



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101995900473718
Data Deposito	25/10/1995
Data Pubblicazione	25/04/1997

Priorità	333.702
Nazione Priorità	US
Data Deposito Priorità	

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

COMPOSIZIONE DI INTERFERONE

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale

a nome: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

di nazionalità: svizzera

con sede in: BASILEA (Svizzera)

La presente invenzione riguarda formulazioni non-parenterali perfezionate per la somministrazione di interferone.

Gli interferoni sono proteine specie-specifiche che si trovano in natura prodotte da diverse cellule con effetto di induzione provocato da virus, da RNA a doppio filamento, da altri polinucleotidi, antigeni e mitogeni. Gli interferoni presentano attività biologiche multiple per esempio funzioni antivirali, anti-proliferative, di immunomodulazione e funzioni anti-cellulari. Almeno tre differenti tipi di interferoni umani sono stati identificati e caratterizzati in termini della loro attività antivirale, anticrescita e di attivazione di attività di cellule killer naturali. Essi vengono prodotti da leucociti, linfociti e fibroblasti e vengono classificati, rispettivamente, come interferone α , interferore γ e interferone β . Sono anche note numerosissime varianti dei tre tipi di interferoni umani. Questi int.feroni "nativi" possono venire prodotti in una coltura di cellule e pos-

sono venire isolati e purificati mediante metodi tradizionali, per esempio come descritto nel brevetto U.S. N° 4.503.035. Proteine oppure polipeptidi che presentano una attività biologica paragonabile a quella di un interferone nativo possono venire prodotti anche mediante una tecnologia ricombinante, possono venire isolati e purificati adottando una tecnologia tradizionale, per esempio come descritto nei brevetti U.S. Ni. 4.816.566 e 4.810.645. Per gli scopi di questa invenzione, il termine "Interferone" si riferisce a interferone nativo, proteine e polipeptidi che presentano una attività biologica paragonabile a quella di un interferone nativo e si riferisce anche a interferoni coniugati con un polimero (interferone pegilato). Per gli scopi di questa invenzione i più preferiti sono l'interferone α , in particolare l'interferone α -2a.

Normalmente, l'interferone viene scarsamente assorbito attraverso il tessuto muscolare nel flusso sanguigno e, pertanto, ha un valore limitato oppure non ha alcun valore pratico quando viene somministrato attraverso una via diversa dalla via parenterale. La biodisponibilità dell'interferone nei presenti sistemi per una somministrazione non-parenterale, in particolare per via orale, in generale è 0% oppure è

prossima a 0%.

La somministrazione di questo farmaco difficile da assorbire, in generale, viene effettuata mediante iniezioni endovenose oppure iniezioni intramuscolari.

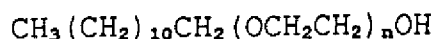
Le composizioni secondo la presente invenzione fanno aumentare l'entità di assorbimento dell'interferone attraverso il tessuto delle mucose per esempio la membrana gastrointestinale e la membrana rettale e nel flusso sanguigno e, così, favoriscono la biodisponibilità dell'interferone che, altrimenti, in generale non viene assorbito attraverso il tessuto delle mucose, facendo così aumentare l'efficacia terapeutica dell'interferone. Soltanto la combinazione del tutto particolare del sistema di esaltazione dell'assorbimento porta ad ottenere i migliori risultati.

La presente invenzione riguarda una composizione farmaceutica costituita da:

- a) una quantità terapeuticamente efficace di interferone;
- b) una quantità che fa aumentare l'assorbimento di un sistema di esaltazione dell'assorbimento che comprende:

(1) da circa 1% a circa 20% in peso, riferito al sistema che fa aumentare l'assorbimento, di un compo-

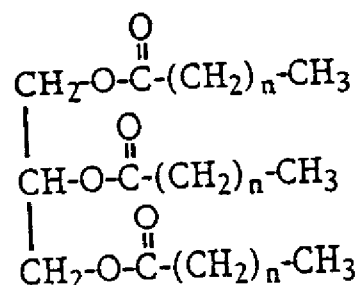
sto avente la formula:



in cui n ha un valore medio di 12;

(2) da circa 1% fino a circa 20% in peso del sistema che fa aumentare l'assorbimento di un sale farmaceuticamente accettabile di almeno uno degli acidi caprilico oppure caprinico, e

c) da circa 0% fino a circa 90% in peso di un composto avente la formula



in cui n è 6 oppure 8.

Il primo componente del sistema che fa aumentare l'assorbimento (componente (b)(1)), è il prodotto di una reazione di eterificazione tra un lauril-alcanolo e il poliossietilen glicole.

Laureth-12, avente la denominazione CTFA di PEG (12) lauril etere, è reperibile in commercio ed è noto anche come MACOL® LA-12, fabbricato dalla Mazer Chemicals Company, Gurnee, Illinois; Alkasurf® LAN-12, fabbricato dalla Alkaril; Carsonon® L-12, fabbricato dalla Lonza; e Ethosperse® LA-12, fabbricato

dalla Glyco.

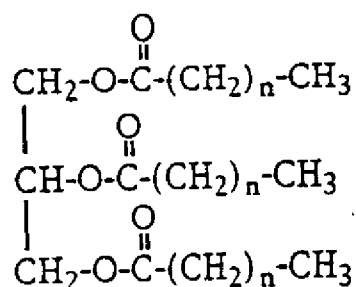
Il polietilen glicol presente nel Laureth-12 è, tipicamente, un prodotto avente un peso molecolare da medio a elevato, che, preferibilmente, ha un peso molecolare medio numerico di 600.

Il secondo componente del sistema che fa aumentare l'assorbimento dell'interferone (componente (b)(2)) è uno o più dei sali dell'acido caprilico, $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH})$ e dell'acido caprinico $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{COOH})$.

Secondo questa invenzione, i sali farmaceuticamente accettabili dell'acido caprinico o dell'acido caprilico oppure dell'acido caprinico e dell'acido caprilico, oppure di loro miscele possono venire usati e vengono presi in considerazione dall'invenzione. I sali possono venire preparati in modo tradizionale e adottando tecniche note facendo reagire l'acido con una base contenente un catione non-tossico, farmacologicamente e farmaceuticamente accettabile. In generale, è adatta qualsiasi base che formi un sale con l'acido carbossilico e le cui proprietà farmacologiche non provochino alcun effetto fisiologico negativo quando detta base viene ingerita o somministrata in qualche altro modo a un animale a sangue caldo. Tra tali basi sono compresi, per esempio, idrossidi oppure carbonati di metalli alcalini e di metalli alcali-

no-terrosi, come idrossido di sodio, idrossido di potassio, idrossido di calcio, carbonato di potassio e simili. Particolarmente preferiti per questa invenzione sono i sali di sodio, principalmente a causa della loro facile reperibilità, e i sali di potassio. Il caprilato di sodio è il più preferito.

Inoltre, si preferisce che la formulazione dell'invenzione contenga un trigliceride C₈-C₁₀ avente la formula:



in cui n è 6 oppure 8.

Questo trigliceride viene prodotto dalla Huls America sotto il marchio di fabbrica Miglyol[®]-812 e dalla Stephan Company sotto il marchio di fabbrica Neobee[®] M5.

La composizione farmaceutica di questa invenzione può venire resa disponibile praticamente in qualsiasi forma di dosaggio adatta per una somministrazione non-parenterale, preferibilmente per una somministrazione orale oppure rettale. Per esempio, le composizioni farmaceutiche possono venire somministrate per

via orale tramite un dispositivo di erogazione del farmaco fluido-imbibente. Tra i sistemi di somministrazione orale adatti per questa invenzione sono compresi quelli descritti nei brevetti U.S. Ni. 5.198.229 e 5.223.265.

Le composizioni farmaceutiche possono anche venire somministrate per via rettale sotto forma di "microenemi" tradizionali usando dispositivi per la somministrazione rettale per esempio una siringa oppure altri dispositivi noti nel settore. Esempi di microenemi sono descritti in Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 30^a edizione, (The Pharmaceutical Press, Londra, 1993) (vedi descrizioni di diverse composizioni per Microlax, Microlet e Relaxit rispettivamente alle pagine 1696, 1697 e 1797). Le composizioni farmaceutiche possono anche venire somministrate per via rettale sotto forma di una supposta che può venire preparata secondo procedimenti tradizionali.

Le composizioni farmaceutiche dell'invenzione possono essere un'emulsione oppure possono essere miscibili in acqua oppure possono essere una soluzione acquosa.

Nel caso di un'emulsione, la composizione farmaceutica può contenere inoltre un emulsionante. Tra

gli adatti emulsionanti sono compresi emulsionanti tradizionali che favoriscono la formazione dell'emulsione e che fanno ampliare l'intervallo di temperatura, di concentrazione, ecc., nel quale l'emulsione rimane dispersa e, in generale, fanno aumentare la stabilità dell'emulsione. Un esempio di un emulsionante preferito è il monogliceride dell'acido stearico prodotto dalla Henkel Corporation sotto il marchio di fabbrica di Monumul® 90-25.

Nel caso di una composizione che sia miscibile in acqua, la composizione farmaceutica può anche contenere almeno una sostanza-veicolo idrofila che è in grado di sciogliere le sostanze solubili in acqua. Esempi sono PEG 400 e glicerina.

Oltre ai componenti basici indicati sopra, le composizioni farmaceutiche possono contenere anche inibitori delle proteasi. Le proteasi sono enzimi che catalizzano la scissione di legami peptidici interni in una proteina. Un esempio di inibitori della proteasi è l'aprotinina.

Le composizioni farmaceutiche possono anche contenere agenti chelanti. Un esempio di un agente chelante è l'acido etilendiammino-tetraacetico (EDTA) e suoi sali.

Inoltre, le composizioni farmaceutiche possono

anche contenere albumina di siero umano, un preparato sterile di albumina di siero ottenuto sottoponendo a frazionamento sangue prelevato da persone donatori sani, l'albumina proteica essendo presente in quantità non inferiore al 96% del suo volume totale.

Quando viene somministrata sotto forma di una supposta, la composizione farmaceutica può contenere un'adatta base per supposte. Tra le basi di supposte adatte è compresa qualsiasi base per supposte di tipo tradizionale per esempio quelle descritte in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a edizione, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA 1990. Tra gli esempi di adatte basi per supposte sono compresi, senza alcuna limitazione, i seguenti: burro di cacao; gliceridi di acidi grassi per esempio olio vegetale, ivi compresi olio di semi di noci di cocco oppure di semi di palma che viene modificato mediante esterificazione, idrogenazione e frazionamento; gelatina trattata con glicerina; polietilenglicol; tensioattivo non-ionico per esempio un estere di un acido grasso del poliossietilensorbitano; e poliossietilenstearato. Favorite al massimo grado sono miscele di monogliceridi, di digliceridi e di trigliceridi di acidi grassi saturi naturali C₁₂₋₁₈ aventi un numero pari di atomi di carbonio. Particolarmente adatte e

preferite sono le basi di Huls America aventi il marchio di fabbrica Witespol®.

Le proporzioni relative dei componenti della composizione della presente invenzione possono venire fatte variare per ottenere un assorbimento ottimale a seconda dell'interferone scelto, a seconda del modo di somministrazione della formulazione dell'invenzione e a seconda della tollerabilità dei pazienti nei confronti di un'irritazione. Nel caso di interferone a-2a, la composizione in peso della composizione può essere la seguente:

a) circa 1×10^6 UI/ml fino a circa 2×10^8 UI/ml di interferone, preferibilmente circa 2×10^7 UI/ml fino a circa 1×10^8 UI/ml, nel modo più preferibile circa 5×10^7 UI/ml;

b) (1) circa 1% fino a circa 20% di Laureth-12, preferibilmente circa 3% fino a circa 15%, e nel modo più preferibile tra circa 6% e circa 12%;

(2) circa 1% fino a circa 20% del sale dell'acido caprilico/caprinico, preferibilmente circa 3% fino a 15%, e nel modo più preferibile circa 5% fino a circa 10%.

La composizione farmaceutica può contenere inoltre circa 0% fino a circa 90% di Miglyol-812, preferibilmente 20% fino a circa 60%, e nel modo più pre-

feribile circa 50%.

In una forma di realizzazione preferita, il sale dell'acido caprilico/caprinico è caprilato di sodio, che è presente nella formulazione di cui sopra nella percentuale in peso indicata sopra.

Le composizioni della presente invenzione sono in forme di dosaggio costituite da emulsioni oppure soluzioni liquide. La formulazione può venire introdotta in un sistema di somministrazione orale oppure rettale come quelli descritti sopra nel caso di metodi tradizionali.

Preferibilmente, la composizione farmaceutica della presente invenzione è sotto forma di una "dose unitaria". Il termine "dose unitaria" viene qui usato nel senso tradizionale per indicare una singola applicazione oppure una singola somministrazione del farmaco al soggetto che deve venire trattato, in una quantità come indicato di seguito. Si deve intendere che la quantità può venire somministrata in una dose unitaria o in una capsula unitaria oppure, in alternativa, in multipli di due o più di tali dosi unitarie, la quantità totale arrivando fino alla quantità di farmaco stabilita per un determinato periodo di tempo.

Esempi

Per valutare l'assorbimento di interferone da

parte della membrana gastrointestinale e della membrana rettale, si sono effettuate prove in vivo sulle formulazioni della presente invenzione e anche su una formulazione di confronto. Il procedimento e i risultati sono descritti qui di seguito.

Esempio 1

Prova su colon di ratti in vivo

Preparazione della Formulazione 1

Per preparare la Formulazione 1 che non è della presente invenzione, si è aggiunta una soluzione acquosa di interferone α -2a, avente una concentrazione di circa $14,2 \times 10^8$ UI/ml, tamponata a circa pH 5 (soluzione di interferone) ad acqua contenente albumina di siero umano.

Per preparare le Formulazioni 2 e 3 secondo la presente invenzione, si è aggiunta una soluzione di caprilato di sodio in acqua (fase acquosa) ad una miscela di Laureth-12, eventualmente con Monomul® 90-25 e con Miglyol® 812 (fase oleosa) a 60-65°C sotto sbattimento, e quindi effettuando un'agitazione vorticoso. In un secondo tubo da saggio, si è preparata una miscela contenente una soluzione di interferone, albumina di siero umano, aprotinina e EDTA. Alla miscela del secondo tubo da saggio si è aggiunta l'emulsione della fase oleosa e della

fase acquosa a circa 35-40°C e si è sottoposta la miscela ottenuta ad agitazione vorticoso.

Le formulazioni sono riportate nella Tabella 1 che segue:

Tabella 1

Ingredienti	Formulazione 1 non della presente invenzione	Formulazione 2 della presente invenzione	Formulazione 3 della presente invenzione
Soluzione di interferone*	0,357 ml	0,357 ml	0,357 ml
Acqua	4,6 ml	1,9 ml	1,0 ml
Miglyol® 812	----	1,4 g	2,3 g
Laureth-12	----	0,6 g	0,6 g
Caprilato di sodio	----	0,5 g	0,5 g
Albumina di siero umano**	0,04 ml	0,04 ml	0,04 ml
EDTA	----	1,75 mg	1,75 mg
Aprotinina***	----	0,2 ml	0,2 ml

* La soluzione di interferone è $14,2 \times 10^8$ UI/ml di interferone α -2a

** soluzione al 25% p/v di albumina di siero umano

*** di una soluzione-madre di 50.000 KUI/ml.

Mentre si è usato interferone α -2a nelle composizioni di cui sopra, si deve intendere che si possono impiegare altri interferoni in quantità opportune nell'ambito delle conoscenze di coloro che sono

esperti nel settore in queste composizioni e in altre composizioni qui descritte.

Somministrazione della Formulazione 1 di controllo e delle Formulazioni 1 e 2 dell'invenzione

Ratti femmine adulti Sprague-Dawley aventi un peso di circa 300-400 grammi ciascuno sono stati mantenuti a digiuno per 24 ore e sono stati anestetizzati con ketamina-HCl e con silazina ad una dose di 80 mg/kg e rispettivamente, di 10 mg/kg. Con ciascun ratto, si è effettuata una incisione di circa 3 cm verticalmente attraverso la linea mediana addominale per esporre la parete del colon. La Formulazione 1 di controllo e le Formulazioni 2 e 3 dell'invenzione sono state somministrate ad un dosaggio di 20 MU mediante iniezione usando una siringa nella parete del colon ascendente ad una distanza di 1-2 cm dall'intestino cieco.

Somministrazione della Formulazione 1 per via sottocutanea

Allo scopo di determinare una relativa biodisponibilità, si è somministrata una dose della Formulazione 1 di 3-20 mU per via sottocutanea (s.c.) mediante iniezione con una siringa sotto forma di un bolo in una sacca che viene creata ripiegando la pelle in corrispondenza dell'area del collo dorsale di

ratti anestetizzati. La fig. 1 mostra i dati per l'area situata al disotto della curva della Formulazione 1 somministrata s.c. come funzione della dose.

Determinazione della concentrazione di interferone nel plasma

Si è determinata la concentrazione di interferone nel plasma in corrispondenza di diversi intervalli di tempo dopo la somministrazione di interferone tramite la Formulazione 1 e tramite le Formulazioni 2 e 3 dell'invenzione. Si sono raccolti campioni di sangue da 0,6 ml adottando la tecnica del plesso orbitale prima della somministrazione dell'interferone e in corrispondenza di 0,25, 0,50, 1, 2, 4 e 5 ore dopo la somministrazione, e quindi si è effettuata la centrifugazione per separare il siero, dopo di che il plasma è stato asportato ed è stato congelato fino al momento della sua analisi. Dopo avere prelevato ciascun campione di sangue, tranne che prima della somministrazione dell'interferone e in corrispondenza di 15 minuti dopo la somministrazione, si sono iniettati 0,5 ml di soluzione salina normale (0,9%) per via intraperitoneale.

Prova su campioni di plasma

Si sono esaminati livelli di interferone nel plasma usando un "kit" per un immunosaggio enzimatico

(EIA) della Roche Diagnostic Systems, Basilea, Svizzera.

Il procedimento di prova era il seguente:

Soluzione standard: Si è introdotto un ml di acqua distillata in una fiala contenente 2500 UI di interferone liofilizzato α -2a. Si è sottoposta a sbattimento la fiala, blandamente, rovesciandola per circa due volte.

Standard per la curva di taratura: Si sono etichettati tubi da saggio EIA come 200 UI, 100 UI, 50 UI, 25 UI e 12,5 UI per ml. Nel primo tubo da saggio (etichettato a 200 UI/ml), si sono introdotti 920 ml di albumina di siero umano (HSA) e nei rimanenti tubi da saggio si sono introdotti, in ciascuno, 500 ml di albumina di siero umano. Nel primo tubo da saggio si sono aggiunti 80 ml dello standard di soluzione-madre e si è effettuata una blanda miscelazione. Da questo tubo da saggio, si sono trasferiti 500 ml di soluzione nel secondo tubo da saggio (etichettato 100 UI/ml) e si è effettuata una blanda miscelazione. Questo procedimento di successive diluizioni è stato ripetuto per ciascuno dei rimanenti tubi da saggio e si sono ottenute concentrazioni di 200 UI, 100 UI, 50 UI, 25 UI e 12,5 UI/ml.

Disposizione sperimentale per standard e per campioni: Si sono trasferiti cento microlitri di

standard ed i campioni in doppio, nei tubi da saggio EIA destinati alla prova. Nei tubi da saggio da 0 UI/ml, si sono aggiunti 100 ml di tampone HSA. Ai tubi da saggio EIA contenenti gli standard in tampone HSA, si sono aggiunti 100 ml di siero che non contiene interferone, mentre nei tubi da saggio EIA contenenti campioni nel siero, si sono introdotti 100 ml di tampone HSA.

In tutti questi tubi da saggio si sono aggiunti 500 ml di soluzione di perossidasi anti-interferone proveniente dal kit per analisi di interferone e si è effettuata una blanda miscelazione. In ciascun tubo da saggio si è introdotta una perlina (rivestita con anticorpo anti-interferone monoclonale). Tutti i portaprovette sono stati ricoperti con un foglio di alluminio e sono stati lasciati a sé per 18-24 ore al buio a temperatura ambiente per effettuare l'incubazione.

Dopo un periodo di incubazione, le perline presenti in tubi di EIA sono state lavate con acqua usando un apparecchio COBAS Washer. Dopo lavaggio, si sono aggiunti 250 ml di un substrato di sviluppo del colore e si è lasciato sotto incubazione per 30 minuti. Immediatamente dopo il periodo di 30 minuti, si è introdotto in ciascun tubo da saggio 1 ml di un rea-

gente di bloccaggio, si è effettuata la miscelazione e si è misurata la densità ottica del colore sviluppato a 492 nm usando un fotometro COBAS EIA. Dalla densità ottica, si è calcolata la quantità di interferone presente nel campione sulla base dell'inclinazione della curva standard.

Esami ed analisi di dati

Si è riportato in grafico il livello del plasma in funzione del tempo per la Formulazione 1 e per le Formulazioni 2 e 3 dell'invenzione, come indicato nelle Figure 2 e 3. Usando un sistema computerizzato, si è determinata l'area che si trova al disotto della curva ("AUC") per la Formulazione 1 e per le Formulazioni 2 e 3 dell'invenzione.

La figura 1 mostra i dati ottenuti dopo la somministrazione s.c. di differenti dosi usando la Formulazione 1.

Si è quindi calcolata la biodisponibilità nei modi seguenti:

$$\text{Biodisponibilità relativa \%} = \frac{\text{AUC 0-5 ore (Formulazioni 1/2/3)}}{\text{AUC 0-5 ore (Formulazione 1 (s.c.))}} \times 100.$$

I risultati sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2

<u>Biodisponibilità media relativa %</u>	<u>Composizione</u>
0	Formulazione di controllo 1
18,3	Formulazione dell'invenzione 2
22,6	Formulazione dell'invenzione 3

I dati indicano che le Formulazioni 2 e 3 dell'invenzione, quando vengono somministrate non per via parenterale, sono superiori alla Formulazione 1 non della presente invenzione, quando viene somministrata per via non-parenterale, in termini di biodisponibilità relativa.

Esempio 2

Somministrazione dell'emulsione per via rettale in ratti in vivo

Preparazione delle Formulazioni

Si è preparata la Formulazione 1 non della presente invenzione come descritto nell'Esempio 1.

Per preparare le Formulazioni 4 e 5 dell'invenzione, si è aggiunta una soluzione di caprilato di sodio in acqua (soluzione acquosa) ad una miscela di Laureth-12, con Monomul® 90-25, in Miglyol® 812 (fase oleosa) a 60-65°C sotto sbattimento effettuando quindi un'agitazione vorticoso. In un secondo tubo da saggio, si è preparata una miscela contenente una soluzione-madre di interferone, albumina di siero uma-

no, soluzione di aprotinina e EDTA. Alla miscela del secondo tubo da saggio si è aggiunta l'emulsione della fase oleosa e . della fase acquosa a circa 35-40°C e si è sottoposta la miscela ottenuta ad agitazione vorticoso.

La Formulazione 1 non dell'invenzione e le Formulazioni 4 e 5 dell'invenzione sono indicate nella Tabella 3 che segue:

Tabella 3

Ingredienti	Formulazione 1 non dell'invenzione	Formulazione 4 dell'invenzione	Formulazione 5 dell'invenzione
Soluzione di interferone*	0,357 ml	0,357 ml	0,357 ml
Acqua	4,6 ml	1,75 ml	1,75 ml
Miglyol® 812	----	2,5 g	2,5 g
Laureth-12	----	0,3 g	0,2 g
Monomul® 90-25	----	0,15 g	0,2 g
Caprilato di sodio	----	0,25 g	0,2 g
Albumina di siero umano**	0,04 ml	0,04 ml	0,04 ml
EDTA	----	1,75 mg	1,75 mg
Aprotinina***	----	0,2 ml	0,2 ml

* La soluzione di interferone è $14,2 \times 10^8$ UI/ml di interferone α -2a

** soluzione al 25% p/v di albumina di siero umano

*** di una soluzione-madre di 50.000 KUI/ml.

Somministrazione della Formulazione 1 per via sottocutanea

Come descritto nell'Esempio 1.

Somministrazione di una Formulazione 1 di controllo non dell'invenzione e delle Formulazioni 4 e 5 dell'invenzione

Ratti femmine adulti Sprague-Dawley aventi un peso di circa 300-400 grammi ciascuno, sono stati mantenuti a digiuno per 24 ore e sono stati anestetizzati con ketamina-HCl e con xilazina ad una dose di 80 mg/kg e, rispettivamente, di 10 mg/kg. Si è somministrato interferone ad una dose di 3 MU iniettando la Formulazione 1 di controllo non dell'invenzione e le Formulazioni 4 e 5 dell'invenzione usando un dispositivo per una somministrazione per via rettale estemporanea in corrispondenza di 2-3 cm nel retto.

Determinazione della concentrazione di interferone nel plasma

Si è determinata la concentrazione di interferone nel plasma, ivi compresi procedimenti di analisi, come descritto nell'Esempio 1.

Esame e analisi dei dati

La figura 4 mostra un diagramma del livello plasmatico come funzione del tempo per la Formulazione 1

di controllo non dell'invenzione e per le Formulazioni 4 e 5 dell'invenzione. Si è calcolata la biodisponibilità relativa come descritto nell'Esempio 1.

I risultati sono riportati nella Tabella 4.

Tabella 4

<u>Biodisponibilità media relativa %</u>	<u>Composizione</u>
0	Formulazione 1 di controllo non dell'invenzione
19,5	Formulazione 4 dell'invenzione
21	Formulazione 5 dell'invenzione

I dati indicano che le Formulazioni 4 e 5 dell'invenzione, quando vengono somministrate non per via parenterale, sono superiori alla Formulazione di controllo 1 quando viene somministrata non per via parenterale in termini di biodisponibilità relativa.

Esempio 3

Somministrazione per via rettale di un'emulsione in conigli in vivo

Preparazione della Formulazione 1 e della Formulazione 4 dell'invenzione

Si è preparata la Formulazione 1 non dell'invenzione come descritto nell'Esempio 1.

Si è preparata la Formulazione 4 dell'invenzione come descritto nell'Esempio 2.

La Formulazione 1 non dell'invenzione e la For-

mulazione 4 dell'invenzione sono riportate nella Tabella 5 che segue:

Tabella 5

<u>Ingredienti</u>	<u>Formulazione 1</u>	<u>Formulazione 4</u>
Soluzione di interferone*	0,357 ml	0,357 ml
Acqua	4,6 ml	1,75 ml
Miglyol® 812	----	2,5 g
Laureth-12	----	0,3 g
Monomul® 90-25	----	0,15 g
Caprilato di sodio	----	0,25 g
Albumina di siero umano**	0,04 ml	0,04 ml
EDTA	----	1,75 mg
Aprotinina***	----	0,2 ml

* La soluzione di interferone è $14,2 \times 10^8$ UI/ml di interferone α -2a

** soluzione al 25% p/v di albumina di siero umano

*** di una soluzione-madre di 50.000 KUI/ml.

Somministrazione di una Formulazione 1 di controllo non dell'invenzione e della Formulazione 4 dell'invenzione

Conigli bianchi della Nuova Zelanda sono stati tenuti a digiuno per 24 ore e sono stati anestetizzati con chetamina-HCl e con xilazina con una dose di 35 mg/kg e, rispettivamente di 10 mg/kg. Per la For-

mulazione 4 dell'invenzione, si è somministrato interferone ad una dose di 20 MU usando un dispositivo rettale estemporaneo 2-3 cm all'interno del retto.

Somministrazione della Formulazione 1 per via sottocutanea

Come descritto nell'Esempio 1, tranne che la dose di interferone era 10 mU.

Determinazione della concentrazione di interferone nel plasma

Si sono prelevati campioni di sangue dall'arteria centrale auricolare in corrispondenza di predeterminati intervalli di tempo. La concentrazione di interferone nel plasma, ivi compresi i procedimenti di prova, è stata determinata come descritto nell'Esempio 1.

Analisi e dati dell'analisi

La fig. 5 indica il livello del plasma come funzione del tempo nel caso della Formulazione 1 non dell'invenzione, somministrata per via sottocutanea nella fig. 5. La fig. 6 mostra il livello plasmatico come funzione del tempo per la Formulazione 4 dell'invenzione, somministrata per via rettale. Mediante l'impiego di un sistema computerizzato, si è determinata l'area situata al disotto della curva ("AUC") per la Formulazione 1 somministrata per via sottocu-

tanea ("s.c.") e per la Formulazione 4 somministrata non per via parenterale. Quindi, si è calcolata nel modo che segue la biodisponibilità relativa della Formulazione 1 di controllo non dell'invenzione e della Formulazione 4 dell'invenzione:

$$\text{Biodisponibilità relativa \%} = \frac{\text{AUC 0-5 ore (Formulazioni 1/4)}}{\text{AUC 0-5 ore (Formulazione 1 (s.c.))}} \times 100.$$

I risultati sono riportati nella Tabella 6 che segue

Tabella 6

<u>Biodisponibilità media relativa %</u>	<u>Composizione</u>
0	Formulazione 1 di controllo non dell'invenzione
10	Formulazione 4 dell'invenzione

I dati indicano che la Formulazione 4 dell'invenzione, quando viene somministrata non per via parenterale, è superiore alla Formulazione di controllo 1 non dell'invenzione, quando viene somministrata non per via parenterale, in termini di biodisponibilità relativa.

Esempio 4

Prova su colon di ratti in vivo con composizione non acquosa

Preparazione delle Formulazioni

Si è preparata la Formulazione 1 non della pre-

sente invenzione come descritto nell'Esempio 1.

Per preparare la Formulazione 6 dell'invenzione, si è aggiunto Laureth-12 a Miglyol® 812 e si è riscaldato a 35°C fino a 40°C. Si è sciolto caprilato di sodio riscaldando in una miscela di acido caprilico e di labrasol, un gliceride C⁸-C¹⁰ poliglicolisato saturo. Si sono aggiunte aprotinina e soluzione di interferone alla soluzione di cui sopra a temperatura ambiente e quindi si è effettuata l'aggiunta di una soluzione di Miglyol® 812 e di Laureth 12 sotto agitazione.

Per preparare la Formulazione 7, si è sciolto caprilato di sodio in una miscela di acido caprilico e di Miglyol® 812 ad una temperatura di 50-60°C. In una seconda fiala, si sono fatti fondere l'agente emulsionante lecitina e Laureth 12 e si è effettuata la miscelazione seguita da aggiunta di soluzioni di interferone e di aprotinina a circa 30°C. Alla seconda fiala, sotto agitazione, si è aggiunta la miscela di sodio caprilato, acido caprilico e di Miglyol® 812.

La Formulazione 1 non dell'invenzione e le Formulazioni 6 e 7 dell'invenzione sono riportate nella Tabella 7 che segue:

Tabella 7

Ingredienti	Formulazione 1 non dell'invenzione	Formulazione 6 dell'invenzione	Formulazione 7 dell'invenzione
Soluzione di interferone*	0,357 ml	0,357 ml	0,178 ml
Acqua	4,6 ml	----	----
Acido caprilico	----	1,0 g	1,1 g
Miglyol® 812	----	1,9 g	2,3 g
Laureth-12	----	0,6 g	0,6 g
Caprilato di sodio	----	0,5 g	0,5 g
Labrasol	---	0,5 g	---
Albumina di siero umano**	0,04 ml	----	0,04 ml
Lecitina	----	----	0,25 g
Aprotinina***	----	0,1 ml	0,1 ml

* La soluzione di interferone è $14,2 \times 10^8$ UI/ml di interferone α -2a

** soluzione al 25% p/v di albumina di siero umano

*** di una soluzione-madre di 50.000 KUI/ml.

Somministrazione della Formulazione 1 per via sottocutanea

Come descritto nell'Esempio 1.

Somministrazione della Formulazione 1 di controllo non dell'invenzione e delle Formulazioni 6 e 7 dell'invenzione

Come descritto nell'Esempio 1.

Determinazione della concentrazione di interferone nel plasma

Si è determinata la concentrazione di interfero-

ne nel plasma, ivi compresi i procedimenti di analisi, come descritto nell'Esempio 1.

Prova e analisi dei dati

La fig. 7 mostra un diagramma di livello plasmatico come funzione del tempo per la Formulazione 6 dell'invenzione. La fig. 8 mostra un diagramma del livello di plasma come funzione del tempo per la Formulazione 7 dell'invenzione. Si è calcolata la biodisponibilità relativa come nell'Esempio 1.

I risultati sono indicati nella Tabella 8.

Tabella 8

<u>Biodisponibilità media relativa %</u>	<u>Composizione</u>
0	Formulazione 1 di controllo non dell'invenzione
9,2	Formulazione 6 dell'invenzione
4,9	Formulazione 7 dell'invenzione

I dati indicano che le Formulazioni 6 e 7 dell'invenzione, quando vengono somministrate non per via parenterale, sono superiori alla Formulazione 1 quando essa viene somministrata non per via parenterale in termini di biodisponibilità relativa.

Esempio 5

Prova su colon di ratto in vivo con soluzione acquosa

Preparazione della Formulazioni

Si è preparata la Formulazione 1 non dell'inven-

zione come descritto nell'Esempio 1.

Per preparare la Formulazione 8 dell'invenzione, si sono riscaldati PEG 400, glicerina, Laureth 12 e caprilato di sodio fino a che il caprilato di sodio è stato completamente sciolto (60-70°C). Si sono aggiunte soluzione di interferone, soluzione di albumina di siero umano e soluzione di aprotinina dopo raffreddamento della soluzione di cui sopra a temperatura ambiente. La soluzione così ottenuta è stata sottoposta ad agitazione vorticosa.

Per preparare la Formulazione 9 dell'invenzione, si sono sciolti Laureth 12 e caprilato di sodio in acqua riscaldando a 40°C. Dopo raffreddamento della miscela di cui sopra a temperatura ambiente, si sono aggiunte ad essa e si sono mescolate la soluzione di interferone, la soluzione di aprotinina, la soluzione di albumina di siero umano e EDTA.

La Formulazione 1 di controllo non dell'invenzione e le Formulazioni 8 e 9 dell'invenzione sono riportate nella Tabella 9 che segue:

Tabella 9

Ingredienti	Formulazione 1 non dell'invenzione	Formulazione 8 dell'invenzione	Formulazione 9 dell'invenzione
Soluzione di interferone*	0,357 ml	0,357 ml	0,357 ml
Acqua	4,6 ml	----	3,303 ml
Laureth-12	----	0,60 g	0,60 g
Sodio caprilato	----	0,50 g	0,50 g
Acido caprilico	----	1,0 g	----
PEG 400	----	2,5 g	----
Glicerina	----	0,9 g	----
Albumina di siero umano**	0,04 ml	0,04 ml	0,04 ml
EDTA	----	1,75 mg	2,33 mg
Aprotinina***	----	0,1 ml	0,1 ml

* La soluzione di interferone è $14,2 \times 10^8$ UI/ml di interferone α -2a

** soluzione al 25% p/v di albumina di siero umano

*** di una soluzione-madre di 50.000 KUI/ml.

Somministrazione della Formulazione 1 per via sottocutanea

Come descritto nell'Esempio 1.

Somministrazione della Formulazione 1 di controllo e delle Formulazioni 8 e 9 dell'invenzione

Come descritto nell'Esempio 1.

Determinazione della concentrazione di interferone

nel plasma

Si è determinata la concentrazione di interferone nel plasma, ivi compresi i procedimenti di analisi, come descritto nell'Esempio 1.

Prova e analisi dei dati

La fig. 9 mostra un diagramma di livello del plasma come funzione del tempo per la Formulazione 8 dell'invenzione. La fig. 10 mostra un diagramma di livello plasmatico come funzione del tempo per la Formulazione 9 dell'invenzione. La biodisponibilità è stata calcolata come nell'Esempio 1.

I risultati sono indicati nella Tabella 10.

Tabella 10

<u>Biodisponibilità media relativa %</u>	<u>Composizione</u>
0	Formulazione 1 di controllo non dell'invenzione
4,1	Formulazione 8 dell'invenzione
6,	Formulazione 9 dell'invenzione

I dati indicano che le Formulazioni 8 e 9 dell'invenzione; quando vengono somministrate non per via parenterale, sono superiori alla Formulazione 1 di controllo quando esso viene somministrata non per via parenterale, in termini di biodisponibilità relativa.

Esempio 6

Viene riportata qui di seguito un'adatta formulazione di supposte secondo questa invenzione. Mentre si usa l'interferone a-2a, ossia l'interferone preferito per questa invenzione, per illustrare queste formulazioni, si deve intendere che si possono impiegare, al suo posto, altri tipi di interferone, in opportune quantità.

Forma di dosaggio della supposta

Soluzione-madre di interferone	0,02	ml
Witepsol H15	1000	mg
Laureth 12	90	mg
Sodio caprilato	60	mg
Miglyol® 812	280	mg

Si può preparare la forma di dosaggio di cui sopra nel modo seguente:

Riscaldare la base a circa 40-45°C. Aggiungere Laureth 12, sodio caprilato e Miglyol® 812 e mescolare per ottenere una miscela uniforme. Raffreddare la miscela a 35°C, aggiungere la soluzione di interferone e mescolare bene. Versare la miscela in stampi per supposte e raffreddare per far indurire la massa ottenendo le supposte.

L'efficacia delle composizioni ottenute mediante la presente invenzione viene ulteriormente dimostrata per mezzo delle figure 1-10.

La fig. 1 mostra un diagramma dell'area al di sotto della curva come funzione della dose per la somministrazione sottocutanea in ratti della Formulazione 1.

La fig. 2 mostra un diagramma di livelli di interferone nel plasma di ratto come funzione del tempo per la somministrazione nel colon della Formulazione di controllo e della Formulazione 2 dell'invenzione.

La fig. 3 mostra un diagramma di livelli di interferone nel plasma di ratto come funzione del tempo per la somministrazione nel colon della Formulazione 3 dell'invenzione.

La fig. 4 mostra un diagramma di livelli di interferone nel plasma di ratto come funzione del tempo per la somministrazione rettale della Formulazione di controllo e delle Formulazioni 4 e 5 dell'invenzione.

La fig. 5 mostra un diagramma di livelli di interferone nel plasma di coniglio come funzione del tempo per la somministrazione sottocutanea della Formulazione 1.

La fig. 6 mostra un diagramma di livelli di interferone in plasma di coniglio come funzione del tempo per una somministrazione rettale della Formulazione 4 dell'invenzione.

La fig. 7 mostra un diagramma di livelli di in-

terferone nel plasma di ratto come funzione del tempo per la somministrazione nel colon della Formulazione 6 dell'invenzione.

La fig. 8 mostra un diagramma di livelli di interferone nel plasma di ratto come funzione del tempo per la somministrazione nel colon della Formulazione 7 dell'invenzione.

La fig. 9 mostra un diagramma di livelli di interferone nel plasma di ratto come funzione del tempo per la somministrazione nel colon della Formulazione 8 dell'invenzione.

La fig. 10 mostra un diagramma di livelli di interferone nel plasma di ratto come funzione del tempo per la somministrazione nel colon della Formulazione 9 dell'invenzione.

Ing. Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.

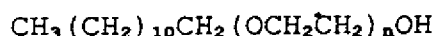
RIVENDICAZIONI

1. Una composizione farmaceutica costituita da:

a) una quantità terapeuticamente efficace di interferone; e

b) una quantità che fa aumentare l'assorbimento di un sistema che esalta l'assorbimento che contiene:

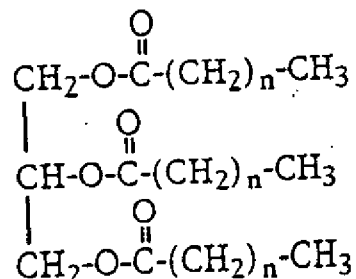
(1) da circa 1% a circa 20% in peso di un composto di formula:



in cui n ha un valore medio di 12;

(2) da circa 1% fino a circa 20% in peso di un sale farmaceuticamente accettabile di almeno uno di acido caprilico oppure di acido caprinico, e

c) da circa 0% fino a circa 90% in peso di un composto avente la formula



in cui n è 6 oppure 8.

2. La composizione farmaceutica della rivendicazione 1, nella quale la composizione farmaceutica contiene interferone in una quantità compresa tra circa 1×10^6 UI/ml e circa 2×10^8 UI/ml.

3. La composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1 oppure 2, nella quale il componente (b) (2) è un sale con un metallo alcalino dell'acido caprilico.

4. La composizione farmaceutica della rivendicazione 3, nella quale il componente (b) (2) è sodio caprilato.

5. La composizione farmaceutica di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, nella quale l'interferone è interferone α -2a.

6. Una composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, che contiene:

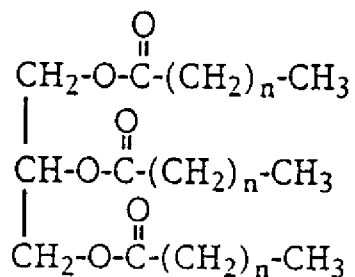
a) da circa 1×10^6 UI/ml fino a circa 2×10^8 UI/ml di interferone- α -2a;

b) una quantità che fa aumentare l'adsorbimento di un sistema che esalta l'assorbimento che contiene

(1) da circa 1% fino a circa 20% di polietilenglicol-12 lauril etere;

(2) da circa 1% fino a circa 20% in peso di sodio caprilato; e

c) da circa 0% fino a circa 90% in peso di un composto avente la formula:

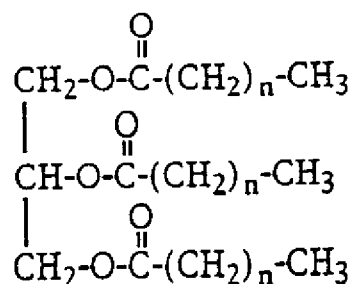


in cui n è 6 oppure 8.

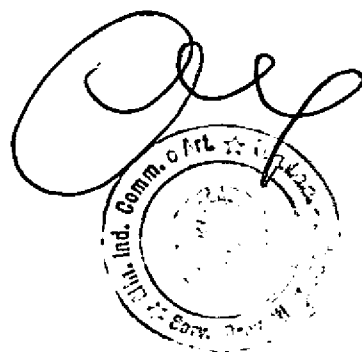
7. La composizione farmaceutica della rivendicazione 6, che contiene da circa 6% fino a circa 12% in peso di polietilen glicol-12 lauril etere.

8. La composizione farmaceutica della rivendicazione 6, che contiene da circa 3% fino a circa 10% in peso di sodio caprilato.

9. La composizione farmaceutica della rivendicazione 6, che contiene circa 50% in peso del composto avente la formula:



in cui n è 6 oppure 8.



Ing. Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.

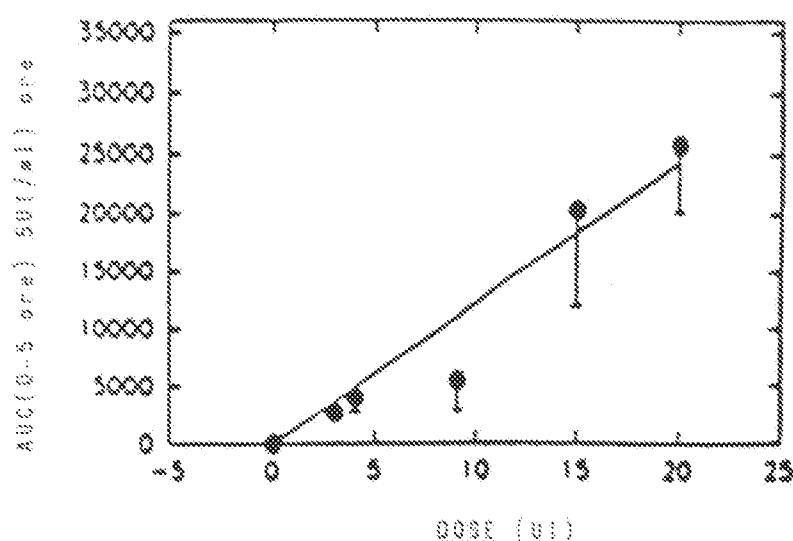
I MANDATARI:
(firma)

829/C/vr

(per sé e per gli altri)

Fig.1

MI 95 A 2202



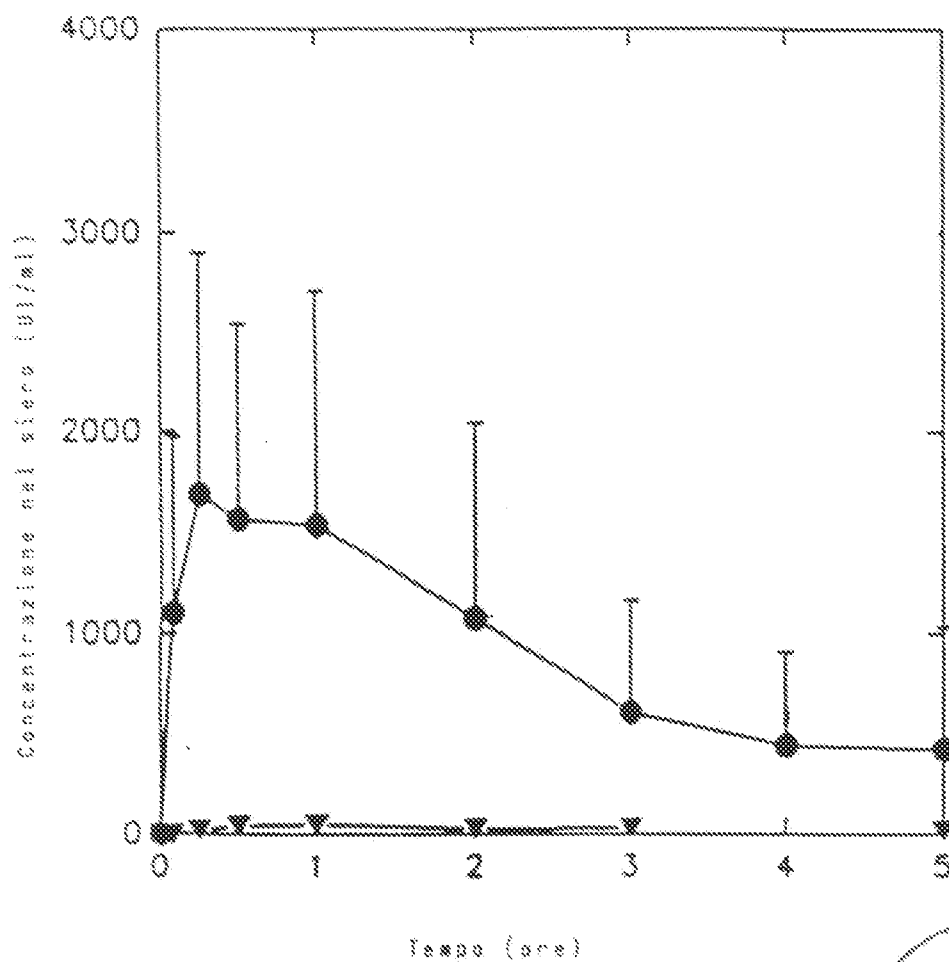
I MONITORARI:
(firma)

De Gennaro

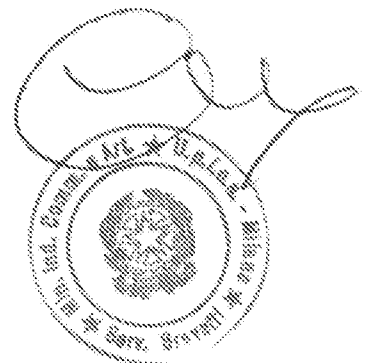
(per sé e per gli altri)

MI 95 A 2202

Fig. 2



- * Formulazione di controllo
- * Formulazione dell'invenzione



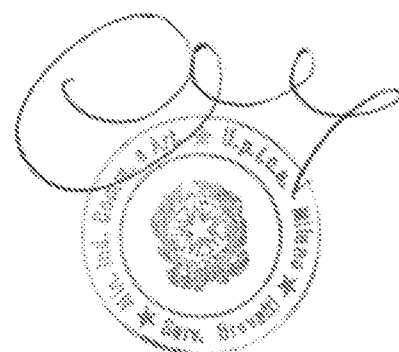
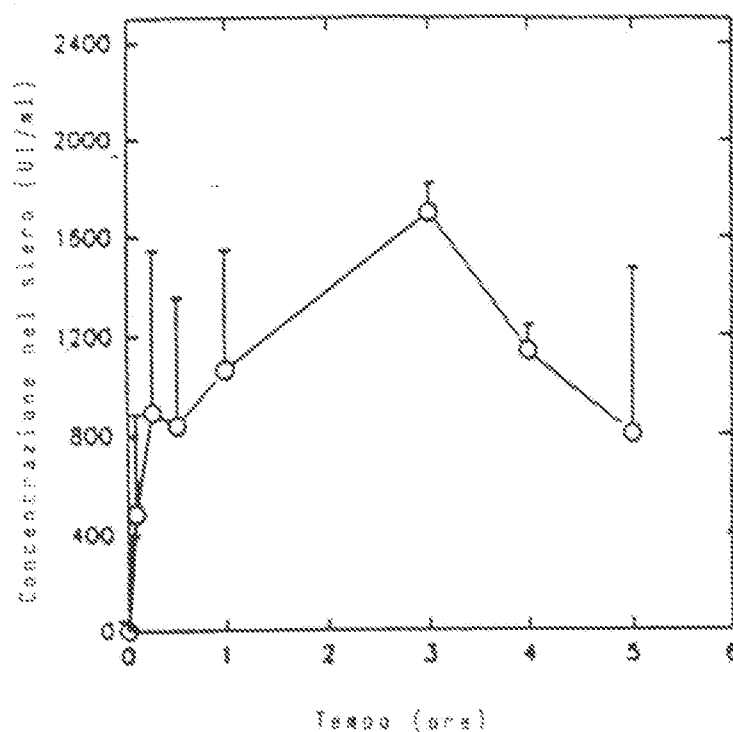
I RAPPRESENTANTI
(firma)

De Fazio

(con la e per gli altri)

MI 95 A 2202

Fig.3



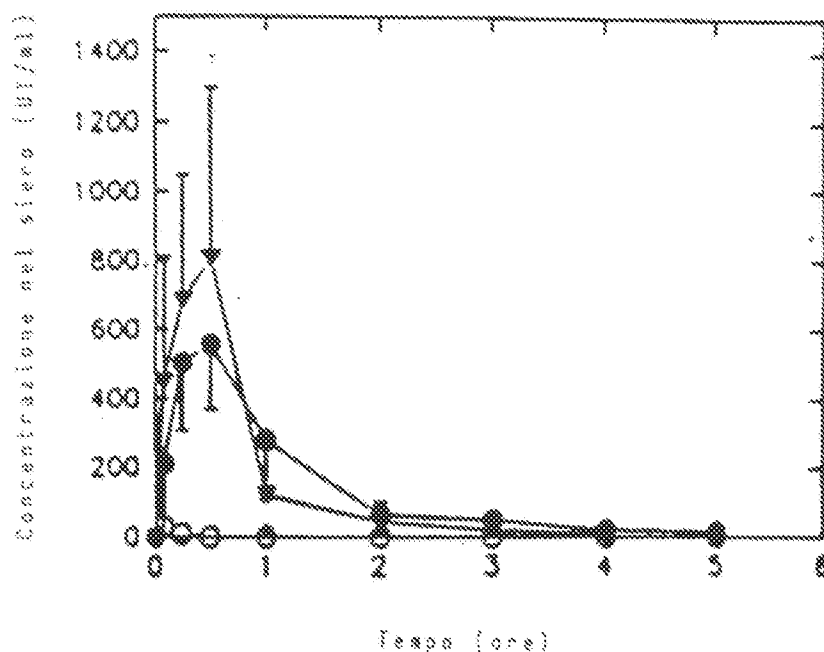
I MANDATARI:

(firma)

Alde Figo
(per sé e per gli altri)

MI 95 A 2202

Fig.4



- Formulazione dell'invenzione 4
- Formulazione di controllo
- ▼ Formulazione dell'invenzione 5

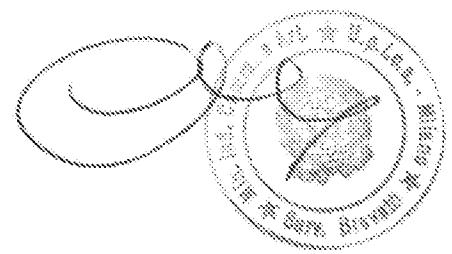
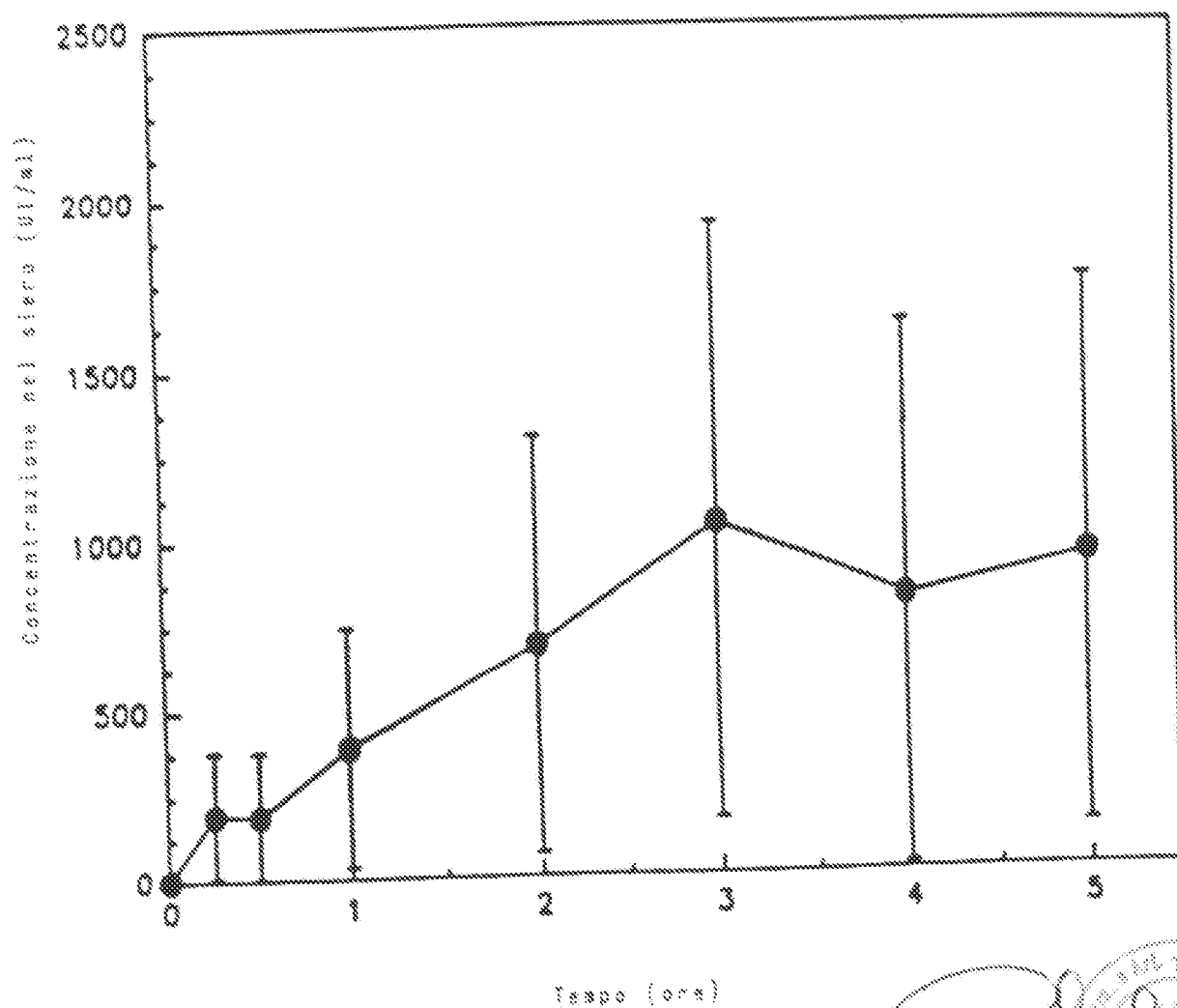


1. MANDATAGGI:

(firma)

(per sé e per gli altri)

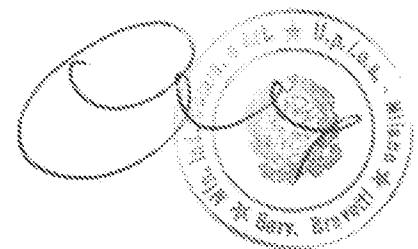
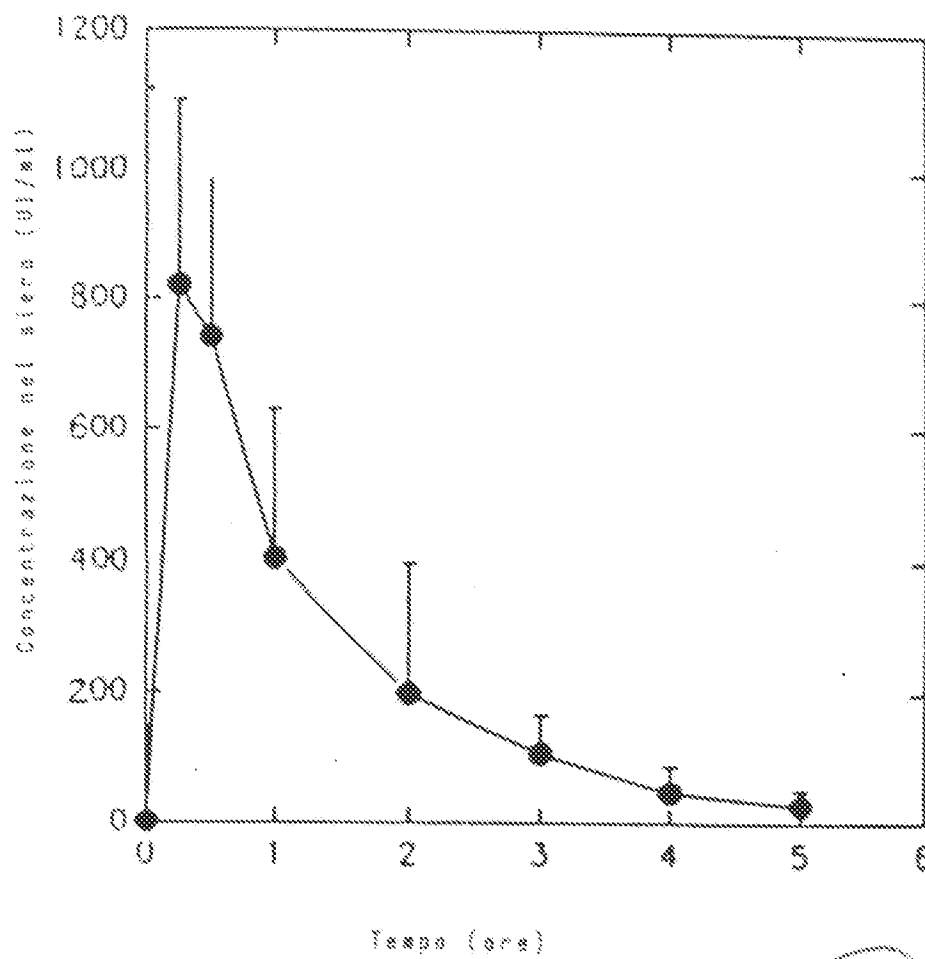
Fig.5



I MANDATARI:
(firma)

Stefano
(per sé e per gli altri)

Fig.6



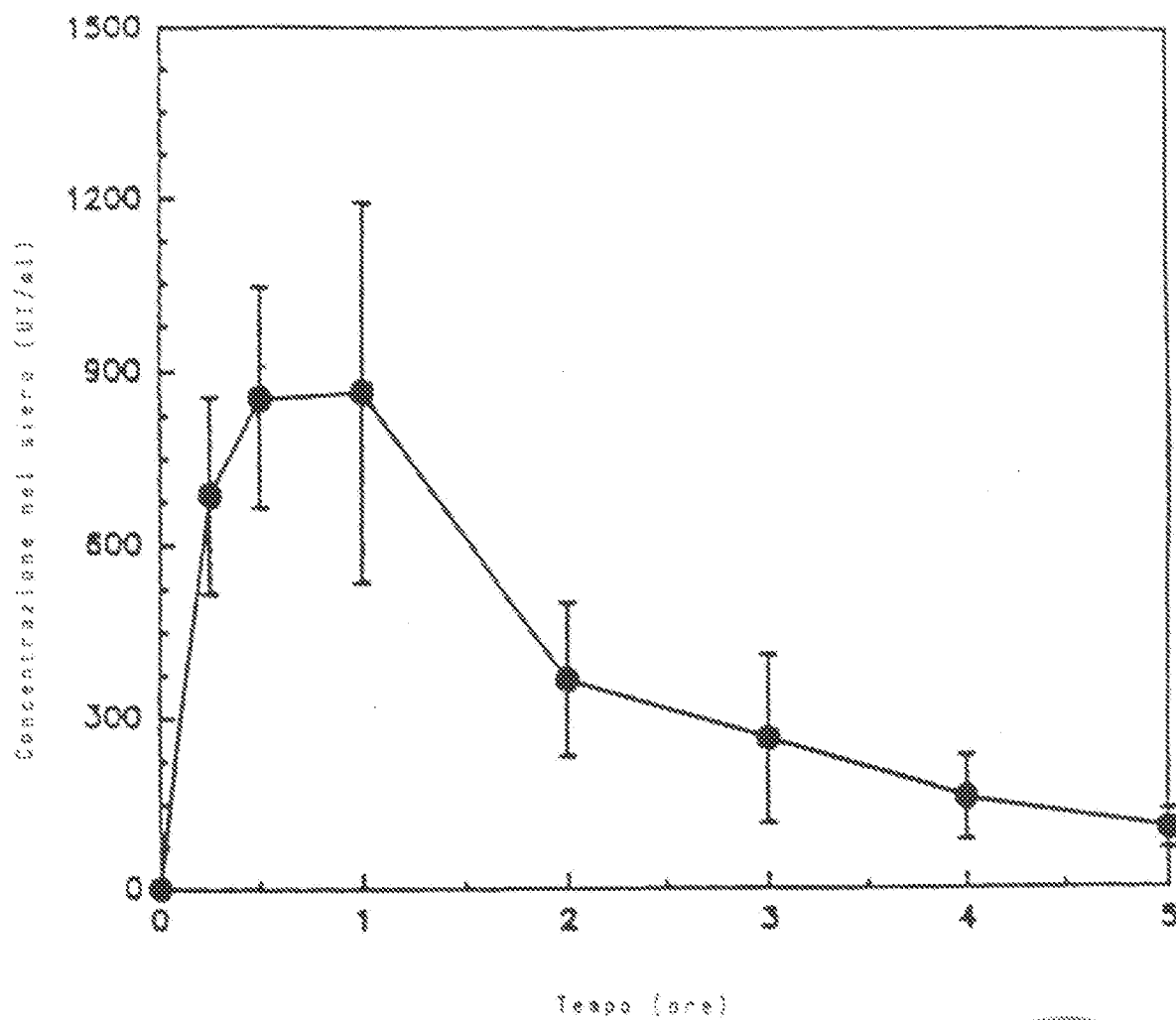
I RACCOMANDATI:
(firma)

De Fazio

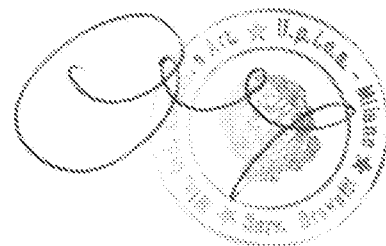
(per sé e per gli altri)

MI 95 A 2202

Fig.7



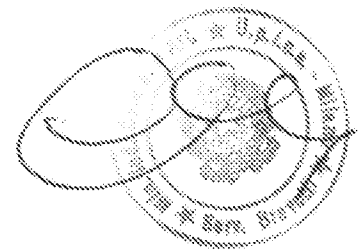
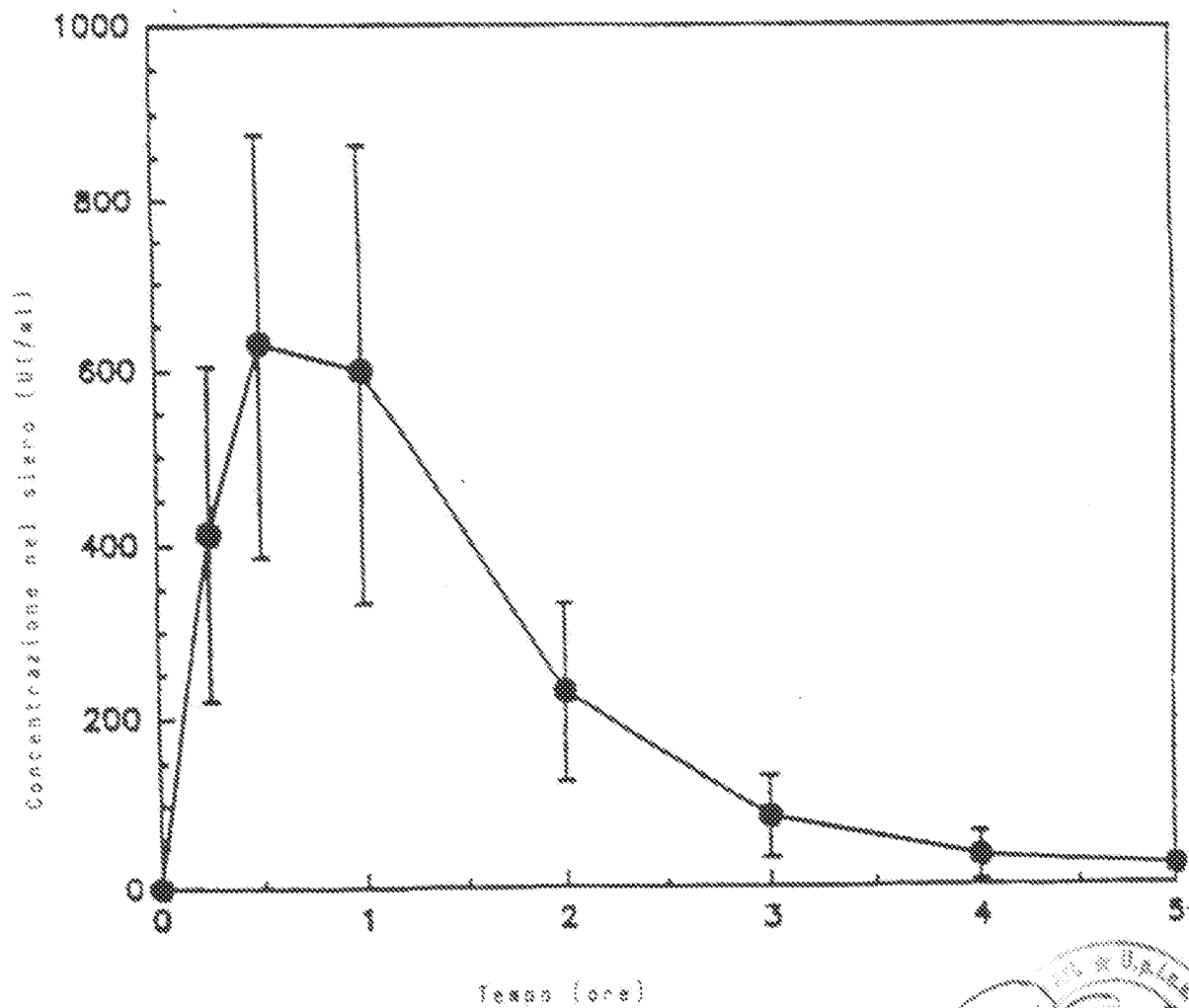
I. BENVENUTI
(Urna)



(Per la e per gli altri)

MI 95 A 2202

Fig.8



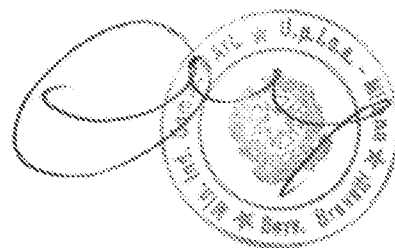
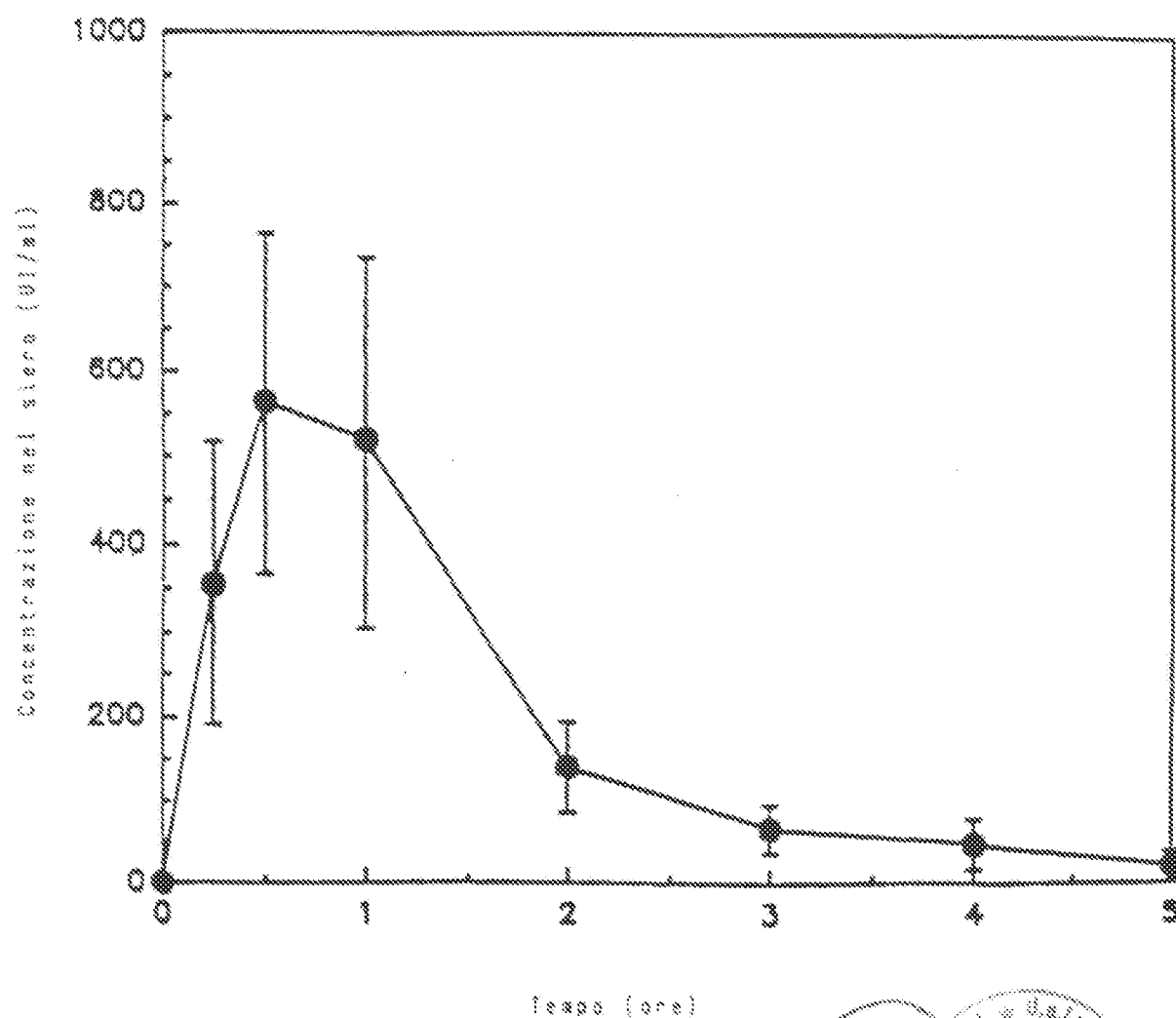
I MANDATARI:

(firma)

De Fegat

(per sé e per gli altri)

Fig.9

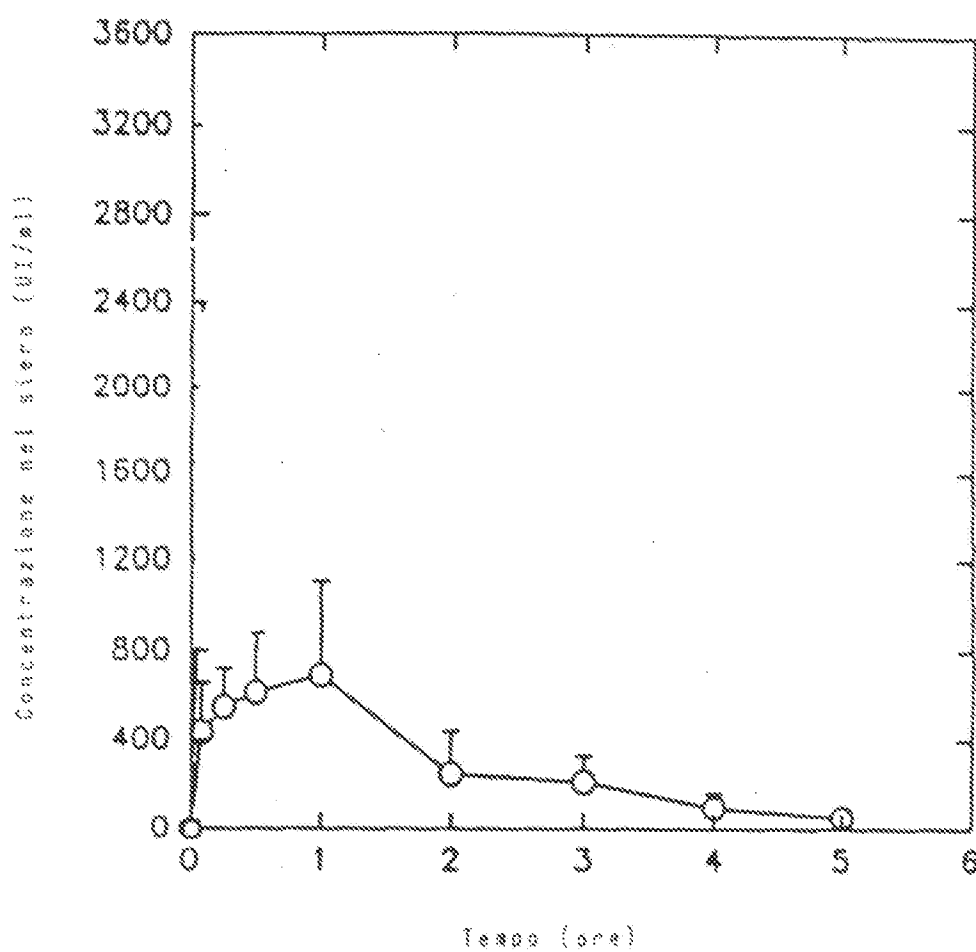


(MANGIARINI)
(firma)

De Siga

(con sig. e per gli atti)

Fig.10



(MANDATARI)

(firma)

(per sé e per gli altri)

