

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 164202 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 0583/87
(22) Indleveringsdag: 04 feb 1987
(41) Alm. tilgængelig: 06 aug 1987
(44) Fremlagt: 25 maj 1992
(86) International ansøgning nr.: -
(30) Prioritet: 05 feb 1986 DE 3603444

(51) Int.Cl.5

A 61 K 37/66
A 61 K 47/38
A 61 K 47/42

(71) Ansøger: Dr. Karl *Thomae Gesellschaft mit Beschraenkter Haftung; D-W-7950 Biberach an der Riss, DE
(72) Opfinder: Helmut *Franz; DE

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Farmaceutiske præparatformer til topisk anvendelse indeholdende interferon-alfa og fremgangsmåde til deres fremstilling

(56) Fremdragne publikationer

EP off.g.skrift nr. 139286, 152345, 159168, 162332

(57) Sammendrag:

583-87

Farmaceutiske præparatformer til topisk anvendelse, til stabilisering af det deri indeholdte aktive stof human-interferon- α (IFN- α), hvor der som bærer og stabilisator for det aktive stof er anvendt en hidtil ukendt komposition, der specielt bibringer det terapeutisk aktive stof IFN- α en særlig stabilitet. Specielt er angivet præparatformer, der i det væsentlige er sammensat af hydroxyethylcellulose og gelatine og, som terapeutisk aktivt stof, fortrinsvis indeholder højrenset IFN- α , der er fremstillet ved DNA-rekombination.

DK 164202 B

Opfindelsen angår farmaceutiske præparatformer til topisk anvendelse indeholdende interferon- α samt fremgangsmåde til fremstilling af sådanne præparatformer, med stabilisering af det deri indeholdte interferon- α .

5 Human-interferoner og interferoner bliver alt efter deres biologiske og kemiske egenskaber og deres syntese-
sted i almindelighed opdelt i tre grupper, der betegnes med interferon- α , interferon- β og inter-
feron- γ , forkortet til IFN- α , IFN- β og IFN- γ . Syn-
10 tesestedet for IFN- α , som den foreliggende opfindelse angår, er leucocyterne, der efter stimulation eller induktion med tilsvarende induktorer (f.eks. vira eller poly I' poly C)) syntetiserer og frigør IFN- α .
Bakterier transformeret med egnede DNA-sekvenser kan
15 syntetisere IFN- α , der har en biologisk aktivitet analog med det genuine humane IFN- α , hvilket har den fordel, at der kan vindes højrenset og i det væsentlige forureninger frie proteiner i forholdsvis
store mængder, hvilke proteiner kan benyttes til
20 klinisk anvendelse, f.eks. over for forskellige virusinfektioner og malignomer.

Alle kendte interferoner virker antiviralt, antiproliferativt og - omend i forskellig grad - immunmodulerende. Mens de til at begynde med blev er-
25 kendt som antivirale midler, er man i dag opmærksom på deres terapeutiske nytte også som antineoplastiske midler.

Hvad angår virkningskvalitet og bivirkningsgrad er anvendelsesvejen af særlig betydning. Netop
30 ved den systemiske anvendelse af interferoner imponerer ulemperne, idet de ikke blot når og påvirker det tilsigtede væv, men også sunde, ikke-inficerede eller ikke-transformerede celler eller organer, og derfor frembringer bivirkninger, der kan stå i ve-
35 jen for en intravenøs eller intramuskulær anvendelse. Endvidere har den systemiske anvendelse ikke altid vist den ønskede effektivitet. I enkelte tilfælde kan en direkte injektion ganske vist være mu-

lig, men f.eks. ved virus- eller tumor-betingede
maligne sygdomme eller andre med interferon behand-
lelige sygdomme, der er tilgængelige for en udven-
dig eller lokal behandling (f.eks. hud, øjne, næse),
5 foretrækkes sædvanligvis topisk anvendelse af inter-
feron eller af IFN- α , som opfindelsen angår. I nye-
ste tid er fra forskellig side rapporteret om topisk
anvendelse af human-leukocyt-interferon, synonymt med
IFN- α , og der er overraskende påvist en høj succes-
10 kvote ved forskellige maligne sygdomme (f.eks. Ikic
et al., Lancet, p. 1022-1024, 1981, bind I; Ikic et
at., Lancet p. 1025-1027, 1981, bind I). Det kan for-
ventes, at den topiske anvendelse af interferon- α
til behandling af forskellige virale eller tumor-be-
15 tinglyede sygdomme i fremtiden vil få stigende medi-
cinsk betydning.

Ud fra forskellige synspunkter er den topiske
anvendelse af IFN- α såvel som alment af interfero-
ner forbundet med betydelige vanskeligheder. I for-
20 bindelse med formulering af farmaceutiske præparater må
det kræves, at det biologisk aktive IFN- α får en
tilstrækkelig høj stabilitet til, at det kan virke
over et tilstrækkeligt langt tidsrum både ved stue-
temperatur og ved legemstemperatur, henholdsvis at
25 det forbliver virksomt "in situ" over et passende
tidsrum på flere timer. Det er kendt, at IFN- α er
et meget temperatur-instabilt protein. Betydelige
aktivitetstab på op til 80% er observeret inden
for få uger ved 4^oC for en human-leukocyt-interfe-
30 ron-holdig gel, der som gelkomponent indeholdt car-
boxymethylcellulose (Moller B.R. et al., Obstetrics
& Gynecology 62, 625-629, 1983), og som blev an-
vendt til topisk behandling af carcinoma in situ
i cervix.

De således nødvendige stabilitetsgivende komponenter skal være således beskafne, at de hverken medfører intolerancereaktioner på anvendelsesstedet, tænkelige som følge af virkning af biologisk aktive fremmedstoffer, eller generer penetrationen af IFN- α eller hindrer diffusionen.

I den senere tid er der benyttet forskellige komponenter til stabilisering af interferon, idet Estis, Evans og Testa har benyttet hydroxyethylcellulose som bæremateriale til fremstilling af interferonholdige geler eller salver, men kun kunne hindre betydelige aktivitetstab af IFN- α , IFN- β eller IFN- γ under anvendelsesrealistiske betingelser ved tilsætning af en proteaseinhibitor (EP-A-O 152 345).

Det er velkendt, at det til fremstilling af geler af denne eller anden art bedst egnede middel er hydroxyethylcellulose, bl.a. på grund af dets varmestabilitet, og dette middel er også kommercielt tilgængeligt.

Den særlige fordel ved hydroxyethylcellulose til fremstilling af en IFN- α -holdig matrix sammenlignet med andre bærere ligger i, at det ikke koagulerer eller gelerer ved vands kogepunkt, er godt vandopløseligt, og at viskositeten af en sådan opløsning stiger med aftagende temperatur.

En stabilisering af interferon eller af IFN- α med alene hydroxyethylcellulose og ved fysiologiske temperaturer kan ikke opnås. Det er også velkendt, at ikke-højrensedede og således forurenede proteinpræparater - såsom interferon - under egnede hydrolysebetingelser udsættes for proteaser. Andre forsøg på at bibringe interferoner, der er indeholdt i farmaceutiske præparater, en passende stabilitet er gennemført af Akagi, Miura og Hoshino (EP-A-O 150 067) med polysaccharider, der er kemisk forskellige fra hydroxyethylcellulose, såsom dextran og hydroxy-

ethylstivelse under tilsætning af humant serumalbumin, af mono- eller disaccharider eller af aminosyrer, idet der er beskrevet præparater fortrinsvis til den parenterale, systemiske anvendelsesvej
5 via intravenøs eller intramuskulær injektion. Endvidere har Terano, ligeledes for et injicerbart farmaceutisk interferon-præparat, beskrevet en stabilisering af interferon i vandig opløsning alene på basis af en kemisk modificeret gelatine, med
10 henblik på at erstatte humant serumalbumin som kendt interferon-stabiliserende middel til injektion (EP-A-O 162 332). Det har længe været kendt, at gelatine per se har en på interferon stabiliserende effekt (Sedmak, J.J. og Grossberg, S.E., Tex. Rep.
15 Biol. Med. 41, 274-279, 1982), og at gelatine og kemisk modificerede derivater deraf på nogle andre biologiske proteiner har en vis stabiliserende effekt (f.eks. DE-A- 1 118 732, EP-A-O 156 242).

Til stabilisering af interferon i geler, salver, suppositorier, sprayprodukter osv. til topisk
20 anvendelse er også omtalt forskellige sukkeralkoholer, såsom glycerol, erythritol, arabitol, xylitol, sorbitol og mannitol, samt forskellige sukkersyrer, såsom iduronsyre, galacturonsyre og andre uronsyrer,
25 ascorbinsyre og salte deraf samt forskellige organiske puffersystemer, såsom citratpuffer, succinatpuffer, tartratpuffer, fumaratpuffer, glyconatpuffer, oxalatpuffer, lactatpuffer og acetatpuffer, i forbindelse med forskellige farmaceutiske bærestof-
30 fer, såsom voksarter, natriumcarboxymethylcellulose, carboxyvinylderivater og vand (EP-A-O 080 879).

Disse sidstnævnte såvel som de foran omtalte interferon-stabiliserende komponenter samt navnlig sammensætningerne af de farmaceutiske præparater

og deres anvendelsesmåde (f.eks. EP-A-O 162 332) er fundamentalt forskellige fra den foreliggende opfindelse og kan ikke sammenlignes med denne.

Den foreliggende opfindelse har haft til opgave at tilvejebringe en bærermatrix for højrenset interferon- α , specielt for rekombinant fremstillet IFN- α , hvilken matrix i det mindste skal opfylde de ovenfor omtalte krav, og som endvidere skal udvise en såvel i fremstillingsteknisk som i økonomisk henseende så gunstig, dvs. så simpel sammensætning som mulig, uden at have skadelig indvirkning på en krævet optimal aktivitet af det i bærermatrixen indeholdte biologisk aktive IFN- α til topisk anvendelse, idet man her må erindre, at IFN- α og interferoner alment er kendt for at være instabile proteiner, f.eks. over for fysiske påvirkninger, både på "nøgen" form og inkorporeret i andre gelmatricer (se f.eks. Moller et al., ovenfor).

Det har nu overraskende vist sig, at man ved at forene hydroxyethylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose eller blandinger deraf, med gelatine i bestemte blandingsforhold, kan tilvejebringe en bærer og stabilisator for IFN- α , der ikke blot opfylder de ovenfor beskrevne fordringer, men yderligere bibringer IFN- α en særlig stabil biologisk aktivitet og således på bedste måde er egnet til topisk anvendelse af højrenset, navnlig ved rekombinant DNA-teknologi fremstillet IFN- α . Et sådant bærer/stabilisatorkompleks er ydermere fordelagtigt frit for humant serumalbumin, der som bekendt navnlig ved topisk anvendelse over længere tidsperioder kan medføre fra lokale immunreaktioner og op til allergisk betingede skavanker.

Som nedenfor illustreret (Eksempel 6) opnår man kun ved den samtidige anvendelse af de nævnte cellulosederivater og gelatine den overraskende høje lagerstabilitet for de IFN- α -holdige præparater, idet stabiliteten kraftigt aftager, når en af disse komponenter mangler.

Anderledes udtrykt udøver cellulosekomponenten i det dannede kompleks med gelatine en overraskende synergistisk stabiliserende effekt på det i præparatet ifølge opfindelsen indeholdte IFN- α .

5 I overensstemmelse hermed er præparatformerne ifølge opfindelsen ejendommelige ved, at de som bærer og stabilisator for interferon- α indeholder

1. Hydroxyethylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, eller blandinger deraf, og
- 10 2. gelatine, surt eller alkalisk oplukket, samt yderligere som antiadhæsionsmiddel anionaktive, kationaktive eller neutrale overfladeaktive stoffer, og eventuelt yderligere sædvanlige hjælpestoffer;

15 og fremgangsmåden til fremstilling af de omhandlede præparatformer er ejendommelig ved, at man til fremstilling af en hydrogel opløser gelatine, i en mængde svarende til en andel på 0,1 til 2,0 vægt% af det færdige produkt, i vand ved temperaturer op til 80°C, til denne opløsning sætter antiadhæsionsmiddel og de ønskede øvrige. 20 hjælpestoffer, derefter til opløsningen sætter hydroxyethylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose eller en blanding deraf, og at man efter afkøling af opløsningen til stuetemperatur heri homogent fordeler interferon- α i 25 en mængde svarende til en andel på $1:10^5$ til $1:10^{10}$ IE/100 g færdigt produkt og aftapper denne blanding sterilt.

Foretrukne udførelsesformer for præparaterne ifølge opfindelsen ses i underkravene 2-10, og en foretrukket 30 udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er, til fremstilling af omhandlede præparatformer til intravaginal anvendelse, ejendommelig ved det i krav 12's kendetegnende del angivne.

De omhandlede, topisk anvendelige farmaceutiske præparatformer for IFN- α anvendes fortrinsvis som virusstatika, hvorhos den terapeutiske anvendelse foregår i det dermale, nasale, ophthalmiske og intravaginale område, f.eks. ved Herpes labialis, Herpes genitalis inklusive Papilloma-infektioner, vorter og ved Herpes Zoster-infektioner. Anvendelsesomfanget omfatter også den topiske behandling af paracanceroser og canceroser (cancerbetingede tilstande).

Eksempler på de i præparatformerne ifølge opfindelsen anvendte andre sædvanlige aktive stoffer er puffere og salte, fugtighedsbevarende stoffer, konserveringsmidler, penetrationsfremmende stoffer og bærere.

Som bærer og stabilisator for IFN- α benyttes som nævnt hydroxyethylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose eller blandinger deraf sammen med gelatine, surt eller alkalisk oplukket. Som foretrukket bærer og stabilisator for IFN- α anvendes hydroxyethylcellulose med en substitutionsgrad på 2,5 i bestemte blandingsforhold på altid 0,1 til 2 vægt% og gelatine i en mængde på 0,1-10 vægt%, baseret på det færdige produkt. Herved opnås en særlig stabilisering specielt af IFN- α , som eksempelvis demonstreret ved de gennemførte forsøg vedrørende stabiliseringsforhold og ved de i fig. 1 til 3 viste kurveforløb, der omfatter et forsøgstidsrum på 14 uger ved lagertemperatur på -10 , $+4$ og $+21^{\circ}\text{C}$.

Som antiadhæsionsmiddel til bedre spredning af gelerne og som antiadhæsivt filtreringshjælpesstof kan der benyttes anionaktive, kationaktive samt neutrale overfladeaktive stoffer, fortrinsvis polyethoxylerede sorbitanestre, såsom polysorbitat 20, 60, 80. Som uorganiske og organiske pufferopløsninger har det vist sig velegnet at anvende en af følgende puffere, udvisende en for IFN- α -præparater optimal pH-værdi i området fra 6,0 til 7,4: Natriumphosphat-puffer, kaliumhydrophosphat-natriumdihydrophosphat-puffer samt citronsyrephosphat-puffer, ka-

lium-natrium-glutamat-phosphat-puffer og succinat-puffer.

Til de omhandlede IFN- α -holdige præparat-
former egner sig fugtighedsbevarende stoffer, såsom
5 glycerol, 1,2-propylenglycol, sorbit, butylenglycol
samt polyoler (f.eks. polyethylenglycol 400).

Egnede hudvenlige konserveringsstoffer er
f.eks. p-hydroxybenzoesyrestre (Nipa[®]-estre), for-
trinsvis p-hydroxybenzoesyremethylester, endvidere
10 benzoesyre, sorbinsyre, chlorhexidindigluconat, ben-
zalkoniumchlorid og hexadecyltrimethylammonium-
bromid (cetrimoniumbromid).

Et egnet, med IFN- α -2 kompatibelt penetrations-
fremmende middel er op til 50 vægt% dimethylsulfo-
15 xid (DMSO).

Som bærer er til ikke-alkoholiske hydroge-
ler vand bedst egnet.

Egnede farmaceutiske former til topisk an-
vendelse på hud, i øjet eller i næsen eller andre
20 legemshulheder er f.eks. hydrogeler. Disse indehol-
der i almindelighed 0,1 til 2,0 vægt% af såvel ge-
latine som af cellulosederivater, idet forholdene må
være afstemt efter hinanden alt efter ønsket viskositet.
Ved fremstilling af vaginalkugler må andelen af ge-
25 latine forøges op til 10 vægt%, ligeledes i afhængig-
hed af den ønskede viskositet.

I de følgende eksempler er detaljeret be-
skrevet fremstillingen af topisk anvendelige farma-
ceutiske præparatformer til stabilisering af det
30 deri indeholdte IFN- α , hvilke præparater ifølge op-
findelsen hovedsageligt er sammensat af cellulose-
derivater og gelatine, antiadhæsionsmidler samt af
det deri indeholdte aktive stof IFN- α og forskel-
lige tilsætningsstoffer.

I eksemplerne betyder:

- Nipagin[®] M = p-Hydroxybenzoesyremethylester,
 Polysorbat 20 = Polyoxyethylen(20)sorbitanmono-
 5 laurat (Tween[®]20),
 Polysorbat 60 = Polyoxyethylen(20)sorbitanmono-
 stearat (Tween[®]60),
 Polysorbat 80 = Polyoxyethylen(20)sorbitanmono-
 oleat (Tween[®]80),
 10 Benzalkonium- = Blanding af alkyldimethylbenzyl-
 chlorid ammoniumchlorider med alkylgrup-
 per med 8 til 18 C-atomer,
 Centrimonium- = Hexadecyltrimethylammoniumbromid,
 bromid
 15 $3,2 \times 10^8$ I.E. Interferon- α -2 svarer til 1 mg
 af dette stof.

Eksempel 1 (Hydrogel)

I 100 g gelstof var indeholdt:

20	IFN- α -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
25	NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,0593 g
	K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	0,0407 g
	Glutaminsyre-Na x H ₂ O	0,0636 g
	Polysorbat 20	0,1 g
	Hydroxyethylcellulose (f.eks.	
30	Natrosol [®] 250 HX)	1,75 g
	Vand, deioniseret til 100 g	96,7944 g

* Bloom-værdien er et mål for styrken af en gel (se f. eks. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis VII, 35 216-217 (Springer Verlag 1977)).

Fremstillingen af IFN- α -2-hydrogelen foregår ved, at Nipagin[®] opløses i 80°C varmt vand, og opløsningen derefter afkøles til rumtemperatur (RT), idet gelatinen under afkølingsfasen indføres i opløsningen. Efter fuldstændig opløsning af gelatinen tilsættes ved stuetemperatur successivt til denne opløsning NaCl, KCl, NaH₂PO₄ x 2 H₂O, K₂HPO₄ x 3 H₂O, glutaminsyre-Na x H₂O samt polysorbat 20. Efter påfølgende sterilfiltrering indstrøes mikrobiologisk ren hydroxyethylcellulose, og opløsningen bliver under omrøring atter opvarmet til 80°C. Efter afkøling til stuetemperatur bliver under forsigtig omrøring den saltsure, 1% polysorbat-holdige IFN- α -2-opløsning, bestående af et i 0,01 N HCl opløst IFN- α -2-lyofilisat, tilsat og fordelt homogent. Aftapningen af denne blanding foregår under Laminar-Air-Flow-betingelser til sterile aluminiumtuber.

Eksempel 2

(Hydrogel)

20 I 100 g gelstof er indeholdt:

	IFN- α -2	1 x 10 ¹⁰ I.E.
	Hydroxyethylcellulose (f.eks. Natrosol [®] 250 HX)	2, 0 g
	Gelatine, Bloom 160 - 200	0, 1 g
25	NaCl	0,35 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,16 g
	KH ₂ PO ₄	0,09 g
	1,2-Propylenglycol	10,00 g
	Polysorbat 80	0,1 g
30	Benzalkoniumchlorid 90 %	0,02 g
	Vand, deion. til	100 g

Fremstillingen af IFN- α -hydrogelen foregår ved, at benzalkoniumchloridet ved 30°C opløses i vandet, hvorefter propylenglycol tilsættes ved stuetemperatur, og gelatine indføres i opløsningen. Efter fuldstændig opløsning af gelatinen tilsættes successivt ved stuetemperatur NaCl, Na₂HPO₄ x 2H₂O, KH₂PO₄ samt polysorbat 80. Efter sterilfiltrering indstrøes mikrobiologisk ren hydroxyethylcellulose, og opløsningen bliver under omrøring opvarmet 20 minutter ved 80°C. Efter afkøling til RT bliver under forsigtig omrøring den salt-sure, polysorbatholdige IFN- α -2-opløsning, bestående af et i 0,01 N HCl og 0,1% polysorbat 80 opløst IFN- α -2-lyofilisat, tilsat og fordelt homogent. Aftapningen af denne blanding foregår under Laminar-Air-Flow-betingelser til sterile aluminiumtuber.

Eksempel 3

(Hydrogel)

I 100 g gel-stof er indeholdt:

	IFN- α -2	1 x 10 ⁶ I.E.
20	Hydroxyethylcellulose (f.eks. Natrosol [®] 250 HX)	1,0 g
	Gelatine, Bloom 160 - 200	1,0 g
	Polysorbat 20	0,1 g
	Glycerol	5,0 g
25	Ravsyre	0,24 g
	Chlorhexidindigluconat	0,05 g
	1N-NaOH (til pH 6,0)	
	Vand, deion	til 100,0 g

Fremstillingen af IFN- α -2-hydrogelen foregår ved, at chlorhexidindigluconat, glycerol og gelatine bringes i opløsning ved ca. 30°C. Derefter tilsættes ravsyre, pH indstilles på 6,0 med NaOH, og polysorbat 20 tilsættes.

Derefter indstrøes mikrobiologisk ren hydroxyethylcellulose, og opløsningen bliver under omrøring opvarmet 20 minutter ved 80°C. Efter afkøling til RT bliver under forsigtig omrøring den salture, polysorbat-holdige IFN- α -2-opløsning tilsat og fordelt homogent. Aftapningen foregår som i eksemplerne 1 og 2.

Eksempel 4

(Hydrogel som næsegel)

10	I 100 g gelstof er indeholdt;		
	IFN- α -2	1×10^8	I.E.
	Hydroxypropylmethylcellulose (f.eks. Methocel [®] Premium)	0,1	g
	Polysorbat 60	0,1	g
15	Gelatine, Bloom 160 - 200	0,5	g
	Sorbitopløsning 70 %	2,0	g
	Citronsyre x H ₂ O	0,130	g
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,30	g
	NaCl	0,5	g
20	Benzalkoniumchlorid 90 %	0,02	g
	Vand, deion.	til 100	g

Fremstillingen af IFN- α -2-hydrogelen foregår ved, at hydroxypropylmethylcellulosen under omrøring opløses i 40°C varmt vand. Derefter afkøles til stuetemperatur, og under afkølingsfasen indføres gelatine i opløsningen. Efter endt opløsning tilsættes successivt benzalkoniumchlorid, sorbitopløsning, citronsyre, di-Na-hydrophosphat, NaCl og polysorbat 60. I den færdige gel bliver ved stuetemperatur under omrøring den saltsure, 1% polysorbatholdige IFN- α -2-opløsning indført og fordelt homogent. Aftapningen foregår under Laminar-Air-Flow-betingelser til sterile aluminiumtuber.

Eksempel 5

(ovula)

I 100 g ovula-masse er indeholdt:

	IFN- α -2	1×10^8	I.E.
5	Hydroxyethylcellulose	0,1	g
	Gelatine, Bloom 160 - 200	10,0	g
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,16	g
	KH ₂ PO ₄	0,09	g
	Polysorbat 20	0,1	g
10	Glycerol	57,0	g
	Vand, deion.	til 100	g

Fremstillingen af denne IFN- α -2-ovula foregår ved, at hydroxyethylcellulosen sammen med gelatinen ved ca. 40-50°C opløses i glycerol-vandblandingen, der allerede indeholder Na₂HPO₄ x 2H₂O, KH₂PO₄ samt polysorbat. I den endnu viskose tilstand (ved ca. 37-40°C) bliver den 1% polysorbat-holdige saltsure (0,001N) IFN- α -2-opløsning forsigtigt indrørt, og opløsningen udhældes straks til størkning i egnede, afkølede forme.

Eksempel 6

(Stabilitetstests, hydrogel uden gelatine- versus med gelatine-tilsætning).

I 100 g gelstof er indeholdt:

25	IFN- α -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
30	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ 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
	Hydroxyethylcellulose (f.eks. Natrosol [®] 250 HX)	2,0 g	2,0 g
5	Vand, deion.	til 100 g	

De punkterede kurver i fig. 1-3 viser stabilitetsforløbet for en IFN- α -2-hydrogel med ovennævnte sammensætning uden gelatinetilsætning, og de fuldt optrukne kurver viser sammen med gelatine-tilsætning, og med gelen indfyldt i aluminiumtuber. Hvert punkt viser middelværdien for 6 bestemmelser. Bestemmelserne gennemførtes med ELISA-testen.

I fig. 1 er vist stabilitetsforløbet ved minus 10°C-lagring, i fig. 2 ved plus 4°C-lagring og i fig. 3 ved plus 21°C-lagring.

Stabilitetsforholdene fulgtes over et tidsrum på 14 uger (=3 1/2 måned). Herved blev det overraskende fastslået, at stabilitetsforskellene blev tydeligere ved stigende lagertemperatur. Ved addition af de biologiske stabilitetsresultater over det totale tidsrum på 14 uger og tilvejebringelse af det aritmetiske gennemsnit (\bar{x}) af værdierne ($n = 11$) fandtes det i følgende tabel viste billede, idet en værdi på 10,0 svarende til 10^8 I.E. IFN- α -2 pr. 100 g blev sat til 100% aktivitet.

Lager-temperatur	Hydrogel uden gelatine-tilsætning	Hydrogel med gelatinetilsætning	Differen- ce
-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%

Af denne tabel kan tydeligt aflæses den stabiliserende virkning af kombinationen af hydroxyethylcellulose og gelatine. Ved en lagring i køleskab (= plus 4°C) kunne der praktisk taget ikke konstateres nogen aftagen i aktivitet efter 3 1/2 måned for præparatet med gelatine-tilsætning, hvorimod præparatet uden gelatinetilsætning viste et fald på ca. 25%. Køleskabstemperatur er således en praktikabel lagring for et handelspræparat. Ved en lagring ved 21°C kunne der for præparatet uden gelatine-tilsætning inden for lagringstidsrummet på 3 1/2 måned konstateres et aktivitetstab til næsten det halve af udgangsværdien, hvorimod det omhandlede præparat med hydroxyethylcellulose og gelatine inden for nævnte tidsrum kun viste et aktivitetstab på 11%, hvilket svarer til en relativ stabilitetsforøgelse for IFN- α -2 på over 30%.

Et yderligere lagringsforsøg med en varighed på 44 uger (10 måneder) med en præparatform ifølge Eksempel 1, indfyldt i aluminiumtuber med indvendig beskyttelseslak, viste ved ELISA-test ved en lagertemperatur på 4°C og 21°C intet aktivitetstab sammenlignet med begyndelsesværdien.

Lagertemperatur	Hydrogel ifølge Eksempel 1	
	Begyndelsesværdi	Slutværdi efter 10 måneder
+ 4°C	\bar{x} (6) 9,6	\bar{x} (6) 11,0
+ 21°C	\bar{x} (6) 9,6	\bar{x} (6) 9,6

P A T E N T K R A V

1. Farmaceutiske præparatformer til topisk anvendelse indeholdende interferon- α , kendt og næt ved, at de som bærer og stabilisator for interferon- α
5 indeholder
1. Hydroxyethylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, eller blandinger deraf, og
 2. gelatine, surt eller alkalisk oplukket, samt yderligere som antiadhæsionsmiddel anionaktive,
10 kationaktive eller neutrale overfladeaktive stoffer, og eventuelt yderligere sædvanlige hjælpestoffer.
 2. Præparatformer ifølge krav 1, kendt og næt ved, at de er hydrogeler.
 - 15 3. Præparatformer ifølge krav 2, kendt og næt ved, at de som bærer og stabilisator indeholder hydroxyethylcellulose og gelatine, idet andelen af hydroxyethylcellulose er 0,1 til 2,0 vægt% beregnet på det færdige produkt.
 - 20 4. Præparatformer ifølge krav 2, kendt og næt ved, at de som bærer og stabilisator indeholder hydroxypropylmethylcellulose og gelatine, hver i en andel på 0,1 til 2,0 vægt% beregnet på det færdige produkt.
 - 25 5. Farmaceutiske præparatformer ifølge krav 2, kendt og næt ved, at de som bærer og stabilisator indeholder hydroxyethylcellulose og gelatine, idet andelen af gelatine, beregnet på det færdige produkt, andrager fra 0,1 til 10 vægt%.
 - 30 6. Præparatformer ifølge et hvilket som helst af kravene 1-5, kendt og næt ved, at antiadhæsionsmidlet består af polyethoxylerede sorbitanestre.
 - 35 7. Præparatformer ifølge et hvilket som helst af kravene 1-6, kendt og næt ved, at det deri indeholdte interferon- α er vundet fra en cellekultur, der er transformeret med en for human-interferon- α kodende DNA-sekvens.

8. Præparatformer ifølge et hvilket som helst af kravene 1-7, k e n d e t e g n e t ved, at de som yderligere hjælpestoffer indeholder et puffersystem til et pH-område på 6,0-7,4, fugtighedsbevarende stoffer, hudvenlige konserveringsstoffer, interferon- α -kompatible penetrationsfremmende stoffer og en bærer.

9. Præparatformer ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at de som fugtighedsbevarende stoffer indeholder glycerol, 1,2-propylenglycol, sorbitol, butylenglycol, en polyol, såsom polyethylenglycol 400, eller en blanding deraf.

10. Farmaceutiske præparatformer ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at det interferon- α -kompatible penetrationsfremmende middel er op til 50 vægt% dimethylsulfoxid.

11. Fremgangsmåde til fremstilling af farmaceutiske præparatformer ifølge krav 1 til topisk anvendelse, med stabilisering af det deri indeholdte interferon- α , k e n d e t e g n e t ved, at man til fremstilling af en hydrogel opløser gelatine, i en mængde svarende til en andel på 0,1 til 2,0 vægt% af det færdige produkt, i vand ved temperaturer op til 80°C, til denne opløsning sætter antiadhæsiionsmiddel og de ønskede øvrige hjælpestoffer, derefter til opløsningen sætter hydroxyethylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose eller en blanding deraf, og at man efter afkøling af opløsningen til stuetemperatur heri homogent fordeler interferon- α i en mængde svarende til en andel på $1 \cdot 10^5$ til $1 \cdot 10^{10}$ IE/100 g færdigt produkt og aftapper denne blanding sterilt.

12. Fremgangsmåde til fremstilling af farmaceutiske præparatformer ifølge krav 1 til intravaginal anvendelse, k e n d e t e g n e t ved, at man

a) i en vand-glycerolblanding, der indeholder et antiadhæsiionsmiddel samt eventuelt salte, puffermidler og konserveringsmidler, ved temperaturer op til 60°C opløser hydroxyethylcellulose i en mængde på 0,1 til 2,0 vægt% sammen med gelatine i en mængde op til 10

vægt%, at man derefter

b) forsigtigt ved en temperatur på 40 til 50°C
heri indrører en polysorbatholdig saltsur IFN- α -opløsning, og at man

5 c) straks udhælder denne opløsning i egnede forme.

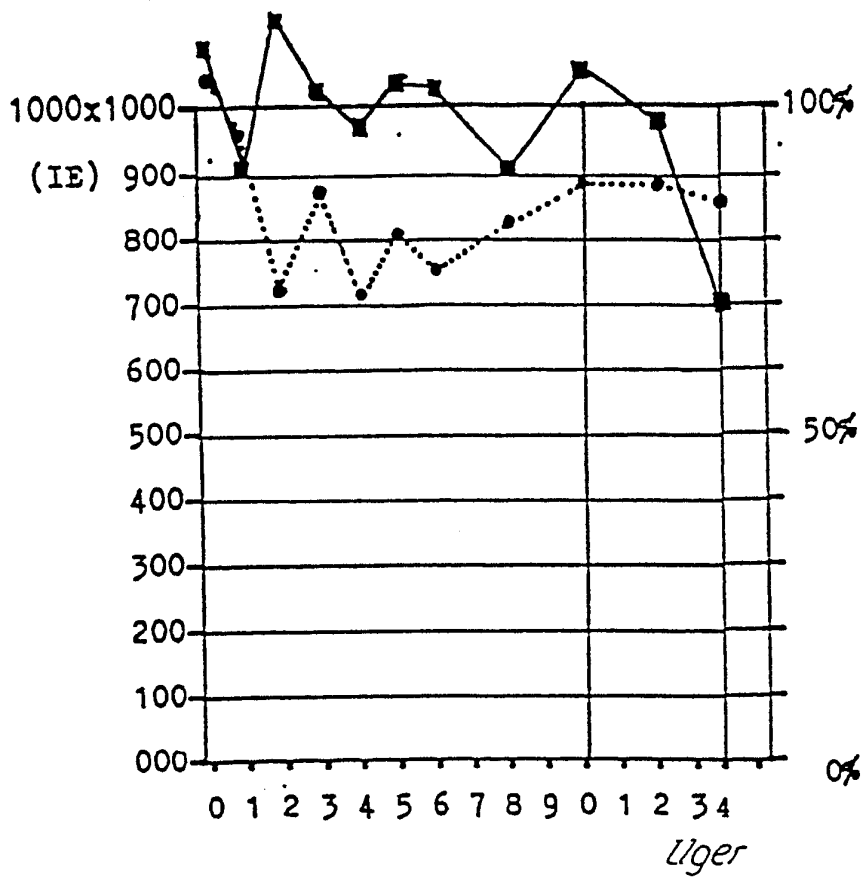


FIG. 1

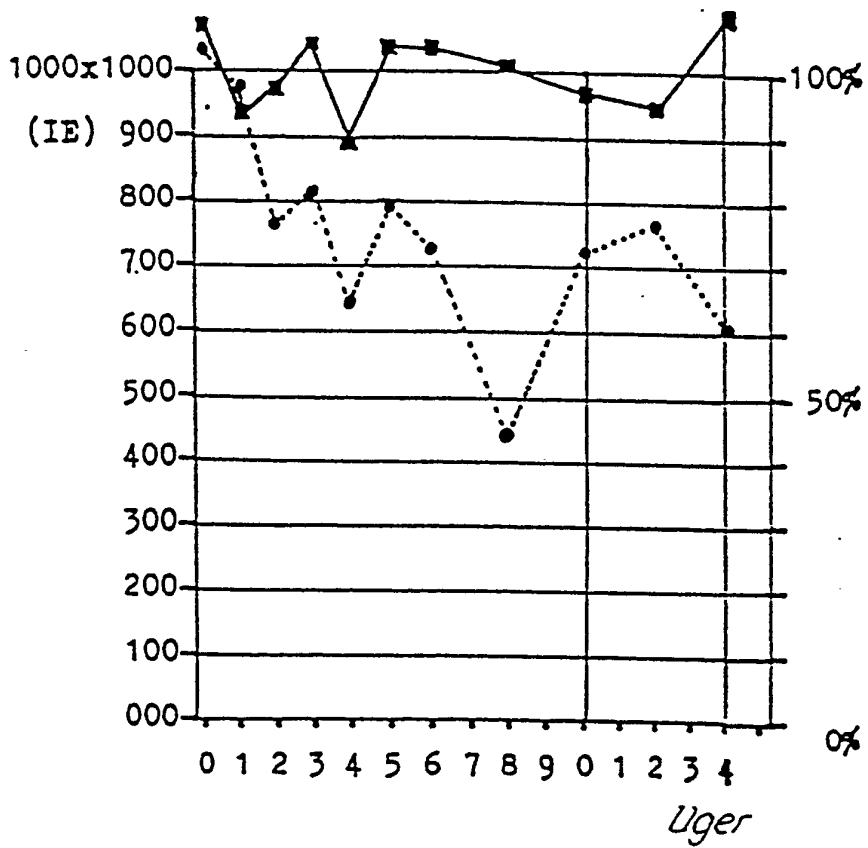


FIG. 2

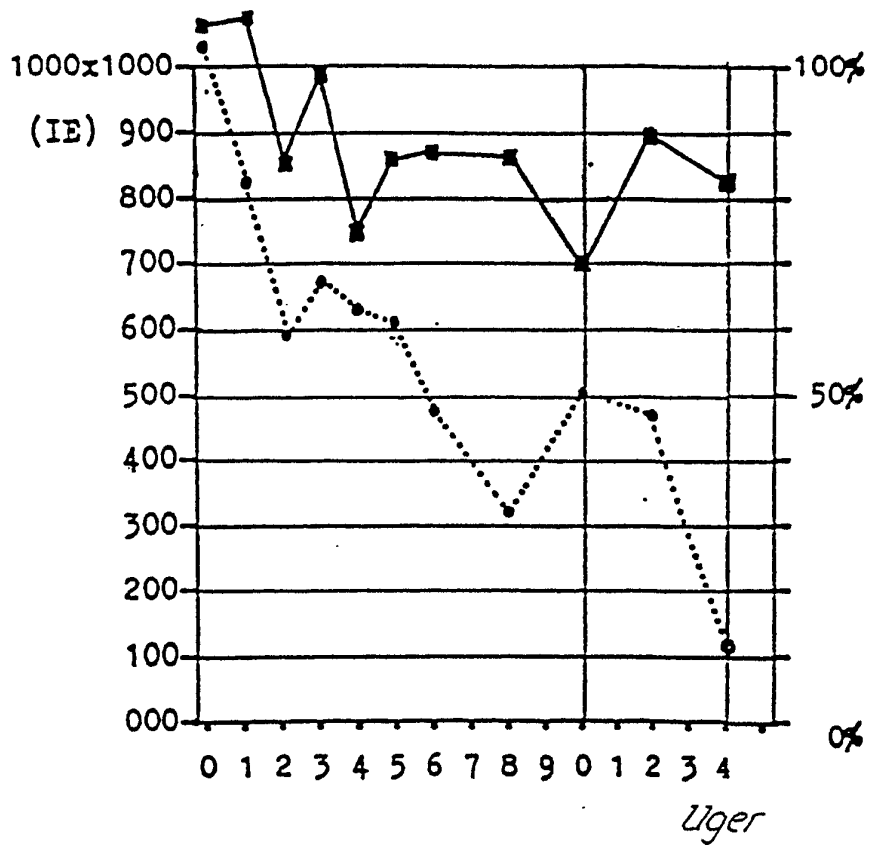


FIG. 3