



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **313786**

(13) B1

(51) Int Cl⁷ A 61 K 31/575, 31/685, A 61 P 31/04

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19970582	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1995.08.10. PCT/US95/10189
(22) Inng. dag	1997.02.07	(85) Videreføringsdag	1997.02.07
(24) Løpedag	1995.08.10	(30) Prioritet	1994.08.10. US. 288568
(41) Alm. tilgj.	1997.04.07		1995.06.07. US. 487459
(45) Meddelt dato	2002.12.02		

(71) Patenthaver
(72) Oppfinner

Sepsicure L.L.C, One Harmon Plaza, Secaucus, NJ 07094, US
Daniel M. Levine, New York, NY, US
Thomas S. Parker, Brooklyn, NY, US
Albert L. Rubin, Englewood, NJ, US
Bruce R. Gordon, New York, NY, US
Stuart D. Saal, New York, NY, US

(74) Fullmektig
Bryn Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) Benevnelse **Proteinfrie og peptidfrie farmasøytiske blandinger, samt anvendelse derav for fremstilling av medikamenter**

(56) Anførte publikasjoner US 4115313, EP A 74251, DE C2 2556592, EP A 391369, US 4314997

(57) Sammendrag

Behandling og profylakse av endotoksisitet fremkalt av endotoksin blir beskrevet. Dette oppnås ved tilførsel av fosfolipidholdige blandinger til individet. Blandingene er fri for protein og peptid, og kan inneholde triglycider, andre polare eller nøytrale lipider, gallesyrer eller gallesyresalter.

Denne oppfinnelse vedrører proteinfrie og peptidfrie farmasøytiske blandinger, samt anvendelse derav for fremstilling av medikamenter. Mer spesifikt relaterer den til anvendelse av farmasøytiske blandinger for fremstilling av medikament for behandling eller profylakse av et menneske eller dyr som lider av endotoksinemi. Blandingene virker ved å nøytralisere og/eller fjerne endotoksiner fra organismen enten som behandling av slik forgiftning eller som profylakse.

Endotoksinsjokk er en tilstand, ofte dødelig, som fremmes ved frisetting av lipopolysakkarid (LPS) fra den ytre membran fra de fleste gram-negative bakterier (f.eks. *Escherichia coli*; *Salmonella typhimurium*). Strukturen til det bakterielle LPS er blitt relativt godt klarlagt, og et unikt molekyl som blir beskrevet som lipid A, som er bundet til acylkjeder via lipid A-molekylets glukosaminryggrad. Se Raetz, Ann. Rev. Biochem. 59:129-170 (1990) med henblikk på dette.

Lipid A-molekylet fungerer som et membrananker til en lipo-polysakkaridstruktur ("LPS") og det er LPS som er implisert i utviklingen av endotoksinsjokk. Det bør understrekes at LPS-molekyler er karakterisert ved en lipid A-struktur og en polysakkariddel. Den senere molekylidel kan variere i molekylære detaljer hos ulike LPS-molekyler, men den vil bevare de generelle strukturelle motiver som er karakteristiske hos endotoksiner. Det vil ikke være korrekt å påstå at LPS-molekylet er det samme fra bakterie til bakterie (se Raetz, *supra*). Det er vanlig på fagområdet å beskrive de ulike LPS-molekyler som "endotoksiner", og denne betegnelse vil bli benyttet heretter for å referere til LPS-molekyler i sin helhet.

I US-patent nr. 5.128.318, hvis beskrivelse og innhold blir inkorporert som referanse, ble det beskrevet at rekonstituerte partikler som inneholdt både et HDL-assosiert apolipoprotein og et lipid som hadde evne til binde et endotoksin for å inaktivere det, kunne bli benyttet som effektive materialer for å lindre toksisitet fremkalt av endotoksin.

I de forrige søknader og søknadene før der sitert i den relaterte søknadsseksjonen og inkorporert som referanse her, ble det oppgitt at ulike andre materialer kan benyttes for å behandle endotoksin-fremkalt toksisitet. Det ble spesielt funnet at apolipoproteiner ikke er nødvendig i de rekonstituerte partikler, og at den rekonstituerte partikkel kan inneholde et peptid og et lipid der peptidet ikke er et apolipoprotein.

Det ble også funnet av oppfinnerne at endotoksin-fremkalt toksisitet kan bli behandlet via påfølgende tilførsel av enten et apolipoprotein eller et peptid etterfulgt av et lipid. Etter en slik sekvensiell tilførsel samler komponentene seg som en rekon-stituert partikkel og fungerer deretter i å fjerne endotoksin.

5 Det ble også funnet at minst noen individer har medfødte nivåer av apolipoprotein som er høyere enn de normale nivåer slik at effektiv endotoksinemi-behandling kan bli gjennomført ved tilførsel av rekonstituerte partikler som ikke inneholder apolipoprotein eller peptid, men inneholder oppfinnelsens lipid.

10 I tillegg omfattet oppfinnelsen som beskrives i disse søknader bruk av de rekonstituerte partikler og komponentene som blir diskutert her som profylaktisk behandling mot endotoksin-fremkalt toksisitet, ved tilførsel profylaktisk av effektive mengder til individer som har behov for profylakse. Slike individer inkluderer pasienter som er utsatt for infeksjoner eller som helbredes etter kirurgisk behandling. Disse pasienter har noen ganger meget lave plasma HDL-nivåer, 15 noen ganger så lave som 20% av normale nivåer. Det er i disse tilfeller meget ønskelig å gi tidlig profylakse med HDL, for å kompensere for disse tap.

Det er nå overraskende funnet, at fosfolipider kan bli benyttet i kombinasjon med ytterligere materialer slik som nøytrale lipider og cholater, som effektive midler for å lindre og/eller forhindre endotoksinemi.

20 I et første aspekt angår foreliggende oppfinnelse en anvendelse av en proteinfri og peptidfri farmasøytisk blanding omfattende en cholansyre eller cholansyresalt, et fosfolipid og et nøytralt lipid for fremstilling av et medikament for behandling eller profylakse av et menneske eller dyr som lider av endotoksinemi.

25 I andre aspekt av foreliggende oppfinnelse omfattes en proteinfri og peptidfri farmasøytisk blanding egnet for intravenøs administrering omfattende en cholansyre eller cholansyresalt, et fosfolipid og et nøytralt lipid hvor det nøytrale lipidet er tilstede fra 3% opp til 50 vekt% i forhold til den totale mengden av lipid, samt en proteinfri og peptidfri farmasøytisk blanding omfattende en gallesyre/-gallesyresalt, et fosfolipid, og et nøytralt lipid hvor blandingen omfatter fra 5% til 30 30 vekt% gallesyre/gallesyresalt, fra 3% til 50 vekt% av nøytralt lipid, og fra 10% til 95 vekt% av fosfolipid, hvor blandingen er en vandig emulsjon.

I et ytterligere aspekt av oppfinnelsen omfattes en anvendelse av en farmasøytisk blanding i henhold til et hvilket som helst av kravene 6-16 for

fremstilling av et medikament for behandlingen eller profylaksen av et menneske eller dyr som lider av endotoksinemi.

Det er spesielt foretrukket å benytte fosfatidylcholin ("PC" heretter), enten alene eller i kombinasjon med andre fosfolipider slik som sfingolipider i blandinger som er hovedsakelig uten peptider og proteiner slik som apolipoproteiner eller peptider som er avledet fra disse. Nøytrale lipider, f.eks. mono-, di- og triglycider kan bli kombinert med fosfolipidene så lenge den totale mengde av nøytrale lipider er under en viss vektprosent når blandingene blir benyttet som en intravenøs bolusinjeksjon. Ved anvendelse av andre tilførselsformer, f.eks. intravenøs ved kontinuerlig infusjon er vektprosentene ikke så kritiske, men de samme begrensninger er ønskelig.

Spesielt foretrukne varianter av oppfinnelsen inkluderer emulsjoner hvor en gallesyre, eller et gallesyresalt blir benyttet sammen med et fosfolipid og et nøytralt lipid.

Effektiviteten av gallesyrer og gallesyresalter som er cholater i behandling av endotoksinemi blir vist her. Disse gallesyrer kan benyttes med ett eller flere fosfolipider og/eller nøytrale lipider, f.eks. et fosfatidylcholin og/eller et triglycerid.

Oppfinnelsen blir beskrevet i større detalj i beskrivelsen som følger.

Kort beskrivelse av figurene

Fig. 1A og 1B viser resultater oppnådd når ulike blandinger ble testet i en modell som bestemte nøytralisering av endotoksin ved at TNF-frisetting ble bestemt i en total menneskeblod-modell. Fig. 1A viser proteinets rolle og 1B fosfolipidets rolle. Sammensetningene testet inkluderte naturlige lipoproteiner (VLDL, LDL, HDL), og rekonstituert HDL ("R-HDL"), og INTRALIPID® blandinger, såvel som emulsjoner som inneholdt fosfolipid og protein.

Fig. 2A og 2B sammenligner rollene til triglycerid (et nøytralt lipid), og fosfatidylcholin, et fosfolipid, i den samme modell.

Fig. 3 presenterer informasjon om toksisitet som er tilknyttet tilførsel av ulike PC og PC/TG-blandinger i en musemodell, der det benyttes en 55% dødelighetsmodell med *E. coli* LPS blir tilført.

Fig. 4 viser data sammenlignbare til dem som ble oppnådd i den humane helblodmodell, se ovenfor, men ved anvendelse av fosfolipid med ikke-esterifisert kolesterol, sfingomyelin, eller blandinger av begge disse istedenfor triglycider.

Fig. 5A og 5B viser resultater som er sammenlignbare med dem som vises i fig. 1A og 1B med unntak at i disse nye figurer blir fosfolipid, ikke-esterifisert kolesterol og/eller sfingomyelin blandet med triglycider eller esterifisert kolesterol som det nøytrale lipid.

5 Fig. 6 sammenligner resultater oppnådd fra kolesterolester og triglycid-inneholdende emulsjoner, under bruk av *in vivo* musemodellen.

Fig. 7 fremstiller grafisk de teoretiske mengder av triglycider som frisettes i blodet etter tilførsel av ulike TG-inneholdende blandinger, med terskelverdier for toksisitet. "TPN" står for "total parenteral ernæring", mens "RI" står for blandinger ifølge oppfinnelsens beskrivelser.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsens utførelser

Eksempel 1

15 Faktorer som affiserer den LPS-medierte stimulering av TNF- α (tumor-nekrosefaktor- α) mens de samtidig opprettholder integriteten til interaksjoner mellom plasmaproteiner og cellulære blodelementer, kan bli studert på en adekvat måte i et *in vitro*, humant helblodssystem. Et slikt system ble benyttet for å avgjøre hvilken lipoproteinkomponent som er viktig for å nøytralisere LPS.

20 Materialer som ble analysert var rekonstituert høytetthets lipoprotein (R-HDL), naturlig plasma lipoproteiner (VLDL, LDS, HDL), serum som manglet lipoprotein (LPDS), og den triglycid-rike emulsjon 20% INTRALIPID® (en blanding av triglycider og fosfolipider).

25 Blod ble samlet i et heparinisert rør, fortynnet med Hank's balanserte saltløsning ("HBSS" heretter), eller materialet som skulle bli analysert oppløst i HBSS. Det resulterende materiale ble overført til Starstedt-rør (250 μ l/rør). LPS ble oppløst i pyrogenfritt saltvann som inneholdt 10 mM HEPES, og tilsatt (2,5 μ l) til en sluttkonsentrasjon på 10 ng/ml. Etter 4 timers inkubering ved 37°C ble rørene kjølt til 4°C, etterfulgt av sentrifugering ved 10.000xg i 5 minutter.

30 Supernatanten ble samlet og analysert for tilstedeværelse av TNF- α , idet det ble brukt et kommersielt tilgjengelig ELISA.

Tabell 1, som følger, sammenligner sammensetningene av materialene som ble analysert. Fig. 1A og 1B presenterer resultatene. Resultater blir fremstilt som mengde TNF- α som ble produsert som funksjon av konsentrasjon av tilsatt

protein (fig. 1A), og fosfolipid (fig. 1B). Logaritmiske skalaer ble benyttet for å vise de brede konsentrasjonsområder som ble benyttet, der 10° er det samme som 1 mg/ml. Alle helblods-inkuberinger inneholdt 10 ng/ml med *E. coli* 0111:4B LPS, tilsatt én av blandingene slik teksten i fig. 1A og 1B viser.

Det faktum at materialene har ulik effektivitet når de vurderes etter proteininnhold (fig. 1A) mens de er svært like når fosfolipidinnhold blir vurdert (fig. 1B) antyder at fosfolipid er den viktige komponent. Dette bekreftes ved at en proteinfri fettemulsjon ble funnet å være mer effektiv enn naturlig HDL, men mindre effektiv enn R-HDL. Protein synes ikke å være viktig for å fremkalle nøytralisering.

Sammensetning av naturlige lipoproteiner og rekonstituert HDL

Lipoprotein		TC	TG	PC	Protein
Klasse	Tetthet (g/ml)	Vekt%			
VLDL	<1,006	22	53	18	7
LDL	1,007-1,063	48	11	22	20,9
HDL	1,063-1,21	18	8	22	52
R-HDL	1,063-1,21	-	-	79	21
LPDS	>1,21	0	0	2	98
Intralipid	-	1	93	6	0

Eksempel 2

Som det neste skritt ble proteinfrie fettemulsjoner som inneholdt ulike mengder av nøytralt lipid testet i humant helblod. Det samme *in vitro* humant helblod-analysesystem som beskrevet i eks. 1 ble benyttet.

Alle partikler som beskrives her ble preparert via den samme protokoll, som involverte å blande et fosfolipid, sfingomyelin eller fosfatidylcholin, triolein og/eller ikke-esterifisert kolesterolester, oppløst i kloroform, og veie det opp i en flaske. Vitamin E (0,02% vekt/vol) ble tilsatt som antioksydant. En tørr lipidfilm ble deretter fremstilt ved å blåse nitrogen eller argongass over prøven. Et volum ikke-pyrogent saltvann ble deretter tilsatt til flasken, etterfulgt av blanding på en Vortex blandemaskin til alt lipid var suspendert i løsning. Løsningen ble deretter

homogenisert i en høytrykks homogenisator. Prøver som inneholdt fosfatidylcholin (PC) med eller uten triolein ble sendt gjennom homogenisatoren 10 ganger ved 20.000 psi. Prøver som inneholdt kolesterolester med ett eller flere andre lipider ble sendt gjennom 15-20 ganger ved 30.000 psi. Homogeniserte løsninger ble filtrert gjennom 0,45 μ m sprøytefiltere og filtratet ble lagret ved romtemperatur til det ble benyttet (innen 3 dager). Fig. 2A og 2B presenterer disse resultater. I disse studiene er LPS-avhengig, TNF- α produksjon plottet mot konsentrasjon av tilsatt triglycerid (fig. 2A), eller fosfolipid (fig. 2B). Blandingene som indikeres i figurteksten inneholdt (i vektenhet) 7% triglycerid ("TG"), 45% TG, 89% TG, 94% TG, R-HDL, eller fosfolipid uten TG (kun vist i fig. 2B). En 89% TG-blanding er en 10% INTRALIPID®-formulering, mens 94% TG henviser til 20% INTRALIPID. I alle andre analyser ble egg fosfatidylcholin (PC) og triolein benyttet.

Disse resultater viser at de proteinfrie blandinger er svært ulike når de sammenlignes via triglyceridinnhold. De er meget like når de sammenlignes via fosfolipid (PC)-innhold. Dette bekrefter fosfolipidets rolle, spesielt siden fosfolipid alene også har effekt, men er mindre effektivt enn emulsjoner som inneholder opp til 45% TG.

Eksempel 3

Arbeidet ble deretter ført videre til *in vivo* eksperimenter i en musemodell som er akseptert som et pålitelig system som kan brukes til å forutsi human effektivitet.

I disse eksperimenter ble mus injisert i bolus form med tilstrekkelige mengder av formuleringene som er beskrevet i eks. 2 og i andre (rent fosfatidylcholin, 7% TG, 25% TG, 45% TG, 71% TG, 81% TG, 89% TG, 94% TG), eller en saltvannskontroll for å gi fosfolipid-doser (enten 200 mg/kg eller 400 mg/kg), sammen med 25 mg/kg av *E. coli* 0111:B4 LPS. Kontrollgruppen mottok intravenøst fysiologisk saltvann i et tilsvarende volum som emulsjonsvolumet. Overlevelse etter 72 timer er vist i fig. 3. I kontrollgruppen på 344 dyr overlevde 155.

PC alene hadde en moderat beskyttende virkning, som ikke var statistisk signifikant på 95% konfidensnivå, mens 7%, 45% og 71% TG-blandinger signifikant forbedret overlevelse. 80% og 89% TG-blandingene var marginalt effektive, mens 94% TG senket overlevelsen.

Når dosen ble øket til 400 mg/kg av PC ga både 89% og 94% TG-emulsjonene en signifikant senket overlevelsestid, sannsynligvis forårsaket av TG-forgiftning som forklares nedenfor.

5 **Eksempel 4**

Arbeidet beskrevet i eksemplene 1-3 etablerte at fosfolipider representerer et aktivt middel som kan benyttes i å hemme endotoksinemi. Det faktum at ikke-polare lipider i tillegg til triglycider kan danne emulsjoner med fosfolipider i tillegg til PC antydte at andre kunne bli forsøkt. Eksempler er f.eks. sfingomyelin (et
10 annet fosfolipid), og ikke-esterifisert kolesterol (et polart nøytralt lipid) og blandinger av disse. På lignende måte kan esterifisert kolesterol (en ikke-polar ester), squalen (et hydrokarbon) og vitamin E (en ikke-polar antioksydant) bli benyttet. En serie med eksperimenter ble utført for å teste disse, idet det humane helblodsystem beskrevet i eks. 1 ovenfor, og museoverlevelsestesten i eks. 3 ble
15 benyttet.

Emulsjoner ble preparert på samme måte som beskrevet ovenfor ved bruk av rent fosfatidylcholin, fosfatidylcholin med 10% (v/v) uesterifisert kolesterol, 10% (v/v) sfingomyelin eller 10% totalt av en blanding av begge. Emulsjoner ble tilsatt helblod i en konsentrasjon av 100 mg/dl, med referanse til PC, og 10 ng/ml LPS.
20 Blandingen ble inkubert og TNF- α -frisetting ble målt.

Resultatene er vist i fig. 4. TNF- α -produksjon ble betydelig senket med PC alene. Emulsjoner som inneholdt ikke-esterifisert kolesterol, sfingomyelin eller blandinger av begge førte også til hemming av TNF- α -frisetting.

25 **Eksempel 5**

Helblod-analysen ble også benyttet for å bestemme effekten av ikke-esterifisert kolesterol og/eller sfingomyelin til nøytrale lipid-inneholdende emulsjoner. Emulsjonene ble igjen tilsatt i en konsentrasjon av 100 mg/dl PC. De ulike blandinger (v/v) blir beskrevet i den følgende tabell.
30

	<u>Emulsjon</u>	<u>Sammensetning</u>
	PC med 45% TG	55:45
	PC+TG+C	54,4:45:3:0,3
	PC+TG+SP	51,6:43,0:5,4
5	PC+TG+C+SP	51,4:42,9:0,3:5,4
	PC+CE	54,5:45,5
	PC+CE+C	54,4:45,3:0,3
	PC+CE+SP	51,6:43,0:5,4
10	PC+CE+C+SP	51,5:42,9:0,3:5,4

Fig. 5A og 5B viser resultatene. PC-emulsjoner fremstilt enten med nøytralt lipid med eller uten polare lipider viste inhibisjon. LPS-konsentrasjonen var igjen 10 ng/ml, som er en klinisk relevant konsentrasjon av endotoksin. Kolesterol-15 ester-inneholdende emulsjoner var mindre effektive enn TG-inneholdende emulsjoner, mens de emulsjoner som inneholdt ikke-esterifisert kolesterol ikke hemmet TNF- α så godt som de emulsjoner som ikke inneholdt dette. Tilsetning av sfingomyelin til emulsjonene syntes å forbedre den inhiberende effekt på TNF- α -produksjon.

20 Eksempel 6

Kolesterol-25 ester-inneholdende emulsjoner ble testet i en *in vivo* modell (d.v.s. den modell som benyttes i eks. 3), med en letal dose av endotoksin. Emulsjoner ble preparert med PC og TG eller PC og kolesterol-ester (CE), og ble tilført for å gi en enkel bolus dose på 200 mg/kg av PC sammen med 25 mg/kg av *E. coli* 0111:B4 LPS (en letal dose), gjennom halevene-injeksjon. Kontrollgrupper mottok intravenøst fysiologisk saltvann i et tilsvarende volum som emulsjonsvolumet.

Data i fig. 6 sammenligner resultatene oppnådd med emulsjoner 30 inneholdende CE og TG. Hver emulsjon ble testet i minst to eksperimenter, ved bruk av 16 eller flere dyr.

Som vist, forbedret emulsjoner som inneholdt 7% eller 45% CE (vekt%) signifikant overlevelsen. Disse resultater sammen med de vist i eks. 5, viser at CE kan substitueres for TG for å produsere emulsjoner som nøytraliserer endotoksin.

Eksempel 7

Proteinfrie emulsjoner av fosfolipid med triglycerid blokkerer effektivt TNF- α -produksjon i helblod som er stimulert med LPS. Teoretisk kan disse emulsjoner også være effektive *in vivo* hvis de kan tilføres på en sikker måte i doser som gir konsentrasjoner av fosfolipid i plasma som er beskyttende. Våre tidligere eksperimenter med R-HDL antyder at den minimale dose fosfolipid er omtrent 200 mg/kg. Ved å bruke denne dose og et plasmavolum på 4,5% av kroppsvekt kan man kalkulere konsentrasjonen av triglycerid som kan forventes i plasma etter tilførsel av en serie av emulsjoner med økende triglyceridinnhold. Resultat vises i fig. 7 som en jevn oppad konkav linje som funksjon av økende vekt% TG. Plasma TG-konsentrasjoner går sjelden over 1000 mg/dl hos sunne individer selv etter et fett-rikt måltid. Bukspyttkjertelbetennelse er beskrevet hos pasienter med plasma TG over 2000 mg/dl (Farmer et al., Amer. J. Med. 54: 161-164 (1973); Krauss et al., Amer. J. Med. 62: 144-149 (1977); Glueck et al., J. Lab. Clin. Med. 123: 59-61). Plasma TG-nivåer over 4000 mg/dl er ekstremt sjeldent og bør fremkalle alvorlig uro. De siste to terskler vises som horisontale linjer i figuren beskrevet ovenfor. Tilførsel av enten 10% eller 20% INTRALIPID® i en dose som gir 200 mg/kg fosfolipid forventes å øke plasma TG-konsentrasjoner (se de to åpne sirkler på figuren) som ligger godt over de trygge grenser. I motsetning til dette gir tilførsel av emulsjoner som inneholder 7%, 45%, 71% eller 78% (fylte kvadrater fra venstre mot høyre) økning av plasma TG til 136, 477, 1300 eller 2000 mg/dl, resp. Emulsjoner med TG-innhold opp til ca. 50% forventes ikke å gi toksisitet fra TG.

Eksempel 8

Effektiviteten av kombinasjoner av fosfolipid og en galle-syre, f.eks. natriumcholat, ble testet i den samme type eksperiment som er beskrevet i de tidligere eksempler.

Prosedyren hvormed formuleringen som ble tilført dyrene ble preparert var imidlertid forskjellig.

I dette eksempel og i eksemplene som følger ble formuleringer preparert ved bruk av en Microfluidizer høytrykks-homogenisator. Dette apparat forenkler økning av prøvevolumer.

Enten flytende triolein eller flytende soyatriglycerid ble veiet opp i en passende mengde vann, eller vann pluss 9 mM, 18 mM eller 36 mM

natriumcholat. Fast, granulært fosfatidylcholin ble veiet på et veiepapir og deretter
 langsomt satt til løsningen under omrøring. Det kreves fra 3-5 minutter for å
 fordele lipidet. Etter fordeling ble materialene hellet inn i microfluidizer-
 homogenisatoren. Apparatet benytter hydraulisk trykk for å starte en pumpe som
 5 deretter retter to stråler med prøve mot hverandre. Trykket kan bli så høyt som
 25.000 pund pr. kvadrattomme. Når strålene kolliderer blir de presset gjennom en
 åpning formet som et plusstegn, hvorved prøven blir homogenisert.

Prøven ble resirkulert gjennom "microfluidizer"-apparatet, med "én
 passasje" definert som den tid det tok å pumpe hele prøven gjennom maskinen.
 10 Prøven ble sirkulert i 20 passasjer, for å produsere en homogenisert prøve.
 Dekstrose ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 5%.

Endotoksin rensset fra *E. coli* 0111:B4 (40 mg/kg), og emulsjon, som
 diskutert nedenfor (200 mg fosfatidylcholin/kg), ble blandet ved romtemperatur og
 umiddelbart tilført C57BL6/J-mus (kroppsvekt mellom 19 og 30 g), via intravenøs
 15 injeksjon gjennom halevenen. De mus som mottok cholat alene ble gitt et volum
 av natriumcholat som var tilsvarende volumet til cholat/EML (emulsjon)
 preparasjonen ved den samme cholat-konsentrasjon. Kontrollmusene mottok det
 samme volum av 5% dekstrose for å reprodusere plasma-osmolalitet.

Resultatene vises i tabellen som følger umiddelbart. Emulsjonen er
 20 fosfatidylcholin/7% triglycerid-emulsjonen beskrevet i tidligere eksempler.
 Natriumcholat, når benyttet, bli tilsatt i de angitte konsentrasjoner til råmaterialene
 før emulsifisering av materialene.

Tabell 1: Beskyttelse av mus fra dødelig endotoksinutfordring

Tid (h)	Kontroll	7%TG	7%TG + CA		36 mM	18 mM CA		
			9 mM	18 mM		ingen PC eller TG	+PC	
			<u>Overlevende (N)</u>					
0	28	28	8	16	8	8	8	
24	9	12	4	15	8	8	8	
48	5	10	2	15	8	8	8	
72	2	5	1	15	8	8	8	
96	1	0	1	15	8	7	8	

For letthets skyld er emulsjonenes vektprosent som følger. Når 9 mM cholat ble brukt, er vektprosentene relative til emulsjonen 7% cholat, 6,1% triglycerid og 86,9% fosfatidylcholin. Ved 18 mM cholat er vektprosentene 13,1% cholat, 5,7% triglycerid og 81,2% fosfatidylcholin. Ved 36 mM er de relative verdier 23,2% cholat, 5% triglycerid og 71,8% fosfatidylcholin.

Det bør noteres at mengden av LPS tilført i disse eksperimenter (40 mg/kg) er mye høyere enn mengden benyttet for letalitätsstudiene i tidligere eksperimenter. Hensikten med disse høyere doser er å overdøve enhver beskyttende effekt som kan henføres til fosfatidylcholin og/eller triglycerid. Således er konklusjonen som skal nås etter disse eksperimenter at det er en beskyttende effekt som kan henføres til gallesyrens salt, natriumcholat.

Det som ikke presenteres her er studier som ble utført med andre gallesyresalter og gallesalter inneholdende taurin. Ytterligere eksempler på gallesalter inkluderer allodeoksy-cholsyre, litocholsyre, hyodeoksycholeoyl, hyocholsyre, α , β og ω -muricholsyrer, murodeoksycholeoyl, ursodeoksycholeoyl, ursochol-syre og alle saltene av disse syrer, slik som deres natriumsalter eller taurin eller glycinoksyder. Se Hoffmann, ovenfor.

Eksempel 9

Videre studier ble deretter utført, hvorav det første var en overlevelsesstudie, ved bruk av mus som forsøksdyr.

I overlevelsesstudiet ble forsøksdyrene delt i 4 grupper. Den første gruppen mottok en 5% dekstroseløsning og fungerte som kontroll. Den andre gruppen mottok en emulsjon på 99% (som vekt) fosfatidylcholin og 7% (som vekt) triglycerid, preparert som beskrevet ovenfor. Emulsjonen inneholdt 5% dekstrose og soyafosfolipider i omtrent 50 mg/ml lipid.

I den tredje og fjerde gruppe mottok dyrene en emulsjon lignende det som ble gitt til den andre gruppe, supplementert med enten 18 mM natriumcholat eller 18 mM natriumdeoksycholeoyl. I dette eksperiment var den protokoll som ble benyttet identisk med den som beskrevet i eks. 8.

Overlevelse ble målt 72 timer etter behandling og blir sammenfattet i den følgende tabell:

Tabell 1. Effekt av å tilføre gallesyre til 7% triglyceridemulsjon på 72 timers overlevelse hos mus

Gruppe	N	Overlevelse	p-verdi mot gruppe		
			1	2	3
		%			
1 5% dekstrose	28	4	-	-	-
2 7% TG	64	8	NS	-	-
3 Natriumcholat + 7% TG	16	94	0,00001	0,00001	-
4 Natriumdeoksy- cholat + 7% TG	8	75	0,0001	0,00001	NS

Bemerk at den statistiske signifikans av sammenligninger mellom gruppe overlevelse ble analysert med den generaliserte Wilcoxon-metoden ved bruk av et dataprogram. Sammenligninger mot gruppe 1-kontroller er samlet i kolonne "1", sammenligninger mot gruppe 2 dyr, som er behandlet med 7% emulsjon er samlet under "2", og sammenligninger mot gruppe 3 dyr som er behandlet med emulsjon pluss natriumcholat er samlet under "3".

Både prosent av overlevelse og den statistiske analyse viser den klare, men uventede overlegne effekt av formuleringer som inneholdt gallesyresalt.

Eksempel 10

Et annet sett av eksperimenter benyttet en kaninmodell. I denne modell ble frisetting av TNF (tumor nekrosefaktor)- α bestemt.

Kaninene ble delt i tre grupper og mottok 5% dekstroseløsning, emulsjonen av fosfolipid og triglycerid (93%/7%) diskutert ovenfor, eller en 93%/7% emulsjon som også inneholdt 18 mM cholsyre. Alle emulsjoner ble justert til 5% dekstrose som i eks. 9. Kaninene mottok en forberedende bolus av emulsjon og ble deretter 2 timer senere belastet med 100 μ g *E. coli* 0111:B4 LPS. Etter tilførsel av den forberedende bolus ble formuleringene tilført i form av en kontinuerlig vedlikeholdsinfusjon via intravenøs tilførsel, som inneholdt 50 mg lipid pr. kg kroppsvekt pr. time. Den intravenøse tilførsel ble fortsatt i 3 timer etter belastningen.

Blodprøver ble tatt fra kaninene under basale betingelser, 30 min. etter tilførsel av den primære bolus og deretter hver time under totalt 5 timers tilførsel.

I tabellen som følger blir de høyeste TNF- α -verdier presentert. Disse ble funnet 2 timer etter tilførsel av endotoksinet.

Statistisk signifikans ble bestemt ved bruk av den velkjente Student's test. Som tabellen viser ble TNF- α -verdiene signifikant senket etter tilførsel av 18 mM cholsyre.

Tabell 2. Effekt av emulsjoner på produksjon av TNF- α i kaniner

Emulsjon	TNF- α ng/ml	Signifikans	
		N	P
5% dekstrosek kontroll	134 \pm 70	9	
7% TG-emulsjon	68 \pm 5	5	<0,05
7% TG-emulsjon + 18 mM cholsyre	39 \pm 20	4	<0,01

De foregående eksempler viser i detalj oppfinnelsen hvis anvendelse medfører lindring eller forebygging av endotoksinemi i et individ via tilførsel av en effektiv mengde av et fosfolipid som et endotoksin kan bindes til. Kombinasjonen av fosfolipid og endotoksin blir deretter fjernet fra individet via standard biologiske prosesser som er velkjent for enhver som kjenner prosesser som benyttes for å fjerne lipoprotein-partikler. Binding av endotoksinet med fosfolipid fører til inaktivering av toksinet.

Eksemplene viser også at tilførsel av et medlem av familien av cholansyrer eller cholansyresalter, slik som en gallesyre eller et gallesurt salt også kan bli benyttet for å oppnå det samme resultat som fosfolipidene, d.v.s. lindring eller prevensjon av endotoksinemi. Således kan peptidfrie og proteinfrie sammensetninger som inneholder én eller begge av en gallesyre/gallesyre-salt og et fosfolipid bli benyttet for å behandle endotoksinemi. Cholansyrer er beskrevet av f.eks. Hoffmann, Hepatology 4(5): 4S-14S (1984), som herved inkluderes som referanse. Spesielt henvises til side 5S, figurene 1 og 2, inkludert herved som referanse, som viser strukturene som karakteriserer cholansyrer.

Individet som behandles er fortrinnsvis et menneske, men oppfinnelsens praktiske utførelse kan like gjerne anvendes innen en veterinærmedisinsk sammenheng.

"Lindring" som benyttet her henviser til behandling for å lette plagene fra endotoksinemi som fremkalles av enhver av ulike endotoksiner som blir produsert av f.eks. gram-negative bakterier (*S. typhimurium*, *E. coli* etc.). Profylakse kan oppnås ved tilførsel av agens på et tidspunkt hvor individet er i eller holder på å komme i en situasjon hvor endotoksin-eksponering kan forekomme. Vanligvis forekommer dette under kirurgiske inngrep. Således kan et individ som forberedes for en kirurgisk prosedyre tilføres den aktive ingrediens som forberedelse til prosedyren.

Den effektive mengde fosfolipid- og gallesyre-kombinasjon som er nødvendig for behandling av individet kan variere. Generelt blir en dose totalt opp til fra 200 total mg til 800 mg av fosfolipid pr. kg kroppsvekt hos individet foretrukket, selv om mengden kan synke eller øke, avhengig av alvorret av endotoksinemien eller risikograden i sammenheng med profylaksen. For cholansyrer og salter, slik som gallesyrene og deres salter blir doser fra 10 mg til 300 mg/kg kroppsvekt, mer fordelaktig 15 mg til ca. 275 mg/kg kroppsvekt benyttet.

Det er ønskelig å tilføre gallesyren/gallesyresaltet og fosfolipider i sammensetninger som også inneholder nøytrale lipider, men dette er ikke nødvendig siden nøytrale lipidfrie emulsjoner av fosfolipider også blir forventet benyttet. Ønskeligheten av kombinert tilførsel av fosfolipidene kommer fra det faktum at de nøytrale lipider og fosfolipider kombineres i partikler som ligner på lipoproteinene, men skiller seg fra disse siden de ikke inneholder protein- eller peptidkomponenter som selvfølgelig er til stede i alle lipoproteiner.

Spesielt ønskelige behandlingsformer er slike der fosfolipidet er et fosfatidylcholin, slik som eggeplomme-fosfatidylcholin, soya-basert fosfatidylcholin eller et sfingolipid. Hva angår gallesyre/gallesyresalter er cholsyre og/eller dens salter foretrukne, slik som natriumcholat, natriumdeoksychofat og natriumkendoxychofat. Hva angår de nøytrale lipider er det foretrukket å benytte kolesterolester eller triglycerid, men andre nøytrale lipider slik som squalen eller andre hydrokarbonoljer, di- og monoglycerider og antioksydanter slik som vitamin-E kan også benyttes.

Tilførselsformen for blandingene kan variere, med en bolus eller andre intravenøse former blir spesielt foretrukket. Når en bolusform blir benyttet og blandingen inneholder f.eks. triglycerid, må en viss forsiktighet vises under til-

førsel. Det er relativt godt kjent at triglycerider er giftige hvis de tilføres i for stor mengde. Den normalt kompetente fagmann kan imidlertid lett formulere blandinger slik at triglycerid-forgiftningsrisikoen blir redusert eller eliminert. Generelt bør, når en bolusform blir benyttet, blandinger ikke inneholde mer enn ca. 80 vekt% triglycerid eller andre nøytrale lipider, fortrinnsvis ikke mer enn 70 vekt%. Mest fordelaktig bør blandinger ikke inneholde mer enn ca. 50 vekt% av nøytrale lipider når en bolus blir tilført.

Når ikke-bolus tilførselsformer blir benyttet, slik som andre intravenøse tilførselsformer, er risiko for forgiftning imidlertid senket. Til tross for dette er konsentrasjonsområdene angitt ovenfor foretrukket for intravenøse eller andre tilførselsformer selv om det skal forstås at de ikke er absolutt nødvendige. Hva angår gallesyrer og gallesyresalter er dosene fortrinnsvis fra 25 mg/kg kroppsvekt opp til 500 mg/kg kroppsvekt, med spesielt foretrukne doser fra 50 mg/kg kroppsvekt til 100 mg/kg kroppsvekt. Hva angår fosfolipider blir en dose fra 100 mg/kg kroppsvekt til 1000 mg/kg kroppsvekt foretrukket. Disse doser er imidlertid generelle, og de vil variere avhengig av individet og tilførselsmåten.

Som indikert ovenfor, krever de proteinfrie og peptidfrie formuleringer at minst ett fosfolipid eller gallesyre/-gallesyresalt er til stede. Hva angår fosfolipider er det foretrukket at minst ett nøytralt lipid, f.eks. et triglycerid, diglycerid eller monoglycerid er til stede. Blandinger kan inkludere ytterligere materialer såsom steroler (f.eks. kolesterol, β -sitosterol), esterifiserte eller ikke-esterifiserte lipider (f.eks. kolesterolester eller ikke-esterifisert kolesterol), hydrokarbonoljer såsom squalen, antioksydanter såsom vitamin-E, men disse er ikke nødvendige. Selvfølgelig kan mer enn ett fosfolipid og/eller mer enn ett nøytralt lipid bli benyttet i enhver slik formulering. Når kombinasjoner av nøytralt lipid og fosfolipid blir benyttet, bør det nøytrale lipid være til stede i konsentrasjoner fra 3% til 50 vekt% i forhold til total mengde lipid i blandingen.

I tilfellet med gallesyre/gallesyresalter kan disse bli benyttet separat eller i kombinasjon med et fosfolipid, et nøytralt lipid eller med begge. Med hensyn til disse ekstra-materialer (f.eks. fosfolipider og nøytrale lipider) er de foretrukne typer dem som er diskutert og beskrevet ovenfor. Mulige ytterligere ingredienser inkluderer dem som er opplistet ovenfor.

Også en del av oppfinnelsen er blandinger som er effektive i behandling av endotoksinemi. I én utførelse av dette aspekt av oppfinnelsen er en blanding som

inneholder minst ett av enten en gallesyre/gallesyresalt, et fosfolipid eller et nøytralt lipid der blandingen som helhet inneholder en mengde aktiv ingrediens som kan lindre endotoksinemi. Denne blanding inneholder fortrinnsvis, i vekt%, fra 5% til ca. 30% i vekt av gallesyre/gallesyresalt, fra 3% til 50% i vekt av nøytralt lipid, og fra 10% til 95% i vekt av fosfolipid. Spesielt foretrukket er blandinger som inneholder fra 10-15% i vekt av gallesyre/gallesyresalt, fra 5% til 10% i vekt av nøytralt lipid og der resten av blandingen er fosfolipid.

Det skal bemerkes at disse vektprosentene er relative til blandinger som består av tre komponenter. Når trekomponentsystemet blir kombinert med f.eks. en bærersubstans, adjuvans eller ekstra ingredienser slik det er beskrevet ovenfor, vil vektprosenten relativt til den totale blanding falle. Det må kontinuerlig huskes at slike terapeutiske blandinger alltid er fri for protein og peptid.

I tilfellet med sammensetninger som ikke inneholder en gallesyre eller et gallesyresalt, hvor slike peptidfrie og proteinfrie blandinger inneholder fortrinnsvis minst ca. 3% i vekt av et nøytralt lipid, opp til ca. 50% i vekt av nøytralt lipid, er resten representert av minst ett fosfolipid. Fortrinnsvis er det nøytrale lipid et triglycerid, men det kan også være ethvert av de ytterligere nøytrale lipidene som er diskutert ovenfor. Videre er fosfolipidet fortrinnsvis et fosfatidylcholin.

PATENTKRAV

1. Anvendelse av en proteinfri og peptidfri farmasøytisk blanding omfattende en cholansyre eller cholansyresalt, et fosfolipid og et nøytralt lipid for fremstilling
5 av et medikament for behandling eller profylakse av et menneske eller dyr som lider av endotoksinemi.

2. Anvendelse i henhold til krav 1, omfattende ikke mer enn omtrent 80 vekt% av nøytralt lipid.
10

3. Anvendelse i henhold til krav 1 eller 2, omfattende ikke mer enn 70 vekt% av nøytralt lipid.

4. Anvendelse i henhold til et hvilket som helst av kravene 1-3, omfattende
15 ikke mer enn omtrent 50 vekt% av nøytralt lipid.

5. Anvendelse i henhold til et hvilket som helst av kravene 1-4, omfattende fra omtrent 3% opp til omtrent 50% av nøytralt lipid i forhold til totalvekten av lipid i blandingen.
20

6. Proteinfri og peptidfri farmasøytisk blanding egnet for intravenøs administrering omfattende en cholansyre eller cholansyresalt, et fosfolipid og et nøytralt lipid hvor det nøytrale lipidet er tilstede fra 3% opp til 50 vekt% i forhold til den totale mengden av lipid.
25

7. Farmasøytisk blanding i henhold til krav 6, hvor cholansyren eller cholansyresaltet er en gallesyre eller et gallesyresalt.

8. Proteinfri og peptidfri farmasøytisk blanding omfattende en
30 gallesyre/gallesyresalt, et fosfolipid, og et nøytralt lipid hvor blandingen omfatter fra 5% til 30 vekt% gallesyre/gallesyresalt, fra 3% til 50 vekt% av nøytralt lipid, og fra 10% til 95 vekt% av fosfolipid, hvor blandingen er en vandig emulsjon.

9. Farmasøytisk blanding i henhold til krav 8, som er egnet for intravenøs administrering.

5 10. Farmasøytisk blanding i henhold til et hvilket som helst av kravene 6-9, hvor fosfolipidet er et fosfatidylcholin.

11. Farmasøytisk blanding i henhold til et hvilket som helst av kravene 6-9, hvor fosfolipidet er et sfingolipid.

10 12. Farmasøytisk blanding i henhold til et hvilket som helst av kravene 6-9, hvor det nøytrale lipidet er et triglycerid.

13. Farmasøytisk blanding i henhold til et hvilket som helst av kravene 6-9, hvor det nøytrale lipidet er en cholesterolester.

15 14. Farmasøytisk blanding i henhold til kravene 7-13, hvor gallesyresaltet er valgt fra natriumcholat, natriumdeoksychoolat, og natriumchenodeoksychoolat.

20 15. Farmasøytisk blanding i henhold til krav 14, hvor gallsyresaltet er natriumcholat.

16. Farmasøytisk blanding i henhold til kravene 6-10 og 12, hvor natriumcholat, fosfatidylcholin og triglycerid har en total vektratio på henholdsvis 13,1 : 81,2 : 5,7.

25 17. Anvendelse av en farmasøytisk blanding i henhold til et hvilket som helst av kravene 6-16 for fremstilling av et medikament for behandlingen eller profylaksen av et menneske eller dyr som lider av endotoksinemi.

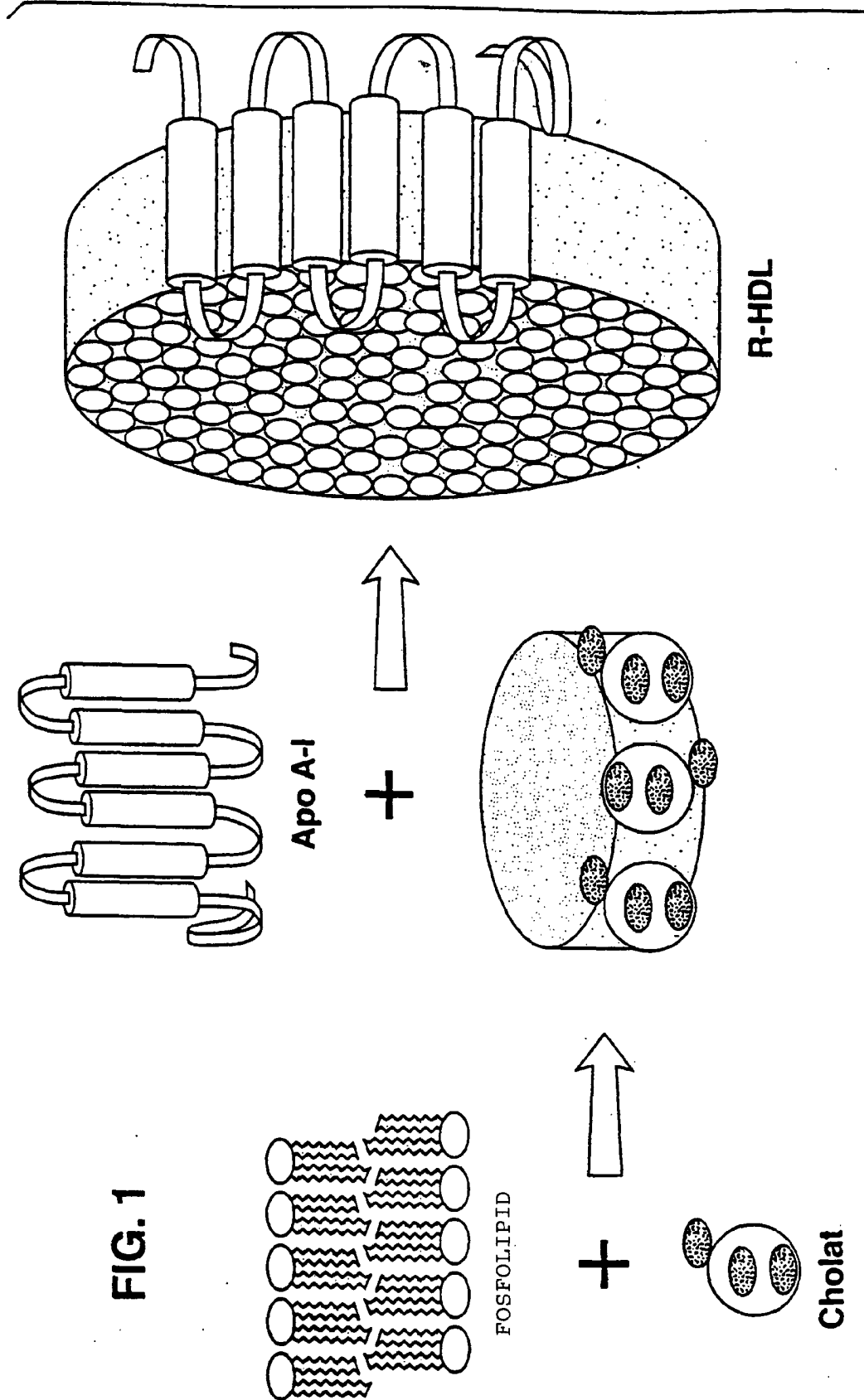


FIG. 1

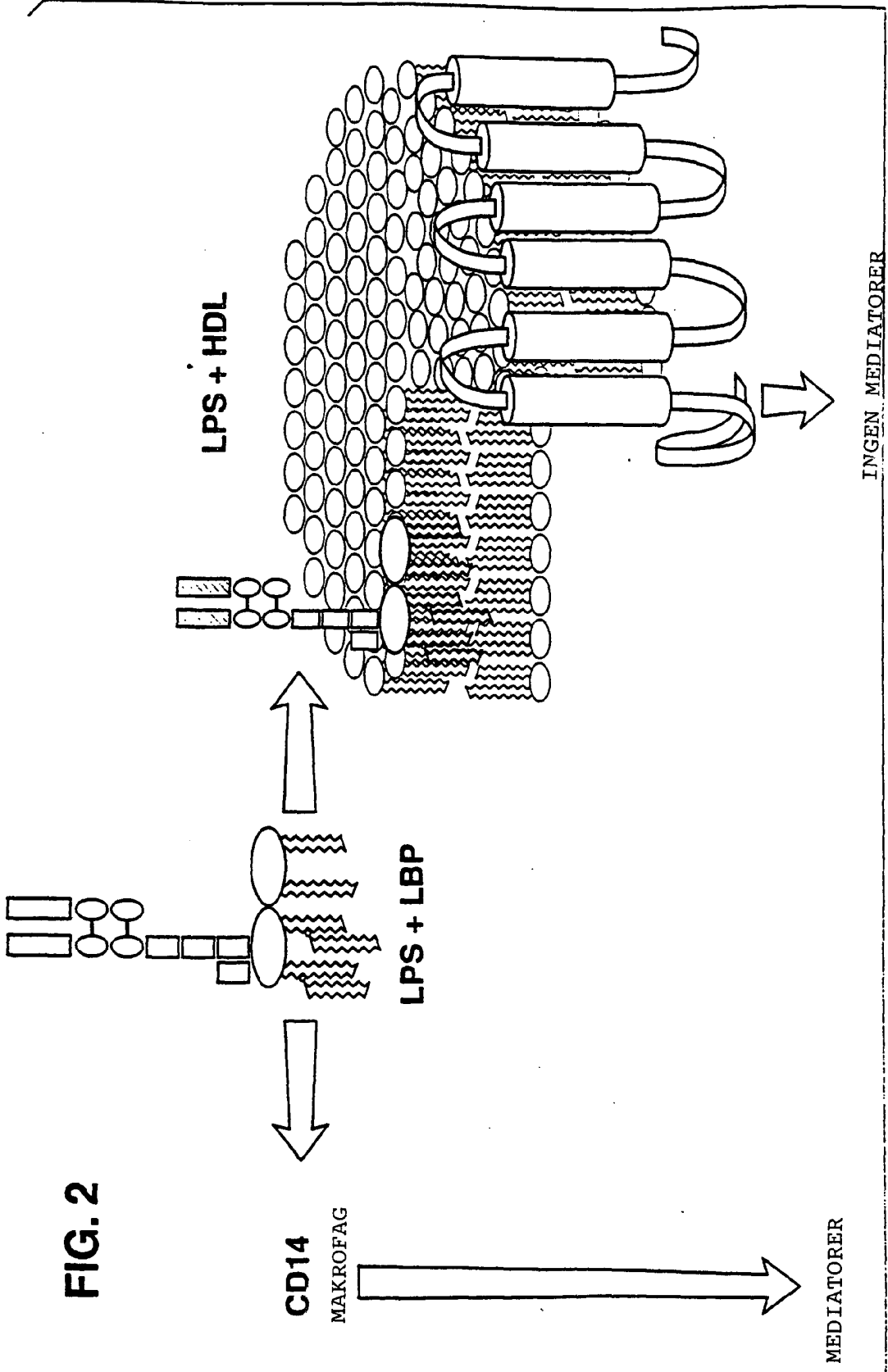
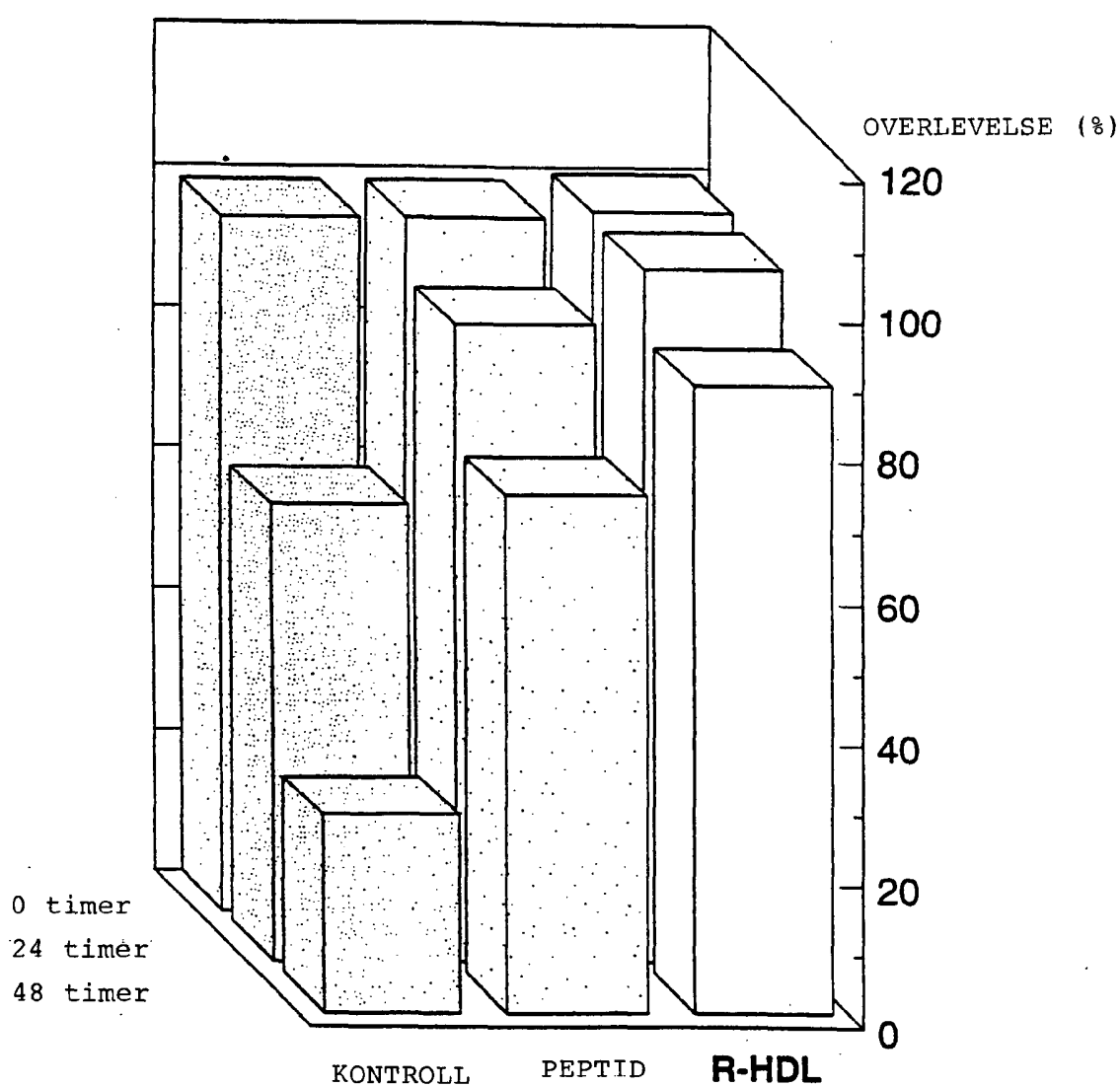


FIG. 2

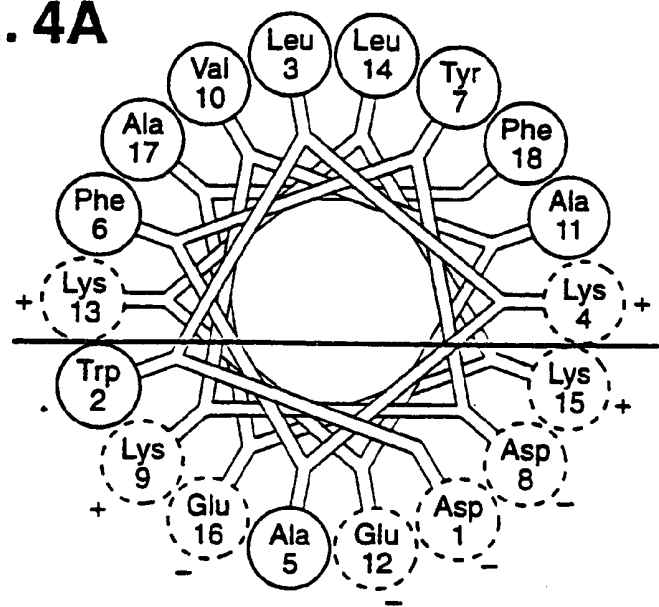
3/15

FIG. 3



IKKE-POLAR OVERFLATE

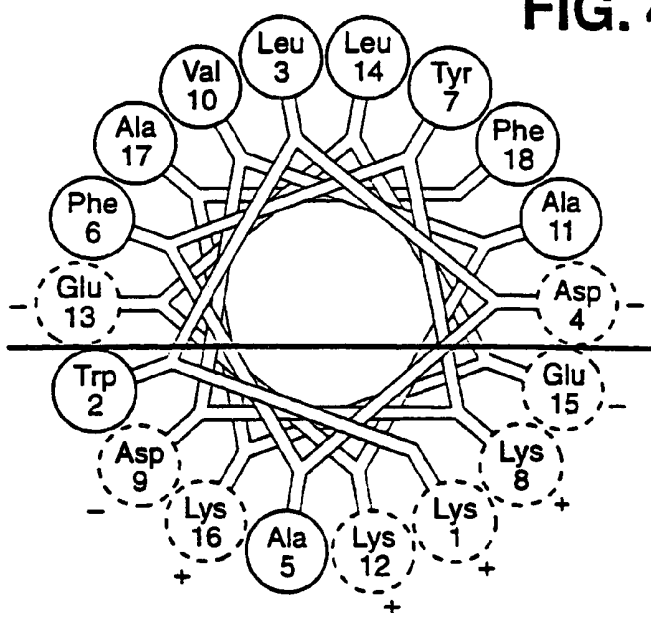
FIG. 4A



Polar Overflate
18A

IKKE-POLAR OVERFLATE

FIG. 4B

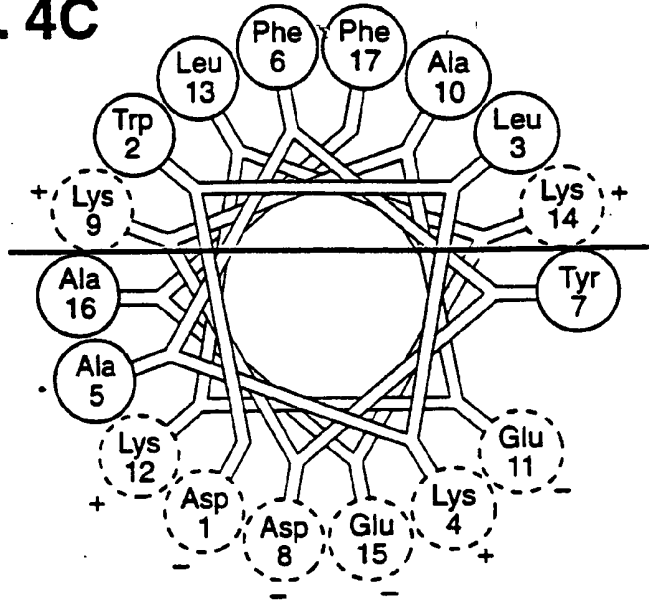


Polar overflate
Reverse 18A

5/15

FIG. 4C

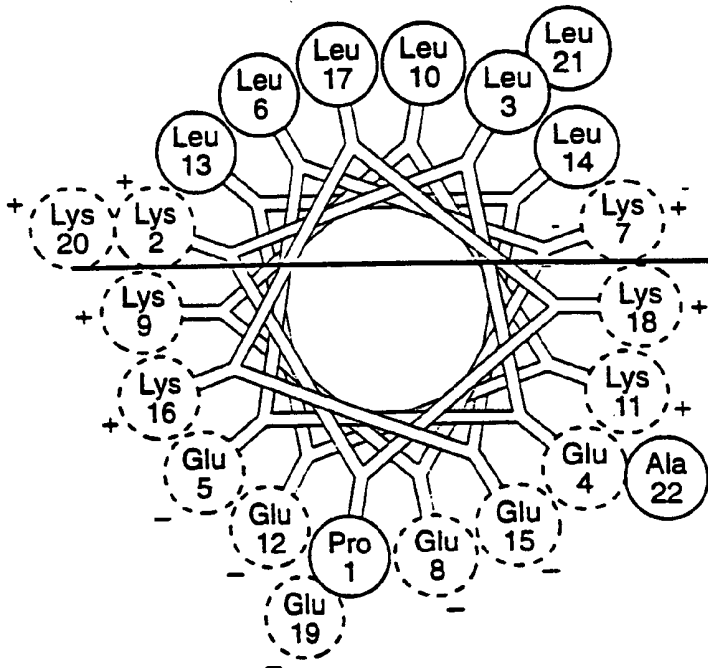
IKKE-POLAR OVERFLATE



Polar overflap
des Val¹⁰ 18A

IKKE-POLAR OVERFLATE

FIG. 4D

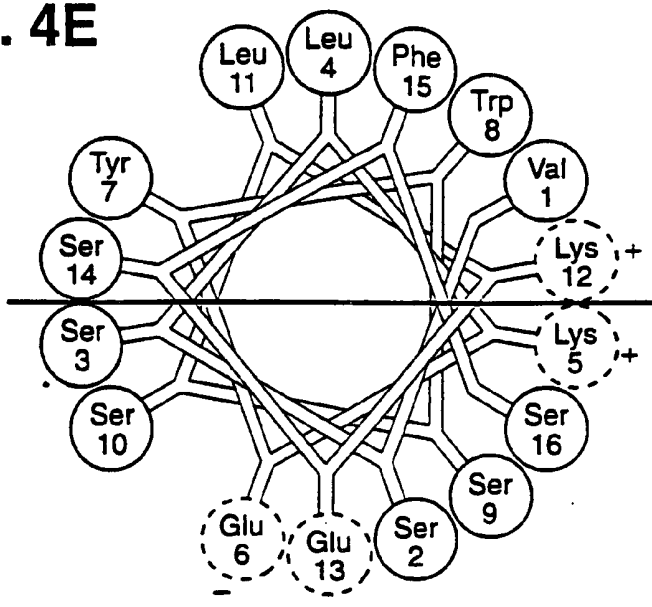


Polar overflap
AP

6/15

IKKE-POLAR OVERFLATE

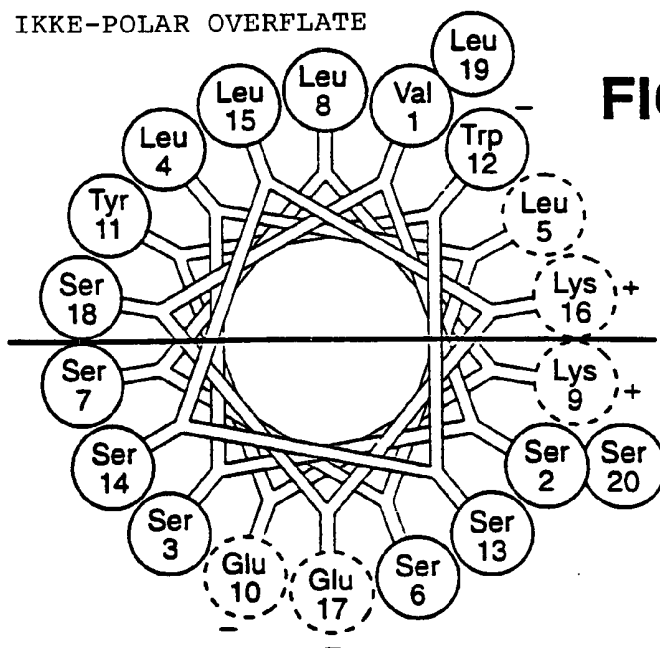
FIG. 4E



Polar overflate
LAP 16

IKKE-POLAR OVERFLATE

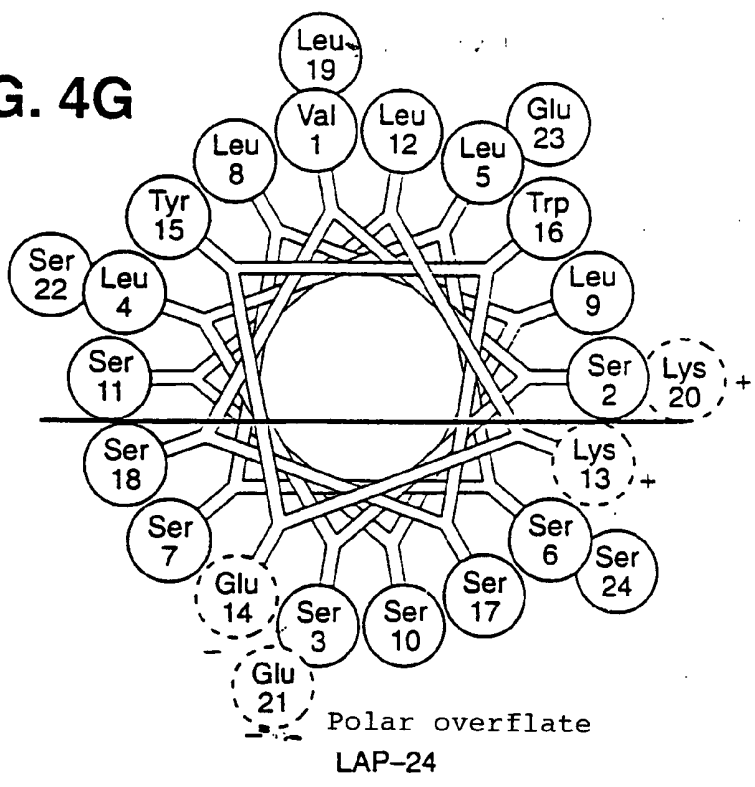
FIG. 4F



Polar overflate
LAP 20

IKKE-POLAR OVERFLATE

FIG. 4G



IKKE-POLAR OVERFLATE

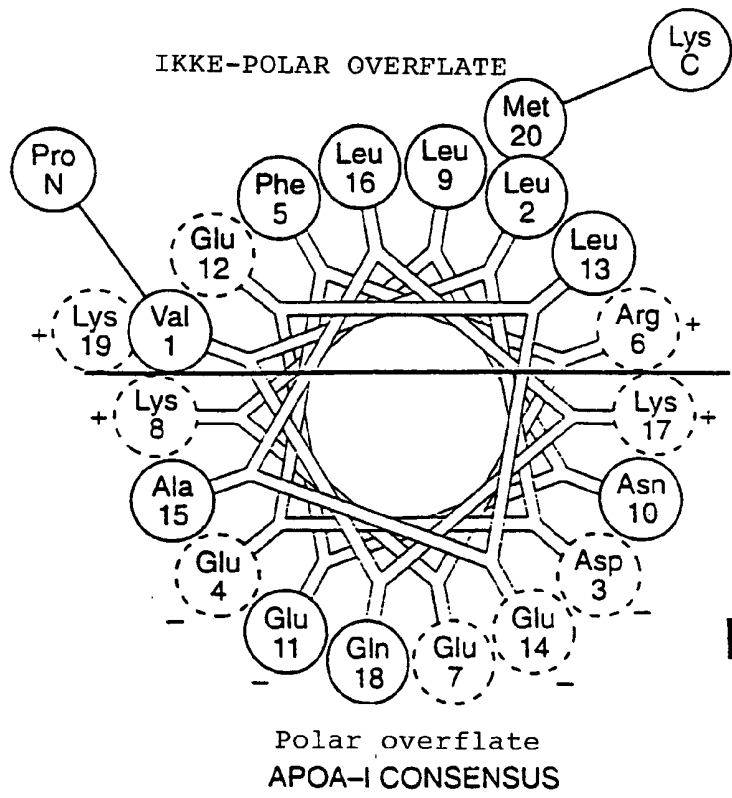
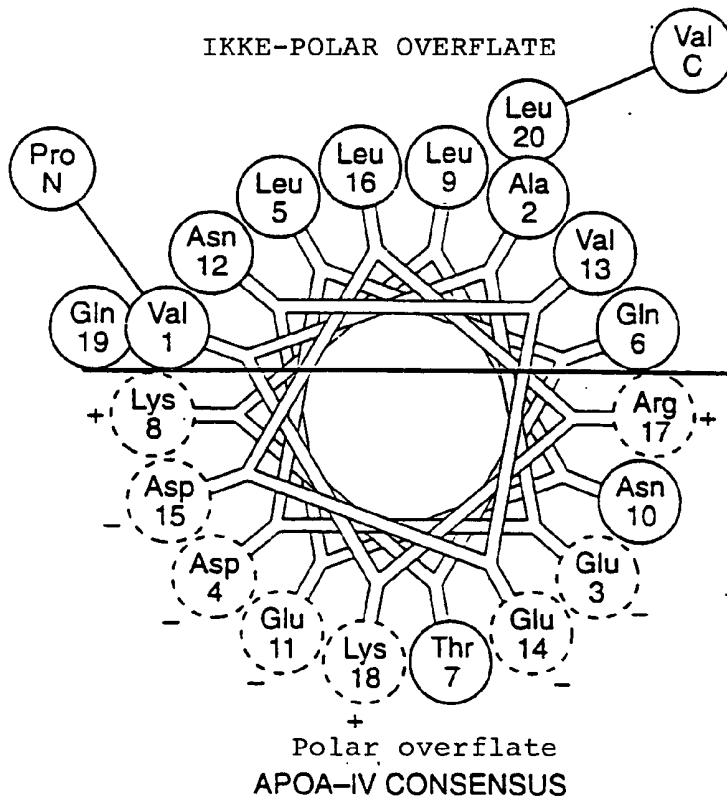


FIG. 4H

FIG. 4I



9/15

FIG. 1A

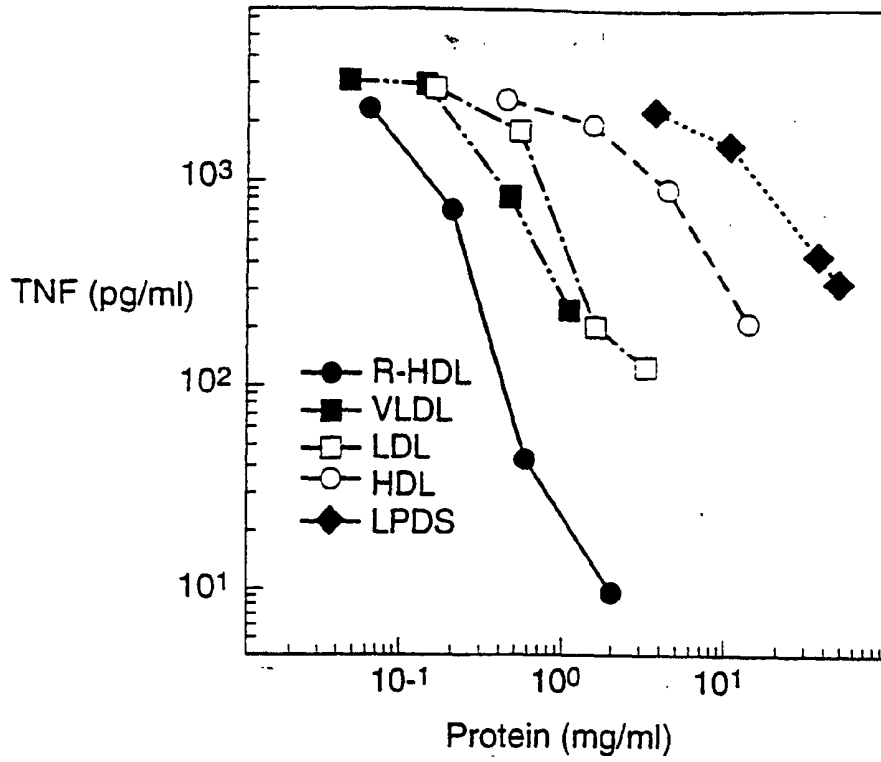


FIG. 1B

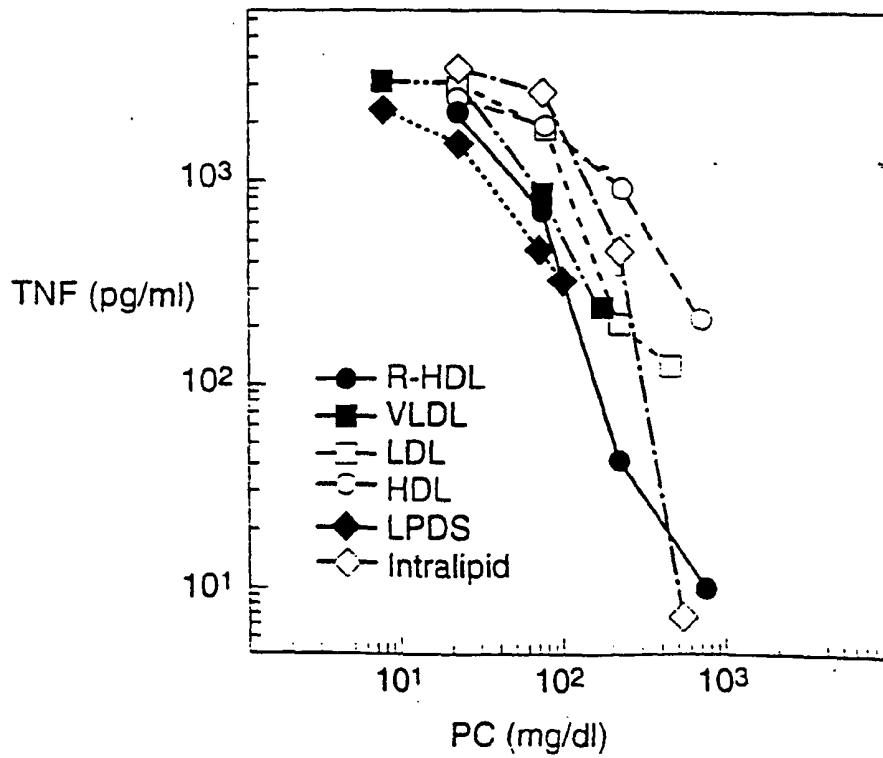


FIG. 2A

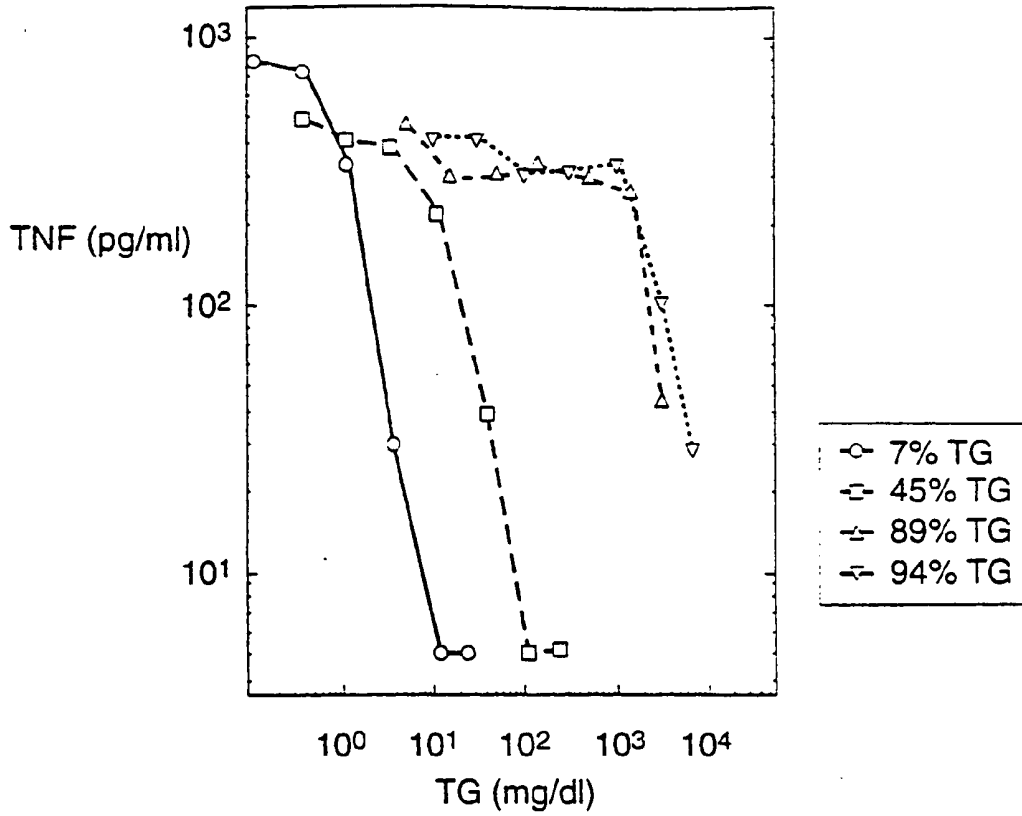


FIG. 2B

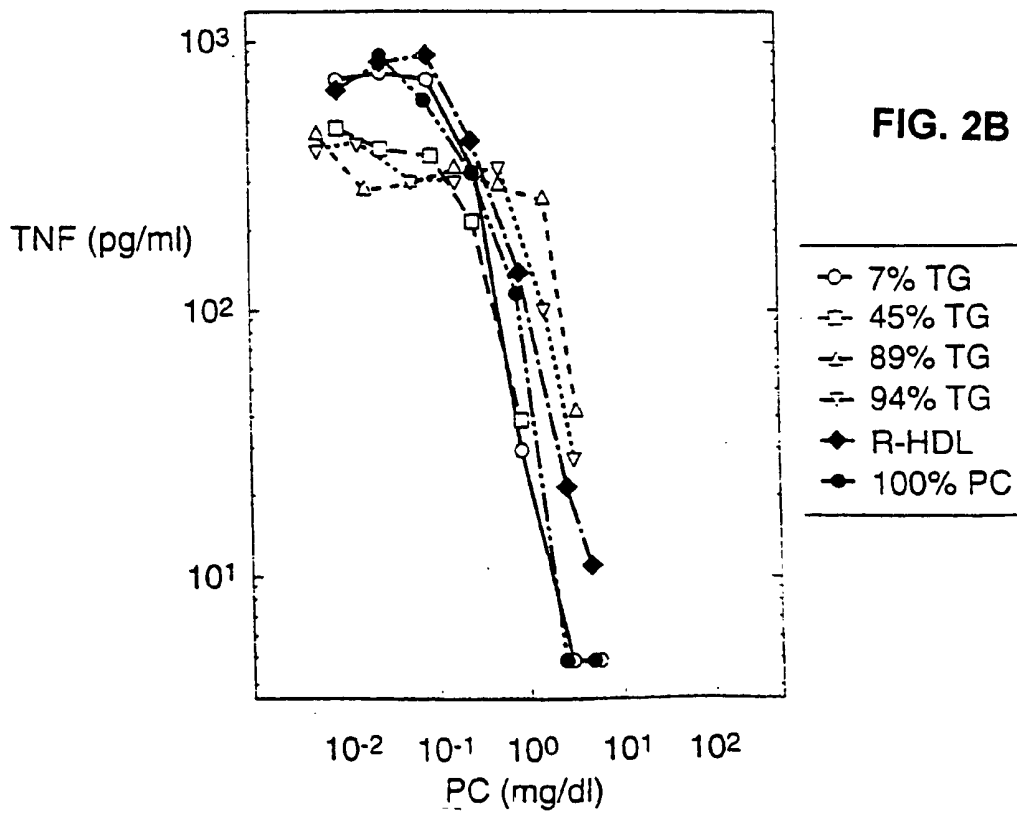
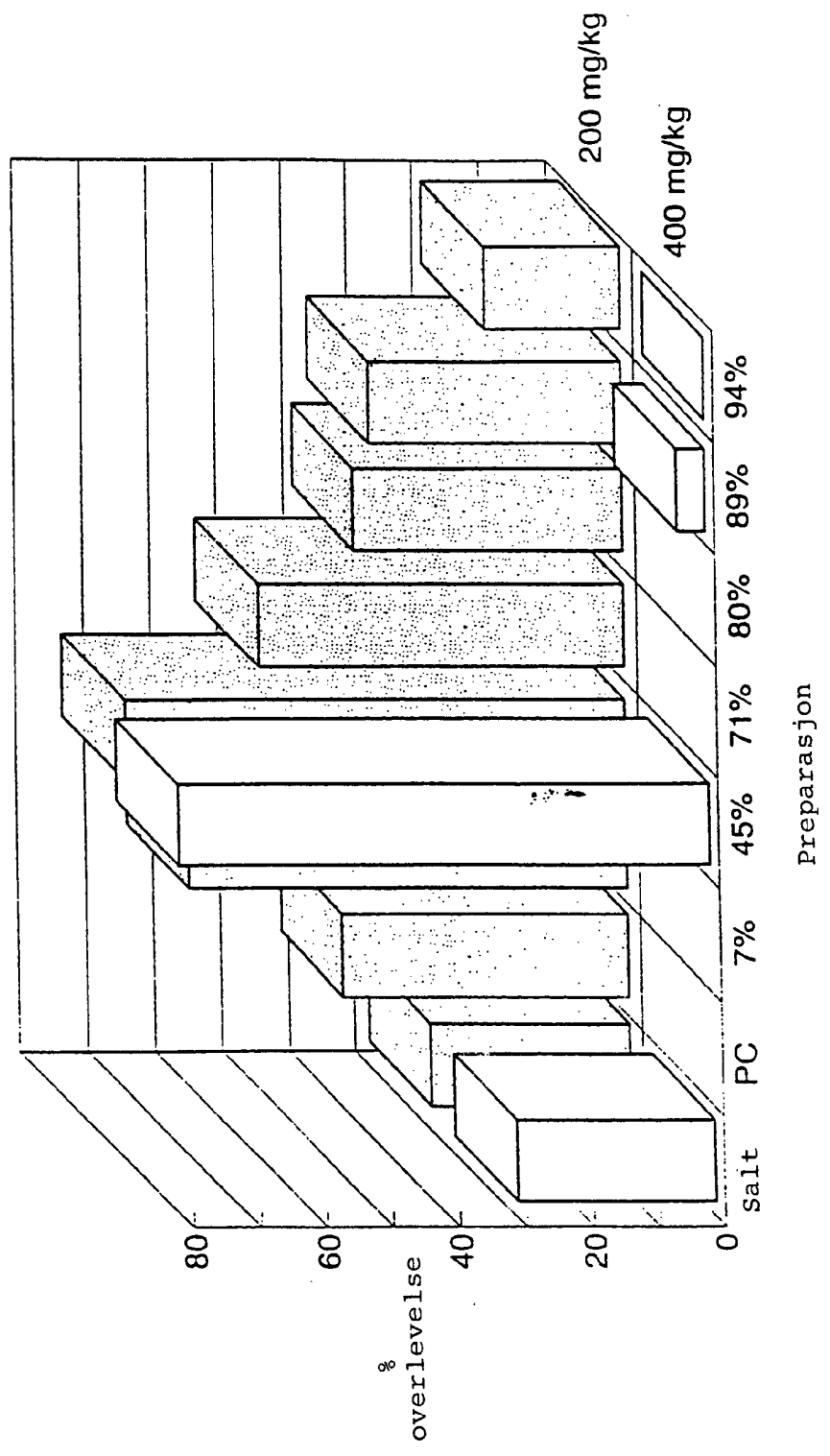


FIG. 3



12/15

FIG. 4

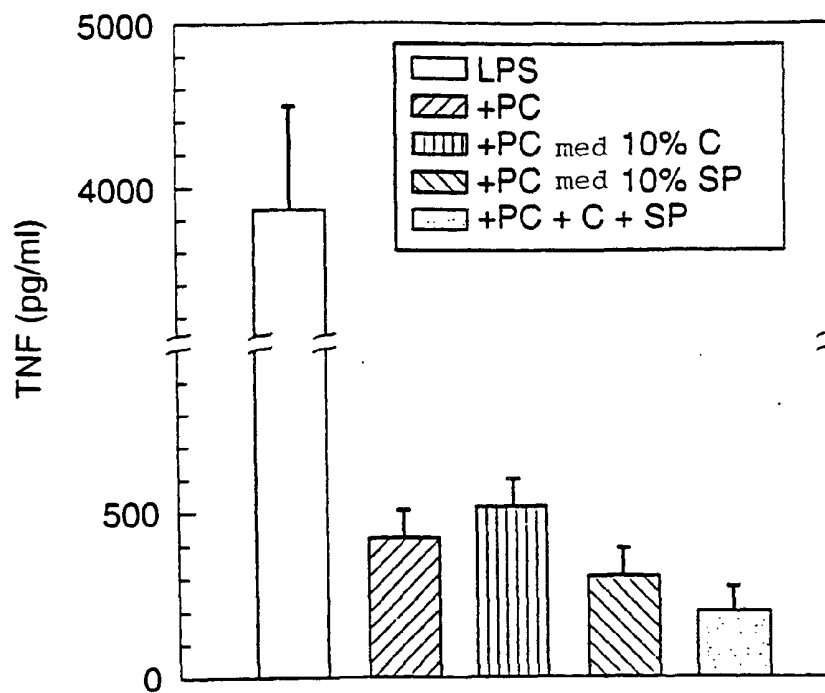


FIG. 5A

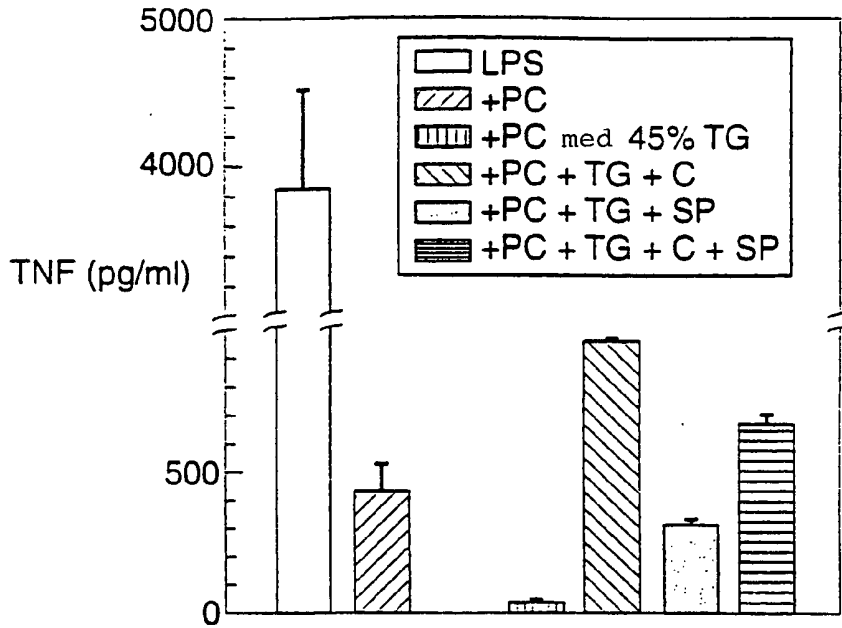


FIG. 5B

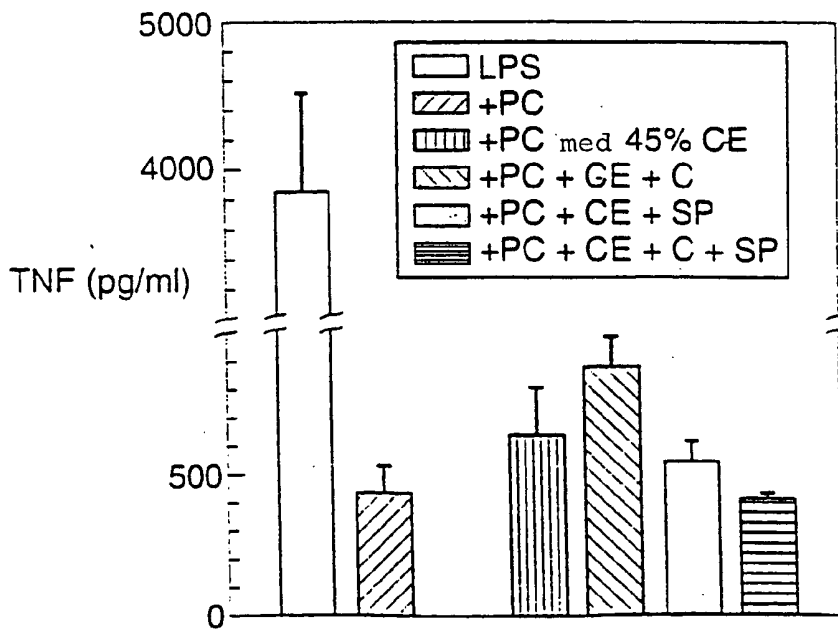
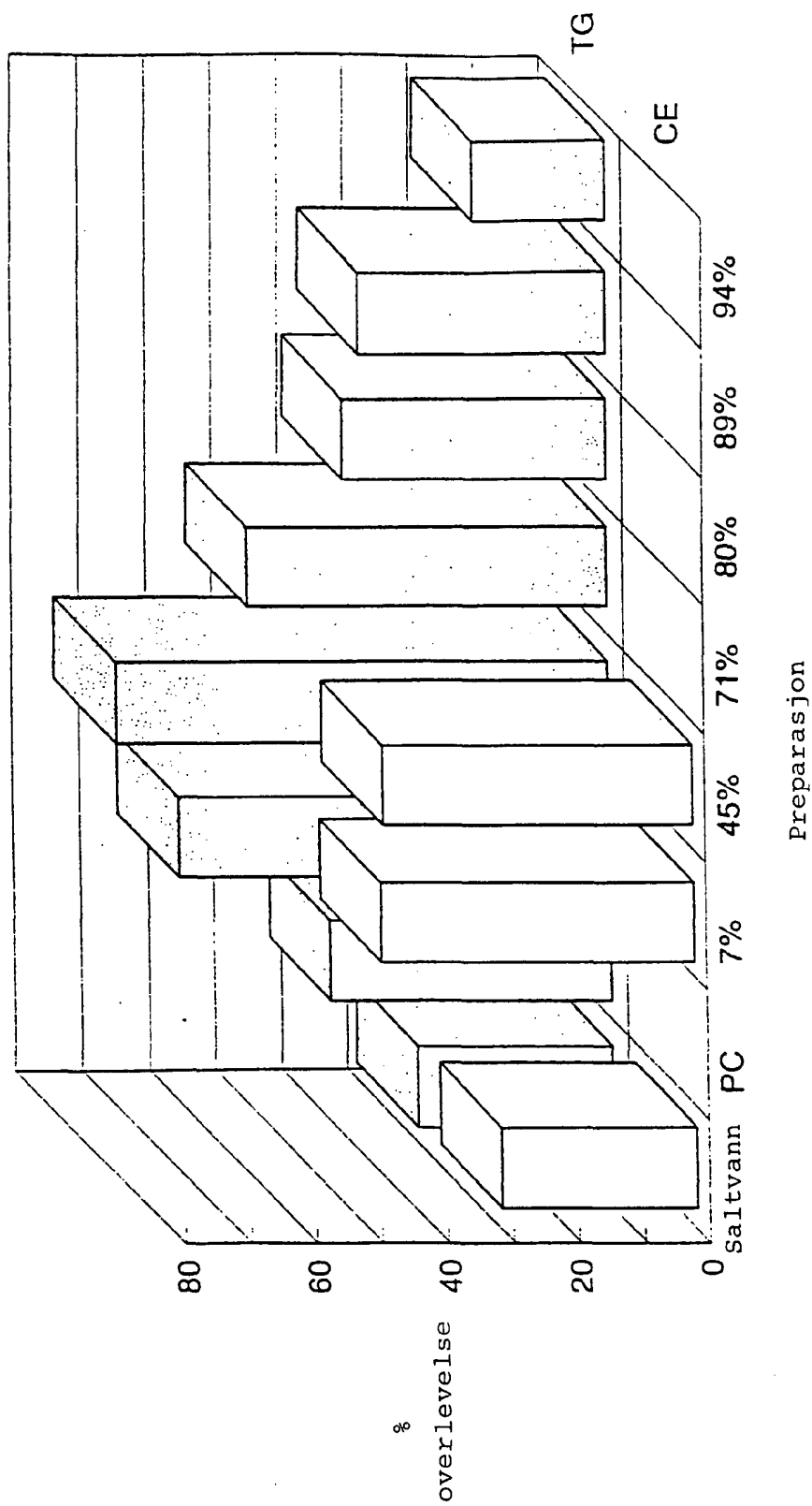


FIG. 6



15/15

FIG. 7

