiter M. Biopsy standards for detection of prostate cancer. *World J Urol* 2007 March;25(1):11-7.

- (99) International Conference on Harmonisation. ICH Harmonised Tripartite Guideline for Good Clinical Practice. 3 ed. London: Informa; 2005.
- (100) Noguchi M, Kikuchi H, Ishibashi M, Noda S. Percentage of the positive area of bone metastasis is an independent predictor of disease death in advanced prostate cancer. Br J Cancer 2003 January 27;88(2):195-201.
- (101) Altman DG. Practical statistics for medical research. 1 ed. London: Chapman & Hall; 1991.
- (102) Mostaghel EA, Page ST, Lin DW, Fazli L, Coleman IM, True LD et al. Intraprostatic Androgens and Androgen-Regulated Gene Expression Persist after Testosterone Suppression: Therapeutic Implications for Castration-Resistant Prostate Cancer. Cancer Res 2007 May 15;67(10):5033-41.
- (103) Cresta S, Sessa C, Catapano CV, Gallerani E, Passalacqua D, Rinaldi A et al. Phase I study of bortezomib with weekly paclitaxel in patients with advanced solid tumours. Eur J Cancer 2008 September;44(13):1829-34.
- (104) Dobbin K, Simon R. Sample size determination in microarray experiments for class comparison and prognostic classification. Biostatistics 2005 January;6(1):27-38.
- (105) Lykkesfeldt J. Measurement of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Biological Samples. Current Protocols in Toxicology 2002;7(6 (12)):1-15.
- (106) Boutros PC, Okey AB. Unsupervised pattern recognition: an introduction to the whys and wherefores of clustering microarray data. Brief Bioinform 2005 December;6(4):331-43.
- (107) PreAnalytix. PAX-Gene Blood RNA Kit Handbook. 4-1-2008. Hombrechtikon, CH, Qiagen.
Ref Type: Catalog
- (108) Ellis M, Davis N, Coop A, Liu M, Schumaker L, Lee RY et al. Development and validation of a method for using breast core needle biopsies for gene expression microarray analyses. Clin Cancer Res 2002 May;8(5):1155-66.
- (109) Fukabori Y, Yoshida K, Nakano K, Shibata Y, Yamanaka H, Oyama T. Preparation of a single prostate needle biopsy specimen for histological diagnosis and RNA analysis. J Urol 2006 September;176(3):1204-7.
- (110) Mikulowska-Mennis A, Taylor TB, Vishnu P, Michie SA, Raja R, Horner N et al. High-quality RNA from cells isolated by laser capture microdissection. Biotechniques 2002 July;33(1):176-9.

20. Bilag

Danish titles in ()

Appendices in [brackets] are pending

Appendices in < > are not yet required

Protocol:

<Amendment protocols (tillægsprotokoller)>

<Log of amendments (log over tillægsprotokoller)>

Signed agreements from project group members (underskrevne protokoller)

Project group:

Project group resumes

Task distribution list (opgavefordelingsliste)

Permissions and applications:

[Danish Medicines Agency application (Lægemiddelstyrelsen – ansøgning)]

[Danish Medicines Agency approval (Lægemiddelstyrelsen – godkendelse)]

Danish Medicines Agency communication (Lægemiddelstyrelsen – kommunikation)

[Regional Research Ethics Committee Denmark application (De Videnskabsetiske komiteer for Region Hovedstaden - ansøgning)]

[Regional Research Ethics Committee Denmark approval (De Videnskabsetiske komiteer for Region Hovedstaden - approval)]

[EudraCT – EU Community Clinical Trial System application (EudraCT ansøgning)]

[EudraCT – EU Community Clinical Trial System approval (EudraCT – godkendelse)]

[Clinical Trials <http://clinicaltrials.gov> – application (Clinical Trials <http://clinicaltrials.gov> ansøgning)]

[Clinical Trials <http://clinicaltrials.gov> – registration (Clinical Trials <http://clinicaltrials.gov> registrering)]

The Danish Data Protection Agency application (Datatilsynet - ansøgning)

[The Danish Data Protection Agency (Datatilsynet – godkendelse)]

Cooperation agreements:

[Department of Urology, Herlev Hospital consent form (Urologisk Afdeling, Herlev Hospital – samarbejdsdeklaration)]

[GCP-Unit, Region Hovedstaden – declaration of cooperation (GCP-enheden, Region Hovedstaden, Samarbejdsaftale)]

[Region Hovedstaden, Central Pharmacy – declaration of cooperation (Centralapoteket, Region Hovedstaden – samarbejdsaftale)]

Case report forms:

Demographics

Concurrent medications

Prior treatment, general

Prior treatment, prostate cancer

Venous blood samples

Inclusion and exclusion criteria

Clinical observations

Project medications - infusions

Diagnostic imaging

Microarray data

Histopathological data
Serious adverse events (SAEs)
Suspected unexpected serious adverse reactions (SUSARs)
Vitamin C measurement
Radio-nucleotide scan
End-of-study
Project medications – vitamin C oral supplements

Subject information:

Subject information (deltagerinformation)
Lay man's protocol (lægmandsprotokol)
Subject FAQ (deltagerinformation – spørgsmål og svar)
Subject time line (deltagerinformation – tidslinie)
Subject rights in clinical trial (Dine rettigheder som forsøgsperson)
Consent form (Samtykkeerklæring)
Consent form – additional 8 weeks treatment (Samtykkeerklæring, yderligere 8 ugers behandling)
[Fuldmagt]
[Subject ID card (Deltagerkort)]

Budget

Trial master file sponsor-investigator
Vitamin C sampling bedside
Subject identification list (Forsøgsperson Identifikationsliste)

Product information Vitamin C supplements – 'Apotekets Stærk C-vitamin syreneutral'
(Produktresumé – 'Apotekets Stærk C-vitamin syreneutral')

Table 1 - Samlet oversigt over blodprøver og øvrige undersøgelser

Uge 13 - 20forsæt: kun hvis kriterier herfor er opfyldt (PSArespons)

| | Før / Uge 0 | Uge 1 | Uge 2 | Uge 3 | Uge 4 | Uge 5 | Uge 6 | Uge 7 | Uge 8 | Uge 9 | Uge 10 | Uge 11 | Uge 12 | Uge 13 | Uge 14 | 15 uger | Uge 16 | Uge 17 | Uge 18 | Uge 19 | Uge 20-forsæt | Uge 20 | Uge 26 | Uge 52 |
|---|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|---------------|--------|--------|--------|
| Blodprøver - Rutineanalyser KBA Herlev | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hgb | x | | | x | | | x | | | x | | | x | | | | x | | | | x | x | x | x |
| Leucocyter | x | | | | | | x | | | x | | | x | | | | x | | | | x | x | x | x |
| Koag f 2+7+10, % + INR | x | | | | | | | | | | x | | | | | | | | | x | | | | |
| LDH | x | x | x | x | x | x | x | | | x | | | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| Bas.fosfat. | x | | | x | | | x | | | x | | | x | | | | x | | | | x | x | x | x |
| K ⁺ | x | | | x | | | x | | | x | | | x | | | | x | | | | x | x | x | x |
| Na ⁺ | x | | | x | | | x | | | x | | | x | | | | x | | | | x | x | x | x |
| Creatinin | x | | | x | | | x | | | x | | | x | | | | x | | | | x | x | x | x |
| Bilirubin | x | x | | x | | | x | | | x | | | x | | | | x | | | | x | x | x | x |
| ASAT/ALAT | x | | | x | | | x | | | x | | | x | | | | x | | | | x | x | x | x |
| Albumin | x | | | x | | | x | | | x | | | x | | | | x | | | | x | x | x | x |
| Urat | x | x | | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| phosphat | x | x | | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Jern | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ferritin | x | | | x | | | x | | | x | | | x | | | | x | | | | x | x | x | x |
| PSA | x | | | | | | x | | | x | | | x | | | | x | | | | x | x | x | x |
| Transferrin | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ca ²⁺ | x | | | x | | | x | | | x | | | x | | | | x | | | | x | x | x | x |
| CRP | x | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | x | x | x | |
| Haptoglobin | x | x | | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Blodprøver - Rutineanalyser SSI / RH | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Testosteron | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G-6-Pdh-screening | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Blodprøver - Specielle | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| plasma-VC | x | x | x | x | x | x | x | | | x | | | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| bALP | x | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | x | x | x | x |
| PINP | x | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | x | x | x | x |
| YKL-40 | x | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | x | x | x | |
| Lymfocytter (biobank) | x | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | x | | | |
| URINprøver | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| U-NTx ANDEN SPOT | x | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | x | x | x | x |
| U-8-oxoguanidin DØGN | x | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | x | | | |
| Øvrige scoringer / undersøgelser | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ECOG | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| EORCT Core+P25 | x | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | | | | |
| Prostatabiopsier | x | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | x | | | |
| Knoglescintigrafi | x | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | | | x | x |

Udskrevet:

8. juli 2011