



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **331686**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/52 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)
A61K 47/38 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20015501	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.05.17 PCT/FR2000/01315
(22)	Inng.dag	2001.11.09	(85)	Videreføringsdag	2001.11.09
(24)	Løpedag	2000.05.17	(30)	Prioritet	1999.05.17, FR, 9906207
(41)	Alm.tilgj	2002.01.09			
(45)	Meddelt	2012.02.20			
(73)	Innehaver	Laboratories des Produits Ethiques - Ethypharm, 21, rue Saint-Mathieu, F-78500 Houdan, Frankrike			
(72)	Oppfinner	Nathalie Faisant, Montreuil-sur-Maine, Frankrike Jean-Pierre Benoit, 45, allée des Châtaigniers, F-49240 Avrille, Frankrike Philippe Menei, Avrille, Frankrike			
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 6963 St Olavs Plass, 0130 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for å fremstille bionedbrytbare mikrokuler som inneholder et anticancermiddel og er belagt med en polymer, suspensjon inneholdende disse mikrokulene og anvendelse av mikrokulene ifremstilling av et medisinsk produkt til behandlingen av glioblastom.			
(56)	Anførte publikasjoner	BENOIT, J. P., et al; Proceedings 1997 of the 24th international symposium on controlled release of bioactive materials, vol. 24, 1997, Controlled release society, inc, Deerfield Page 995-996			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse angår bruken av bionedbrytbare mikrokuler som frigjør et radiosensitiverende anticancermiddel for fremstilling av et medikament som kan brukes samtidig med, separat fra eller brukt over tid, med en radioterapi for behandling av glioblastom. Bruken av nevnte bionedbrytbare mikrokuler ifølge foreliggende oppfinnelse resulterer i en pasientoverlevelsestid på minst 90 uker, og hvor en terapeutisk effektiv konsentrasjon blir opprettholdt i det parenchymatøse området i hele dette tidsrom. Mikrokulene inneholder fortrinnsvis 5-fluoruracil belagt med poly(d,l-melkesyre-co-glykolinsyre). Mikrokulene blir implantert i veggene omkring operasjonsstedet etter ekserese av tumoren, ved intravevsinjeksjon. Den radioterapi som settes inn mot tumoren er dosert med 60 Gy over ca 6 uker. Oppfinnelsen angår også en fremgangsmåte for fremstilling av bionedbrytbare mikrokuler ved en emulsjons-ekstraksjon, og en suspensjon som inneholder de bionedbrytbare mikrokuler som er fremstilt ved denne fremgangsmåten.

Tittel: Fremgangsmåte for å fremstille bionedbrytbare mikrokuler som inneholder et anticancermiddel og er belagt med en polymer, suspensjon inneholdende disse mikrokulene og anvendelse av mikrokulene i fremstilling av et medisinsk produkt til behandlingen av glioblastom.

5

Foreliggende oppfinnelse angår bionedbrytbare mikrokuler som frigjør et anticancermiddel for behandling av glioblastom.

Glioblastom hører til en gruppe av sjeldne sykdommer som er registrert av den nasjonale organisasjonen for sjeldne sykdommer.

- 10 Ondartede gliale tumorer er primære tumorer i det sentrale nervesystemet, som avhengig av seriene, representerer fra 13 til 22 % av interkraniale tumorer. Sett fra et histologisk synspunkt kan man faktisk skille mellom to typer ondartede gliale tumorer, anaplastiske astrocytomer og glioblastomer, og hvor sistnevnte representerer den mest udifferensierte formen av disse
- 15 tumorene.

Det er for tiden ingen effektiv behandling mot ondartede gliale tumorer. Overlevelsestiden for pasienter som lider av glioblastom vil vanligvis ikke overstige ett år, selv om kjemoterapi og strålingsterapi kombineres med kirurgiske inngrep.

- 20 Behandlingen av ondartede gliale tumorer er i alt vesentlig begrenset av tre fenomener.

Den første er eksistensen av blod-hjernebarriere (BBB), som isolerer det sentrale nervesystemet fra resten av kroppen. Denne blod-hjernebarrieren gjør at bare lipoløselige molekyler kan passere på grunn av sin lille størrelse.

- 25 Andre molekyler må administreres i meget høye doser for å kunne nå sentralnervesystemet, men dette har sin pris i form av betydelige systemiske bivirkninger.

- Den andre faktoren som begrenser effekten av behandlingen for gliale tumorer er at disse tumorene er sterkt infiltrerende. Ettersom hjernen er et
- 30 sterkt funksjonelt organ, så er det umulig å utføre et kirurgisk inngrep som er altomfattende i den carcinologiske betydning av ordet. Den mest fullstendige ekserese som kan utføres vil bare være en makroskopisk fullstendig ekserese, og vil etterlate en rekke tumorceller som er infiltrert i veggene på ekseresehulrommet. Mange forfattere har videre vist at over 90 % av de

ondartede gliale tumorene som blir operert og siden behandlet med radioterapi vil komme tilbake innenfor en distanse på 2 cm fra det opprinnelige tumorstedet.

5 Den siste faktoren som begrenser effektiviteten av behandlingen av gliale tumorer er den lave terapeutiske indeksen. Tumorcellene ligger ofte bak normale celler som er ekstremt fragile og følsomme overfor angrep forårsaket for eksempel av radioterapi eller av visse anticancermidler. Det er således vanskelig å ødelegge tumorcellene uten å ødelegge de normale nervecellene.

10 Det har vært utilstrekkelig og liten utvikling med hensyn til behandlingen av gliale tumorer (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
15 glioma, J. Neurosurg. 76: 772-781, 1992).

Den behandling som i dag brukes for glioblastom etter et kirurgisk inngrep er basert på ytre radioterapi. En slik behandling har ikke gjort det mulig å oppnå en overlevelsestid på utover 1 år. En kombinasjon av radioterapi og
20 kjemoterapi ved anvendelse av 1-(2-kloretyl)-3-sykloheksyl-1-nitrosourea (BCNU) er bare effektivt på anaplastiske astrocytomer. Dette gir bare en svak bedring, ettersom det bare øker prosenten av overlevende pasienter etter 18 måneder, uten at det modifierer overlevelsestiden.

Videre har immunterapi aldri blitt brukt innenfor dette området, og genterapi har hittil ikke gitt noen resultater.

25 Det har vært utført en rekke eksperimenter med hensyn til flere teknikker som har til hensikt å øke den lokale konsentrasjonen av anticancermidlene, så som en osmotisk oppbrytning av blod-hjernebarrieren, injeksjon inn i den cerebrospinale væsken, en intrakarotid infusjon og intratumoradministrering ved å bruke subkutane reservoarer (Taramargo RJ and Brem H, Drug delivery
30 to the central nervous system, Neurosurgery Quarterly, 2: 259-279, 1992). Ingen av disse teknikkene har vært i stand til å øke overlevelsestiden for pasientene, og enkelte av dem har vist seg å være meget giftige.

Forskningen innenfor den galeniske farmasi har i de senere år gjort det mulig å utvikle implanterbare polymersystemer som beskytter de aktive
35 bestanddelene mot nedbryting, og gjør at disse kan frigjøres kontrollert lokalt

- over et gitt tidsrom, samtidig som man har nedsatt de systemiske bivirkninger. Fordelene ved disse implanterbare polymersystemene har nå gjort at flere grupper undersøker deres anvendelse med hensyn til patologier (Langer R, Polymer implants for drug delivery in the brain, J. Controlled Release, 16: 53-60, 1991). Mer spesielt har det vist seg at slike systemer 5 implantert i tumorreseksjonsveggen ved ondartede gliomer forsinket gjenopptreden av tumoren og forlenger pasientoverlevelsen. Isolerte ondartede celler vil være tilstede omkring det hulrom som er skapt etter operasjonen, og disse er ansvarlige for 90 % av tilbakefallene, og dette skjer 10 innenfor en distanse på 2 cm fra det opprinnelige operasjonsstedet. Innenfor dette området vil nervevevet være funksjonelt, og blod-hjernebarrieren er fremdeles intakt, noe som begrenser virkningen av vanlig kjemoterapi og radioterapi. Diverse implanterbare polymersystemer som frigjør aktive molekyler er blitt utviklet og testet i dyr.
- 15 Et system bestående av bionedbrytbare oblater som er sammensatt av PCPP-SA (poly[1,3-bis(karboksyfenoksy)propan-co-sebasinsyre]), og som frigjør BCNU (GLIADEL®) er blitt utviklet til tross for beskjedne resultater i kliniske undersøkelser (Brem, Polymers to treat brain tumors, Biomaterials 11: 699-701, 1990; Brem H, Mahaley MS, Vick NA, Black KL, Schold SC, 20 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 25 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).
- Mikrokuler som frigjør BCNU er blitt utviklet, men resultatene av undersøkelser i dyr har vært relativt lite oppmuntrende (Torres AI, Boisdron-Celle M, Benoit JP, Formulation of BCNU-loaded microspheres: influence of 30 drug stability and solubility on the design of the microencapsulation procedure, J. Microencapsulation, 13: 41-51, 1996; Painbéni T, Venier-Julienne MC, Benoit JP, Internal morphology of poly(D,L-lactide-co-glycolide) BNCU-loaded microspheres. Influence on drug stability, Eur. J. 35 Pharm. Biopharm, 1998, 45, 31-39).

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for å fremstille bionedbrytbare mikrokuler som inneholder et anticancermiddel og er belagt med en polymer ved emulgerings-ekstraksjon, som innbefatter å dispergere polymeren og anticancermiddelet i et organisk løsemiddel, blande den organiske fasen som blir oppnådd med en vandig fase for å oppnå en emulsjon, ekstrahere det organiske løsemiddelet ved å tilsette vann, og deretter filtrere mikrokulesuspensjonen som er oppnådd, der anticancermiddelet er dispergert i det organiske løsemiddelet under kraftig røring før polymeren tilsettes.

Foreliggende oppfinnelse vedrører også anvendelse av en suspensjon som består av en steril løsning som inneholder 1 til 1,5 % masse/volum av et viskositetsmodifiserende middel, 0,5 til 1,5 % av et overflateaktivt middel og 3,5 til 4,5 % av et isotonisitetsmiddel, og bionedbrytbare mikrokuler som kan bli oppnådd ved å benytte fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, der nevnte mikrokuler frigjør et anticancermiddel, og hvor kulene er belagt med en polymer, og hvor mengden av mikrosfærene representerer 200 til 300 mg/ml med steril løsning, fortrinnsvis 230 til 270 mg/ml.

Til slutt gjelder foreliggende oppfinnelse anvendelse av en suspensjon ifølge oppfinnelsen for fremstillingen av et medisinsk produkt ment for benyttelse simultant eller separat i tid eller spredt ut over tid med en radioterapi, til behandlingen av glioblastom, der mikrokulene er ment å skulle bli implantert i veggene på operasjonsstedet, i en dybde på minst to centimeter, fortrinnsvis mellom 2 og 3 centimeter, i det minste hver cm^2 , etter utskjæring av glitumoren, og polymeren som belegger dem forsinker frigjøringen av anticancermiddelet og opprettholder en terapeutisk effektiv konsentrasjon i det parenchymale rommet over tid, for å nå en overlevelsestid for pasienten som blir behandlet på denne måten på minst 90 uker, fortrinnsvis omtrent 130 uker, mer foretrukket omtrent 160 uker.

Anvendelsen av disse mikrokulene er kombinert med strålingsterapi og kirurgiske inngrep. Etter ekserese av tumoren vil bionedbrytbare mikrokuler som frigjør et anticancermiddel bli implantert på operasjonsstedet ved hjelp av intravevsinjeksjon. Radioterapi blir så utført, maksimalt i løpet av 7 dager etter inngrepet.

Ved å bruke disse mikrokulene har foreliggende søker oppnådd meget fordelaktig å doble overlevelsestiden for pasienter som lider av glioblastom. Mer spesifikt har det vist seg at bruken av disse mikrokulene ifølge

foreliggende oppfinnelse gjør det mulig å oppnå en overlevelsestid på minst 90 uker.

De mikrokuler som brukes i foreliggende oppfinnelse inneholder et anticancermiddel som fortrinnsvis er hydrofilt og/eller ikke krysser blod-
 5 hjernebarrieren. Fordelaktig bør anticancermiddelet ikke vise sentralnevrotoksitet. Dette anticancermiddelet virker fortrinnsvis på delende celler.

Anticancermiddelet består av en radiosensitiverende anticancerforbindelse eller en blanding av slike forbindelser, og inneholder minst én
 10 radiosensitiverende anticancerforbindelse, hvor nevnte anticancerforbindelse eller -forbindelser for eksempel er valgt fra 5-fluoruracil (5-FU), platiner så som karboplatin og cisplatin, taksaner så som docetaxel og paklitaxel, gemcitabin, VP16, mitomycin, idoksuridin, topoiserase 1-inhibitorer så som irinotekan, topotekan og kamptoteciner, nitrosoureaer så som BCNU,
 15 ACNU eller MCNU, metotreksat, bleomycin, adriamycin, cytoksan og vinkristin, immunmodulerende cytokiner så som IL2, IL6, IL12 og IL13 og interferoner.

Anticancermiddelet er fortrinnsvis 5-FU.

5-FU er et velkjent og lenge brukt antimitotisk middel. Det er hydrofilt
 20 molekyl som bare i meget liten grad krysser blod-hjernebarrieren, og dets aktivitet blir derfor økt ved lokal administrering (Bourke RS, West CR, Cheda 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, Wilson CB, Rosenblum ML,
 25 Improved treatment of a brain tumor modell, Par 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-
 30 (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
 35 urokinase embedded in silastic. Proceeding of the 6th 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, vincristine 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 ependymoblastomas, *Cancer Chemother Rep.*, 36: 1-4, 1964).

Aktiviteten av 5-FU blir således økt ved vedvarende administrering. 5-FU er et middel som virker ved å påvirke nukleinsyresyntesen. Undersøkelser har vist at bare 30 til 50 % av cellene i et ondartet musegliom (L9) og fra 14 til 44 % av cellene i et humant ondartet gliom, er ved deling på et gitt tidspunkt. I tillegg har glioblastomcellene lang syklus (20 timer for L9 gliom, fra 3 til 7 dager for humant glioblastom). På den annen side blir 5-FU rask fjernet fra plasma (30 minutters halveringstid) (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 kan derfor ikke via systemisk administrering eller lokal injeksjon ødelegge et større antall ondartede celler.

5-FU er i alt vesentlig aktivt i vev hvor det skjer en rask fornying, og er eksepsjonelt nevrotoksisk. 5-FU griper inn i syntesen av nukleinsyrer, noe som er spesielt viktig i vev med rask vekst for å kunne sikre en god oppformering og regenerering. Dette er selvsagt ikke tilfelle med hjernevev, hvor mitoser er sjeldne i den normale tilstand, og opptrer bare blant gliale celler. De toksiske effektene av 5-FU som begrenser dens administrering via den generelle vei er i alt vesentlig hematologiske og gastrointestinale. Skjønt det bare er publisert sjeldne neurologiske bivirkninger av 5-FU, så er deres etiopatogenitet, som er relativt ukjent, sannsynligvis multifaktoriell (blokkering av Krebs syklus ved en 5-FU-katabolitt eller en forsterkelse av en på forhånd eksisterende tiaminsvikt) (Aoki N, Reversible 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).

Endelig er 5-FU radiosensitiverende (Koutcher JA, Alfieri AA, Thaler J et al., Radiation enhancement by biochemical modulation and 5-FU, Int. J. Radit, Biol. Phys., 39: 1145-1152, 1997). Fortrinnet eller den bedrede effekten av kombinasjonen av 5-FU/radioterapi i hver av disse isolerte behandlingene ble vist så tidlig som i 1960-årene ved hjelp av dyremodeller, og på tumorceller in vitro (Bagshaw M, A possible role of potentiation in radiation therapy, Amer J. Roentgenol, 85: 822-833, 1961; Vietti T, Eggerding F, Valeriote F, Combined effect of X-radiation and 5-fluorouracil on survival of transplanted leukemic cells, J. Natl. Inst., 47: 865-870, 1971). Man antar at denne synergien skyldes en synkronisering av tumorcellepopulasjonen og en svekket mekanisme med hensyn til cellereparasjon på grunn av 5-FU. Kombinasjonen av radioterapi og antipyrimidin (5-FU eller BrdR) er allerede forsøkt på mennesker (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). Fraværet av en klar effekt kan igjen forklares ved at de aktive forbindelsene har vært administrert systemisk.

Når anticancermiddelet er 5-FU, så vil konsentrasjonen av anticancermiddelet i den cerebrospinale væsken, som speiler konsentrasjonen i det parenchymale rommet, være mellom 3 og 20 ng/ml.

For å begrense nevrotoksiteten på anticancermiddelet som forefinnes i mikrokulene som blir brukt som angitt i foreliggende oppfinnelse, så kan man med fordel tilsette en nevrobekyttende forbindelse i tillegg til nevnte anticancermiddel. Denne nevrobekyttende forbindelsen kan for eksempel velges fra peptidvekstfaktorer så som NGF eller BDNF.

De bionedbrytbare mikrokuler som brukes i foreliggende oppfinnelse er belagt med en polymer som forsinker frigjøringen av anticancermiddelet, og opprettholder i det parenchymale rommet en terapeutisk effektiv konsentrasjon i et tidsrom på minst 3 uker, fortrinnsvis minst 4 uker.

Polymeren velges fra etylcellulose, polystyren, poly(ϵ -kaprolakton), poly(d,l-melkesyre) og poly(d,l-melkesyre-co-glykolsyre).

Polymeren er fortrinnsvis poly(d,l-melkesyre-co-glykolsyre) eller PLAGA, som er en bionedbrytbar polymer som er tillatt ved fremstillingen av

galeniske preparater med forsinket eller vedvarende frigjøring (i motsetning til PCPP-SA, som ikke er godkjent for klinisk bruk i stor skala).

Nevnte poly(d,l-melkesyre-co-glykolsyre) er fortrinnsvis 50:50 PLAGA (det vil si inneholder like mengder av melkesyre og glykolsyre), for eksempel
 5 Resomer® RG 506 som produseres av BI Chimie, Frankrike, som har en vekt-
 midlere molekyllær masse som er lik 72000, en polydispergeringsindeks på
 1,8 og en indre viskositet på 0,80 dl/g (0,1 % løsning av polymer i kloroform
 ved 25°C).

PLAGA er en hydrofob sampolymer, hvis nedbrytning skyldes en
 10 hydrolysereaksjon, og som gir opphav til to normale biologiske substrater, det
 vil si melkesyre og glykolsyre, som metaboliseres ved slutten av den aerobe
 glykolysen til CO₂ og H₂O. Velkjente undersøkelser har vist at det er i alt
 vesentlig gjennom respirasjonen at disse to substratene elimineres.
 Hastigheten med hensyn til bionedbrytingen av PLAGA er avhengig av de
 15 respektive mengdene av melkesyre og glykolsyre. PLAGA er fullstendig
 bioforenlig og frembringer en moderat fremmed kroppsreaksjon (Visscher
 GE, RL Robinson, HV Mauding, Fong JW, Pearson JE, Argentieri GJ,
 Biodegradation of and tissue reaction to 50:50 poly(DL-lactide-co-glycolide)
 microcapsules, J. Biomed. Mat. Res. 19: 345-365, 1985). PLAGA er en
 20 nødvendig bestanddel i kirurgiske suturer (Frazza EJ, Schmidt EE, A new
 absorbable suture, J. Biomed. Mater. Res., 5: 43-58, 1971) og i subkutane
 implanterbare galeniske former (Jalil R, Nizon JR, Biodegradable poly(lactic
 acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with
 preparative techniques and release properties (Review), J.
 25 Microencapsulation, 7: 297-325, 1990). Det er vist at 50:50 PLAGA
 mikrokuler kan steriliseres ved gammabestråling, og så snart de er implantert
 ved stereotaksi i hjernen hos en smågnager, så blir de fullstendig bionedbrutt i
 løpet av 2 måneder, og frembringer bare en moderat reaksjon av den ikke-
 spesifikke astrocytt og histiocytt-typen (Menei P, Daniel V, Montero-Menei
 30 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). Sistnevnte resultat
 35 er siden blitt bekreftet av Kou JH, Emmet 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.

De bionedbrytbare mikrokulene som blir fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse har fortrinnsvis en midlere diameter på $48 \pm 20 \mu\text{m}$, fortrinnsvis $46 \pm 7 \mu\text{m}$. De inneholder fra 15 til 35 vekt% av anticancermiddel, fortrinnsvis fra 19 til 27% 5-FU, mest foretrukket 20% 5-FU og fra 65 til 85 vekt% av polymeren.

I den foreliggende oppfinnelsen er det spesielt foretrukket å bruke 50:50 PLAGA mikrokuler som inneholder 5-FU.

In vitro vil 50:50 PLAGA mikrokulene som inneholder 5-FU frigjøre 5-FU i 21 dager. In vivo, og implantert subkutant i kaniner gjør disse mikrokulene det mulig å oppnå en platåkonsentrasjon av 5-FU i plasma i 23 dager. Ved in vivo forsøk i gnagere kunne man påvise krystaller av 5-FU i mikrokulene i opptil 19 dager. Hos kaniner etter intracerebral implantering av PLAGA-5-FU mikrokuler (7 mg/kg av 5-FU), kunne det ikke påvises noe spor av 5-FU i serum, noe som antyder at den aktive forbindelsen så å si ikke i det hele tatt forefinnes i den systemiske sirkulasjonen.

Etter intracerebral implantering av PLAGA-5-FU mikrokuler i gnagere med en total dose på 17 mg/kg kroppsvekt av 5-FU, kunne man ikke påvise noen tegn til systemisk toksisitet eller tegn til klinisk eller histologisk nevrotoksitet. Ved den fraksjonerte dosen på 24 Gy, så ble kombinasjonen av 5-FU mikrokuler/cerebral radioterapi fullstendig tolerert (Menei P, Vectorisation dans le SNC par implantation stéréotaxique de microsphères [Vectorization in the CNS by stereotactic implantation of microspheres], Thèse d'Université en Sciences Pharmaceutiques [University doctorate in pharmaceutical sciences], Université d'Angers [University of Angers], 1995). Til slutt kan det nevnes at når disse mikrokulene ble implantert ved hjelp av stereotaksi i ondartet gliom utviklet i rotter (C6 gliom), så kunne man observere en signifikant nedsatt mortalitet (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).

Fordelaktig kan mikrokulene suspenderes i en steril løsning, hvorefter suspensjonen injiseres i veggene omkring operasjonsstedet etter at tumoren er utoperert.

Den sterile løsningen inneholder fortrinnsvis:

- mellom 1 og 1,5%, fortrinnsvis 1,25% vekt/volum av et viskositetsmodifiserende stoff, for eksempel natriumkarboksymetylcellulose,
- 5 - mellom 0,1 og 1,5%, fortrinnsvis 1% av et overflateaktivt middel, for eksempel polysorbat 80[®], og
- mellom 3,5 og 4,5%, fortrinnsvis 4% av et isotonisitetsmiddel, for eksempel mannitol.

Mikrokulene blir fortrinnsvis suspendert ekstemporært like før injeksjon. Suspensjonen inneholder fortrinnsvis 3 ml av den sterile løsningen som
10 beskrevet ovenfor, og fra 700 til 800 mg av de bionedbrytbare mikrokulene.

Etter å ha bekreftet diagnosen med hensyn til glioblastom og en makroskopisk utoperering av den gliale tumoren, blir suspensjonen av mikrokulene implantert i veggene omkring operasjonsstedet i en dybde på minst 2 cm, fortrinnsvis 2-3 cm, i minst hver eneste cm².

15 Når anticancermiddelet er 5-FU, så vil den totale dosen av den suspensjonen som er injisert, tilsvare en mengde av 5-FU på mellom 50 og 200 mg.

Radioterapien er fokusert på tumorens volum, og det volum som bestråles innbefatter hele den preoperative tumoren med en margin på minst 2 cm i alle retninger, og det anvendes en total dose på mellom 50 Gy og 60 Gy.

20 Radioterapien startes fortrinnsvis mellom andre og syvende dag etter operasjonen. En total dose på mellom 50 Gy og 60 Gy spres ut over et tidsrom på mellom 4 og 8 uker, for eksempel i en mengde på 5 fraksjoner pr uke.

25 Radioterapien utføres fortrinnsvis med en total dose på 60 Gy i ca. 6 uker, fortrinnsvis igjen med en mengde på 5 fraksjoner pr uke i 6,5 uker.

Etter å ha injisert mikrokulene like etter at svulsten er utoperert, kan man utføre en eller flere nye injeksjoner av mikrokuler ved stereotaksi i det tilfellet at tumoren igjen oppstår.

30 De mikrokuler som brukes i foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ved å bruke en emulerings-ekstraksjonsteknikk ifølge en variasjon av den fremgangsmåten som er beskrevet av Boisdron-Celle M, Menei P, Benoit JP:

Preparation of biodegradable 5-fluorouracil-loaded microspheres, J Pharm Pharmacol, 47, 108-114, 1995.

5 Foreliggende oppfinnelse angår også en fremgangsmåte for fremstilling av de bionedbrytbare mikrokulene som inneholder et anticancermiddel, og som er belagt med en polymer, brukt som beskrevet i foreliggende oppfinnelse. Hovedtrinnene i denne fremgangsmåten består av å fremstille en organisk fase hvor anticancermiddelet og polymeren er dispergert i et organisk løsemiddel. Den organiske fasen og en vandig fase blir så emulgert, hvorefter det organiske løsemiddelet blir ekstrahert ved å tilsette vann. Til slutt blir 10 suspensjonen av de fremstilte mikrokulene filtrert.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er først og fremst karakterisert ved at anticancermiddelet er dispergert i det organiske løsemiddelet under kraftig røring før polymeren tilsettes.

15 Avhengig av de tilpasninger som gjøres i forhold til tidligere kjente fremgangsmåter som måtte anvendes, så blir det aktive prinsipp malt i en planetarisk kulemølle. Størrelsen på de fremstilte krystallene vil da være mellom 15 og 50 μm . Størrelsen på de krystallene som skal innkapsles og deres dispergering, er i virkeligheten vesentlige kriterier for å kontrollere graden av innkapsling og kinetikken med hensyn til frigjøringen in vitro.

20 Det aktive prinsipp blir så dispergert i et organisk løsemiddel, fortrinnsvis diklormetan, i et rundbunnet rør under røring ved å bruke en homogeniseringsstav før polymeren tilsettes.

25 Homogeniseringen gir en homogen suspensjon og svekker forskjeller fra en porsjon til en annen, og reduserer størrelsen på krystallene av det aktive prinsipp.

Den organiske fasen fremstilles i et løsemiddel uten et hjelpeløsemiddel. Fraværet av sistnevnte gjør at utfellingen av polymeren under emulgeringsfasen går langsommere, slik at de fremstilte partikler er mindre porøse.

30 Dispersjonen med det aktive prinsipp blir så overført til en første reaktor.

Polymeren blir så tilsatt i en mengde på mellom 8 og 13%, fortrinnsvis 11%. Den fremstilte organiske fasen holdes på romtemperatur under konstant røring i 2 til 4 timer og så i ca 15 minutter ved en temperatur på mellom 1 og 5°C,

fortrinnsvis ca 2°C. En lengre røreperiode for denne organiske fasen ved romtemperatur sikrer en total oppløsning av polymeren i løsemiddelet.

Den vandige fasen fremstilles i en annen reaktor, fortrinnsvis ved samme temperatur som den organiske fasen, det vil si ca 2°C. Reduksjon av
5 temperaturen på den vandige fasen og den organiske fasen øker deres viskositet og graden av innkapsling. Den vandige fasen er for eksempel en vandig 10% PVA-løsning.

Det anvendes to reaktorer med kjølevæske, og sistnevnte sirkulerer i serie mellom de to reaktorene. Temperaturen på den organiske og den vandige fase
10 er fordelaktig identisk, fortrinnsvis ca 2°C, når de to fasene blandes. God kontroll av temperaturen vil effektivt gi optimal partikkelstørrelse, oppløsningshastighet at det aktive prinsipp og ekstraksjonshastighet for løsemiddelet.

Den organiske fasen overføres fra den første reaktoren til den andre.
15 Volumforholdet mellom den vandige fasen og den organiske fasen er mellom 80/3 og 120/3, fortrinnsvis 100/3.

Den fremstilte emulsjonen røres i minst 3 minutter, fortrinnsvis mellom 3 og 6 minutter, fortrinnsvis ca 5 minutter. Valget av dette tidsrommet er direkte korrelert med kinetikken omkring frigjøringen av det aktive prinsipp, og
20 spesielt den såkalte "briste"-effekten over 24-48 timer.

Fraværet av et hjelpeløsemiddel koblet med tilstrekkelig emulgeringstid muliggjør en oppløsning av det aktive prinsipp som enten ikke er belagt eller bare dårlig belagt, slik at frigjøringskinetikken i den første fasen er bedre kontrollert.

25 Vann blir så tilsatt emulsjonen i et volumforhold mellom emulsjon og vann på mellom 1/4 og 1/2, fortrinnsvis ca 1/3, for å ekstrahere det organiske løsemiddelet. Temperaturen på ekstraksjonsvannet er mellom 1 og 5°C, fortrinnsvis ca 4°C.

Emulgeringen og ekstraksjonen utføres i den samme reaktoren for å begrense variasjonen fra en porsjon til en annen og for å spare tid. Temperaturen under ekstraksjonen er lav for å begrense en for sterk oppløsning av det aktive prinsippet.
30

Den fremstilte suspensjonen av mikrokuler blandes i et par minutter og blir så filtrert i en inert atmosfære. Ved å anvende en inert atmosfære er det mulig å begrense risikoen for en forurensning av produktet.

- 5 Mikrokulene som er fremstilt ved hjelp av den fremgangsmåten som er beskrevet ovenfor blir så med fordel frysetørket.

10 ml sterilt vann blir tilsatt 2 til 5 g av mikrokulepulveret (filterkaken). Denne blandingen blir så frosset ved -40°C og deretter plassert i en frysetørker. Selve frysetørkingen varer i 18 timer, og deretter bør man holde en sekundær tørketemperatur under 10°C .

- 10 Mikrokulene bør lagres ved $+4^{\circ}\text{C}$ selv når de er tørre.

- Foreliggende oppfinnelse angår også en suspensjon som består av en steril løsning inneholdende fra 1 til 1,5% masse/volum av et viskositetsmodifiserende middel, fra 0,5 til 1,5% av et overflateaktivt middel og fra 3,5 til 4,5% av et isotonisitetsmiddel, og bionedbrytbare mikrokuler som frigjør et anticancermiddel og som er belagt med en polymer slik dette er beskrevet ovenfor, eventuell fremstilt ved hjelp av den fremgangsmåten som er beskrevet ovenfor, og hvor mengden av mikrokulene er fra 200 til 300 mg/ml av den sterile løsningen, fortrinnsvis 230 til 270 mg/ml.

- 20 Disse mikrokulene består fortrinnsvis av fra 15 til 35 vekt% av anticancermiddel og fra 65 til 85 vekt% av polymer.

Polymeren er fordelaktig poly(d,l-melkesyre-co-glykolsyre) og bør fortrinnsvis inneholde like mengder av melkesyre og glykolsyre.

Den sterile løsningen inneholder fortrinnsvis 1,25% vekt/volum av natriumkarboksymetylcellulose, 1% polysorbat 80 og 4% mannitol.

- 25 Oppfinnelsen vil nå bli illustrert på en ikke-begrensende måte ved hjelp av de følgende eksempler.

EKSEMPEL 1

- 30 Mikrokulene ble fremstilt ved å bruke en teknikk med hensyn til emulgering og ekstraksjon av løsemiddel, som er en variasjon av den fremgangsmåten som er beskrevet av Boisdron-Celle M, Menei P og Benoit JP (Preparation of biodegradable 5-fluorouracil-loaded microspheres, J Pharm Pharmacol, 47, 108-114, 1995).

Maling av 5-FU

5-FU ble malt i en planetarisk kulemølle, for eksempel Pulvérisette 7-møllen (Fritsch). 8,5 g 5-FU ble tilsatt et beger som inneholder 7 perler. Malingen varer i 10 minutter ved hastighet 7. Pulveret blir så gjenvunnet i en steril
5 benk. De fremstilte krystallene har en størrelse på mellom 15 og 50 μm og deles i to fraksjoner: En fin fraksjon (med partikkelstørrelse på mindre enn 1 μm) og en grov fraksjon (større enn 30 μm).

Dispergering av 5-FU i det organiske løsemiddelet

10 Det malte 5-FU blir dispergert i 45 ml diklormetan under røring ved å bruke en homogenisator, for eksempel en Ultra-Turrax-maskin i 3 minutter ved 13500 omdreininger pr minutt, i et rundbunnet rør.

Fremstilling av den organiske fasen

5-FU-dispersjonen blir overført til en reaktor på 150 ml og utstyrt med en kjølekappe. PLAGA blir så tilsatt slik at PLAGA/diklormetanforholdet er lik
15 11%. Den organiske fasen blir rørt med en padlerører ved 450 omdreininger pr minutt i 4 timer ved 20°C, så i 15 minutter ved 2°C. Temperaturen i reaktoren holdes konstant innenfor 0,1% avvikt ved hjelp av en kryostat.

Fremstilling av emulsjonen

1500 ml av en autoklavert vandig 10% PVA-løsning blir fremstilt og holdt på
20 2°C i en 6 liters reaktor utstyrt med kjølekappe. Den organiske fasen blir så overført til denne reaktoren ved å åpne bunnventilen i den første reaktoren. Den organiske fasen blir i løpet av 5 til 10 sekunder overført til den vandige fasen, som så blir rørt ved hjelp av en padlerører ved 375 omdreininger pr minutt. Volumforholdet mellom den vandige fasen og den organiske fasen er
25 lik 100/3.

Emulsjonen blir rørt i 4 minutter og 45 sekunder.

Ekstraksjon

Når emulsjonen er ferdig, blir 4,5 l ekstraksjonsvenn ved 4°C helt over emulsjonen i et volumforhold mellom emulsjon og vann på 1/3.
30 Ekstraksjonen varer i 2 minutter.

Filtrering

Hele innholdet i den andre reaktoren blir overført via bunnventilen til en tank av rustfritt stål, og blir så plassert under et nitrogentrykk. Suspensjonen blir filtrert gjennom et filter med en porediameter på 3 μm .

5 Etter at hele suspensjonen er ført gjennom filteret, blir filterkaken vasket to ganger med 3 liter sterilt vann.

Innkapslingsgraden av anticancermiddelet i mikrokulene er 20%. Etter sikting blir diklormetanet desorbert i en ovn i 48 timer. Mikrokulene blir så pakket og sterilisert ved gammabestråling ved 19 kGy. Ytterligere kontroll av innkapslingsgraden blir så utført etter sterilisering. Det blir så utført en
10 analyse på eventuelle gjenværende spor av løsemiddel. Et gjenværende nivå av diklormetan på 0,5% kan med fordel påvises. Steriliteten og kinetikken med hensyn til frigjøring in vitro av mikrokulene blir så kontrollert.

De fremstilte mikrokulene har et innhold av det aktive prinsipp på $23 \pm 3,5\%$.

15 Det ble fremstilt flere porsjoner ved hjelp av den fremgangsmåten som er beskrevet ovenfor, og den midlere partikkelstørrelsen på $48 \pm 20 \mu\text{m}$ ble beregnet for alle kulene i alle porsjonene, og dette tilsvarer $46 \pm 7 \mu\text{m}$ (middel av alle midlene i de fremstille porsjonene).

De fremstilte mikrokulene har et innhold av aktivt prinsipp på $23 \pm 3,5\%$ og en middelstørrelse på $48 \pm 20 \mu\text{m}$.

20 **EKSEMPEL 2**

Mikrokuler ble fremstilt ved hjelp av den emulgerings-ekstraksjonsteknikk som er beskrevet i eksempel 1.

Maling av 5-FU

Malingen ble utført som beskrevet i eksempel 1, og 4 g 5-FU ble malt.

25 De fremstilte krystallene hadde en størrelse på mellom 15 og 50 μm og ble delt i to fraksjoner: En fin fraksjon (med en partikkelstørrelse på mindre enn 1 μm) og en grov fraksjon (større enn 30 μm).

Dispergering av 5-FU i det organiske løsemiddelet

30 Det malte 5-FU ble dispergert i 40 ml diklormetan med røring, og ved å bruke homogenisator, for eksempel en Ultra-Turrax-maskin i 3,5 minutter ved 13500 omdreininger pr minutt i et rundbunnet rør.

- Den organiske fasen og emulsjonen ble fremstilt som beskrevet i eksempel 1.

- Ekstraksjonen og filtreringen ble utført som beskrevet i eksempel 1.

Karakteristika for de fremstilte mikrokuler:

5 5-FU-innhold: 22%

Størrelse: $46 \pm 7 \mu\text{m}$

Bristeeffekt ved 24 timer etter bestrålingssterilisering ved 19 kGy: $40 \pm 4\%$.

EKSEMPEL 3

10 En åpen forsøksklinisk undersøkelse av typen fase I/II ble utført med 50:50 PLAGA/5-FU mikrokulene fra eksempel 1.

De fremstilte mikrokulene ble suspendert ekstemporært i en løsning inneholdende:

- 1,25% vekt/volum av natriumkarboksymetylcellulose (Cooper),
- 1% polysorbat 80,
- 15 - 4% mannitol, og
- tilstrekkelig vannmengde til at man fikk fremstilt et injiserbart preparat i et totalt volum på 3 ml.

20 Løsningen ble presterilisert ved autoklaving ved 121°C i 20 minutter og strålingssterilisert ved gammabestråling med en dose på mellom 5 kGy og 25 kGy, fortrinnsvis 19 kGy.

Fremstillingen av denne suspensjonen må gjøres meget forsiktig, ettersom man må unngå å få dannelse av bobler. Suspensjonen må injiseres umiddelbart etter at den er fremstilt, ettersom mikrokulene har en tendens til å sedimentere seg i sprøyten og blokkere den.

25 Mikrokulesuspensjonen implanteres i veggene omkring operasjonsstedet etter en makroskopisk fjerning av den gliale tumoren, til en dybde på mellom 2 og 3 cm, hver eneste cm^2 , i en mengde på 100 μl pr injeksjon.

Injeksjonen ble utført med en 1 ml sprøyte og et kateter (Insys[®] Vialon[™]) på 18 ga (1,3 x 45 mm), og hvor kjernerøret av metall var fjernet slik at man

bare hadde beholdt det rettavskårne skumdekkede plastkateteret for injeksjon av suspensjonen i hjernevevet. Man kan bruke så mange 1 ml sprøyter som det er behov for. Injeksjon av suspensjonen med den skråttskårne nålen øker risikoen for hematom og tilbakestrøm av mikrokuler. Kateteret må ha så liten diameter at det ikke traumatiserer hjernevevet, samtidig som det må være stort nok til ikke å bli blokkert av mikrokulesuspensjonen.

Injeksjonen må utføres meget forsiktig, og kateteret må forbli på plass i et par minutter før det fjernes, for derved å unngå en tilbakestrøm av mikrokulene. Et 1 cm² fragment av en resorberbar hemostatisk kompress (Surgical® eller Spongel®) blir så pålagt injeksjonsstedet.

De pasientene som inngikk i undersøkelsen var mellom 18 og 68 år gamle og hadde ingen neoplastisk historie, hadde en Karnofskyindeks på mer enn 60, hadde en klinisk historie og hvor billedundersøkelser hadde klarlagt en sutentakulær glioblastom, hadde vært underkastet en makroskopisk fullstendig fjerning av tumoren, og deres interoperative histologiske undersøkelse (utført etter de kriterier som er nedlagt av Verdens Helseorganisasjon: Nekrose, vaskulær proliferasjon, nukleær pleomorfisme og mitotisk aktivitet) bekrefter diagnosen på glioblastom.

Kriteriene for å utelukke pasienter som følger: Metabolsk svikt, svangerskap eller andre patologier før canceren ble påvist.

Det ble først etablert tre grupper for å undersøke effektene av økende doser av 5-fluoruracil: I kronologisk rekkefølge 70, 132 og 264 mg, og behandling av den følgende gruppe ble først startet etter at man hadde observert toleranse med hensyn til behandlingen av den foregående gruppen.

På grunn av forekomst av grad II nevrologisk toksisitet i en pasient som fikk 132 mg 5-FU, og ifølge de regler som er fastlagt for å stoppe forsøket, ble den terapeutiske eskaleringen stoppet, og de etterfølgende pasienter fikk den samme dosen på 132 mg.

Vanlig ekstern radioterapi (fokusert på tumorvolumet slik dette kunne bedømmes ved en preoperativ MRI med en energi på 10 MV), ble startet mellom andre og syvende dag etter operasjonen. Det ble anvendt en total dose på 60 Gy i 33 fraksjoner på 1,8 Gy med en mengde på 5 fraksjoner over 6,5 uker. Det volum som ble bestrålt innbefatter den preoperative tumoren og et område på minst 2 cm i alle retninger.

Pasientene ble kontrollert klinisk og radiologisk: Og en scan 72 timer etter operasjonen ble brukt for å bekrefte en makroskopisk fullstendig ekserese eller fjerning av tumoren, og en klinisk undersøkelse ble utført på dag 10, 20 og 30. MRI ble utført på dag 10 og 30. Endelig ble det utført en analyse med hensyn til konsentrasjonen av 5-FU i blodet, og CSF ble utført etter 72 timer og på dag 10, 20 og 30. Toksiteten (nevrologisk, hematologisk, slimhinner og kardiologisk) ble bedømt etter en skala basert på de kriterier som er fastlagt av WHO. Etter 1 måned ble pasientene undersøkt klinisk hver andre måned, og ble behandlet med MRI hver tredje måned.

10 Mild postoperativ anemi, hyperleukocytose og mild lymfopeni ble observert i alle pasientene.

Den farmakologiske undersøkelsen bekreftet en vedvarende frigjøring av 5-FU i den cerebrospinale væsken (CSF) i mer enn 30 dager, og en overgangspassasje med et lavere nivå av molekylet i den systemiske sirkulasjonen. Signifikante konsentrasjoner av 5-FU var tilstede i den cerebrospinale væsken selv 1 måned etter implanteringen.

Frigjøringsprofilene for 5-FU i den cerebrospinale væsken viser en topp på den tiende og den tyvende dagen henholdsvis for doser på 70 og 132 mg. Nivået av 5-FU i plasma var ikke påvisbart fra den tiende dagen i halvparten av pasientene.

20 Den systemiske toleransen var utmerket i alle de behandlede pasienter. Man kunne ikke observere noen forandringer med hensyn til kjemi eller cellularitet i den cerebrospinale væsken. Forekomst av et cerebralt ødem under radioterapi i en pasient som ble behandlet med 132 mg, gjorde det ikke mulig å fortsette eskaleringen av dosen.

8 pasienter, og herav 4 menn og 4 kvinner med en midlere alder på 48,5 og en Karnofskyindeks på mer enn 90, inngikk således i undersøkelsen. Den første gruppen av tre pasienter fikk en dose på 70 mg, mens den andre gruppen på fem fikk en dose på 132 mg. De preliminære resultater med hensyn til overlevelse kunne ikke tolkes eller behandles statistisk, på grunn av at det var for få pasienter. Resultatene var imidlertid meget oppmuntrende. Ved den endelige oppsummeringen av den første gruppen som ble behandlet (70 mg), så døde de tre pasientene etter 61, 114 og 125 uker henholdsvis. Det skal bemerkes at den pasienten som døde etter 114 uker, døde av lungemetastaser fra glioblastomet. I den andre behandlingsgruppen (132 mg), så døde tre

pasienter 31, 59 og 82 uker etter operasjonen, mens to var fremdeles i remisjon etter 159 og 172 uker på det tidspunkt da disse preliminnære resultater ble notert.

- 5 Den midlere overlevelse for pasientene er 98 uker (den er 50,6 uker i litteraturen for pasienter som oppfyller de samme kriterier (Devauz BC, O'Eallon JR, Kelly PJ, Resection, biopsy and survival in malignant glial neoplasms, J Neurosurg, 78: 767-775, 1993)). Fem av åtte pasienter, det vil si 62%, var levende etter 18 måneder, mens det i litteraturen for pasienter som tilfredsstiller de kriterier som er brukt i denne undersøkelsen er angitt at bare
- 10 20% av pasientene er overlevende etter 18 måneder (Devauz BC, O'Eallon JR, Kelly PJ, Resection, biopsy and survival in malignant glial neoplasms, J Neurosurg, 78: 767-775, 1993).

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for å fremstille bionedbrytbare mikrokuler som inneholder et anticancermiddel og er belagt med en polymer ved emulgerings-
ekstraksjon, som består i å dispergere polymeren og anticancermiddelet i et
5 organisk løsemiddel, blande den organiske fasen som blir oppnådd med en
vandig fase for å oppnå en emulsjon, ekstrahere det organiske løsemiddelet
ved å tilsette vann, og deretter filtrere mikrokulesuspensjonen som er
oppnådd,
k a r a k t e r i s e r t v e d at anticancermiddelet er dispergert i det organiske
10 løsemiddelet under kraftig røring før polymeren tilsettes.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det organiske løsemiddelet er diklormetan.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den vandige fasen og den organiske fasen har
15 en identiske temperaturer, fortrinnsvis lik omtrent 2°C, når de er blandet
sammen.
4. Fremgangsmåte ifølge ett av kravene 1 til 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den organiske fasen inneholder 11 % polymer.
5. Fremgangsmåte ifølge ett av kravene 1 til 4,
20 k a r a k t e r i s e r t v e d at mengdeforholdet mellom den vandige fasen og
den organiske fasen er 100/3.
6. Fremgangsmåte ifølge ett av kravene 1 til 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at emulsjonen som består av den vandige fasen og
den organiske fasen blandes i minst 3 minutter.
- 25 7. Fremgangsmåte ifølge ett av kravene 1 til 6,
k a r a k t e r i s e r t v e d at vannet som er nødvendig for å ekstrahere det
organiske løsemiddelet tilsettes i en slik mengde at forholdet emulsjon til
vann pr volum er lik 1/3.
8. Fremgangsmåte ifølge ett av kravene 1 til 7,
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at temperaturen på vannet som er nødvendig for å
ekstrahere det organiske løsemiddelet har en temperatur på 4°C.

9. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 til 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d at anticancermiddelet males opp før det
dispergeres i det organiske løsemiddelet, slik at størrelsen på krystallene av
anticancermiddelet er mellom 15 og 50 μm .
- 5 10. Fremgangsmåte ifølge ett av kravene 1 til 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d at etter at ekstraksjonsvannet er tilsatt så blir
suspensjonen som er oppnådd filtrert under en inert atmosfære.
11. Fremgangsmåte ifølge ett av kravene 1 til 10,
k a r a k t e r i s e r t v e d at mikrokulene blir frysetørket.
- 10 12. Fremgangsmåte ifølge ett av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at polymeren er valgt fra etylcellulose, polystyren,
poly(ϵ -kaprolakton), poly(d,1-melkesyre) og poly(d,1-melkesyre-co-
glykolisyre).
13. Fremgangsmåte ifølge krav 12,
15 k a r a k t e r i s e r t v e d at polymeren som belegger mikrokulene er en
poly(d,1-melkesyre-co-glykolsyre).
14. Fremgangsmåte ifølge krav 13,
k a r a k t e r i s e r t v e d at polymeren som belegger mikrokulene er en
poly(d,1-melkesyre-co-glykolsyre) som inneholder en lik mengde med
20 melkesyre og glykolsyre.
15. Suspensjon,
k a r a k t e r i s e r t v e d å bestå av en steril løsning som inneholder 1 til
1,5 % masse/volum av et viskositetsmodifiserende middel, 0,5 til 1,5 % av et
overflateaktivt middel og 3,5 til 4,5 % av et isotonisitetsmiddel, og
25 bionedbrytbare mikrokuler som kan bli oppnådd ved å benytte
fremgangsmåten ifølge ethvert av kravene 1 til 14, der nevnte mikrokuler
frigjør et anticancermiddel, og hvor kulene er belagt med en polymer, og hvor
mengden av mikrosfærene representerer 200 til 300 mg/ml med steril løsning,
fortrinnsvis 230 til 270 mg/ml.
- 30 16. Suspensjon ifølge krav 15,
k a r a k t e r i s e r t v e d at mikrokulene består av 15 til 35 vekt% av
anticancermiddel og fra 65 til 85 vekt% av polymer.
17. Suspensjon ifølge krav 15 eller 16,
k a r a k t e r i s e r t v e d at polymeren er poly(d,1-melkesyre-co-

glykolsyre), fortrinnsvis inneholdende en lik mengde melkesyre og glykolsyre.

18. Suspensjon ifølge ett av kravene 15 til 17,
karakterisert ved at den sterile løsningen inneholder 1,25 %
5 vekt/volum av natriumkarboksymetylcellulose, 1 % polysorbat 80 og 4 %
mannitol.

19. Suspensjon ifølge ett av de foregående krav,
karakterisert ved at mikrokulene har en gjennomsnittlig diameter på
48 +/- 20 µm, fortrinnsvis 46 +/- 7 µm.

10 20. Suspensjon ifølge ethvert av de foregående krav,
karakterisert ved at mikrokulene inneholder 19 til 27 % med 5-FU,
fortrinnsvis 20 % 5-FU.

15 21. Anvendelse av en suspensjon ifølge ethvert av kravene 15 til 20 for
fremstillingen av et medisinsk produkt ment for benyttelse simultant eller
separat i tid eller spredt ut over tid med en radioterapi, til behandlingen av
glioblastom, der mikrokulene er ment å skulle bli implantert i veggene på
operasjonsstedet, til en dybde på minst to centimeter, fortrinnsvis mellom 2
og 3 centimeter, i det minste hver cm², etter utskjæring av glitumoren, og
polymeren som belegger dem forsinker frigjøringen av anticancermiddelet og
20 opprettholder en terapeutisk effektiv konsentrasjon i det parenchymale
rommet over tid, for å nå en overlevelsestid for pasienten som blir behandlet
på denne måten på minst 90 uker, fortrinnsvis omtrent 130 uker, mer
foretrukket omtrent 160 uker.

22. Anvendelse ifølge krav 21, der anticancermiddelet er hydrofilt og/eller
25 ikke krysser blod-hjerne barrieren.

23. Anvendelse ifølge krav 21 eller 22, der anticancermiddelet ikke har noen
sentral nevrotoksisitet.

24. Anvendelse ifølge ett av de foregående krav, der anticancermiddelet
består av en radiosensitiviserende anticancerforbindelse eller en blanding av
30 anticancerforbindelser som inneholder minst én radiosensitiviserende
anticancerforbindelse, der nevnte anticancerforbindelse/-forbindelser er valgt
fra 5-fluoruracil (5-FU), platinamidler slik som karboplatin og cisplatin,
taxaner slik som docetaxel og paclitaxel, gemcitabin, VP16, mitomycin,
idoxuridin, topoisoimerase-1-inhibitorer slik som irinotecan, topotecan og

camptoteciner, nitrosoureaer slik som BCNU, ACNU eller MCNU, metotreksat, bleomycin, adriamycin, cytoxan og vincristin, immunmodulerende cytokiner slik som IL2, IL6, IL12 og IL13, og interferoner.

5 25. Anvendelse ifølge krav 24, der anticancermiddelet er 5-fluoruracil.

26. Anvendelse ifølge krav 25, der konsentrasjonen av 5-FU i cerebrospinalvæsken, som gjenspeiler konsentrasjonen i det parenchymale rommet, er mellom 3 og 20 ng/ml.

10 27. Anvendelse ifølge ett av de foregående krav, der en nevrobeskyttende forbindelse som er valgt fra peptidvekstfaktorer slik som NGF eller BDNF, blir tilsatt til anticancermiddelet.

15 28. Anvendelse ifølge ett av de foregående krav, der polymeren som belegger mikrokulene, som forsinker frigjøringen av anticancermiddelet, opprettholder nevnte terapeutisk effektive konsentrasjon i det parenchymale rommet i minst tre uker, fortrinnsvis minst fire uker.

29. Anvendelse ifølge krav 25, der den totale dosen med 5-FU injisert er mellom 50 og 200 mg, fortrinnsvis 130 mg.

20 30. Anvendelse ifølge ett av de foregående krav, der radioterapien er fokusert på tumorvolumet ved at volumet som bestråles omfatter den preoperative tumoren med en margin på minst to centimeter i alle retninger, og ved at en total dose på mellom 50 Gy og 60 Gy blir benyttet.

31. Anvendelse ifølge ett av de foregående krav, der radioterapien fortrinnsvis blir startet mellom den andre og syvende dagen etter operasjonen.

25 32. Anvendelse ifølge ett av de foregående krav, der radioterapien blir utført med en total dose på 60 Gy i omtrent seks uker.

33. Anvendelse ifølge ett av de foregående krav, der suspensjonen av mikrokuler blir injisert ved stereotakse én eller flere ganger i tilfellet der tumoren gjenoppstår.