



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

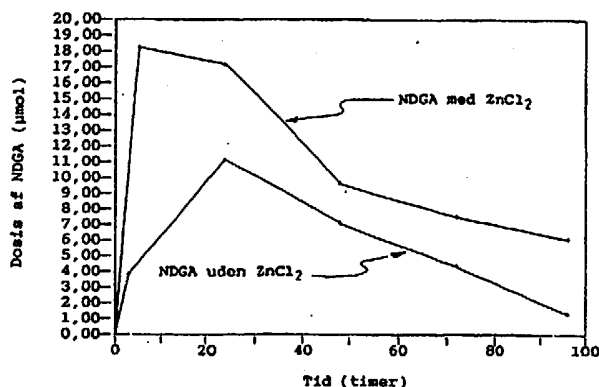
- (51) Int.Cl.: A 61 K 33/30 A 61 P 39/04
(21) Patentansøgning nr: PA 1986 06349
(22) Indleveringsdag: 1986-12-30
(24) Løbedag: 1986-05-02
(41) Alm. tilgængelig: 1987-02-02
(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2000-12-27
(86) International ansøgning nr: PCT/US86/00974
(86) International indleveringsdag: 1986-05-02
(85) Videreførelsesdag: 1986-05-02
(30) Prioritet: 1985-05-03 US 730682
(73) Patenthaver: Access Pharmaceuticals, Inc., 2600 Stemmons Freeway, Suite 210, Dallas, Texas 75207, USA
(72) Opfinder: Larry M. Allen, 450A Josephine Street, Denver, CO 80206, USA
(74) Fuldmægtig: Larsen & Birkeholm A/S, Skandinavisk Patentbureau, Banegårdspladsen 1, 1570 København V, Danmark

(54) Benævnelse: Farmaceutiske bærestoffer til reduktion af transdermal flux

(56) Fremdragne publikationer:
Intet

(57) Sammendrag:

En metode til at indføre en reservoirvirkning i hud og slimhinder for at forøge indtrængningen og tilbageholdelsen og reducere den transdermale flux af lokalt påførte, terapeutisk og kosmetisk farmakologisk aktive stoffer. Opfindelsen vedrører også metoder til lokalbehandling, der omfatter sådanne reservoir-effektforøgere og farmaceutiske formuleringer, der indeholder dem.



OPFINDELSENS OMRÅDE.

5

Opfindelsen angår en farmaceutisk formulering til indførelse af reservoirvirkning i hud og slimhinder for at forøge indtrængningen og opholdstiden for farmakologisk aktive stoffer deri.

10

OPFINDELSENS BAGGRUND.

15

Der er mange lokaliserede sygdomstilstande, der behandles effektivt ved lokal påføring af passende fysiologiske stoffer. For at sådanne behandlinger kan være maksimalt effektive, er det nødvendigt, at så meget som muligt af det farmakologisk aktive stof absorberes af huden, hvor det kan komme i kontakt med sygdomstilstanden i hudvævene uden at gå tabt ved at blive gnedet af på tøjet eller ved fordampning. Samtidig må stoffet ikke trænge så effektivt igennem huden, at det hurtigt tabes til lymfe- eller blodkredsløbet. Denne sidste faktor er navnlig vigtig, når det farmakologisk aktive stof er toksisk, når det bruges systemisk.

20

25

Det ideelle bærestof for lægemidler til lokalt brug er derfor et, der kan give en "reservoirvirkning" i den hud eller de slimhinder, som påføres den lokale behandling. Denne "reservoirvirkning" defineres som en forøgelse af hudens eller slimhindens evne til at absorbere og tilbageholde farmakologisk aktive stoffer, det vil sige, at forøge opholdstiden i huden eller hinden, nedsætte transittiden for lægemidlet og reducere den transdermale flux.

30

Forskellige stoffer vides at forøge farmakologisk aktive stoffers evne til at trænge igennem huden og slimhinder, for eksempel N-bis-azacyclopentan-2-onyl-alkaner, 1-substituerede azacycloheptan-2-oner og højere alkylsubstituerede azacyclopentan-2-oner, så vel som dimethylsulfoxid og lavere alkylsulfoxider. Disse stoffer har imidlertid den ulempe, at de giver en hurtig spredning af de farmakologisk aktive stoffer væk fra det lokaliserede syge sted. Mange medikamenter til lokalt brug, såsom retinoiderne, der bruges i behandlingen af acne, og methotrexat, der

35

bruges i behandlingen af psoriasis, er systemisk toksiske. Retinoiderne for eksempel vides at skade ufødte fostre. Der er således behov for en metode til at forøge evnen hos sådanne medikamenter til at trænge ind i huden eller slimhinderne, således at der kan anvendes en lavere total dosis, samtidig med at den hæmmer deres evne til at trænge fra huden og ind i det indre af kroppen.

Det problem, der udgøres af det paradoksale behov for, at et systemisk toksisk lægemiddel til lokal anvendelse skal absorberes effektivt ind i, men ikke igennem huden, har hidtil været uerkendt. Der har ikke været nogen bærestofadditiver til rådighed for den farmakologiske industri, der bevirker en forøgelse af "reservoirkapaciteten" i huden og slimhinderne således, at mængden af farmakologisk aktive stoffer, der når frem til og fastholdes til det lokaliserede, syge sted maksimeres.

RESUMÉ AF OPFINDELSEN.

Det er derfor formålet med den foreliggende opfindelse at angive en farmaceutisk formulering til at indføre en reservoir-effekt i hud og slimhinder for at forøge indtrængningen og tilbageholdelsen af lokalt påførte farmakologisk aktive terapeutiske og kosmetiske stoffer deri. Det omhandlede formål opnås ved en farmaceutisk formulering, der ifølge opfindelsen er særegen ved, at formuleringen omfatter et farmakologisk aktivt stof udvalgt af gruppen bestående af NDGA (nordihydroguaiaretsyre); VP-16 (epipodophyllotoxin-beta-D-ethyliden glucopyranosidetoposid); VM-26 (epipodo-phyllotoxin-beta-D-thenyliden glucopyranosidteniposid); 4'-demethylepipodophyllotoxin; diethylstilbøstrol; dithranol; cyclophosphamid; mitomycin; daunomycin; cisdiamindichloridplatin; adriamycin og allopurinol samt en effektiv mængde af en vandopløselig, zinkholdig forbindelse.

Additiverne ifølge denne opfindelse er vandopløselige, zinkholdige forbindelser, fortrinsvis zinkhalogenider, zinksulfat, zinknitrat, zinkacetat og/eller zinkstearat, og mest foretrukket zinkchlorid.

Ved at indføre en reservoirvirkning i huden og slimhinderne for at reducere den transdermale flux, så lægemidler absorberes og tilbageholdes deri i større mængder og i længere tidsrum end det hidtil har været muligt, virker de vandopløselige, zinkholdige forbindelser ifølge opfindelsen potentierende på de

farmakologisk aktive stoffer. Potentiering defineres som elimination eller reduktion af uønskede virkninger, såsom systemisk toksicitet og udvidelse af effektivitetsområdet for det farmakologisk aktive stof eller begge dele.

- 5 Effektiviteten af indførelsen af NDGA (nordihydroguaiaretsyre) fremgår af det neden for angivne eksempel 2, medens effektiviteten af de øvrige stoffer fremgår af det efterfølgende eksempel 3 og den tilhørende tabel 3.

BESKRIVELSE AF TEGNINGEN.

- 10 Tegningen er en grafisk afbildning af forsøgsresultater, som viser hudreservoirvirkningen opnået ved fremgangsmåden ifølge denne opfindelse ved at benytte nordihydroguaiaretsyre med zinkchlorid sammenlignet med den samme forbindelse uden zinkchlorid. Nordihydroguaiaretsyren blev mærket med carbon-14 med henblik på radiotraceranalyse. Den grafiske afbildning viser omgående
15 absorption og længere tilbageholdelse af større mængder af nordihydroguaiaretsyren med zinkchlorid tilstede end uden. Tilgængeligheden af nordihydroguaiaretsyre, der er en lipoxygenaseinhibitor, til terapeutisk at virke på lokaliserede sygdomstilstande, både med og uden zinkchlorid tilsat, måles ved
20 arealerne under de respektive kurver. Det fremgår, at hudbiotilgængeligheden er stærkt forøget ved tilstedeværelsen af en zinkholdig forbindelse. Fluxhastigheden for lægemidlet kan beregnes som en funktion af arealet under kurven ved at dividere dette areal med dosis. Som det fremgår er fluxhastigheden for lægemidlet stærkt nedsat over hele dosisintervallet ved tilsætning af zinkchlorid.

- 25 DETALJERET BESKRIVELSE AF OPFINDELSEN.

- 30 De zinkholdige forbindelser ifølge denne opfindelse er i almindelighed et hvilket som helst vandopløseligt, organisk eller uorganisk zinksalt, der dissocierer i det til lokalt brug beregnede bærestof, således at der fremkommer zinkioner til kompleksdannelse eller chelatdannelse med de farmakologisk aktive stoffer, der er tilstede i bærestoffet. Eksempler på velegnede zinkholdige forbindelser er zinkhalo genid, zinksulfat, zinknitrat, zinkacetat og/eller zinkstearat. Den mest foretrukne zinkholdige forbindelse er zinkchlorid.

- 35

Sådanne vandopløselige zinkholdige forbindelser kan fremstilles ved metoder, der er kendt inden for faget, og mange er kommercielt tilgængelige.

5 Præparaterne til lokalt brug med forøgede reservoirdannende egenskaber ifølge denne opfindelse kan fremstilles ved at blande en vandopløselig, zinkholdig forbindelse i det farmaceutiske præparat eller bærestof, hvori en reservoirdannende egenskab ønskes frembragt ved hjælp af midler der er kendt inden for faget for at fremme kompleksdannelse eller chelatdannelse med de farmakologisk aktive stoffer deri med zinkioner. Tilstedeværelsen af andre metalioner, der på u-
10 gunstig måde ville konkurrere med zink om bindingsstederne til kompleksdannelse eller chelatdannelse, bør undgås. Zinksaltet kan også blandes med det phamakologisk aktive stof under dannelse af et chelat eller et kompleks, som derefter blandes i det farmaceutiske bærestof.

15 De zinkholdige forbindelser er fortrinsvis tilstede i et forhold equimolært med de farmakologisk aktive stoffer for at bevirke maksimal kompleksdannelse eller chelatdannelse. Hvor ødelæggelse af stratum corneum, d.v.s. afhoming, ønskes, kan der benyttes et overskud af sådanne zinkholdige forbindelser, der også virker som ætsmidler, for eksempel zinkchlorid. (Almindeligvis vil zinkchlorid-
20 koncentrationer på 35% (0,257 mol pr. 100 g) eller mere forårsage vævsødelæggelse ved lokal anvendelse.) Normalt vil brug af equimolære koncentrationer af zinkchlorid og det farmakologisk aktive stof ikke indebære brugen af ætsende mængder af zinkchlorid, imidlertid bør mindre end 35% zinkchlorid betragtes som en øvre grænse, når ingen ætsvirkning ønskes. Mindre end equimolært forhold af
25 zinkholdig forbindelse i forhold til farmakologisk aktivt stof kan anvendes, når det ikke ønskes, at alt medikamentet skal absorberes i huden eller slimhinderne, for eksempel i forbindelse med mundskylnings- og udskylningspræparater, hvor angreb på fritsvømmende organismer også ønskes.

30 Andre ingredienser kan sættes til præparaterne inklusive farvestoffer, stabilitetsforbedrende stoffer, antioxidanter og lignende. Fortrinsvis konkurrerer disse tilsætningsstoffer ikke med det farmakologisk aktive stof om zinken, når det imidlertid er nødvendigt, kan overskud af zinkholdig forbindelse bruges for at kompensere for den zinkkompleksdannende eller chelerende effekt hos sådanne
35 additiver.

De farmakologisk aktive stoffer ifølge denne opfindelse er sådanne, der er beregnet til lokal påføring for at opnå lokaliseret terapeutisk eller kosmetisk virkning.

5 Mekanismen, hvorved den reservoirdannende virkning ifølge denne opfindelse fremkommer, kendes ikke; imidlertid foretrækkes det, at de farmakologiske stoffer indeholder hydro xy, oxo, sulfydryl, amin, carboxyl eller andre anioniske grupper eller kombinationer deraf i konformationer, som muliggør kompleksdannelse og/eller chelatdannelse med zinkioner.

10

Farmakologisk aktive stoffer ifølge opfindelsen er:

15 De antineoplastiske stoffer NDGA (nordihydroguaiaretsyre), VP-16 (epipodophyllotoxin-beta-D-ethyliden glucopyranosid-etoposid), VM-26 (epipodophyllotoxin-beta-D-thenyliden glucopyranosid-teniposid), 4'-demethylepipodophyllotoxin, diethylstilbøstrol, dithranol, cyclophosphamid, mitomycin, daunomycin, cis-diamin-dichlorplatin, adriamycin, allopurinol, 5-fluoruracil og methotrexat.

20

Dispenseringsformer for lokal anvendelse kan omfatte lotioner, salver, cremer, geler, suppositorier, næsedråber, mundskyllemidler, sprøjtevæsker, aerosoler og lignende. Typiske bærestoffer, der udgør de foregående dispenseringsformer omfatter vand, acetone, isopropylalkohol, stearylalkohol, freoner, ethylalkohol, polyvinylpyrrolidon, propylenglycol, polyethylenglycol, duftstoffer, geldannende stoffer, mineralolie, stearinsyre, spermacet, sorbitan, monoleat, polysorbater, "Tweens", sorbitol, methylcellulose, etc.

25

30 Mængden af formuleringen, og således af det farmakologisk aktive stof, der skal administreres deri, vil naturligvis være en effektiv mængde til opnåelse af det ønskede resultat, der ventes deraf. Dette vil naturligvis blive fastslå et af den praktiserende læge ved hjælp af hans almindelige viden. Efter almindelig god formuleringspraksis anvendes indledningsvis en dosering i den lave ende af det brugbare interval for et bestemt stof, og doseringen forøges, som den iagttagede virkning viser behov for.

Foretrukne formuleringer illustreres i de følgende eksempler:

EKSEMPEL 1

5 ANTINEOPLASTISKE PRÆPARATER

To formuleringer indeholdende zinkchlorid, nordihydroguaiaretsyre (NDGA), syre (EDTA), butylhydroxytolulen (BHT), stearylalkohol, rensed vand, polyethylenglycol med en gennemsnitlig molekylvægt på 400 (PEGO 400), og polyethylenglycol med en gennemsnitlig molekylvægt på 3350 (PEGO 3350) blev fremstillet på følgende måde: det rensede vand blev anbragt i en ren glasbeholder af passende størrelse. Vandet blev opvarmet til omkring 80-90°C under omrøring og zinkchloridet blev sat til det opvarmede vand, idet omrøringen blev fortsat indtil zinkchloridet gik i opløsning. Ethylendiamintetraeddikesyre blev derefter langsomt tilsat under omrøring indtil den var opløst. I en anden glasbeholder af passende størrelse blev polyethylenglycol 400 opvarmet til omkring 80-90°C under omrøring. NDGA blev tilsat, og derefter BHT, og denne blanding blev sat til zinkchlorid-ethylendiamintetraeddikesyreopløsningen under omrøring. Hele blandingen blev så afkølet til omkring stuetemperatur og kørt gennem en valsemølle nummer 3 indtil den var jævn. Polyethylenglycol 3350 blev så opvarmet til omkring 80-90°C i en passende beholder og de møllede ingredienser blev tilsat under blanding. Den endelige sammensætning i vægt/vægt% var som følger:

TABEL 1

25

Sammensætning	Blanding	
	A	B
Zinkchlorid	29,8	10,0
NDGA	4,6	4,6
EDTA	14,7	4,93
BHT	1,1	1,1
Stearylalkohol	0,5	0,5
H ₂ O	18,3	18,3
PEGO 400	26,4	26,4
PEGO 3350	4,5	4,5

EKSEMPEL 2

RESERVOIRVIRKNING

- 5 Denne undersøgelse blev planlagt for at tilvejebringe grundlæggende farmakokinetiske data om, hvad der sker med carbon 14 (^{14}C) mærket nordihydroguaiaretsyre (NDGA), der påføres huden i de modificerede blandinger A og B, der beskrives i eksempel 1. Desuden blev fordelingen af zink målt for den dermalt påførte blanding A.
- 10 ^{14}C -NDGA forbindelsen havde en specifik radioaktivitet på 20,2 Ci/mol (66,9 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) og en renhed på 96,9% ifølge massespektrometri og ved radioautografi af tyndtlagsplader udviklet i benzen:isopropanol:eddikesyre:vand (25:5:2:10).
- 15 Herefter blev 25,1 mg af ^{14}C -NDGA forbindelsen (66,9 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) blandet med 12,35 g af blanding A. Tredobbelte analyser af slutblandingen for ^{14}C ved tælling og for NDGA ved højtryksvæskechromatografi (HPLC) viste homogenitet med et indhold på 51 μg af ^{14}C -NDGA-forbindelse/mg af blanding A. Den specifikke radioaktivitet for NDGA var $3,00 \times 10^3 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.
- 20 Tilsvarende blev 26,3 mg af den originale ^{14}C -NDGA-blanding (66,9 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) blandet med 12,55 g af blanding A uden Zn og EDTA for at få en blanding til undersøgelsen af den dermale indtrængning af NDGA fra blanding A uden Zn og EDTA. Analyser af tredobbelte prøver af den modificerede blanding A viste, at
- 25 slutblandingen var homogen med hensyn til ^{14}C og NDGA. Den indeholdt 53 μg ^{14}C -NDGA-forbindelse/mg bærestof. Den specifikke radioaktivitet af det fortyndede NDGA var $3,41 \times 10^{-3} \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.
- 30 Blandingerne blev anbragt på huden af unge voksne Sprague- Dawley rotter efter følgende protokol: under etheranæsthesi blev rygskindet af rotten forberedt ved at fjerne hårene fra et 5 x 5 cm område med en klippemaskine og de tilbageværende hårstubbe blev fjernet ved hjælp af en depileringsvoks. Huden blev så trukket af gentagne gange (5x) med selvklæbende tape indtil stratum comeum var fjernet. Så blev 0,5 g af formuleringen afvejet på et stykke polypropylenfolie på 5 x 5 cm,
- 35 som blev anbragt på huden. Det blev holdt på plads ved hjælp af hypoallergen tape. Til sidst blev bandagen viklet ind i plaster. Efter behandling blev rotterne sat i

bur hver for sig i metabolismebure, der gav fri adgang til foder og vand og var indrettet til separat opsamling af urin og fæces.

5 Undersøgelsen af blanding A med ^{14}C -NDGA blev udført på 15 Sprague-Dawley han-rotter (middelvægt 339 ± 16 g). De fik i gennemsnit $0,520 (\pm 0,032)$ g af blanding A indeholdende ^{14}C -NDGA. Middeldosis af ^{14}C -NDGA var $78,5 (\pm 7,0)$ mg/kg legemsvægt. Rotterne blev opstaldet individuelt i metabolismebure, der gav fri adgang til foder og vand og var indrettet til separat opsamling af urin og fæces. Grupper á tre rotter blev aflivet efter 4, 24, 48, 72 og 96 timer og ekskreta blev opsamlet fra hver rotte i perioder af 24 timer. I tilgift til den sædvanlige udtagning af vævsprøver, blev huden fra applicationsstedet skåret ud efter aftøring af stedet med vandfugtede renseservietter. Materialet fra aftøringerne blev føjet til bandagerne, som blev neddyppet i en lille beholder med acetone.

15 Undersøgelsen af blanding A uden zink og EDTA blev udført på 15 Sprague-Dawley han-rotter (middelvægt 241 ± 7 g). De fik i gennemsnit $0,390 (\pm 0,019)$ g zinkfri C205 indeholdende ^{14}C -NDGA. Gennemsnitsdosis af ^{14}C -NDGA var $83,2$ mg/kg legemsvægt. Grupper á tre rotter blev aflivet ved forblødning og vævsprøver blev taget 4, 24, 48, 72 og 96 timer efter doseringen. På hvert aflivningstidspunkt blev der også fra de rotter, som det var planlagt at aflive næste gang, taget blodprøver fra sinus orbitalis på en sådan måde, at de ikke døde af det. Bandagerne og renseservietterne fra aftøring af hudområdet på aflivningstidspunktet blev taget fra og lagt i acetone, som beskrevet ovenfor.

25 Resultaterne af undersøgelserne er anført i tabel 2A for blanding A med indhold af ^{14}C -NDGA og tabel 2B for Zn-fri blanding A med indhold af ^{14}C -NDGA. Analyseresultaterne for vævsfordelingen af zink som procent af dosis i rotter dose-ret med blanding A med indhold af ^{14}C -NDGA er anført i tabel 2C.

TABEL 2A

Vævsfordeling af ^{14}C som procent af dosis i rotter doseret dermalt med blanding A med indhold af ^{14}C -NDGA.

5

Væv	Middel (\pm S.D) * procent af dosis af ^{14}C fundet efter (timer)				
	4	24	48	72	96
Organer (%)	4,62 (\pm 2,27)	7,55 (\pm 1,85)	10,29 (\pm 8,8)	10,43 (\pm 6,94)	13,45 (\pm 3,45)
Hudområde (%)	20,8 (\pm 8,4)	19,6 (\pm 5,2)	11,1 (\pm 1,4)	8,58 (\pm 5,41)	7,01 (\pm 2,28)

*N = 3

TABEL 2B

Vævsfordeling af ^{14}C som procent af dosis i rotter doseret dermalt med Zn-fri blanding A med indhold af ^{14}C -NDGA.

10

Væv	Middel (\pm S.D) * procent af dosis af ^{14}C fundet efter (timer)				
	4	24	48	72	96
Organer (%)	10,28 (\pm 6,12)	11,08 (\pm 9,65)	10,47 (\pm 10,33)	5,41 (\pm 4,21)	8,03 (\pm 1,48)
Hudområde (%)	4,15 (\pm 0,76)	12,20 (\pm 5,9)	7,86 (\pm 3,75)	4,72 (\pm 3,18)	1,43 (\pm 0,55)

*N = 3

TABEL 2C

Vævsfordeling af Zn som procent af dosis i rotter doseret dermalt med blanding A.

Væv	Middel (\pm S.D) * procent af dosis af ^{14}C fundet efter (timer)				
	4	24	48	72	96
Organer (%)	3,28	6,54	6,79	11,47	12,69
Hudområde (%)	10,5	11,8	9,58	6,46	4,99

*N = 3

5

Undersøgelsen blev fortsat for at prøve Blanding B med ^{14}C - NDGA, Zn- og EDTA-fri blanding B; og modificeret blanding B uden BHT og 0,10 EDTA. Den følgende tabel 2D viser sammensætningerne af blandingerne og mængderne af stoffer brugt til fremstilling af blandinger indeholdende ^{14}C -NDGA. Disse blandinger blev analyseret for ^{14}C ved scintillationtælling og for NDGA ved væskechromatografi.

10

TABEL 2D

Bestanddel	Sammensætning (%)		
	Blanding B Formulering	Zn-fri Blanding B Formulering	Modificeret Blanding B Formulering
Forbindelse, Zn	10,00	0,00	10,00
Forbindelse, EDTA	4,93	0,00	0,10
Forbindelse, NDGA	4,60	4,60	4,60
Forbindelse, BHT	1,10	1,10	0,00
Vand, rensset	18,32	18,32	19,42
PEG 400	2,60	14,50	14,19
PEG 8000	53,45	49,39	46,69
Stearylalkohol	5,00	12,09	5,00
	100 %	100 %	100 %

Blandinger indeholdende ¹⁴C-NDGA:

Mg ¹⁴ C-NDGA	25,75	25,40	25,20
g Formulering	12,55	12,55	12,75
% NDGA i slutblandingen	4,80	4,79	4,78

5

10

15

Rotternes middelvægt, den gennemsnitlige dosis af formuleringerne og middeldosis af ¹⁴C-NDGA i mg/kg legemsvægt for de tre nærværende protokoller var: 297 ± 15 g (standard afvigelse), 512 ± 28 mg, og 82,7 ± 2,0 mg/kg for blanding B; 325 ± 12 g, 570 ± 26 mg, og 84,0 ± 1,4 mg/kg for Zn-fri blanding B; og 328 ± 27 g, 575 ± 45 mg, og 84,2 ± 2,8 mg/kg for modificeret blanding B. Der blev benyttet 15 rotter til hver undersøgelse og grupper á tre rotter blev aflivet efter 4, 24, 48, 48, 72 og 96 timer efter dosering. Hver gang blev blod, lever, hudområde, tarme med indhold, kroppen og bandager samt renseservietter fra aftørringen isoleret. Fra grupperne, der blev aflivet efter 24, 48, 72 og 96 timer blev urin, fæces og vaskevand fra burene også isoleret.

Resultaterne af undersøgelserne er vist i tabel 2E for blanding B, tabel 2F for Zn-fri blanding B og tabel 2G for modificeret blanding B.

20

TABEL 2E

Vævsfordeling af ^{14}C som procent af dosis i rotter doseret dermalt med blanding B med indhold af ^{14}C -NDGA.

5

Væv	Middel (\pm S.D) * procent af dosis af ^{14}C fundet efter (timer)				
	4	24	48	72	96
Organer (%)	1,92 (\pm 1,34)	4,41 (\pm 1,44)	4,31 (\pm 2,5)	3,38 (\pm 0,52)	1,87 (\pm 1,1)
Hudområde (%)	16,3 (\pm 9,2)	11,9 (\pm 6,1)	8,92 (\pm 4,10)	6,55 (\pm 1,76)	5,11 (\pm 3,01)

*N = 3

TABEL 2F

Vævsfordeling af ^{14}C som procent af dosis i rotter doseret dermalt med Zn-fri blanding B med indhold af ^{14}C -NDGA.

10

Væv	Middel (\pm S.D) * procent af dosis af ^{14}C fundet efter (timer)				
	4	24	48	72	96
Organer (%)	1,16 (\pm 0,92)	2,29 (\pm 2,26)	2,38 (\pm 1,73)	7,39 (\pm 10,05)	7,73 (\pm 10,9)
Hudområde (%)	2,21 (\pm 1,44)	4,45 (\pm 4,36)	6,07 (\pm 2,90)	18,6 (\pm 6,3)	12,0 (\pm 4,99)

*N = 3

TABEL 2G

Vævsfordeling af ^{14}C som procent af dosis i rotter doseret dermalt med modificeret blanding B med indhold af ^{14}C -NDGA.

5

Væv	Middel (\pm S.D) * procent af dosis af ^{14}C fundet efter (timer)				
	4	24	48	72	96
Organer (%)	4,35 (\pm 3,06)	1,65 (\pm 0,68)	4,41 (\pm 3,57)	2,54 (\pm 2,05)	0,97 (\pm 0,19)
Hudområde (%)	14,4 (\pm 7,1)	23,0 (\pm 5,5)	17,1 (\pm 4,7)	16,3 (\pm 0,6)	17,7 (\pm 6,2)

*N = 3

De ovenstående resultater viser at tilsætningen af den vandopløselige zinkholdige forbindelse får det organiske molekyle til at absorberes hurtigere i huden i større mængder og til at blive tilbageholdt i huden længere end når den zinkholdige forbindelse ikke er tilstede.

10

EKSEMPEL 3**FORØGELSE AF ANTINEOPLASTISK VIRKNING**

15

Af de i listen anførte organiske forbindelser blev der af de forbindelser der har to eller flere benzenringe brugt 0,0145 mol pr. 100 cm³, og af dem, der har en eller ingen benzenringe, blev der brugt 0,029 mol pr. 100 cm³. Den organiske forbindelse blev afmålt i et rent hætteglas og PEGO 400 blev tilsat under omrøring indtil den gik i opløsning.

20

Til de testblandinger, der indeholdt zinkchlorid, blev zinkchlorid først opløst i PEGO 400 til fremstilling af en stamopløsning, der indeholdt 0,69 % zinkchlorid, og denne opløsning blev tilsat under omrøring til de hætteglas, der indeholdt de organiske forbindelser, der var under afprøvning.

25

Disse forbindelser blev undersøgt med og uden zinkchlorid og deres effektivitet som antitumormidler over for heterotransplantater af human brystadenocarcinom,

5 MX-1, dyrket i thymusløse (nøgne) mus med Balb/c afstamning ved intratumoral injektion efter den følgende protokol: hvert dyr blev podet intradermalt på ryggen nær ved nakken med 0,05 ml af et MX-1 tumorhomogenat. Vægten af tumorene i mg blev beregnet ud fra måling af længden, bredden og højden i mm af tumorene ved hjælp af formlen $(L \times B \times H)/2$. Dyrene blev randomiseret i grupper for at sikre fordelingen af mindre og større tumorer. Tumorene blev behandlet ved intratumoral injektion af 0,05 ml af hver testblanding. Hver blanding blev undersøgt på fem dyr. Dyrene blev kun behandlet én gang. Resultaterne er vist i tabel 3.

10 **TABEL 3**

Organisk forbindelse Forbindelse kendt cancermiddel	Anti-	Tumor fri 60 dage	For tidligt døde	Tumor ved død	Tumor tilbagefald
VP-16 Zn-fri		2	2	3	0
VP-16 + Zn		5	0	0	0
*1/5 VP-16 + Zn		3	0	2	2
VM-26 Zn-fri		0	0	5	0
VM-26 + Zn		5	0	0	0
* 1/5 VM-26 + Zn		5	0	0	0
4'-demethylepipodophyllo- toxin Zn-fri		1	0	4	3
4'-demethylepipodophyllo- toxin + Zn		5	0	0	0
Diethylstilbøstrol Zn-fri		0	2	5	0
Diethylstilbøstrol + Zn		3	0	2	1
Dithranol Zn-fri		1	0	4	0
Dithranol + Zn		4	0	1	1
Cyclophosphamid Zn-fri		0	0	5	0
Cyclophosphamid + Zn		3	2	0	0
Mitomycin Zn-fri		1	4	2	0
Mitomycin + Zn		5	0	0	0
Daunomycin Zn-fri		3	2	5	3
Daunomycin Zn		5	0	0	0

TABEL 3 (fortsat)

Organisk forbindelse Forbindelse kendt cancermiddel	Anti-	Tumor fri 60 dage	For tidligt døde	Tumor ved død	Tumor tilbagefald
Cisdiamindichloridplatin Zn-fri	Zn-	1	0	4	0
Cisdiamindichloridplatin + Zn		5	0	0	0
Adriamycin Zn-fri		0	1	2	4
*1/10 Adriamycin Zn-fri		2	1	2	2
Adriamycin + Zn		4	0	1	1
*1/10 Adriamycin + Zn		1	3	1	1
Allopurinol Zn-fri**		0	-	5	-
*5/2 Allopurinol + Zn		0	0	5	0
Allopurinol + Zn		1	0	4	4
*5/2 Allopurinol + Zn		1	0	4	4

* Dosisniveau forhøjet eller sat ned som anført.

5 ** Alle aflivet på dag 25.

Disse resultater viser den reducerede toksicitet og forøgede antineoplastiske virkning opnået ved tilsætning af zinkioner.

10 EKSEMPLERNE 4-9

POTENTIERING AF ANTINEOPLASTISKE MIDLER BEREGNET TIL LOKALT BRUG

15 I eksemplerne 4-9, hvori der henvises til afprøvningen af blandinger for antitumoraktivitet mod B-16 melanom og Sarcom-180 fast tumurvækst i mus blev følgende fremgangsmåder benyttet. I den udstrækning at et bestemt eksempel modificerede fremgangsmåden, vil sådan modification blive anført ved det enkelte eksempel.

20

Begge typer af tumorer blev dyrket intradermalt eller subcutant i musene. B-16 melanom blev dyrket i BDF₁ mus og S-180 tumoren blev dyrket i ICR mus. Hver mus blev injiceret intradermalt på et barberet område bag på musens hals med omkring 0,01 ml af en saltvandssuspension indeholdende omkring 1×10^6 celler af tumorcellerne pr. 0,01 ml. Tumorerne fik lov til at vokse til de havde nået en

25

omtrentlig størrelse på omkring 25-100 mg, beregnet ved at multiplicere længden af tumoren med bredden og højden målt i mm og dividere produktet med 2. På den første behandlingsdag blev dyrene med tumorstørrelse uden for størrelsesintervallet sorteret fra og de resterende dyr blev tilfældigt delt i kontrol- og forsøgsgrupper. Når tumorene havde nået en passende størrelse, sædvanligvis omkring dag 6, blev tumorene punkteret ens, og derpå behandlet med enten en testblanding eller en kontrol ved lokal påføring på overfladen af tumoren. Sædvanligvis blev der foretaget to lokale påføringer med 24 timers mellemrum. Stoffene blev påført således, at der opnåedes et lag på fra omkring 1 til omkring 2 mm over hele overfladen af tumoren. Dyrene blev derefter observeret og deres vægt og størrelsen af deres tumor blev målt periodisk.

Resultaterne fra hvert af eksperimenterne omfatter følgende:

- (a) begyndelsesantallet (n) af dyr i hver behandlingsgruppe af et forsøg;
- (b) den gennemsnitlige tumorstørrelse i mg på de dyr, der blev behandlet med blandingen og den gennemsnitlige tumorstørrelse for kontroldyrene;
- (c) forholdet ganget med 100 af gennemsnitsstørrelsen af tumorene hos de behandlede dyr i forhold til hos kontroldyrene (T/C), hvor T = gennemsnitsstørrelse af behandlede mus og C = gennemsnitstumorstørrelse hos kontrolmus;
- (d) procentdel af både behandlede og kontroldyr uden tumor;
- (e) procentdel af dyr af det oprindelige antal, der overlevede.

De sidste tre målinger fra et bestemt eksperiment blev alle foretaget på samme tid og varierer i almindelighed fra 21 til omkring 33 dage efter tumorpodning. En T/C værdi på 42 eller mindre viser aktivitet. I alle de følgende tabeller for eksemplerne 4-9 er kontrolresultaterne givet i parentes.

EKSEMPEL 4

Der blev fremstillet to meso-NDGA formuleringer med et PEGO grundlag. Deres sammensætninger er som vist i tabel 4.

5

TABEL 4

Blanding	NDGA (meso)	H ₂ O	EtOH	PEGO 3350
1	3,6	24,3	48,5	23,4
2	6,9	0	0	93,1

10

Blanding nr. 1 blev fremstillet ved at opløse NDGA i absolut ethanol ved opvarmning og omrøring; derefter blev vandet langsomt sat til NDGA opløsningen. Blandingen blev opvarmet for at fordampe tilstrækkeligt meget af opløsningsmidlet til at man fik en blanding med omkring 130 % af NDGA's vægt, og den blev så blandet i PEGO grundlaget. Blanding nr. 2 blev fremstillet ved simpelthen at opløse NDGA i PEGO grundlaget ved opvarmning og omrøring.

15

EKSEMPEL 5

20

NDGA formuleringerne fra eksempel 4 blev undersøgt for potentiel antitumoraktivitet mod B-16 melanom dyrket i mus. Den benyttede fremgangsmåde var den, der er beskrevet tidligere. Resultaterne er vist i tabel 5.

TABEL 5

n	T/C ¹	Tumorstørrelse (kontrol)	% Tumorfri (kontrol)	Overlevende (kontrol)
9	87	954±698 (1091±547)	0 (0)	33 (80)
9	114	748±621 (645±335)	0 (0)	77 (77)
10*	24	138±99 (575±270)	20 (0)	100 (60)

¹T/C forholdet blev beregnet mellem dag 21 og dag 24.

- 5 * Dyr behandlet én gang ved en 0,05 ml intratumoral injektion dag 6 efter tumorpodning.

EKSEMPEL 6

- 10 Adskillige formuleringer af zinkchlorid i et PEGO grundlag blev fremstillet ved først at opløse zinkchloridet i vand og så blande zinkchloridopløsningen i PEGO grundlaget. Formuleringerne havde omtrent de følgende vægt/vægt% sammensætninger, som er vist i tabel 6.

15 **TABEL 6**

Blanding	ZnCl ₂	H ₂ O	PEGO
3	41,9	11,6	46,5
4	30	16	53,8
5	14,6	4,1	81,3
6	28,6	7,9	63,5
7	46,1	13,8	40
8	15	8	77
9	13,8	9,2	77
10	5,5	3,7	90,8

EKSEMPEL 7

5 Blandingerne fra eksempel 6 blev undersøgt for potentiel antitumoraktivitet mod B-16 melanom og S-180 fast tumorvækst i mus i overensstemmelse med de fremgangsmåder, der tidligere er beskrevet. Resultaterne er vist i tabel 7.

TABEL 7

S-180					
Blanding	n	T/C ¹	Tumorstørrelse (kontrol)	% tumorfri (kontrol)	Overlevende (kontrol)
3	8	51	559±476 (1095±360)	25 (10)	100 (100)
3	10	40	366±345 (934±656)	11 (10)	90 (100)
6	8	48	524±462 (1095±360)	12 (10)	100 (100)
6	10	115	1074±687 (934±656)	10 (10)	100 (100)
7	5	0	0 (752±511)	100 (0)	80 (100)
7	10	0	0 (550±184)	100 (0)	90 (100)
7	10	0	0 (997±421)	100 (0)	100 -
10	8	74	815±472 (1095±360)	0 (10)	87 (100)

¹T/C forholdet blev beregnet mellem dag 20 og dag 23.

TABEL 7 (fortsat)

B-16			Tumorstørrelse	% tumorfri	Overlevende
Blanding	n	T/C ¹	(kontrol)	(kontrol)	(kontrol)
3	10	6	162±253 (2505±1844)	60 (0)	100 (100)
4	10	16	106±114 (644±342)	30 (0)	100 (70)
5	10	47	1191±764 (2505±1844)	22 (0)	90 (100)
6	10	4	94±217 (2505±1844)	80 (0)	100 (100)
7	9	15	169±216 (1091±547)	37 (0)	88 (80)
7	9	0	0 (654±335)	100 (0)	88 (77)
7	10	2	31±100 (1805±968)	90 (0)	100 (80)
8	10	43	277±209 (644±342)	10 (0)	40 (70)
9	10	1,0	25±63 (1733±2254)	80 (70)	90 (80)

¹T/C forholdet blev beregnet mellem dag 21 og dag 25.

5 EKSEMPEL 8

Blandinger af zinkchlorid, EDTA og NDGA, blev fremstillet og formuleret i et PEGO grundlag. Blandingerne blev fremstillet ved at opløse NDGA og EDTA i en del af PEGO grundlaget ved opvarmning og omrøring indtil det var i opløsning. Zinkchloridet blev opløst i vand og opvarmet. Den varme zinkchloridopløsning blev

10

sat til den varme PEGO indeholdende NDGA og EDTA og omrørt til det var afkølet til stuetemperatur. Sammensætningen af blandingerne er givet i omtrentlig vægt/vægt%, som vist i tabel 8.

5 **TABEL 8**

Blanding	ZnCl ₂	NDGA	EDTA	H ₂ O	PEGO
11	27,5	6,9	14,7	18,3	32,6
12	28	6,8 ¹	14,7	18,2	32,9

EKSEMPEL 9

10 Blandingerne fra eksempel 8 blev undersøgt for deres potentielle antitumoraktivitet mod B-16 melanom dyrket i mus i overensstemmelse med den fremgangsmåde, der tidligere er beskrevet. Resultaterne er vist i tabel 9.

TABEL 9

15

B-16					
Blanding	n	T/C ¹	Tumorstørrelse (kontrol)	% tumorfri (kontrol)	Overlevende (kontrol)
11	10	8	51±118 (711±286)	70 (0)	100 (100)
12	10	0	0 (711±286)	60 (0)	100 (100)

¹T/C forholdet beregnet på dag 24 undtagen for blanding 11, hvor den blev beregnet på dag 21.

20 De foregående eksempler 4-9 viser den potentierende virkning af zinkchlorid på antineoplastiske midler, der påføres lokalt, idet de viser forbedring i forhold til den antineoplastiske virkning af zinkchlorid alene og i forhold til sammenlignelige mængder af NDGA, selv når NDGA injiceres i tumoren.

25 **EKSEMPEL 10**

5 Passende humanmodeller og dyremodeller vælges for de sygdomstilstande, der behandles med de følgende forbindelser, som beskrevet ovenfor, og forbindelserne undersøges for at bestemme den effektive og den toksiske dosis med og uden tilsætning af equimolære mængder af zinkchlorid, zinkiodid, zinkbromid, zinksulfat, zinknitrat, zinkstearat og zinkacetat. Ud fra resultaterne beregnes det terapeutiske index, der er lig med forholdet mellem den toksiske og den effektive dosis, og dette index for forbindelser med og uden zinktilsætning sammenlignes for at vise en forøgelse i terapeutisk index for forbindelser med indhold af zinkforbindelser i sammenligning med forbindelserne uden sådan til

10 sætning; NDGA (nordihydroguaiaretsyre), VP-16 (epipodophyllotoxin-beta-D-ethyliden glucopyranosid-etoposid), VM-26 (epipodophyllotoxin-beta-D-thenyliden glucopyranosid-teniposid), 4'-demethylepipodophyllotoxin, diethylstilbøstrol, dithranol, cyclophosphamid, mitomycin, daunomycin, cis-diamindichlorplatin, adriamycin og allopurinol.

15

PATENTKRAV

- 5 1. Farmaceutisk formulering, der giver forøget tilbageholdelse i hud og slimhinder, kendetegnet ved, at formuleringen omfatter et farmakologisk aktivt stof udvalgt af gruppen bestående af NDGA (nordihydroguaiaretsyre); VP-16 (epipodophyllotoxin-beta-D-ethyliden glucopyra-nosidetoposid); VM-26 (epipodophyllotoxin-beta-D-thenyliden glucopyranosid-teniposid); 4'-demethylepipodo-phyllotoxin; diethylstilbøstrol; dithranol; cyclophos-phamid; mitomycin; dauno-mycin; cisdiamin-dichloridplatin; adriamycin og allo-purinol samt en effektiv mængde af en vandopløselig, zinkholdig forbindelse.
- 10
2. Formulering ifølge krav 1, kendetegnet ved, at den zinkholdige forbindelse er zinkchlorid.
- 15

Hudfordeling af $(14)\text{C}$ -Nordihydroguaiaretsyre (NDGA) hos rotter, der behandles med $(14)\text{C}$ -NDGA med og uden ZnCl_2

