



MD 1713 Y 2023.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1713** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *A61K 31/704* (2006.01)
A61M 25/01 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului

(21) Nr. depozit: s 2021 0100
(22) Data depozit: 2021.11.23

(41) Data publicării cererii:
2023.05.31, BOPI nr. 5/2023

(45) Data publicării hotărârii de
acordare a brevetului:
2023.08.31, BOPI nr. 8/2023

(71) Solicitanți: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD; IMSP INSTITUTUL DE NEUROLOGIE ȘI NEUROCHIRURGIE "DIOMID GHERMAN", MD

(72) Inventatori: MATCOVSCHI Valeriu, MD; LISII Dan, MD; GUDUMAC Valentin, MD; ANDRONACHE Lilia, MD

(73) Titulari: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD; IMSP INSTITUTUL DE NEUROLOGIE ȘI NEUROCHIRURGIE "DIOMID GHERMAN", MD

(54) **Metodă de chimioterapie selectivă interstițială pentru glioblastomul recurent al creierului**

(57) **Rezumat:**

Invenția se referă la medicină, în special la neurochirurgie și oncologie și poate fi utilizată pentru chimioterapia selectivă interstițială pentru tratamentul glioblastomului recurent al creierului.

Esența invenției constă în aceea că se efectuează intervenția chirurgicală pentru înlăturarea tumorii, apoi în patul tumorii se introduce un capăt al unui cateter din silicon, care se scoate la suprafața craniului, după care cavitatea cranială se închide pe straturi. Cateterul se trece prin stratul subcutanat al regiunii parieto-occipitale, de-a lungul suprafeței posterioare a mușchiului sternocleidomastoidian, iar în regiunea subclaviculară se efectuează o incizie de 2 cm,

unde se introduce un mini-port la care se conectează capătul opus al cateterului, după care plaga se suturează. Se administrează prima doză de 0,25 mg de doxorubicină cu ajutorul unui liniomat, care se conectează la mini-portul instalat cu ajutorul unei seringi, apoi în lipsa reacțiilor adverse se repetă administrarea în doză de 1 mg, de 2...3 ori, peste fiecare 2 zile. După 10 zile se administrează preparatul utilizat în doză de 1 mg, apoi procedura se repetă de 3 ori, peste fiecare 10 zile, după care doxorubicina se administrează o dată pe lună, în doză de 1 mg, timp de 4...6 luni.

Revendicări: 1

MD 1713 Y 2023.08.31

(54) Method for selective interstitial chemotherapy for recurrent brain glioblastoma

(57) Abstract:

1
The invention relates to medicine, in particular to neurosurgery and oncology, and can be used in selective interstitial chemotherapy for the treatment of recurrent brain glioblastoma.

Summary of the invention consists in that it is performed the surgical tumor removal intervention, then into the tumor bed is introduced one end of a silicone catheter, which is brought to the surface of the skull, after which the cranial cavity is closed in layers. The catheter is passed through the subcutaneous layer of the parieto-occipital region, along the posterior surface of the sternocleidomastoid muscle, and in the

2
subclavian region, is made an incision of 2 cm, where a mini-port is inserted, to which the opposite end of the catheter is connected, after which the wound is sutured. The first dose of doxorubicin 0.25 mg is administered using a liniomat, which is connected to the installed mini-port using a syringe, then, in the absence of adverse reactions, it is administered again in a dose of 1 mg, 2...3 times, every 2 days. After 10 days, it is administered the used drug in a dose of 1 mg, then the procedure is repeated 3 times, every 10 days, after which doxorubicin is administered once a month, in a dose of 1 mg, for 4...6 months.

Claims: 1

(54) Метод селективной интерстициальной химиотерапии для рецидивирующей глиобластомы мозга

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к медицине, в частности к нейрохирургии и онкологии, и может быть использовано при селективной внутритканевой химиотерапии для лечения рекуррентной глиобластомы головного мозга.

Сущность изобретения состоит в том, что проводят хирургическое вмешательство по удалению опухоли, затем в ложе опухоли вводят один конец силиконового катетера, который выводят на поверхность черепа, после чего полость черепа закрывают послойно. Катетер проводят через подкожный слой теменно-затылочной области, вдоль задней поверхности грудино-ключично-сосцевидной мышцы, а в подключичной

2
области выполняют разрез длиной 2 см, куда вводят мини-порт, к которому подключают противоположный конец катетера, после чего рану ушивают. Вводят первую дозу доксорубина 0,25 мг с помощью линиомата, который соединяется с установленным мини-портом при помощи шприца, затем при отсутствии побочных реакций вводят повторно в дозе 1 мг, 2...3 раза, через каждые 2 дня. Через 10 дней вводят использующий препарат в дозе 1 мг, затем процедуру повторяют 3 раза, через каждые 10 дней, после чего доксорубин вводят один раз в месяц, в дозе 1 мг, в течение 4...6 мес.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la medicină, în special la neurochirurgie și oncologie și poate fi utilizată pentru chimioterapia selectivă interstițială pentru tratamentul glioblastomului recurent al creierului.

Glioblastomul este una din cele mai agresive tumori cerebrale, având o recidivă și mortalitate de 100% în intervalul de 1,5...2 ani de la intervenția chirurgicală pentru eliminarea tumorii (Batash R., Asna N., Schaffer P., Francis N., Schaffer M. Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. Curr. Med. Chem. 2017, vol 24(27), p. 3002-3009).

Glioblastomul multiform (GBM) este cea mai frecventă și mai agresivă tumoare malignă primară a creierului, cu o incidență globală de <10 la 100,000 de persoane și un prognostic remarcabil de prost, arătând o rată de supraviețuire la un an de numai 37,2% și o rată de supraviețuire la 5 ani doar de 5,1%, media supraviețuirii fiind de ~10 luni (Taylor O.G., Brzozowski J.S., Skelding K.A. Glioblastoma Multiforme: An Overview of Emerging Therapeutic Targets. Front Oncol. 2019 Sep. 26, vol. 9, p. 963. doi: 10.3389/fonc.2019.00963. PMID: 31616641; PMID: PMC6775189). Tratamentele de astăzi nu pot vindeca pacienții cu GBM, ci doar le poate extinde supraviețuirea.

Este cunoscută metoda de tratament complex al GBM, care constă în intervenția chirurgicală, unde se efectuează rezecția maximală a tumorii, urmată de radioterapie și chimioterapie concomitentă, sistemică, iar chimioterapia include cel mai frecvent temozolomida (TMZ) - un agent alchilant peroral, ambele ducând la îmbunătățiri ale supraviețuirii globale ale pacienților de la 12,1 luni când este utilizată radioterapia în monoterapie până la 14,6 luni, la utilizarea radioterapiei în combinație cu TMZ, administrată enteral. În afară de TMZ, chimioterapia poate include alte medicamente, cum ar fi: lomustina, carmustină intravenoasă, bevacizumab și alte chimioterapice aprobate de către Administrația SUA pentru Alimente și Medicamente (FDA) pentru tratamentul GBM [1], (Martínez-García M., Álvarez-Linera J., Carrato C., et al. SEOM clinical guidelines for diagnosis and treatment of glioblastoma, 2017, Clin Transl Oncol. 2018 Jan, vol. 20(1), p. 22-28).

Dezavantajul acestei metode de tratament complex constă în eficiența ei joasă, care se manifestă prin lipsa unei îmbunătățiri semnificative privind supraviețuirea și durata unei perioade fără recidive la acești pacienți. Un alt dezavantaj al acestei metode constă în eficiența nesatisfăcătoare, condiționată de faptul, că nu îndeplinește cerințele privind expunerea selectivă la celulele glioblastice, fiind afectat în mod inevitabil sistemul imunitar și toate celulele care se divid rapid, cum ar fi, de exemplu, epiteliul intestinal, seria mieloidă limfopoietică a măduvei osoase, celulele gonadelor și foliculilor piloși (Stepanovic A., Nikitovic M. Severe hematologic temozolomide-related toxicity and lifethreatening infections. J BUON. 2018, PMID: 29552752).

Un alt dezavantaj al metodei menționate constă în aceea că concentrația remediei chimioterapice în țesutul tumoral variază foarte mult și, adesea nu este citotoxică pentru celulele tumorale la intervalele dintre administrarea remediei. Totodată, chimioterapia sistemică contribuie la formarea clonelor de celule glioblastice tolerante, rezistente la concentrații ce depășesc de 5...10 ori dozele terapeutice ale remediilor chimioterapice utilizate.

Un alt dezavantaj constă în faptul că în chimioterapia sistemică, pot fi utilizate doar remedii chimioterapice care pot traversa bariera hemato-encefalică (BHE), o barieră semipermeabilă extrem de selectivă, care separă sângele de creier. BHE este o problemă de medicină fundamentală, care blochează progresul în dezvoltarea de noi terapii eficiente pentru tumorile cerebrale sau dezvoltarea de noi produse radiofarmaceutice pentru imagistica creierului (Pardridge W.M. Drug transport across the blood-brain barrier. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2012, p. 1959-1972).

Este cunoscută metoda de tratament al glioblastomului multiform (GBM), care se bazează pe implantarea unor capsule cu gel de carmustină "Gliadel" cu absorbție lentă în patul tumoral, fapt ce permite de a obține un efect citotoxic timp de câteva săptămâni sau câteva luni. Carmustina este o nitrozouree antineoplazică, care alchilează și leagă ADN-ul în toate fazele ciclului celular, ducând la perturbarea funcției ADN-lui celular, oprirea ciclului celular și apoptozei. Acest agent carbamoilează și proteinele, inclusiv enzimele de reparare a ADN-ului, rezultând cu un efect citotoxic pregnant. Implanturile biodegradabile de carmustină (BCNU) (Gliadel(@) Wafer, Eisai Inc., New Jersey, SUA) utilizate în tratamentul GMB îmbunătățesc supraviețuirea globală în comparație cu placebo în studii clinice controlate din Statele Unite și Europa [2].

Dezavantajul acestei metode de tratament constă în eficiența ei nesatisfăcătoare, care se manifestă prin lipsa unei îmbunătățiri semnificative privind supraviețuirea și durata unei perioade fără recidive la acești pacienți. Supraviețuirea medie pentru pacienții tratați cu capsule cu gel de carmustină "Gliadel", conform datelor din literatura de specialitate este de 8,7 luni față de 5,5 luni comparativ cu cei tratați fără capsule de carmustină (Bregy A., Shah A.H., Diaz M.V., Pierce H.E., Ames P.L., Diaz D.,

Komotar R.J. The role of Gliadel wafers in the treatment of high-grade gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2013 Dec; 13, vol 13(12), p 14).

Un alt dezavantaj al metodei menționate constă în dificultățile menținerii concentrației citotoxice optime ale remediei chimioterapice în țesutul tumoral pe termen lung, deoarece restabilirea capsulelor cu gel de carmustină "Gliadel" în patul tumoral poate fi efectuată doar prin intervenție neurochirurgicală, cu un risc ridicat de complicații grave, inclusiv convulsii și evenimente hemoragice sau trombotice.

Un alt dezavantaj al acestei metode de tratament constă în apariția unor complicații grave, cum ar fi edemul cerebral, convulsiile, probleme de vindecare a plăgii postoperatorii, infecțiile, trombozele, hipertensiune intracraniană, totodată, simptomele de intoxicație generală la utilizarea capsulelor Gliadel pentru pacienții cu GBM au fost mai exprimate (Ashby L.S., Smith K.A., Stea B. Gliadel wafer implantation combined with standard radiotherapy and concurrent followed by adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic literature review. *World J. Surg. Oncol.* 2016 Aug 24, doi: 10.1186/s12957-016-0975-5), fapt ce poate fi explicat prin aceea că carmustina este foarte lipofilă și traversează cu ușurință bariera hemato-encefalică (BHE) (Xing W.K., Shao C., Qi Z.Y., Yang C., Wang Z. The role of Gliadel wafers in the treatment of newly diagnosed GBM: a meta-analysis. *Drug Development and Therapy*, 2015, vol. 9, p. 33413348).

Este cunoscută altă metodă de tratament al glioblastomului malign recurent, care se bazează pe administrarea doxorubicinei lipozomale pegilate (PEG-DOXO) în doză de 20...40 mg/m², zilnic, care spre deosebire de doxorubicina liberă, pătrunde prin BHE și manifestă o eficacitate moderată împotriva gliomului malign recurent, în special, împotriva gliomului de gradul III [3].

Dezavantajul acestei metode constă în eficiența nesatisfăcătoare, condiționată de faptul că nu îndeplinește cerințele privind expunerea selectivă la celulele glioblastice, fiind afectat în mod inevitabil sistemul imunitar și toate celulele care se divid rapid (de exemplu, epiteliul intestinal, seria mieloidă și limfopoietică a măduvei osoase, celulele gonadelor și foliculilor piloși). Totodată, metoda menționată poate contribui la formarea clonelor de celule glioblastice tolerante, rezistente la remediu chimioterapic utilizat.

Cea mai apropiată după esență și rezultatul obținut poate fi metoda de tratament, care constă în implantarea intracraniană a unui polimer reabsorbabil, ce conține doxorubicină (DOXO), care prelungește semnificativ supraviețuirea animalelor experimentale purtătoare de gliom intracranian uman până la 45 de zile ($p < 0,0001$) față de 21 de zile în grupul de control, ce conține doar polimerul reabsorbabil fără DOXO. Mai mult decât atât, efectele secundare sistemice ale acestui remediu au fost minimizate din cauza că DOXO nu penetrează bariera hemato-encefalică (BHE) [4].

Dezavantajul acestei metode constă în eficiența nesatisfăcătoare, condiționată de faptul că metoda propusă nu îndeplinește cerința privind menținerea concentrației citotoxice optime a remediei chimioterapice atât în patul tumoral, cât și în țesutul creierului pe termen lung (luni de zile, chiar ani), fapt ce influențează negativ asupra citotoxicității și eradicării celulelor tumorale, precum și la apariția efectelor adverse: creșterea presiunii intracraniene provocate de edem cerebral, defecte de vindecare a plăgilor, apariția convulsiilor epileptice și altor probleme neurologice.

Un alt dezavantaj al acestei metode constă în dificultățile de menținere a concentrației citotoxice optime ale remediei chimioterapice în țesutul tumoral pe termen lung, deoarece restabilirea capsulelor cu gelul polimer reabsorbabil ce conține doxorubicină (DOXO) în cavitatea intracraniană poate fi efectuată doar prin intervenție neurochirurgicală, cu risc ridicat de complicații grave, inclusiv convulsii și evenimente hemoragice sau trombotice.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în optimizarea condițiilor de efectuare a metodei de chimioterapie selectivă interstițială pentru glioblastomul recurent al creierului cu crearea condițiilor ce asigură menținerea concentrației citotoxice optime a remediei chimioterapice atât în patul tumoral, cât și în țesutul creierului, fapt ce permite eradicarea mai completă a celulelor de gliom, reducerea recidivelor glioblastomului și mărirea speranței de viață a pacienților.

Esența invenției constă în aceea că se efectuează intervenția chirurgicală pentru înlăturarea tumorii, apoi în patul tumoral se introduce un capăt al unui cateter din silicon, care se scoate la suprafața craniului, după care cavitatea cranială se închide pe straturi. Cateterul se trece prin stratul subcutanat al regiunii parieto-occipitale, de-a lungul suprafeței posterioare a mușchiului sternocleidomastoidian, iar în regiunea subclaviculară se efectuează o incizie de 2 cm, unde se introduce un mini-port la care se conectează capătul opus al cateterului, după care plaga se suturează. Se administrează prima doză de 0,25 mg de doxorubicină cu ajutorul unui liniomat, care se conectează la mini-portul instalat cu ajutorul unei seringi, apoi în lipsa reacțiilor adverse se repetă administrarea în doză de 1 mg, de 2...3 ori, peste fiecare 2 zile. După 10 zile se administrează preparatul utilizat în doză de 1 mg, apoi procedura se repetă de 3 ori,

peste fiecare 10 zile, după care doxorubicina se administrează o dată pe lună, în doză de 1 mg, timp de 4...6 luni.

Paralel, se obține o cultură de celule de glioblastom și se selecționează remediul cu cea mai mare sensibilitate pentru tumoarea dată, care după refacerea stării neuropsihice somatice a pacientului (de obicei 14 zile), în calitate de remediu chimioterapic se folosește doxorubicina (DOXO) care, după efectuarea probei alergologice subcutanate, se injectează în port, cu o frecvență care permite obținerea și menținerea efectului citotoxic și citostatic optimal în patul tumoral și în țesutul creierului pe termen lung (luni de zile), în funcție de starea generală a pacientului, rezultatele testelor de sânge generale și biochimice, prezența celulelor tumorale circulante (CTC) și caracteristicilor lor moleculare, CT-ul dinamic și controlul RMN.

Numărul de cursuri de chimioterapie depinde de mai mulți factori: a) de toleranța biologică a medicamentului; b) de mărimea tumorii îndepărtate; c) de gradul de malignitate a tumorii; d) de rezultatele imagisticii prin rezonanța de control a creierului, etc.

Metoda propusă de chimioterapie interstițială utilizează catetere port standard, sterile, fabricate pe cale industrială pentru administrarea intravasculară selectivă a remediilor farmaceutice. Aceste porturi sunt fabricate de mai multe companii, cum ar fi "Braun" din Franța, sub denumirea "Celsite" (Celsite Acces Ports - Magazin online B. Braun. <https://magazin-bbraun.ro> > img > cms > Ghid util).

Instalarea unui cateter-port standard de tipul "Celsite", se efectuează în modul următor. Se efectuează intervenția chirurgicală pentru înlăturarea tumorii, apoi în patul tumoral se introduce un capăt al unui cateter din silicon, care este scos la suprafața craniului, după care cavitatea cranială se închide pe straturi. Cateterul se trece prin stratul subcutanat al regiunii parieto-occipitale, de-a lungul suprafeței posterioare a mușchiului sternocleidomastoidian, iar în regiunea subclaviculară se efectuează o incizie de 2 cm, unde se introduce un mini-port la care se conectează capătul opus al cateterului, după care plaga se suturează. Pentru introducerea unui medicament chimioterapic, se face o puncție cutanată deasupra portului cu un ac special, după ce pielea a fost dezinfectată cu alcool etilic de 70%. Avantajul real al unui astfel de port este posibilitatea efectuării chimioterapiei interstițiale selective fracționate timp de mai multe luni, chiar ani.

Doxorubicina (DOXO) a fost aleasă ca medicament chimioterapic de primă linie, deoarece este cel mai eficient medicament citotoxic dintre mai multe medicamente utilizate frecvent în practica clinică (temazolomidă, cisplatină, procarbazine, vincristină, ciclofosfamidă, etc.). Datele experimentale demonstrează că DOXO manifestă efecte citotoxice asupra glioblastomului începând cu concentrația egală sau mai mare > de 0,0002 mg/ml (sau 0,2 μg/ml). Aceasta este eficiența terapeutică a DOXO înregistrată în farmacopee.

Metoda se efectuează în modul următor.

Metoda constă în aceea că se efectuează intervenția chirurgicală pentru înlăturarea tumorii, apoi în patul tumoral se introduce un capăt al unui cateter din silicon, care se scoate la suprafața craniului, după care cavitatea cranială se închide pe straturi. Cateterul se trece prin stratul subcutanat al regiunii parieto-occipitale, de-a lungul suprafeței posterioare a mușchiului sternocleidomastoidian, iar în regiunea subclaviculară se efectuează o incizie de 2 cm, unde se introduce un mini-port la care se conectează capătul opus al cateterului, după care plaga se suturează. Se administrează prima doză de 0,25 mg de doxorubicină cu ajutorul unui liniomat, care se conectează la mini-portul instalat cu ajutorul unei seringi, apoi în lipsa reacțiilor adverse se repetă administrarea în doză de 1 mg, de 2...3 ori, peste fiecare 2 zile. După 10 zile se administrează preparatul utilizat în doză de 1 mg, apoi procedura se repetă de 3 ori, peste fiecare 10 zile, după care doxorubicina se administrează o dată pe lună, în doză de 1 mg, timp de 4...6 luni.

Procedura se desfășoară sub supravegherea medicului curant a chimioterapeutului, urmată de tomografia computerizată (CT) și rezonanța magnetică nucleară (RMN) ale creierului, teste de sânge generale și biochimice, identificarea prezenței celulelor tumorale circulante (CTC), ceea ce asigură distrugerea eficientă a celulelor tumorale, scăderea recurenței glioblastomului și creșterea speranței de viață a pacientului.

Pentru tratarea glioblastomului, după refacerea stării neuropsihice și somatice a pacientului (de obicei 14 zile), prima administrare a DOXO se efectuează în regim de probă biologică cu introducerea a 0,25 mg de DOXO, diluată în 10 ml de apă *pro injectiones* cu ajutorul unei seringi instalate într-un liniomat și mini-portul instalat, care se efectuează cu o viteză de 20...30 ml/oră (în scopul prevenirii creșterii presiunii intracraniene provocate de edem cerebral). Apoi, în absența unei reacții hiperergice la acest medicament, se efectuează încă 2...3 administrări a medicamentului DOXO, câte 1 mg, peste fiecare 2 zile. Apoi pacientul se externează din spital. După 10 zile, pacientului i se administrează câte 1 mg de DOXO, procedura poate fi repetată cu un interval de 10 zile de mai multe ori în dependență de starea pacientului (cel puțin de 3 ori). Administrarea ulterioară a DOXO se efectuează o dată pe lună în

absența semnelor de recidivă tumorală, conform rezultatelor cercetărilor tomografice ale creierului. În general, efectul chimioterapiei selective apare după 4...6 luni de la debutul ei.

Notă: metoda propusă nu prevede menținerea unei concentrații constante ale DOXO în creier, ci se bazează pe efectul citotoxic pe termen lung al DOXO după injectarea sa în cavitatea tumorii îndepărtate și o concentrație înaltă a medicamentului în patul tumoral, doza totală fiind de 70...100 ori mai mică decât în cazul administrării intravenoase sistemice a medicamentului.

Avantajul metodei constă în aceea că, la realizarea metodei de chimioterapie selectivă interstițială pentru glioblastomul recurent al creierului se creează condiții ce asigură efectul citotoxic și citostatic optimal al remediei chimioterapice la o concentrație, care este cu mult mai joasă, decât cea folosită la chimioterapia sistemică, fapt ce permite eradicarea eficientă a celulelor de gliom, reducerea recidivelor glioblastomului și mărirea speranței de viață a pacienților. Totodată, se exclude apariția efectelor adverse generalizate asupra organismului. Un alt avantaj al metodei indicate constă în aceea că DOXO nu pătrunde prin bariera hemato-encefalică (BHE) în circulația sistemică, astfel se exclude efectul cardiotoxic, imunosupresiv, citotoxic general asupra întregului organism, în special, asupra tuturor celulelor care se divid rapid (cum ar fi, de exemplu, epitelul intestinal, seria mieloidă și limfopoietică a măduvei osoase, celulele gonadelor și foliculilor piloși, etc.).

În afară de aceasta, folosirea DOXO în chimioterapia interstițială selectivă prezintă avantaje, datorită faptului că acest medicament este un antibiotic natural, ce împiedică dezvoltarea meningoencefalitei iatrogene sau altor infecții intracraniene. Conform multiplelor date din literatura de specialitate DOXO manifestă proprietăți antibacteriene, antifungicide și antivirale pronunțate. Astfel, DOXO inhibă creșterea *S. aureus* (1 μg/ml), *S. epidermis* (1 μg/ml) și *Streptococcus sanguis* (10 μg/ml). Este activă împotriva *M. smegmatis* (MIC 8 μM)* și *M. tuberculosis* (MIC 5 μM (Gajadeera C., Willby M.J., Green K.D., et al. Antimycobacterial activity of DNA intercalator inhibitors of Mycobacterium tuberculosis primase DnaG. J. Antibiot (Tokyo). 2015, vol. 68(3), p. 153-157; Peiris V., Oppenheim B.A. Antimicrobial activity of cytotoxic drugs may influence isolation of bacteria and fungi from blood cultures. J. Clin. Pathol. 1993, vol. 46, p. 1124-1125).

* MIC - concentrațiile minime inhibitorii sunt definite ca fiind cea mai mică concentrație a unui antimicrobian, care va inhiba creșterea vizibilă a unui microorganism după incubarea peste noapte.

Doxorubicina manifestă activitate antivirală, inclusiv împotriva virusului *Herpes Simplex*, virusului leucemiei Rauscher, virusului mieloblastozei aviare și HIV (Ash R. J. and K. A. Diekema. Inhibition of herpes simplex virus replication by anthracycline compounds. Antiviral Res. 1987, vol. 8, p. 71-83 21, 22, 48; Openshaw Fl. and Itoyama Y. Intradermal doxorubicin reduces ganglionic reactivation of latent herpes simplex virus in mice after pretreatment with hypertonic saline. J. Med. Virol. 2003, vol. 70, p. 263-266; Jeyaseelan R., M. Kurabayashi and L. Kedes. Doxorubicin Inhibits Tat-Dependent Transactivation of HIV Type I LTR. AIDS Res. Hum. Retroviruses 1996, vol.12, p. 569-576). În plus, doxorubicina inhibă SARS-CoV-2 prin mai multe mecanisme (Al-Motawa M.S., Abbas H., Wijten P. et al. Vulnerabilities of the SARS-CoV-2 Virus to Proteotoxicity-Opportunity for Repurposed Chemotherapy of COVID-19 Infection. Front Pharmacol. 2020 Oct. 9, vol. 11, p. 585408, doi: 10.3389/fphar.2020.585408. PMID: 33162891, PMCID: PMC7581855; Jamal Q. M. S., Ahmad, V. et al. Therapeutic development by repurposing drugs targeting SARS-CoV-2 spike protein interactions by simulation studies. Saudi J. Biol. Sci. 2021, vol. 28, p. 4560-4568).

Printre varietatea de medicamente anticancer, doxorubicina prezintă un efect puternic de inhibare a creșterii celulare în multe tipuri de tumori, inclusiv neoplazmele SNC (Hevener K., Verstak T.A., Lutat K.E., Riggsbee D.L., Mooney J. W. Recent developments in topoisomerase-targeted cancer chemotherapy. Acta Pharm Sin B. 2018 Oct, vol. 8(6), p. 844-861; Zhang H., Yuan F., Qi Y., Liu B., Chen Q. Circulating Tumor Cells for Glioma. Front Oncol. 2021 Mar 10, vol. 11, p. 607150 doi: 10.3389/fonc.2021.607150. PMID: 33777749; PMCID: PMC7987781).

Numărul de cursuri de chimioterapie depinde de mai mulți factori: a) de toleranța biologică a medicamentului; b) de mărimea tumorii îndepărtate; c) de gradul de malignitate a tumorii; d) de rezultatele imagisticii prin rezonanța de control al creierului.

Administrarea ulterioară a DOXO se efectuează o dată pe lună în absența semnelor de recidivă tumorală, conform rezultatelor cercetărilor tomografice ale creierului. În general, putem vorbi despre efectul chimioterapiei selective după 4...6 luni de la debutul ei. Pentru prevenirea complicațiilor sistemice negative ale chimioterapiei sunt necesare mai multe teste clinice generale: hemoleucograma (dozarea hemoglobinei, numărul de eritrocite, leucocite, trombocite, VSH); teste coagulologice (indicele protrombinic, D-dimerii, fibrinogenul); teste biochimice (dozarea bilirubinei, ureei, transaminazelor ALT, AST, glicemiei, troponinei T). De asemenea, este necesar de a identifica prezența celulelor tumorale circulante (CTC) și a caracteristicilor sale moleculare în lichidul din patul tumoral sau lichidul cefalorahidian. Identificarea CTC la pacienții cu glioblastom are o valoare importantă pentru diagnosticul

precoce al recidivei tumorii, care limitează speranța de viață și calitatea vieții pacienților (Liu T., Xu H., Huang M., Ma W., Saxena D., Lustig R.A. et al.. Circulating glioma cells exhibit stem cell-like properties. *Cancer Res.* 2018, vol. 78, p. 6632-6642).

Avantajul determinării CTC și a caracteristicilor sale moleculare în practica clinică constă în aceea că aceasta ajută la stabilirea unui diagnostic neinvaziv și poate sugera tratamente cu alte preparate sensibile pentru celulele tumorale circulante, fără a fi nevoie de intervenție neurochirurgicală cu risc ridicat (Liu T., Xu H., Huang M., Ma W., Saxena D., Lustig R.A. et al.. Circulating glioma cells exhibit stem cell-like properties. *Cancer Res.* 2018, vol. 78, p. 6632-6642).

Pentru identificarea CTC a fost utilizată platforma de secvențiere GeneReader™ folosind software-ul QIAGEN Clinical Insight Analyze (QCI-A) (Kolostova K., Pospisilova E., Pavlickova V., Bartos R., Sames M., Pawlak I., Bobek V. Next generation sequencing of glioblastoma circulating tumor cells: non-invasive solution for disease monitoring. *Am. J. Transl. Res.* 2021 May 15, vol. 13 (5), p. 448). Rezultatul tehnic al metodei propuse constă în eradicarea eficientă a celulelor de gliom, reducerea recidivelor glioblastomului, excluderea apariției efectelor adverse generalizate asupra organismului și mărirea speranței de viață a pacienților.

Exemplul 1

Pacientul A. Cu diagnosticul de glioblastom de gradul III. O lună mai târziu a fost supus radioterapiei (60 Gr). Rezonanța magnetică nucleară (RMN) efectuată după 4 luni a evidențiat o recurență tumorală cu creștere progresivă. Clinic, pacientul a prezentat crize jacksoniene secundare generalizate, hemipareză ușoară a piciorului drept și oligoafazie. A urmat operația de rezecție totală a gliomului cu instalarea ulterioară a unui port-cateter "Celsite" în patul tumorii îndepărtate.

O porțiune de tumoare îndepărtată în timpul operației a fost utilizată ulterior pentru a efectua teste de chemosensibilitate la doxorubicină (DOXO). Inițial, porțiunea de tumoare a fost disociată mecanic cu lame chirurgicale. Apoi, secțiunile obținute au fost trecute de două ori prin filtre cu diametrul porilor de 1,5 mm apoi de 0,5 mm, înainte de a fi însămânțate pe mediul de cultură DMEM, care conține glucoză (0,1%), ser sanguin obținut din sângele pacientului (20%), gentamicină și fluconazol (câte 100 μg/ml). Celulele au fost crescute în incubatorul cu CO₂ la 3% CO₂, 85% umiditate și temperatura de 37°C. Celulele de glioblastom au fost selectate prin mai multe pasaje și apoi transferate într-o placă cu 24 de godeuri. Fiecare godeu conținea de la 50 până la 150 celule. DOXO a fost adăugată în fiecare godeu la concentrații începând de la 0,02 μg/ml până la 2,0 μg/ml. Starea celulelor a fost verificată prin microscopie după 1, 4, 24 ore, 3, 4 și 14 de zile. A fost evaluat numărul și gradul de deteriorare a celulelor de glioblastom în funcție de timpul de expunere la diferite concentrații de DOXO.

Având în vedere volumul patului tumoral (cavității ce s-a format după îndepărtarea tumorii, care a fost de 32 ml) luând în considerare sensibilitatea tumorii la DOXO *in vitro* pentru a evita toxicitatea potențială, prima administrare a DOXO s-a efectuat în regim de probă biologică cu introducerea a 0,25 mg de DOXO, diluată în 10 ml de apă *pro injectiones* cu ajutorul unei seringi instalate într-un liniomat și mini-portul instalat, cu o viteză de 20 ml/oră, aceasta fiind cu mult mai mică, decât cea folosită pentru doza intravenoasă (20...40 mg/m² pe zi, cantitatea maximă pe săptămână depășind 100 mg) recomandată pentru doxorubicina lipozomală pegilată (PEG-DOXO), care se deosebește de DOXO liberă prin faptul că penetrează ușor BHE.

Apoi, în absența unei reacții hiperergice la acest medicament, s-a efectuat încă 3 ședințe de administrare a medicamentului DOXO, câte 1 mg la fiecare 2 zile. Apoi pacientul a fost externat din spital, după 10 zile, pacientului i s-a administrat câte 1 mg de DOXO, iar procedura a fost repetată cu un interval de 10 zile, de 3 ori. Procedura de chimioterapie interstițială a fost efectuată prin cateterul de port, folosind o seringă electrică pentru 30 de minute cu înregistrare video și cu următoarele date atent monitorizate: pulsul pacientului, tensiunea arterială, temperatura corporală, neurologia și starea psihică. Soluția de DOXO a fost preparată *ex tempore* folosind 1 mg de preparat la 10 ml de apă *pro injectiones*. Medicamentul a fost administrat timp de 20 de minute.

Calcul: Pacientul A. Volumul patului tumoral (chistului post-operator) - 32 ml. Volumul creierului - 1200 ml.

Concentrația doxorubicinei în chist a constituit: 1 mg sau 1000 μg/32ml = 31 μg/ml. Concentrația doxorubicinei în țesutul creierului a constituit: 1 mg sau 1000 μg/1200 ml = 0,8 μg/ml de țesut de creier, ceea ce depășește cu mult doza citotoxică a remediei indicat (≥ 0,2 μg/ml), adică eficiența terapeutică a DOXO înregistrată în farmacopecie.

Tomografia computerizată (CT) de control efectuată după o lună de chimioterapie interstițială nu a prezentat semne de edem cerebral sau careva semne de dislocare a structurilor creierului. Totodată, peste o lună după efectuarea chimioterapiei interstițiale s-a efectuat RMN al creierului pacientului cu un agent de contrast, care a arătat o delimitare clară între tumoarea rezecată și țesutul cerebral, lipsa semnelor de edem cerebral sau careva modificări ale structurilor creierului. Nu au existat semne de

prezență a tumorii. De asemenea, au fost evaluate testele de laborator în dinamică: hemoleucograma (dozarea hemoglobinei, numărul de eritrocite, leucocite, trombocite, VSH), teste coagulologice (indicele protrombinic, D-dimerii, fibrinogenul), teste biochimice (dozarea bilirubinei, ureei, transaminazelor ALT, AST, glicemiei, troponinei T, sodiului, potasiului) care au fost fără modificări pregnante. De asemenea, după o lună de tratament în lichidul din patul tumoral nu a fost identificată prezența celulelor tumorale circulante (CTC). Administrarea ulterioară a DOXO (câte 1 mg de preparat diluat în 10 ml de apă *pro injectiones* cu ajutorul liniomatului și mini-portului cu o viteză de 20 ml/oră) s-a efectuat o dată pe lună în absența semnelor de recidivă tumorală, luând în considerare rezultatele cercetărilor tomografice ale creierului și a testelor de laborator în dinamică. În prezent pacientul continuă cura de tratament profilactic.

Exemplul 2

Pacienta B. Recurența tumorii (glioblastom de gradul IV) a fost detectată după 3 luni de la intervenția inițială. S-a prezentat sub forma unei hemipareze/hemiplegii profunde. A urmat operația de rezecție totală a gliomului cu instalarea ulterioară a unui port-cateter "Celsite" în patul tumorii îndepărtate. O mostră de tumoare îndepărtată în timpul operației a fost folosită ulterior pentru determinarea chemosensibilității la doxorubicină (DOXO). Inițial, tumoarea a fost disociată mecanic cu lame chirurgicale. Apoi, secțiunile obținute au fost trecute de două ori prin filtre cu diametrul porilor de 1,5 mm și mai apoi 0,5 mm, înainte de a fi însămânțate în mediul de cultură DMEM, care conținea glucoză (0,1%), ser sangvin obținut din sângele pacientei (20%), gentamicină și fluconazol (câte 100 μg/ml). Celulele au fost crescute în incubatorul cu CO₂ la 3% CO₂, 85% umiditate temperatura de 37°C, apoi au fost transferate într-o placă cu 24 de godeuri. Fiecare godeu conținea 150 celule. DOXO a fost adăugată în fiecare godeu la concentrații începând de la 0,02 μg/ml până la 2,0 μg/ml. Starea celulelor a fost verificată prin microscopie la 1, 4, 24 ore, 3, 4 și 14 de zile. A fost evaluat numărul și gradul de deteriorare a celulelor de glioblastom în funcție de timpul de expunere la diferite concentrații ale DOXO.

Având în vedere volumul patului tumoral (cavității ce s-a format după îndepărtarea tumorii) și luând în considerare sensibilitatea tumorii la DOXO *in vitro* pentru a evita toxicitatea potențială, prima administrare a DOXO s-a efectuat în regim de probă biologică cu introducerea a 0,25 mg de DOXO, diluată în 10 ml de apă *pro injectiones* cu ajutorul unei seringi instalate într-un liniomat și mini-portul instalat cu o viteză de 30 ml/oră. Apoi, în absența unei reacții hiperergice la acest medicament, s-a efectuat încă 3 ședințe de administrare a medicamentului DOXO, câte 1 mg, la fiecare 2 zile. Apoi pacienta a fost externată din spital și după 10 zile, pacientei i s-a administrat câte 1 mg de DOXO, iar procedura a fost repetată cu un interval de 10 zile, de 3 ori. Doza indicată a fost de 100 ori mai mică, decât cea folosită pentru doza intravenoasă (20...40 mg/m² pe zi, cantitatea maximă pe săptămână depășind 100 mg) recomandată pentru doxorubicina lipozomală pegilată (PEG-DOXO), care se deosebește de DOXO liberă prin faptul că penetrează ușor BHE.

Calcul:

Pacienta B. Volumul patului tumoral (chistului post-operator) - 33 ml. Volumul creierului - 1400 ml.

Concentrația DOXO în patul tumoral (chistului post-operator) a constituit: 1 mg sau 1000 μg/33ml = 30 μg/ml.

Concentrația DOXO în țesutul creierului a constituit: 1 mg sau 1000 μg/1400 ml = 0,7 μg/ml de țesut de creier, ceea ce depășește cu mult doza citotoxică a remediei indicat (≥ 0,2 μg/ml), adică eficiența terapeutică a DOXO înregistrată în farmacopee.

RMN de control efectuat după o lună de tratament - fără semne de edem cerebral sau careva semne de modificare a structurilor creierului. De asemenea, au fost evaluate testele de laborator în dinamică: - hemoleucograma (dozarea hemoglobinei, numărul de eritrocite, leucocite, trombocite, VSH), teste coagulologice (indicele protrombinic, D-dimerii, fibrinogenul), teste biochimice (dozarea bilirubinei, ureei, transaminazelor ALT, AST, glicemiei, troponinei T, sodiului, potasiului) și care au fost fără modificări pregnante. Totodată, în lichidul din patul tumoral nu a fost identificată prezența celulelor tumorale circulante (CTC). Pacienta a fost externată într-o stare satisfăcătoare. În continuare, în scop profilactic, administrarea DOXO s-a efectuat o dată pe lună în absența semnelor de recidivă tumorală, conform rezultatelor cercetărilor tomografice ale creierului și a testelor de laborator în dinamică. În prezent pacienta continuă cura de tratament.

Efectul pozitiv și avantajul metodei propuse față de soluția cea mai apropiată constă în aceea că la folosirea metodei revendicate cantitatea de preparat chimioterapic se micșorează de 100 ori în comparație cu doxorubicina lipozomală pegilată (PEG-DOXO) administrată în dozele 20...40 mg/m², zilnic, iar cantitatea maximă pe săptămână depășind 100 mg și care pătrunde ușor prin bariera hematoencefalică (BHE) [3], totodată, se mărește eficiența prin creșterea efectului curativ antitumoral. Se reduce substanțial efectul cardiotoxic și imunosupresiv sistemic și pericolul dezvoltării meningoencefalitei

iatrogene, datorită faptului că doxorubicina nu pătrunde prin bariera hemato-encefalică (BHE) în circulația sistemică, ea fiind un antibiotic natural eficient.

Metoda propusă asigură distrugerea eficientă a celulelor tumorale, scăderea recurenței glioblastomului și creșterea speranței la viață a pacienților. Astfel, metoda propusă asigură un înalt efect antitumoral și este cost-eficientă.

5

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Fisher J.P., Adamson D.C. Current FDA-Approved Therapies for High-Grade Malignant Gliomas. *Biomedicines*. 2021 Mar, 22, vol. 9(3), p. 324, doi: 10.3390/biomedicines 9030324. PMID: 33810154; PMCID: PMC8004675
2. Yoshida M., Yamaguchi S., Ishi Y. et al. Risk Factors for Adverse Events after Implantation of BCNU Wafers in High-grade Gliomas. *No Shinkei Geka*. 2015 Jul, vol. 43(7), p. 603-610.
3. Hau, P. et al. Pegylated liposomal doxorubicin-efficacy in patients with recurrent highgrade glioma. *Cancer*, 2004, vol. 100 (1), p. 1199-1207
4. Lesniak M.S., Upadhyay U., Goodwin R., Tyler B., Brem H. Local delivery of doxorubicin for the treatment of malignant brain tumors in rats. *Anticancer Res*. 2005 Nov-Dec, vol. 25(6B), p. 3825-3831

(57) Revendicări:

Metodă de chimioterapie selectivă interstițială pentru glioblastomul recurent al creierului, care constă în aceea că se efectuează intervenția chirurgicală pentru înlăturarea tumorii, apoi în patul tumoral se introduce un capăt al unui cateter din silicon, care se scoate la suprafața craniului, după care cavitatea cranială se închide pe straturi; cateterul se trece prin stratul subcutanat al regiunii parieto-occipitale, de-a lungul suprafeței posterioare a mușchiului sternocleidomastoidian, iar în regiunea subclaviculară se efectuează o incizie de 2 cm, unde se introduce un mini-port la care se conectează capătul opus al cateterului, după care plaga se suturează; se administrează prima doză de 0,25 mg de doxorubicină cu ajutorul unui liniomat, care se conectează la mini-portul instalat cu ajutorul unei seringi, apoi în lipsa reacțiilor adverse se repetă administrarea în doză de 1 mg, de 2...3 ori, peste fiecare 2 zile; după 10 zile se administrează preparatul utilizat în doză de 1 mg, apoi procedura se repetă de 3 ori, peste fiecare 10 zile, după care doxorubicina se administrează o dată pe lună, în doză de 1 mg, timp de 4...6 luni.