

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

**2001 - 4137**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17.05.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **17.05.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/9906207**

(33) Země priority: **FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.06.2002**  
(Věstník č. 6/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/FR00/01315**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/69413**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**A 61 K 9/16**

**A 61 P 35/00**

(71) Přihlašovatel:

**LABORATOIRES DES PRODUITS ETHIQUES  
ETHYPHARM, Houdan, FR;**

(72) Původce:

**Faisant Nathalie, Montreuil-sur-Maine, FR;  
Benoit Jean-Pierre, Avrille, FR;  
Menei Philippe, Avrille, FR;**

(74) Zástupce:

**PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,  
14000;**

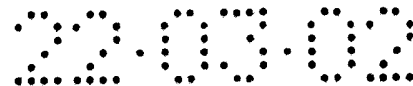
(54) Název přihlášky vynálezu:

**Použití biodegradovatelných mikrosférů  
uvolňujících protirakovinné činidlo**

(57) Anotace:

Použití biodegradovatelných mikrokuliček se zpožděným uvolňováním radiosenzibilizující protinádorové látky pro výrobu léku určeného k léčbě glioblastomu a prodlužujícího život pacientů po operativním odstranění nádoru na nejméně 90 týdnů.

**CZ 2001 - 4137 A3**



## **Použití biodegradovatelných mikrokuliček uvolňujících protinádorovou látku pro přípravu léku k léčbě glioblastomů.**

### **Oblast techniky**

Žádost se týká použití biodegradovatelných mikrokuliček uvolňujících protinádorovou látku pro přípravu léku k léčbě glioblastomů.

### **Dosavadní stav techniky**

Glioblastom patří mezi vzácná onemocnění registrovaná National Organization for Rare Disorders.

Maligní gliové nádory jsou původní nádory centrálního nervového systému a představují 13 až 22 % vnitrolebečních nádorů. Na histologické úrovni rozeznáváme dva typy maligních gliových nádorů: anaplastické astrocytomy a glioblastomy, které představují nejméně diferenciovanou formu těchto nádorů.

V současné době neexistuje účinná léčba maligních gliových nádorů. Pacienti postižení glioblastomem nepřežívají déle než jeden rok i přesto, když se k chirurgickému zákroku přidruží chemoterapie a radioterapie.

Léčba maligních gliových nádorů je omezena zvláště třemi skutečnostmi.

První je existence hematoencefalické bariéry (BHE), která izoluje centrální nervový systém od zbytku organismu. BHE propouští pouze molekuly malých rozměrů, které jsou rozpustné v tucích. Ostatní molekuly je nutno podávat ve velmi vysokých dávkách, aby dosáhly centrálního nervového systému, a to za cenu významných vedlejších účinků.

Druhý faktor omezující účinnost léčby gliových nádorů je infiltrující povaha těchto nádorů. Vzhledem k tomu, že je mozek vysoce funkční orgán, je nemožné v něm provést rozsáhlý chirurgický zákrok v onkologickém smyslu slova. Jakkoli je vynětí nádoru úplné, stále zůstává pouze makroskopicky úplným vynětím, které zanechává velký počet nádorových buněk infiltrovaných do stěny dutiny po vynětí nádoru. Mnozí autoři dále ukázali že 90 % operovaných maligních gliových



nádorů následně ošetřených radioterapií recidivuje v oblasti dvou centimetrů od původního místa nádoru.

Poslední faktor omezující účinnost léčby gliových nádorů je nízký terapeutický index. Nádorové buňky se ukrývají za normální a extrémně křehkou tkáň, citlivou na podráždění způsobené radioterapií nebo některými protinádorovými látkami. Proto je těžké zničit nádorové buňky bez současného zničení normálních nervových buněk.

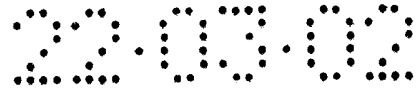
Pokroky dosažené v léčbě gliových nádorů jsou nedostatečné (Kornblith PL, Walker M, Chemotherapy for malignant gliomas. *J. Neurosurg*, 68:1-17, 1988 ; Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Selker RG, VanGilder JC, Robertson JT, Mahaley SM, A randomized comparison of intra-arterial versus intravenous BCNU with or without intravenous 5-fluorouracil, for newly diagnosed patients with malignant glioma, *J. Neurosurg*. 76:772-781, 1992).

V současné době je klasická léčba glioblastomů následující po chirurgické resekci založena na externí radioterapii. Neumožňuje prodloužit dobu života na více než jeden rok. Spojení radioterapie s chemoterapií založenou na 1-(2-chloroethyl)-3-cyklohexyl-1-nitroso-urei (BCNU) je účinné pouze na anaplastických astrocytomech. Je malým přínosem, neboť zvyšuje procento žijících pacientů až teprve v osmnácti měsících. Délka přežití se přitom nemění.

Imunoterapie se nikdy neprosadila a genetická terapie se teprve musí osvědčit.

Bylo testováno několik postupů cílených na zvýšení lokální koncentrace protinádorových látek, jako je osmotické porušení hematoencefalické bariéry, injekce do mozkomíšního moku nebo do arteria carotis, transport léku do nitra nádoru pomocí podkožních rezervoárů (Tamargo RJ et Brem H, Drug delivery to the central nervous system, *Neurosurgery Quaterly*, 2: 259-279, 1992). Žádný z těchto postupů nemohl zvýšit dobu přežití pacientů a některé se ukázaly být vysoce toxické.

Během posledních let lékařský farmaceutický výzkum umožnil vývoj implantovatelných polymerních systémů, které chrání účinné látky před degradací a umožňují jejich uvolnění kontrolovaným způsobem během stanovené doby a



zároveň snižují vedlejší systémové efekty. Výhody těchto implantovatelných polymerních systémů nedávno podnítily několik skupin ke studiu jejich aplikace v patologii centrálního nervového systému (Langer R, Polymer implants for drug delivery in the brain, *J. Controlled Release*, 16: 53-60, 1991). Konkrétně takové systémy implantované do stěny po odstranění maligních gliomů opožďují nádorovou recidivu a prodlužují život pacienta. V okolí operační dutiny přetrvávají izolované maligní buňky odpovědné za 90 % recidiv a vznikají v oblasti 2 cm od operovaného místa. V této oblasti je nervová tkáň funkční a hematoencefalická bariéra je dosud nedotčena, což omezuje účinnost běžné chemoterapie a radioterapie.

Byly vyvinuty a na zvířatech otestovány rozličné implantovatelné polymerní systémy uvolňující účinné molekuly.

Přes skromné výsledky v klinických studiích byl vyvinut systém biodegradovatelných disků složených z PCPP-SA (poly[1,3-bis(karboxyfenoxi)propan-ko-sebaková kyselina]) a uvolňujících BCNU (GLIADEL®) (Brem H, Polymers to treat brain tumors, *Biomaterials* 11: 699-701, 1990; Brem H, Mahaley MS, Vick NA, Black KL, Schold SC, Eller TW, Cozzens JW, Kenealy JN, Interstitial chemotherapy with drug polymer implants for the treatment of recurrent gliomas, *J. Neurosurg* 74: 441-446, 1991; Brem H, Walter KA, Langer R, Polymers as controlled drug delivery devices for the treatment of malignant brain tumors, *Eur J Pharm Biopharm*, 39 (1): 2-7, 1993; Brem H, Piantadosi S, Burger PC, Walker M, et al., Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent glioma, *Lancet*, 345: 1008-1012, 1995).

Byly připraveny mikrokuličky uvolňující BCNU, ale výsledky studií u zvířat byly málo povzbuzující (Torres AI, Boisdron-Celle M, Benoit JP, Formulation of BCNU-loaded microspheres: influence of drug stability and solubility on the design of the microencapsulation procedure, *J. Microencapsulation*, 13: 41-51, 1996; Painbėni T, Venier-Julienne MC, Benoit JP, Internal morphology of poly(D,L-lactide-co-glycolide) BCNU-loaded microspheres. Influence on drug stability, *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 1998, 45, 31-39).

### Podstata vynálezu

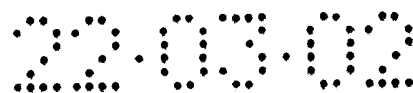
Vynález se týká použití implantovatelných biodegradovatelných mikrokuliček, které uvolňují protinádorovou látku, k léčbě glioblastomu. Použití těchto mikrokuliček je spojeno s radioterapií a chirurgií. Po vyjmutí nádoru jsou do tkáně v operační dutině injekcí implantovány biodegradovatelné mikrokuličky, které uvolňují protinádorovou látku. Nejpozději do sedmi dnů po zákroku se přistoupí k radioterapii.

Díky použití těchto mikrokuliček žadatel dokázal velmi výhodným způsobem prodloužit dvakrát dobu přežití pacientů trpících glioblastomem. Použití mikrokuliček podle vynálezu skutečně umožňuje dosáhnout doby přežití nejméně 90 týdnů.

Vynález se tedy týká použití biodegradovatelných mikrokuliček, které uvolňují radiosenzibilizující protinádorovou látku, pro výrobu léku určeného k léčbě glioblastomu za současného, odděleného nebo v čase rozprostřeného použití s radioterapií, tyto mikrokuličky jsou určeny k implantaci do operační dutiny po vyjmutí gliového nádoru. Vynález se vyznačuje tím, že mikrokuličky obsahující protinádorovou látku jsou obaleny polymerem zpožďujícím uvolňování protinádorové látky a udržujícím v parenchymové oblasti v průběhu času její terapeuticky účinnou koncentraci, tak aby se dosáhlo u takto léčených pacientů doby přežití nejméně 90 týdnů, výhodně 130 týdnů a ještě výhodněji 160 týdnů.

Mikrokuličky použité v rámci vynálezu obsahují protinádorovou látku, která je přednostně hydrofilní a/nebo neproniká hematoencefalickou bariéru. Je výhodné, když protinádorová látka není pro centrální nervový systém toxická. Tato protinádorová látka působí přednostně na dělicí se buňky.

Protinádorová látka je tvořena jednou protinádorovou radiosenzibilizující sloučeninou nebo směsí protinádorových sloučenin obsahující nejméně jednu protinádorovou radiosenzibilizující sloučeninu, tzv. protinádorové sloučeniny jsou vybrány ze skupiny obsahující 5-fluorouracil(5-FU), platinu jako karboplatina a cisplatina, taxany jako docetaxel a paklitaxel, gemcitabin, VP16, mitomycin, idoxuridin, inhibitory topoizomerázy I jako irinotekan, topotekan a camtotheciny, nitrosourei, jako BCNU, ACNU nebo MCNU, methotrexat, bleomycin, adriamycin,

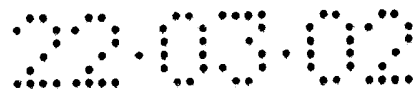


cytoxan a vinkristin, imunomodulační cytokiny jako IL2, IL6, IL12 a IL13 a interferony.

### Protinádorová látka je přednostně 5-FU

5-FU je stará a dobře známá antimitotická látka. Je to hydrofilní látka, která prochází velmi slabě hematoencefalickou bariérou, její aktivita je tedy zvyšována lokálním podáním (Bourke RS, West CR, Chheda G et al., Kinetics of entry and distribution of 5-fluorouracil in CSF and brain following intravenous injection in primate, *Cancer Res*, 33: 1735-1746, 1973; Gerosa MA, Dougherty DV, Wison CB, Rosenblum ML, Improved treatment of a brain tumor model, Part 2: Sequential therapy with BCNU and 5-fluorouracil, *J. Neurosurg.* 58: 368, 1983; Kotsilimbas DG, Karpf R, Meredith S, Scheinberg LC, Evaluation of parenteral 5-FU on experimental brain tumors, *Neurology*, 16: 916-918, 1966; Levin VA, Edwards MS, Wara WM, Allen J, Ortega J, Vestnys P, 5-fluorouracil and 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU) followed by hydroxyurea, misonidazole and irradiation for brain stem gliomas: a pilot study of the brain tumor research center and the children cancer group, *Neurosurgery*, 14: 679-681, 1984; Oda Y, Tokuriki y, Tsuda E, Handa H, Kieler J, Trial of anticancer pellet in malignant brain tumours, 5-FU and urokinase embedded in silastic. *Proceeding of the 6<sup>th</sup> European Congress of Neurosurgery*, *Acta neurochirurgica*, Suppl. 28: 489-490, 1979; Penn RD, Kroin JS, Harris JE, Chiu KM, Braun DP, Chronic intratumoral chemotherapy of a rat tumor with cisplatin and fluorouracil, *Appl. Neurophysio*, 46: 240-244, 1983; Shapiro WR, Studies on the chemotherapy of experimental brain tumors: Evaluation of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea, Vinscristine and 5-Fluorouracil, *J. Nat. Cancer Institute*, 46(2), 359-368, 1971; Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Selker RG, VanGilder JC, Robertson JT, Mahaley SM, A randomized comparison of intra-arterial versus intravenous BCNU with or without intravenous 5-fluorouracil, for newly diagnosed patients with malignant glioma, *J. Neurosurg*, 76: 772-781, 1992; Soloway AH, Mark VH, Dukat EG et al., Chemotherapy of brain tumors. I-Transplanted murine ependymblastomas, *Cancer Chemother Rep.*, 36: 1-4, 1964).

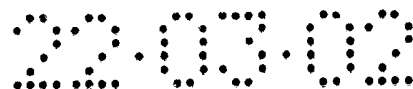
Aktivita 5-FU je rovněž zvýšená při prodlouženém podávání. 5-FU je látka, jejíž účinek je vyvolán interferencí se syntézou nukleových kyselin. Studie ukázaly, že pouze 30 až 50 % buněk maligního myšího gliomu (L9) a 14 až 44 % buněk maligního lidského gliomu se v každou chvíli dělí. Navíc jsou doby buněčného cyklu glioblastomu dlouhé (20 hodin pro gliom L9, 3 až 7 dnů pro lidský



glioblastom). Klírens 5-FU v plazmě je rychlá (poločas 30 min) (Neuwelt EA, Barnett PA, Frenkel EP, Chemotherapeutic agent permeability to normal brain and delivery to avian sarcoma virus-induced brain tumors in the rodent: observation on problems of drug delivery, *Neurosurgery*, 14: 154-160, 1984). 5-FU tedy nemůže při systémovém podání nebo lokální injekcí zničit velký počet maligních buněk.

5-FU zásadně působí na rychle se obnovující tkáň a je vyjíměčně neurotoxický. 5-FU zasahuje do syntézy nukleových kyselin, které rychle rostoucí tkáň velmi potřebují, aby zajistily svou proliferaci a regeneraci. To samozřejmě není případ mozkové tkáň, kde je mitóza za normálního stavu vzácná, a dochází k ní pouze v samotném centru gliové populace. Toxické efekty 5-FU omezující jeho podávání běžnou cestou jsou hlavně hematologické a gastrointestinální. Byly publikovány pouze vzácné sekundární neurologické účinky 5-FU, jejich etiopatogeneze je málo známá a je důsledkem více faktorů (blokování Krebsova cyklu katabolytem 5-FU nebo zesílení předem existujícího nedostatku thyaminu (Aoki N, Reversible leukoencephalopathy caused by 5-fluorouracil derivatives, presenting as akinetic mutism, *Surg Neurol*, 25: 279-282, 1986; Moore DH, Fowler WC, Crumpler LS, 5-fluorouracil neurotoxicity, case report, *Gynecol Oncology*, 36: 152-154, 1990).

Konečně 5-FU je radiosensibilizující látkou (Koutcher JA, Alfieri AA, Thaler h et al., Radiation enhancement by biochemical modulation and 5-FU, *Int. J. Radit. Biol. Phys.*, 39: 1145-1152, 1997). Větší účinek spojení 5-FU s radioterapií v každém jednotlivém léčení byl prokázán již v 60. letech na zvířecích modelech a na nádorových buňkách *in vitro* (Bagshaw M, A possible role of potentiation in radiation therapy, *Amer J. Roentgenol*, 85: 822-833, 1961; Vietti T, Eggerding F, Valeriotte F, Combined effect of X-radiation and 5-fluorouracil on survival of transplanted leukemic cells, *J. Natl. Inst.*, 47: 865-870, 1971). Tento synergický účinek 5-FU je pravděpodobně způsoben synchronizací nádorové buněčné populace a omezením buněčných reparačních mechanismů. Na člověku se již také zkoušelo spojení 5-FU s antipirimidinem (5-FU nebo BrudR) (Goffman TE, Dachowski LJ, Bobo H et al., Long term follow-up on national cancer institute phase I/II study of glioblastoma multiforme treated with iododeoxyuridine and hyperfractionated irradiation, *J Clinical Oncology*, 10: 264-268, 1992). Absenci přímé účinnosti zde lze vysvětlit systémovým podáváním léčiva.



Jestliže je protinádorovou látkou 5-FU, koncentrace protinádorové látky v mozkomíšním moku, která odráží koncentraci v parenchymovém prostoru, je 3 až 20 ng/ml.

Pro omezení neurotoxicity protinádorové látky obsažené v mikrokuličkách použitých v rámci tohoto vynálezu, lze k protinádorové látce výhodně přidat neuroprotektivní sloučeninu. Tato neuroprotektivní sloučenina je vybrána mezi peptidovými růstovými faktory jako je NGF nebo BDNF.

Biodegradovatelné mikrokuličky použité v rámci vynálezu jsou obaleny polymerem, který zpochďuje uvolňování protinádorové látky, a udržuje v parenchymovém prostoru její terapeuticky účinnou koncentraci v průběhu nejméně tří týdnů, přednostně nejméně čtyř týdnů.

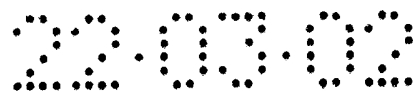
Polymer je vybrán z následujících látek: ethylcelulóza, polystyren, poly( $\epsilon$ -caprolacton), poly(kyselina d,l-mléčná) a poly(kyselina d,l-mléčná-ko-kyselina glykolová).

Polymer je přednostně poly(kyselina d,l-mléčná-ko-kyselina glykolová) nebo PLAGA, který je autorizovaným biodegradovatelným polymerem pro přípravu farmaceutických přípravků s prodlouženým uvolňováním účinné látky (na rozdíl od PCPP-SA, který není schválen pro široké klinické použití).

Poly(kyselina d,l-mléčná-ko-kyselina glykolová) je přednostně PLAGA 50:50 (i.e. obsahující stejné množství kyseliny mléčné a kyseliny glykolové), například Resomer® RG 506 dodávaný BI Chimie, France, o molekulové hmotnosti 72000, s polydisperzním indexem 1,8 a inherentní viskozitou 0,80 dl/g (0,1% roztok polymeru v chloroformu při 25 °C).

PLAGA je hydrofobní kopolymer, z něhož hydrolytickou degradací vznikají dva normální biologické substráty, kyselina mléčná a kyselina glykolová, metabolizované na konci aerobní glykolýzy na CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. Dnes již staré studie ukázaly, že dýchací řetězec je hlavní cestou odbourávání těchto dvou substrátů. Rychlost biodegradace PLAGA závisí na vzájemném poměru kyseliny mléčné a kyseliny glykolové. PLAGA je dokonale biokompatibilní a vyvolává mírnou reakci k cizorodým látkám (Visscher GE, RL Robinson, HV Mauding, Fong JW, Pearson JE, Argentiers GJ, Biodegradation of and tissue reaction to 50: 50 poly(DL-lactide-





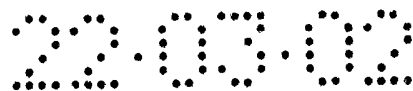
co-glycolide) microcapsules, *J. Biomed. Mat. Res.* 19: 349-365, 1985). PLAGA se objevuje ve složení chirurgických nití (Frazza EJ, Schmidt EE, A new absorbable suture, *J. Biomed. Mater. Res.*, 5: 43-58, 1971) a farmaceutických podkožně implantovatelných forem (Jalil R, Nixon JR, Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties (Review), *J. Microencapsulation*, 7: 297-325, 1990). Bylo dokázáno, že mikrokuličky PLAGA 50:50 mohou být sterilizovány zářením  $\gamma$ , a pokud jsou stereotakticky implantovány do mozku hlodavce, jsou celkově biodegradovány do dvou měsíců a způsobují pouze mírnou nespecifickou reakci astrocytárního a histiocytárního typu (Menei P, Daniel V, Montero-Menei C, Brouillard M, Pouplard-Barthelaix A, Benoit JP : Biodegradation and brain tissue reaction to poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres, *Biomaterials* 14: 470-478, 1993; Menei P, Croue A, Daniel V, Pouplard-Barthelaix A, Benoit JP: Fate and biocompatibility of three types of microspheres implanted into the brain, *J. Biomed Mat Res*, 28, 1079-1085, 1994). Tento poslední výsledek byl od té doby potvrzen Kou JH, Emmett C, Shen P et al., Bioerosion and biocompatibility of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) implants in brain, *J Control Release*, 43, 123-130, 1997.

Biodegradovatelné mikrokuličky podle vynálezu mají přednostně střední průměr  $48 \pm 20 \mu\text{m}$ , přednostně  $46 \pm 7 \mu\text{m}$ . Obsahují 15 % až 35 % hmotnostních protinádorové látky, přednostně 19 % až 27 % hmotnostních 5-FU, přednostně ještě 20 % hmotnostních 5-FU a 65 % až 85 % hmotnostních polymeru.

V rámci tohoto vynálezu jsou obzvláště upřednostňovány mikrokuličky obsahující PLAGA 50:50, které slouží jako vehikulum pro 5-FU.

Mikrokuličky obsahující PLAGA 50:50, které slouží jako vehikulum pro 5-FU, mohou *in vitro* uvolňovat 5-FU po dobu 21 dnů. *In vivo*, implantovány podkožně králíkovi, dovolí tyto mikrokuličky dosáhnout vyrovnané koncentrace 5-FU v plazmě během 23 dnů. Stále *in vivo* a v mozku hlodavců jsou krystaly 5-FU pozorovatelné v mikrokuličkách nejméně do devatenáctého dne. Po intracerebrální implantaci PLAGA-5-FU mikrokuliček (7 mg/kg 5-FU) králíkovi nejsou v séru detekovány žádné stopy 5-FU, což naznačuje téměř nulový přechod drogy do systémového oběhu.

Po intracerebrální implantaci PLAGA-5-FU mikrokuliček v celkové dávce 17 mg/kg 5-FU nebyly pozorovány žádné známky systémové toxicity ani žádné



známky klinické nebo histologické neurotoxicity. Ve frakcionované dávce 24 Gy je spojení 5-FU mikrokuliček s cerebrální radioterapií dokonale tolerováno. (Menei P, Vectorisation dans le SNC par implantation stéréotaxique de microspheres, These d'Université en Sciences Pharmaceutiques, Université d'Angers, 1995). Nakonec tyto mikrokuličky implantované stereotakticky do nitra maligního gliomu vyvinutého u krysy (gliom C6) významně snižují úmrtnost (Menei P, Boisdron-Celle M, Croue A, Guy G, Benoit JP, Effect of stereotactic implantation of biodegradable 5-fluorouracil-loaded microspheres in normal and C6-glioma bearing rats, Neurosurgery, 39: 117-124, 1996).

Výhodným způsobem jsou mikrokuličky převedeny do suspenze ve sterilním roztoku. Suspenze je injikována do stěn operační dutiny po vyjmutí nádoru.

Sterilní roztok obsahuje přednostně:

- 1 % až 1,5 %, přednostně 1,25 % hmotnostněobjemových látky zvyšující viskozitu, například sodnou sůl karboxymethylcelulózy,
- 0,5 % až 1,5 %, přednostně 1 % tenzidu, například polysorbátu 80<sup>®</sup> a
- 3,5 % až 4,5 %, přednostně 4 % izotonizující látky, například manitolu.

Mikrokuličky jsou přednostně převedeny do suspenze rychle a těsně před injekcí. Suspenze přednostně obsahuje 3 ml výše popsaného sterilního roztoku a 700 až 800 mg biodegradovatelných mikrokuliček.

Po potvrzení glioblastomové diagnózy a makroskopickém vyjmutí gliového nádoru je suspenze mikrokuliček implantována do stěn operační dutiny do hloubky nejméně dvou centimetrů, přednostně 2 až 3 centimetrů, na nejméně každý cm<sup>2</sup>.

Pokud je protinádorovou látkou 5-FU, celková dávka injikované suspenze odpovídá 50 až 200 mg 5-FU.

Radioterapie je zaostřena na oblast nádoru, ozářený objem obsahuje preoperační nádor s okrajem nejméně dvou centimetrů ve všech směrech a je aplikována celková dávka 50 až 60 Gy.

Radioterapie je zahájena přednostně mezi druhým a sedmým dnem následujícím po operaci. Celková dávka 50 až 60 Gy je rozložena na dobu 4 až 8 týdnů, například 5 dávek za týden.

Radioterapie je přednostně provedena s celkovou dávkou 60 Gy během šesti týdnů, přednostně ještě s pěti dávkami týdně během 6,5 týdnů.

Po injekci mikrokuliček hned po vyjmutí nádoru jedna nebo více nových injekcí mikrokuliček mohou být stereotakticky provedeny v případě návratu nádoru.

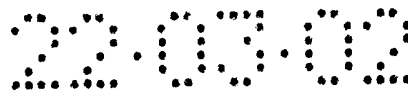
Mikrokuličky použité v rámci vynálezu mohou být připraveny emulzně-extrakční technikou, podle jedné varianty popsané Boisdron-Celle M, Menei P, Benoit JP: Preparation of biodegradable 5-fluorouracil-loaded microspheres, *J Pharm Pharmacol*, 47, 108-114, 1995.

Vynález se zároveň týká postupu přípravy mikrokuliček obsahujících protinádorovou látku obalenou polymerem a použitých podle vynálezu. Důležité kroky v tomto postupu spočívají v přípravě organické fáze, ve které jsou protinádorová látka a polymer dispergovány v organickém rozpouštědle. Organická a vodná fáze jsou převedeny na emulzi, potom je organické rozpouštědlo extrahováno přidáním vody. Nakonec je získaná suspenze mikrokuliček filtrována.

Postup v tomto vynálezu se v první řadě vyznačuje tím, že protinádorová látka je dispergována v organickém rozpouštědle za silného míchání před přidáním polymeru.

Podle úprav zavedených do postupu podle dřívějšího stavu techniky je účinná látka drcena v drtiči s planetární kuličkou. Velikost získaných krystalů je 15 až 50  $\mu\text{m}$ . Velikost krystalů určených k zapouzdření a jejich disperze jsou zásadní kritéria pro zvládnutí výše zapouzdření a kinetiky uvolňování účinné látky *in vitro*.

Účinná látka je potom a ještě před přidáním polymeru dispergována v organickém rozpouštědle, přednostně v dichloromethanu, ve zkumavce s kulatým dnem, za míchání homogenizační tyčinkou.



Homogenizace umožní získání homogenní suspenze, zmírnění rozdílů mezi různými šaržemi prošlými drcením a zmenšení velikosti krystalů účinné látky.

Organická fáze je připravena v rozpouštědle bez druhého rozpouštědla. Nepřítomnost druhého rozpouštědla umožňuje zpomalit precipitaci polymeru během emulgační fáze a zároveň jsou získané částice méně porézní.

Disperze účinné látky je přelita do prvního reaktoru.

Polymer se přidá v poměru 8 až 13 % hmotnostních, přednostně v poměru 11 % hmotnostních. Získaná organická fáze je stejnoměrně míchána při pokojové teplotě po dobu 2 až 4 hodin, potom 15 minut při teplotě 1 až 5 °C, přednostně 2 °C. Delší doba míchání organické fáze při pokojové teplotě zajistí celkovou solubilizaci polymeru v rozpouštědle.

V druhém reaktoru se připraví vodná fáze a ponechá se přednostně při stejné teplotě jako fáze organická, přednostně při 2 °C. Snížení teploty vodné a organické fáze způsobí zvýšení jejich viskozity a zvýšení zapouzdření. Vodná fáze je například vodný 10% roztok PVA.

Používají se dva reaktory s dvojitými stěnami a chladící kapalina proudí sériově do obou reaktorů. Je výhodné, aby byla při míchání obou fází teplota organické a vodné fáze identická, přednostně 2 °C. Dobré zvládnutí teploty podmiňuje totiž zároveň velikost částic, rychlost rozpouštění účinné látky a rychlost extrakce rozpouštědla.

Organická fáze je přelita z prvního reaktoru do druhého. Poměr objemu vodné a organické fáze je 80/3 až 120/3, přednostně 100/3.

Získaná emulze je míchána po dobu nejméně 3 minut, přednostně po dobu nejméně 3 až 6 minut a nejlépe po dobu 5 minut. Volba této doby přímo souvisí s kinetikou uvolňování účinné látky a zvláště s „burst“ efektem ve 24 až 48 hodinách.

Nepřítomnost druhého rozpouštědla spojená s dostatečnou emulgační dobou dovoluje rozpouštění účinné látky na povrchu nebo rozpouštění špatně obalené

účinné látky, takže kinetika uvolňování účinné látky v počáteční fázi je lépe zvládnuta.

K emulzi se přidá voda v objemovém poměru emulze/voda v rozmezí 1/3 až 1/2, přednostně 1/3, aby se extrahovalo organické rozpouštědlo. Teplota vody určené k extrakci je v rozmezí 1 až 5 °C, přednostně 4 °C.

Emulgační i extrakční kroky jsou prováděny ve stejném reaktoru, aby se zabránilo rozdílům mezi jednotlivými šaržemi a získal čas. Teplota vody určené k extrakci je nízká, aby se zabránilo příliš silnému rozpouštění účinné látky.

Získaná suspenze mikrokuliček je míchána po dobu několika minut a potom filtrována v inertní atmosféře. Práce v inertní atmosféře umožňuje zamezit kontaminaci produktu.

Mikrokuličky získané výše popsaným postupem jsou výhodně lyofilizovány.

Ke 2 až 5 g prášku mikrokuliček (filtrační koláč) je přidáno 10 ml sterilní vody. Celek je zamrazen při -40 °C a přenesen do lyofilizátoru. Lyofilizace trvá 18 hodin. Teplota při dodatečném vysušování musí být udržována pod 10 °C.

Mikrokuličky, i vysušené, musí být konzervovány při 4 °C.

Vynález se týká rovněž suspenze tvořené sterilním roztokem obsahujícím 1 až 1,5 % hmotnostněobjemových látky zvyšující viskozitu, 0,5 až 1,5 % tenzidu, 3,5 až 4,5 % izotonizující látky a biodegradovatelné mikrokuličky, které uvolňují protinádorovou látku obalenou polymerem, a které byly popsány výše, popřípadě byly získány výše popsaným postupem. Obsah mikrokuliček je 200 až 300 mg/ml sterilního roztoku, přednostně 230 až 270 mg/ml.

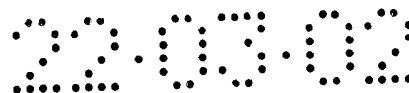
Tyto mikrokuličky jsou složeny přednostně z 15 až 35 % hmotnostních protinádorové látky a 65 až 85 % hmotnostních polymeru.

Polymer je výhodně poly(kyselina d,l-mléčná-ko-kyselina glykolová) obsahující přednostně stejné množství kyseliny mléčné a kyseliny glykolové.



Sterilní roztok obsahuje přednostně 1,25 % hmotnostněobjemových sodné soli karboxymethylcelulózy, 1 % polysorbátu 80 a 4 % manitolu.

Vynález je ilustrován následujícími příklady, které nemají omezující charakter.



## Příklady provedení vynálezu

### Příklad 1

Mikrokuličky připravené emulzně-extrakční technikou, podle varianty postupu popsané Boisdron-Celle M, Menei P a Benoit JP (Preparation of biodegradable 5-fluorouracil-loaded microspheres, J Pharm Pharmacol, 47, 108-114, 1995).

### Drcení 5-FU

5-FU je drcen v drtiči s planetární kuličkou typu Pulvérisette 7 (Fritsch). 8,5 g 5-FU se vloží do každé jamky obsahující 7 kuliček. Drcení trvá 10 minut rychlostí 7. Prášek se sesbírá v boxu s laminárním proděním vzduchu. Získané krystaly mají velikost 15 až 50  $\mu\text{m}$  a rozdělují se na dvě frakce: na jemnou frakci (velikost částic menší než 1  $\mu\text{m}$ ) a hrubou frakci (větší než 30  $\mu\text{m}$ ).

### Disperze 5-FU v organickém rozpouštědle

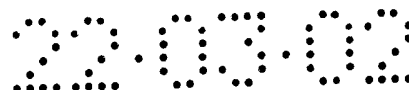
5-FU je drcen a dispergován za stálého míchání ve 45 ml dichloromethanu pomocí homogenizátoru typu ultra-turrax po dobu 3 minut při 13500 rpm, ve zkumavce s kulatým dnem.

### Příprava organické fáze

Disperze 5-FU se přelije do chlazeného reaktoru s dvojitou stěnou o 150 ml. Přidá se PLAGA tak, že poměr PLAGA/dichloromethan je roven 11 %. Organická fáze se míchá lopatkou po dobu 4 hodin rychlostí 450 rpm při teplotě 20 °C, potom 15 minut při teplotě 2 °C. Pomocí kryostatu se v reaktoru udržuje stálá teplota s přesností 0,1 °C.

### Příprava emulze

Připraví se 1500 ml 10% autoklávovaného vodného roztoku PVA, jehož teplota je udržována při teplotě 2 °C v chlazeném dvoustěnném reaktoru o objemu 6



litřů. Organická fáze je vzápětí přelita do tohoto reaktoru otevřením stavidla dna prvního reaktoru. Během 5 až 10 s je organická fáze vylita na vodnou fázi míchanou lopatkou otáčející se rychlostí 375 rpm. Objemový poměr vodná/organická fáze je roven 100/3.

Emulze je míchána po dobu 4 minut a 45 s.

#### Extrakce

Když je emulze hotová, přilije se na emulzi 4,5 l vody určené k extrakci o teplotě 4 °C v objemovém poměru emulze/voda 1/3. Extrakce trvá 2 minuty.

#### Filtrace

Celkový obsah druhého reaktoru se přelije dnem do inoxové nádoby a je stlačen dusíkem. Suspenze je filtrována přes filtr s póry o průměru 3 μm.

Po průchodu celé suspenze filtrem, se filtrační koláč dvakrát promyje 3 litry sterilní vody.

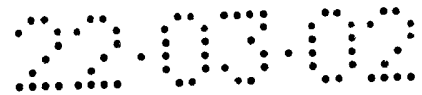
Míra zapouzdření protinádorové látky u získaných mikrokuliček je 20 %. Po prosetí se provede desorpce dichloromethanu v sušárně po dobu 48 hodin. Mikrokuličky jsou poté upraveny a sterilizovány γ-zářením o 19 kGy. Po sterilizaci se provede nová kontrola míry zapouzdření. Poté se provede stanovení stop rozpouštědla. Je výhodné detekovat zbylý dichloromethan o obsahu 0,5 %. Dále se zkontroluje sterilita a kinetika uvolňování účinné látky in vitro u takto získaných mikrokuliček.

Získané mikrokuličky mají obsah účinné látky  $23 \pm 3,5$  %.

Připraví se několik šarží podle výše popsaného protokolu a vypočítá se průměrná velikost částic  $48 \pm 20$  μm na populaci všech šarží odpovídající  $46 \pm 7$  μm (průměr průměrů z připravených šarží).

Získané mikrokuličky mají obsah účinné látky  $23 \pm 3,5$  % a průměrnou velikost  $48 \pm 20$  μm.





## Příklad 2

Mikrokuličky jsou připraveny emulzně-extrakční technikou podle příkladu 1.

### Drcení 5-FU

Postupuje se jako v příkladu 1 drcením 4g 5-FU. Získané krystaly mají velikost 15 až 50  $\mu\text{m}$  a rozdělují se na dvě frakce: na jemnou frakci (velikost částic menší než 1  $\mu\text{m}$ ) a hrubou frakci (větší než 30  $\mu\text{m}$ ).

### Disperze 5-FU v organickém rozpouštědle

5-FU je drcen a dispergován za stálého míchání ve 40 ml dichloromethanu pomocí homogenizátoru typu ultra-turrax po dobu 3,5 minut při 13500 rpm, ve zkumavce s kulatým dnem.

Příprava organické fáze a příprava emulze se provedou jako v příkladu 1.

Extrakce a filtrace se provedou jako v příkladu 1.

Charakteristika získaných mikrokuliček.

Obsah 5-FU: 22 %

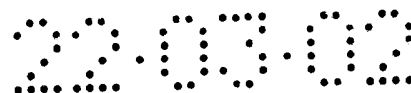
Velikost:  $46 \pm 7 \mu\text{m}$

Burst efekt 24 hodin po radiosterilizaci 19 kGy:  $40 \pm 4 \%$ .

## Příklad 3

Klinická vzorová studie fáze I/II je provedena s mikrokuličkami PLAGA 50:50/5-FU z příkladu 1.

Získané mikrokuličky jsou rychle převedeny na suspenzi v roztoku obsahujícím:



- 1,25 % hmotnostněobjemových sodné soli karboxymethylcelulózy (Cooper),
- 1 % polysorbátu 80,
- 4 % manitolu a
- dostatečné množství vody pro injikovatelný přípravek k získání celkového objemu 3 ml.

Roztok je předem sterilizován autoklávováním při 121 °C po dobu 20 minut, potom radiosterilizován  $\gamma$ -zářením o dávce 5 až 25 kGy, přednostně 19 kGy.

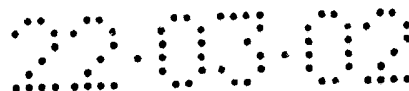
Příprava této suspenze je náročná, protože je třeba se vyhnout tvorbě bublinek. Suspenze je injikována ihned po své přípravě, protože mikrokuličky mají tendenci sedimentovat a ucpávat stříkačku.

Po makroskopickém vyjmutí gliového nádoru je suspenze mikrokuliček implantována do hloubky 2 až 3 cm po celém povrchu operační stěny v množství 100  $\mu$ l na injekci.

Injekce se provádí stříkačkou o objemu 1 ml a katetrem (Insyte®, Vialon TM) 18 ga (1,3 x 45 mm), ze kterého se odejme kovové sklíčidlo a ponechá se jenom plastový katetr s nezabroušeným koncem, kterým se injikuje suspenze do mozkové tkáně. Použije se takové množství stříkaček o objemu 1 ml, kolik je třeba. Injekce suspenze se zabroušenou jehlou vytváří riziko hematomu a odlivu mikrokuliček. Průměr katetru musí být dostatečně malý, aby nedošlo ke zranění mozkové tkáně a dostatečně velký, aby se neucpal suspenzí mikrokuliček.

Injekce se musí provádět velmi jemně a katetr musí zůstat několik minut na místě, aby se zabránilo odlivu mikrokuliček. Na místo injekce se přiloží fragment hemostatického resorbovatelného obvazu o velikosti 1 cm<sup>2</sup> (Surgical® nebo Spongel®).

Pacienti zahrnuti do studie jsou ve věku od 18 do 68 let, bez předchozího novotvaru, s Karnofským indexem větším než 60, a mají klinickou historii a obraz naznačující živý glioblastom, podstoupili kompletní makroskopické vyjmutí nádoru a jejich operační histologické vyšetření (provedené podle kritérií OMS; nekróza,



vaskulární proliferace, nukleární pleomorfismus a mitotická aktivita) potvrdilo diagnózu glioblastomu.

Kritéria pro vyloučení pacienta jsou následující: metabolická deficiencie, obezita, jiná předchozí rakovinná pathologie.

Na začátku byly pro studium vlivu rostoucích dávek 5-fluoro-uracilu plánovány tři skupiny: v chronologickém pořadí 70, 132, 264 mg, léčba následující skupiny byla zahájena po zjištění tolerance u skupiny, která byla právě testována.

Vzhledem k zjištění neurologické toxicity Grade II u pacienta, který přijmul 132 mg 5-FU a podle pravidel ukončení protokolu, bylo zvyšování terapeutických dávek zastaveno a následující pacienti dostali stejnou dávku 132 mg.

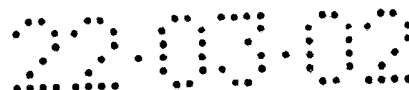
Běžná externí radioterapie (zaostřena na objem nádoru ohodnocený na předoperačním IRM s energií 10 MV) je zahájena mezi druhým a sedmým dnem následujícím po operaci.

Aplikuje se celková dávka 60 Gy ve 33 dávkách po 1,8 Gy, při 5 dávkách za 6,5 týdne. Ozařovaný objem zahrnuje objem nádoru s okrajem nejméně 2 cm ve všech směrech.

Pacienti jsou sledováni po klinické i radiologické stránce: scanner pro potvrzení kompletního makroskopického vyjmutí nádoru se provede 72 hodin po operaci a klinické hodnocení 10., 20. a 30. den. IRM se provede 10. a 30. den. Stanovení hladiny 5-FU v krvi a LCR se provede po 72 hodinách, 10., 20. a 30. den. Toxicita (neurologická, hematologická, slizniční a kardiologická) je hodnocena stupněmi podle kritérií odvozených od OMS. Po uběhnutí jednoho měsíce jsou pacienti klinicky sledováni každé dva měsíce a podstupují každé tři měsíce IRM.

U všech pacientů byla pozorována lehká postoperační anémie, hyperleukocytoza a lehká lymfopenie.

Farmakologická studie dovolila potvrdit prodloužené uvolňování 5-FU účinné látky v cefalorachidové kapalině (LCR) během více než 30 dnů a v menší



míře přechodný průchod těchto molekul do systémového oběhu. Ještě měsíc po implantaci je poměrně velká koncentrace 5-FU v LCR.

Profil uvolňování 5-FU do LCR vykazuje maximum v desátém resp. ve dvacátém dni pro dávky 70 resp. 132 mg. Koncentrace 5-FU v plazmě nebyla u poloviny pacientů detekovatelná od desátého dne.

Systémová tolerance je výtečná u všech testovaných pacientů. Nebyly pozorovány žádné chemické nebo buněčné změny LCR. Po zjištění mozkového edému při radioterapii pacienta, kterému byla podána dávka 132 mg, nebylo dovoleno další zvyšování dávek.

Osm pacientů, z nichž čtyři muži a čtyři ženy v průměrném věku 48,5 let a s Karnofsky indexem větším než 90 bylo tedy zahrnuto do studie. První skupině o třech lidech byla podána dávka 70 mg a druhé, čítající pět lidí, dávka 132 mg.

První předběžné výsledky o přežití pacientů nebyly statisticky interpretovatelné z důvodu malého počtu pacientů. Byly však velmi povzbuzující. Při posledním hodnocení v první skupině (70 mg) zemřeli tři pacienti v 61., 114. a 125. týdnu. Je nutno poznamenat, že pacient, který zemřel ve 114. týdnu, zemřel na následky plicních metastáz glioblastomu. Ve druhé zpracované skupině (132 mg) zemřeli tři pacienti v 31., 59. a 82. týdnu u dalších nemoc ustupovala ještě ve 159. a 172. týdnu, v době psaní těchto předběžných výsledků.

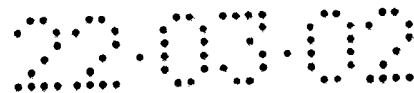
Medián doby přežití pacientů je 98 týdnů (v literatuře je 50,6 týdnů pro pacienty odpovídající stejným kritériím (Devaux BC, O'Fallon JR, Kelly PJ, Resection, biopsy, and survival in malignant glial neoplasms, J Neurosurg, 78: 767-775, 1993). Pět z osmi pacientů, tedy 62 %, přežili 18 měsíců, zatímco literatura uvádí u pacientů odpovídajících kritériím pro přijetí do této studie, že 18 měsíců přežije 20 % pacientů (Devaux BC, O'Fallon JR, Kelly PJ, Resection, biopsy, and survival in malignant glial neoplasms, J Neurosurg, 78: 767-775, 1993).

**Průmyslová využitelnost**

Vynález lze použít ve farmaceutickém průmyslu.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití biodegradovatelných mikrokuliček uvolňujících radiosenzibilizující protinádorovou látku pro přípravu léku k léčbě glioblastomu za současného, odděleného nebo v čase rozprostřeného použití s radioterapií, přičemž tyto mikrokuličky jsou určeny k implantaci do operační oblasti po vyjmutí gliového nádoru, kdy jsou mikrokuličky obsahující protinádorovou látku obaleny polymerem, který zpožďuje uvolňování protinádorové látky a udržuje v parenchymovém prostoru její terapeuticky účinnou koncentraci pro dosažení přežití pacientů nejméně 90 týdnů, přednostně 130 týdnů a ještě přednostně 160 týdnů.
2. Použití podle nároku 1, kdy protinádorová látka je hydrofilní a/nebo neproniká hematoencefalickou bariéru.
3. Použití podle nároku 1 nebo 2, kdy protinádorová látka není toxická pro centrální nervový systém.
4. Použití podle jednoho z předcházejících nároků 1 až 3, kdy je protinádorová látka tvořena jednou protinádorovou radiosenzibilizující sloučeninou nebo směsí protinádorových sloučenin obsahující nejméně jednu protinádorovou radiosenzibilizující sloučeninu, tzv. protinádorové sloučeniny jsou vybrány ze skupiny obsahující 5-fluorouracil(5-FU), platinu jako karboplatina a cisplatina, taxany jako docetaxel a paklitaxel, gemcitabin, VP16, mitomycin, idoxuridin, inhibitory topoizomerázy I jako irinotekan, topotekan a camtotheciny, nitrosourei, jako BCNU, ACNU nebo MCNU, methotrexat, bleomycin, adriamycin, cytoxan a vinkristin, imunomodulační cytokiny jako IL2, IL6, IL12 a IL13 a interferony.
5. Použití podle nároku 4, kdy protinádorová látka je 5-fluorouracil.
6. Použití podle nároku 5, kdy koncentrace 5-FU v mozkomíšním moku, která odráží koncentraci v parenchymovém prostoru, je 3 až 20 ng/ml.
7. Použití podle jednoho z předcházejících nároků 1 až 6, kdy se k protinádorové látce přidá neuroprotektivní sloučenina, vybraná mezi peptidovými růstovými faktory jako je NGF nebo BDNF.



8. Použití podle jednoho z předcházejících nároků 1 až 7, kdy polymer obalující mikrokuličky, který zpožďuje uvolňování protinádorové látky, udržuje v parenchymovém prostoru její terapeuticky účinnou koncentraci v průběhu nejméně tří týdnů, přednostně nejméně čtyř týdnů.

9. Použití podle jednoho z předcházejících nároků 1 až 8, kdy je polymer vybrán z následujících látek: ethylcelulóza, polystyren, poly( $\epsilon$ -caprolacton), poly(kyselina d,l-mléčná) a poly(kyselina d,l-mléčná-ko-kyselina glykolová).

10. Použití podle jednoho z předcházejících nároků 1 až 9, kdy polymer, který obaluje mikrokuličky, je poly(kyselina d,l-mléčná-ko-kyselina glykolová).

11. Použití podle nároku 10, kdy polymer, který obaluje mikrokuličky, je poly(kyselina d,l-mléčná-ko-kyselina glykolová) obsahující stejné množství kyseliny mléčné a kyseliny glykolové.

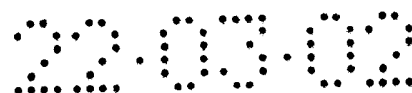
12. Použití podle jednoho z předcházejících nároků 1 až 11, kdy mikrokuličky mají střední průměr  $48 \pm 20 \mu\text{m}$ , přednostně  $46 \pm 7 \mu\text{m}$ .

13. Použití podle jednoho z předcházejících nároků 1 až 12, kdy mikrokuličky obsahují 15 až 35 % hmotnostních protinádorové látky a 65 až 85 % hmotnostních polymeru.

14. Použití podle nároků 5 a 13, kdy mikrokuličky obsahují 19 až 27 % hmotnostních 5-FU, přednostně 20 % hmotnostních 5-FU.

15. Použití podle jednoho z předcházejících nároků 1 až 14, kdy se mikrokuličky převedou do suspenze ve sterilním roztoku, získaná suspenze je určena k injekci do stěn operační dutiny po vyjmutí gliového nádoru a kdy sterilní roztok obsahuje 1 až 1,5 % hmotnostněobjemových látky zvyšující viskozitu, 0,5 až 1,5 % tenzidu a 3,5 až 4,5 % izotonizující látky.

16. Použití podle nároku 15, kdy roztok obsahuje 1,25 % hmotnostněobjemových sodné soli karboxymethylcelulózy, 1 % polysorbátu 80 a 4% manitolu.



17. Použití podle nároku 15 nebo 16, kdy se suspenze injikuje do stěn operační dutiny do hloubky nejméně dvou centimetrů, přednostně dvou až tří centimetrů, na nejméně každý  $\text{cm}^2$ .

18. Použití podle nároku 5, kdy celková dávka injikovaného 5-FU je 50 až 200 mg, přednostně 130 mg.

19. Použití podle jednoho z předcházejících nároků 1 až 18, kdy se radioterapie zaostří na oblast nádoru tak, že ozářený objem obsahuje preoperační nádor s okrajem nejméně dvou centimetrů ve všech směrech, a kdy se aplikuje celková dávka 50 až 60 Gy.

20. Použití podle jednoho z předcházejících nároků 1 až 19, kdy se radioterapie zahájí přednostně mezi druhým a sedmým dnem následujícím po operaci.

21. Použití podle jednoho z předcházejících nároků 1 až 20, kdy se radioterapie provede s celkovou dávkou 60 Gy v průběhu šesti týdnů.

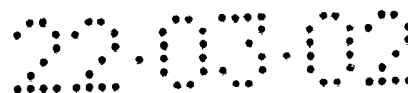
22. Použití podle jednoho z nároků 15 až 17 nebo 19 až 21, kdy se suspenze mikrokuliček injikuje stereotakticky jednou nebo vícekrát v případě návratu nádoru.

23. Způsob přípravy biodegradovatelných mikrokuliček obsahujících protinádorovou látku obalenou polymerem pomocí emulgace a extrakce, které spočívají v disperzi protinádorové látky a polymeru v organickém rozpouštědle, ve smíchání získané organické fáze s vodnou fází pro získání emulze, v extrakci organického rozpouštědla přidáním vody a ve filtraci získané suspenze mikrokuliček, vyznačující se tím, že protinádorová látka se disperguje v organickém rozpouštědle za silného míchání před přidáním polymeru.

24. Způsob podle nároku 23, vyznačující se tím, že organické rozpouštědlo je dichloromethan.

25. Způsob podle nároku 23 nebo 24, vyznačující se tím, že vodná fáze a organická fáze mají v momentě smíchání stejnou teplotu, přednostně  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .





26. Způsob podle jednoho z nároků 23 až 25, vyznačující se tím, že organická fáze obsahuje 11 % polymeru.

27. Způsob podle jednoho z nároků 23 až 26, vyznačující se tím, že poměr vodná fáze/organická fáze je roven 100/3.

28. Způsob podle jednoho z nároků 23 až 27, vyznačující se tím, že emulze tvořená vodnou a organickou fází se míchá nejméně 3 minuty.

29. Způsob podle jednoho z nároků 23 až 28, vyznačující se tím, že voda potřebná k extrakci organického rozpouštědla je přidána v takovém množství, aby byl objemový poměr emulze/voda roven 1/3.

30. Způsob podle jednoho z nároků 23 až 29, vyznačující se tím, že voda potřebná k extrakci organického rozpouštědla má teplotu 4 °C.

31. Způsob podle jednoho z nároků 23 až 30, vyznačující se tím, že se protinádorová látka před disperzí v organickém rozpouštědle rozdrtí, aby byla velikost krystalů protinádorové látky 15 až 50 μm.

32. Způsob podle jednoho z nároků 23 až 31, vyznačující se tím, že se suspenze získaná po přidání vody určené k extrakci filtruje v inertní atmosféře.

33. Způsob podle jednoho z nároků 23 až 32, vyznačující se tím, že se mikrokuličky lyofilizují.

34. Suspenze, vyznačující se tím, že je tvořena sterilním roztokem obsahujícím 1 až 1,5 % hmotnostněobjemových látky zvyšující viskozitu, 0,5 až 1,5 % tenzidu a 3,5 až 4,5 % izotonizující látky a biodegradovatelnými mikrokuličkami obalenými polymerem, které uvolňují protinádorovou látku, poměr mikrokuliček představuje 200 až 300 mg/ml sterilního roztoku.

35. Suspenze podle nároku 34, kdy mikrokuličky jsou tvořeny 15 až 35 % hmotnostními protinádorové látky a 65 až 85 % hmotnostními polymerem.

36. Suspenze podle nároku 34 nebo 35, kdy polymer je poly(kyselina d,l-mléčná-ko-kyselina glykolová) obsahující přednostně stejné množství kyseliny mléčné a kyseliny glykolové.

37. Suspenze podle jednoho z nároků 34 až 36, kdy sterilní roztok obsahuje 1,25 % hmotnostněobjemových sodné soli karboxymethylcelulózy, 1 % polysorbátu 80 a 4% manitolu.