

1190/96

74517 30930

62.301/SZE

KIVONAT **KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY**

Elektromosan töltött liposzómák - *liposomes*

Schering Aktiengesellschaft, BERLIN, DE

A bejelentés napja: 1994. 11. 04.

Elsőbbsége: 1993. 11. 04. (08/145,541) US

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP94/03668

A nemzetközi közzététel száma: WO 95/12386

A jelen találmány tárgyát képezi javított liposzóma készítmények előállítása, olyan mennyiségű elektromos töltés bevitelével, amely például hatékonyan csökkenti a liposzóma készítmény hemodinámiás hatásait, fokozza a toleranciát, vagy csökkenti a káros hatásokat. Az elektromos töltés hatékony mennyiségét úgy adják a liposzóma készítményhez, hogy a liposzómákat egy elektromosan töltött komponens hatékony mennyiségének jelenlétében állítják elő, vagy a töltés hatékony mennyiségét a már elkészült liposzómákhoz adják.

Cell. dev. -

1130/96

30930

62.301/SZE

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

7

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Elektromosan töltött liposzómák

Schering Aktiengesellschaft, BERLIN, DE

Feltalálók: KRAUSE Werner, BERLIN, DE

SACHSE Andreas, BERLIN, DE

SULLIVAN Mark, FAIRFIELD, California, US

A bejelentés napja: 1994. 11. 04.

Elsőbbsége: 1993. 11. 04. (08/145,541) US

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP94/03668

A nemzetközi közzététel száma: WO 95/12386

A jelen találmány tárgyát liposzómák és azok gazdaszervezetekbe való bejuttatása képezi.

A liposzómákat hordozóként használják aktív ágensekhez, beleértve a terápiás, diagnosztikus és profilaktikus ágenseket.

A liposzómák általában amfipatikus vegyületeket tartalmaznak, amelyeknek van egy hidrofil fejük és egy hidrofób farkuk, amelyek bizonyos körülmények között úgy reagálnak, hogy bimolekuláris levélstruktúrát hoznak létre legalább két lipidrétegből, amelyben a poláros fejcsoportok a vizes közeg és a lipid határfelületén találhatók, míg a hidrofób farkak egymással kölcsönhatásba lépve olyan környezetet hoznak létre, amely kizárja a vizet. A lipid kettősrétegek stabil struktúrák, amelyeket az acilcsoportok szénhidrogén csoportjainak nem-kovalens kölcsönhatása tart össze. Ha a lipid kettősréteg önmagával kapcsolódva bezáródik, akkor egy liposzómának nevezett gömb alakú részecskét hoz létre, amelynek a belső tere el van választva a külső környezettől. A kívánt ágenseket ebbe a térbe, vagy magába a kettősrétegbe kapszulázhatjuk.

A liposzómát képező lipidek általában foszfogliceridek, azaz lehetnek például foszfatidil-kolin (lecitin) és szfingolipidek.

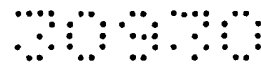
A liposzómák használhatók hordozóként, például terápiás, diagnosztikai és profilaktikus ágensekhez. Azért is különösen előnyösek, mert megvédhetik az érzékeny ágenseket a lebomlástól, és ezzel fokozzák azt az időt, ami alatt az ágens aktív a testben. Emellett a liposzóma szövet- vagy sejtspecifikus célzását is elérhetjük, úgy, hogy egy bizonyos szövetre vagy sejttípusra szelektív komponenst építünk be a liposzómába, azaz a liposzóma kettősréteg szerkezetéhez kapcsoljuk, konjugáljuk, abszorbeáljuk vagy adszorbeáljuk. Például lipidek, ellenanyagok, lectinek, receptorok, ligandumok, és egyéb ilyen komponensek építhetők be a liposzómákba, hogy szövetspecifikus célzást érjünk el.

A liposzóma technológia további alkalmazása a májbetegségek kezelése, megelőzése és diagnosztizálása. A jelenleg hozzáférhető számos különböző képalkotó technikák és modalitások ellenére a máj léziók pontos megbecslése megmarad komoly diagnosztikai problémának. A diagnosztikai nehézségek egyik oka az alacsony kontrasztkülönbség a normális és a daganatos máj parenchyma között, ami csak az 1-2 cm-nél nagyobb léziók leképezését teszi lehetővé. Ennek megfelelően kívánatos lenne, ha képesek lennénk egy radiográfiás vagy MRI kontrasztanyag koncentrálására a májban, azzal a céllal, hogy fokozzuk a kontrasztot egy olyan időtartamra, amely lehetővé teszi a teljes szerv alapos vizsgálatát.

A hidrofil anyagok májba való juttatásának egyik módja, ha liposzómákba kapszulázzuk őket. Az intravénás beadás után a liposzómákat felvehetik a retikulo-endoteliális rendszer fagocita sejtjei. Ezek azután főleg a máj Kupfer sejtjeiben és a lép makrofágjaiban koncentrálnak. Mivel a tumorszövet nem mutat fagocita aktivítást, a liposzómális kontrasztanyag szelektíven az egészséges szövetben koncentrálnak. Ennek eredménye a fokozott sűrűségkülönbség (Δ HU a Röntgen-képeknél, $\Delta T1$ vagy $\Delta T2$ az MRI-hez).

Különböző vizsgálok képesek voltak elvileg igazolni egy ilyen megközelítésnek a hatékonyságát. A legtöbb esetben azonban nem voltak képesek elegendő sűrűségkülönbséget elérni, liposzómaik alacsony jódhordozó kapacitása miatt; emellett egyetlen, kontrasztanyagot hordozó liposzómák készítésére használt módszer sem bizonyult alkalmasnak a gyógyászatilag elfogadható liposzóma készítmények nagy mennyiségben, reprodukálhatóan való előállítására (megfelelő tárolási időtartam, sterilitás, pirogénmentesség, magas jódfelvétel).

Eljárást fejlesztettünk ki kontrasztanyagot hordozó liposzómák előállítására, amely a fenti problémákra megoldást ad (WO 91/16039; P 40 135802). Ez a módszer, amely az "etanol-evaporációs módszer" névre hallgat, lehetővé teszi lipo-



szómák nagy mennyiségben való előállítását, aszeptikus körülmények között. Az ezzel a módszerrel előállított eredeti liposzóma szuszpenziót liofilezzük, hogy megfelelő tárolási élettartamú terméket kapjunk. Az alkalmazás előtt a liofilizátumot szuszpendáljuk 135 mmol/l koncentrációjú mannitol oldatban, így kapunk egy liposzóma szuszpenziót, amit egy szűrési lépés beiktatása után infúzióban adunk be.

Az ezzel a módszerrel előállított, kontrasztanyagot hordozó liposzómák felhasználásával a máj és a lép opacifikálása érhető el. A kezdeti biodisztribúciós vizsgálatok alapján az iopromidot választottuk liposzómás kontrasztanyagnak, mivel a májban és a lépben való hétnapos retenciós ideje lényegesen kisebb mint az iotroláné.

Jóllehet a liposzómák fontos előrelépést jelentenek a gyógyszerbejuttatási rendszerekben, azaz például az előzőekben ismertetett kontrasztanyag hordozásában, az élő szervezetekben való alkalmazásuk korlátozott, a káros szisztémás mellékhatásuk miatt, amit a liposzómák beadása után lehet észlelni. Ezek közé a szisztémás hatások közé tartozik például a tranziens hemodinámiás depresszió, ami érinti a vérnyomást, a szívritmust és az ECG-t; a vér alakos elemei számának csökkenése. Az például ismert, hogy a liposzómáknak káros hemodinámiás hatásuk lehet, ha állatoknak intravénásan adják be, és ezzel súlyos veszélyt jelentenek a gazdaállat egészségére.

Az ilyen szisztémás hatások előfordulásának fényében az ilyen liposzóma készítmények nem használhatók gyógyszerek bejuttatására a szervezetbe. Meglepő módon azt találták, hogy ha előállítjuk ugyanezeket a liposzómákat, de elektromosan töltött komponenseket viszünk be a liposzómákat alkotó anyagba, akkor a beadáskor észlelt káros szisztémás hatások csökkenthetők vagy eliminálhatók.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a mellékelt ábrákat.

Az 1. ábrán a liposzómák előállításának etanol-evaporációs módszerének sematikus diagramját láthatjuk.

A 2. ábrán az átlagos vérnyomást láthatjuk (a megelőző érték százalékában), különböző lipidekből és mannitolból (300 mmol/l) készített intravénás infúzió után (300 mg lipid/kg, 100 mg lipid/kg/perc), n=6, átlag±SEM.

• Mannitol (○) DSPC/DSPG DSPC

A 3. ábrán a teljes perifériás ellenállást láthatjuk (az előző érték százalékában) különböző lipidekből és mannitolból (300 mmol/l) készített intravénás infúzió után (300 mg lipid/kg, 100 mg lipid/kg/perc), n=6, átlag±SEM.

• Mannitol (○) DSPC/DSPG DSPC

A 4. ábrán az enddiasztolés nyomást láthatjuk, különböző lipidekből és mannitolból (300 mmol/l) készített intravénás infúzió után (300 mg lipid/kg, 100 mg lipid/kg/perc), n=6, átlag±SEM.

• Mannitol (○) DSPC/DSPG DSPC

Ha elektromos töltéssel rendelkező komponenseket juttatunk be káros mellékhatással rendelkező liposzómákba, akkor azt tapasztaljuk, hogy a kapott liposzómák csökkentik vagy eliminálják a nemkívánatos vagy káros szisztémás mellékhatások előfordulását, amelyek egyébként akkor figyelhetők meg, ha olyan liposzómákat adunk be, amelyeket ugyanazokból a lipid alkotóelemekből állítunk elő, de kihagyjuk belőlük az elektromos töltésű részecskéket.

Pontosabban, egy negatív töltésű komponenst, azaz például zsírsavat, úgy- mint sztearinsavat adunk a liposzóma készítményekhez, akkor ez jelentős mértékben fokozza a gazdaszervezet toleranciáját a készítményre, azzal összehasonlítva, amikor ugyanazt a készítményt adjuk be, de a negatív töltésű komponensek nélkül. A fokozott tolerancia tükröződhet azoknak a káros szisztémás hatásoknak a csök-

kentésében vagy eliminálásában, amelyeket az elektromos töltést nem tartalmazó liposzóma készítmények okoznak. Ezek közé a szisztémás hatások közé tartoznak például a hemodinámiás hatások, azaz például a vérnyomás, a szívritmus, a szisztolés nyomás, a disztolés nyomás megváltozása, vagy az ECG intervallumok (PR, QRS, QT, QTc) megváltozása, a reflex tachikardia, a túl korai kamrai aritmiák, a fokozott légzés, szedáció, valamint a vérsejtek és a vérlemezka szám megváltozása, végül a halál. Az nyilvánvaló, hogy ez az alapelv, hogy egy egyébként káros hatású struktúrával szembeni toleranciát az elektromos töltés megváltoztatásával fokozni lehet, a liposzómáktól eltérő reagensekre is alkalmazható.

A jelen találmány tárgyát képezi az a mennyiségű elektromos töltés, amely például hatékonyan csökkenti egy liposzóma készítmény hemodinámiás hatásait, fokozza a toleranciát, vagy csökkenti a káros hatásokat. Az elektromos töltés hatékony mennyiségét úgy adhatjuk a liposzóma készítményhez, hogy a liposzómákat egy elektromosan töltött komponens hatékony mennyiségének jelenlétében állítjuk elő, vagy a töltés hatékony mennyiségét a már elkészült liposzómákhoz adjuk.

A liposzómák készítmény beadására létrejött nemkívánatos vagy káros hatások csökkenthetők egy elektromos töltés hozzáadásával, a beadott liposzómák összetételétől függetlenül. Például egy szisztémás hatásokkal rendelkező liposzóma készítmény már tartalmazhat elektromosan töltött komponenseket. Ebben az esetben egy elektromosan töltött komponens hatásos mennyiségét bejuttathatjuk a liposzómákban már megtalálható töltött komponensek mellé. A bejuttatott töltött komponens lehet ugyanolyan típusú vagy töltésű, mint amilyen már megtalálható a liposzómában, de lehet egészen más típusú vagy töltésű. Tehát a jelen találmány tárgyát képezi továbbá töltés hozzáadása egy olyan liposzómához, amelynek már van töltött komponense.

A töltött komponenseket számos különböző módon juttathatjuk be a liposzómákba. Egy elektromosan töltött komponensnek a liposzómába való bejuttatásával a töltött komponens lehet a lipid kettősréteg egy szerkezeti komponense, és/vagy konjugálva vagy nem-kovalens kötéssel hozzákapcsolva a liposzóma egy alkotóeleméhez. Ha például a liposzómák egy olyan keverékből készülnek, amely hatékony mennyiségű negatívan töltött sztearinsavat tartalmaz, akkor a sztearinsav beépülhet a liposzóma lipid kettősrétegébe. Egy elektromosan töltött komponens hatékony mennyisége hozzáadható egy már létrehozott liposzóma készítményhez, vagy egy még nem teljesen létrejött készítményhez, például úgy, hogy egy töltött komponens a lipid kettősréteg felszínéhez konjugálással vagy nem-kovalens kötéssel hozzákapcsolunk.

Annak kisebb a jelentősége, hogy a liposzóma egy elektromosan töltött komponensét hogyan visszük be a liposzómába. A döntő tulajdonság az, hogy az elektromosan töltött komponens olyan mennyiségben van jelen a liposzómában, amely hatékony, azaz például fokozza a gazdaszervezet toleranciáját, csökkenti a káros hatásokat és/vagy csökkenti a hemodinámiás hatásokat, amiket egy liposzóma készítmény beadása okoz. Az elektromos töltés tehát számos különböző módon bevihető a liposzómába, beleértve például töltött komponensek, azaz például savak, például sztearinsav hozzáadását, valamint ezen komponensek sóinak, például ammóniumsóinak hozzáadását; töltött csoportok hozzákapcsolását a lipid kettősréteghez; valamint töltéssel rendelkező kettősréteg-képző anyagok hozzáadását, kovalens kötéssel, vagy valamilyen más erővel hozzákötve. Bár ezt a találmányt semmilyen elméleti megfontolás nem korlátozza, általában egy, a jelen találmány szerinti liposzóma egy elektromos töltést tartalmaz a kettősréteg külső felszínén.

Ismert például, hogy egy foszfatidil-kolint tartalmazó liposzóma készítmény káros hemodinámiás hatással rendelkezik. A gazdaszervezet toleranciáját fokoz-

hatjuk a készítményre, ha egy új liposzóma sarzsot készítünk, amely a foszfatidilkolin mellett hatékony mennyiséget tartalmaz egy elektromosan töltött komponensből, így például az elektromos töltés hatékony mennyiségét hordozhatja a sztearinsav. Egy másik módszer szerint a töltést bejuttathatjuk egy már létrejött liposzómba. Az elektromos töltést például kémiai módosítással, vagy egy töltött egységnek kovalens vagy nem-kovalens kapcsolásával juttathatjuk be a lipid kettősréteg külső felszínébe.

A töltésnek a liposzóma készítményhez való hozzáadása azt is lehetővé teszi, hogy a készítményből nagyobb mennyiséget adjunk be a gazdaszervezetnek anélkül, hogy káros hatásokat okoznánk, amelyek általában a liposzóma beadást kísérik. Ez azért lényeges, mert a liposzómba csomagolt ágensből nagyobb dózisok érhetőek el. A töltés hozzáadása egy liposzómához fokozhatja a liposzóma készítmény stabilitását és tárolhatóságát, például a szobahőmérsékletnél magasabb hőmérsékleten, azaz például 30-40 °C-on.

Az elektromos töltésű komponens hatékony mennyisége lehet pozitív vagy negatív is, mindaddig, amíg a kívánt hatást elérjük vele, azaz például fokozzuk a toleranciát, csökkentjük a káros hatásokat és/vagy csökkentjük a hemodinámias hatásokat, amelyeket a liposzóma készítmény beadása okozhat. A negatív töltést részesítjük előnyben. A töltés lehet ionos vagy elektronegatív. Elvileg, ha egyszer már tudjuk, hogy egy adott liposzóma készítményt a gazdaszervezet nem tolerál, amit a nemkívánatos szisztémás hatások mutatnak, kiválaszthatunk egy töltött komponenst, majd ezt beépíthetjük a liposzóma készítménybe, azzal a céllal, hogy csökkentjük vagy elimináljuk a készítmény beadását kísérő mellékhatásokat. Különböző mennyiségű és minőségű töltést tartalmazó liposzóma készítménysorozat előállításával egyszerű lenne meghatározni, hogy milyen fajta töltés hatásos, például

a hemodinamias hatás csökkentésében és a gazdaszervezet toleranciájának fokozásában.

A hatékony elektromos töltésmennyiséget hordozhatja egy molekula vagy egy töltéshordozó. A molekulának lehet egy vagy több töltött része, azaz lehet egy zwitterion. A töltés bárhol lehet a töltéshordozón. A töltéshordozó megválasztása számos különböző tényezőtől függ, azaz például a hozzáférhetőségtől, a biokompatibilitástól és a kívánt hatástól. A töltéshordozót a kívánt töltést hordozó képessége mellett egyéb tényezők alapján is megválaszthatjuk. A töltéshordozó működhet például célzó ágensként is, azaz a liposzómát szelektíven a kívánt szövethez vagy sejttípushoz irányíthatja a gazdaszervezetben. A töltéshordozó lehet például biomolekula, polimer, lipid, fehérje, nukleinsav, szénhidrát, szintetikus molekula, vagy bármely egyéb molekula vagy molekuláris struktúra, amely beépíthető a liposzóma kettősrétegbe, és amely hatásos mennyiségű elektromos töltést hordoz. A molekulát a liposzóma kettősrétegbe beépítve a molekula szerkezetileg része lehet a liposzóma részecskének, azaz például integrálódhat a lipid kettősrétegbe, vagy perifériálisan kapcsolódhat a liposzóma felszínéhez, vagy lehet a lipid alkotórésze is. Emellett kisméretű vegyületek, amelyek további savas csoportokat tartalmaznak, hozzáköthetők egy "horgony"-hoz, azaz például koleszterinhez, foszfatidil-kolinhoz, zsírsavhoz, stb., amelyek a kettősrétegben ülnek. A töltést (előnyösen negatív) hordozhatják aminosavak vagy cukorsavak, bármely, a kettősréteghez kötődni képes egységhez kapcsolva (koleszterin, foszfatidil-kolin, zsírsav, stb.).

A töltéshordozó lehet bármely töltéssel rendelkező lipid is, beleértve például a szterolokat, a zsírsavakat, glicerín-észtereket, a szfingozint, a terpéneket vagy általában a lipideket [TEXTBOOK OF CLINICAL CHEMISTRY, szerk.: N.W. Tietz; 7. fejezet, 829-900; W.B. Saunders Co. (1986)]. A sztearinsav az előnyös példa a negatív töltésű zsírsavra, amely a jelen találmányban hatékony mennyiségben

használható, azaz amely csökkenti a parenterálisan beadott liposzóma készítmények hemodinámiás hatását. Egyéb zsírsav lehet például a palmitinsav, arachidonsav, linolsav, linolénsav és/vagy ezek keveréke.

A töltéshordozó lehet például egy fehérje, amely például képes integrálódni a lipid kettősrétegbe, vagy periferiálisan kötődni a felszínéhez. A fehérje töltését létrehozhatják aminosavak, szénhidrát-kötések, vagy a fehérjéhez hozzákötött vagy hozzákapcsolt nem-fehérje csoportok. A fehérje lehet lipidrészt tartalmazó fehérje is. A fehérjét azért választhatjuk, mert a kívánt töltéssel rendelkezik, és azért is, mert képes a liposzómákat egy specifikus szövethez irányítani.

A liposzómába beépítendő töltésmennyiség lehet bármely olyan mennyiség, amely hatékonyan csökkenti a nemkívánatos hemodinámiás hatásokat, azaz például a hemodinámiás depressziót és/vagy növeli a toleranciát. A töltés mennyisége változhat, változtatva a molarányt a töltött komponens és a liposzóma egyéb alkotóelemei között. Például egy töltött komponens hozzáadhatunk egy foszfatidil-kolint tartalmazó liposzómához, sztearinsav hozzáadásával. A liposzómában levő töltésmennyiségét úgy kapjuk meg, hogy a molarányt a kívánt mértékben változtatjuk a két alkotóelem között; azaz például a foszfatidil-kolin/sztearinsav arány 9:1.

A gazdaszervezetnek a liposzóma készítménnyel szembeni fokozott toleranciáját, valamint a szisztémás hatások ezt követő eliminálását vagy csökkenését egy töltött komponensnek a liposzóma részecskébe való beépítésével érhetjük el. Ezt a javulást, ha a töltött komponensnek a sejtfelszínre gyakorolt hatása közvetíti, akkor elérhetjük úgy is, hogy a felszínt módosító ágenseket vagy módszereket használunk. Például a már létrejött, káros szisztémás hatással rendelkező liposzómákat enzimesen vagy kémiai módon kezelhetjük, azzal a céllal, hogy megváltoztassuk a liposzóma felületi tulajdonságait, és beadása esetén fokozzuk ellene a szervezet toleranciáját. A kémiai módosítások közé tartozik például a liposzóma reagáltatása redukáló

ágensekkel, oxidáló ágensekkel, vagy töltött komponenseknek a felszínhez való kapcsolása. Ezeket a módszereket szokványos módon hajthatjuk végre, de úgy, hogy elérjük a káros hatásoknak az említett csökkenését vagy eliminálását.

A liposzómákat a szakterületen ismert módszerekkel állíthatjuk elő, lásd például a WO86/00238 bejelentést. A liposzómákat emellett elő lehet állítani az EP69307 és az U.S. Pat. No. 5,110,475 számú bejelentések alapján, amelyek leírják például egy vizes diszperzió készítését, ami magában foglalja a folyadék(ok) eltávolítását egy adott esetben multifázisos folyadékelegyből, membrándeztillálás alkalmazásával; valamint a WO86/238 alapján, amelyben egy extrúziós technikát írnak le liposzómák előállítására, amellyel lényegében unimodális vagy meghatározott méreteloszlás érhető el.

Ha egy liposzómát egy elektromosan töltött komponenssel állítunk elő, akkor lehetséges, hogy az elektromosan töltött egység számos különböző irányba orientálódhat a liposzómában; azaz például a liposzóma részecske belseje felé fordulva és a részecske külseje felé fordulva a vizes közeg és a lipid közötti határfelületnél. Előnyösebbek a külsejükön, azaz a külső felszínükön elektromos töltéssel rendelkező liposzómák. Kíváncos lehet a "belső" töltéssel és a "külső" töltéssel rendelkező liposzómák elválasztása. Ezt bármely, a szakterületen ismert módszerrel elvégezhetjük, beleértve az oszlopkromatográfiát, amelynek során töltött vagy más módon módosított hordozókat használunk, az elektroforézist, elektromos elválasztási folyamatokat és más olyan folyamatokat, amelyek a struktúrákat a töltésük, a töltéssűrűségük vagy a töltés orientációja alapján választják el. Az elektromosan töltött komponenseket tartalmazó liposzóma készítményeket általában olyan körülményeknek tehetjük ki, amelyek eliminálják a jelen találmány céljainak meg nem felelő orientációkat.

Egy aktív ágens szokványos módszerekkel kapszulázható a liposzómákba. Tehát egy hatékony elektromos töltést tartalmazó liposzóma készítmény tartalmazhat, beburkolhat egy aktív ágenst. A kapszulázást ismert módszerekkel végezhetjük el, azaz például a liposzóma készítését az aktív adalékanyag megfelelő mennyiségének jelenlétében, olyan körülmények között, amelyek között az aktív adalékanyag körül lipid kettősréteg alakul ki és bekapszulázza azt, az aktív adalékanyagot egy már létrehozott liposzómába egy liposzómával, sejttel vagy egyéb, az aktív adalékanyagot tartalmazó szerkezettel való fúzióval juttatva be; az ilyen fúziót elvégezhetjük PEG-gel, elektromos árammal, lektinokkal, valamint egyéb, a szakterületen jól ismert módszerekkel. Emellett egy aktív adalékanyagot tartalmazó liposzómát a WO/89593 szabadalmi bejelentés alapján készíthetünk el, azaz például a liposzómákat vizes közegben olyan nyomás mellett kezeljük, amely hatékonyan csökkenti a lipid elrendeződés rendjét, ezzel lehetővé teszi egy aktív adalékanyag bejutását, és nyomásesést hoz létre.

Egy aktív adalékanyag kapszulázható egy hatékony mennyiségű elektromosan töltött komponenst tartalmazó liposzóma készítménybe, amely adalékanyag lehet például szokványos aktív adalékanyag, amelyet a terápiában alkalmaznak, beleértve azokat az ágenseket is, amelyeket a "Physicians Desk References, Medical Economics Data", 44. kiadás (1993), vagy a "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., 18. kiadás (1990) kiadványokban szerepelnek, valamint az ellenanyagokat, peptideket, DNS-t, RNS-t, ribozimeket és oligonukleotidokat, vagy a profilaxisban és diagnosztizálásban alkalmaznak, azaz például kontraszt ágenseket, úgymint az iopromidot, paramágneses részecskéket, ferromágneses részecskéket, radioaktív izotópokat, valamint az egyéb szokványos struktúrákat vagy vegyületeket. Egy ilyen aktív adalékanyag lehet egy, a szakterületen átlagos jártassággal rendelkező szakember által használt és felismert ágens.

A liposzómákat szokványos módszerekkel adhatjuk be. Egy liposzóma készítményt beadhatunk például parenterálisan, azaz intravénásan arteriális vagy vénás katéterrel, egy fecskendő injekcióval, de beadhatók orálisan vagy a beleken keresztül is. A liposzóma készítmények tipikus mennyisége 100-200 mg lipid/kg, ez a mennyiség attól függ, hogy a hatóanyagból mennyit akarunk beadni és egy liposzóma mennyit tartalmaz belőle. A beadandó liposzóma készítmény mennyiségét a gyakorlat alapján határozhatjuk meg, a szakterületen jártas szakember számára ismert módszerekkel. A liposzómákat beadhatjuk egyetlen injekcióban, de beadhatók vagy infundálhatók egy adott időtartam alatt is konstans vagy variábilis sebességgel, azaz például 2 ml/perc sebességgel 30 perc alatt. Mivel a töltött komponenst tartalmazó liposzómákat a gazdaszervezet jól tolerálja, az infúzió sebességét és a beadott liposzóma mennyiségét megnövelhetjük, a káros hatású liposzóma készítményeknél tipikusan alkalmazott mennyiségekhez viszonyítva.

A liposzómákat bármely szervezetnek be lehet adni, azaz például emlősöknek, úgymint embereknek, patkányoknak, egereknek, kutyáknak, macskáknak, nyulaknak, lovaknak, de beadhatók madaraknak, kételtűeknek és hüllőknek is. A beadás célja lehet hogy diagnosztizáljuk, kezeljük, nyugtassuk az alanyt, vagy megelőzzük rendellenességek kialakulását, de használhatók állati modellek kifejlesztésével kapcsolatban is, amelyekkel gyógyszerek, kontrasztanyagok, ellenanyagok és más ágensek biztonságosságát és hatékonyságát lehet kiértékelni, emberekben való végleges felhasználhatóságuk szempontjából. A jelen találmány szerinti módszer például a liposzóma beadással járó hemodinamiás hatások csökkentésére, a gazdaszervezet toleranciájának fokozására, vagy a káros mellékhatások csökkentésére, bármely szervezetben alkalmazható, azaz például azokban is, amelyeket az előzőekben felsoroltunk. A liposzómák használhatók bármely diagnosztikai vagy terápiás fel-

használás céljára, beleértve az MRI-t, az ultrahangot és a radioaktív anyagokkal végzett gyógyítást.

A részletek további kifejtése nélkül az a véleményünk, hogy egy, a szakterületen jártas szakember az előző leírást alkalmazva a jelen találmányt teljes mértékben alkalmazni tudja. Az alábbi specifikus leírás tehát csak illusztratív jellegű, semmiképpen sem tekinthető a találmány korlátozásának.

Az előzőekben, valamint az alább következő leírásban a hőmérsékleteteket korrígalatlanul, Celsius fokban adjuk meg, és ha külön nem említjük, akkor minden rész és százalék súly alapján van megadva.

Minden idézett szabadalmi leírás és publikáció, amelyet az előzőekben vagy a későbbiekben idézünk, referenciának számít.

1. Példa

Az iopromid liposzómák előállítását az "etanol evaporációs módszer" alkalmazásával az 1. ábrán mutatjuk be. A membránlipidek etanolos oldatát (standard=92,5 mg/ml foszfatidil-kolin/koleszterin/sztearinsav 4:5:1 molarányban) iopromid oldattal keverjük össze, amelyet úgy kaptunk, hogy egy Ultravist 370 oldat alikvot részeit 20 mmol/l trometamin pufferrel (pH=7,4) hígítjuk, így kapunk 46,25 mg/ml végső jódkoncentrációt. A keverési periódus után az etanolt csökkentett nyomáson eltávolítjuk a keverékből, egészen addig, ameddig egy fehér liposzóma szuszpenziót kapunk. Ezt a szuszpenziót megszűrjük (5 μm és 1,2 μm), ampullákba töltjük, majd liofilezzük, így kapunk tárolható stabil formát.

A felhasználás előtt ezeket a liofilizátumokat előbb rehidráljuk, 1 g száraz anyagra 4 ml 135 mmol/l mannitol oldatot számítva. A kapott liposzóma oldatot azután megszűrjük (20 μm -es üvegszál előszűrővel és 5 μm -es CN fő szűrővel) a nem-liposzómális struktúrák eltávolítására. Ezek a struktúrák parittyá- vagy

hurokalakú kettősréteg képződmények, amelyek egy része 10 μm -nél is nagyobb lehet. Kimutattuk, hogy ezek a struktúrák a fenti szűrési lépéssel eltávolíthatók.

Igazoltuk az előzőekben ismertetett előállítási eljárás alkalmazhatóságát nagyobb mennyiségű liposzóma készítmény reprodukálható előállítására is. 16 szarzs előállítása során (mindegyik 1000 ml liposzóma szuszpenzió) $42,1 \pm 4,9\%$ -os kapszulázást kaptunk, az átlagos átmérő 458 ± 55 nm a reszuszendált anyagban (2 ml 135 mmol/l koncentrációjú mannitol oldat per 1 g liofilizátum).

Az eljárás potenciálisan alkalmas aszeptikus körülmények között való végrehajtásra. A liposzómák előállítására használt oldatokat ultra- vagy sterilszűrésnek vethetjük alá.

A reszuszendált liofilizátum összetételét (4 ml 135 mmol/l mannitol oldat per 1 g liofilizátum) az alábbiakban ismertetjük (határok nélkül):

iopromid	145,5 mg
foszfatidil-kolin	41,3 mg
DL- α -tokoferol	0,04 mg
koleszterin (CH)	25,0 mg
sztearinsav (SS)	3,7 mg
tromethamine	3,7 mg
1 mol/l HCl	25,4 mg
dinátrium-edetát	0,15 mg
mannitol	21,8 mg
víz	1 literre ml

Egy PC/CH/SS 4:5:1 moláris összetételű lipidkeverék adta a legmagasabb fokú kapszulázást ($42,5 \pm 3,7\%$, $n=6$), valamint a legkisebb átlagátmérőt (439 ± 87 nm) a reszuszendált anyagban. Ezek az értékek jól egyeznek azokkal az értékekkel,

amelyeket akkor kaptunk, amikor a sarzs méretét tízszeresre növeltük (lásd 3.1). A három membránkomponens molarányát és az egyes lipidkomponensek típusát és minőségét ezeknek a célparamétereknek az alapján optimalizáltuk.

Egyéb nem-ionos monomer kontrasztanyagok (iopamidol, iohexol és ZK 119095) alkalmazása iopromid helyett nem bizonyult jobbnak, a jód kapszulázás alapján megítélve. Amikor a nem-ionos dimer iotrolant kapszuláztuk, akkor magasabb súlyarányt (mg jód/mg lipid) kaptunk. Ezt az anyagot azonban kizártuk a további vizsgálatokból, mivel az iotrolant elfogadhatatlanul hosszú ideig visszatartja a vizsgált állatok mája és lépe (biodisztribúciós vizsgálatok), és ezzel egyidőben a májban patológiás elváltozások tapasztalhatók.

Az etanol-evaporációs eljárásban 1:1 jód/lipid arány (az eredeti oldatokban) (lásd 1. ábra) bizonyult a legalkalmasabbnak a lipid optimális alkalmazását illetően (azaz a legmagasabb lehetséges jód-lipid súlyaránnal) a végső készítményben. A vizsgált reszuszpenciós anyagok közül a 135 mmol/l mannitollal kaptuk a legmagasabb kapszulázási értéket, a bidesztillált vízzel, különböző pufferoldatokkal és alacsonyabb koncentrációjú mannitol oldatokkal összehasonlítva.

2. Példa

Egy kiindulási stabilitási vizsgálatához egy liposzóma sarzsot készítünk aszeptikus laboratóriumi körülmények között. A reszuszpendált liposzómákat a méret (QUELS), a jód kapszulázás, a pH és a mikroszkópos megjelenés alapján jellemezzük. A mikrobiológiai státuszt nem határozzuk meg. Az ebben a vizsgálatban kapott eredmények szerint (hathónapos tárolás) a liposzómális liofilizátumok (PC/CH/SS 4:5:1) 30 °C-ig növelhető hőmérsékleten tárolhatók észlelhető minőségi változás nélkül. Hathónapos 40 °C-os tárolás után azonban a reszuszpendált anyagban

jelentős méretnövekedés és pH-csökkenés figyelhető meg. Ezeket a változásokat a reszuszendált anyagból származó kellemetlen szag kíséri.

A (szűretlen) reszuszendált anyaggal végzett stabilitási vizsgálatban nem figyelhető meg jelentős méretváltozás (QUELS), kapszulázási érték változás vagy pH-változás 24 óra alatt. Ebben a vizsgálatban azonban nem követtük a mikroszkópos megjelenés lehetséges megváltozását; így a reszuszendált liofilizátum mikroszkópos megjelenési formáját külön követtük mind a szűrés előtt mind a szűrés után, nyolcórás időtartamban. Egyik vizsgált anyagban sem figyelhetők meg jelentős változások.

3. Példa

(A) Módszerek

(i) Sebészeti módszerek

A vizsgálat előtt hat-hét nappal hat egészséges felnőtt korcs kutyát (mindegy milyen nemű) választunk ki a testsúlyok hasonlósága alapján (14,3-15,6 kg), majd 35 mg/kg, iv beadott pentobarbitál nátriummal anesztetizáljuk, megborotváljuk, majd előkészítjük a steril műtéthez, a szándékolt vágás területét kétszer mosva Betadine sebészeti oldattal, majd a területet Betadine oldattal megfestve. A kutyákat galléros endotracheális csővel intubáljuk, majd a szoba levegőjével mechanikusan lélegeztetjük egy Harvard állati lélegeztetőberendezéssel (607-es modell), dorzális fekvő helyzetbe hozzuk őket a műtőasztalon, majd a műtéthez steril technikák alkalmazásával letakarjuk. Egy kis (0,25 cm) bevágást teszünk a szegycsont markolata és a jobb váll nagyobb gumója között. Tompa disszekciót alkalmazva kanülözéshez izoláljuk a jobb omocervikális artériát és a jobb nyaki vénát. Az artériát először Tygon mikrofuratos csővel (0,13 cm belső átmérő, #S-54-HL) katéterezzük. A katétert 2-0 selyem öltésekkel rögzítjük, majd exteriorizáljuk egy bőr alatti csatornán keresztül a

nyakszirthez. A jobboldali nyaki vénát is Tygon mikrofuratos csővel (0,1 cm belső átmérő, #S-54-HL) katéterezzük. A katétert 2-0 selyem öltésekkel rögzítjük, majd ezt is egy bőr alatti csatornán keresztül exteriorizáljuk a nyakszirthez. Mind az artériás mind a vénás katétereket steril, heparinozott (600 E/ml) sóoldattal töltjük, szuturáljuk, majd betadinnel festjük a fertőzés csökkentése érdekében. Az exponált katétereket kis műanyag zacskókban rögzítjük, majd ragasztószalaggal gyapottal borított nyakörvhöz rögzítjük. A kutyák standard intramuszkuláris Combiotic injekciókat kapnak, hogy csökkentsük a fertőzés veszélyét, majd hagyjuk, hogy felépüljenek a műtétből.

(ii) Kísérleti eljárások

A vizsgálat napján a kutyákat bevisszük a laboratóriumba, egyszerre kettőt, mobil hámiban. A kutyákat megborotváljuk a bokájuknál, és vezető II elektrokardiográfiás (ECG) vezetésekkel szereljük fel őket, felszíni elektródokat és elektromosan vezető zselét használva. Eltávolítjuk a speciális nyakörveket, mindegyik katéterből vért veszünk, majd a katétereket steril sóoldattal átöblítjük. Az artériás katétert egy nyomás távadóhoz kapcsoljuk, és egy higanyos manométerrel kalibráljuk. 10 ml vénás vérmintát veszünk a vénás katéterből, EDTA-t tartalmazó steril Sarstedt monovetta csövekkel. Egy 20-40 perces ekvilibrációs periódus után a kutyáknak DMPC/DPPC-t adunk be infúzióban, amit az interdigitációs/fúziós módszerrel készítünk (lásd: WO 91/10422; EP 510096), vagy 25 perc alatt 2 ml/perc sebességgel DPPC-t adunk be. A követett paraméterek: közvetlen artériás vérnyomás és a vezetés II felszíni ECG.

(iii) Gyógyszerbeadás

DMPC/DPPC vagy DPPC liposzóma részecskéket adagolunk intravénásan, átlátszatlan szuszpenzióban, 2 ml/perc sebességgel, 1 mg/kg/ml koncentrációban, ameddig 50 mg/kg dózist megkapnak az állatok. Minden dózist steril 60 ml-es fecskendőbe töltünk, majd Razel infúziós pumpával infundáltatjuk. Minden, a katéterben

maradó szuszpenziót belemosunk a kutyába. steril sóoldatot alkalmazva, azonos infúziós sebességgel.

(iv) Statisztikai elemzés

A részecskék beadása után kapott kiválasztott CBC számokat az alapértékekkel hasonlítjuk össze, páros minta t-tesztet alkalmazva. A különbségeket akkor tekintjük szignifikánsnak, ha $p \leq 0,05$.

(B) Eredmények

A DMPC/DPPC vagy DPPC infúziók hatását a szívverésre (HR), az átlagos vérnyomásra (MAP), a szisztolés nyomásra (SP), a diasztolés nyomásra (DP), az ECG intervallumokra (PR, QRS, QT, QTc) és a kiválasztott vérsejtszámokra az 1-4 táblázatokban mutatjuk be. A teljes vérsejtszámot (CBC) a függelékben adjuk meg.

(i) Vérnyomás

A DMPC/DPPC vagy DPPC intravénás adagolása jelentős csökkenést okoz a szisztolés, diasztolés és átlagos artériás nyomásban.

(ii) Szisztolés nyomás (1. táblázat)

A szisztolés nyomás átlagban 37%-kal csökken a DMPC/DPPC infúzió hatására. A szisztolés nyomásban még nagyobb esés figyelhető meg DPPC részecskék infúziója során, amikor a szisztolés nyomás 55%-kal esik. Jóllehet minden egyes csoportban csak egy kutyánál tért vissza a szisztolés nyomás az alapszinthez közeli értékre a megfigyelési periódusban, ezt a nyomáscsökkenést átmenetinek határozzuk meg, mivel a szisztolés nyomások a normális fiziológiás szinten voltak a részecske beadást követő 30 percen belül.

(iii) Diasztolés nyomás (2. táblázat)

A diasztolés nyomás 39%-kal esik a DMPC/DPPC csoportban és 48%-kal a DPPC csoportban a részecske infúzió során. A DMPC/DPPC csoportból egy kutya tartotta meg a diasztolés nyomás kontroll értékét az infúzió során, és a DPPC cso-

portból 1 kutyánál volt megfigyelhető minimális hatás a diasztolés nyomásra. A liposzóma részecskék hatása a diasztolés nyomásra általában átmeneti volt, mivel az átlagos diasztolés nyomás a részecske beadást követő 30 percen belül visszatért a kontroll szint közelébe.

(iv) Átlagos nyomás (3. táblázat)

A liposzóma részecskéknek az átlagos artériás nyomásra gyakorolt hatása sokkal jelentősebb a DPPC csoportban, alacsonyabb, és sokkal hosszabb időtartamú nyomáscsökkenéssel. A DMPC/DPPC csoportban a kutyák átlagos nyomása átlagosan 38%-ot esett az infúzió során, de az infúzió végére visszatért a kontroll szint közelébe. A DPPC részecskéket kapott kutyáknál azonban 52%-os nyomáscsökkenés figyelhető meg az infúzió során, és az infúzió befejezése után 30 perccel sem tért vissza a kontroll szint közelébe.

(v) Szívritmus (4. táblázat)

A liposzóma részecskék hatása éber kutyák szívritmusára változó volt. Míg az átlagos szívritmus értékek mindkét csoportban növekedtek a liposzóma részecskék beadása során, ez egy kifejezett tachikardiát tükröz, amit minden egyes csoportban csak egy kutyánál figyeltünk meg. Minden egyes csoportban a másik két kutyánál a szívritmus azonos maradt, vagy a kontroll szint alá süllyedt az infúzió során, valamint az ezt követő 45 perces megfigyelési periódusban.

(vi) Elektrokardiográfiás intervallumok (5. táblázat)

A DMPC/DPPC vagy DPPC liposzóma részecskék infúziója nem gyakorolt fiziológiásan jelentős hatást az ECG intervallumokra. Nem figyeltünk meg változásokat a PR vagy QRS intervallumokban (3A. és 3B. táblázat). A QT-ben (3C. táblázat) és a QTc-ben (3D. táblázat) minimális változások voltak megfigyelhetők, de nem tükröztek jelentősnek tekinthető nagy fiziológiai hatást.

(vii) CBC értékek (6. táblázat)

A DMPC/DPPC liposzóma részecskék infúziója jelentősen növelte a fehér-vérsejtek számát, és enyhén csökkentette a keringő vérlemezkék számát, míg a vörös vérsejtek számát és a hematokrit értéket nem érintette (4A. táblázat). A DPPC részecskék infúziója emellett csak kis hatást gyakorolt a vörös vérsejtek számára és a hematokrit értékre, azonban jelentősen csökkentette a vérlemezkék számát, és csak enyhén csökkentette a fehér vérsejtek számát (4B. táblázat).

(C) Megbeszélés

A jelen vizsgálatban, amelyben éber kutyáknál figyeltük meg az akut hemodinamiás és ECG változásokat, a DMPC/DPPC és DPPC liposzóma részecskék intravénás infúziója hirtelen és jelentős csökkenést okozott a vérnyomásban, aminek számos különböző fiziológiás reakció volt az eredménye, beleértve a letargiát és enyhe nyugtató hatást, míg hányás csak egy kutyánál fordult elő. Az ECG paraméterekben nem volt megfigyelhető jelentős változás; azonban a vörös vérsejtek száma és a keringő vérlemezkék száma megváltozott.

Ezeknek a nyilvánvaló reakcióknak a többsége a vérnyomás ideiglenes, de szignifikáns csökkenésének tulajdonítható, ami a vizsgálati anyag lehetséges anafilaktikus hatásából származhat. Az ilyen reakciót kísérhetik a fehér vérsejtek és a keringő vérlemezkék számában megfigyelhető változások.

4. Példa

(A) Módszerek

(i) Sebészeti eljárások

A vizsgálat előtt 6-7 nappal 5 normális, egészséges korcs kutyát (a nem lényegtelen) választunk ki a testsúlyok hasonlósága alapján (14,3-15,6 kg), majd 35 mg/kg, iv beadott pentobarbitál nátriummal anesztetizáljuk, megborotváljuk, majd

előkészítjük a steril műtéthez, a szándékolt vágás területét kétszer mosva Betadine sebészeti oldattal, majd a területet Betadine oldattal megfestve. A kutyákat galléros endotracheális csővel intubáljuk, majd a szoba levegőjével mechanikusan lélegeztetjük egy Harvard állati lélegeztetőberendezéssel (607-es modell), dorzális fekvő helyzetbe hozzuk őket a műtőasztalon, majd a műtéthez steril technikák alkalmazásával letakarjuk. Egy kis (0,25 cm) bevágást teszünk a szegycsont markolata és a jobb váll nagyobb gumója között. Tompa disszekciót alkalmazva kanülözéshez izoláljuk a jobb omocervikális artériát és a jobb nyaki vénát. Az artériát először Tygon mikrofuratos csővel (0,13 cm belső átmérő, #S-54-HL) katéterezzük. A katétert 2-0 selyem öltésekkel rögzítjük, majd exteriorizáljuk egy bőr alatti csatornán keresztül a nyakszirthez. A jobboldali nyaki vénát is Tygon mikrofuratos csővel (0,1 cm belső átmérő, #S-54-HL) katéterezzük. A katétert 2-0 selyem öltésekkel rögzítjük, majd ezt is egy bőr alatti csatornán keresztül exteriorizáljuk a nyakszirthez. Mind az artériás mind a vénás katétereket steril, heparinozott (600 E/ml) sóoldattal töltjük (1 ml), majd steril sapkákkal lezárjuk a két vágást selyemmel lezárjuk, majd Betadinnel festjük a fertőzés csökkentése érdekében. Az exponált katétereket kis műanyag zacskókban rögzítjük, majd ragasztószalaggal gyapottal borított nyakörvhöz rögzítjük. A kutyák standard intramuszkuláris Combiotic injekciókat kapnak, hogy csökkentsük a fertőzés veszélyét, majd hagyjuk, hogy felépüljenek a műtétből.

(ii) Kísérleti eljárások

A vizsgálat napján a kutyákat bevisszük a laboratóriumba, mobil hámban. A kutyákat megborotváljuk a bokájuknál, és vezető II elektrokardiográfiás (ECG) vezetésekkkel szereljük fel őket, felszíni elektródokat és elektromosan vezető zselét használva. Eltávolítjuk a speciális nyakörveket, mindegyik katéterből vért veszünk, majd a katétereket steril sóoldattal átöblítjük. Az artériás katétert egy nyomás távadóhoz kapcsoljuk, és egy higanyos manométerrel kalibráljuk (0-200 Hgmm). 10 ml

vénás vérmintát veszünk a vénás katéterből, EDTA-t tartalmazó steril Sarstedt monovetta csövekkel. Egy 20-40 perces ekvilibrációs periódus után a kutyáknak EPC-t adunk be infúzióban, 25 perc alatt 2 ml/perc sebességgel. A követett paraméterek: közvetlen artériás vérnyomás és a vezetés II felszíni ECG.

(iii) Gyógyszerbeadás

EPC liposzóma részecskéket adagolunk intravénásan, átlátszatlan szuszpenzióban, 2 ml/perc sebességgel, 1 mg/kg/ml koncentrációban, ameddig 50 mg/kg dózist megkapnak az állatok. Minden dózist steril 60 ml-es fecskendőbe töltünk, majd Razel infúziós pumpával infundáltatjuk. Minden, a katéterben maradó szuszpenziót belemosunk a kutyába, steril sóoldatot alkalmazva, azonos infúziós sebességgel, hogy biztosítsuk, hogy minden egyes kutya megkapta a teljes dózist.

(B) Eredmények

Az EPC infúziók hatását a szívverésre (HR), az átlagos vérnyomásra (MAP), a szisztolés nyomásra (SP), a diasztolés nyomásra (DP), az ECG intervallumokra (PR, QRS, QT, QTc) és a teljes vérsejtszámra (CBC) alábbiakban ismertetjük. A vérnyomásváltozás és a szivritmus csúcserőkei a liposzóma részecskék infúziója során fordulnak elő.

(i) Vérnyomás

Az EPC liposzóma részecskék intravénás beadása jelentős csökkenést okozott a szisztolés, diasztolés és átlagos arteriális vérnyomásban, a vizsgált 5 kutya közül háromban.

(ii) Szisztolés vérnyomás (7. táblázat)

A szisztolés nyomás az 5 kutyából álló csoportban átlagosan 36%-kal esett. Ezeknek az akut hemodinamiai depresszió áteső kutyáknak (n=3) a szisztolés nyomása az alapszint alá esett 50-62%-kal. Ezek a változások a szisztolés nyomás-

ban ideiglenesek voltak, mivel a szisztolés nyomás az EPC infúzió végére visszatért a normális szintre.

(iii) Diasztolés nyomás (8. táblázat)

Az 5 vizsgált kutyánál a diasztolés nyomás 36%-kal esett. Annak a három kutyánál, amelyeknek a vérnyomása jelentősen csökkent, a diasztolés nyomáscsökkenése 56-61%-kal csökkent az alapszint alá. Míg ezek a nyomáscsökkenések komolyak voltak, ugyanakkor ideiglenesek is voltak, mivel a nyomásértékek az EPC részecskék infúziójának végén visszatértek a normális szint közelébe.

(iv) Átlagos nyomás (9. táblázat)

Az EPC liposzóma hordozóknak nem volt megfigyelhető hatása az 5 vizsgált kutya közül kettőben; azonban az 5 kutya közül háromban az artériás nyomás jelentősen csökkent. A nyomáscsökkenés átlagos értéke 35% volt, de a jelentős hemodinámiás depressziót mutató kutyáknál az átlagos nyomáscsökkenés 57-61%-kal csökkent az alapszint alá. Jóllehet ezek a nyomáscsökkenések súlyosak voltak, ugyanakkor ideiglenesek is voltak, mivel a nyomásértékek visszatértek a normális érték közelébe az EPC részecskék infúziójának végére.

(v) Szívritmus (10. táblázat)

Az EPC liposzóma részecskék hatása a szívritmusra éber kutyákon szorosan kapcsolódott a vérnyomáscsökkenésre adott fiziológias válaszhoz. Azok a kutyák, amelyeknek hemodinámiás problémáik voltak az EPC adagolás hatására, erős reflex tachikardiát mutattak az EPC infúzió során, ezt követte egy rövid bradikardia, és az EPC infúzió után 30 perccel mindegyik kutyánál a szívritmus visszatért az alapszintre. Az a 2 kutya, amelyeknek nem voltak hemodinámiás problémái az EPC infúzió során, viszonylag állandó szintű szívritmust mutatott a vizsgálat során.

(vi) Elektrokardiográfiás intervallumok (11. táblázat, A-D)

Az EPC liposzóma részecskék infúziójának nem volt fiziológiailag jelentős hatása az ECG intervallumokra. A QRS időtartamában sem figyelhető meg változás. A PR, QT és QTc intervallumok során megfigyelt változások a szívritmus változásokhoz kapcsolódtak, amelyek az EPC infúzióval nyíltan érintett 3 állatban léptek fel. Ezek közül a változások közül egyik sem jelentős fiziológiailag, az ideiglenes természetük miatt.

Egy kutyában spontán aritmiák (izolált idő előtti kamrai kontrakció formájában) fordultak elő az EPC infúzió során. A példákat a 2. ábrán mutatjuk be.

(vi) Átlagos CBC értékek (12. táblázat)

Az EPC liposzóma részecskék infúziója nem érintette a vörös vérsejtek számát vagy a hematokrit értéket. A fehér vérsejtek száma nem volt következetes. A vérlemezke szám teljesen lecsökkent abban a 3 kutyában, amelyek hemodinámiás depressziót mutattak. Az egyik kutyában, amelyik nem mutatott hemodinámiás depressziót (USDA #97684), csökkent a vérlemezkek száma, de nem csökkent a normális értékhatárok alá.

(C) Megbeszélés

Az EPC liposzóma részecskék intravénás adagolása éber kutyákban hemodinámiás depressziót eredményezett. Az ebben a vizsgálatban megfigyelt vérlemezke szám csökkenés hasonló volt az előző vizsgálatban megfigyelt hatással. Mindkét vizsgálatban a vérlemezke szám csökkenése szorosan kapcsolódni látszik a liposzóma infúzió következtében fellépő súlyos vérnyomáscsökkenéshez. A liposzóma infúzió során megfigyelt nyílt reakciókról (vérlemezke szám csökkenése, erős hipotenzió és reflex tachikardia) a legvalószínűbb, hogy egy anafilaxiás válaszhoz kötődnek. Az egyik, EC részecskéket kapott kutyában megfigyelt spontán aritmiák

hirtelen hipotenzív hatásra adott válaszok lehetnek, a katekolaminok reflex aktiválásával.

5. Példa

A jelen találmány szerinti liposzómákat, amelyek az elektromos töltésű sztearinsav komponenst tartalmazzák (SA 504/02079 és SA 504/300591) egészséges kutyáknak adtuk be.

(A) Módszerek

(i) Sebészeti módszerek

A vizsgálat előtt hat-hét nappal hat egészséges felnőtt korcs kutyát (mindegy milyen nemű) választunk ki a testsúlyok hasonlósága alapján (12,3-15,1 kg), majd 35 mg/kg, iv beadott pentobarbitál nátriummal anesztetizáljuk, megborotváljuk, majd előkészítjük a steril műtéthez, a szándékolt vágás területét kétszer mosva Betadine sebészeti oldattal, majd a területet Betadine oldattal megfestve. A kutyákat galléros endotracheális csővel intubáljuk, majd a szoba levegőjével mechanikusan lélegeztetjük egy Harvard állati lélegeztetőberendezéssel (607-es modell), dorzális fekvő helyzetbe hozzuk őket a műtőasztalon, majd a műtéthez steril technikák alkalmazásával letakarjuk. Egy kis (0,25 cm) bevágást teszünk a szegycsont markolata és a jobb váll nagyobb gumója között. Tompa disszekciót alkalmazva kanülözéshez izoláljuk a jobb omocervikális artériát és a jobb nyaki vénát. Az artériát először Tygon mikrofuratos csővel (0,13 cm belső átmérő, #S-54-HL) katéterezzük. A katétert 2-0 selyem öltésekkel rögzítjük, majd exteriorizáljuk egy bőr alatti csatornán keresztül a nyakszirthez. A jobboldali nyaki vénát is Tygon mikrofuratos csővel (0,1 cm belső átmérő, #S-54-HL) katéterezzük, és a nyakszirthez exteriorizáljuk. Mind az artériás mind a vénás katétereket steril, heparinozott (600 E/ml) sóoldattal töltjük, steril sapkával lezárjuk, majd betadinnel festjük a fertőzés csökkentése érdekében. A zárt

katétereket kis műanyag zacskókban rögzítjük, majd ragasztószalaggal gyapottal borított nyakörvhöz rögzítjük. A kutyák standard intramuszkuláris Combiotic injekciókat kapnak, hogy csökkentsük a fertőzés veszélyét, majd hagyjuk, hogy felépüljenek a műtétből.

(ii) Kísérleti eljárások

A vizsgálat napján a kutyákat bevisszük a laboratóriumba, mobil hámban. A kutyákat megborotváljuk a bokájuknál, és vezető II elektrokardiográfiás (ECG) vezetésekkel szereljük fel őket, felszíni elektródokat és elektromosan vezető zselét használva. Eltávolítjuk a speciális nyakörveket, mindegyik katéterből vért veszünk, majd a katétereket steril sóoldattal átöblítjük. Az artériás katétert egy nyomás távadóhoz kapcsoljuk, és egy higanyos manométerrel kalibráljuk. 10 ml vénás vérmintát veszünk a vénás katéterből, EDTA-t tartalmazó steril Sarstedt monovetta csövekkel. Egy 20-30 perces ekvilibrációs periódus után a kutyáknak vagy SA 504/020791 vagy SA 504/300591 készítményt adunk be infúzióban, pontosan 30 perc alatt 2 ml/perc sebességgel. A követett paraméterek: közvetlen artériás vérnyomás és a vezetés II felszíni ECG. A szívritmust az ECG nyomonkövetésből határozzuk meg.

(iii) Gyógyszerbeadás

SA 504/020791 vagy SA 504/300591 jelű jódtartalmú liposzóma részecskéket adagolunk intravénásan, átlátszatlan szuszpenzióban, 4,2 ml/perc vagy 4,5 ml/perc sebességgel, 1 mg/kg/ml koncentrációban. Az infúzió sebességét úgy határozzuk meg, hogy a teljes infúziós idő 30 perc legyen. Minden dózist steril fecskendőbe töltünk, majd Razel infúziós pumpával infundáltatjuk. Minden a katéterben maradó szuszpenziót belemosunk a kutyába, steril sóoldatot alkalmazva, azonos infúziós sebességgel.

A vizsgált anyagokat az alábbi eljárás szerint készítjük: SA 504/020791: 17,6 ml mannitol oldatot (135 mmol/l) adunk minden egyes, a vizsgálati anyagot tartal-

mazó ampullához, majd legalább 10 percig hagyjuk állni. Az ampullákat azután erősen megrázzuk és újabb 10 percig hagyjuk állni. A rázást megismételve a szuszpenziót vizuálisan ellenőrizzük, hogy vannak-e benne csomók (ha vannak, akkor a fenti rázást megismételjük). A szuszpenziókat azután 60 ml-es fecskendőkbe szívjuk fel, és steril szűrőberendezésen szűrjük át (Schering AG.). Mindegyik állat 4,5 ml/kg-ot kap.

SA 504/300591: Az eljárás pontosan megegyezik az előzőekben ismertetettel, azzal a különbséggel, hogy 18,0 ml mannitol oldatot (135 mmol/l) használunk ampullánként, és az állatok 4,2 ml/kg-ot kapnak.

(iv) Statisztikai elemzés

A hemodinámiás paramétereket, az ECG intervallumokat és a kiválasztott teljes vérszámokat az alapértékekkel hasonlítjuk össze, páros minta t-tesztet alkalmazva. A különbségeket akkor tekintjük szignifikánsnak, ha $p \leq 0,05$.

(v) Liposzóma készítés

Az SA 504/020791 és SA 5041/300591 készítményeket az alábbiak szerint készítjük el.

Az 1-es oldatot úgy állítjuk elő, hogy 54,6 g S100 lipoidot, 33,0 g koleszterolt és 4,9 g sztearinsavat oldunk 9,5 ml 96,5%-os etanolban. 2000 ml 2-es oldatot úgy készítünk, hogy 250 ml iopromid oldatot kombinálunk 9,5 ml 20 mmol/l koncentrációjú TRIS-HCl-lel (pH=7,5) és 9,5 ml 96%-os etanollal. Kevertetés közben az 1-es oldatot hozzáadjuk a 2-es oldathoz. Az etanolt csökkentett nyomáson eltávolítjuk, majd a megmaradt oldatot fagyasztva szárítjuk. 5 g fagyasztva szárított anyagot szuszpendálunk 8,8 ml 135 mmol/l koncentrációjú mannitolban. A reszuszendált liposzóma készítményt átlátlában 300 mg jód/kg koncentrációban injekciózzuk be.

(B) Eredmények

Az SA 504/020791 vagy az SA 504/300591 infúziók hatását a szívritmusra (HR), az átlagos vérnyomásra (MAP), a szisztolés nyomásra (SP), diasztolés nyomásra (DP), ECG intervallumokra (PR, QRS, QT, Qtc) és a kiválasztott vérsejtszámokra a 13-16. táblázatban mutatjuk be.

(i) Vérnyomás (13. táblázat)

Az SA 504/020791 és SA 504/300591 részecskék intravénás beadása nem okozott jelentős változásokat a szisztolés, diasztolés vagy átlagos artériás nyomásban. Amint az a 13C. táblázatból látható az SA 504/300591-gyel kezelt állatok átlagos artériás vérnyomása 104 ± 6 volt, és viszonylag változatlan maradt a kísérlet során. Hasonló eredményeket kaptunk az SA 504/020791 jelű anyaggal is.

(ii) Szívritmus

Éber kutyákon a liposzóma részecske készítményeknek nem volt szignifikáns hatásuk a szívritmusra. Az infúzió során az SA 504/300591-gyel kezelt öt kutya közül háromnak csökkent a szívritmusa, kettőnek pedig nőtt. Tehát nem volt megfigyelhető következetes változás. Az egyik állatban, amelyik SA 504/020791-et kapott (a 10003 számú kutya) a kontroll szívritmus különösen magas volt (164 bpm). Ez az állat nagyon erősen reagált minden, a szobából származó ingerre (azaz például a laboratóriumi személyzetre), de végül megnyugodni látszott, ahogy a kísérlet előrehaladt. Ez valószínűleg az akklimatizációnak köszönhető és nem egy gyógyszer által indukált hatás.

(iii) Elektrokardiográfiás intervallumok

Egyik vizsgált anyagnak sem volt fiziológiásan jelentős hatása az ECG intervallumokra. Nem volt megfigyelhető változás a PR, QRS, QT vagy QTc intervallumokban.

(vii) CBC értékek

Egyik vizsgált anyagnak sem volt jelentős hatása az RBC vagy WBC számokra. Jóllehet a WBC számok változása nem volt jelentős, az a trend, hogy a WBC nő a vizsgált anyagok beadása során. Ha egyesítjük a két csoportból származó adatokat (azaz $n=8$), akkor statisztikai szignifikanciát kapunk a megnőtt WBC-re ($p=0,026$). 5 kísérletben a vizsgálati anyag beadása előtt és után a vérlemezke értékeket "megfelelő"-nek, "fokozott"-nak vagy "csökkent"-nek kategorizálhattuk. Mind az ötnél "megfelelő" minősítést kapott a vérlemezke érték. A többi 3 kísérletben a vérlemezke számok (ezer/ml) a következők:

Kezelés	Kutya#	Kontroll	45'
SA 504/300591	10174	435	376
SA 504/020791	10003	198	243
SA 504/020791	98701	210	298

(C) Megbeszélés

A DMPC/DPPC, DPPC és EPC liposzóma készítményekkel éber kutyákon végzett korábbi vizsgálatok a vizsgált állatok 40-60%-ánál nagyon jelentős, átmeneti hipotenzív választ mutattak. A jelen vizsgálatban, amelyben éber kutyáknak figyeljük az akut hemodinámiás és ECG változásait, azt tapasztaltuk, hogy az SA 504/300591 és az SA 504/020791 liposzóma készítmények nem okoztak szignifikáns változásokat a hemodinámiás változókban (vérnyomás és szívritmus), az ECG intervallumokban vagy az RBC és WBC értékekben, és így ezek a készítmények jól tolerálhatók, mentesek a káros hemodinámiás hatásokról.

6. Példa

Két liposzóma készítményt állítunk elő, és kutya modellben vizsgáljuk a hemodinámiás hatásukat.

1. készítmény: Csak foszfatidil-kolint tartalmazó (körülbelül 25 mg/ml koncentrációban) liposzómák.

2. készítmény: Foszfatidil-kolint és sztearinsavat tartalmazó liposzómák. A molarány körülbelül 9:1, körülbelül 70 mg/hl lipid koncentráció mellett.

Ezeket a készítményeket öt kutyába infundáltatjuk intravénásan, mindegyiket körülbelül 50 mg lipid/testsúlykilogramm (1. készítmény) dózisszinten és körülbelül 30 mg lipid/testsúlykilogramm (2. készítmény) dózisszinten.

A kutyákban az alábbi hatásokat figyeltük meg.

1. készítmény: A vérnyomás ideiglenes csökkenése az öt vizsgált állat közül háromnál, ami jelentős reflex tachikardiához kötődik. Ennél a három állatnál a következő hatásokat figyeltük még meg: egy állatnál idő előtt kamrai aritmiák az infúzió során és a beadást követően még egy rövid ideig, fokozott légzés zihálás formájában a másik két kutyánál. Egyik kutyánál sem volt megfigyelhető fiziológiailag szignifikáns változás az ECG intervallumokban. Az öt kezelt kutyánál négyben csökkent a vérlemezke szám. A hemodinámiás depressziót mutató állatok valamennyire szedáltak látszótnak, és a legjelentősebb vérlemezke szám csökkenést mutatták, azokkal a kutyákkal összehasonlítva, amelyeknél nem csökkent a vérnyomáscsökkenés.

2. készítmény: Ennek a készítménynek az intravénás beadása nem okozott káros hemodinámiás hatást egyik kezelt állatnál sem.

7. Példa

Ebben a példában a csak telített, töltés nélküli DSPC-ből készített, vagy ugyanezt az anyagot negatív töltésű foszfolipiddel (DSPG) kombinálva (9:1) készített liposzómák kardio-hemodinámiás hatásait vizsgáltuk.

A liposzómák készítése: Az ebben a vizsgálatban használt liposzómákat folyamatos nagynyomású extrudálással készítjük.

Röviden, a megfelelő lipid vagy lipidkeverék etanolos oldatát egy gömblombik falára visszük. A kapott lipidfilmet 300 mmol/l koncentrációjú mannitol oldatban diszpergáljuk, így kapunk körülbelül 100 mg/ml lipidkoncentrációt. A kapott MLV diszperziókat ezt követően egy nagynyomású extrudáló berendezéssel extrudáljuk (Maximator HPE 10.0-250 modell, Schmidt, Kranz & Co., Zorge, Németország). Ezután egymás után mindegyik sarzsot tizszer extrudálunk két egymásra rétegzett csökkenő pórusméretű (1,0-4,0 és 0,1 μm) polikarbonát membránon (Nucleopore, Tübingen, Németország), így kapunk összesen 30 szűrést minden egyes készítményhez. Az extrudálási eljárás végén a kapott liposzóma szuszpenziókat steril szűrőtartókon szűrjük át (0,4 vagy 0,2 μm pórusméretű cellulóz-acetát, Sartorius, Göttingen, Németország) steril üvegampullákba, amelyeket aszeptikus körülmények között zárunk le.

Lipidek

Mindegyik foszfolipidet -20 °C alatt tároljuk, és további tisztítás nélkül használjuk.

A disztearoil-foszfatidil-kolint (DSPC, LP-04-013-114219-es és -116298-as sarzs) és a disztearoil-foszfatidil-glicerint (DSPG, LP 04-017-115751-es sarzs) a Sygena-tól szerezzük be (Liestal, Svájc).

A liposzómák méretét foton korrelációs spektroszkópiával (PCS) határozzuk meg, szubmikronos részecske osztályozót használva, (autodilute™ model 370, Nicomp Instr. Corp., Santa Barbara, Ca, USA).

A minták ozmolalitását (mOsm/kg) és pH-ját automatikus fagyáspont ozmóméterrel (Knauer, Berlin, Németország) és egy 761 Calimatic (Knick, Berlin, Németország) pH mérővel határozzuk meg.

Állatkísérletek

Tizennyolc hím patkányt (törzs: Han-Wistar, tenyésztő: Schering SPF, standard etetési és tartási körülmények), testsúlyuk 360-430 g között változik, véletlenszerűen három csoportba osztunk szét, a csoportonkénti állatszám 6.

A patkányokat 60 mg/kg intraperitoneális pentobarbitállal érzéstelenítjük. A légcsövet kanülözzük, a spontán lélegzés megkönnyítésére. A testhőmérsékletet $38 \pm 0,5$ °C-on tartjuk, melegített műtőasztal és fűtőlámpák segítségével.

A bal kamrai nyomást és a combcsonti artéria vérnyomását Statham nyomás távadóhoz kapcsolt, töltött polietilén katéterekkel rögzítjük. A szív kimenetet termidilúciós módszerrel határozzuk meg (termisztor katéter a hasi aortában, jéghideg sóoldat injekciózása a jobb kamrába). Az állatokat 400 E/kg bolusszal heparinizáljuk.

Az állatokat úgy készítjük elő, hogy az alábbi paraméterek mérhető/számíthatók legyenek: Bpsyst. (szisztolés vérnyomás, Hgmm), BPmean (átlagos vérnyomás, Hgmm), Bpdia. (diasztolés vérnyomás, Hgmm), HR (szívritmus, 1/perc), CO (szívkimenet/100 g testtömeg, ml/perc/100g), LVEDP (bal kamra végdiasztolés nyomás, Hgmm), TPR (teljes perifériális ellenállás, $\text{din} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5} \cdot 10^3$), ECG (elektrokardiogrammok, ms) és dP/dt max (a bal kamra maximális nyomásnövekedése, Hgmm/s).

A műtétet és a műszerezést 30 perces ekvilibrációs periódus követi, amelynek a végén meghatározzuk a kezelési értékeket. Az adatokat a liposzómák vagy a mannitol (kontroll) beadása után 45 percig rögzítjük (térfogatkontroll). Mindegyik állat csak egy kezelést kap.

Az állatokat összesen 300 mg lipid/testsúlykg lipid dózissal infundáltatjuk, az injekció sebessége 100 mg lipid/kg/perc a bal combcsonti vénába. A kontrollok azonos térfogatú, 300 mmol/l mannitol oldatot kapnak. A vizsgált liposzóma készítményeket DSPC-ből vagy DSPC/DSPG keverékből készítjük.

Statisztika

A hemodinámiás adatok átlagos százalékos változását az előkalkulált értékekkel szemben számítjuk (kivéve az LVEDP-t, amit a pre-drog alapvonal értékekből abszolút változásként fejezünk ki). Az értékeket a kontroll értékekkel hasonlítjuk össze. A Bartlett tesztet végezzük el, hogy az egyforma varianciákat vizsgáljuk és a variancia egyutas elemzését (ANOVA) használjuk a statisztikai különbségek demonstrálására. A statisztikai szignifikancia számításait Student-féle t-teszttel végezzük. A 0,05 alatti p értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintjük. Az ábrákon látható értékeket átlagos százalékos változás az előzetes értékektől $\pm$ SEM formában fejezzük ki.

Eredmények

Kontroll kísérletek

A 300 mmol/l koncentrációjú mannitol (térfogat kontroll) nem okozta a kardio-hemodinámiás paraméterek szignifikáns eltérését az előzetes értékektől. A Bpmean maximum 1,8%-kal nőtt (2. ábra), a Bpsyst 2,3%-kal nőtt, és a Bpdiaast -2,2%-kal csökkent az alkalmazás utáni első 10 percben. A HR értéke 3,4%-kal csökkent. A TPR (3. ábra) és az LVEDP (4. ábra) rövid időnövekedéssel 5,5% és 2,8 Hgmm növekedéssel válaszolt (17. táblázat). A kontraktibilitás 3,3%-kal csökkent.

DSPC liposzómák

A telített DSPC használata semleges, gél-állapotú liposzómákat eredményezett, ami jelentős szív és hemodinámiás zavarokat okozott, ha 300 mg lipid/kg dózisban infundáltuk patkányokba. A Bpmean és a TRP jelentősen csökkent (53,7% és 46,3%) (2. és 3. ábra). A kontraktibilitás 34,7%-kal csökkent az infúzió kezdete után. Ez alatt az idő alatt az LVEDP (4. ábra) jelentősen csökkent ($p < 0,05$). Az összes

ilyen hatást súlyos kardiális aritmia kísérte. Voltak kamrai extraszisztolék, ektopikus szívverések, AV vezetési késések és a kamrába való vezetés kudarca. A HR-t és a CO-t azonban csak enyhén érintették ezek a kezelés utáni első 10 percben. Ennek a tízperces periódusnak a végén a BP és a kontraktilitás visszatért az alapértékekhez. A HR azonban elkezdett enyhén az alapvonal fölé emelkedni (körülbelül 10%), és a kontraktilitás is. A beadás utáni 45 perces megfigyelési periódus után a kontraktilitás 66,3%-kal nőtt az alapvonal fölé ($p < 0,01$). A TPR azonban nem tért vissza az alapvonalra a megfigyelési periódus végére.

DSPC/DSPG liposzómák

Egy negatívan töltött liposzóma hozzáadása (10 mól%) a DSPC-hez jelentősen csökkentette a DSPC kardio-hemodinámiás mellékhatásait. A BP és a TPR egy rövid ideiglenes növekedés után az előzetes értékhez viszonyítva 33,3 illetve 35,5%-kal csökkent (2. és 3. ábra). A kontraktilitás 14,3%-kal csökkent az alkalmazás utáni első 10 percben. Visszatért a normál értékekre, majd az alkalmazás után 30 perccel megnőtt. Egy későbbi időpontban a HR is növekedéssel reagált. A liposzóma infúzió során hatból négy patkánynál elektrokardiográfiás változások léptek fel. A hatásokat úgy értékeltük, mint vezetett és nem vezetett atriális idő előtti ütések három állatban, egy állatban pedig páros atriális idő előtti ütések által okozott komplex aritmiaaként értékeltük. Mindegyik ECG hatás eltűnt az infúzió végén.

Így a negatív töltés hozzáadása a DSPC liposzómákhoz jelentősen fokozta a készítmény kardio-hemodinámiás mellékhatásait a patkányokban.

Az előző példákat hasonló eredményekkel lehet megismételni, ha a jelen találmány szerinti általánosan vagy specifikusan ismertett reagenseket és reakciókörülményeket az előző példákban alkalmazottakkal helyettesítjük.

Az előző leírásból a szakterületen jártas szakember könnyen megbizonyosodik a jelen találmány lényeges jellemzőiről, és anélkül, hogy eltérne a találmány szellemétől és oltalmi körétől, különböző változtatásokat és módosításokat képes belevinni a találmányba, hogy a különböző alkalmazásokhoz és körülményekhez adaptálja a leírást.

1. Táblázat

A. Szisztolés nyomás

Kezelés	Kutya sorszám	Alap	Infúzió	0'	15'	30'	45'
DMPC/DPPC	97547	137	140	145	135	135	145
„	97481	145	60	115	125	125	130
„	97557	120	55	85	115	108	100
Átlag±S.E.		134±7	85±28	115±17	125±6	123±8	125±13
DPPC	97511	125	85	95	100	120	120
„	97454	140	55	70	115	115	120
„	97502	150	45	50	100	125	115
Átlag±S.E.		138±7	62±12	72±13	105±5	120±3	118±2

2. Táblázat

B. Diasztolés nyomás

Kezelés	Kutya sorszám	Alap	Infúzió	0'	15'	30'	45'
DMPC/DPPC	97547	120	120	120	115	105	120
„	97481	100	35	90	90	80	80
„	97557	90	35	60	85	65	75
Átlag±S.E.		103±9	63±28	90±17	97±9	83±12	92±14
DPPC	97511	90	70	70	80	85	85
„	97454	80	25	45	75	75	75
„	97502	80	35	40	75	85	75
Átlag±S.E.		83±3	43±14	52±9	77±2	82±3	78±3

3. Táblázat

C. Átlagos nyomás

Kezelés	Kutya sorszám	Alap	Infúzió	0'	15'	30'	45'
DMPC/DPPC	97547	126	127	128	122	115	128
„	97481	115	43	98	102	95	97
„	97557	100	42	68	95	79	83
Átlag±S.E.		114±8	71±28	98±17	106±8	96±10	103±13
DPPC	97511	102	75	78	87	97	97
„	97454	100	35	53	88	88	90
„	97502	103	38	43	83	98	88
Átlag±S.E.		102±1	49±13	58±10	86±2	94±3	92±3

4. Táblázat

Kezelés	Kutya sorszám	Alap	Infúzió	0'	15'	30'	45'
DMPC/DPPC	97547	120	115	110	120	110	110
„	97481	110	180	170	160	180	180
„	97557	100	60	80	70	100	100
Átlag±S.E.		110±6	122±35	120±26	117±26	130±25	130±25
DPPC	97511	100	100	60	70	70	80
„	97454	85	180	220	190	210	160
„	97502	100	110	110	65	100	75
Átlag±S.E.		95±5	130±25	130±47	108±41	127±43	105±28

5. Táblázat

A. PR intervallum

Kezelés	Kutya sorszám	Alap	0'	15'	30'	45'
DMPC/DPPC	97547	103	115	105	118	105
„	97481	94	90	88	83	80
„	97557	92	92	95	80	77
Átlag±S.E.		96±3	99±8	96±5	94±12	87±9
DPPC	97511	102	113	118	117	107
„	97454	90	78	78	75	80
„	97502	103	90	110	105	107
Átlag±S.E.		98±4	94±10	102±12	99±12	98±9

B. QRS időtartam

Kezelés	Kutya sorszám	Alap	0'	15'	30'	45'
DMPC/DPPC	97547	40	40	40	40	40
„	97481	44	45	47	43	43
„	97557	41	43	43	40	40
Átlag±S.E.		42±1	43±1	43±2	41±1	41±1
DPPC	97511	41	40	40	43	43
„	97454	45	36	42	42	40
„	97502	42	38	39	40	40
Átlag±S.E.		43±1	38±1	40±1	42±1	41±1

C. QT időtartam

Kezelés	Kutya sorszám	Alap	0'	15'	30'	45'
DMPC/DPPC	97547	197	203	213	217	213
"	97481	173	195	198	188	187
"	97557	227	248	247	232	220
Átlag±S.E.		199±16	215±17	219±15	212±13	207±10
DPPC	97511	205	228	228	222	207
"	97454	223	177	188	195	202
"	97502	220	209	222	227	233
Átlag±S.E.		216±6	205±15	213±12	215±10	214±10

D. QTc időtartam

Kezelés	Kutya sorszám	Alap	0'	15'	30'	45'
DMPC/DPPC	97547	292	309	272	244	253
"	97481	255	298	290	302	313
"	97557	248	272	285	285	333
Átlag±S.E.		249±3	293±11	282±5	277±17	300±24
DPPC	97511	245	281	255	254	240
"	97454	262	340	335	287	264
"	97502	285	275	215	242	258
Átlag±S.E.		264±12	299±21	268±35	261±13	254±7

6. Táblázat

A. DMPC/DPPC

Paraméter	Alapérték	Kezelés után 45 perccel	P-érték (páros-t)	@24 óra
Fehérvérsejtszám	12,5±4,0	16,3±4,0	0,009	16,4±3,2
Vörösvérsejtszám	5,96±0,08	5,97±0,27	0,974	6,12±0,13
Hematokrit	42,9±1,0	43,3±2,1	0,818	42,0±0,4
Vérlemezkék	252±87	140±47	0,203	227±58

B. DPPC

Paraméter	Alapérték	Kezelés után 45 perccel	P-érték (páros-t)	@24 óra
Fehérvérsejtszám	8,9±1,6	7,1±1,3	0,444	9,6±1,0
Vörösvérsejtszám	5,66±0,31	5,84±0,36	0,335	6,11±0,41
Hematokrit	41,2±1,4	42,2±1,7	0,433	42,8±2,0
Vérlemezkék	244±38	69±7	0,041	173±27

7. Táblázat

Szisztolés nyomás (Hgmm) EPC-vel kezelt kutyákban

USDA#	Alap	Infúzió	0'	15'	30'	45'
97513	140	70	130	140	140	145
97682	150	57	105	140	145	150
97492	165	65	145	180	185	190
97804	140	143	145	130	143	143
97684	150	145	140	140	143	140
Átlag±S.E.	149±5	96±20	133±8	146±8	151±8	154±9

8. Táblázat

Diasztolés nyomás (Hgmm) EPC részecskével kezelt kutyákban

USDA#	Alap	Infúzió	0'	15'	30'	45'
97513	95	35	100	90	100	95
97682	85	35	85	75	75	90
97492	95	42	90	115	105	110
97804	90	92	93	80	80	90
97684	92	90	88	80	75	70
Átlag±S.E.	92±2	59±13	91±3	88±7	87±6	91±6

9. Táblázat

Átlagos artériás nyomás (Hgmm) EPC-vel kezelt kutyákban

USDA#	Alap	Infúzió	0'	15'	30'	45'
97513	110	47	110	107	113	116
97682	107	42	92	97	98	110
97492	118	50	108	137	132	137
97804	107	110	110	97	101	108
97684	113	110	105	100	98	93
Átlag±S.E.	111±2	72±16	105±3	108±8	108±7	113±7

10. Táblázat

Szívritmus értékek (ütés/perc) EPC részecskével kezelt kutyákban

USDA#	Alap	Infúzió	0'	15'	30'	45'
97513	135	310	130	120	120	130
97682	90	220	50	65	100	130
97492	166	273	76	132	112	105
97804	113	115	139	109	94	118
97684	100	100	111	88	85	92
Átlag±S.E.	121±14	204±42	101±17	103±12	102±6	115±7

11. Táblázat

A. PR (msec) értékek EPC-vel kezelt kutyákban

USDA#	Alap	0'	15'	30'	45'
97513	85	83	87	93	92
97682	93	135	128	105	88
97492	87	101	87	85	81
97804	119	115	116	120	119
97684	107	101	96	100	97
Átlag±S.E.	98±6	107±9	103±8	101±6	95±6

B. QRS (msec) értékek EPC-vel kezelt kutyákban

USDA#	Alap	0'	15'	30'	45'
97513	35	40	37	39	40
97682	30	30	33	33	33
97492	35	35	35	35	35
97804	33	33	34	34	35
97684	34	34	35	35	33
Átlag±S.E.	33±1	34±2	35±1	35±1	35±1

C. QT (msec) értékek EPC-vel kezelt kutyaákban

USDA#	Alap	0'	15'	30'	45'
97513	195	197	200	209	197
97682	210	260	247	215	200
97492	163	228	188	170	180
97804	163	228	188	170	180
97684	210	211	235	232	226
Átlag±S.E.	196±9	219±11	217±11	209±11	202±7

D. QTc (msec) értékek EPC-vel kezelt kutyaákban

USDA#	Alap	0'	15'	30'	45'
97513	289	293	276	299	285
97682	270	233	298	320	283
97492	266	260	227	231	224
97804	267	296	261	289	302
97684	292	298	275	287	273
Átlag±S.E.	277±6	276±13	267±12	285±15	273±13

12. Táblázat

Vér értékek EPC-vel kutyákban

USDA#	Alap	45'	24 óra
	WBC	WBC	WBC
97513	10	13	13
97682	18	21	22
97492	20	19	18
97804	29	26	26
97864	9	9	11
Átlag±SEM	17±4	18±3	18±3
USDA#	RBC	RBC	RBC
97513	6	6	6
97682	6	6	6
97492	6	6	7
97804	6	6	6
97864	6	6	7
Átlag±SEM	6±1	6±1	6±2
USDA#	Hematokrit	Hematokrit	Hematokrit
97513	44	42	39
97682	44	42	38
97492	47	46	46
97804	41	41	38
97864	43	41	46
Átlag±SEM	44±1	43±1	41±2

13. Táblázat

A. Szisztolés nyomás

Kezelés	Kutya sorszám	Alap	Infúzió	0'	15'	30'	45'
SA 504/300591	98661	150	170	175	165	155	155
"	98411	130	140	145	145	150	140
"	98741	140	140	140	145	140	140
"	98783	145	135	160	140	145	170
"	10174	162	155	145	145	145	145
Átlag±S.E.		145±5	148±6	153±6	148±4	149±4	152±6
SA 504/020791	98682	205	195	210	190	200	195
"	10003	150	145	152	150	155	155
"	98701	155	155	145	145	140	145
Átlag±S.E.		170±18	165±15	169±21	162±14	165±18	165±15

B. Diasztolés nyomás

Kezelés	Kutya sorszám	Alap	Infúzió	0'	15'	30'	45'
SA 504/300591	98661	100	100	125	100	95	90
"	98411	65	70	80	80	80	70
"	98741	90	90	90	90	85	95
"	98783	70	75	90	70	70	90
"	10174	90	95	85	85	85	85
Átlag±S.E.		83±7	86±6	94±8	85±5	83±4	86±4
SA 504/020791	98682	105	130	115	105	105	110
"	10003	103	100	105	98	98	103
"	98701	85	90	80	98	107	109
Átlag±S.E.		98±6	107±12	100±10	98±4	96±6	101±6

C. Átlagos nyomás

Kezelés	Kutya sorszám	Alap	Infúzió	0'	15'	30'	45'
SA 504/300591	98661	117	123	142	122	118	115
"	98411	87	93	102	102	103	93
"	98741	107	107	107	108	103	110
"	98783	95	95	113	93	95	117
"	10174	114	115	105	105	105	105
Átlag±S.E.		104±6	107±6	114±7	106±5	105±4	108±4
SA 504/020791	98682	138	152	147	133	137	138
"	10003	119	115	121	115	117	120
"	98701	108	112	102	108	103	108
Átlag±S.E.		122±9	126±13	123±13	119±7	119±10	122±9

15. Táblázat

A. PR intervallum

Kezelés	Kutya sorszám	Alap	0'	15'	30'	45'
SA 504/300591	98661	97	111	107	105	104
"	98411	103	109	101	103	103
"	98741	99	104	109	104	105
"	98783	85	95	88	93	85
"	10174	97	107	111	105	107
Átlag±S.E.		96±3	105±3	103±4	102±2	101±4
SA 504/020791	98682	89	85	91	92	92
"	10003	104	109	121	108	119
"	98701	116	125	116	120	115
Átlag±S.E.		103±8	106±12	109±9	107±8	109±8

B. QRS időtartam

Kezelés	Kutya sorszám	Alap	0'	15'	30'	45'
SA 504/300591	98661	32	32	32	29	29
"	98411	31	31	33	31	31
"	98741	33	33	29	29	31
"	98783	28	28	25	28	28
"	10174	24	23	24	25	24
Átlag±S.E.		30±2	29±2	29±2	28±1	29±1
SA 504/020791	98682	27	27	28	28	31
"	10003	29	31	28	29	29
"	98701	24	25	23	25	25
Átlag±S.E.		27±1	28±2	26±2	27±1	28±2

C. QTc intervallum

Kezelés	Kutya sorszám	Alap	0'	15'	30'	45'
SA 504/300591	98661	172	160	171	175	187
"	98411	195	199	193	181	197
"	98741	181	187	185	192	184
"	98783	183	189	191	197	195
"	10174	176	184	176	173	167
Átlag±S.E.		181±4	184±6	183±4	184±5	186±5
SA 504/020791	98682	160	159	164	164	163
"	10003	189	196	199	201	205
"	98701	183	187	185	185	188
Átlag±S.E.		177±9	181±11	183±10	183±11	185±12

D. QRS időtartam

Kezelés	Kutya sorszám	Alap	0'	15'	30'	45'
SA 504/300591	98661	233	235	251	229	252
"	98411	228	236	234	248	245
"	98741	252	279	230	256	254
"	98783	218	289	232	233	234
"	10174	234	195	226	216	217
Átlag±S.E.		233±6	247±17	235±4	236±7	240±7
SA 504/020791	98682	232	238	202	241	215
"	10003	270	278	277	239	266
"	98701	262	244	251	267	229
Átlag±S.E.		255±12	253±12	243±22	249±9	237±15

16. Táblázat

A. RBC (millió/ml)

Kezelés	Kutya sorszám	Kontroll	45'
SA504/300591	98661	6,5	6,4
"	98411	6,1	6,2
"	98741	6,7	6,7
"	98783	6,6	6,7
"	10174	7,3	6,6
Átlag±S.E.		6,6±0,2	6,5±0,1
SA 504/020791	98682	6,9	6,9
"	10003	5,7	5,7
"	98701	6,8	6,6
Átlag±S.E.		6,5±0,4	6,4±0,4

B. WBC (ezer/ml)

Kezelés	Kutya sorszám	Kontroll	45'
SA504/300591	98661	9,2	12,8
"	98411	13,9	19,2
"	98741	9,0	10,1
"	98783	9,8	8,6
"	10174	13,8	27,3
Átlag±S.E.		11,1±1,1	15,6±3,4
SA 504/020791	98682	9,8	13,6
"	10003	10,8	17,3
"	98701	6,8	9,1
Átlag±S.E.		9,1±1,2	13,3±2,4

17. Táblázat

	BPmean (%)	HR (%)	LVEDP (\Hgmm)	dP/dt max (%)	CO (%)	TPR (%)
Hordozó (300 mmol/l mannitol)	+1,8	-3,4	+2,8	-3,3	-4,5	+6,5
DSPC vs. kontroll	-53,7***	-7,2	+12,5*	-34,7**	-13,2	+15,3 (1 perc)* -46,3 (7 perc)***
DSPC/DSPG vs. kontroll	+12,3 (2 perc)* -33,3 (6 perc)***	-3,6	+5,3	-14,3**	-4,8	+11,8 (2 perc) -35,5 (7 perc)***
DSPC vs. DSPC/DSPG	***	n.s.	*	n.s.	*	n.s

n=6 *p<0,05, **p<0,001, Student féle t-teszt

A hemodinámiás és szív paraméterek maximális százalékos változása a különböző lipidekből (300 mg lipid/kg, 100 mg lipid/kg/perc) készült liposzómák combcsonti vénába való infúziójának megkezdése után 10 perccel.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás egy parenterálisan beadható liposzóma készítmény hemodinámiás hatásainak csökkentésére, amely, ha egy emlősnek beadjuk, hemodinámiás hatásokat okozhat, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

a liposzóma készítménybe beadás előtt olyan mennyiségű elektromos töltésű komponenst juttatunk be, amely hatékonyan képes csökkenteni az említett hemodinámiás hatásokat, és az említett mennyiséget az említett liposzóma készítményben levő említett komponens mellé pluszban adjuk hozzá.

2. Eljárás egy gazdaszervezet toleranciájának fokozására egy parenterálisan beadható liposzóma készítménnyel szemben, azzal jellemezve, hogy:

a liposzóma készítménybe egy elektromos töltéssel rendelkező komponensből olyan mennyiséget viszünk be, az említett liposzóma készítményben az említett komponensből már meglevő mennyiség mellé, amely hatékonyan képes növelni az említett toleranciát.

3. Eljárás egy káros szisztémás hatásokkal rendelkező aktív adalékanyag beadására, azzal jellemezve, hogy az eljárást úgy javítjuk meg, hogy a liposzóma készítménybe a beadás előtt megfelelő mennyiségű, az említett káros szisztémás hatásokat csökkenteni képes komponenst juttatunk be, és az említett mennyiséget az említett komponensből az említett liposzómában már meglevő mennyiség mellé juttatjuk be a liposzómába.

4. Eljárás egy gazdaszervezetben levő szövet leképezésére, melynek során egy káros szisztémás mellékhatásokat okozó liposzóma készítménybe kapszulázott kontrasztanyagot adunk be, azzal jellemezve, hogy az eljárás javítása céljából a liposzóma készítménybe a beadás előtt az említett szisztémás mellékhatások csökkentésére képes, elektromos töltéssel rendelkező komponenst juttatunk be, amelynek

mennyiségét az említett liposzóma készítményben már meglevő említett komponens mellé visszük be a liposzómába.

5. Eljárás egy parenterálisan beadható liposzóma készítmény hemodinámiás hatásainak csökkentésére, azzal jellemezve, hogy egy olyan liposzóma készítményt adunk be, amely a liposzóma beadáshoz kapcsolódó hemodinámiás hatások csökkentésére alkalmas mennyiségű elektromos töltéssel rendelkező komponenst tartalmaz.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az elektromos töltésű komponensnek negatív töltése van.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az elektromos töltésű komponens zsírsav.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az elektromos töltésű komponens sztearinsav.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a liposzóma egy aktív ágenst is tartalmaz.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a liposzóma egy kontrasztágenst is tartalmaz.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kontrasztanyag iopromid.

12. Új liposzóma készítmény, amelyet úgy állítunk elő, hogy egy olyan liposzómába, amely nem tartalmaz elektromos töltésű komponenst, és amelynek egy emlősnek való beadás során káros szisztémás hatása van, a beadás előtt az említett szisztémás mellékhatások csökkentésére képes, elektromos töltéssel rendelkező komponenst juttatunk be, amelynek mennyiségét az említett liposzóma készítményben már meglevő említett komponens mellé visszük be a liposzómába.

13. A 12. igénypont szerinti liposzóma, amelyben az elektromos töltésű komponensnek negatív töltése van.

14. A 12. igénypont szerinti liposzóma, amelyben az elektromos töltésű komponens zsírsav.

15. A 12. igénypont szerinti liposzóma, amelyben az elektromos töltésű komponens sztearinsav.

16. A 12. igénypont szerinti liposzóma, amelyben a liposzóma egy aktív ágenst is tartalmaz.

17. A 12. igénypont szerinti liposzóma, amelyben a liposzóma egy kontrasztágenst is tartalmaz.

18. Új liposzóma készítmény, amelyet úgy állítunk elő, hogy egy olyan liposzómába, amely elektromos töltésű komponenszt tartalmaz, és amelynek egy emlősnek való beadás során káros szisztémás hatása van, a beadás előtt az említett szisztémás mellékhatások csökkentésére képes, elektromos töltéssel rendelkező komponenszt juttatunk be, amelynek mennyiségét az említett liposzóma készítményben már meglevő említett komponens mellé visszük be a liposzómába.

19. A 18. igénypont szerinti liposzóma, amelyben az elektromos töltésű komponensnek negatív töltése van.

20. A 18. igénypont szerinti liposzóma, amelyben az elektromos töltésű komponens zsírsav.

21. A 18. igénypont szerinti liposzóma, amelyben az elektromos töltésű komponens sztearinsav.

22. A 18. igénypont szerinti liposzóma, amelyben a liposzóma egy aktív ágenst is tartalmaz.

23. A 18. igénypont szerinti liposzóma, amelyben a liposzóma egy kontrasztágenst is tartalmaz.

24. Új eljárás káros mellékhatásokkal rendelkező liposzóma készítménybe kapszulázott terápiás ágens beadására, azzal jellemezve, hogy a liposzóma káros mellékhatását úgy küszöböljük ki, hogy a beadás előtt az említett szisztémás mellékhatások csökkentésére képes, elektromos töltéssel rendelkező komponenst juttatunk be a liposzóma készítménybe, amelynek mennyiségét az említett liposzóma készítményben már meglevő említett komponens mellé visszük be a liposzómába.

25. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett liposzóma készítménybe beépített elektromos töltésű komponens sztearinsav, és olyan mennyiségben visszük be, hogy a liposzóma 4:5:1 arányban tartalmaz foszfatidilkolint, koleszterolt és sztearinsavat.

26. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett liposzóma készítménybe beépített elektromos töltésű komponens sztearinsav, és olyan mennyiségben visszük be, hogy a liposzóma 9:1 arányban tartalmaz foszfatidilkolint és sztearinsavat.

27. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett liposzóma készítménybe beépített elektromos töltésű komponens DSPG, és olyan mennyiségben visszük be, hogy a liposzóma 9:1 molarányban tartalmaz DSPC-t és DSPG-t.

28. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az elektromosan töltött komponens a DSPG.

29. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az elektromosan töltött komponens a DSPG.

30. A 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az elektromosan töltött komponens a DSPG.

31. A 24. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az elektromosan töltött komponens a DSPG.

32. Eljárás egy parenterálisan beadható liposzóma készítmény hemodinámiás hatásainak csökkentésére, amely készítmény, ha egy emlősnek beadjuk, hemodinámiás hatásokat okoz, azzal jellemezve, hogy:

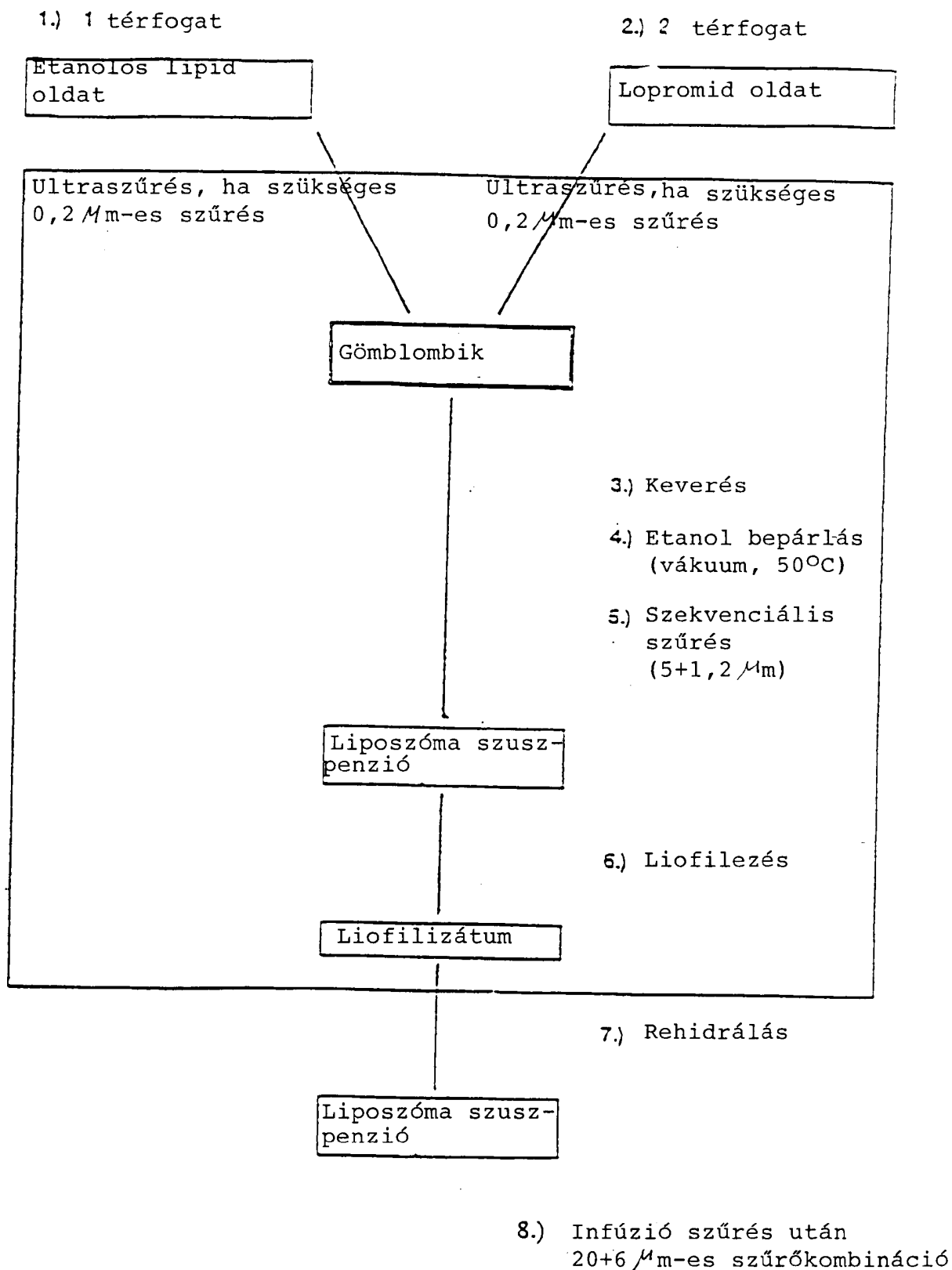
azonosítunk egy liposzóma készítményt, amelynek káros hemodinámiás mellékhatásai vannak, és

az említett liposzóma készítménybe az említett hemodinámiás hatások csökkentésére elektromosan töltött komponenst viszünk be, amelynek mennyiségét az említett liposzóma készítményben már meglevő említett komponens mellé visszük be a liposzómába.

A meghatalmazott

ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G./& K. Nemzeti
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 112.
tel: 34-24-950, Fax: 34-24-323

1. ábra



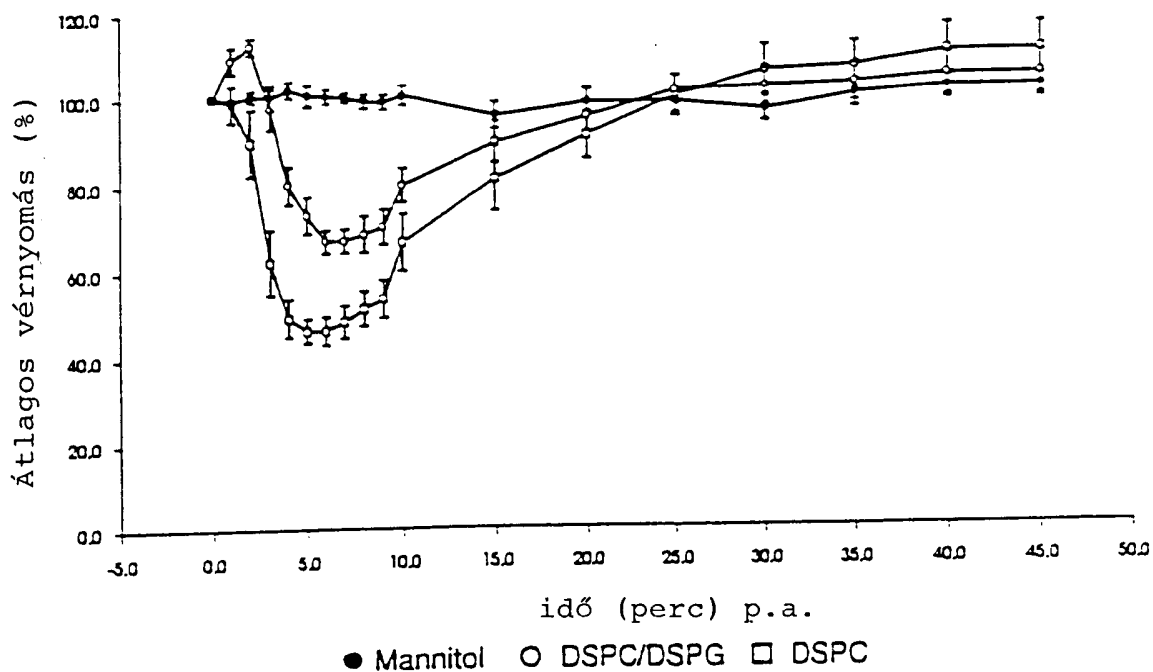
1190/96

30930

2/4

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

2. ábra



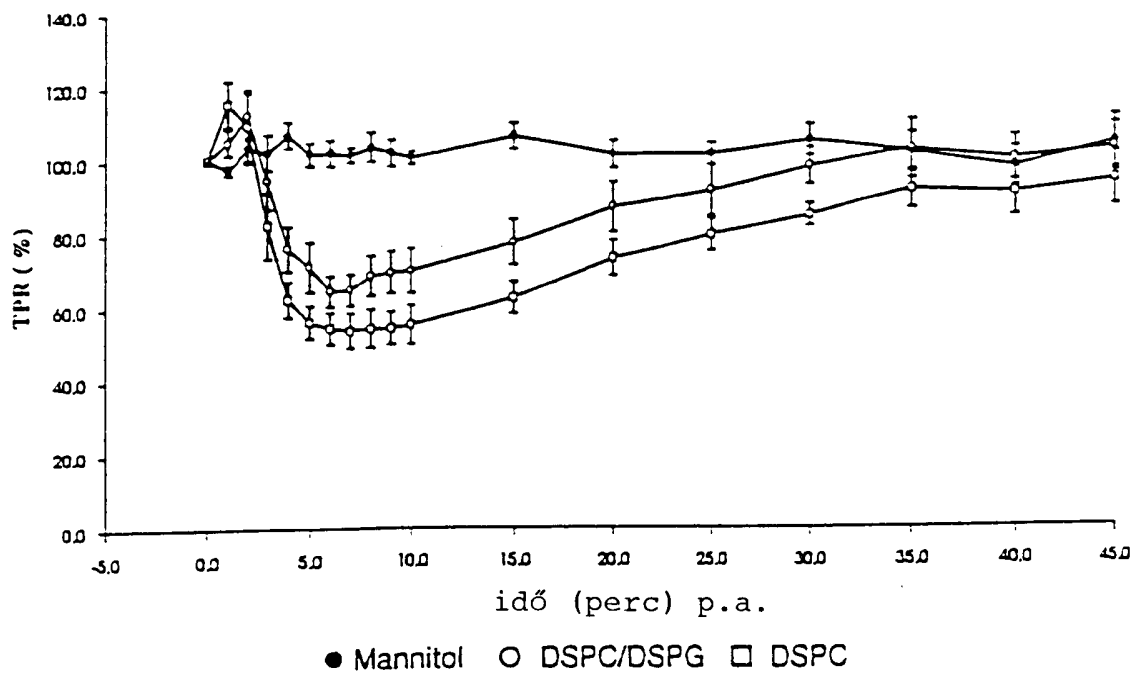
1190/96

30930

3/4

3. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzeti
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Tel. 24-930, Fax. 34-34-323

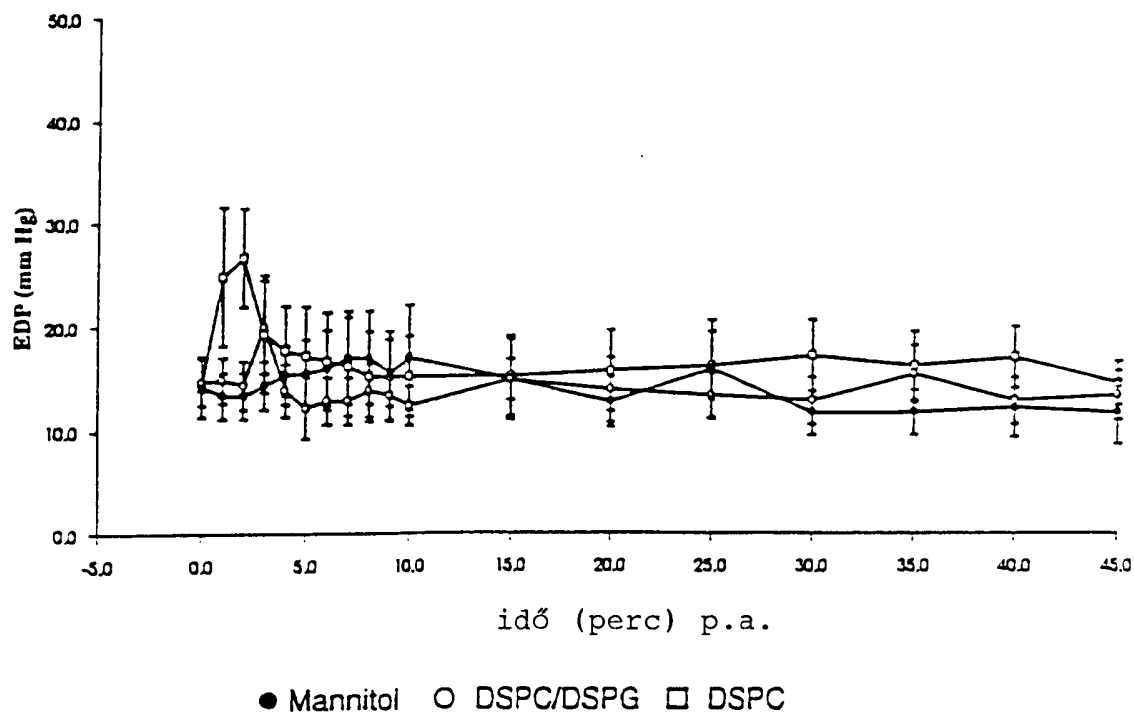
11.9.0/96

30970

4/4

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

4. ábra



ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzeti
Szabadalmi Iroda tagja
H-1063 Budapest, Andrássy út 113.
Tel.: 24-350, Fax: 24-323