

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 157120 B

P.B.

(21) Patentansøgning nr.: 1281/80

(51) Int.Cl.⁴ A 61 K 33/40

A 61 K 37/50

(22) Indleveringsdag: 25 mar 1980

(24) Løbedag: 07 mar 1977

(41) Alm. tilgængelig: 25 mar 1980

(44) Fremlagt: 13 nov 1989

(86) International ansøgning nr.: -

(62) Stamansøgning nr.: 0989/77

(30) Prioritet: 08 mar 1976 SE 7603075

(71) Ansøger: *ASTRA-EWOS AB; Fack; 151 20 Soedertaelje, SE

(72) Opfinder: Karl Erik Lennart *Bjoerck; SE

(74) Fuldmægtig: Kontor for Industriel Eneret

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af et farmaceutisk præparat med antibakteriel virkning**

(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer. Biochem. Biophys. Acta 117 (1966) side
63-72. Chemical Abstracts, bind 83
(1975), 162316 y

(57) Sammendrag:

1281-80

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et farmaceutisk præparat med antibakteriel virkning, k e n d t e g n e t ved at man til i og for sig kendte farmaceutiske bærere sætter et antibakterielt system indeholdende laktoperoxydase, tiocyanat og en fast, vandopløselig peroxyddonor valgt blandt alkalimetaller-karbonater, jordalkalimetallperoxyder og karbamidperoxyd.

DK 157120 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangs-
måde til fremstilling af et farmaceutisk præparat med
antibakteriel virkning og det er formålet med opfindel-
sen at tilvejebringe mulighed for at fremstille et så-
dant præparat som udøver sin antibakterielle virkning i
5 mave-tarmkanalen.

Det er i forvejen kendt at husdyrbestande, navn-
lig unge dyr, er udsat for alvorlige infektioner i for-
døjelseskanalen, som hovedsagelig beror på infektioner
10 af *Escherichia coli* og forskellige *Salmonella*-arter. De
hidtil kendte fremgangsmåder til eliminering af sådanne
infektioner er bl.a. indgift af en terapeutisk mængde
antibiotika, hvilket er forbundet med en risiko for at
der dannes antibiotikaresistente bakteriestammer; og vac-
15 cination af husdyrbesætningen, hvilket fører til høje
omkostninger fordi vaccine og vaccinationer er kostbare.

Det har nu overraskende vist sig at være muligt
at undgå de nævnte ulemper og at modvirke og/eller eli-
minere sådanne bakterieinfektioner ved anvendelse af et
20 farmaceutisk præparat med en antibakteriel virkning, som
ifølge opfindelsen er fremstillet ved at man til en i og
for sig kendt farmaceutisk bærer sætter et antibakterielt
system indeholdende laktoperoxydase i en mængde på mindst
1 mg/kg produkt, tiocyanat i en mængde på mindst 15 ppm
25 udtrykt som natriumtiocyanat og en fast, vandopløselig
peroxyddonor i en mængde på mindst 21 ppm udtrykt som
natriumperkarbonat og udvalgt blandt alkalimetalperkar-
bonater, jordalkalimetalperoxyder og karbamidperoxyd.

Man bør tilsætte tiocyanat i en mængde der i for-
30 døjelseskanalen giver en koncentration deraf på mindst
0,1 mM, fortrinsvis 0,2-0,4 mM og den må ikke overskride
den toxiske koncentration (10 mM). Mængden af fast vand-
opløselig peroxyddonor vælges på en sådan måde at der i
fordøjelseskanalen opnås en ækvimolær mængde H_2O_2 , dvs.
35 at koncentrationen af dannet H_2O_2 bliver mindst 0,1 mM
og fortrinsvis 0,2-0,4 mM.

Mængden af laktoperoxydase afhænger af enzymets aktivitet men baseret på den antagelse at 1 mg indeholder 50 enheder (U) bør der være mindst 1 mg enzym til stede pr. liter fordøjelsesvæske. En enhed laktoperoxydase er den mængde laktoperoxydase der danner 1 mg purogallin fra purogallol på 20 sek. ved pH 6,0 og 20°C.

I en opløsning er koncentrationen af tiocyanat således mindst 0,1 mM, fortrinsvis 0,2-0,4 mM, koncentrationen af peroxyddonor er således at koncentrationen af H_2O_2 er 0,1 mM, fortrinsvis 0,2-0,4 mM og koncentrationen af laktoperoxydase bør være 1-2 mg/l (50-100 U/l).

Mængden af laktoperoxydase i oksevalle (upasteuriseret) eller i ultrafiltreret valle varierer naturligt. Komælk indeholder ifølge litteraturen laktoperoxydase i en mængde på ca. 30 mg/l.

Ved klinisk anvendelse indgives systemet sædvanligvis oralt eller rektalt i form af et i henhold til opfindelsen fremstillet farmaceutisk præparat som indeholder et antibakterielt system i kombination med et farmaceutisk bærestof.

Når der i nærværende beskrivelse og i kravene omtales det ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede antibakterielle system, sigtes der til en hvilken som helst peroxyddonor og et hvilket som helst tiocyanat hvad enten forbindelserne er generelt eller specifikt beskrevet; med mindre den sammenhæng hvori sådanne udtryk anvendes, fx i eksemplerne, ikke stemmer overens med den brede betydning. Bærestoffet kan være et fast, halvfast eller flydende fortyndingsmiddel eller en kapsel. I de farmaceutiske præparater udgør de aktive bestanddele mellem 0,1 og 99 vægt% af præparatet, hensigtsmæssigt mellem 2 og 50 vægt% i præparater til oral indgift.

Ved fremstilling af farmaceutiske præparater der indeholder et antibakterielt system i form af en dosisenhed til oral indgift kan de udvalgte bestanddele blandes med en fast, pulverformig bærer, fx med laktose,

sakkarose, sorbitol, mannitol, stivelse såsom kartoffelstivelse, majsstivelse eller amylopektin, cellulosederivater eller gelatine, samt med et smøremiddel såsom magniumstearat, kalciumstearat eller polyætylenglykolvokser, hvorpå blandingen presse til tabletter. Hvis der ønskes coatede tabletter kan den på den ovenfor beskrevne måde fremstillede kerne belægges med en opløsning af en polymer som opløses eller er permeabel i tarmkanalen. Til denne belægning kan der sættes et farvestof for at gøre det lettere at skelne mellem tabletter med forskellige aktive bestanddele eller med forskellige mængder af de tilstedeværende aktive bestanddele.

Til fremstilling af bløde gelatinekapsler (perleformede lukkede kapsler) som består af gelatine og fx glycerol, eller ved fremstilling af tilsvarende lukkede kapsler blandes de aktive bestanddele med en vegetabilsk olie. Hårde gelatinekapsler kan indeholde granulater af de aktive bestanddele i kombination med en fast, pulverformig bærer såsom laktose, sakkarose, sorbitol, mannitol, stivelse (som fx kartoffelstivelse, majsstivelse eller amylopektin), cellulosederivater eller gelatine.

Dosisenheder til rektal indgift kan fremstilles i form af suppositorier, som indeholder den aktive forbindelse i en blanding med en neutral fedtbase, eller de kan fremstilles i form af rektalt indgivelige gelatinekapsler som indeholder de virksomme bestanddele i en blanding med en vegetabilsk olie eller paraffinolie.

Flydende præparater til oral indgift kan have form af saft eller suspension, fx en opløsning med 2-20 vægt% af de aktive substanser beskrevet ovenfor, idet resten består af sukker og en blanding af ætanol, vand, glycerol og propylenglykol. Om ønsket kan sådanne flydende præparater indeholde farvestoffer, smagsstoffer, sakkarin og karboxymetylcellulose som fortykningsmiddel. Peroxydonoren er herved til stede i form af mikroindkapslede partikler.

Fremstilling af farmaceutiske tabletter til per-

oral anvendelse kan ske på følgende måde:

De indgående faste stoffer males eller sigtes til en bestemt partikelstørrelse. Bindemidlet homogeniseres og suspenderes i en bestemt mængde opløsningsmiddel. De terapeutiske substanser og nødvendige hjælpestoffer blandes under en kontinuerlig og konstant blanding med bindemiddelopløsningen som kan bestå af en polymer som er opløselig eller permeable i tarmkanalen, og man befugter således at opløsningen bliver ensartet fordelt i massen uden at nogle af delene overbefugtes. Befugtningen af pulverblandingen med bindemiddelopløsningen får partiklerne til at forenes til aggregater og den reelle granuleringssproces gennemføres på en sådan måde at massen presses gennem en sigte i form af et net af rustfrit stål med en maskestørrelse på ca. 1 mm. Massen anbringes derpå i tynde lag på en bakke til tørring i et tørreskab. Denne tørring foregår i løbet af 10 timer og må standardiseres omhyggeligt eftersom fugtighedsgraden af granulatet er af største vigtighed for den følgende fremgangsmåde til dannelse af tabletterne. Det er muligt at anvende tørring i et fluidiseret leje. I dette tilfælde anbringes massen ikke på en bakke men udhældes i en beholder med en netbund. Efter tørringstrinnet sigtes granulatet således at man opnår den ønskede partikelstørrelse. Under visse omstændigheder må man fjerne støv.

Til den færdige blanding sættes desintegreringsmidler, smøremidler og antiklæbemidler. Efter denne blanding skal massen have sin rigtige sammensætning til tabletteringstrinnet.

Den rengjorte tabletmaskine forsynes med et bestemt sæt stempler, hvorefter korrekt justering af tabletvægt og kompressionsgrad afprøves. Tablettens vægt er bestemmende for dosisstørrelsen i hver tablet og beregnes ud fra mængden af terapeutisk middel i granulatet. Kompressionsgraden påvirker tablettens størrelse, dens styrke og dens evne til sønderdeling i vand. Navnlig med hensyn til de to sidstnævnte egenskaber er valget af kom-

pressionstryk (0,5-5 t) noget af en balancegang. Når den rigtige justering er indstillet, sættes tabletfremstillingen i gang og den gennemføres med en hastighed på 20.000-200.000 tabletter i timen. Tabletpresningen kræver forskellig tid og afhænger af portionsstørrelsen.

Tabletterne coates fortrinsvis med et overtræk. Dette betyder at de belægges med et lag af en polymer der kan opløses eller er permeabel i tarmkanalen.

Tabletterne emballeres sædvanligvis ved hjælp af maskiner med et elektronisk tælleorgan. De forskellige emballagetyper består af glas- eller plastkrukker men også æsker, rør og specielle dosistilpassede emballager.

Den daglige dosis af de aktive substanser varierer og afhænger af indgiftsvejen og den bakterielle infektion, men som almen regel er den 8-400 mg pr. dag Natiocyanat og 10-500 mg/dag Na-perkarbonat ved peroral indgift.

Farmaceutiske præparater der indeholder et antibakterielt system fremstillet ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er beregnet til anvendelse ved behandling af bakterieinfektioner i mave-tarmkanalen frembragt af arter af fx Shigella, Salmonella, Escherichia coli, Vibrio colera, Pseudomonas-arter (Pseudomonas pyocyanea), Staphylococcus-arter (Staphylococcus albus, Staphylococcus aureus), Streptococcus-arter (Streptococcus viridans, Streptococcus faecalis og β -Streptococcus) og Proteus.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen vil blive beskrevet nærmere i det følgende ved hjælp af nogle eksempler.

Eksempel 1

	Natriumperkarbonat-granulat indeholdende 10% aktivt oxygen	100 g
	Natriumtiocyanat	40 g
5	Laktoperoxydase (50 U/mg)	2 g
	Polyvinylpyrrolidon	10 g
	Laktose	50 g
	Magniumstearat	10 g

10 Laktoseperoxydasen blandedes med laktose og granuleredes under anvendelse af en opløsning af polyvinylpyrrolidon.

Natriumperkarbonat blandedes med natriumtiocyanat og laktoperoxydasegranulatet. Der tilsattes magniumstearat hvorefter der granulære blanding tabletteredes.

Der vandtes tabletter med en gennemsnitlig vægt på 212 mg og disse blev belagt med et mavesaftresistent lag bestående af "Eudragit"®.

20 Eksempel 2

	Magniumperoxyd	50 g
	Natriumtiocyanat	0,8 g
	Laktoperoxydase (50 U/mg)	0,04g
25	Polyvinylpyrrolidon	5 g
	Laktose	100 g
	Magniumstearat	10 g

30 De tre aktive komponenter granuleredes hver for sig under anvendelse af polyvinylpyrrolidon som granuleringsmiddel. Der tilsattes laktose og magniumstearat hvorpå blandingen tabletteredes. De vundne tabletter (1000 stk.) med en gennemsnitlig vægt på ca. 155 mg blev belagt med en opløsning af celluloseacetatftalat som er

35 resistent overfor mavesaft, i en opløsningsmiddelblanding af lige dele acetone og isopropanol.

Eksempel 3

	Karbamidperoxyd	50 g
	Natriumtiocyanat	20 g
	Laktoperoxydase (50 U/mg)	1 g
5	Laktose	100 g
	Stearinsyrepulver	2 g

Karbamidperoxydet granuleres under anvendelse af en opløsning af "Eudragit"[®] S. Laktoperoxydasen blandes med laktose og tiocyanat og blandingen granuleres under anvendelse af "Eudragit"[®] S. De to portioner granulater forenedes og blandedes med stearinsyrepulver og den endelige blanding tabletteredes. Tabletterne havde en gennemsnitlig vægt på ca. 175 mg.

15

Eksempel 4

	I	Natriumperkarbonat	100 g
		Mannitol	20 g
20	II	Natriumtiocyanat	40 g
		Mannitol	20 g
	III	Laktoperoxydase	2 g
25		Mannitol	20 g

Der fremstilledes granulater ud fra hver sin af blandingerne I, II og III under anvendelse af en opløsning af "Eudragit"[®] L. De forenede granulater blandes med et passende smagsstof såsom sukker, kakao, mikroindkapslede citrusaroma eller blandinger deraf.

30

Et doseringsorgan, fx en ske, som giver en dosis på ca. 200 mg lægges ind i emballagen til den granulære blanding. Emballagen er fremstillet af fugtighedstæt materiale som fx en lamineret aluminiumsfolie.

35

Biologiske forsøgA. Sammenligning med kendt teknik

Fra Chemical Abstracts vol. 83, 1975, nr. 16231y (referat af en afhandling af B. Björck et al. 9 Appl. Microbiol. 30(2), 199-204, 1975) er det kendt at produkter af oxydation af tiocyanat med laktoperoxydase inhiberer grampositive bakterier der danner peroxyd. Disse produkter var baktericide for sådanne gramnegative bakterier som Pseudomonas ssp. og Escherichia coli under forudsætning af at det exogent tilførtes glukoseoxydase og glukose. Det ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede system er også virksomt mod grampositive bakterier, se omstående.

I en afhandling af Klebanoff et al, "The Peroxidase-Thiocyanate-Hydrogen Peroxide Antimicrobial System" i Biochim.Biophys. Acta 117, 63-72, 1966, er det beskrevet at peroxydase (laktoperoxydase og myeloperoxydase), tiocyanat og H_2O_2 er komponenter i et antimikrobielt system som er effektivt mod et antal organismer. H_2O_2 kan dannes endogent (antagelig ved mikroorganismers stofskifte), kan tilsættes eller kan udvikles ved tilsætning af forskellige systemer der genererer hydrogenperoxyd, fx oxydation af askorbinsyre, oxydation af glukose med glukoseoxydase og oxydation af hypoxantin med xantinoxydase.

Der er gennemført to forsøg til påvisning af at det ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede system har bedre virkning end det fra Klebanoff et al. kendte.

30

Forsøg A

Medium: En 10% opløsning af skummetmælkspulver indeholdende 0,5 mM SCN^- tilsættes som natriumtiocyanat og 2 $\mu g/ml$ laktoperoxydase.

35

Teststamme: Escherichia coli NCTC 9703.

Antibakteriel Test: Skummetælksopløsningen inkuberedes på et vandbad ved 37°C og der tilsattes 0,5 mM H₂O₂ eller
 5 magnesiumperoxyd. Flasker der kun indeholdt mediet inkuberedes som kontrol. 15 minutter efter tilsætningen af peroxydet syrnedes testopløsningerne ved tilsætning af 0,5M HCl til pH 5,0 for at simulere virkningen af mavesyre. Efter
 10 yderligere 15 minutter blev der udtaget prøver på 10 ml og de podedes med Escherichia coli NCTC 9703 og inkuberedes yderligere ved 37°C. Antallet af overlevende bakterier bestemtes umiddelbart efter podningen og efter 2 timers inkubering.

15 Resultat:

	Tilsætning	Overlevende bakterier, cfu/ml	
		0 time	2 timer
20	Ingen, kontrol	$8,8 \times 10^5$	$8,8 \times 10^6$
	0,5 mM H ₂ O ₂	$8,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$
	0,5 mM MgO ₂	$8,8 \times 10^5$	$3,5 \times 10^2$

25 Det fremgår af resultatet at antallet af bakterier var tidoblet i kontrolprøven mens det var steget med 59% i prøven med tilsætning af H₂O₂. I den prøve til hvilken der var sat MgO₂ var antallet af bakterier derimod gået ned til mindre end halvt tusinde.

30 Klebanoff et al. diskuterer som nævnt ovenfor også tilsætning af et H₂O₂-genererende system som fx et system bestående af glukose og glukoseoxydase.

Forsøg_B

35 Der er gennemført forsøg for at sammenligne et sådant system med et system i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse.

Medium: Et halvsyntetisk medium bestående af 1,0 g
 NH_4Cl , 1,0 g K_2HPO_4 , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg
 CaCl_2 , 3,0 g gærekstrakt (Difco) og 1000 ml vand, tillige
indeholdende 0,25 mM SCN^- tilsat som natriumtiocyanat,
5 0,5% glukose og 2 µg/ml laktoperoxydase.

Teststamme: Escherichia coli NCTC 9703.

Antibakteriel test: Forsøget blev gennemført i et anaerobt
10 telt. Mediet podedes med teststammen og der tilsattes en
vandig opløsning af natriumperkarbonat i en mængde svaren-
de til 0,25 mM H_2O_2 , karbamidperoxyd i en mængde svarende
til 0,25 mM H_2O_2 eller 0,1 U/ml glukoseoxydase til forskel-
lige prøver. Umiddelbart efter podningen og efter 2 timers
15 inkubering ved 37°C blev der udtaget prøver og antallet
af overlevende bakterier bestemtes.

Resultater:

20	Tilsætning	Overlevende bakterier, cfu/ml	
		0 time	2 timer
	Ingen, kontrol	$1,4 \times 10^6$	$2,5 \times 10^7$
	0,1 U/ml glukoseoxydase	$1,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$
25	0,25 mM H_2O_2 som natriumperkarbonat	$1,4 \times 10^6$	$<3,5 \times 10^1$
	Ingen, kontrol	$1,5 \times 10^6$	$2,7 \times 10^7$
	0,1 U/ml glukoseoxydase	$1,5 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$
30	0,25 mM H_2O_2 som karbamidperoxyd	$1,5 \times 10^6$	$5,2 \times 10^1$

B. Uafhængige forsøg

4 reagensglas indeholdende 10 ml valle med et indhold på 21 ppm (0,25 mM) NaSCN inkuberedes ved 30°C efter at vollen var blevet podet med *Pseudomonas fluorescens* EF 1998. Det ene reagensglas var en kontrolprøve. Natriumperkarbonat svarende til henholdsvis 0,1, 0,2 og 0,3 mM H₂O₂ sættes til de respektive tre andre reagensglas. Mængden af bakterier bestemtes ved podning og efter 2 timers inkubering. Laktoperoxydase er til stede i en mængde på 5 µg/ml. Resultatet fremgår af tabel 1:

T a b e l 1

15	Na-perkarbonat svarende til mM H ₂ O ₂	Antal bakterier/ml	
		0 timer	2 timer
20	Kontrol (0,0 mM/	2,1x10 ⁶	2,1x10 ⁶
	0,1 mM	2,1x10 ⁶	1,8x10 ⁵
	0,2 mM	2,1x10 ⁶	2,8x10 ³
	0,3 mM	2,1x10 ⁶	2,6x10 ³

Det fremgår tydeligt af tabel 1 at der opnås en markant forbedring af den antibakterielle virkning når der er 0,2 mM H₂O₂ eller mere til stede. Men allerede tilsætning af 0,1 mM H₂O₂ giver en markant baktericid virkning.

Pseudomonas fluorescens EF 1998 inkuberedes ved 30°C i to reagensglas 1) og 2), idet reagensglas 1) indeholdt 1 g kommerciel mælkeerstatning bestående af 15% ultrafiltreret vallepulver, 57% vallepulver, 8% fedt, 16% animalsk protein og 4% vitaminer og mineraler i 10 ml vand, idet prøven indeholdt 50 µg laktoperoxydase og idet der tilsættes 27,5 ppm natriumperkarbonat og hvor reagensglas 2) indeholdt samme mængde erstatning (50 µg laktoperoxydase) og idet der til reagensglas 2) sættes 21 ppm natriumtiocyanat og 27,5 ppm natriumperkarbonat.

Mængden af bakterier i de forskellige reagensglas er vist i tabel 2 nedenfor, hvor resultaterne efter 0, 2, 4 og 6 timers forløb er angivet.

5

T a b e l 2

Prøve	0	2	4	6 timer
10 reagensglas 1	$4,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$
reagensglas 2	$4,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$	$5,3 \times 10^4$	$5,6 \times 10^3$

15 Det fremgår af tabellen at bakteriemængden i reagensglas 2) efter 6 timers forløb kun er 1/1000 af mængden i reagensglas 1) på samme tidspunkt, idet der i reagensglas 1) ikke eller kun i ringe grad er foregået vækst mens bakterier på den anden side er døde i betydeligt omfang

20 i reagensglas 2).

Virkningen af det antibakterielle system bestemtes in vitro. Herved inkuberedes forskellige Escherichia coli-stammer ved $+37^{\circ}\text{C}$ i en vandig opløsning af 5 g vallepulver/100 ml, 21 ppm NaSCN og natriumperkarbonat svarende

25 til 0,25 mM H_2O_2 . Antallet af dræbte celler af Escherichia coli efter 2 timer er vist i tabel 3.

30

35

T a b e l 3

	Escherichia coli	stamme	% dræbt
5			
	0-139	299/66	>99,98
	0-149	853/67	>99,98
	0-138	355/67	>99,95
10	0-8	915/66	>99,99
	0-147	949/66	>99,99
	0-141	220/65	>99,99

15

Flere af de ovenfor afprøvede stammer af *Escherichia coli* er resistente mod antibiotika. Resultaterne viser således at systemet er meget anvendeligt. Den høje anvendelighedsgrad hænger også sammen med at systemet virker mod grampositive bakterier.

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et farmaceutisk præparat med antibakteriel virkning, k e n d e t e g -
n e t ved at man til en i og for sig kendt farmaceutisk
5 bærer sætter et antibakterielt system indeholdende lakto-
peroxydase i en mængde på mindst 1 mg/kg produkt, tio-
cyanat i en mængde på mindst 15 ppm udtrykt som natrium-
tiocyanat, og en fast, vandopløselig peroxyddonor ud-
valgt i en mængde på mindst 21 ppm udtrykt som natrium-
10 perkarbonat og udvalgt blandt alkalimetalkarbonater,
jordalkalimetalkarbonater og karbamidperoxyd.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved at den faste, vandopløselige peroxyddonor er
natriumkarbonat.
- 15 3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g -
n e t ved at natriumkarbonat i kornform overtrækkes
med et i tarmkanalen opløseligt beskyttelseslag.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g -
n e t ved at beskyttelseslaget er af celluloseacetat-
20 ftalat.

25

30

35