



Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 61 K 37/66

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD A 61 K / 299 676 4	(22)	03.02.87	(44)	21.11.90
(31)	P3603444.4	(32)	05.02.86	(33)	DE

(71)	siehe (73)
(72)	Helmut, Franz, Dr., DE
(73)	Dr. Karl Thomae GmbH, 7950 Biberach an der Riss, DE
(74)	Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

(54) Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen Zubereitungsformen

(55) pharmazeutische Zubereitungsform; topische Anwendung; Stabilisierung; Wirkstoff; Human Interferon alpha (IFN alpha); Wirkstoffträger; Wirkstoffstabilisator; Hydroxyäthylcellulose; Gelatine

(57) Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen Zubereitungsformen für die topische Anwendung zur Stabilisierung des darin enthaltenen Wirkstoffs Human Interferon alpha (IFN alpha), wobei als Wirkstoffträger und Wirkstoffstabilisator eine neuartige Komposition eingesetzt wird, die speziell dem therapeutisch aktiven Wirkstoff IFN alpha eine besondere Stabilität verleiht. Im einzelnen bezieht sich die Erfindung auf Zubereitungsformen, die im wesentlichen aus Hydroxyäthylcellulose und Gelatine zusammengesetzt sind und die als therapeutisch aktiven Wirkstoff vorzugsweise hochgereinigtes IFN alpha enthalten, welches durch DNA-Rekombination hergestellt wird.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen Zubereitungsformen für die topische Anwendung zur Stabilisierung des darin enthaltenen Interferon alpha, **gekennzeichnet dadurch**, daß
 - a) sauer oder alkalisch aufgeschlossene Gelatine in einer Menge bis zu 10 Gew.-%, bezogen auf das fertige Produkt, Hydroxyethylcellulose oder Carboxymethylcellulose, Methylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Polyvinylalkohole, Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylsäure oder ein Gemisch davon vorzugsweise in einer auf das fertige Produkt bezogenen Menge von 0,1 bis 2,0 Gew.-%, bei Polyvinylalkoholen oder Polyvinylpyrrolidon bis zu 15 Gew.-%, ein Antiadhäsionsmittel und, gegebenenfalls, Konservierungsmittel und Feuchthalter, Salze, Puffersysteme und Penetrationsförderer in bis zu 80°C heißem Wasser gelöst werden und darin
 - b) Interferon alpha in einer Menge von 1×10^5 bis 1×10^{10} IE/100 g fertiges Produkt homogen verteilt und diese Mischung steril abgefüllt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die pharmazeutischen Zubereitungsformen für die topische Anwendung in Form von Gelen eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die pharmazeutischen Zubereitungsformen für die topische Anwendung im Vaginalbereich in Form einer Ovula-Masse eingesetzt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Gelatine Bloom 160–200 ist und Hydroxyäthylcellulose einen Substitutionsgrad von 2,5 aufweist.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß das darin enthaltene Interferon alpha aus einer Zellkultur erhalten wird, die mit einer für Human-Interferon alpha codierenden DNA-Sequenz transformiert wurde.
6. Verfahren nach Anspruch 5, **gekennzeichnet dadurch**, daß das darin enthaltene Interferon alpha aus transformierten Zellen von E. Coli gewonnen wird.
7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Polysorbat das Polysorbat 20, 60 oder 80 oder ein Gemisch davon eingesetzt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Puffersystem Natriumphosphat-Puffer, Kaliumhydrogenphosphat, Natriumdihydrogenphosphat-Puffer, Citronensäure-Phosphat-Puffer, Kalium-Natrium-Glutamat-Phosphat-Puffer, Succinat-Puffer oder ein Gemisch davon eingesetzt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 1 und 8, **gekennzeichnet dadurch**, daß die jeweilige Pufferlösung einen pH-Wert im Bereich von 6,0 bis 7,4 aufweist.
10. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Feuchthaltesubstanzen Glycerin, 1,2-Propylenglykol, Sorbit, Butylenglyko, ein Polyol wie Polyethylenglykol 400 oder ein Gemisch davon eingesetzt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als hautverträgliches Konservierungsmittel p-Hydroxybenzoesäureester, Sorbinsäure, Benzoesäure, Chlorhexidindigluconat, Benzalkoniumchlorid, Hexydecyltrimethylammoniumbromid oder ein Gemisch davon eingesetzt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als kompatibler Penetrationsförderer bis zu 50 Gew.-% Dimethylsulfoxid eingesetzt wird.
13. Verfahren nach Anspruch 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß das für das Gel benutzte Vehikel Wasser ist.

Hierzu 3 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft pharmazeutische Zubereitungsformen, die Interferon alpha enthalten und zur Behandlung verschiedener viraler oder tumorbedingter Erkrankungen eingesetzt werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Anhängig von ihren biologischen und chemischen Eigenschaften und ihrem Syntheseort werden Human-Interferone und Interferone allgemein in drei Gruppen unterteilt, die mit Interferon alpha, Interferon beta und Interferon gamma bezeichnet werden entsprechend IFN alpha, IFN beta, IFN gamma. Der Syntheseort von IFN alpha, auf das sich die vorliegende Erfindung

bezieht, sind die Leucozyten, die nach Stimulation oder Induktion durch entsprechende Induktoren (z. B. Viren oder poly I: poly C) IFN alpha synthetisieren und freisetzen. Mit geeigneten DNA-Sequenzen transformierte Bakterien können IFN alpha synthetisieren, die eine dem genuinen Human IFN alpha analoge biologische Aktivität besitzen, mit dem Vorteil, daß hochgereinigte und im wesentlichen von Kontaminationen freie Proteine in vergleichsweise großen Mengen erhalten werden können, die für die klinische Anwendung, z. B. gegen verschiedene Virusinfektionen und Malignome, einsetzbar sind. Alle bekannten Interferone wirken antiviral, antiproliferativ und – jedoch verschieden stark – immunmodulierend. Anfänglich als antivirales Agens erkannt, wird heute ihr therapeutischer Nutzen auch als antineoplastisches Mittel gesehen. Hinsichtlich Wirkungsqualität und Nebenwirkungsrate kommt der Applikationsroute eine besondere Bedeutung zu. Gerade bei der systemischen Anwendung von Interferonen imponieren die Nachteile, da sie nicht nur das Zielgewebe, sondern auch gesunde, nicht infizierte oder nicht transformierte Zellen oder Organe erreichen und beeinflussen und daher Nebenwirkungen erzeugen, die einem intravenösen oder intramuskulären Einsatz entgegenstehen können. Außerdem zeigte die systemische Applikation nicht immer die erwünschte Effektivität. In einzelnen Fällen mag eine direkte Injektion zwar möglich sein, das Mittel der Wahl, z. B. bei Virus- oder tumorbedingten malignen oder anderen mit Interferon therapierbaren Erkrankungen, die einer äußerlichen und lokalen Behandlung zugänglich sind (z. B. Haut, Augen, Nase), ist aber eher die topische Anwendung von Interferon bzw. von IFN alpha, auf das sich diese Erfindung bezieht. In jüngster Zeit wurde von verschiedenen Seiten über die topische Applikation von Human-Leucocyten-Interferon, synonym mit IFN alpha, berichtet, wobei überraschenderweise eine hohe Erfolgsquote bei verschiedenen malignen Erkrankungen festgestellt werden konnte (z. B. Ikic et al, Lancet, 1022–1024, 1981, Vol. 1; Ikic et al., Lancet 1025–1027, 1981, Vol. 1). Mit der topischen Anwendung von IFN alpha als auch allgemein von Interferonen sind unter verschiedenen Gesichtspunkten erhebliche Schwierigkeiten verbunden. Bekannt ist, daß IFN alpha ein sehr temperaturinstabiles Protein ist. Erhebliche Aktivitätsverluste von bis zu 80% wurden innerhalb von wenigen Wochen bei 4°C bei einem Human-Leucocyten-Interferon-haltigen Gel beobachtet, das als Gelkomponente Carboxymethylcellulose enthielt (Moller B.R. et al., Obstetrics & Gynecology 62, 625–629, 1983) und für die topische Anwendung zur Behandlung des Carcinoma in situ der Cervix eingesetzt wurde. Die daher notwendigen stabilitätserhaltenden Komponenten müssen so beschaffen sein, daß sie weder Unverträglichkeitsreaktionen am Ort der Applikation verursachen, denkbar durch Wirkung von biologisch aktiven Fremdstoffen, noch die Penetration von IFN alpha beeinträchtigen oder die Diffusion verhindern. In der letzten Zeit wurden verschiedene Komponenten zur Stabilisierung von Interferon benutzt, wobei Estis, Evans und Testa Hydroxyäthylcellulose als Trägermaterial zur Herstellung von interferonhaltigen Gelen oder Salben eingesetzt haben, aber erhebliche Aktivitätsverluste von IFN alpha, IFN beta oder IFN gamma unter anwendungsrealistischen Bedingungen nur durch Zusatz eines Proteaseinhibitors verhindern konnten (EP-A-O 142345). Dem Fachmann ist bekannt, daß mit Hydroxyäthylcellulose ein zur Herstellung von Gelen dieser oder auch anderer Art bestgeeignetes Mittel, z. B. auf Grund seiner Hitzestabilität, vorliegt und kommerziell erhältlich ist. Der besondere Vorteil von Hydroxyäthylcellulose zur Herstellung einer IFN alphahaltigen Matrix liegt gegenüber anderen Trägern darin, daß sie bei Siedetemperatur von Wasser nicht koaguliert bzw. geliert, gut wasserlöslich ist und daß die Viskosität einer solchen Lösung mit abnehmender Temperatur zunimmt. Eine Stabilisierung von Interferon bzw. von IFN alpha durch Hydroxyäthylcellulose allein und unter physiologischen Temperaturen ist nicht zu erreichen. Auch ist dem Fachmann bekannt, daß nicht hochgereinigte und daher kontaminierte Proteinpräparate – wie z. B. Interferone – unter geeigneten Bedingungen der Hydrolyse durch Proteasen ausgesetzt sind. Andere Versuche, in pharmazeutischen Präparaten enthaltenen Interferonen eine geeignete Stabilität zu verleihen, wurden von Akagi, Miura und Hoshino (EP-A-O 150067) mit von Hydroxyäthylcellulose chemisch unterschiedlichen Polysacchariden, wie Dextran und Hydroxyäthylstärke unter Zusatz von Human Serum Albumin, von Mono- oder Disacchariden oder von Aminosäuren durchgeführt, wobei Präparate vornehmlich für die parenterale, systemische Anwendungsroute via intravenöser oder intramuskulärer Injektion beschrieben wurden. Darüber hinaus wurde von Terano nur allein auf Basis einer chemisch modifizierten Gelatine, ebenfalls für ein zu injizierendes pharmazeutisches Interferon-Präparat, eine Stabilisierung von Interferon in wässriger Lösung beschrieben, um damit Human Serum Albumin als bekanntes Interferon stabilisierendes Mittel für die Injektion zu substituieren (EP-A-O 162332). Es ist dem Fachmann seit langem bekannt, daß Gelatine per se einen auf Interferone stabilisierenden Effekt aufweist (Sedmak, J. J., and Grossberg, S. E., Tex. Rep. Biol. Med. 41, 274–279, 1982), und daß Gelatine und chemisch modifizierte Derivate davon auf einige andere biologische Proteine einen gewissen stabilisierenden Effekt ausüben (z. B. DE-A-1 118732, EP-A-0156242). Für die Stabilisierung von Interferon in Gelen, Salben, Suppositorien, Sprays usw. zur topischen Anwendung sind auch verschiedene Zuckeralkohole wie Glycerol, Erythritol, Arabitol, Xylitol, Sorbitol und Mannitol sowie verschiedene Zuckersäuren wie Iduronsäure, Galacturonsäure und andere Uronsäuren, Ascorbinsäure und deren Salze als auch verschiedene organische Puffersysteme wie Citratpuffer, Succinatpuffer, Tartratpuffer, Fumaratpuffer, Glyconatpuffer, Oxalatpuffer, Lactatpuffer und Acetatpuffer offenbart worden, in Verbindung mit verschiedenen pharmazeutischen Trägerstoffen wie Wachse, Natriumcarboxymethylcellulose, Carboxyvinylester und Wasser (EP-A-O 080879). Diese letztgenannten als auch die vorhergenannten Interferon-stabilisierenden Komponenten sowie vor allem die Zusammensetzungen der pharmazeutischen Formulierungen und deren Anwendungsmodalitäten (z. B. EPA-O 162332) sind grundsätzlich verschieden von der vorliegenden Erfindung und mit dieser nicht vergleichbar.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, eine pharmazeutische Formulierung zu schaffen, in der das biologisch aktive IFN alpha eine genügend hohe Stabilität erhält, um über eine ausreichend lange Zeit sowohl bei Raumtemperatur als auch bei Körpertemperatur zu wirken bzw. über einen geeigneten Zeitraum von mehreren Stunden „in situ“ wirksam zu bleiben.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, eine Trägermatrix für hochgereinigtes Interferon alpha, speziell für rekombinant hergestelltes IFN alpha, zu finden, die mindestens den obig aufgezählten Anforderungen entsprechen und zum anderen eine sowohl unter herstellungstechnischen als auch unter ökonomischen Gesichtspunkten so günstig wie mögliche, d. h. einfache Zusammensetzung, aufweisen sollte, ohne eine Einbuße einer geforderten optimalen Wirksamkeit des in der Trägermatrix enthaltenen biologisch aktiven Wirkstoffes IFN alpha zur topischen Anwendung zu bewirken.

Durch die vorliegende Erfindung wurde dieser Aufgabenkomplex dadurch gelöst, daß Hydroxyäthylcellulose und Gelatine in bestimmten Mischungsverhältnissen miteinander vereint wurden und somit ein Träger und Stabilisator für IFN alpha geschaffen werden konnte, der die oben beschriebenen Anforderungen nicht nur erfüllt, sondern überraschenderweise dem IFN alpha eine besonders stabile biologische Aktivität verleiht und somit bestens für die topische Anwendung von hochgereinigtem, insbesondere über rekombinante DNA-Technologie hergestelltem IFN alpha geeignet ist.

Ein weiterer Vorteil dieser Erfindung besteht darin, daß der gefundene Träger/Stabilisator-Komplex frei von Human Serum Albumin ist, das bekannterweise und insbesondere bei der topischen Anwendung gerade über längere Zeiträume zu lokalen Immunreaktionen bis zu Allergosen führen kann. Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher auf eine verbesserte pharmazeutische Formulierung für die topische Anwendung von IFN alpha. Erfindungsgemäß wurde dabei festgestellt, daß beide als Träger und Stabilisator fungierenden Einzelkomponenten zusammen, nämlich Hydroxyäthylcellulose und Gelatine, eine über das zu erwartende Maß hinausgehende aktivitätserhaltende Wirkung auf IFN alpha ausüben, wobei gerade Berücksichtigung finden muß, daß IFN alpha und Interferone allgemein dafür bekannt sind, z. B. gegenüber physikalischen Einflüssen, instabile Proteine zu sein – sowohl in „nackter“ Form als auch inkorporiert in anderen Gelmatrizes (z. B. Moller, B. R., et al., siehe oben), so daß den erfindungsgemäßen Zubereitungsformen überraschend und in unvorhersehbarer Weise ein synergistischer Effekt hinsichtlich der Stabilitätssteigerung von IFN alpha eigen bzw. inhärent ist. Somit dient die Gelatine in der vorliegenden Erfindung nicht für sich allein als stabilisierendes Mittel, sondern entfaltet erst im Komplex zusammen mit Hydroxyäthylcellulose den festgestellten und erstaunlichen synergistischen Stabilisierungseffekt für IFN alpha, auf den sich diese Erfindung bezieht.

Die erfindungsgemäßen, topisch zu applizierenden pharmazeutischen Zubereitungsformen für IFN alpha werden vorzugsweise als Virusstatika angewendet, wobei der therapeutische Einsatz im dermalen, nasalen, ophthalmischen und intravaginalen Bereich, z. B. bei Herpes labialis, Herpes genitalis inclusive Papilloma-Infektionen, Warzen und bei Herpes Zoster-Infektionen, erfolgt. Der Anwendungsumfang umfaßt auch die topische Behandlung von Paracancerosen und Cancerosen.

Gegenstand dieser Erfindung sind topisch anzuwendende pharmazeutische Zubereitungsformen mit einer Stabilisierung des darin enthaltenen Wirkstoffes Human Interferon alpha (IFN alpha), bestehend aus 1. einem Träger und Stabilisator im Komplex für den Wirkstoff, 2. einem Antiadhäsionsmittel und 3. gegebenenfalls sonstigen üblichen Wirkstoffen wie Puffer und Salze, Feuchthalter, Konservierungsstoffe, Penetrationsförderer, Vehikel.

Als Träger und Stabilisator für IFN alpha werden bekannte Stoffe wie Cellulosederivate (Carboxymethylcellulose, Methylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose) sowie Polyvinylalkohole, Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylsäure-Polymerisate (Carbopol®) und Mischungen davon zusammen mit Gelatine, sauer oder alkalisch aufgeschlossen, eingesetzt. Als bevorzugter Träger und Stabilisator für IFN alpha wird Hydroxyäthylcellulose mit einem Substitutionsgrad von 2,5 in bestimmten Mischungsverhältnissen von jeweils 0,1 bis 2 Gew.-% und Gelatine von 0,1 bis 10 Gew.-%, jeweils bezogen auf das fertige Produkt, benutzt. Verwendet man Polyvinylalkohole sowie Polyvinylpyrrolidon, so werden bis 15 Gew.-% hiervon eingesetzt. Damit wird eine besondere Stabilisierung speziell von IFN alpha erreicht, wie es auch die durchgeführten Versuche über das Stabilitätsverhalten beispielhaft belegen und wie es die in Fig. 1 bis 3 gezeigten Kurvenverläufe, die einen Versuchszeitraum von 14 Wochen bei Lagertemperatur jeweils von -10, +4 und +21 °C umfassen, beispielhaft zeigen.

Als Antiadhäsionsmittel zur besseren Spreitung der Gele und als antiadhäsive Filtrationshilfe können anionaktive, kationaktive sowie neutrale oberflächenaktive Substanzen benutzt werden, vorzugsweise werden polyäthoxylierte Sorbitan-Ester wie Polysorbat 20, 60, 80 benutzt. Als anorganische und organische Pufferlösungen haben sich mit einem für IFN alpha-Präparationen optimalen pH-Wert im Bereich von 6,5 bis 7,4 Natriumphosphat-Puffer, Kaliumhydrogenphosphat-Natriumdihydrogenphosphat-Puffer sowie Citronensäurephosphat-Puffer, Kalium-Natrium-glutamat-phosphat-Puffer und Succinat-Puffer bewährt.

Für die erfindungsgemäßen IFN alpha-haltigen Zubereitungsformen eignen sich Feuchthaltesubstanzen wie Glycerin, 1,2-Propylenglykol, Sorbit, Butylenglykol sowie Polyole (z. B. Polyethylenglykol 400).

Geeignete hautverträgliche Konservierungsstoffe sind z. B. p-Hydroxybenzoesäureester (Nipa-Ester), vorzugsweise p-Hydroxybenzoesäuremethylester; des weiteren Benzoesäure, Sorbinsäure, Chlorhexidindigluconat, Benzalkoniumchlorid und Hexadecyltrimethylammoniumbromid (Cetrimoniumbromid).

Ein geeigneter, mit IFN alpha 2 kompatibler Penetrationsförderer ist bis zu 50 Gew.-% Dimethylsulfoxid (DMSO).

Als Vehikel ist bei nichtalkoholischen Hydrogelen Wasser bestens geeignet.

Geeignete pharmazeutische Formen für die topische Anwendung auf der Haut, im Auge oder in der Nase oder sonstigen Körperhöhlen sind z. B. Hydrogele. Diese enthalten im allgemeinen 0,1 bis 2,0 Gew.-% sowohl an Gelatine als auch an Cellulosederivaten und/oder Polyvinylalkohole, Polyvinylpyrrolidon oder Polyacrylsäure-Polymerisate, wobei die Verhältnisse je nach gewünschter Viskosität aufeinander abgestimmt werden müssen. Verwendet man Polyvinylalkohole oder Polyvinylpyrrolidon, so können hiervon bis zu 15 Gew.-% erforderlich werden. Im Falle der Fertigung von Vaginalkugeln ist der Anteil an Gelatine bis auf 10 Gew.-% zu erhöhen, ebenfalls in Abhängigkeit von der gewünschten Viskosität.

Ausführungsbeispiel

In den folgenden Beispielen wird die Herstellung von topisch anzuwendenden pharmazeutischen Zubereitungsformen zur Stabilisierung des darin enthaltenen IFN alpha im Detail beschrieben, die sich gemäß der vorliegenden Erfindung in der Hauptsache aus Cellulosederivaten und Gelatine, Antiadhäsionsmitteln sowie dem darin enthaltenen Wirkstoff IFN alpha und

verschiedenen Zusatzstoffen zusammensetzen. Es wird jedoch vorausgesetzt, daß viele Modifikationen und Veränderungen durchführbar sind und den Gegenstand der Erfindung einschließen, ohne sich von dem dieser Erfindung zugrunde liegenden Umfang zu entfernen, und daß die aufgeführten Beispiele die Erfindung nicht einschränken. In den Figuren wird der unterschiedliche Stabilitätsverlauf bei verschiedenen Temperaturen der Lagerung gezeigt.

Fig. 1: zeigt den Stabilitätsverlauf bei minus 10°C.

Fig. 2: zeigt den Stabilitätsverlauf bei plus 4°C.

Fig. 3: zeigt den Stabilitätsverlauf bei plus 21°C.

In den Beispielen bedeuten:

Nipagin M	= p-Hydroxybenzoesäuremethylester,
Polysorbat 20	= Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaurat (Tween ^R 20);
Polysorbat 60	= Polyoxyethylen(20)sorbitanmonostearat (Tween ^R 60),
Polysorbat 80	= Polyoxyethylen(20)sorbitanmonooleat (Tween ^R 80),
Benzalkoniumchlorid	= Mischung aus Alkyldimethylbenzylammoniumchloriden mit Alkylgruppen von 8 bis 18 Kohlenstoffatomen,
Cetrimoniumbromid	= Hexadecyltrimethylammoniumbromid,
$3,2 \times 10^8$ I. E.	Interferon-alpha-2-arg entsprechen 1 mg dieser Substanz.

Beispiel 1 (Hydrogel)

In 100g Gelsubstanz sind enthalten:

IFN alpha 2	1×10^8 IE
Nipagin M	0,20 g
Gelatine, Bloom 160–200	0,50 g
NaCl	0,48 g
KCl	0,012 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 = 2 \text{H}_2\text{O}$	0,0593 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$	0,0407 g
Glutaminsäure-Na $\times \text{H}_2\text{O}$	0,0636 g
Polysorbat 20	0,1 g
Hydroxyäthylcellulose (z. B. Natrosol ^R 250 HX)	1,75 g
Wasser, deionisiert ad 100 g	96,7944 g

Die Präparation des IFN alpha 2-Hydrogels erfolgt dadurch, daß Nipagin M in 80°C heißem Wasser gelöst und die Lösung anschließend auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt wird, wobei während der Abkühlphase die Gelatine in diese Lösung eingebracht wird. Nach der vollständigen Lösung der Gelatine werden bei RT konsekutiv NaCl, KCl, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$, Glutaminsäure-Na $\times \text{H}_2\text{O}$ sowie Polysorbat 20 zu dieser Lösung dazugegeben. Nach anschließender Sterilfiltration wird mikrobiologisch reine Hydroxyäthylcellulose eingestreut und die Lösung unter Rühren wieder auf 80°C erwärmt. Nach dem Abkühlen auf RT wird unter vorsichtigem Rühren die salzsaure, 1% Polysorbat-haltige IFN alpha 2-Lösung, bestehend aus einem in 0,01 N HCl gelöstem IFN alpha 2-Lyophilisat, dazugegeben und homogen verteilt. Die Abfüllung dieses Gemisches erfolgt unter laminaren Air-flow-Bedingungen in sterile Aluminium-Tuben.

Beispiel 2 (Hydrogel)

In 100g Gelsubstanz sind enthalten:

- IFN-alpha-2	1×10^{10} I. E.
- Hydroxyäthylcellulose (z. B. Natrosol ^R 250 HX)	2,0 g
- Gelatine, Bloom 160–200	0,1 g
- NaCl	0,35 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,16 g
- KH_2PO_4	0,09 g
- 1,2-Propylenglykol	10,00 g
- Polysorbat 80	0,1 g
- Benzalkoniumchlorid 90 %	0,02 g
- Wasser deion.	ad 100 g

Die Herstellung des IFN-alpha 2-Hydrogels erfolgt dadurch, daß Benzalkoniumchlorid bei 30°C in dem Wasser gelöst wird, anschließend wird bei RT das Propylenglykol zugesetzt und die Gelatine in die Lösung eingebracht. Nach vollständiger Lösung der Gelatine werden bei RT nacheinander NaCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 sowie Polysorbat 80 dazugegeben. Nach erfolgter Sterilfiltration wird mikrobiologisch reine Hydroxyäthylcellulose eingestreut und die Lösung unter Rühren 20 Min. auf 80°C erwärmt. Nach dem Abkühlen auf RT wird unter vorsichtigem Rühren die salzsaure, polysorbathaltige IFN-alpha-2-Lösung, bestehend aus einem in 0,01 N HCl und 0,1% Polysorbat 80 gelöstem IFN-alpha-2-Lyophilisat, dazugegeben und homogen verteilt. Die Abfüllung dieses Gemisches erfolgt unter laminaren Air Flow-Bedingungen in sterilen Aluminiumtuben.

Beispiel 3 (Hydrogel)

In 100 g Gel-Substanz sind enthalten:

– IFN-alpha-2	1 × 10 ⁶ I. E.
– Hydroxyäthylcellulose (z. B. Natrosol [®] 250 HX)	1,0 g
– Gelatine, Bloom 160–200	1,0 g
– Polysorbat 20	0,1 g
– Glycerin	5,0 g
– Bernsteinsäure	0,24 g
– Chlorhexidindigluconat	0,05 g
– 1 N-NaOH (ad pH 6,0)	
– Wasser, deion.	ad 100,0 g

Die Herstellung des IFN-alpha-2-Hydrogels erfolgt dadurch, daß Chlorhexidindigluconat, Glycerin und Gelatine bei etwa 30°C in Lösung gebracht werden. Anschließend wird Bernsteinsäure zugesetzt, mit 1 N NaOH auf pH-Wert 6,0 eingestellt und Polysorbat 20 zugegeben.

Dann wird mikrobiologisch reine Hydroxyäthylcellulose eingestreut und die Lösung unter Rühren 20 Min. auf 80°C erwärmt. Nach dem Abkühlen auf RT wird unter vorsichtigem Rühren die salzsaure, polysorbathaltige IFN-alpha-2-Lösung dazugegeben und homogen verteilt. Die Abfüllung erfolgt wie bei Beispiel 1 und 2.

Beispiel 4 (Hydrogel als Nasengel)

In 100 g Gel-Substanz sind enthalten:

– IFN-alpha-2	1 × 10 ⁸ I. E.
– Hydroxypropylmethylcellulose (z. B. Methocel [®] Premium)	0,1 g
– Polysorbat 60	0,1 g
– Gelatine, Bloom 160–200	0,5 g
– Sorbitlösung 70 %	2,0 g
– Citronensäure × H ₂ O	0,130 g
– Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	0,30 g
– NaCl	0,5 g
– Benzalkoniumchlorid 90 %	0,02 g
– Wasser deion.	ad 100 g

Die Herstellung des IFN-alpha-2-Hydrogels erfolgt dadurch, daß in 40°C warmem Wasser die Hydroxypropylmethylcellulose unter Rühren gelöst wird. Anschließend wird auf RT abgekühlt, während der Abkühlphase wird Gelatine in die Lösung eingebracht. Nach erfolgter Lösung werden nacheinander eingetragen: Benzalkoniumchlorid, Sorbitlösung, Citronensäure, Di-Na-Hydrogenphosphat, NaCl und Polysorbat 60. In das fertige Gel wird bei RT unter vorsichtigem Rühren die salzsaure, 1% Polysorbat-haltige IFN-alpha-2-Lösung eingebracht und homogen verteilt. Die Abfüllung erfolgt unter Laminar-Air-Flow-Bedingungen in sterile Aluminium-Tuben.

Beispiel 5 (Hydrogel als Augengel)

In 100 g Gel-Substanz sind enthalten:

– IFN-alpha-2	1 × 10 ⁸ I. E.
– Polyacrylsäure (MG: etwa 3 Mill.)	0,1 g
– Gelatine, Bloom 160–200	0,3 g
– Polysorbat 20	0,1 g
– Sorbitlösung 70 %	2,0 g
– Glycerin	1,0 g
– NaCl	0,1 g
– Cetrimoniumbromid	0,01 g
– 1 N-NaOH (ad pH 7,4)	
– Wasser deion.	ad 100 g

Die Herstellung des IFN-alpha-2-Hydrogels erfolgt dadurch, daß die Polyacrylsäure und Gelatine in Wasser unter Rühren bei RT gelöst wird, anschließend werden nacheinander Sorbitlösung, Glycerin, NaCl, Cetrimoniumbromid und Polysorbat eingetragen. Nach vollständiger Lösung wird steril filtriert und unter Rühren bei RT auf etwa pH-Wert 7,6 mit Natronlauge eingestellt, dabei tritt die Gelierung ein. In dieses Gel wird bei RT dann unter vorsichtigem Rühren die salzsaure (0,001 N), 1% Polysorbat-haltige IFN-alpha-2-Lösung eingebracht und homogen verteilt. Die Abfüllung erfolgt wie in den bisherigen Beispielen unter Laminar-Air-Flow in sterile Aluminium-Tuben.

Beispiel 6 (Ovula)

In 100g Ovula-Masse sind enthalten:

- IFN-alpha-2	1×10^8 I. E.
- Hydroxyäthylcellulose	0,1 g
- Gelatine, Bloom 160-200	10,0 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,16 g
- KH_2PO_4	0,09 g
- Polysorbat 20	0,1 g
- Glycerin	57,0 g
- Wasser, deion.	ad 100 g

Die Herstellung des IFN-alpha-2-Ovula erfolgt dadurch, daß die Hydroxyäthylcellulose zusammen mit der Gelatine im Glycerin-Wasser-Gemisch, welches schon $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 sowie Polysorbat enthält bei etwa 40-50°C gelöst wird. Im noch viskosen Zustand (bei etwa 37-40°C) wird die 1 % Polysorbat-haltige, salzsaure (0,001 N) IFN-alpha-2-Lösung vorsichtig eingerührt und die Lösung sofort zur Erstarrung in geeignete, gekühlte Formen ausgegossen.

Beispiel 7 (Stabilitätstests, Hydrogel ohne Gelatine-vs. mit Gelatine-Zusatz)

In 100g Gelsubstanz sind enthalten:

- IFN-alpha-2	1×10^8 I. E.	1×10^8 I. E.
- Nipagin M	0,2 g	0,2 g
- Gelatine, Bloom 160-200	-	0,5 g
- NaCl	0,48 g	0,48 g
- KCl	0,012 g	0,012 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,086 g	0,086 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$	0,012 g	0,012 g
- Polysorbat 20	0,1 g	0,1 g
- Hydroxyäthylcellulose	2,0 g	2,0 g
- (z. B. Natrosal [®] 250 HX)		
- Wasser deion.	ad 100 g	

Die punktierten Kurven in Fig. 1 bis 3 beschreiben den Stabilitätsverlauf eines IFN-alpha-2-Hydrogels obiger Zusammensetzung ohne Gelatinezusatz, die durchgezogenen Kurven mit Gelatine Zusatz abgefüllt in Aluminium-Tuben. Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus 6 Bestimmungen dar. Die Bestimmungen wurden mit dem ELISA-Test durchgeführt.

Das Stabilitätsverhalten bei unterschiedlichen Temperaturen wurde über einen Zeitraum von 14 Wochen (= 3 1/2 Monate) verfolgt. Dabei konnte erstaunlicherweise und völlig unerwartet festgestellt werden, daß mit zunehmender Lagertemperatur die Stabilitätsunterschiede deutlicher wurden. Bei Summation der biologischen Stabilitätsergebnisse über den gesamten Zeitraum von 14 Wochen und Bildung des arithmetischen Mittels ($\bar{x}$) der Werte ($n = 11$) ergibt sich das in der folgenden Tabelle dargestellte Bild, wobei ein Wert von 10,0 entsprechend 10^8 I. E. IFN-alpha-2 pro 100g, als 100% Aktivität gesetzt wurde:

Lager-temperatur	Hydrogel ohne Gelatinezusatz	Hydrogel mit Gelatinezusatz	Differenz
-10°C	$\bar{x}(11) = 8,49 (= -15 \%)$	$\bar{x}(11) = 9,72 (= -3 \%)$	12 %
+4°C	$\bar{x}(11) = 7,52 (= -25 \%)$	$\bar{x}(11) = 9,97 (= +/-0)$	25 %
+21°C	$\bar{x}(11) = 5,67 (= -43 \%)$	$\bar{x}(11) = 8,87 (= -11 \%)$	32 %

Aus dieser Tabelle kann man deutlich die stabilisierende Wirkung der Kombination von Hydroxyäthylcellulose und Gelatine ablesen. Bei einer Lagerung im Kühlschrank (= plus 4°C) konnte praktisch keine Abnahme der Aktivität nach 3 1/2 Monaten der Formulierung mit Gelatinezusatz festgestellt werden, während die Formulierung ohne Gelatinezusatz einen Abfall von etwa 25 % zeigte. Kühlschranktemperatur stellt dabei eine praktikable Lagerung für ein Handelspräparat dar. Bei einer Lagerung bei 21°C war ein Aktivitätsverlust der Formulierung ohne Gelatinezusatz innerhalb des Lagerzeitraumes von 3 1/2 Monaten auf fast die Hälfte des Ausgangswertes festzustellen, während die erfindungsgemäße Formulierung mit Hydroxyäthylcellulose und Gelatine innerhalb dieses Zeitraumes nur einen Aktivitätsverlust von 11 % aufwies, was einer relativen Stabilitätserhöhung von IFN alpha 2 von über 30 % gleichkommt.

Ein weiterer Lagerungsversuch über 44 Wochen (10 Monate) einer Zubereitungsform nach Beispiel 1, abgefüllt in Aluminiumtuben mit Innenschutzlack, zeigte im Elisatest bei Lagertemperaturen von 4°C und 21°C keinen Aktivitätsabfall gegenüber dem Anfangswert.

Lagertemperatur	Hydrogel gemäß Beispiel 1	
	Anfangswert	Endwert nach 10 Monaten
+4°C	$\bar{x}(6) 9,6$	$\bar{x}(6) 11,0$
+21°C	$\bar{x}(6) 9,6$	$\bar{x}(6) 9,6$

Abbildung 1

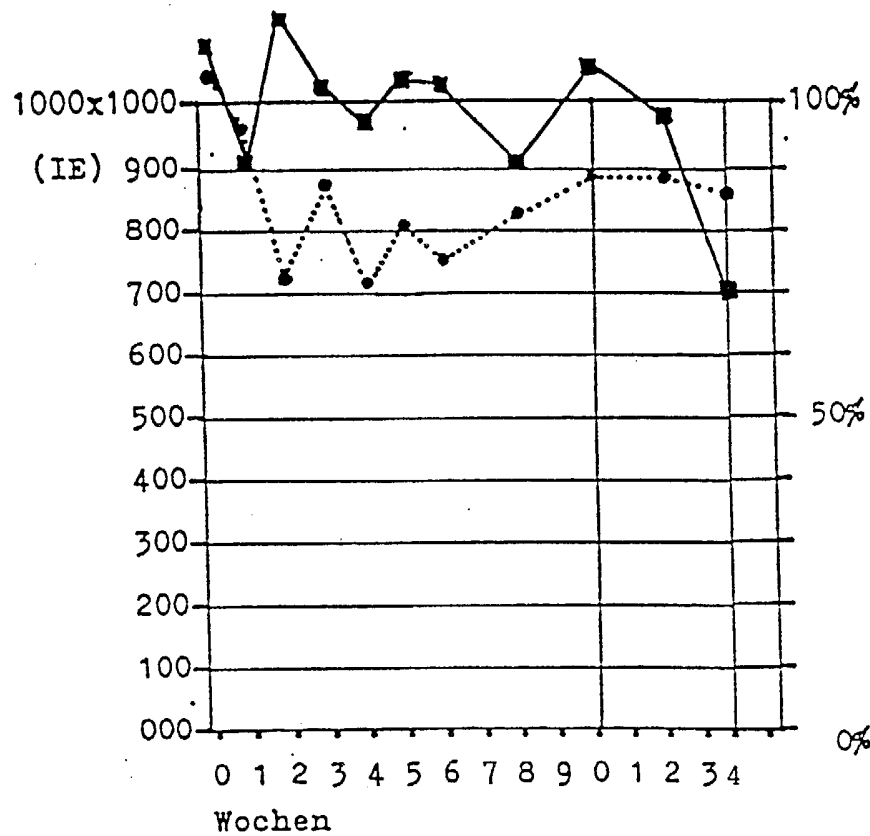


Abbildung 2

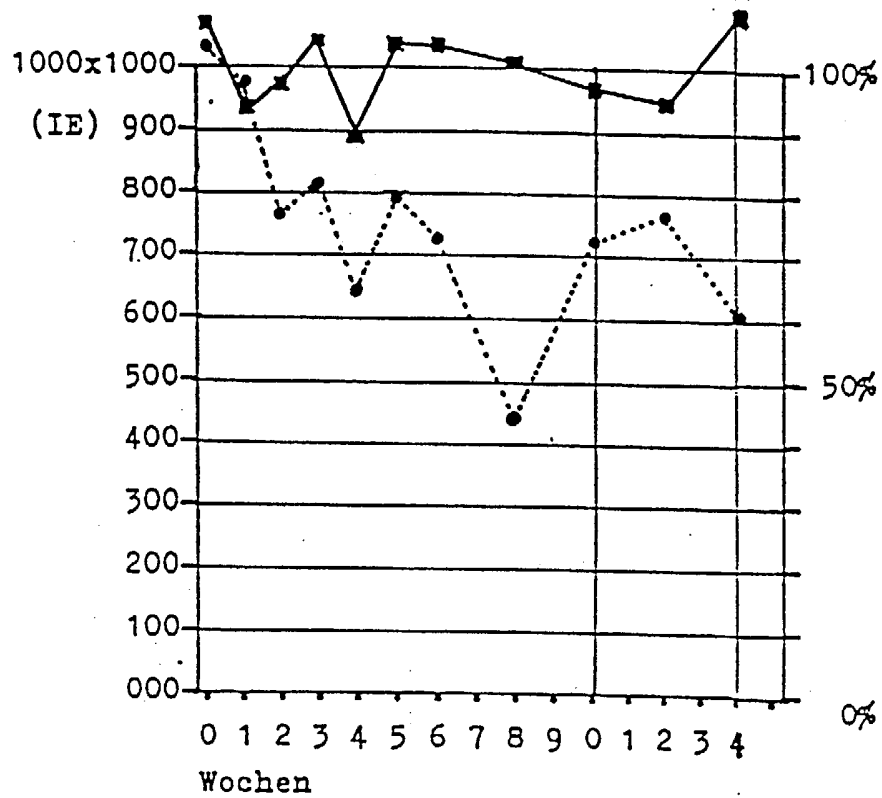


Abbildung 3