

00331638

7128

75.668/ZSO

Kationos diagnosztikai, képalkotó és terápiás ágensek, aktivált
vaszkuláris helyekkel asszociálódva

KIVONAT

A találmány tárgyát olyan készítmények és módszerek képezik, amikkel preferenciálisan lehet becélozni terápiás, diagnosztikai és képalkotó ágenseket, hogy azok aktivált vaszkuláris helyek szomszédságában akkumulálódjanak



2020.06.22

Pat. 1000

S. B. G. & K.

Szabadalmi Ügyvivői Iroda
H-1062 Budapest, Angrássy út 113.
Telefón: 461-1000, Fax: 461-1099



75.668/ZSO

Kationos diagnosztikai, képalkotó és terápiás ágensek, aktivált
vaszkuláris helyekkel asszociálódva

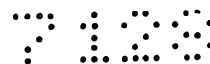
A jelen találmány tárgyát készítmények és módszerek képezik, amikkel preferenciálisan lehet becélózni terápiás, diagnosztikai és képalkotó ágenseket, hogy azok aktivált vaszkuláris helyek szomszédságában akkumulálódjanak. Specifikusan, a jelen találmány tárgyát olyan készítmények és módszerek képezik, amik szelektíve irányítanak ilyen ágenseket azokra a vaszkuláris endoteliális helyekre, ahol az anionos töltések exponálódnak vagy csoportosulnak az angiogenezis vagy a gyulladás pontjaiban. Pontosabban, a jelen találmány tárgyát olyan készítmények és módszerek képezik, amik jól használhatók olyan betegségek kezelésében, amik az angiogenezishez kapcsolódnak, mint amilyen például a rák, a diabetikus retinopátia és retrolenta fibroplázia. Emellett a jelen találmány tárgyát képezi a diagnosztikai, képalkotó és terápiás ágensek módosítása és csomagolása, azzal a céllal, hogy fokozzuk hatékonyságukat az aktivált vaszkuláris helyekkel kapcsolatban, amik asszociálódnak az angiogenezishez kapcsolódó betegségekkel és a sebgyógyulási folyamatokkal. A jelen találmány tárgyát képezik továbbá a gyógyszer-hordozó rendszerek is, amik úgy állíthatók be, hogy maximalizáljuk célzási hatásukat, miközben minimalizáljuk toxikus mellékhatásaikat.

A jelen találmány tárgya ahhoz a felfedezéshez kapcsolódik, hogy az aktivált vaszkuláris helyek asszociálódnak egy fokozott negatív töltéshez, amely negatív töltés a vaszkuláris endoteliális sejtekhez képest alakul ki nyugalmi állapotukhoz viszonyítva. Tény az, hogy az aktivált endoteliális sejtek és azok asszociálódott mátrix rétegének fokozott negatív sejtfelszíni töltése természetes korlátként működhet a negatív töltésű vegyületeknek a vérből való penetrációjával szemben.

1. Vaszkuláris struktúra és permeabilitás

A vérereket, amik a keringési rendszerben magukba zárják a a vért, és a vért elhatárolják a szövetektől, valamint a test extravaszkuláris folyadékaitól, a lumenális rétegükben vaszkuláris endoteliális sejtek határolják. A kapillárisok, a legkisebb vérerek vékonyfalú mikroszkópikus erek, amik vaszkuláris endoteliális sejtek egyetlen rétegéből állnak. A kapillárisok falai felelősek a tápanyagok és a metabolitok cseréjéért, valamint az intravaszkuláris és extravaszkuláris folyadék kompartmentek közötti folyadék-egyensúly kialakításáért és fenntartásáért. Bár a lipofil és kismolekulasúlyú hidrofil molekulák könnyen átdiffundálnak ezeken a falakon, a makromolekulákkal szemben általában áthatolhatatlannak. A vaszkuláris endoteliális sejtek szorosan kapcsolódnak egymáshoz, ezzel egy korlátot biztosítanak, ami megvédi a szerveket a molekulák ellenőrizetlen cseréjével szemben.

Az endoteliális sejtekből álló vér-ér membránok, amik egymáshoz szorosan kapcsolódnak, nem impermeábilisak. Például



nagyszámú makromolekula, azaz például az ellenanyagok, a fehérjékhez kötött hormonok, a citokinek hozzáférnek az intersticiális térhez, és végül a limfatikus rendszeren keresztül visszatérnek a plazmába. A korai ötvenes években Pappenheimer és munkatársai azt gondolták, hogy körülbelül 40 Angström átmérőjű pórusok vannak a kapillárisokban [Pappenheimer és mtsai: *Am. J. Physiol.* 167, 13 (1951)], amik lehetővé teszik az oldatban levő kis molekulák diffundálását [Rippe és mtsai: *Physiological Reviews* 74, 163 (1994)]. Később Grotte és munkatársai leírták nagy, 250-300 Angström méretű pórusok jelenlétét [Grotte, G.: *Acta Chir. Scand. Suppl* 211, 1 (1956)], a plazmafehérjék transzkapilláris átjutásához [Rippe és mtsai: *Physiological Reviews* 74, 163 (1994)]. Az eltelt évek során a pórusok jelenlétét és a kapillárisok méret alapján való szelektivitását bőségesen igazolták számos szövetben [Rippe és mtsai: *Physiological Reviews* 74, 163 (1994)].

Az agyat a vér-agy gát védi, ami viszonylag megnőtt lokális negatív töltést jelent az asszociálódott endoteliális sejteken és a velük szomszédos extracelluláris mátrixon. Taguchi és munkatársai például kimutatták, hogy a patkányagy kamrák choroid plexusában a kapilláris endotélium és alap membránjai, valamint az epitélium luminális felszíne és ablakos diafragmája erősen anionos [Taguchi és mtsai: *Arch. Histol. Cytol.* 61, 243 (1998)]. Taguchi és munkatársai azt is sugallták, hogy a negatívan töltött endoteliális ablak és alap membrán töltés-korlátként hathat, ami gátolja az anionos molekulák átjutását [Taguchi és mtsai: *Arch. Histol. Cytol.* 61, 243 (1998)].



Ennek megfelelően egy molekula fizikokémiai tulajdonságairól, azaz például annak töltéséről, méretéről, konfigurációjáról és polaritásáról ismert, hogy befolyásolja a molekula transzportját egy vérér falán keresztül [Seno és mtsai: *Ann. Acad. Sci.* 416, 410 (1983); Yuan, F.: *Seminars in Radiation Oncology* 8, 164 (1998)].

Egy molekula vaszkuláris permeabilitása általában fordítottan arányos a méretével. Emellett a véredény falai viszonylag permeábilisabbak a kationos mint az anionos molekulákkal szemben, feltehetőleg azért, mert az alap membrán és a glycocalyx a véredény falainak luminális felszínén negatív töltéssel rendelkezik [Yuan, F.: *Seminars in Radiation Oncology* 8, 164 (1998)]. Ezekkel a megfigyelésekkel összhangban, Adamson és mtsai: publikálták, hogy a ribonukleáz (nettó töltése +4, molekulásúlya 13,683) vaszkuláris permeabilitása kétszer olyan nagy mint az α -laktalbuminé, aminek a molekulásúlya hasonló (14,176), de negatív töltése van (nettó töltése -10) [Adamson és mtsai: *Am. J. Physiol.* 254, H304 (1988)].

Miközben az anionos molekulák elleni mikrovaszkuláris endoteliális korlát ontogenezisét állapították meg, Henry és munkatársai úgy találták, hogy ahogy a csirke korioallantoin membrán öregszik, az endoteliális anionos helyek redukálódnak [Henry és mtsai: *Tissue Cell* 28, 449 (1996)]. Henry és munkatársai folyamatos kationos ferritin kötődést láttak a luminális endotéliumon, a csatlakozási hézagoknál, és a plazmalemma vezikulumoknál a 4,5-14. napon, de a 18. napon a kötődés megszakadt [Henry és mtsai: *Tissue Cell* 28, 449 (1996)]. Cavallo és munkatársai tanul-



mányozták a kis véredények felszíni töltési jellemzőit és a perivaszkuláris komponenseket patkány szerotoninnal érintkezésbe hozott, vagy enyhe hősrülésnek kitett függesztő véredényeiben, és felfedezték, hogy a szivárgó véredényekben megnőtt az anionos helyek sűrűsége a luminális endoteliális plazma membránon [Cavallo és mtsai: Virchows Arch. [Pathol. Anat] 388, 1 (1980)].

2. Fokozott negatív töltés az angiogén és aktív vaszkuláris helyeken

Az angiogenezis az a folyamat, amiben az új véredények kialakulnak [Folkman és mtsai: Journal of Biological Chemistry 267, 10931 (1992)]. Ez esszenciális a szervezet normális aktivitásaihoz, azaz például a reprodukcióhoz, a fejlődéshez és a sebgyógyuláshoz. Bár az angiogenezis teljes folyamata nem ismert teljesen, az a vélemény alakult ki, hogy az eljárásban molekulák komplex csoportja vesz részt, amik kölcsönhatásba lépnek egymással, hogy szabályozzák az endoteliális sejtek – azaz a kapilláris véredények primer sejtjei - növekedését. Normális körülmények között ezek a molekulák a sejteket nyugalmi állapotban tartják, azaz abban az állapotban, amikor nincs kapilláris növekedés, hosszabb ideig, ami tarthat hetekig, vagy néhány esetben dekádokig. Azonban, ha szükséges, azaz például a sebgyógyulás során, ezek a molekulák elősegítik a sejtek gyors szaporodását és turnoverét egy ötnapos periódusban [Folkman és mtsai: Journal of Biological Chemistry 267, 10931 (1992); Folkman és mtsai: Science 235, 442 (1987)].

Bár az angiogenezis egy erősen szabályozott folyamat normális körülmények között, számos betegséget állandó, szabályozatlan angiogenezis jellemez. Például az okuláris neovaszkularizációt tekintik a vakság legáltalánosabb okának. Az olyan betegségekben, mint például az arthritis, az újonnan képződő kapilláris véredények behatolnak az ízületekbe és elroncsolják porcokat. A diabetesben a retinában képződő új kapillárisok behatolnak az üvegtestbe, véreznek és vakságot okoznak. A szilárd tumorok növekedése és metasztázisa szintén függ az angiogenezistől [Folkman és mtsai: *Cancer Research* 46, 467 (1986); Folkman és mtsai: *Journal of the National Cancer Institute* 82, 4 (1989)]. A 2 mm-nél nagyobbra növő tumoroknak saját vérrellátással kell rendelkezniük, és ezt úgy érik el, hogy új kapilláris véredények növekedését indukálják. Ezek az új, a tumorba beágyazódó véredények módot adnak a tumorsejtek számára, hogy bekerüljenek a vérkeringésbe és távolabbi pontokban, azaz például a májban, a tüdőben vagy a csontokban metasztatizálódjanak [Weidner és mtsai: *Cancer Research* 55, 3752 (1995)].

A vaszkuláris szivárgás a tumorokban általában magasabb, mint a normális szövetekben [Yuan és mtsai: *Cancer Research* 54, 3352 (1994)]. Yuan és munkatársai kimutatták, hogy a tumorerek permeábilisabbak mint a normális véredények, az érfalakban levő nagy, körülbelül 400 nm átmérőjű pórusoknak a következtében [Yuan és mtsai: *Cancer Research* 55, 3752 (1995)]. Azt gondolják, hogy a normál szövetek és tumorok angiogenezise során a szivárgás annak a következménye, hogy az endoteliális sejtek lazítják

szoros kötődéseiket, azzal a céllal, hogy osztódjanak és szaporodjanak. Egy másik változat szerint azt sugallták, hogy a vaszkuláris szivárgásra ahhoz van szükség, hogy az angiogenezis lejátsszódjon [Dvorak és mtsai (1995)].

Azonban, ami egy homeosztatikus válasz lehet az ilyen szivárgásra, az az, hogy úgy tűnik, hogy aktív vaszkuláris helyeken levő angiogenikus endoteliális sejtek nagyobb sűrűségben és/vagy nagyobb mennyiségben expresszálnak negatív töltésű felszínnel rendelkező molekulákat, mint amennyi nyugalmi állapotban a vaszkuláris helyeket található. Ezt a megfigyelést támasztja alá például Cavalló és munkatársai munkája, aki kimutatta, hogy a szivárgó véredények az anionos helyeknek a kontrollnál nagyobb nagyobb sűrűségét mutatják a luminális endoteliális plazma membránon [Cavallo és mtsai: Virchows Arch. [Pathol. Anat] 388, 1 (1980)]. A negatív töltésnek ez az erősödése természetes gátként funkcionál a negatív töltésű molekuláknak a vérből való behatolásával szemben. Amint azt az előzőkben megjegyeztük, Taguchi és munkatársai kimutatták, hogy az endoteliális ablakos és alap membránoknál a megnőtt negatív töltés töltés-korlátként hat, és megátolja az anionos molekulák átjutását [Taguchi és mtsai: Arch. Histol. Cytol. 61, 243 (1998)].

A kationos liposzómákról kimutatták, hogy az endoteliális sejtek szer-specifikus módon veszik fel, és leginkább a tüdőben akkumulálódik [McLean és mtsai: Am. J. Physiol. 273, H387 (1997)]. Azonban a tumorok és a krónikus gyulladásban szerepet játszó angiogén endoteliális sejtekről kiderült, hogy főleg a katio-

nos liposzómákat veszik fel, és egy nagy rész asszociálódik az endoteliális ablakhoz [Thurston és mtsai: J. Clinic. Invest. 101, 1401 (1998)]. Az endoteliális ablakot nagyon gyakran meg lehet találni a tumor endotéliumban [Roberts és Palade: Cancer Research 57, 765 (1997); Hobbs és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 95, 4607 (1998)], és így a kationos fehérjék kiszivárgásának helye lehet.

3. Az angiogén endoteliális sejtek megcélzása kationos liposzómákkal

McDonald és munkatársai az 5,322,678 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban (1998) leírják az angiogén endoteliális sejtek szelektív irányítását kationos liposzómákkal, amik olyan ágenst tartalmaznak, ami befolyásolja a megcélzott sejtek növekedését, vagy a megcélzott sejteken levő jeleket. A kationos liposzómák elég hosszú ideig asszociálódnak az angiogén endoteliális sejtekkel, oly módon, hogy a liposzómák maguk és/vagy a liposzómák tartalma belépjen az angiogén endoteliális sejtekbe. Tehát az ágens, ami belép a sejtbe, képes gátolni vagy elősegíteni a sejt angiogenezisét, vagy egyszerűen egy jelzést biztosít, ami lehetővé teszi az angiogenezis helyének kimutatását. McDonald és munkatársai találmánya azon a felfedezésen alapul, hogy a kationos liposzómák ötször vagy annál is nagyobb arányban asszociálódnak az angiogén endoteliális sejtekkel, mint az ezeknek megfelelő, nyugalmi állapotú endoteliális sejtekkel.

McDonaldnak és munkatársainak ez a találmánya leírja a kationos liposzómák használatát, amik lehetnek semleges és kationos lipidek, például olyanok, amik 5 mol%-ban, vagy nagyobb arányban tartalmaznak kationos lipideket, vagy specifikusan tartalmazhatnak semleges lipideket 45%-nál nagyobb mennyiségben, vagy tartalmazhatnak kationos lipideket körülbelül 55%-ban. Miközben McDonald és munkatársai azt közlik, hogy a kationos liposzómák zeta potenciálja 0 mV-nál nagyobb, ez a szabadalmi leírás nem ad meg semmilyen specifikus zeta potenciált vagy izoelektromos pontot, vagy annak tartományát, ami előnyben részesíthető lehet az angiogén endoteliális sejtek szelektív becélzásához. McDonald és munkatársai azt sem közlik, hogy mi a kationos lipid előnyben részesített felső korlátja a kationos liposzóma készítményben való felhasználás során, ha az a cél, hogy szelektíve irányítsuk az angiogén endoteliális sejteket.

Thurston és munkatársai szintén leírják az endoteliális sejtek tumorokban és krónikus gyulladásban való becélzását egereknél, kationos liposzómákat használva [Thurston és mtsai: J. Clinic. Invest. 101, 1401 (1998)]. Thurston kationos liposzómákat használ, amik 55 mól% kationos komponenst tartalmaz. Thurston nem közöl specifikus zeta potenciált vagy izoelektromos pontot vagy azok tartományát, azzal a céllal, hogy egerekben az endoteliális sejteket szelektíve irányítsák a tumorokban vagy krónikus gyulladásban.

4. A fehérje farmakokinetika modulálása

Morgan és munkatársai leírnak egy módszert a fehérjék farmakokinetikai tulajdonságainak megváltoztatására, töltésük módosításával [Morgan és munkatársai: 5,322,678 (1994) és 5,635,180 (1997) számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás]. Ezek a szabadalmi leírások módszereket ismertetnek a „célzó fehérjék”, főleg ellenanyag fragmensek vesén keresztül való kiürülésének befolyásolására, annak a megfigyelésnek az alapján, hogy a kationosabb jellegű ellenanyag vagy fragmensek gyorsabban lerakódnak a glomeruláris alap membránban, és így gyorsabban kiürülnek a szérumból. Tehát Morgan és munkatársai szerint a fehérje ágensek nettó töltése megváltoztatható, azzal a céllal, hogy csökkentsük vagy növeljük a véráramból való kiürülésük sebességét.

Morgan és munkatársai szabadalmi leírásaikban azt közlik, hogy a tumorsejteknek nettó negatív töltésük van, és a normál sejteknek hasonlóképpen negatív töltésű klaszterei vannak. A tumorsejtek negatív töltése dacára Morgan és munkatársai azt állítják, hogy a megcélzott terápiás fehérje töltését negatívabbá kell tenni (azaz anionosabbá, vagy másszóval az izoelektromos pontjukat kell 7 alá vinni), azzal a céllal, hogy csökkentsük a veséből való kiürülést, megnöveljük a felezési időt a szérumban, és minimalizáljuk a normál sejtekkel való aspecifikus kölcsönhatásokat. Azt állítják, hogy ez lehetővé teszi az ágens fokozott lokalizációját a célpontban, azaz például a tumoron. Morgan és munkatársai leírják, hogy miként kell a terápiás ágenst módosítani, hogy savasabb izoelektromos pontot kapjunk, egy pH-egység legalább

egy tizedének, maximum négy pH-egységnek megfelelő savas eltolással. Morgan és munkatársai azt állítják, hogy 4.0 vagy alacsonyabb pI értéknél (savasabb) virtuálisan az összes ionizálható csoport protonálva van a fehérjében, Ennek elvégzésének egyik módja a célzó fehérjében töltés módosítása legalább egy lizin csoporton, nettó pozitív töltésről nettó negatív töltésre (5,635,180 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás, 6-8. és 11. oszlop, és az 5,322,678 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás 6-8. oszlop).

Ezzel ellentétben Morgan és munkatársai azt mondják, hogy egy semleges vagy bázikus ellenanyag fragmensre van szükség a szérumból való gyorsabb kiürüléshez, és a magas tumor-háttér arányhoz a korai időpontokban [Morgan és munkatársai: 5,322,678 (1994) és 5,635,180 (1997) számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás]. Azonban inkább a viszonylag bázikusabb (kationos) fragmenseket részesítik előnyben a rövid felezési idejű izotópokhoz, miközben a savasabb (anionos) fragmenseket részesítik előnyben a hosszabb felezési idejű izotópokhoz. Ennek megfelelően Morgan és munkatársai szerint bázikusabb izoelektromos pont kell a diagnosztikai ágensekhez, és savasabb izoelektromos pont kell a terápiás ágensekhez. Mindazonáltal Morgan és munkatársai nem ismertetik sem a terápiás ágens, sem a diagnosztikai ágens izoelektromos pontja megváltoztatásának módszerét, a maximális célzáshoz és a minimális toxicitáshoz.

Morgannal és munkatársaival ellentétben Khawli és munkatársai [5,990,286 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadal-

mi leírás (1990)] leírják a csökkent nettó pozitív töltésű (az izoelektromos pont savas eltolódása) ellenanyagok diagnosztikai használatát a megnövekedett nettó pozitív töltésűvel szemben. Khawli és munkatársai szerint ennek sorrendje az antigén kötési specifitás növelése, az aspecifikus kötődés csökkentése, és az *in vivo* kiürülés idejének csökkentése. Az ismertetett módszerek közé tartoznak az alábbi lépések: olyan ellenanyag előállítása, ami érintetlen, a kimutatandó antigénre kötési specifitással rendelkezik, a természetes ellenanyagnak számos különböző, szabad aminos csoportja van a felszínén, és a szabad aminos csoportok közül legalább az egyik reagál egy kémiai reagenssel, ezzel módosított ellenanyagot állítva elő, oly módon, hogy a módosított ellenanyag izoelektromos pontja alacsonyabb legyen, mint az érintetlen ellenanyag izoelektromos pontja, majd a módosított ellenanyagot egy kimutatható jelöléssel jelezzük. A módszerről azt állítják, hogy egy jelzett, módosított ellenanyagot eredményez, ami például immunscintigráfiával mutatható ki, úgymint egy gamma kamerával.

Khawlihoz és munkatársaihoz hasonlóan [5,990,286 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás (1990)] Rok és munkatársai olyan adatokat írnak le, amik azt mutatják, hogy egy gyógyszer-LMWP konjugátumnak a vizeletbe való kiválasztása növelhető, ha csökkentik a pozitív töltést (savas eltolódás az izoelektromos pontban) a hordozó felszínén [Rok és mtsai: Renal Failure 20(2), 211-217 (1998)]. Tehát egy ilyen hordozóról azt állítják, hogy vonzó jelölt arra, hogy a gyógyszer hatóanyagot a hólyagba irányítsuk.



Ezek a korábbi publikációk azt állítják, hogy a terápiás ágens töltését módosítani kell, csökkentve a nettó töltését, azaz az ilyen ágenseket anionosakká kell tenni, azzal a céllal, hogy lokalizációjukat fokozzuk a megcélzott pontban, a jelen találmánnyal ellentétben, ami részben arra a meglepő felfedezésre alapul, hogy a pozitív töltésű terápiás és diagnosztikai ágenseket szelektíve lehet irányítani a vaszkuláris helyekre, amik negatív töltésűek, vagy az anionos töltések klaszterezését mutatják, az inaktív vaszkuláris helyekkel összehasonlítva. A jelen találmány tárgya az, hogy a terápiás és diagnosztikai ágenseket módosítjuk, hogy növeljük zéta potenciáljukat vagy izoelektromos pontjukat, hogy szelektíve az aktivált vaszkuláris helyekre célozzuk ezeket. A jelen találmány útmutatást ad a zéta potenciálok és izoelektromos pontok tartományára, hogy szelektíve irányítsunk az aktivált vaszkuláris helyekre.

Jelenleg, mivel nincsenek klinikailag igazolt módszerek a terápiás és diagnosztikai ágensek szelektív bejuttatására a megcélzott pontokba, például az angiogenezis vagy a gyulladásos helyére, az ilyen állapotokat közvetlenül fizikai módszerekkel kezelik, azaz például a rákos szövetek sebészeti eltávolításával. Az angiogenezis helyeit is kémiaiilag kezelik. Például a kemoterápiás ágenseket alkalmazzák a rákok esetében, és a gyulladásellenes gyógyszereket alkalmazzák a krónikus gyulladásellenes állapotok esetében. Azonban ezek a módszerek felvetik az operatív kockázatok kérdését, a mellékhatások, a hatékonyság és a siker gyakoriságának kérdését. Továbbá a kezelés, azaz például a kemoterápia nem



célzott, és a kemoterápia következtében mellékhatások, azaz például csontvelő depresszió, gasztroenteritisz, émelygés, hajhullás, máj- vagy tüdőkárosodás és sterilitás lép fel. Tehát szükség van új stratégiák kidolgozására, amikkel szelektíve be lehet juttatni a terápiás és diagnosztikai ágenseket az aktivált vaszkuláris helyekre, amint azt a különböző, angiogenezishez kapcsolódó betegségek esetében megfigyelték.

A negatív töltés növelése az aktivált vaszkuláris helyeken, azaz például olyan pontokban, amikben angiogenezis lép fel, módszerrel biztosít arra, hogy megkülönböztessük a nyugalmi állapotú endoteliális sejteket az aktivált sejtektől. Az ilyen negatív töltésű, aktivált vaszkuláris helyek szolgálhatnak célpontként a terápiás és diagnosztikai ágensekhez, amik úgy vannak módosítva, hogy nettó pozitív töltést vagy pozitív töltést hordozzanak az ismertetett tartományon belül. A terápiás, képalkotó és diagnosztikai ágensek úgy módosíthatók, hogy pozitív töltéssel rendelkezzenek, és ezek szelektíve irányíthatók az aktivált vaszkuláris helyekre.

A jelen találmány tárgya eljárás egy terápiás, diagnosztikai vagy más gyógyászati készítmény szelektív célzására egy vaszkuláris helyre, töltését vagy töltés-sűrűségét módosítva. Egy gyógyszer hatóanyag vagy gyógyszer hordozó készítmény töltés-módosításával szoros korrelációban van a tolerabilitásának változása. A pozitív töltésű gyógyszer-hordozó rendszereket gyakran tekintik biológiailag gyengén tolerálhatóknak; a toxicitás tipikus esetben nő a pozitív töltésű komponens mennyiségével. Amint azt a példákban demonstráljuk, a feltalálók meglepő módon azt találták, hogy li-

neáris kapcsolat van egy gyógyszerhordozó rendszer célzási tulajdonságai és zéta potenciálja között. Azonban a zéta potenciál és a kationos komponens koncentrációja közötti kapcsolat egy hiperbolikus görbére illeszkedik. Ez lehetővé teszi egy olyan régió azonosítását, amiben a célzás majdnem a maximumán áll, de a kationos komponens koncentrációja nem. A szelektív célzásnak ezt a módszerét előnyösen úgy lehet végrehajtani, hogy egy, az alábbi csoportból választható készítményt adunk be: a) részecskék, liposzómák kivételével, amiknek a zéta potenciálja körülbelül +25 mV és +100 mV között van, körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül pH=7,5 értéknél; b) olyan molekulák, amiknek az izoelektromos pontja 7,5 fölött van; és c) liposzómák, amik kationos lipideket tartalmaznak, körülbelül 25 mól% és 50 mól% közötti tartományban; d) magnetoszómák, amiknek kationos lipidrétegük van, aminek a zéta potenciálja körülbelül +25 mV és körülbelül +100 mV között van körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, pH körülbelül 7,5. A megfontolás tárgyává tett aktivált vaszkuláris helyek a következők: a) az angiogenezis helyei; a gyulladás helyei; c) a sebgyógyulás helyei; és a vér-agy gát, és más ilyen helyek is nyilvánvalóak lesznek a szakterületen jártas szakember számára.

Egy képalkotó készítmény, amivel szelektív célzást végzünk egy aktivált vaszkuláris helyre, előnyösen tartalmaz egy képalkotó ágenszt és egy hordozót. Egy terápiás készítmény, amivel szelektív célzást végzünk egy aktivált vaszkuláris helyre, előnyösen egy aktív adalékanyagból terápiásan hatékony mennyiséget tartalmaz,

valamint tartalmaz egy hordozót, valamint esetleg egy képalkotó ágenst is.

A megfontolás tárgyává tett hordozók közé az alábbiak tartoznak: a) részecskék, liposzómák kivételével, amiknek a zéta potenciálja körülbelül +25 mV és +100 mV között van, körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül pH=7,5 értéknél; b) olyan molekulák, amiknek az izoelektromos pontja 7,5 fölött van; és c) liposzómák, amik kationos lipideket tartalmaznak, körülbelül 25 mól% és 50 mól% közötti tartományban; d) magnetoszómák, amiknek kationos lipidréttegük van, aminek a zéta potenciálja körülbelül +25 mV és körülbelül +100 mV között van; e) olaj-a-vízben emulzió, vagy mikroemulziók, amik kationos amfifil anyagokat tartalmaznak a külső rétegben, körülbelül 25-60 mól/mennyiségben, zéta potenciáljuk körülbelül +25 mV és körülbelül +100 mV között van körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, pH körülbelül 7,5. Az alkalmas leképező ágenssek közé tartoznak a vasoxid részecskék, a festékek, a fluoreszcens festékek, az NMR jelölések, a szcintigráfias jelölések, aranyrészecskék, PET jelölések, ultrahang kontrasztanyagok, és CT kontraszt anyagok.

Az állatokban - beleértve az emlősöket, különösen az embereket - használt terápiás, diagnosztikai és képalkotó módszerek tartalmazzák ágenssek beadását egy olyan protokoll szerint, ami lehetővé teszi, hogy az ágens vagy aktív adalékanyag szelektíve akkumulálódjon, hatékony szinten, leképezés, vagy más diagnosztikai célokra, az angiogenesis helyének közelében.

Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint egy terápiás készítmény aktív adalékanyagát citosztatikumokat és citotoxikus ágenseket tartalmazó csoportból választhatjuk ki. A citosztatikus és citotoxikus ágensek közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a taxánok, a szervetlen komplexek, a mitózis inhibitorok, a hormonok, az antraciklinek, az antibiotikumok, a topoizomeráz inhibitorok, a gyulladáscsökkentő ágensek, az alkaloidok, az interleukinok, a citokinek, a növekedési faktorok, a fehérjék, a peptidek, a tetraciklinek és a nukleozid-analógok. Az ilyen anyagok specifikus példái lehetnek, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a paclitaxel és annak származékai, a docetaxel és annak származékai, az epothilon A, B és D valamint ezek származékai, a camptotecin, a daunorubicin, a doxorubicin, az epirubicin, a vincristine, a navelbine, az antimikrotubulus aktív ágensek, a thrombospondin, az angiostatin, a ciszplatina vegyületek, és más platina vegyületek, a gemcitabine és az 5'-fluorouracil és más nukleozid-analógok.

A jelen találmány tárgya továbbá különböző készítmények módosítása, azzal a céllal, hogy egy vagy több tulajdonsággal rendelkezzenek az alábbi csoportból: a) a zéta potenciál körülbelül +25 mV és +100 mV között van, körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül pH=7,5 értéknél; és b) az izoelektromos pont 7,5 fölött van.

Megfontoltuk, hogy számos különböző betegség gyógyítható az előzőekben említett módszerekkel és készítményekkel. Az ilyen betegségek közé tartozik például a diabeteszes retinopátia, a kró-

nikus gyulladásos betegségek, a reumás arthritis, a gyulladás, a dermatitisz, a pszoriázis, a gyomorfekélyek, a hematogén és szilárd tumorok. Néhány esetben egy aktivált vaszkuláris hely azonosítása jelezhet egy angiogenezishez kapcsolódó betegséget.

Megfontoltuk, hogy vagy az aktív adalékanyag vagy a hordozó úgy módosítható, hogy a kombinált termék zéta potenciálja növekedjen vagy csökkenjen, azzal a céllal, hogy az előnyben részesített zéta potenciál tartományba eső zéta potenciált kapjon. Az ilyen módosításokat a szakterületen jártas szakember számára ismert kémiai módszerekkel lehet elérni, előnyösen ide tartoznak a kationképző ágensek és/vagy a kationos ágensek, például, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, az etiléndiamin, a hexametiléndiamin, a trietiléntetraamin, a 4-dimetilamino-butilamin, az N,N-dimetilaminoetil-amin, más kationos poliaminok, a dimetilamino-benzaldehid, a polilizin, más kationos peptidek, a kitozán és más kationos poliszacharidok. Az ilyen módosításokat létrehozhatjuk úgy is, hogy az aktív ágenszt reagáltatjuk egy kationos molekulával, oly módon, hogy kovalens kötés jöjjön létre a két molekula között. Egy másik változat szerint az ilyen módosításokat elérhetjük az aktív ágens és egy kationos ágens vagy hordozórendszer közötti komplexképzéssel is (azaz nem-kovalens kötés létrehozásával). Néhány készítmény tartalmazhat egy fehérjét, és a különböző reagensek, amikkel növelni vagy csökkenteni lehet a zéta potenciált, ismertek a fehérje- és gyógyszer-vegyészek számára.

A jelen találmány egy előnyben részesített megvalósítási módja szerint a diagnosztikai, képalkotó és terápiás készítmények jelezve vagy csomagolva vannak, a készítmény beadásához való használati utasítással, hogy egy angiogenezishez kapcsolódó betegséget kezeljenek vele.

Megfontoltuk, hogy a terápiás készítményben az aktív adalékanyagot az alábbi csoportból választjuk ki: éterlipid, alkil-lizolecitin, alkil-lizofoszfolid, lizolipid, alkil-foszfolid. A készítményben levő éterlipid előnyösen lehet, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, 1-O-oktadecil-2-O-metil-rac-glicero-3-fosfokolin, 1-O-hexadecil-2-O-metil-sn-glicerin, hexadecil foszfokolin és oktadecilfoszfokolin.

A beadott zéta potenciál készítmények előnyösen a következő tartományba esnek: körülbelül +25 mV és +100 mV között, körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül pH=7,5 értéknél; előnyösebben +30 mV és +50 mV között, körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül pH=7,5 értéknél. A jelen találmány egy másik megvalósítási módja szerint az ismert diagnosztikai, képalkotó és terápiás készítmények módosítva vannak, vagy azzal a céllal, hogy növeljük vagy csökkentjük a készítmény effektív zéta potenciálját, oly módon, hogy az az előzőkben, vagy a részletes leírásban ismertetett, előnyben részesített tartományba essen, azaz egy széles tartományba, előnyösebben +30 mV és +50 mV között, körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül pH=7,5 értéknél.

A jelen találmányban a DOTAP mellett különböző kationos lipideket is megfontoltunk. Ezek az alábbiak lehetnek, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat: DDAB (dioktadecil-dimetilammóniumbromid), DC-Chol (3β [N-(N',N'-dimetilaminoetán)-karbamoil)] koleszterin, DOSPER (1,3-dioloil-2-(6-karboxi-spermil)-propilamid).

A jelen találmány tárgya továbbá eljárás egy optimális zéta potenciál meghatározására egy készítményhez, azzal a céllal, hogy egy specifikus pontba célozzunk vele. Az eljárás a következő lépésekből áll: i) mérjük a készítmény zéta potenciálját, miközben változtatjuk a kationos komponensek koncentrációját; ii) a zéta potenciál értékeket ábrázoljuk az y tengelyen, és a kationos komponensek koncentrációját ábrázoljuk az x tengelyen, ezzel hiperbolikus görbét kapunk; és iii) meghatározzuk a kationos komponens zéta potenciálját és koncentrációját abban a régióban, amelyben a hiperbolikus görbének inflexiója van, mivel a hiperbolikus görbe inflexiós pont régiója optimális tartományt jelent a készítmény számára. A jelen találmány tárgya eljárás egy optimális zéta potenciál meghatározására egy készítményhez, azzal a céllal, hogy egy specifikus pontba célozzunk vele, azzal jellemezve, hogy kiértékeljük a készítmény zéta potenciálját, és a készítmény eltérő mennyiségű kationos komponenshez asszociálódik, majd azonosítjuk a zéta potenciál optimális tartományát. A jelen találmány tárgya továbbá eljárás egy készítmény módosítására, azzal a céllal, hogy fokozzuk hatékonyságát, ami abból áll, hogy a kationos komponenseket asszociáljuk a készítménnyel, ezzel olyan készítményt

állítva elő, aminek a zéta potenciálja az optimális tartományban van.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a mellékelt ábrákat.

Az 1. ábra egy részecske zéta potenciáljának sematikus reprezentációja.

A 2. ábra a különböző liposzóma kiserelési formák mért zéta potenciálját mutatja.

A 3. ábra a kationos liposzómák zéta potenciálját mutatja, egy hiperbolikus görbéhez illesztve, aholis a zéta potenciál a DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilammónium propán) mol%-ban kifejezett koncentrációjától függ.

A 4A-C. ábra mutatja semleges, negatív és pozitív töltésű dextránok szelektivitását az időben, a tumor endoteliális sejtekben mért fluoreszcencia intenzitások versus környező szövetek összefüggésében.

Az 5A-B. ábra mutatja a rodaminnal jelzett liposzómák felvételét HUVEC-cel. Az 5A. ábra mutatja a fluoreszcencia intenzitást (cps) vs. DOTAP (mól%). Az 5B. ábra mutatja a fluoreszcencia intenzitást (cps) vs. zéta potenciál (mV).

A jelen találmány azon a megfigyelésen alapul, hogy egy specifikált nettó pozitív töltés-tartománnyal vagy töltéssel rendelkező molekulák szelektíve irányíthatók az aktivált vaszkuláris helyekre. Az ilyen helyek az angiogén endoteliális sejtekkel, a gyulladásokkal és a sebgyógyulási helyekkel asszociálódva találhatók.

A jelen találmány azon a felfedezésen is alapul, hogy ha növeljük vagy moduláljuk a diagnosztikai, képalkotó és terápiás ágensek nettó pozitív töltését, akkor ennek eredménye az ilyen ágensek szelektív akkumulálódása az aktivált vaszkuláris helyeken. Emellett, ha egy bizonyos töltés-tartományt vagy töltés sűrűséget választunk ki, akkor az ilyen ágensek akkumulálódása a gyulladásos helyeken - ami krónikusan megtalálható a tüdőben - minimalizálható, miközben biztosítjuk a célzási szelektivitást az aktivált és nem-aktivált vaszkuláris helyek között a többi szövetben. Ebből a szempontból megfontoltuk, hogy az alábbiakban jelzett tartományok alatti nettó pozitív töltéssel rendelkező ágensek kezelhetők, módosíthatók vagy csomagolhatók úgy, hogy csökkenjen látszólagos nettó töltésük, hogy ezzel fokozzuk biológiai tolerabilitásukat.

Emellett a jelen találmány azon a megfigyelésen alapul, hogy egy specifikált nettó töltéssel rendelkező molekulák szelektíve kötődnek az angiogén endoteliális sejtekhez, és azok szelektíve veszik fel, mind a nyugalmi állapotú endoteliális sejtekhez, mind a viszonylag konstans aktivált vaszkuláris helyeken, mint például a tüdőben levő endoteliális sejtekhez viszonyítva. Az ilyen szelektív célzás és akkumulálás fokozza ezeknek az anyagoknak a lokális kötődését az extracelluláris mátrixhoz és az angiogén endoteliális sejtekhez. Emellett az ágenseknek ez a szelektív célzása és lokális akkumulálódása a gyulladásához kapcsolódó aktivált vaszkuláris helyeken levő vaszkuláris endoteliális sejtek szomszédságában, amint az megkülönböztethető a tumorok által indukált neovas-

kularizáció helyeitől. Az ilyen akkumulálódás, az aktivált hely bármelyik típusában ezeknek az ágenseknek egy magasabb koncentrációját is produkálja, a gyulladás vagy az áttétes tumorok helyén. Extravazáción és más releváns folyamatokon keresztül az ilyen ágensek szelektíve akkumulálódnak ezeken a helyeken, terápiás, képalkotási és diagnosztikai célból.

Ennek megfelelően a jelen találmány tárgya eljárás egy diagnosztikai, képalkotó vagy terápiás ágens szelektív irányítására egy emlős - beleértve a humán betegeket is - aktivált vaszkuláris helyeire. Általánosságban a jelen találmány tárgya olyan ágensek beadása, amiknek a nettó pozitív zéta potenciálja 25 mV fölött van körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül 7,5-ös pH-n, vagy 7,5-nál magasabb izoelektromos pontnál, előnyösen az előzőekben ismertetett tartományokban, és amik lehetővé teszik, hogy az ágensek szelektíve akkumulálódjanak egy vagy több aktivált vaszkuláris helyen.

Az ilyen ágensek irányíthatók a gyulladás helyein talált vaszkuláris endoteliális sejtekhez valamint az angiogén endoteliális sejtekhez és ezek extracelluláris mátrixához, annyi ideig és oly módon, hogy az ágens akkumulálódjon a megcélzott vaszkuláris endoteliális sejtek szomszédságában. A jelen találmány tárgyát képezik továbbá olyan ágensek, amik tartalmazznak egy olyan hordozót, aminek a specifikált nettó pozitív zéta potenciálja 25 mV körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, a pH értéke körülbelül 7,5, vagy az izoelektromos pontja 7,5 fölött van, az alábbiakban ismertetett tartományokban, valamint tartalmazznak egy aktív

adalékanyagot is. Emellett a jelen találmány szerinti készítmények és módszerek használhatók aktivált vaszkuláris helyeken, amik a sebgyógyuláshoz kötődnek, aholis a vaszkuláris endoteliális sejtek közötti kapcsolat szivárogni kezd, és a sejtek és extracelluláris mátrixaik a nyugalmi állapotú, vagy nem-aktivált vaszkuláris helyekhez viszonyítva megnőtt negatív töltést fejlesztenek ki.

Ebből a szempontból a releváns szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy a zéta potenciál egy olyan, mérhető tulajdonság, ami alkalmazható részecskék, főleg kolloid részecskék, azaz például 3-10 nm-nél nagyobb liposzómák, magnetoszómák vagy mikroemulziók töltésének vagy töltéssűrűségének mérésére. Hasonlóképpen, az is nyilvánvaló, hogy az izoelektromos pont is egy olyan tulajdonság, aminek a mérése alkalmazható a makromolekulák - beleértve a fehérjéket, ellenanyagokat - valamint a kolloidok, azaz például a dextránok töltéssűrűségének mérésére.

1. Definíciók

Hacsak más definíciót nem alkalmazunk, akkor az ebben a specifikációban használt összes technikai és tudományos szak kifejezés jelentése ugyanaz, mint ami általában azok, a szakterületen jártas szakemberek értenek alatta, akiknek ez a találmány szól.

Az „aktivált vaszkuláris hely” szakkifejezés olyan vaszkuláris endoteliális helyekre vonatkozik, amik aktivált fenotípust mutatnak, és amikben az endoteliális sejtek között normális körülmé-

nyek között megtalálható szoros kapcsolatok az angiogenezis vagy gyulladás miatt meglazulhatnak, és ennek a helynek a permeabilitása megnő, lehetővé téve a vér, plazma és különböző gyógyászati ágensek extravazációját.

Az „aktív adalékanyag” szakkifejezés egy olyan ágensre vonatkozik, ami diagnosztikailag vagy terápiásan hatékony.

Az „angiogenezis” szakkifejezés új véredények kialakulását jelenti. Az endoteliális sejtek új kapillárisokat képeznek *in vivo*, ha erre indukálják őket, azaz például a sebgyógyulás vagy a tumor-képződés során, vagy néhány más patológus állapotban, amiket a továbbiakban angiogenezishez kapcsolódó betegségeknek nevezünk.

Az „angiogenezishez kapcsolódó betegség” szakkifejezés emberekben előforduló patológus folyamatokra vonatkozik, aholis az angiogenezis normális körülmények között meghosszabodik, vagy patológusán indukálva van. Az ilyen, angiogenezissel indukált betegségek közé tartozik a diabeteszes retinopátia, a krónikus gyulladásos betegségek, a reumás arthritis, a gyulladás, a dermatitisz, a pszoriázis, a gyomorfekélyek, a hematogén és szilárd tumorok.

Az „angiogén endoteliális sejtek” szakkifejezés olyan vaszkuláris endoteliális sejtekre vonatkozik, amik olyan sebességgel szaporodnak, ami lényegesen magasabb, mint a vaszkuláris endoteliális sejtek normális körülmények között megfigyelhető szaporodási sebessége.

A „hordozó” szakkifejezés jelentése általában hígítószer, adjuváns, töltőanyag vagy hordozó, amivel egy diagnosztikai, képalkotó vagy terápiás ágenszt beadunk. A továbbiakban a hordozó szakkifejezés olyan gyógyászatilag elfogadható komponensekre is vonatkozik, amik tartalmaznak egy aktív adalékanyagot, vagy komplexet képeznek vele, azzal a céllal, hogy megkönnyítsék egy ilyen ágens eljuttatását a megcélzott helyre. A megfontolt hordozók közé tartoznak a szakterületen ismert hordozók, a liposzómák, a különböző polimerek, a lipid komplexek, a szérum-albumin, az ellenanyagok, a ciklodextrinek, a kelátok és más szupramolekuláris komplexek.

A „kationos” szakkifejezés egy olyan ágensre vonatkozik, aminek fiziológiás pH-n nettó pozitív töltése vagy pozitív zéta potenciálja van (vagy izoelektromos pontja 7 fölött van).

A „kolloidok” vagy kolloid részecskék olyan részecskék, amik egy olyan közegben vannak elosztatva, amiben oldhatatlanok, és méretük 10 nm és 5000 nm között van.

A „kombináció”, vagy „együtt-beadás” szakkifejezés egy olyan kezelési menetrendre utal, ami szinkron, sorozat, átlapoló, alternáló, párhuzamos, vagy bármilyen más kezelési menetrend, amiben a különböző ágenseket vagy terápiákat egyetlen kezelési mód, előírás vagy indikáció egy részeként adjuk be, amiben az időtartamok, amik alatt a különböző ágenseket vagy terápiákat alkalmazzuk, másképp részlegesen vagy teljesen egybeesnek.

A „diagnosztikai vagy képalkotó ágens” szakkifejezés egy gyógyászatilag elfogadható ágensre vonatkozik, ami arra használ-

ható, hogy lokalizáljuk vagy láthatóvá tegyük az angiogenezis helyét, a detektálás különböző módszereivel, beleértve az MRI-t és a szcintigrafikus technikákat. A megfontolt diagnosztikai vagy képalkotó ágensek közé tartoznak a szakterületen ismert ágensek, azaz például a festékek, fluoreszcens festékek, aranyrészecskék, vasoxid részecskék és más kontrasztképző ágensek, beleértve a paramágneses molekulákat, a röntgensugarat elnyelő vegyületeket (CT-hez és röntgenhez) kontraszt ágensek az ultrahangos vizsgálathoz, γ -sugarakat emittáló izotópok (szintigráfia) és a pozitront emittáló izotópokat (PET).

A „diagnosztikusan hatékony” szakkifejezés egy olyan ágens-re vonatkozik, ami hatékonyan lokalizálja, vagy más módon azonosítja az angiogenezis vagy neovaszkularizáció helyeit monitorozási vagy képalkotási célokból.

Az „emulzió” vagy „mikroemulzió” szakkifejezés egy olyan rendszerre vonatkozik, ami két, egymással nem elegyedő folyadékot tartalmaz, amik közül az egyik a másikban van diszpergálva, nagyon kis gömbök formájában (belső fázis) a másik (külső) fázisban, például olaj-a-vízben (tej) vagy víz-az-olajban (majonéz). Az emulzió vagy mikroemulzió lehet két egymással nem elegyedő folyadék kolloid diszperziója (azaz például folyadék-folyadék diszperzió).

Az „endoteliális sejt” szakkifejezés az endotéliumot alkotó sejtekre vonatkozik, ami egysejtréteget alkot a véredények, a szív, és a nyirokerek belső felszínén. Ezek a sejtek megtartják a sejtszótózási képességüket, bár nagyon lassan szaporodnak normális

(azaz például nem angiogén) körülmények között, és csak évente körülbelül egyszer szaporodnak.

Az „erősen toxikus”, vagy „erősen toxikus ágens” szakkifejezés egy olyan fehérjére vagy peptidre vonatkozik, amit egy megcélzott sejt expresszál, és gátolja a fehérje, a DNS vagy az RNS szintézisét, vagy destabilizálja a lipid felszínét, vagy másképpen eredményezi a sejtpusztulást apoptózissal vagy nekrozissal. Ilyen ágenseket írnak le az 1999. november 3-án benyújtott 60/163,250 sorozatszámú, rokon szabadalmi leírásban.

A „növekvő zéta potenciál”, vagy az „izoelektromos pont növelése” szakkifejezés egy aktív adalékanyag vagy egy hordozó vegyület olyan megváltoztatására vagy módosítására vonatkozik, ami olyan mértékben növeli meg nettó pozitív töltését, hogy annak eredménye egy statisztikailag szignifikáns változás az említett adalékanyag vagy hordozó akkumulálódása mennyiségében vagy sebességében egy aktivált vaszkuláris helyen, azaz például az angiogenezis egy helyén, amely változtatást elérhetünk származékképzéssel, kovalens módosítással, egy aminosav helyettesítésével vagy hozzáadásával egy hordozóhoz vagy más szubsztráthoz való kapcsolódással vagy komplexképzéssel, az említett adalékanyaghoz vagy hordozóhoz való akkumulálódással összehasonlítva, anélkül hogy az ilyen változtatást vagy módosítást elvégeztük volna.

Az „izoelektromos pont” (pI vagy IEP) szakkifejezés arra a pH-értékre vonatkozik, aminél a molekulának nincs nettó töltése.

A „magnetoszómák” szakkifejezés vonatkozik például ferroszómákra, egy körülbelül nanométer nagyságú mágneses magra, amit egy vagy több lipidrétteg határol.

Az „olaj-a-vízben emulzió” szakkifejezés jelentése hidrofób olaj kolloid cseppjeinek diszperziója, amiket amfifil lipidek rétege borít egy vizes közegben.

A „szelektív célpont” vagy „szelektíven asszociálódik” szakkifejezés egy aktivált vaszkuláris helyre, azaz például egy angiogén kapilláris véredényre vonatkoztatva egy ágens akkumulálódását jelenti angiogén endoteliális sejtek vagy extracelluláris mátrixuk szomszédságában, vagy az ágens kötődését és/vagy felvételét jelenti angiogén endoteliális sejtek vagy extracelluláris mátrixuk szomszédságában, magasabb szinten, mint ami a megfelelő normális (azaz például nem-angiogén) endoteliális sejteknél található.

A „szelektivitás” szakkifejezés a fluoreszcencia-intenzitásra vonatkoztatva a tumor endoteliális sejtek fluoreszcencia intenzitásának a környező szövetek fluoreszcencia intenzitására vonatkoztatott arányára vonatkozik. Tehát az 5. példában a szelektivitást az affinitásnak azzal az értékével mérjük, amivel a töltött dextrán molekulák kötődnek a tumor endotéliumához.

A „terápiásan hatékony” szakkifejezés olyan ágensre vonatkozik, ami hatékonyan csökkenti egy gyulladásos betegség vagy egy angiogenezishez kapcsolódó betegség, azaz például rák patológiájának nagyságát vagy kiterjedését, vagy csökkenti az angiogenezis vagy neovaszkularizáció sebességét, előnyösen lényegében megakadályozza az ilyen folyamatok folytatódását az angiogenezis

meglevő helyein, vagy lényegében megakadályozza az angiogenezis iniciálódását az angiogenezis további, nem-kívánt helyein. Például a tumor metasztázissal rokon angiogenezis kezelésénél egy terápiásan hatékony vagy hatékony ágens szignifikáns antitumor aktivitást, vagy tumor regressziót mutat, akár a tumorsejtekre gyakorolt közvetlen hatás révén, vagy az angiogenezis gátlásával. Egy ilyen vegyület például csökkentheti a primer tumornövekedést, és előnyösen a rák metasztázis potenciálját. Egy másik változat szerint egy ilyen vegyület csökkentheti a tumor vaszkularitását, például vagy a mikroerek méretének vagy számának csökkentésével, vagy a véredény sűrűség arány csökkentésével.

A „tumor regresszió” szakkifejezés egy tumor méretének, átmérőjének, keresztmetszetének, tömegének vagy életképességének a csökkenését jelenti; jelen a tumor marker csökkenését, vagy a rák diagnózis vagy prognózis más hagyományos előjeleiből vett pozitív indikációkat, amik a ráksejtek méretének csökkenését, vagy növekedésének lassulását mutatják, egy rákos betegnek a jelen találmány szerinti készítményekkel való kezelésének következtében. Az ilyen vegyületek beadása előnyösen legalább körülbelül 30-50 százalékos tumor-regressziót jelent, előnyösebben legalább körülbelül 60-65 százalék tumor regressziót, még előnyösebben legalább körülbelül 80-90 százalék tumor regressziót, és legelőnyösebben legalább körülbelül 95-99 százalékos tumor regressziót jelent egy rákos beteg egy vagy több tumoros pontjában. Ideális esetben egy ilyen beadás az életképes tumorsejt elpusztítását vagy megszüntetését jelenti, vagy teljesen eltünteti a tumorsejteket egy

rákos beteg egy vagy több tumoros pontjában, ezzel egy klinikailag megfigyelhető remisszióhoz, vagy egy beteg egészségi állapotának más javulásához vezet.

Az „angiogenezis helyének szomszédsága” szakkifejezés egy aktív adalékanyagnak az angiogén endoteliális sejt és neovaszkulaturával való fizikai szomszédságát jelenti, oly módon, hogy egy lokalizált koncentráció gradienst lehet elérni, ami az aktív adalékanyagnak olyan mennyiségét képes bejuttatni, ami diagnosztikailag vagy terápiásan hatékony egy angiogenezishez kapcsolódó betegségben.

A „zéta potenciál” szakkifejezés egy részecske, azaz például egy kolloid részecske mért elektromos potenciáljára vonatkozik, amit például egy Zetasizer 3000 berendezéssel lehet megmérni, Laser-Doppler mikro-elektroforézissel, a specifikált körülmények között. A zéta potenciál a potenciál helyét írja le a nagytömegű oldószer és a hidrodinamikai nyírás vagy diffúz réteg régiója között (lásd 1. ábra). A szakkifejezés szinoním az „elektrokémiai potenciállal”, mivel a részecskék potenciálja az, ami kifele hat, és felelős a részecske elektrokinetikai viselkedéséért.

2. Részletes leírás

A. Töltött dextránnal borított vasoxid részecskék felvétele HUVEC-kel

A makromolekuláknak az endoteliális sejtekhez való szállítása nemcsak a molekula méretétől, hanem a töltésétől is függ. Például McDonald és munkatársai leírják, hogy kationos liposzómák

szelektíve megcélozzák azokat az angiogén endoteliális sejteket, amik tápanyagokat juttatnak be a tumorba [McDonald és munkatársai: 5,837,283 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás]. Emellett Spragg és munkatársai azt publikálták, hogy az aktivált humán köldökvéna endoteliális sejtek (HUVEC), ha a doxorubicin nevű citotoxikus ágenszt tartalmazó E-szelektin-célzott immunliposzómákkal inkubálják őket, akkor szignifikánsan alacsonyabb sejt-túlélést mutatnak, míg a nem-aktivált HUVEC-et nem érintette az ilyen kezelés [Spragg és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 94, 8795 (1997)]. Az E-szelektinnel célzott immunliposzómák kationos liposzómákat tartalmaznak, egy E-szelektinre specifikus monoklonális ellenanyaghoz konjugáltatva. Az E-szelektin egy endoteliális-specifikus sejt-felszíni molekula, ami *in vivo* az aktiválás helyein expresszálódik, és a HUVEC-ben citokinekkal való kezelés hatására indukálható. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy a tumor endotélium sejt-felszínének, vagy a glycocalyx-nak negatív töltése van.

A jelen találmány részben azon a felfedezésen alapul, hogy a humán köldökvéna vaszkuláris endoteliális sejtek tenyésztésében a pozitív töltésű dextránnal borított vasoxid felvétele nagyobb, mint a semleges vagy negatív töltésű dextránnal borított vasoxidé. Amint az az 1. táblázatban látható, ha a HUVEC-et pozitív töltésű dextránnal borított vasoxiddal inkubáljuk, akkor a vasoxid 51,8%-át veszik fel a sejtek, és található meg a sejtek lizátumában, miközben 48,2%-a a közegben marad. Másrészt viszont, ha a

HUVEC-et semleges dextránnal borított vasoxiddal inkubáljuk, akkor a vasoxid 18,4%-a található a sejtizátumban, és 81,6% található a közegben.

B. A kationos töltés és a célzás korrelációja

Bár a korábbi szakirodalomban az a vélemény alakult ki, hogy a makromolekulák, azaz például az ellenanyagok és liposzómák, magnetoszómák és mikroemulziók szállítása egy tumor helyére függ a molekula töltésétől, a korábbi szakirodalomban nincs adat semmilyen zéta potenciál tartományra vagy pozitív töltésre, amivel fokozni lehet a diagnosztikai, képalkotó és terápiás ágensek szelektív célzását az aktivált vaszkuláris helyekre, azaz például az angiogén endoteliális sejtekhez és extracelluláris mátrixukhoz.

A jelen találmány azon a megfigyelésen alapul, hogy ha növeljük a DOTAP ((1,2-dioleoil),sn-3-glicerotrimetilammónium propán), vagy bármely más pozitív töltésű lipid (monovalensen vagy polivalensen töltve) mólszázalékát, amint az a kationos liposzómában, valamint a magnetoszómákban és olaj-a-vízben mikroemulziókban található, akkor az korrelál a makromolekula zéta potenciáljával és szelektív asszociációjával az angiogén endoteliális sejtek szomszédságában. Amint az a második és harmadik táblázatban látható, a 4 és 50 mólszázalék közötti DOTAP koncentráció esetében a zéta potenciál viszonylag állandóan növekszik. Ha azonban a DOTAP koncentrációja nagyobb mint 50 mólszázalék, akkor a zéta potenciál kiegyenlítődik, és körülbelül +60 mV maxi-



mumot ér el $\text{pH}=7-7,5$ közötti értéknél. A 2. és 3. táblázat eredményeiből készült grafikonok hiperbolikus görbék (2. és 3. ábra), amik laposak maradnak, ha a zéta potenciált különböző puffer-rendszerekben mérjük. Bár az abszolút zéta potenciál enyhén megváltozik egy másik pufferben, az eredményekből kapott grafikon hiperbolikus alakja megmarad.

Az adatok azt mutatják, hogy egy szupramolekuláris formációban (azaz például egy liposzómában) a nettó pozitív töltés és a kationos komponens közötti kapcsolat nem lineáris (2. ábra). A 60 mólszázalék fölötti DOTAP koncentrációban a zéta potenciál egy platóban végződik, azaz ha tovább növeljük a kationos komponens koncentrációját, akkor ez nem növeli a zéta potenciált. Úgy tűnik, hogy van a töltés-sűrűségnek egy maximuma, ami fölött a kationos komponens további hozzáadásának nincs előnye. Ha a terápiás, képalkotó vagy diagnosztikai ágensek zéta potenciálját e fölé a zéta potenciál fölé növeljük, akkor ez valószínűleg növeli a megcélzott hely(ek)től eltérő szövetekhez való aspecifikus kötődést, és ezzel a toxicitást, valamint más mellékhatásokat. Növelheti a kiürülés sebességét is, ezzel csökkentve a célzott helyen elérhető hatékony dózist.

Ezeknek az adatoknak az alapján a jelen találmány szerint előnyben részesített terápiás, képalkotó, vagy diagnosztikai ágenszt olyan formában szereljük ki, hogy optimalizáljuk szelektív asszociációját egy aktivált vaszkuláris helyen. Azonban, amint azt a jelen találmány szerzői meglepő módon kiderítették, az ilyen ágensek részecske formájában kialakuló zéta potenciáljának az alatt a pont

alatt kell maradnia, ami fölé emelve a zéta potenciált, az nem eredményez egy megfelelő növekedést az angiogén endoteliális sejtekbe, vagy az ilyen ágensek akkumulálódását az aktivált vaszkuláris helyeken. Ílymódon elérhetők a szelektív akkumuláció előnyei, és az ilyen ágensek aspecifikus kötődése és mellékhatásai minimalizálhatók.

Tehát például a jelen találmány szerinti diagnosztikai, képalakító és terápiás készítmények előnyösen olyan nettó zéta potenciált hoznak létre, ami a +25 mV és 100 mV közötti tartományba esik körülbelül 0,06 mmol/l kálium-klorid oldatban körülbelül 7,5-ös pH-n, vagy van egy kationos komponensük körülbelül 20-60 mólszázalék tartományban, az ismertetett körülmények között. Előnyösen a +25 mV és 100 mV közötti tartományt használjuk körülbelül 0,05 mmol/l kálium-kloridban körülbelül 7,5-ös pH-n, vagy egy kationos komponenst használunk, körülbelül 25-50 mólszázalékban. Előnyösebben a +25 mV és 55 mV közötti tartományt használjuk körülbelül 0,05 mmol/l kálium-kloridban körülbelül 7,5-ös pH-n. Az a legelőnyösebb, ha a +30 mV és 50 mV közötti tartományt használjuk körülbelül 0,05 mmol/l kálium-kloridban körülbelül 7,5-ös pH-n. Tehát azoknak a liposzómáknak az esetében, amiket DOTAP-pal és semleges lipidekkel formuláztunk, a DOTAP optimális mennyisége körülbelül 20-60 mólszázalék között van, előnyösebben körülbelül 35-50 mólszázalék között.

Általánosságban, a 2. és 3. ábrán bemutatott eredmények alapján az az előnyös, ha a kationos komponens mennyisége legalább 25 mólszázalék, és legfeljebb 60 mólszázalék. A 2. és 3.

ábrán az látható, hogy 0-50 mólszázalék között a megfelelő zéta potenciál lineárisan növekszik. 25 mólszázalék alatt a megfelelő zéta potenciál a görbe alsó felénél van. Ennek következtében az angiogén endoteliális sejtek becélzása esetleg nem megfelelő az itt megfontolt célokhoz. 60 mólszázalék fölött nem sok szelektív célzást kapunk. Tehát a kationos komponens 60 mólszázaléka az előnyben részesített felső határ. A felvételi görbék inflexiós pontját is figyelembe vehetjük az optimális kisserelési forma kialakításához. A görbe inflexiójának optimális régiója előnyösen körülbelül ± 10 mV az inflexiós pontnál mért zéta potenciáltól, vagy körülbelül ± 10 mólszázalék a kationos komponensnek az inflexiós pontban mért koncentrációjától.

Bár a zéta potenciál alkalmazható a kolloid részecskékre, ugyanaz a célzó tulajdonság figyelhető meg a kationos molekuláknál. A jelen találmányban az előnyben részesített izoelektromos pont 7,5 fölött van.

A jelen találmányban megfontolt más kationos lipidek példái közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a következők: DDAB (dioktadecil-dimetil-ammóniumbromid), DC-Chol (3β [N-(N',N'-dimetilaminoetán)-karbamoil]] koleszterin, DOSPER (1,3-dioleoil-2-(6-karboxi-spermil)-propilamid).

C. A pozitív töltésű molekulák szelektív célzása *in vivo* az angiogén endoteliális sejtekhez

A jelen találmány emellett azon a megfigyelésen is alapul, hogy a töltött dextránoknak a kötési affinitása az aktivált vaszku-

lális helyhez, specifikusan a tumor helyénél található angiogén vaszkuláris endoteliális sejtekhez *in vivo*, növeli a molekula nettó pozitív töltését. Amint az a 4A-C. ábrákon látható, a nettó pozitív töltésű dextrán molekulák szelektivitása nagyobb, mint azoké a megfelelő molekuláké, amik semlegesek, vagy negatív töltésűek. A jelen találmány szempontjából a negatív dextránok pI értékét körülbelül háromnak gondoljuk; a semleges dextránoké körülbelül 7, a pozitív dextránoké körülbelül 10. Az itt bemutatott eredmények azt jelzik, hogy a kationos makromolekulák tapadnak a negatív töltésű kötőhelyekhez, amik a sejt felszínén, vagy az endotélium glycocalyx-án található, ami az ilyen ágensek megnőtt lokális koncentrációját tükrözi egy aktivált vaszkuláris helynél, valamint egy lokális koncentráció gradienst, ami előnyben részesíti az ilyen konstrukciók extravazációját a viszonylag szivárgó endoteliális sejtfalon, és a megcélzott szövetbe.

D. Vaszkuláris permeabilitás a humán tumor xenograftban: molekuláris töltés-dependencia

A normál szövetekben a luminális endoteliális membrán negatív töltésű [Curry és mtsai: Am. J. Physiol. 257, H1354 (1987); Turner és mtsai: Microvasc. Res. 25, 205 (1983); Baldwin és mtsai: Microvasc. Res. 42, 160 (1991)]. Tehát ez korlátozza az anionos molekulák extravazációját, amint azt demonstrálták *in vitro* a tenyésztett endoteliális sejt egysejtrétegekben [Sahagun és mtsai: Am. J. Physiol. 259, H162 (1990)], valamint számos különböző normál szövetekben [Jain és mtsai: Microcirculation 4, 1

(1997)]. Amint azt az előzőekben megjegyeztük, Adamson és munkatársai demonstrálták, hogy az α -laktalbuminnal (molekulasúly=14,176; nettó töltés -10) szemben mutatott mikrovaskuláris permeabilitás körülbelül 50%-a a ribonukleázénak (molekulasúly=13,683; nettó töltés $+4$), ami azt sugallja, hogy egy pozitív töltésű molekula mikrovaskuláris permeabilitása normál szövetekben magasabb, mint a negatív töltésűeké. Az anionos makromolekulák szállításának korlátozása elengedhetetlen ahhoz, hogy a testben fenntartsuk a folyadék homeosztázist, az ozmotikus hatás következtében [Curry és mtsai: Mechanism and Thermodynamics of Transcapillary Exchange. *In*: Handbook és Physiology, Sect 2., The Cardiovascular System, Vol. IV, The Microcirculation, 309-374. oldal; szerk.: Renkin, E.M. és Michel, C.C., American Physiological Society: Bethesda (1984)].

Azonban a tumoros véredények szignifikánsan eltérnek a normális véredényektől. A molekuláris töltés szerepe a tumor véredény falán keresztül való transzportban még nem ismert. A jelen találmányban ismertetjük a molekuláris töltésnek a szerepét a tumor véredény korlátokon való transzport folyamatokban.

A jelen találmány részben azon a megfigyelésen alapul, hogy a pozitív töltésű molekulák nagyobb koncentrációban akkumulálódhatnak szilárd tumorok angiogén véredényeiben, mint a hasonló méretű, de semleges vagy negatív töltésű vegyületek. A magasabb akkumulációt követően ezek a pozitív töltésű molekulák gyorsabban extravazálhatnak az ilyen tumor véredényekből a tumorszövetekbe. A 4. táblázat (5. példa) azt mutatja, hogy a

kationizált BSA (pI-tartomány: 8,6-9,1) és az IgG (pI: 8,6-9,3) tumor vaszkuláris permeabilitása több mint kétszer magasabb ($4,25$ és $4,65 \times 10^{-7}$ cm/s), mint az anionizált BSA-é (pI körülbelül 2,0; $1,11 \times 10^{-7}$ cm/s) és IgG-é (pI körülbelül 3,0-3,9; $1,93 \times 10^{-7}$ cm/s). Ennek megfelelően a kationizálás, ami növeli egy molekula zéta potenciálját vagy pI értékét, hatékony megközelítési mód lehet ahhoz, hogy diagnosztikai és terápiás ágensek, valamint génterápiás vektorok vagy más makromolekulák bejuttatását javítsuk a szilárd tumorokba.

E. Semleges és kationos, Rhodaminnal jelzett liposzómák felvétele endoteliális sejttenyészetekkel (HUVEC)

A jelen találmány továbbá azon a megfigyelésen is alapul, hogy a semleges és kationos, rodaminnal jelzett liposzómák HUVEC által való felvétele összhangban van az előzőekben tárgyalt adatokkal, amikben a zéta potenciált és a DOTAP mólszázalékát hoztuk korrelációba. Amint az az 5A. ábrán látható, a fluoreszcencia intenzitása viszonylag állandóan nő 0 és 50 mólszázalék DOTAP koncentráció között. 50 mólszázaléknál nagyobb DOTAP koncentrációnál a fluoreszcencia intenzitása állandóvá válik. Ezeknek az adatoknak az alapján a jelen találmány szerzői megfontolták, hogy a jelen találmány szerinti módszerekben és készítményekben való felhasználásra szánt liposzómák előnyösen körülbelül 20-60 mólszázalék DOTAP-ot vagy más kationos lipidet tartalmaznak, azzal a céllal, hogy az endoteliális sejteket fiziológias pH-n becélazzuk, illetve előnyösebben körülbelül 50 mólszázalékot

tartalmazznak. Az 5B. ábra, ami a fluoreszcencia intenzitását mutatja a zéta potenciál függvényében, azt mutatja be, hogy a HUVEC sejtekben mért fluoreszcencia intenzitás és a zéta potenciál közötti összefüggés lineáris. Tehát, ha a jelzett liposzóma zéta potenciálját nem növeljük tovább, akkor a jelzett liposzómák HUVEC által való felvétele nem fokozódik.

F. A vegyületek módosítása, azzal a céllal, hogy növeljük töltésüket (azaz izoelektromos pontjukat vagy zéta potenciáljukat)

A diagnosztikai, képalkotó és terápiás ágensek izoelektromos pontjának és zéta potenciáljának növelésére számos különböző technika ismert, az ilyen anyagokból származékok készítésével, vagy más módon való módosításával. Például Morgan és munkatársai, valamint Khawli és munkatársai különböző technikát írnak le a fehérjekészítmények módosítására, azzal a céllal, hogy befolyásolják nettó töltésüket [Morgan és munkatársai: 5,322,678 (1994) és 5,635,180 (1997) számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás; Khawli és munkatársai: 5,990,286 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás (1990)]. Hasonlóképpen, Rok és munkatársai különböző terápiás kiszerezési formákat ismertetnek, amikben egy aktív adalékanyaghoz egy hordozó molekulát módosítottak [Rok és mtsai: Renal Failure 20(2), 211-217 (1998)].

A termékek módosítására, származékképzésére és rekombináns úton való expresszállására szolgáló ilyen technikák általában használhatók ellenanyagokra, ellenanyag fragmensekre, növeke-

dési faktorokra, hormonokra valamint más fehérje aktív ágensekre. A módosításra és származékképzésre más technikák is nyilvánvalóak, amikkel különböző célzó és hordozó egységek (amikhez egy aktív adalékanyagot lehet hozzákapcsolni) töltését (izoelektromos pontját) növelni lehet. Az ilyen hordozók közé tartoznak például a különböző polimerek, amik közé tartozik a polivinil-pirrolidon, a pirán kopolimer, a polihidroxipropil-metakrilamid-fenol, a polihidroxietil-aszpartamid-fenol, vagy a palmitoil csoportokkal helyettesített polietilénoxid-polilizin. A jól használható kationképző ágensek közé tartozik az etiléndiamin az EDCI reakción keresztül, a fehérjén egy karboxi-csoporttal. Az egyik specifikus példa a hexametiléndiamin. Vannak más kationos ágensek is, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat: hexametiléndiamin, trietiléntetraamin, 4-dimetilamino-butilamin, N,N-dimetilaminoetil-amin és a dimetilamino-benzaldehid.

Emellett a jelen találmány szerinti, megfelelő nettó pozitív zéta potenciállal rendelkező aktív adalékanyagok kapcsolhatók biológiailag lebomló kopolimerek egy osztályához is, amik jól használhatók egy gyógyszer hatóanyag szabályozott felszabadulásának elérésére, mint például a politejsav, poliglikolsav, a politejsav és a poliglikolsav kopolimerjei, a poliepszilon-kaprolakton, a polihidroxivajsav, a poliortoészterek, a poliacetálok, a polihidroxipiránok, a policianoakrilátok és a hidrogélek keresztkötéses vagy amfipatikus blokk kopolimerjei. A polimerek és a félig áteresztő polimer mátrixok különböző alakú készítményekké, azaz például stentekké, csövekké és hasonlókká formázhatók.

Azoknak a szakértőknek, akik jártasak a vegyületek módosításában, azzal a céllal, hogy modulálják nettó töltésüket, más releváns módosítási technikák is ismerősek lesznek. Ilyen például a Gyory és munkatársai publikációjában ismertetett eljárás, amiben készítményeket és módszereket írnak le a gyógyszer hatóanyagok pozitív töltésének növelésére, bár főleg azzal a céllal, hogy fokozzák transzdermális bejuttatásukat, de az ismertetett technikák relevánsak a jelen találmány szerinti készítményekhez és módszerekhez is [Gyory és mtsai: 5,990,179 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás (1999)].

Azok a diagnosztikai, képalkotó és terápiás ágensek, amik esetében hasznos lehet a módosítás, azaz töltésük növelése, a következők lehetnek, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat: éterlipidek, alkil-lizolecitinek, alkil-lizofoszfolidok, lizolipidek, alkil-foszfolidok. Kimutatták, hogy ezek az ágensek citosztatikusak, és egy membrán kettősréteg, vagy liposzóma készítmény egy részét képezhetik. Ilyen ágensek az alábbiak lehetnek, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, 1-O-oktadecil-2-O-metil-rac-glicero-3-foszfokolin, 1-O-hexadecil-2-O-metil-sn-glicerin, hexadecil foszfokolin és oktadecilfoszfokolin.

G. Diagnosztikai és jelölő jelölések

A jelen találmány egyik tárgya, hogy a pozitív töltésű molekulák diagnosztikai markerként használhatók tumorok leképezésére, amik az angiogén endoteliális sejtek növekedését indukálták. A jelen találmány előnyben részesített alkalmazása képalkotási

célokra magában foglalja a mágneses rezonancia, mint diagnosztikai eszköz használatát. A liposzómás formában való beadásra alkalmas ágensek esetében a szakterületen jártas szakember ismeri a liposzómák előállítására szolgáló különböző protokollokat, amely ágensek számos különböző kationos és nem-kationos komponenssel szerelhetők ki, olyan liposzómákat állítva elő, amik egy előnyben részesített zéta potenciállal rendelkeznek, az előzőekben ismertetett módon [Szoka és mtsai: Ann. Rev. Biophys. Bioeng, 9, 467 (1980)]. Az endoteliális sejteket becélzó magnetoszómák is előállíthatók úgy, hogy ugyanazokat a kationos és nem-kationos vegyületeket használjuk, amiket az előzőekben ismertetett liposzómális készítményekhez használtunk. A nagy molekulákhoz, főleg fehérjékhez, más megfelelő technikák, azaz például az előzőekben ismertetett technikák használhatók olyan ágensek előállítására, amiknek az izoelektromos pontja az előnyben részesített tartományban van. Hordozók, azaz például biopolimerek, mikroemulziók, vasoxid részecskék használhatók olyan ágensek előállítására, amik az előnyben részesített izoelektromos pontokkal rendelkeznek. Egy másik változat szerint az ágens kationizálással módosítható.

A szakterületen jártas szakember számára az is nyilvánvaló, hogy a mágneses rezonancián alapuló képalkotás (MRI) jelenleg az egyik legérzékenyebb, nem invazív módja a test lágy szövetei leképezésének. Egy CT szkenneléssel vagy hagyományos röntgenfelvétellel ellentétben az ilyen típusú letapogató berendezés nem alkalmaz sugárzást; ehelyett inkább mágneses mezőt alkalmaz,

ami kölcsönhatásba lép a test összes szövetében és folyadékában megtalálható vízben levő hidrogénatomokkal. Egy MRI letapogatás során számítógépek alakítják a különböző hidrogénmagok megnövekedett energiáját a vizsgált szövet keresztmetszeti képeivé. A letapogatási eljárás nagyon érzékeny, és gyakran kimutat ilyen tumorokat is, amiket egy CT letapogatással nem lehet kimutatni. Számos különböző szövet és tumor képezhető le MRI-vel, beleértve, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, az agyat, az emlőket és a test bármelyik lágy szövetében (beleértve a májat, a hasnyálmirigyet, a petefészkeket, stb.) bármelyik szilárd tumort.

Ahhoz, hogy fokozzuk az MRI (valamint a CT) letapogatások érzékenységét, különböző kontrasztanyagokat használnak. Bár a „makromolekuláris MRI kontraszt közegek” (MMCM) már egy ideje ismertek, ezeket a közegeket csak újabban kezdték el diagnosztikai célokra használni [Kuwatsuru és mtsai: Magn. Reson. Med. 30, 76 (1993)]. Számos különböző vegyületcsoportnak van meg az a lehetősége, hogy az MRI-ben kontrasztanyagként lehessen használni. Ezek közé tartoznak a szuperparamágneses vasoxid részecskék, a nitroxidok, és a paramágneses fémkelátok [Mann és mtsai: *In: Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids: Bioorganic Medicine*, 2, szerk.: Berthon, G., Marcel Dekker Inc., New York, N.Y. (1995)]. Általában előnyben részesítenek egy erős paramágneses fémeket. A paramágneses lantanidák és átmeneti fémionok *in vivo* toxikusak. Ezért ezeket a vegyületeket szerves ligandumokkal képezett kelátokba kell bevinni. Ha a jelen találmány szerint javítjuk az ilyen kelátba vitt fémek célzását az



angiogén endoteliális sejt szomszédságába, akkor lehetséges a képző készítmény egyébként szükséges össz-dózisának csökkentése.

Az elfogadható kelátok a szakterületen ismertek. Ezek közé tartoznak az alábbiak: 1,4,7,10-tetraazaciklododekán- N,N',N'',N''' -tetraecetsav (DOTA); 1,4,7,10-tetraazaciklododekán- N,N',N'' -triacetsav (DO3A); 1,4,7-trisz(karboximetil)-10-(2-hidroxipropil)-1,4,7,10-tetraazaciklododekán (HP-DO3A); dietiléntriaminpentaecetsav (DTPA); polimerekhez (azaz például poli-L-lizinhez vagy polietiléniminhez) kapcsolt DTPA; és számos más. A kelátképzéshez számos különböző paramágneses fém alkalmas. Azok a megfelelő fémek, amiknek az atomszáma 22 és 29 között van (a szélső értékeket is beleértve), 42, 44 és 58 és 70 között van (a szélső értékeket is beleértve), és oxidációs állapotuk 2 vagy 3. Azokat részesítjük előnyben, amiknek az atomszáma 22 és 29 között van (a szélső értékeket is beleértve), és 58 és 70 között van (a szélső értékeket is beleértve), és ezek közül is inkább azokat részesítjük előnyben, amiknek az atomszáma 24 és 29 között van (a szélső értékeket is beleértve), valamint 64 és 68 között van (a szélső értékeket is beleértve). Ilyen fém például a króm (III), a mangán (II), a vas (II), a kobalt (II), a nikkel (II), a réz (II), a praesodymium (III), a neodymium (III), a samárium (III), a gadolinium (III), a terbium (III), a diszprózium (III), a holmium (III), erbium (III) és itterbium (III). A króm (III), mangán (II), vas (III) és gadolinium (III) ionok különösen előnyben részesítettek, ezek közül a gadolinium (III)-at részesítik leginkább előnyben. Az ilyen paramágneses

ágensekről további információ például a WO 94/27498 számú publikált PCT szabadalmi leírásban található.

A tumorok leképezésére használt kontraszt anyagokat tipikus esetben parenterális úton adjuk be, azaz például intravénán, intraperitoneálisan, szubkután, intradermálisan vagy intramuszkulárisan. Tehát a kontraszt anyagot olyan készítmény formájában adjuk be, ami tartalmazza a kontraszt anyag oldatát, az anyagot megfelelő oldatban feloldva vagy szuszpendálva, általában vizes hordozóban. Az MMCM koncentrációja függ a kontraszt anyag erősségétől, de tipikus esetben körülbelül $0,1 \mu\text{mol/kg}$ és körülbelül $100 \mu\text{mol/kg}$ között változik. Számos különböző vizes hordozó ismert, azaz például a víz, a pufferezt víz, 0,9% sóoldat, 5% glükóz, 0,3% glicin, hialuronsav és hasonlóak. Ezeket a készítményeket hagyományos, jól ismert sterilizációs technikákkal sterilizálhatjuk, vagy sterilre szűrhetjük.

Brasch és munkatársai ismertetik az egy nagy gerinchez kapcsolt kontraszt ágensek használatát makromolekuláris kontraszt közeg leképezéshez (MCMI), ami egy mennyiségi módszer a tumorok, pontosabban az emlőtumorok mikrovaskuláris permeabilitásának becslésére (Brasch és mtsai: 6,009,342 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás). A gerinc lehet fehérje, azaz például albumin, polipeptid, azaz például poli-L-lizin, egy poliszacharid, egy dendrimer, vagy egy merev szénhidrogén vagy más vegyület, aminek kicsi a molekulásúlya, de nagyobb az effektív molekuláris mérete. Az előnyben részesített gerincek olyan

vegyületek, amik, ha egy gélszűrési mátrixon bocsátják át őket, akkor egy 30 kDa-os peptidhez hasonló módon viselkednek.

A tumorok leképezésének más módszerei közé tartozik a CR letapogatás, a pozitron emissziós tomográfia (PET) és a radioaktív atommagok leképezése. A CT letapogatásokhoz használt kontraszt anyagok közé tartozik minden molekula, ami gyengíti a röntgensugarat. Amint az a leképezés területén jártas szakember számára ismert, a pozitron emissziós tomográfiához és a radioaktív atommagokkal végzett leképezéshez rövid felezési idejű radioaktív izotópokat használnak. Hasonlóképpen, az ismert, hogy minden pozitront emittáló izotóp jól használható kontraszt anyagként a pozitron emissziós tomográfiában, és minden gamma sugárzást emittáló anyag jól használható a radioaktív atommagokkal végzett képalkotáshoz.

Az ultrahangos képalkotás egy másik módszere a test leképezésének diagnosztikai célokból. Az ultrahang kontraszt anyagoknak két általános típusa van: a pozitív kontraszt ágensek és a negatív kontraszt ágensek. A pozitív kontraszt ágensek visszaverik az ultrahang energiáját, és ezzel pozitív (világos) képet adnak. Ennek megfelelően, a negatív kontraszt ágensek fokozzák az áthatolóképességet, vagy szonolucenciát, ezzel negatív (sötét) képet hoznak létre. Számos különböző anyagot – gázokat, folyadékokat, szilárd anyagokat, és ezek kombinációit - vizsgáltak, mint potenciális kontraszt-fokozó ágenseket. Az 5,558,854 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetett szilárd részecske kontraszt ágensek közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre

korlátoznánk magunkat, az IDE részecskék és az SHU454. A 0231091 számú Európai szabadalmi bejelentésben erősen fluoro- zott szerves vegyületeket tartalmazó olaj-a-vízben emulziókat ismertetnek, amikkel fokozott kontrasztot lehet biztosítani egy ultrahangos képen. A perfluorooktil bromidot (PFOB) tartalmazó emulziókat is vizsgálták mint ultrahangos képalkotó ágenseket. A 4,900,540 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetik a foszfolipid alapú liposzómák használatát, amik kontraszt-fokozó ágensként gázt vagy gáz prekuzort tartalmaznak.

Emellett jelzett monoklonális ellenanyagokat használtak a megbetegedett vagy károsodott szövetek lokalizálására. A használható jelölések közé tartoznak a radioaktív izotópok, a fluoreszcens jelölések és a biotin jelölések. A lokalizációs vizsgálatokhoz alkalmas ellenanyag vagy ellenanyag fragmensek jelölésére használható radioaktív izotópok közé tartozna a gamma-sugárzók, a pozitron-sugárzók, a röntgen-sugárzók és a fluoreszkálók. Az ellenanyagok jelölésére alkalmas radioaktív izotópok közé tartozik a jód-131, a jód-123, a jód-125, a jód-126, a jód-133, a bróm-88, az indium-111, az indium-113m, a gallium-67, a gallium-68, a ruténium-95, a ruténium-97, a ruténium-103, a ruténium-105, a higany-107, a higany-203, a rénium-99m, a rémium-105, a rénium-101, a tellurium-121m, a tellurium-122m, a tellurium-125m, a thulium-165, a thulium-167, a thulium-168. a technécium-99m és a fluor-18. A halogéneket többé-kevésbé egymás helyett is lehet jelölésként használni, mivel a halogénnel jelzett ellenanyagok

és/vagy a normál immunglobulinok lényegében azonos kinetikával és megoszlással, valamint metabolizmussal rendelkeznek. A gamma-sugárzókat, azaz az indium-111-et és a technécium-99m-et részesítik előnyben, mivel az ilyen radioaktív fémek egy gamma kamerával mutathatók ki, és az *in vivo* képalkotáshoz előnyös felezési idővel rendelkeznek. Az ellenanyag jelezhetjük indium-111-gyel vagy technécium-99m-mel, egy konjugált fémkelátor, azaz például DTPA (dietiléntriaminpentaecetsav) alkalmazásával [Krejcarek és mtsai: Biochemical and Biophysical Research Communications 77, 581 (1977); Khaw és mtsai: Science 209, 295 (1980); 4,472,509 és 4,479.930 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás] A monoklonális ellenanyagokhoz való konjugációra alkalmas fluoreszcens vegyületek közé tartozik a fluoreszcein nátriumsó, a fluoreszcein-izotiocianát valamint a Texas Red szulfonil-klorid [DeBelder és mtsai: Carbohydrate Research 44, 254-257 (1975)].

A jelen találmányban megfontoltuk nem-fluoreszkáló festék, azaz például a patent blue V használatát is. Hirnle és munkatársai leírják a patent blue V liposzómákba való kapszulázását [Hirnle és mtsai: Lymphology 21, 187 (1988)].

H. Terápiás kisserelési formák és bejuttató rendszerek

A jelen találmány szerinti kisserelési formák közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a terápiás, diagnosztikai és képalkotó készítmények. A megfontolt készítmények tartalmazhatnak egy aktív adalékanyagot, azaz például egy cito-

sztatikus vagy citotoxikus ágens. A citosztatikus vagy citotoxikus ágensek közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a taxánok, a szervetlen komplexek, a mitózis inhibitorok, a hormonok, az antraciklinek, az antibiotikumok, a topoizomeráz inhibitorok, a gyulladáscsökkentő ágensek, az alkaloidok, az interleukinok, a citokinek, a növekedési faktorok, a fehérjék, a peptidek, a tetraciklinek és a nukleozid-analógok. A taxánok specifikus példái a paclitaxel és a docetaxel. A szervetlen komplexek tipikus példája a ciszplatín. Az antraciklinek specifikus példái a daunorubicin, a doxorubicin és az epirubicin. Az angiogenezis inhibitorok specifikus példája az angiosztatin. Az alkaloidok specifikus példái a vinblasztin, a vinkrisztin, a navelbine és a vinorelbine. A nukleozid-analóg specifikus példák az 5-fluoro-uracil és mások. A szintén figyelembe vett aktív ágensek közé tartoznak a citokinek, interleukinok, növekedési faktorok, fehérjék és ellenanyagok terápiásan hatásos fragmensei.

Különböző bejuttató rendszerek ismertek, és használhatók olyan terápiás készítmények beadására, amik tartalmaznak egy pozitív töltésű diagnosztikai, képalkotó vagy terápiás ágens, vagy egy pozitív töltésű hordozót az ilyen ágensekhez. Például a liposzómákba, mikrorészecskékbe és mikrokapszulákba, valamint magnetoszómákba való kapszulázást számos különböző diagnosztikai, képalkotó és terápiás termékekre leírták. Néhány esetben ezek a kiszerezési formák receptorok által végzett endocitózist eredményeznek [Wu és Wu: *Journal of Biological Chemistry* **262**, 4429-4432 (1987)]. Az ilyen készítmények egy alanyba való bea-

dásának megfelelő módszerei közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, az intradermális, intramuszkuláris, intraperitoneális, intravénás, intraarteriális, szubkután, intranazális, epidurális és orális beadási módszerek. Egy másik változat szerint a szisztémás beadási módszerek közé tartozik a transzmukozális és transzdermális beadási mód, penetránsokat, azaz például epesavakat vagy fuzidinsavat vagy más detergenset használva. Emellett a terápiás készítményeket közvetlen intratumorális injekcióval is beadhatjuk egy tumor helyére.

A jelen találmány szerinti készítményeket beadhatjuk bármelyik hagyományos úton, például infúzióval vagy bolus injekcióval, az epiteliális vagy mukokután rétegeken (azaz például szájnyálkahártya, végbél és vékonybél nyálkahártya, stb.) keresztül való abszorpcióval, és beadhatjuk más biológiailag aktív ágensekkel kombinálva is. A beadás lehet szisztémás vagy lokális. Emellett kívánatos lehet a jelen találmány szerinti gyógyászati készítmény bármilyen megfelelő módon való bejuttatása a központi idegrendszerbe, beleértve az intraventrikuláris és intratekális injekciózást is; az intraventrikuláris injekciózást megkönnyíthetjük egy intraventrikuláris katéterrel, amit például egy tárolóhoz, mondjuk egy Ommaya tárolóhoz kapcsolunk. Pulmonáris beadást is használhatunk, azaz például egy inhalátor vagy nebulizátor alkalmazásával, adott esetben egy aeroszolizáló ágens használatával.

Kívánatos lehet a jelen találmány szerinti gyógyászati készítmények lokális beadása a kezelésre szoruló területre. Ezt elérhetjük például, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, topiká-

lis alkalmazással, injekciózással, katéterrel, kúpok alkalmazásával, implantátum beültetésével, amely implantátum lehet porózus, nem-porózus, vagy gélszerű anyag, beleértve a membránokat, azaz például a szialisztikus membránokat vagy fonalakat.

A jelen találmány szerinti készítményeket bejuttathatjuk egy szabályozott felszabadulást biztosító rendszerrel is. Használhatunk például egy pumpát [Medical Applications of Controlled Release, szerk.: Langer és Wise, CRC Press, Boca Raton, Fla (1974); Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14, 201 (1987); Bichwald és mtsai: Surgery 88, 507 (1980); Saudek és mtsai: The New England Journal of Medicine 321, 574 (1989)]. A jelen találmány egy megvalósítási módja szerint polimer anyagok használhatók [Medical Applications of Controlled Release, szerk.: Langer és Wise, CRC Press, Boca Raton, Fla (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, szerk.: Smolen és Ball, Wiley, New York (1984); Ranger és Peppas: J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23, 61 (1983); Levy és mtsai: Science 228, 190 (1985); During és mtsai: Ann. Neurol. 25, 351 (1989); Howard és mtsai: J. Neurosurg. 71, 105 (1989)]. Emellett egy szabályozott felszabadulást biztosító rendszert a terápiás ágens szomszédságába helyezhetünk [Goodson: Medical Application of Controlled Release, 2, 115-138 szerk.: Langer és Wise, CRC Press, Boca Raton, Fla (1984)]. Más szabályozott kibocsátást biztosító rendszereket is megtárgyalnak a szakirodalomban [Langer: Science 249, 1527-1533 (1990)].

A jelen találmányban számos különböző, az itt bemutatott kutatással konzisztens gyógyászati készítményt és kiszerelési formát is megfontolunk. Az ilyen készítmények tartalmazznak egy terápiásan hatásos mennyiséget egy terápiás ágensből, valamint egy gyógyászatilag elfogadható hordozóból. Az ilyen gyógyászati hordozók lehetnek steril folyadékok, azaz például víz és olajok, beleértve a petróleumot, állati vagy növényi vagy szintetikus eredetű olajat, azaz például mogyoróolajat, szójaolajat, ásványolajat, szezámolajat és hasonlókat. Az előnyben részesített hordozó a víz, ha a gyógyászati készítményt intravénásan adjuk be. A sóoldatok és a vizes szacharóz és glicerín oldatok is használhatók folyékony hordozókként, főleg az injekciózható oldatokhoz. A megfelelő gyógyászati töltőanyagok közé tartozik a keményítő, a glükóz, a laktóz, a szacharóz, a zselatin, a maláta, a rizs, a liszt, az agyag, a szilikagél, a nátriumsztearát, a glicerín-monosztearát, a talkum, a nátrium-klorid, a szárított fölözött tej, a glicerín, a propilén, a glikol, a víz, az etanol és hasonlók. A készítmény, ha szükséges, akkor tartalmazhat minimális mennyiségű nedvesítő vagy emulgeáló ágenszt vagy pH-pufferelő ágenseket. Az ilyen készítmények lehetnek oldatok, szuszpenziók, emulziók, tabletták, pirulák, kapszulák, porok, szabályozott felszabadulású kiszerelési formák és hasonlók. A készítményeket kiszerelhetjük kúpok formájában is, amihez hagyományos kötőanyagokat és hordozókat, azaz például triglicerideket használhatunk. Az orális kiszerelési formák tartalmazhatnak standard hordozókat, azaz például gyógyszerészeti minőségű mannitot, laktózt, keményítőt, magnézium-sztearátot,

szacharin nátriumsót, cellulózt, magnézium-karbonátot, stb. Az alkalmas gyógyászati hordozókat a „Remington’s Pharmaceutical Sciences” című szakkönyvben foglalták össze (szerk.: E.W. Martin). Az ilyen készítmények a terápiás készítményből hatékony mennyiséget tartalmaznak, előnyösen tisztított formában, megfelelő mennyiségű hordozóval, hogy ezzel biztosítsuk a betegnek való beadás megfelelő formáját.

A teljes kiszerelési formának illeszkednie kell a beadáshoz. Tehát például a jelen találmány szerinti készítményeket rutin eljárásokkal formulázzuk, például az embereknek intravénás úton való beadáshoz adaptálva. Tipikus esetben az intravénás beadáshoz használt készítmények steril izotóniás pufferben készített oldatok. Ha ez megfelelő, akkor a készítmények tartalmazhatnak szolubilizáló ágenszt, valamint egy helyi érzéstelenítőt, azaz például lignocaint is, hogy enyhítsük az injekciózás helyén érzett fájdalmat. Az adalékanyagokat általában vagy külön-külön, vagy összekeverve adjuk be, egységdózis formájában, például száraz liofilezett por, vagy vízmentes koncentrátum formájában, hermetikusan lezárt tartóedényben, azaz például ampullában, feltüntetve az aktív ágens mennyiségét. Ha a készítményt infúzióként kell beadni, akkor egy infúziós palackban oldhatjuk fel, ami steril, gyógyszerészeti minőségű vizet vagy sóoldatot tartalmaz. Ha a beadás módja injekciózás, akkor egy ampulla steril, injekciózáshoz készített vizet vagy sóoldatot biztosíthatunk, oly módon, hogy az adalékanyagokat a beadás előtt összekeverjük.

A jelen találmány szerinti diagnosztikai, képalkotó és terápiás, egy bizonyos rendellenesség vagy állapot diagnosztizálásában, monitorozásában, leképezésében és kezelésében hatékony készítmények mennyisége függ a rendellenesség vagy állapot természetétől, és standard klinikai technikákkal határozható meg. Emellett adott esetben *in vivo* és/vagy *in vitro* esszéket használhatunk, hogy ezek segítsék meghatározni az optimális dózistartományokat. Bármelyik kiszerelési formában az alkalmazandó pontos dózis is függ a beadási módtól, valamint a betegség vagy rendellenesség súlyosságától, és a gyakorló orvos megítélése, valamint az egyes betegek körülményei alapján kell meghatározni. Általánosságban azonban, ha ismert vegyületeket úgy módosítunk, hogy az itt ismertetett módszerek alkalmazásával növeljük nettó pozitív zéta potenciáljukat, az aktív adalékanyag dózisa alacsonyabb lehet, mint a módosítatlan vegyületé.

I. A készítmények beadása tumorok leképezése és kezelése céljából

A jelen találmány szerinti aktív adalékanyagokat olyan beadási módot használva adhatjuk be, amit a kezelő onkológus vagy más kezelőorvos alkalmasnak ítél. Ez a beadási mód lehet közvetlenül a tumor tömegébe adott injekció, vagy bármilyen más mód, ami biztosítja a jelen találmány szerinti készítmény bejutását az angiogén endoteliális sejtek szomszédságába. A beadott dózis nagysága függ a beteg életkorától, egészségi állapotától, test-súlyától, az egyidejűleg alkalmazott más kezelésektől (ha van

ilyen), a kezelés gyakoriságától, valamint a kívánt hatás természetétől, amint az az onkológusok számára jól ismert.

A jelen találmány szerinti eljárások gyakorlásakor a jelen találmány szerinti vegyületeket használhatjuk önmagukban vagy kombinációban, vagy más diagnosztikumokkal, képalkotó és terápiás ágensekkel kombinálva. Bizonyos előnyben részesített megvalósítási módokban a jelen találmány szerinti vegyületeket beadhatjuk más vegyületekkel együtt, amiket az általánosan elfogadott orvosi gyakorlatnak megfelelően általában előírnak egy ilyen állapothoz, beleértve az anti-angiogén ágenseket, mint például az angiosztatin vagy endosztatin expressziós vektorokat vagy fehérjéket, vagy más rákellenes terápiás szereket. A jelen találmány szerinti vegyületek használhatók *in vivo*, rendszerint emlősökben, azaz például emberekben, birkákban, lovakban, szarvasmarhákban, sertésekben, kutyákban, macskákban, patkányokban és egerekben, vagy használhatjuk *in vitro*.

A terápiásan hatásos dózisokat vagy *in vitro* vagy *in vivo* módszerekkel határozhatjuk meg. Minden, a jelen találmány szerinti vegyület esetében egyedi meghatározásokat végezhetünk, azzal a céllal, hogy meghatározzuk a szükséges optimális dózist. A terápiásan hatásos dózisok tartományát befolyásolja a beadás módja, a kitűzött terápiás célok és a beteg állapota, valamint például a tumor természete, fejlődési állapota és mérete. Az injekcióstüvel való injekciózás esetében feltételezhetjük, hogy a dózis a test folyadékaiba jut be. Más beadási módok esetében az abszorpció hatékonyságát minden egyes vegyületre egyedileg kell megha-

tározni, a farmakológiában jól ismert módszerekkel. Ennek megfelelően a kezelőorvosnak esetleg szükséges lehet a dózis titrálása, és a beadás módjának megváltoztatása, ha kell, hogy megkapjuk az optimális terápiás hatást.

Miközben az egyes személyek igényei változhatnak, az egyes komponensek hatékony mennyiségei optimális tartományainak meghatározása a szakterületen jártas szakember ismereteihez tartozik. Az optimális dózis általában azonos vagy kisebb, mint azoknak a terápiás ágenseknek a megfelelő dózisa, amiket nem módosítottak vagy derivatizáltak valamilyen módon, hogy növeljék nettó zéta potenciáljukat. Az is megfontolás tárgyát képezi, hogy a szelektív célzáshoz megnövekedett zéta potenciállal rendelkező, módosított terápiás ágenseknek magasabb lehet a biztonsági szintjük és alacsonyabb a toxicitásuk, és magasabb dózisban adhatók be. Általánosabban, a jelen találmány szerinti vegyületeket beadhatjuk intravénásan, vagy parenterálisan a körülbelül 0,01 mg és körülbelül 50 mg/kg, előnyösen körülbelül 0,05 mg és körülbelül 5 mg/kg, és előnyösebben körülbelül 0,2 mg és körülbelül 1,5 mg/kg közötti dózistartományon belüli hatékony mennyiségben, napi egy, kettő vagy 4 dózissal osztva, vagy folyamatos infúzióban.

J. A különböző, aktivált vaszkuláris helyeket mutató betegségek kezelése és leképzése

Számos neoplasztikus és nem-neoplasztikus betegség létezik, ami szaporodó vagy angiogén epiteliális sejtekhez kapcsolódik,

amint azt aktivált vaszkuláris helyek bizonyos típusaiban meg lehet figyelni. Amint azt Davis-Smyth és munkatársai tárgyalják publikációjukban, ezek a betegségek lehetnek szilárd tumorok, valamint különböző betegségek, mint például reumás arthritis, pszoriázis, atheroszklerózis, diabeteszes retinopátia, retrolenta fibroplázia, neovaszkuláris glaukóma, életkorhoz kapcsolódó sárgafolt degeneráció, hemangiómák, transzplantált szaruhártya vagy más szövet immunológiai kilökődése, és krónikus gyulladás.

Ezeknek a betegségeknek a hagyományos terápiái változóak. A rákokat például számos különböző terápiás szerrel lehet kezelni. A reumás arthritist gyakran kezelik aszpirinnel, vagy az aszpirint helyettesítő hatóanyagokkal, mint például ibuprofénnel, kortikoszteroidokkal vagy immunszuppresszív terápiával [Merck Manual, 16. kiadás, 1305-1312. oldal (1992)]. Az atheroszklerózis kezelése a tüneti állapotok, vagy kockázati faktorok kezelésére irányul, azaz arra, hogy csökkentsék a keringésben levő koleszterin szintjét vagy az angioplasztiát [Merck Manual, 16. kiadás, 409-412. oldal (1992)]. A diabetes mellitus számos különböző állapotot képes indukálni, beleértve a diabetikus atheroszklerózist és a diabetikus retinopátiát, ami azzal kezelhető, hogy ellenőrzés alatt tartják a primer diabeteszt vagy az ehhez kapcsolódó állapotokat, mint például a vérnyomást [Merck Manual, 16. kiadás, 412-413., 1106-1125. és 2383-2385. oldal (1992)]. A pszoriázist általában topikális kenőcsökkel és szteroidokkal kezelik [Merck Manual, 16. kiadás, 2435-2437. oldal (1992)]. A retrolenta fibropláziát legjobban preventív oxigén és E-vitamin adago-

lással lehet kezelni, bár krioterápiás ablációra is szükség lehet [Merck Manual, 16. kiadás, 1975-1976. oldal (1992)]. Az előzőkből nyilvánvaló, hogy ezeknek az angiogenezis-indukált betegségeknek nincs közös kezelési indikációjuk, annak ellenére, hogy az angiogén asszociációjuk közös.

Más, az aktivált vaszkuláris helyekhez kapcsolódó betegségek közé tartoznak a gyulladásos betegségek, azaz például a nefritisz. Nemrég Iruela-Arispe és munkatársai leírták a glomeruláris endoteliális sejtek részvételét a kapilláris helyreállításában, amit a glomerulonefritiszre adott válasz indukál [Iruela-Arispe és mtsai: Am. J. Pathol. 147, 1715 (1995)]. Számos glomeruláris betegségben előfordulhat a mesangium súlyos sérülése, ami a mátrix feloldódásához és a glomeruláris kapillárisok károsodásához vezet. Bár a glomeruláris szerkezet roncsolódása állandó sérülést eredményezhet, néhány esetben előfordul spontán gyógyulás. Iruela-Arispe és munkatársai kimutatták az endoteliális sejtek szaporodását a mesangium súlyos sérülése után 2-14 nappal, a glomeruláris kapillárisok megjavulásával kapcsolatban [Iruela-Arispe és mtsai: Am. J. Pathol. 147, 1715 (1995)]. A kiindulási endoteliális sejt szaporodás kapcsolódik a bázikus fibroblaszt faktorhoz, és a laterális glomeruláris endoteliális sejt szaporodása kapcsolódik a vaszkuláris permeabilitási faktor/endoteliális sejt növekedési faktor növekedéséhez, és az flk, egy VPF/VEGF receptor növekedéséhez. Ez azt mutatja, hogy a glomeruláris endoteliális sejtek aktív szerepet játszanak a sérülésre adott glomeruláris válaszban, és a jelen találmány szerinti terá-

piás, képképző valamint diagnosztikai készítmények jól használhatók lehetnek a gyulladásos állapotokkal, azaz például a glomerulonefritisszel kapcsolatban.

Emellett az angiogenezis gátlása vagy megelőzése viszonylag új, és globálisabb mechanizmust biztosít számos különböző, angiogenezishez kapcsolódó betegség kezelésében. Tehát a jelen találmány egyik tárgya olyan ágensek becélzása, amik szelektíve akkumulálódnak az aktivált vaszkuláris helyeken, azaz például az angiogén vagy szaporodó endoteliális sejtek szomszédságában, amivel az ilyen angiogén sejtek, vagy tumorsejtek pusztulását okozzák, amit az ilyen sejtek angiogenezise és neovaszkulatúrája indukál. Ebből a szempontból erősen toxikus ágenseket írtak le a 60/163,250 számú, „copending” ideiglenes Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentésben, amiket megfelelően formáztak például liposzómákban, és a jelen találmány szerint előnyben részesített zéta potenciállal rendelkeztek.

K. Kombinációs vagy együtt-beadási terápia

Amint azt megfontoltuk a jelen találmány tárgyát képező továbbá az itt ismertetett vegyületek kombinációja vagy együttes beadása, a kapcsolódó inventív módszerekkel, más terápiaikkal, angiogenezis inhibitorokkal és/vagy más anti-tumor ágensekkel. Az ilyen más terápia, angiogenezis inhibitorok és ágensek jól ismertek például a szemészek és onkológusok között. Az ilyen más ágensek és kapcsolódó módszerek közé - amiket a jelen találmány szerinti konstrukciókkal és módszerekkel kombináltan kell

használni - tartoznak hagyományos kemoterápiás ágensek, a besugárzásos terápiák, az immunmodulációs ágensek, a génterápia, és számos más készítmény, azaz például immuntoxinok és anti-angiogén készítmények, azaz például angiosztatin vagy endosztatin használata, amint azt a vonatkozó szakirodalomban ismertetik [Parish és mtsai: 5,874,081 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás (1999); Thorpe és mtsai: 5,863,538 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás (1999)], vagy a szakirodalom más részéből ismerhető. A jelen találmányra és az angiogenezishez kapcsolódó betegségek (amiket például az előzőekben tárgyaltunk) hagyományos terápiáira alapuló kombinációkat vagy együttes kezeléseket is megfontoltuk.

L. Sebgyógyulás

Az is kifejezetten végiggondoltuk, hogy a jelen találmány szerinti készítmények és kisserelési formák szelektíve irányíthatók, hogy javítsuk a sebek, vagy más ilyen vaszkuláris helyek kezelését azzal a céllal, hogy javítsuk a gyógyulási folyamatot, az aktivált vaszkuláris helyekhez kapcsolódó patológiás állapotok kezelésével szemben.

A növekedési faktorok, azaz például a fibroblaszt növekedési faktor és a vérszint endoteliális sejt növekedési faktor elősegíti a sejtek szaporodását és differenciálódását a normális sebgyógyulási folyamatban. A fibroblaszt növekedési faktor családba hét polipeptid tartozik, amikről kimutatták, hogy stimulálják a szaporodást a különböző sejtvonalakban, beleértve az endoteliális sejteket, fibro-

blasztokat, simaizomsejteket és epidermális sejteket. A család tagjai a savas fibroblaszt növekedési faktor (FGF-1), a bázikus fibroblaszt növekedési faktor (FGF-2), az int-2 (FGF-3), a Kaposi szarkóma növekedési faktor (FGF-4), a hst-1 (FGF-5), a hst-2 (FGF-6) és a keratinocita növekedési faktor (FGF-7) [Baird és Klagsbrun: Ann. NY Acad. Sci. 638, xiv (1991)]. A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) , ami vaszkuláris permeabilitási faktor (VPF) néven is ismert, egy erősen szelektív mitogénje a vaszkuláris endoteliális sejteknek [Ferrara és mtsai: Endocr. Rev. 13, 19 (1992)]. Kiderítették, hogy a VPF felelős a plazma fehérjékkel szembeni állandó mikrovaszkuláris hiperpermeabilitásért, még a sérülés leállítása után is, ami a normális sebgyógyulás jellemző tulajdonsága. Ez azt sugallja, hogy a VPF fontos szerepet játszik a sebgyógyulásban [Brown és mtsai: J. Exp. Med. 176, 1375 (1992)].

A sebgyógyításhoz a növekedési faktorokat liposzómákba kapszulázhatjuk, és a megcélzott pontba a liposzóma készítmény lokális injekciójával juttathatjuk el. A liposzómák kereskedelmi forgalomban beszerezhetők, számos különböző szállítótól. Egy másik változat szerint a liposzómákat előállíthatjuk a szakterületen jártas szakember számára ismert módszerekkel (lásd például a 4,522,811 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírást). Az 5,879,713 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetik a liposzóma készelési formák előállítását, megfelelő lipid(ek) azaz például sztearoil-foszfatidil-etanolamin, sztearoil-foszfatidil-kolin arachidoil-foszfatidil-kolin és

koleszterin) szerves oldószerben való feloldásával, amit azután be-
 párlunk, aminek eredményeképpen a megszáradt lipid száraz
 filmje marad hátra a tartóedény belső felületén. Az aktív adaléka-
 nyagnak, vagy monofoszfátjának, difoszfátjának és/vagy trifoszfát-
 jának vizes oldatát visszük be azután a tartóedénybe. A tartó-
 edényt azután kézzel forgatjuk, hogy a lipid-anyagot felszabadít-
 suk a tartóedény oldaláról, és diszpergáljuk a lipid aggregátumo-
 kat, ezzel kialakítva a liposzómális szuszpenziót. A biológiailag ak-
 tív molekulákat, azaz például az FGF-et vagy VEGF-et olyan kon-
 centrációban keverjük össze a liposzómával, ami a betegben a
 megcélzott pontban hatékony mennyiséget szabadít fel.

M. Más, a károsodott angiogenezishez kapcsolódó álla-
 potok

Azt is kifejezetten megfontoltuk, hogy a jelen találmány sze-
 rint készítmények és kiserelési formák szelektíve irányozhatók,
 más, a károsodott angiogenezishez kapcsolódó állapotok kezelése
 céljából.

Újabban kimutatták, hogy az angiogenezis az öregedéssel
 károsodik. Reed és munkatársai publikálták, hogy a késleltetett
 neovaszkularizáció részben az endoteliális sejtek lelassult vándor-
 lásának a következménye, ami a lecsökkent kollagenáz aktivitás
 eredménye [Reed és mtsai: Journal of Cell Biochem. 77, 116
 (2000)]. Ennek megfelelően, azok a zavarok, amik növelik a kolla-
 genáz aktivitást, növelhetik a mikrovaszkuláris endoteliális sejtek
 vándorlási képességét. Rivard és munkatársai publikálták, hogy

az öreg állatokban a károsodott angiogenezis a károsodott endoteliális funkció következménye, beleértve az alacsonyabb alap-NO kibocsátást, az acetilkolinra adott csökkent vazodilációt, és a VEGF alacsonyabb expresszióját az iszkémiás szövetekben [Rivard és mtsai: *Circulation* 99, 111 (1999)]. Ezért Rivard és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy a végtag iszkémia kollaterális fejlődéséért felelős angiogenezis az öregedéssel károsodik, ami az öregedéshez kapcsolódó endoteliális diszfunkció és a csökkent VEGF expresszió következménye [Rivard és mtsai: *Circulation* 99, 111 (1999)]. Azonban úgy tűnik, hogy az előrehaladott öregség nem erősíti a kollaterális véredény fejlődését, és ez befolyásolható az exogén angiogén citokinekkal.

Yamanaka és munkatársai leírták, hogy a károsodott glomeruláris kapilláris hálózatok fontos szerepet játszanak a glomeruláris léziók javítási folyamataiban [Yamanaka és mtsai: *Kidney Blood Press Res.* 22, 13 (1999)]. A glomeruláris endoteliális sejt sérülése befolyásolja a glomeruláris betegségek előrehaladását és javulási folyamatát. Ha egy glomeruláris lézió súlyos, akkor ez megakadályozza az angiogenezist, az endoteliális sejt sérülése következtében, majd ezután szklerózis lép fel a károsodott régióban. A glomeruláris endoteliális sejt sérülések szükségszerűen érintik a mesangiális és epiteliális sejteket. Ennek következtében az az elképzelés alakult ki, hogy a vesebetegség kifejlődése befolyásolható az endoteliális sejtek angiogenezisének elősegítésével.

A Raynaud jelenséget a kezek hidegre való érzékenysége jellemzi, ami az ujj artériák görcsös összehúzódásának következmé-

nye, és az ujjak elfehéredését és érzéketlenségét eredményezi. Ez keringési rendellenesség, amit az okoz, hogy a kezek és a lábak vérellátása nem kielégítő. A vizsgálatok azt sugallják, hogy az idegrendszer változásai periferiális szinten vagy központi szinten kapcsolódnak az endoteliális sejtek diszfunkciójához. Cerinic és munkatársai javasolják a terápiás angiogenezis alkalmazását (a véredények regenerálását) a Raynaud betegség kezelésére, és az angiogenezis elhagyására a diffúz szklerodermában [Cerinic és mtsai: Curr. Opin. Rheumatol. 9, 544 (1997)].

N. Az agy kezelése

Azt is kifejezetten megfontoltuk, hogy a jelen találmány szerinti készítmények és kiszerezési formák szelektíve irányíthatók a vér-agy gáton való áthatoláshoz, egy megfelelő nettó pozitív töltést hozva létre az endoteliális sejteken a vér-agy gátnál.

Az előző részek fényében az alább bemutatott specifikus példák csak illusztráció céljából vannak megadva, céljuk nem a jelen találmány oltalmi körének korlátozása. Más generikus és specifikus konfigurációk nyilvánvalóak a szakterületen jártas szakember számára.

PÉLDÁK

1. Példa

Töltött dextránnal borított vasoxid részecskék szintézise

A dextránnal stabilizált vasoxid részecskéket a szakirodalomban ismertett módon állítjuk elő [Papisov és mtsai: J. Magn.

Magn. Matter 122, 383 (1993)]. A részecskék oxidációja (például perjodáttal) aldehid csoportokat hoz létre az egyes kolloidok felszínén. Ezután az aldehid csoportokat különböző reagensek aminosz csoportjaival reagáltathatjuk, ezzel különböző nettó töltést hozva létre. Ha például foszfatidiletanolaminnal (nettó töltése nulla) vagy egy másik semleges molekulával végezzük a kapcsolást, aminek szabad amin-funkciója van, akkor negatív töltésű terméket kapunk. Ha egy dendrimerrel végezzük a kapcsolást, polilizinnel, egy pozitív nettó töltésű fehérjével, vagy egy másik megfelelő molekulával, ami főlegben hordoz pozitív töltést a megfelelő molarányban, akkor nettó pozitív töltésű terméket kapunk. A módosítatlan és nem-oxidált, dextránnal stabilizált vasoxid részecskéket használjuk a töltetlen molekulák reprezentánsaiként.

I. Dextránnal stabilizált, semleges töltésű vasoxid részecskék készítése

Az együtt-kicsapás klasszikus módját alkalmazzuk, aminek során a magnetitet egy bevonó anyag, azaz például dextrán jelenlétében csapjuk ki. A reakció két lépésben játszódik le. Az elsőben FeCl_2 -t és FeCl_3 -at keverünk össze dextránnal, majd alkalikus közeggel csapjuk ki, így kapunk $\text{Fe}(\text{OH})_2$ -t vagy $\text{Fe}_2\text{O}_3 \times n \text{ H}_2\text{O}$ -t. Melegítés hatására a víz eliminálódik, és az Fe_3O_4 szupramágneses kristályait kapjuk meg. Ha a részecskéket vízben rediszpergáljuk, akkor különböző méreteloszlású részecskéket kapunk. A 80-120 nm $Z_{\text{átlagos}}$ méretű részecskéket (egy monomodális eloszláshoz illesztett részecske-csoport átlagos részecskemérete) (Zetasizer

3000, Malvern Instruments) használjuk. Tipikus esetben egy ml oldat körülbelül 0,2 mmol dextránt, valamint 31 mg (0,55 mmol) vasat tartalmaz. Ezeknek a részecskéknek a zéta potenciálja körülbelül 0 és -15 mV között van pH=7-en, 0,05 mol/l kálium-kloridban.

2. Vasoxid részecskék oxidációja

A dextránnal borított vasoxid részecskék oxidációját Bogdanov és munkatársai eljárásának módosításával hajtjuk végre [Bogdanov és mtsai: Biochimica et Biophysica Acta 1193, 212-218 (1994)]. A dextránnal borított vasoxid részecskéket nátrium-perjodáttal keverjük össze, 6 mól dextrózt elegyítve 1 mól IO_4^- -gyel vizes oldatban (30 perc, pH=6). A reakciót körülbelül 300-szoros, vagy nagyobb mólfölöslegben alkalmazott etilén-glikol hozzáadásával állítjuk le. Ezt követően az oldatot 0,15 mol/l nátrium-kloriddal szemben dializáljuk.

3. Pozitív töltésű részecskék készítése

Az előzőekben kapott, oxidált vasoxid részecskéket használjuk pozitív töltésű részecskék előállítására. 2 μmol polilizin vizes oldatát keverjük össze körülbelül 20 μmol nátrium-boráttal (pH=9), valamint a 2. lépésben előállított, módosított vasoxid részecskékkel, amik 300 μmol vasat és 100 μmol dextrózt tartalmaznak. Az emulziót 0,15 mol/l nátrium-klorid oldattal szemben dializáljuk, majd sejttenyésztési kísérletben használjuk. Ezeknek a részecskéknek a zéta potenciálja körülbelül +50 mV (pH=5).

4. Negatív töltésű részecskék

A negatív töltésű vasoxid részecskék, amiket kettős laurilsav réteggel vonunk be, kereskedelmi forgalomban beszerezhetők a Berlin Heart AG-től. Ezeknek a részecskéknek a zéta potenciálja körülbelül -30 és körülbelül -40 mV között van (a pH körülbelül $7,0$).

2. Példa

A töltött dextrán részecskék alternatív szintézise

Semleges, polikationos és polianionos dextrán az Amersham Pharmacia Biotech-től szerezhető be. Míg a semleges dextránt széles mérethatárok között lehet beszerezni (10000 és 2000000 dalton között) a töltött dextránok csak egy méretben (500000 dalton) szerezhetők be. A kationos dextrán egy dietilaminoetiléter (DEAE) származék, az anionos dextrán szulfát. Amint azt az alábbiakban ismertetjük, a más molekulásúlyú dietilaminoetiléter dextránt és dextrán-szulfátot úgy szintetizáljuk meg, hogy jól ismert eljárásokat módosítunk.

1. Meghatározott méretű dextrán-részecskék készítése

A derivatizálás előtt a dextrán molekulákat méretük alapján különböző osztályokba soroljuk, Isaacs és munkatársai módszerének alkalmazásával [Isaacs és mtsai: Am. J. Pathol. 111, 298 (1983)] Az ezt követő jellemzés (azaz például töltéssűrűség, izo-

elektromos fókuszálás) használható az egy molekula dextránon levő töltött funkciós csoportok arányának meghatározására.

A dextránt a Pharmacia-tól vásároljuk (Uppsala, Svédország), három különböző méretben (10000, 70000 és 500000 dalton), amiket kiindulási anyagként használunk minden egyes esetben. Ezután a dextrán molekulasúlyát gélkromatográfiával ellenőrizzük. Ennek elvégzéséhez a 10000-es molekulasúlyú dextránt Sephacryl S-200 oszlopra vesszük (Pharmacia, 75 cm hosszú, 5 cm belső átmérőjű), majd 0,05 mol/l ammónium-hidrogénkarbonáttal eluáljuk (pH=8,2). Ezután 20 ml-es frakciókat szedünk, majd hexóz-tartalmukat Mokrasch és munkatársai módszerével elemezzük [Mokrasch, J.: Journal of Biological Chemistry 254, 55 (1954)]. A 70000-es molekulasúlyú dextránt analóg módon kromatografáljuk egy AcA oszlopon (LKB, Bromma, Svédország, 96×2,5 cm). Ezután 9 ml-es frakciókat szedünk. Az 500000 daltonos dextránt Sepharose 6B oszlopon kromatografáljuk (Pharmacia, 96×2,5 cm), és 9 ml-es frakciókat szedünk és elemzünk. Az egyes dextrán-típusok esetében a maximális mennyiségű dextránt tartalmazó frakciókat összegyűjtjük és egyesítjük, ez összesítve körülbelül 70%-a a kiindulási anyagnak. Az egyes dextrán poolokból az anyagot a további felhasználáshoz liofilezzük.

A dextrán frakciók izoelektromos pontját izoelektromos fókuszálással határozzuk meg, Pharmalyte gélen (Amersham Pharmacia Biotech), a pH 3 és 11 között változik, az anyagot pH=7-nél lehet megtalálni.

2. Polianionos dextrán előállítása

A dextrán-szulfátot Nagasawa és munkatársai módszerével állítjuk elő [Nagasawa és mtsai: J. Org. Chem. 39, 1681 (1974)]. Azaz, 162 mg dextránt (1 mmol glükóz), 225 mg 8-kinolil-szulfátot (1 mmol) és 67 mg CuCl_2 -t (0,5 mmol) keverünk össze 10 ml vízmentes dimetilformamidban, majd 5 óra hosszat 40 °C-on kevertetjük. Ezt követően a reakcióelegyet 50 ml vízzel hígítjuk, ami csapadék keletkezéséhez vezet. A csapadékot szűréssel eltávolítjuk, majd a szűrletet Dowex 50W oszlopon (X8, H^+ , 20-50 mesh) bocsátjuk át. Az elfolyót és a mosófolyadékot egyesítjük, 2 mol/l nátrium-hidroxiddal semlegesítjük, majd éjszakán át vízzel szemben dializáljuk. Ezután a dializált oldatot csökkentett nyomáson 2,5 ml-re pároljuk be, majd cseppenként 45 ml etanolhoz adjuk, aminek következtében a nátrium-dextrán-szulfát kicsapódásához vezet. Ezt a csapadékot centrifugálással választjuk el, etanollal mossuk, majd 3 óra hosszat csökkentett nyomáson, 80 °C-on, P_2O_5 fölött szárítjuk.

Az egyes komplexek izoelektromos pontját (IEP) izoelektromos fókuszálással határozzuk meg, Pharmalyte gélen (Amersham Pharmacia Biotech), a pH 2,5 és 5 között változik. A 10000 daltonos frakcióból származó dextrán-szulfát IEP értéke pH=3, a 70000 daltonos frakció IEP értéke 2,5-ös pH alatt van, az 500000 daltonos frakció IEP értéke 2,8-as pH.

Minden egyes termékben a szulfátot BaSO_4 formában, gravimetriásan határozzuk meg [Harris, D.C.: Quantitative chemical

analysis, 5. kiadás, W.H. Freeman and Company, New York (1997)], míg a dextrán mennyiségét anthronnal határozzuk meg [Mokrasch, J.: Journal of Biological Chemistry 254, 55 (1954)]. A dextrán/szulfát molarány körülbelül 46 volt a 10000 daltonos frakcióban, 190 a 70000 daltonos frakcióban és 54 az 500000 daltonos frakcióban.

3. Polikationos dextrán előállítása

A DEAE dextránt McKernan és munkatársai módszerével állítjuk elő [McKernan és mtsai: Biochemical J. 76, 117 (1960)]. Azaz 6 g dextránt oldunk nátrium-hidroxid oldatban (4 g nátrium-hidroxid 17 ml vízben), majd 0 °C-ra hűtjük. 3,5 g 2-klór-trietilamin-hidrokloridot 4,5 ml vízben adunk hozzá kevertetés közben, majd a hőmérsékletet 35 percig 80 °C-on tartjuk. Hűtés után kevertetés közben etanolt adunk hozzá, ennek hatására a DEAE dextrán kicsapódik. A terméket centrifugálással elválasztjuk, vízben oldjuk, majd újra kicsapjuk. Az eljárást addig ismételjük, amíg a felülúszó szintelen lesz. A termék vizes oldatát végül sósavval semlegesítjük, dializáljuk, majd csökkentett nyomáson töményítjük. A DEAE dextránt liofilezéssel izoláljuk.

Az egyes komplexek izoelektromos pontját (IEP) izoelektromos fókuszálással határozzuk meg, Pharmalyte gélen (Amersham Pharmacia Biotech), a pH 8 és 10,5 között változik. A 10000 daltonos frakcióból és a 70000 daltonos frakcióból származó dextrán-szulfát IEP értéke pH=10,5 fölött van, az 500000 daltonos frakció IEP értéke 9,6-os pH.

Az egyes termékek nitrogén-tartalmát égetéssel határozzuk meg, amit GC elemzés követ, míg a dextrán mennyiségét anthronnal határozzuk meg [Mokrasch, J.: Journal of Biological Chemistry 254, 55 (1954)]. A dextrán/amin molarány körülbelül 2 a 10000 daltonos frakció esetében, 45 a 70000 daltonos frakció esetében, és 590 az 500000 daltonos frakció esetében.

3. Példa

Töltött dextránnal norított vasoxid részecskék felvétele HUVEC-kel

A humán endoteliális sejtenyészeteket (HUVEC) 2×10^4 sejt per cm^2 sejtsűrűségben oltjuk le 10 cm^2 -es tenyésztő lemezekre, majd 48 óra hosszat antibiotikum szaporító közegben tenyésztjük, 2% borjúmagzat szérummal, 37°C -on, 5% CO_2 -t tartalmazó, nedvesített atmoszférában. A tenyésztő táptalajt eltávolítjuk, a sejteket foszfáttal pufferelt sóoldattal mossuk, majd 1 ml szérummentes endoteliális alaptáptalajt adunk hozzájuk. A töltött dextránnal borított vasoxid részecskéket $50 \mu\text{g Fe}^{3+}/\text{ml}$ koncentrációban adjuk hozzá. Négyórás tenyésztés után a táptalajt eltávolítjuk, majd a tenyészeteket 1 ml foszfáttal pufferelt sóoldattal mossuk. Az eltávolított tenyésztő táptalajt és a mosóoldatot egyesítjük, és a vaskoncentrációt a Jander és munkatársai által ismertett tiocianát-reakciós módszerrel mérjük meg [Jander: Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum, S.Hirzel Verlag, Stuttgart (1995)]. A sejteket $500 \mu\text{l}$ tömény sósavval lizáltatjuk, majd a tenyésztő lemezeket $500 \mu\text{l}$ foszfáttal pufferelt sóoldattal mossuk. A sejtlizátumot és a mosóoldatot egyesítjük, majd a vaskoncentrá-

ciót a Jander és munkatársai által ismertetett tiocianát-reakciós módszerrel mérjük meg [Jander: Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum, S.Hirzel Verlag, Stuttgart (1995)].

Az előzőekben említett kísérlet eredményeit az alábbi, 1. táblázatban mutatjuk be.

1. Táblázat

Vaskoncentráció HUVEC tenyészetek sejtlizátumaiban és tenyésztő táptalajaiban töltött dextránnal borított vasoxid részecskékkel való inkubálás után

Ré- szecs- ke	Töltés	Sejtlizátum Fe ³⁺ [μg]	Táptalaj Fe ³⁺ [μg]	Összes Fe ³⁺ [μg]	Hozam [%]	Sejtlizátum (a teljes %-a)	Közeg (a teljes %-a)
Lauril-savval borított Fe	negatív	11,04	27,35	38,39	78,48	28,7	71,3
FeDex-pLys	pozitív	16,80	15,59	32,39	61,09	51,8	48,2
FeDex	semleges	5,38	23,84	29,22	70,92	18,4	81,6

A sejtlizátumokban és a tenyésztő közegekben mért vaskoncentráció világosan mutatja, hogy a pozitív töltésű dextránnal

borított vasoxid részecskék HUVEC által való felvétele jelentősen nagyobb mint a semleges vagy negatív töltésű részecskéké.

4. Példa

A liposzómák zéta potenciáljának mérése

1. A mérés elvei

A zéta potenciált Zetasizer 3000 (Malvern Instruments) berendezéssel mérjük. Ebben a kísérletben az elektroforetikus mobilitás függ a kolloid részecske töltés-sűrűségétől, ezt Laser Doppler mikro-elektroforézissel mérjük. A részecskéket fényszórási tulajdonságaik alapján mutatjuk ki. A méréseket 25 °C-on hajtjuk végre, számos párhuzamosban. A minták között egy standard oldatot (latex részecskék meghatározott zéta potenciállal) ismételtén megmérünk, hogy biztosítsuk, hogy a rendszer helyesen működik. Különböző mennyiségű kationos komponenst (DOTAP) tartalmazó liposzómákat készítünk (10 mmol/l lipidtartalom).

2. A liposzómák szintézise

Először a film-módszert követjük. A lipideket kloroformban oldjuk egy gömblombikban, majd a lombikot csökkentett nyomáson addig forgatjuk, amíg a lipidek egy vékony réteget képeznek. A lipid filmet 40 °C-on 3-5 mbar csökkentett nyomáson körülbelül 60 percig szárítjuk. Ezt követően a lipideket megfelelő térfogatú 5%-os glükózban diszpergáltatjuk, így kapjuk multilamelláris vezikulumok szuszpenzióját (10 mmol/l lipid koncentráció). Egy nappal később a vezikulumokat megfelelő méretű (tipikus esetben

100 és 400 nm között) membránokon keresztül extrudáljuk (szűrés nyomás alatt) (a zéta potenciálhoz az összes liposzómát 100 nm-es membránon keresztül extrudáljuk).

A zéta potenciál méréseihez a kiszerelési formákat 1:25 arányban hígítjuk két különböző oldószer rendszerben: a) TRIS-HCl puffer (pH=6,8 vagy 8,0), és b) 0,05 mol/l kálium-klorid oldat, pH=7,0 (7,5-7,7-re növelve a minta hozzáadása után).

Ennek a kísérletnek az eredményeit az alábbi, 2. és 3. táblázatban adjuk meg.

2. Táblázat

Hét liposzóma kiszerelési forma mérése (különböző DOTAP, semleges lipid DOPC (dioleil-foszfátidilkolin) vagy DOPE (dioleoil-foszfátidiletanolamin) tartalommal) TRIS-HCl pufferben

A minta vezetőképessége körülbelül 3 mS/cm² (pH=6,8) és 1 mS/cm² (pH=8)

Liposzóma készítmény	DOTAP tartalom [mól%]	Zéta potenciál mV-ban (pH=6,8)	Zéta potenciál mV-ban (pH=8)	Z _{átl} nm-ben
DOTAP/DOPC=4/96	4	+10,8	+7,0	148
DOTAP/DOPE=20/80	20	+23,6	+17,0	150
DOTAP/DOPC=30/70	30	+46,3	+27,0	137
DOTAP/DOPE=40/60	40		+33,1	140
DOTAP/DOPE=55/45	55	+50,3	+42,9	151
DOTAP/DOPE=80/20	80	+51,4	+43,0	130-135

DOTAP	100		+48,9	140
-------	-----	--	-------	-----

3. Táblázat

Hét liposzóma készítési forma mérése (különböző DOTAP, lipid DOPC 0,05 mol/l kálium-klorid oldatban (pH=7,0-7,5

A minta vezetőképessége körülbelül 2,65 mS/cm².

Liposzóma készítmény	DOTAP koncentráció [mól%]	Zéta potenciál mV-ban 0,05 mol/l kálium-klorid oldatban, pH=7,0-7,5
DOTAP/DOPC=4/96	4	+16,6
DOTAP/DOPE=15/85	15	+39,6
DOTAP/DOPC=30/70	30	+49,0
DOTAP/DOPE=50/50	50	+59,9
DOTAP/DOPE=55/45	55	+59,9
DOTAP/DOPE=80/20	80	+59,4
DOTAP	96	+61,5

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy körülbelül 4 és 50 mólszázalék között a zéta potenciál állandóan nő. Azonban meglepő módon a DOTAP 50 vagy magasabb mólszázalékánál a zéta potenciál nem nő tovább, és +40 valamint +62 mV közötti értéket ér el, összességében hiperbolikus görbét mutat. Ezek az adatok azt demonstrálják, hogy a görbének ez a hiperbolikus alakja megmarad a különböző pufferrendszerekben, még akkor is, ha a zéta potenciál abszolút értéke csekély mértékben változik is. Bár a KOH/HCl (pH=7,5) rendszerben kapott görbe reprezentálja a

legtöbb fiziológiás helyzetet, a másik két görbe, amiket 6,8-as és 8,0-ás pH-n vettünk fel, azt illusztrálja, hogy még a fiziológiás pH-tól való bizonyos eltérés esetében is a görbe pH-ja megmarad.

Ebben a példában a DOTAP-ot használjuk a zéta potenciál liposzóma készítményekben való mérésére, A szakterületen jártas szakember ismereteihez tartozik, hogy a DOTAP-ot más kationos lipidekkel lehet helyettesíteni, és a liposzóma készítmény zéta potenciálját meg lehet mérni.

5. Példa

A pozitív töltésű molekulák irányítása *in vivo* az angiogén endoteliális sejtekhez

A makromolekulák tumorszövetekhez való transzportálása és azokkal való specifikus kölcsönhatása különböző paramétereiktől függ, azaz például a molekulák méretétől és töltésétől. Ez a példa az angiogén endoteliális sejtekhez való töltésfüggő irányítást mutatja *in vivo*. A fluoreszcenciásan jelzett töltött dextránokat (a Molecular Probes-től, vagy az alábbiakban ismertetett módon megszintetizálva) használjuk. A töltött molekuláknak az angiogén endoteliális sejtekhez való indirekt tumor-irányítását a hörcsög kamra modell használatával mutatjuk be [Endrich és mtsai: Resp. Exp. Med. 177, 125 (1980)].

1. Fluoreszcenciásan jelzett dextránok különböző nettó töltéssel

A dextránokat - hidrofil poliszacharidok – magas molekulásúly, jó vízdoldhatóság, alacsony toxicitás és viszonylagos inertség jellemzi. Ezek a tulajdonságok teszik a dextránokat hatékony vízdoldható hordozóvá a festékekhez, azaz például a fluoreszcens festékekhez. A biológiailag szokatlan α -1,6-poliglükóz kötéseik rezisztenssé teszik őket a legtöbb endogén celluláris glikozidázzal szemben.

a. Fluoreszcenciásan jelzett dextránok a Molecular Probes-től

Ahhoz, hogy elemezzük a pozitív nettó töltést hordozó dextránok tulajdonságait, a Molecular Probes-től kationos, fluoreszcenciásan jelzett dextránokat használunk. Ilyen dextránok például a Rhodamine GreenTM-hez kapcsolt dextránok, amiknek a molekulásúlya 3000 és 70000 között változik, vagy lizinhez konjugált, tetrametilrodaminhoz kapcsolt dextránok, amik az egyes dextrán molekulákhoz kapcsolt anionos csoportok ellenére pozitív nettó töltéssel rendelkeznek, amik a kapcsolt lizin-csoportokon keresztül jönnek létre. Az is lehetséges, hogy más fluoreszcens dextránokat használjunk, amik lizin csoportokat használnak, pozitív nettó töltést eredményezve.

Negatív nettó töltésű dextránokként fluoreszcens anionos vagy polianionos dextránokat használunk a Molecular Probes-től, amik nem tartalmaznak lizin-csoportot. Az anionos vagy polianionos dextránok közé tartozik a Cascade Blue kapcsolt dextrán, aminek a molekulásúlya 3000 és 70000 között van, vagy ide tar-

toznak a Fluoreszceinhez kapcsolt dextránok, vagy az olyan negatív töltésű dextránok, amik más fluoreszcencia jelölést hordoznak.

Nulla nettó töltésű semleges dextránokként a Molecular Probes-tól használunk dextránokat, azaz például rhodamine B-hez kapcsolt dextránokat, amiknek a molekulásúlya 10000 és 70000 között van, vagy más fluoreszcens dextránokat használunk.

b. Töltött, vagy semleges, fluoreszcenciásan jelzett dextránok szintézise

A töltött vagy semleges dextránokat dextrán molekulák oxidációjával szintetizáljuk meg (az oxidációt elvégezhetjük például perjodáttal), ezzel reakcióképes aldehyd-csoportokat állítva elő. Ezt követően, az aldehyd-csoportokat különböző reagensek amin-funkciójával reagáltatjuk, ezzel különböző nettó töltésű molekulákat állítva elő. Végezetül, ezeket a molekulákat fluoreszcens festékekhez konjugáltatjuk.

i) Dextránok oxidációja

A jelöletlen dextrán molekulákat nátrium-perjodáttal keverjük össze, megfelelő mólarányban, ami lehet 6 mól dextróz 1 mól perjodátra számítva vizes oldatban (30 perc, pH=6). A reakciót körülbelül 300 mólfölöslegben hozzáadott etilénlikol hozzáadásával állítjuk le, majd 0,15 mol/l nátrium-kloriddal szemben dializál-tatjuk.

ii) Pozitív töltésű, fluoreszcenciásan jelzett dextránok előállítása

A módosított oxidált dextránokat polilizin vizes oldatával keverjük össze nátriumborát pufferben (pH körülbelül 9), a megfelelő módon. A kapott oldatot 0,15 mol/l nátrium-kloriddal szemben dializáltatjuk. Ezután a polilizin megmaradt primer aminocsoportjait 0,1 mol/l nátrium-karbonát pufferben reagáltatjuk egy fluoreszcens festék, például az Amersham Cy-Dye családjának egy tagjának, vagy egy fluoreszcein származék vagy bármilyen más reaktív festék megfelelő megfelelő szukcinimidil-észterével vagy szulfonil-kloridjával. A fluorofórnak a polilizin-dextránhoz viszonyított, kiválasztott molarányát előre meghatározzuk, hogy a kapott reakcióterméknek pozitív nettó töltése legyen. A szabad festéket úgy választjuk el, hogy a mintát 0,15 mol/l nátrium-kloriddal szemben dializáltatjuk. A reakciótermék izoelektromos pontját izoelektromos fókuszálással határozzuk meg, 8 fölötti fiziológiás pufferben.

iii) Fluoreszcens, semleges dextránok előállítása

Az oxidált dextránokat egy megfelelő peptiddel reagáltatjuk, ami két primer aminocsoportot tartalmaz, ilyen például az alanin-alanil-lizin, aminél a dextránhoz való kötődéshez a peptidgerinc szabad aminocsoportját használjuk fel. Ezt követően a polilizin primer aminocsoportjainak 0,1-10 mólszázalékát reagáltatjuk egy fluoreszcens festék, például Lissamine Rhodamin B, Fluoreszcein származékok vagy bármilyen más fluoreszcens festék szulfonil-

kloridjával vagy szukcinimidil észterével, amivel egy nulla nettó töltést hordozó molekulát kapunk. A reakciótermék izoelektromos pontját izoelektromos fókuszálással határozzuk meg 7-7,5-ös fiziológiás pufferben végzett izoelektromos fókuszálással.

iv) Fluoreszcens, negatív töltésű dextránok készítése

Az oxidált dextránokat egy megfelelő peptiddel reagáltatjuk, ami negatív és pozitív töltésű aminosavakat tartalmaz, és nettó töltése nulla, vagy alacsonyabb, ilyen például a glutamát-glutamát-lizin. Amint azt az előzőkben ismertettük, a peptid N-terminálisának szabad aminocsoportjait konjugáltatjuk az oxidált dextrán aldehid-csoportjaihoz. Ezután a lizin-csoportok alifás aminocsoportjai 0,1-10 mólszázalékát reagáltatjuk egy megfelelő reakcióképes fluoreszcens festék konjugátummal (lásd fent). A reakciótermék izoelektromos pontját izoelektromos fókuszálással ellenőrizzük, fiziológiás pufferben, és úgy találtuk, hogy értéke tipikus esetben 5 alatt van.

2. Fluoreszcenciásan jelzett dextránok irányítása *in vivo* angio-gén endoteliális sejtekhez

Hím szíriai aranyhörcsögöt (testsúlyuk 40-50 g) látunk el titánból készült bőrránc kamrával. A kamra készítését pentobarbitál érzéstelenítés mellett hajtjuk végre (50 mg/kg intraperitoneálisan). Az átlátszó hozzáférési kamra beültetése és az érzéstelenítés és mikrosebészeti beavatkozás után 24 órával csak a mikroszkópiásan intakt mikrokeringés kritériumának megfelelő prepará-

tumokat használjuk a hörcsög amelanotikus melanómájából származó 2×10^5 sejt beültetésére. A jelenlegi tumor modellben az angiogenezist alaposan jellemezték. A kísérleteket 6-7 nappal a tumor növekedése után hajtjuk végre, amikor a tumorban a keringés kialakult. Fluoreszcenciásan jelzett, töltött dextránokból megfelelő mennyiséget injektálunk egy bennmaradó finom poliéter katéteren keresztül a jobb nyaki vénába, amit a minta injektálása előtt 24 órával ültetünk be. A kísérlet során a felébredő, kamra-hordozó hörcsögöt egy speciálisan tervezett helyzetben immobilizáljuk egy Perspex csővel. A fluoreszcens dextránok tumor endothélium-specifikus vezérlését az angiogén tumorszövet és a környező gazdaszövet fluoreszcencia-mikroszkópás vizsgálatával elemezzük, az injektálás után különböző időpontokban (0,5-360 perc). Mindkét szövetben a fluoreszcencia intenzitását az egyes kamrákban levő referencia fluoreszcencia jel százalékában határozzuk meg (% standard). A tulajdonságban és a környező szövetekben levő % standard fluoreszcencia aránya, amit egy anyagnak a tumorszövetre való szelektivitásaként definiálunk, az az affinitás-érték, amivel a töltött dextránok kötődnek a tumor endothéliumhoz, ezt a 4. ábrán mutatjuk be.

3. Következtetés

Általánosságban, a töltött dextránoknak az angiogén tumor endothéliumhoz való kötési affinitása nő a bejuttatott molekulák pozitív nettó töltésével (lásd a 4A-C. ábrát). Ez azt mutatja, hogy a

makromolekulák tapadnak a negatív töltésű kötőhelyekhez, amik a sejt felszínén vagy a tumor endotélium glycocalyxán találhatók.

6. Példa

Vaszkuláris tumor irányítás egy humán tumor xenograftban: molekuláris töltés-függés

Amint azt korábban megjegyeztük, a molekuláris töltés az egyike azoknak a tulajdonságoknak, amik befolyásolják egy véredény falán keresztül történő transzportot. Azonban makromolekulák esetében nincs adat a molekuláris töltésnek a mikrovaszkuláris permeabilitásra gyakorolt hatásáról, szilárd tumorokban az angiogén véredényekben való magasabb akkumulálódás esetében. A méréseket LS 174T humán vastagbél adenokarcinómával végezzük el, transzparens háti bőrredő kamrákban, súlyos kombinált immundeficiens (SCID) egerekben. A szarvasmarha szérumalbumint (BSA) és IgG-t fluoreszcenciásan jelöljük, majd vagy hexametiléldiaminnal konjugáltatva kationizáljuk, vagy szukcinnilezéssel anionizáljuk. A molekulát intravénásan injektózzuk, és a tumorszövetben a fluoreszcenciát intravitális fluoreszcencia mikroszkópiával hajtjuk végre. A fluoreszcencia intenzitását és a farmakokinetikai adatokat használjuk a mikrovaszkuláris permeabilitás kiszámítására.

1. Állati- és tumor-modell

Az LS174T tumort tartalmazó háti bőrredő kamrákat súlyos kombinált immundeficiens (SCID) hím egerekben készítjük el, a

korábban ismertetett módon [Leunig és mtsai: Cancer Research 52, 6553 (1992)]. Röviden, titán kamrákat ültetünk be egerek hátbőrébe (hím, 6-8 hetes, 25-35 gramm), érzéstelenítéssel (75 mg ketamin hidroklorid és 25 mg xylazine per testsúlykg, szubkután). Két nappal később a humán vastagbél karcinóma sejtekből 2 μ l sűrű szuszpenziót (körülbelül 2×10^5 sejt foszfáttal pufferelt sóoldatban) oltunk a kamrákban levő szubkután szövet harántcsíkkolt izomrétegébe. A permeabilitás mérésére a kísérleteket 2 héttel a tumorsejt beültetése után hajtjuk végre.

2. Töltés-módosított BSA készítése

Szarvasmarha szérum-albumint (BSA; A7030, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) először fluoreszcenciásan jelezzük, karboxitetrametilrodamin-szukcimidil-észterrel (C-1171, Molecular Probes, Eugene, OR) konjugáltatva. A szabad festéket géliszűrés oszlopon (Econo-Pac 10DG; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) eltávolítjuk, amit 50 mmol/l-es, 0,002% nátrium-azidot tartalmazó foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS, Sigma Chemical Co.) hoztunk egyensúlyba. Ezzel az eljárással 1,3-as moláris festék/fehérje arányt lehetett elérni. Ezt követően a BSA oldat alikvot részeit szukcinilezéssel anionizáljuk, vagy hexametiléndiaminnal konjugáltatva kationizáljuk. A szukcinilezéshez [Klotz, L.M.: Succinylation *In: Methods in Enzymology*, 576-580. oldal, szerk.: Hirs, C.A., Academic Press, New York (1967); Rennke és Venkatchalam: *Kidney Int.* 13, 278 (1978)], 50 ml dimetilszulfidban (DMOS, Sigma Chemical Co.) 10 mg borostyánkősav-an-

hidridet (Sigma Chemical Co.) adunk cseppenként, kis növekedésekkel 10 µg fehérje 1 ml 0,2 mol/l-es hidrogénkarbonát pufferben (pH=8,0) készített oldatához. Az inkubálási idő során (30 perc, szobahőmérséklet) a pH-t 8,0-8,5 között tartjuk. A kationizáláshoz [Triguero és munkatársai (1989); Kumagai és munkatársai (1987); Hoare és Koshland (1967)] a fehérje szabad karboxicsoportjait (10 mg 1 ml 5 mmol/l-es MES-ben, pH=5,3, ha szükséges, akkor a pH-t 5,3-on tartjuk 1 mol/l sósavval) 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karboxidiimiddel (CDI, Sigma Chemical Co.) aktiváljuk. Ebből a célból a CDI-t két részletben (mindegyik részlet 10 mg CDI 100 ml vízben) adjuk a fehérje-oldathoz, 10 perc különbséggel. Közvetlenül a második CDI részlet hozzáadása után hozzáadjuk az aktivált fehérjét 2 ml, 2 mol/l koncentrációjú, vízben készített hexametiléndiaminban (Sigma Chemical Co.) kevertetve, az oldat pH-ját 6,8-ra állítjuk, majd az elegyet 5 óra hosszat szobahőmérsékleten tartjuk. A konjugálás után a termékeket éjszakán át tartó dialízissel tisztítjuk, majd a magas molekulásúlyú aggregátumokat egy Sepharose CL-6B oszlopon (Pharmacia) eluálva távolítjuk el. A fő fehérje-csúcsokat egyesítjük, majd 4 °C-on tároljuk.

3. Töltés-módosított IgG készítése

Az egér monoklonális IgG ellenanyag (MOPC21; M-9269, Sigma Chemical Co.) oldószerét 0,2 mol/l nátrium-hidrogénkarbonátra cseréljük egy gélszűrő oszlopon (Econo-Pac 10DG, Bio-Rad), majd az oldatot 1 mg fehérje/ml-re töményítjük, centrifugális ult-

raszűréssel (Ultrafree-CL; Millipore, Bedford, MA). A pH-t 9,3-ra állítjuk. A fluoreszcenciás jelöléshez Cyanine 3 monofunkciós festéket (Cy3-Mono-Osu; PA13104; Amersham Life Science, Arlington Heights, IL) használunk magas fluoreszcencia intenzitás eléréséhez, ami lehetővé teszi, hogy az *in vivo* kísérleteket kis-mennyiségű (0,5 mg IgG/állat) IgG használatával hajtsuk végre. A Cy3-Mono-Osu-t 2 mg festék/10 mg fehérje arányban alkalmazzuk, majd az oldatot szobahőmérsékleten 60 percig kevertetjük. A szabad festéket gélszűrési oszlopon (Econo-Pac 10DG, Bio-Rad) távolítjuk el, amit 50 mmol/l, 0,002% nátrium-azidot (Sigma Chemical Co.) tartalmazó foszfáttal pufferelt sóoldattal hoztunk egyensúlyba, majd az oldatot 1,8 mg fehérje/ml-re töményítjük centrifugális ultraszűréssel (Ultrafree-CL; Millipore Corp., Bedford, MA). Ezután az IgG anionos és kationos származékait az előzőekben a BSA-ra ismertetett módon állítjuk elő.

4. A molekuláris töltés és a molekulásúly mérése

A fehérjék izoelektromos pontját izoelektromos fókuszálással határozzuk meg, poliakrilamid gélt használva egy vertikális elektrofókuszáló berendezésben. A pI értékét fehérje-standardokkal (Bio-Rad) összehasonlítva határozzuk meg, a gélek Coomassie Blue-val való festése után. A fehérjék molekulásúlyát SDS-PAGE-val elemezzük (Mini-Protean II; Bio-Rad), β -merkaptotanolos redukcióval és anélkül is, a mintapufferben.

5. A tumor mikrovaskuláris permeabilitásának mérése

A különböző fehérjék effektív mikrovaskuláris permeabilitását fluoreszcencia mikroszkóppal mérjük, a korábban ismertetett módon [Yuan és mtsai: Microvasc. Res. 45, 269 (1993); Yuan és mtsai: Cancer Research 55, 3752 (1995)]. Röviden, az állatokat az előzőekben ismertetett módon érzéstelenítjük, majd a mikroszkóp állványon egy polikarbonát csőben immobilizáljuk. A fluoreszcenciásan jelzett fehérjét foszfáttal pufferelt sóoldatban oldjuk, majd a farokvénába injekciózzuk bolusként (0,1 ml/25 g testsúly). A tumor fluoreszcencia intenzitását egy 20× objektívvel vizsgáljuk egy fluoreszcencia mikroszkópban (Axioplan, Zeiss), majd mennyiségét 20 percig egy fotosokszorozóval mérjük. A videóra rögzített tumorterület off-line elemzése lehetővé teszi a tumor vaszkuláris felszínének és térfogatának mérését. Külön kísérletekben, amikben három állatot használtunk az egyes fehérjék tulajdonságainak kiértékelésére, a plazma kiürülésének időállandóját mennyiségileg meghatároztuk, artériás vérmintákat véve a fehérje injekciójától számított 30 percen belül. A tumor mikrovaskuláris permeabilitást az egyes fehérjék esetében 6-7 egyedi tumorról végzett kísérletekből számítjuk ki, Yuan és munkatársai módszerével [Yuan és mtsai: Microvasc. Res. 45, 269 (1993)]. A mikrovaskuláris permeabilitás eredményeit átlag $\pm$ az átlag standard hibája formájában adjuk meg.

Az eredményeket az alábbi, 4. táblázatban adjuk meg.

4. táblázat

A jelző molekulák és mikrovaszkuláris permeabilitásuk jellemzői tumorokban

Az anionizált és kationizált BSA-t és IgG-t a természetes fehérjékből az anyagok és módszerek részben ismertetett módon állítjuk elő.

Név	M _r	pI ^a (tartomány)	Átlagos K (tartomány) (100s)	Átlagos P _v (tartomány) (10 ⁻⁷ cm/s)
Természe- tes BSA ^b	66000	4,5	80,5 (77-130)	1,61 (0,65-1,93)
Anionizált BSA	64000	kb. 2,0	40,8 (37-45)	1,11 (0,95-2,38)
Kationizált BSA	64000	8,6-9,1	12,7 (12-13)	4,25 (3,57-5,34)
Natív IgG ^b	160000	6,0	50,0 (34-82)	2,82 (1,47-,07)
Anionizált IgG	155000	3,0-3,9	39,3 (37-44)	1,93 (1,11-2,53)
Kationizált IgG	155000	8,6-9,3	11,0 (5-15)	4,65 (4,25-5,27)

^a pI: izoelektromos pont

K: a koncentráció lecsengésének időállandója;

P_v: mikrovaszkuláris permeabilitás

^b Adatok Yuan-tól és munkatársaitól [Yuan és mtsai: Cancer Research 55, 3752 (1995)].

6. Következtetés

A fluoreszcencia mikroszkópiából kiderült, hogy a különböző fehérjék homogén módon extravazálnak a véredény fala mentén. A tumor mikrovaszkuláris permeabilitását (P_v) az anionizált és kationizált BSA-ra a 4. táblázatban mutatjuk be. A permeabilitási értékek alacsonyak a negatív töltésű BSA-ra ($P_v = 1,11 \pm 0,44 \times 10^{-7}$ cm/s); átlag $\pm$ az átlag standard hibája), és majdnem négyszer magasabb a pozitív töltésű BSA-ra ($P_v = 4,25 \pm 0,26 \times 10^{-7}$ cm/s).

A tumorok mikrovaszkuláris permeabilitása az anionizált és kationizált IgG-re valamivel a megfelelő BSA mintákra mért értékek fölött volt (4. táblázat). A töltés-módosított BSA-val kapott adatokhoz hasonlóan a kationizált IgG mutatta a legmagasabb permeabilitást ($P_v = 6,65 \pm 0,29 \times 10^{-7}$ cm/s), és az anionizált IgG ($P_v = 1,93 \pm 0,41 \times 10^{-7}$ cm/s) a természetes fehérjére mért érték alatt volt.

7. Példa

A semleges és kationos Rhodamin-jelzett liposzómák humán endoteliális sejtenyészetekkel (HUVEC)

A HUVEC-et 2×10^4 sejt/cm² sűrűségben oltjuk le zselatinnal borított, 2-lukas tenyésztő lemezekre, majd 48 óra hosszat 37 °C-on, 5% CO₂-t tartalmazó, nedvesített atmoszférában tenyésztjük endoteliális sejt növesztő táptalajban, ami 2% borjúmagzat szérumot tartalmaz. A tenyésztő táptalajt eltávolítjuk, a sejteket foszfáttal pufferelt sóoldattal mossuk, és 500 µl szérumentes endoteliális alaptáptalajt adunk hozzá. Rhodaminnal jelzett lipo-

szómákat (0,5 mmol/l Rhodamine jelölés) adunk a tenyészetekhez, 100 $\mu\text{mol/l}$ össz-lipid koncentrációban. 4 órás együtt-tenyésztés után a közeget eltávolítjuk, majd a tenyészeteket kétszer mossuk 500 μl foszfáttal pufferelt sóoldattal. A sejteket 1,5 ml (foszfáttal pufferelt sóoldatban készített) Triton X-100-zal lizál-
tatjuk, 30 percig, szobahőmérsékleten. A fluoreszcencia intenzi-
tását 560 nm gerjesztési hullámhosszon és 580 nm emissziós hul-
lámhosszon mérjük egy SPEX FluoroMax-2-ben.

Ennek a kísérletnek az adatait az alábbi, 5. táblázatban mutatjuk be.

5. Táblázat

Rhodamine-nal jelzett liposzómák felvétele HUVEC-kel (az össz-lipid koncentráció 10 mmol/l, a liposzóma készítményeket mólszá-
zalékban adjuk meg)

A zéta potenciálokat a 3. táblázatban specifikált körülmények között mérjük.

DOTAP	0	30	40	50	80	95
DOPC	55	65	55	45	15	0
Chol	40	0	0	0	0	0
Rh-DOPE	5	5	5	5	5	5
Zéta poten- ciál (mV)	----	+27,0	+33,1	+42,9	+43,0	+48,8
fluoresz- cencia fel- vétel (cps)	----	124802	179961	230879	256276	271732

8. Példa

Egy liposzómális, kationos leképező ágens

i) A leképező ágens készítése

A celluláris képalkotó ágenseket kationos liposzómákba pakoljuk, amik kationos lipidet, azaz például DOTAP-ot tartalmaznak. Például a magnetitról (Fe_3O_4) a szakirodalomban ismert, hogy kapszulázni lehet kationos liposzómákba, hipertermia leképezése vagy kezelése céljából. A vasoxidok a kationos liposzómák belsejébe zárhatók, az előzőekben ismertetett általános eljárást követve, vagy például az 5,088,499 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetett eljárás alapján. A hipertermia kezelésére a vasoxid részecskéket intravénásan adjuk be a rákos betegeknek. A részecskék akkumulálódnak a tumorban. Ha a beteget mágneses mezőbe tesszük, akkor a vasoxid részecskék felmelegszenek, és elroncsolják a szilárd tumort.

Specifikus példaként megemlítjük, hogy szuperparamágneses vasoxid részecskéket, amiket H^+ ionokkal stabilizáltunk (kereskedelmi forgalomban beszerezhető a Berlin Heat AG-től), DOTAP-ot és DOPC-t 50/50 arányban tartalmazó liposzómákba kapszulázzuk, aminek kiinduláskor az össz-lipid koncentráció 15 mmol/l. Egy ilyen készítményt az alábbiak szerint állítunk elő:

0,075 mmol DOTAP-ot és 0,075 mmol DOPC-t oldunk 20 ml kloroformban, amihez egy 500 ml-es gömblombikot használunk. A kloroformot csökkentett nyomáson bepároljuk, majd a filmet csökkentett nyomáson (5 mbar) megszárítjuk, 90 alatt. Ezt

követően, a lipid filmet vasoxid részecskék 10 ml, 286 mmol/l koncentrációjú vizes oldatával rehidratáljuk. A liposzóma szuszpenziót óvatosan összekeverjük, majd hűtőben tároljuk. 24 óra elteltével a szuszpenziót 12000×g-vel centrifugáljuk (10 °C, 30 perc). Ennek következtében az elegy két fázisra válik szét: egy felső fázisra, ami a liposzómák nagy részét tartalmazza, a kapszulázott vasoxiddal, míg az alsó fázisban jóval kevesebb a liposzóma, de ez tartalmazza a nem-kapszulázott vasoxidot. A felső fázist (10 ml) ötször extrudáljuk egy 400 nm-es polikarbonát membránon (Osmoics Inc.) (Lipex extruder, 10 ml-es dobbal). Az extrudált terméknek HPLC-vel elemezzük a lipidtartalmát, míg a vastartalmát fotometriásan elemezzük (tiocianát módszer).

ii) Képképző ágens alkalmazása

Az állatkísérletekhez C57BL/6 egereket oltunk be 10^6 Lewis Lung Carcinoma (LLC) sejtekkel. Körülbelül 10 nappal az inokulálás után az egerekben tapintható tumor fejlődik ki. Amikor a tumor mérete eléri a körülbelül 5-8 mm méretet (két dimenzióban mérve), akkor az állatot egy 2T MR tomográfba tesszük (Bruker), érzéstelenítjük (isofluran belégzés), majd letapogatjuk anatómiai orientációját. Ez alatt a letapogatás alatt mérjük a T1 és T2 relaxivitásokat a későbbi összehasonlításhoz. Ezt követően a képképző ágens készítményből (amit az előzőekben ismertetett módon készítünk) az állatok egy grammjára számítva 14 μ l-t injekciózunk a farokvénába. Az egeret újra pozícionáljuk a tomográfban, majd az injekciózás után különböző időpontokban letapogatjuk. A 6.

táblázatban összefoglaljuk egy reprezentatív kísérletben egy állatban a tumorban mért relaxivitási adatokat, amely állat az előzőekben ismertetett készítményt kapta. A normál szövet (azaz például az izom) T2 relaxivitása nem változott (nem közölt adatok).

6. Táblázat

T2 értékek a tumorszövetben a liposzómális kationos kontraszt ágens alkalmazása előtt és után

T2 a kontraszt ágens használata előtt	T2 a kontraszt ágens alkalmazása után		
	T2 15 perc után	T2 60 perc után	T2 4 óra után
86,8 ms	81 ms (a kiindulási T2 93%-a)	75 ms (a kiindulási T2 86%-a)	68 ms (a kiindulási T2 78%-a)

9. Példa

Magnetoszómák, mint kationos képalkotó ágensek

A magnetoszómák nanométer méretű magnetit magból állnak, amit egy lipidréteg borít. A kationos külső réteget tartalmazó magnetoszómákat ahhoz hasonló módon állíthatjuk elő, mint ahogy a negatív töltésű, vagy semleges foszfolipideket állítják elő [DeCuyper és mtsai: Biochimica et Biophysica Acta 1027, 172 (1990)]. A magnetoszómák *in vivo* tesztelését C57BL/6 egerekben hajtjuk végre, amiket 10^6 Lewis tüdőkarcinóma sejtekkel oltottunk

be. Leképezési célokra számos szövet T2 relaxivitását mértül MR-rel.

1. Pozitív töltésű magnetoszómák készítése

A lipidréteggel borított magnetit magokat úgy állíthatjuk elő például, hogy a vasoxid részecskék laurilsav monorétegét lipidekkel helyettesítjük. A réteg cseréje spontán lejátszódik, ha a laurilsavval borított magnetit részecskéket 30-70 mólszázalék foszfolipidet és 70-30 mólszázalék kationos lipidet tartalmazó liposzómákkal inkubáljuk. Azt tételezzük fel, hogy a foszfolipid az Fe_3O_4 oxigénatomjához kötődik, és ezzel leszorítja a laurilsavat. A kationos komponens főleg a magnetoszóma külső rétegében akumulálódik, és elektrosztatikusan stabilizálja azokat. A fölösleges laurilsavat dialízissel távolítjuk el az elegyből. Ezt követően a terméket tisztítjuk.

Specifikus példaként megemlítyük, hogy 150 μl , laurilsavval borított szuperparamágneses vasoxid részecskék szuszpenzióját (a vaskoncentráció 2 mol/l) 37 °C-on inkubáljuk 10 ml 10 mmol/l koncentrációjú liposzóma készítménnyel, ami DOTAP-ot és DOPC-t (Avanti Polar lipids, Inc., Alabaster) tartalmaz 30/70 mólszázalék molarányban (előállítása a 4. példában ismertetett módon). Ezt követően az elegyet 5 napig dializáljuk 5% glükóz oldattal szemben. A dialízis során a laurilsav fogyását HPLC-vel [LiChrospher RP-select B 5 μm 250-4 (Merck), acetonitril/víz 75:25 flow=1 ml/perc, $\lambda=254$ nm, $k'=3,0$, $k'=(t_r-t_0)/t_0$] úgy követjük, hogy laurilsav

fenacilbromid származékot készítünk [Borch és mtsai: Analytical Chem. 47, 2437 (1975)].

A nem-kapszulázott vasoxid részecskéket elválasztjuk a magnetoszómáktól és a főlegben levő üres liposzómákat gélkromatográfiával választjuk el Sephacryl S-300 HR oszlopon. A magnetoszómákat az üres liposzómáktól szuperparamágneses MACS mikrogöngyökön választjuk el, erős állandó mágnesset használva (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach). A 7. táblázatban a magnetoszómák analitikáját foglaljuk össze.

7. Táblázat

A magnetoszómák analitikai adatai a részecskék tisztítása előtt és után

A magnetoszómák lipid-koncentrációja mólszázalékban	Össz-lipid mmol/l-ben	Fe mmol/l-ben	Részecske-méret (nm), Z _{átl} -ként mérve	Polidiszperzitási index	Zéta potenciál (mV)
DOTAP/DOPC 30:70 mólszázalék, inkubálás és dialízis után	3,83	11,4	201,2	0,3	n.a.
DOTAP/DOPC 30:70 mólszázalék tisztítás	1,3	13,9	216,6	0,3	+41,5

után (gélkro- matográfia, MACS, mik- rogyöngyök					
--	--	--	--	--	--

2. A Lewis tüdőkarcinómát hordozó C57BL/6 egerek leképezése

Az állatkísérletekhez az C57BL/6 egereket szubkután LLC sejtekkel oltjuk be (körülbelül 10^6 sejt foszfáttal pufferelt sóoldatban). Körülbelül 10 nappal a beoltás után az egerekben tapintható tumor fejlődik ki. Amikor a tumor mérete eléri a körülbelül 5.8 mm-t (két dimenzióban mérve), akkor az állatokat isofluran inhalálással érzéstelenítjük, 2 T MR tomográfba tesszük (Burker) egy termosztált párnára, majd letapogatjuk az anatómiai orientációt. Ennek a letapogatásnak a során mérjük a T1 és T2 relaxivitásokat a későbbi összehasonlításhoz. Ezt követően a képalkotó ágens készítményből (amit az előzőekben ismertetett módon készítünk) az állatok egy grammjára számítva 14 μ l-t injekciózunk a farokvénába. Az egeret újra pozicionáljuk a tomográfban, majd az injekciózás után különböző időpontokban letapogatjuk. A 8. táblázatban összefoglaljuk a különböző állatokban mért relaxivitási adatokat, amely állatok az előzőekben ismertetett készítményt kapták.

8. Táblázat

Reprezentatív állatkísérletek tumorszöveteinek T2 értékei a
kationos magnetoszómák alkalmazása előtt és után

Kiszerelési forma	T2 a kontraszt ágens alkalmazása előtt	T2 a kontraszt ágens alkalmazása után	
		T2 30 perc után	T2 3,5 óra után
DOTAP/DOPC 30:70 mólszázalék dialízis után	82 ms	65 ms (a kiindulási T2 79%-a)	72 ms (a kiindulási T2 88%-a)
DOTAP/DOPC 30:70 mólszázalék tisztítás után	83 ms	71 ms (a kiindulási T2 86%-a)	69 ms (a kiindulási T2 83%-a)

10. Példa

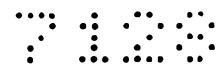
A vízben nem oldódó gyógyszer hatóanyagok hordozójaként a lipofiles Paclitaxel gyógyszer hatóanyagot tartalmazó kationos mikroemulziók

Stabil olaj-a-vízben (O/V) emulziókat, amik a lipofil gyógyszer hatóanyagok megfelelő hordozói, úgy állítjuk elő, hogy egy elektromos keverővel vagy ultrahangos besugárzóval homogenizáljuk [Tuchida és mtsai: Biochimica et Biophysica Acta 1108, 253 (1992); Cavalli és mtsai: Eur. J. Pharmacol. Sci. 10, 305 (2000)]. A különböző lipidekből álló olajfázis szolubilizálószerként hat körülbelül 2,1% mólszázalék gyógyszer hatóanyag számára, ami több hónapra megakadályozza a kristályosodását. Ami az *in vivo* alkal-

mazásokat illeti, a hidrofób mátrix fő komponenseit úgy választottuk ki, hogy biokompatibilis és biológiailag lebontható lipidek legyenek, mint például a trigliceridek. Irányítási célokra kationos emulgeálószerként csak maximum 5 mólszázalék DOTAP-ra vagy DDAB-ra van szükség, ami a külső rétegben levő kationos amfifil 50%-ának felel meg. A részecskeméretet érinti a lipofileknek (TG) az amfifilekhez viszonyított aránya (TG/A), és ez korrelál a növekvő mennyiségű TG-vel.

10 mg paclitaxelt oldunk 560 mg trioktadecilgliceridben. Ezután egy 25 mg DOTAP-ot, 25 mg DOPC-t tartalmazó lipidkeveréket (TG/A arány=11) diszpergálunk a TG/paclitaxel keverékben, oly módon, hogy szobahőmérsékleten 10 percig homogenizáljuk (IKA Ultra-Turrax T8, 10000 per perc fordulatszám). Ezután 7 ml 5%-os glükózoldatot adunk cseppenként az olaj-lipid keverékhez, miközben 15 percig folytatjuk a homogenizálást. A 9. táblázat illusztrálja, hogy a kationizálás elve egyformán használható gyógyszer hatóanyagot tartalmazó és nem tartalmazó mikroemulziókra is, és ennek eredménye stabil kisserelési forma, az angiogenezis irányításához megfelelő zéta potenciállal. Ezzel a megközelítési móddal a gyógyszer hatóanyagának a kationos komponenshez viszonyított magas aránya érhető el (itt 1:2,5 tömegszázalék), ami szignifikáns javulást eredményez a gyógyszert bejuttató rendszer tolerabilitásában.

9. Táblázat



A trigliceridet (TG), DOTAP-ot, DOPC-t és Paclitaxelt tartalmazó kationos mikroemulziók analitikai adatai centrifugálás (500×g, 10 perc) után

kationos lipid [mg]	DOPC [mg]	TG [mg]	Paclitaxel [mg]	TG/am-fifil arány	Z _{át} nm-ben	PI	Zéta potenciál mV-ban
DOTAP:25	25	560	0	11	253	0,3	+60,9
DOTAP:25	25	560	10	11	295	0,4	+56,3
DDAB:28	28	560	3	10	298	0,4	+58,8

11. Példa

Más kapszulázott képalkotó ágensek készítése

A reprezentatív képalkotó ágensek közé tartoznak a kationos liposzómák kapszulázott liposzómális magnetit részecskékkel (a 8. példában ismertetett módon), a kationos liposzómák, amikben a magnetit részecskék kovalens kötással kapcsolódnak a lipid kettősréteghez, a Gd-DTPA-t tartalmazó kationos liposzómák, a kapszulázott Gd-komplexek, a kationos liposzómák, amikben a Gd kovalens kötással kapcsolódik a lipid kettősréteghez, a kationos liposzómák, amik vagy belsejükben kapszulázva tartalmazzák a röntgensugarat gyengítő komplexeket/molekulákat, vagy ezek a membránhoz kapcsolódnak, CT vagy röntgensugár leképezési vizsgálatokhoz. Az ismert technikák alkalmazásával egy reprezentatív számot (amely számot az alábbiakban azonosítunk), és készítményeket állítunk elő, amikkel az előzőkben ismertetett zéta potenciál tartományokat el lehet érni, a szakterületen jártas szakem-

ber képes megfelelő kiszerezési formát előállítani és beadni számos különböző képalkotó ágenszt.

A Gd-DTPA kapszulázási technikái a szakterületen jártas szakember számára jól ismertek [Unger, E.C., P. MacDougall, P. Cullis és C. Tilcock: „Liposomal Gd-DTPA: effect on encapsulation on enhancement of hepatoma model by MRI”, *Magnetic Resonance Imaging* 7, 417-423 (1989)].

A 6,001,333 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetnek egy módszert liposzómális kontraszt ágens készítésére, azzal a céllal, hogy a tumorokat CT leképezéssel ki lehessen mutatni. Az eljárás az alábbi lépésekből áll: a) maltózt vízzel keverünk össze, körülbelül 20 gramm maltóz – 100 ml víz arányban, majd addig kevertetjük, amíg a maltóz feloldódik, ezzel vizes oldatot állítva elő; b) tojás foszfatidilkolint 99,6%-os etanollal keverünk össze körülbelül 4,2 g tojás foszfatidilkolin – 5 ml etanol arányban, majd addig kevertetjük, amíg alkoholos oldatot kapunk; c) BHT-t adunk a vizes oldathoz, körülbelül 6,2 mg BHT – 20 gramm maltóz arányban; d) az alkohol oldatot cseppenként hozzáadjuk a vizes oldathoz, folyamatos kevertetés közben, amíg olyan oldatot kapunk, aminek az összetétele a következő: 5 ml etanol minden 450 ml vízre, ezzel kapszulázó oldatot állítva elő; e) a kapszulázandó anyagot a kapszulázandó oldatba keverjük; f) az e) lépésben kapott elegyet egy mikrofluidizáló berendezésen bocsátjuk át, ezzel tiszta oldatot kapunk; g) az f) lépésben kapott elegyet liofilezzük.

A szakterületen jártas szakember ismereteihez tartozik, hogy az előzőekben említett módszereket módosítani tudja, megfelelő mennyiségű tojás foszfatidilkolint kationos lipiddel helyettesítve, ezzel olyan liposzómális készítményt előállítva, ami tartalmazza az ágenst, és a kívánt zéta potenciállal és/vagy izoelektromos ponttal rendelkezik, ezáltal az ágens szelektíve a tumorba irányul.

A liposzómális készítmények más előállítási módszerei is jól ismertek a szakterületen jártas szakember számára. Ezek közé tartozik, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a lipid filmek hidratálása, az oldószer-injekciózás, a fordított fázisú bepárlás, valamint ezeknek a módszereknek a kombinálása lefagyasztás-felolvasztás ciklusokkal. Az is a szakterületen jártas szakember ismereteihez tartozik, hogy a liposzómákat ultrahangos besugárzással, pH-val indukált vezikulációval, vagy detergens szolubilizálással állítják elő. Emellett különböző módszerek hozzáférhetők a kapszulázott és nem-kapszulázott molekulák elválasztására, beleértve, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a gélszűrést, az ultracentrifugálást, a keresztáramlásos szűrést, sűrűséggradiens centrifugálást és a dialízist.

12. Példa

Tumor regresszió pucér egerekben

Egy liposzóma készítményt, amit általában a 4. példában ismertetettnek megfelelően állítunk elő, úgy, hogy diftéria toxint injektálunk a tumort hordozó pucér vizsgálati egerekbe. A kontroll, tumort hordozó pucér egereket párhuzamosan injektálunk

egy hasonló készítménnyel, amiből nem készítettünk azzal a céllal származékot, hogy módosítsuk a zéta potenciálját. Kétnapi különbséggel beadott két injekció után a vizsgált és a kontroll egereket tizennégy nappal az injekciózás után leöljük, majd boncolással vizsgáljuk. A vizsgált egerekben a tumor tömege statisztikailag szignifikánsan csökken, ami azt mutatja, hogy a készítmény terápiásan hatékonyan okozza a tumor regresszióját.

Más, a tumor regresszióban jól használható készítmények közé tartoznak a liposzóma készítmények, amik paclitaxelt, docetaxelt, vagy más taxánokat, vincristint, navelbint és más vinca alkaloidokat, gemcitabint és más nukleozid analógokat, ciszplatint és más platina-vegyületeket tartalmaznak. Ezeket a készítményeket a 4. példának megfelelően lehet formulázni.

13. Példa

Hólyagtumor leképezése rákos betegekben

Egy fluoreszkáló képalkotó ágenszt állítunk elő a 4. példában ismertetett módon, és szisztémásan beadjuk a rákos betegnek, akinek hólyagtumora van (urothelium karcinóma). Az alkalmazott fluoreszcens képalkotó ágenszt liposzóma készítmény formájában szereljük ki, ami 50 mólszázalék DOTAP-ot, 45 mólszázalék DOPC-t és 5 mólszázalék rhodamine-DOPE-t tartalmaz 5% glükózban és összesen 10 mmol/l össz-lipid tartalommal. A készítményt szisztémásan alkalmazzuk a betegben 6 mg össz-lipid per testsúlykg dózisban, 2 ml/perc infúziós sebességgel.

A kezelés során és után a fluoreszcens képalkotó készítmény akkumulálódása mutatható ki, egy hólyagműtéthez való hagyományos endoszkóppal, ami a liposzómális fluoreszcens festékre specifikus fluoreszcens szűrővel van felszerelve. A fluoreszcens festék akkumulálódását a tumorszövetben leképezéssel, valamint a festék spektroszkópikus azonosításával tesszük láthatóvá. A tumor szélei fluoreszcenciás jelölésének következtében a tumorszövet világosan megkülönböztethető a normális hólyag epitéliumtól, és a tumort teljesen kivágjuk.

14. Példa

Szilárd tumorokat hordozó rákos betegek leképezése

Egy MRI képalkotó ágenszt állítunk elő, általában a 4. és 8. példában ismertetett módon, és egy rákos betegnek adjuk be. Az MRI képalkotó ágenszt liposzóma készítményben szereljük ki, ami 40 mólszázalék DOTAP-ot és 60 mólszázalék DOPC-t tartalmaz (az össz-lipid koncentráció 40 mmol/l), és a vaskoncentráció 9 mmol/l. A készítményből 10 millilitert adunk be egy 80 kg-os betegnek, ami körülbelül 5 mg Fe-t jelent betegenként, vagy körülbelül 0,06 mg Fe/testsúlykg-ot jelent (az éppen beadott Fe-nek körülbelül 10 %-a).

15. Példa

Szilárd tumoros betegek kezelése

A 9. példában ismertetett módon előállított terápiás ágenszt előállítjuk, és tumor kezelésének céljából humán betegnek adjuk

be.. A készítmény terápiásan hatásos mennyiségeit intravénásan adjuk be egy betegnek, aki egy vagy több szilárd tumor növekedésétől szenved. A terápiát addig tartjuk fenn, amíg a tumor regresszió fellép, amit a regresszió egy vagy több markere alapján határozzuk meg, beleértve a keringő tumor antigének szintjének csökkenését és/vagy a fizikai reszorpciót. A készítménnyel ezt követően végzett folyamatos vagy periodikus kezeléseket adott esetben profilaktikusnak tekintjük, vagy olyan eszközöknek, amikkel teljes tumor regressziót lehet biztosítani.

16. példa

Retrolenta fibropláziában szenvedő betegek kezelése

Egy retrolenta fibropláziában szenvedő beteget krioterápiás ablációval kezelünk. Emellett a 1. példában ismertetett terápiás készítményt is beadunk a betegnek. Az ablatált terület revaszkularizációja csökken vagy gátlódik.

17. Példa

Kombinációs terápia

Egy beteget, aki egy vagy több szilárd tumorban szenved, a 1. példában ismertetett módon kezelünk. A terápia megkezdése után a beteget hagyományos kemoterápiának és/vagy besugárzásos terápianak vetjük alá. A terápia kimenetelét szükség esetén általános onkológiai protokolloknak megfelelően monitorozzuk. A kombinációs terápia használata lehetővé teszi a beteg besugárzásnak vagy kemoterápiás szereknek való csökkent kitételét.

18. Példa

Egy terápiás készítmény egy második aktív adalékanyaggal együtt való beadása

Egy, a 11. példában ismertetett liposzóma készítményt egy formulában szerelünk ki egy immuntoxinnal, Thorpe és munkatársai módszerével (5,965,132 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás). Az egy készítményben kiszerelt liposzómák hatásos mennyiségét adjuk be egy betegnek, aki egy vagy több szilárd tumortól szenved. A tumor regressziója figyelhető meg.

19. Példa

Sebgyógyulás

Az 5,879,713 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetett liposzóma készítményt, ami bFGF-et vagy VEGF-et tartalmaz, olyan formában szerelünk ki, hogy az elősegítse a seb gyógyulását egy betegben. A bFGF vagy VEGF terápiásan hatásos mennyiségét adjuk egy liposzóma készítményhez, amiben a DOTAP:DOPC arány 40:60. A liposzóma készítmény terápiásan hatásos mennyiségeit adjuk be sebgyógyításra szoruló betegnek. A seb gyógyulása figyelhető meg.

Az nyilvánvaló, hogy az előző tárgyalás és példák csak néhány előnyben részesített megvalósítási mód részletes leírásai. Ezért a szakterületen jártas szakember számára az nyilvánvaló, hogy különböző módosításokat tehetnek, és ekvivalenseket alkalmazhatnak, anélkül hogy eltérnének a jelen találmány szellemétől

és oltalmi körétől. Minden folyóirat publikációt, más referenciát, szabadalmat és szabadalmi bejelentést, amit ebben a szabadalmi bejelentésben említünk, teljes egészében referenciának tekintünk.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás egy készítmény olyan tulajdonságának erősítése, hogy az szelektíve megcéloz egy aktivált vaszkuláris helyet, és diagnosztikailag hatékony szinten akkumulálódik egy állatban egy aktivált vaszkuláris hely szomszédságában, azzal jellemezve, hogy azt a lépést tartalmazza, hogy a készítményt úgy módosítjuk, hogy az alábbi csoportból egy vagy több tulajdonsággal rendelkezen: a) zéta potenciálja a körülbelül +25 mV és +100 mV közötti tartományban van körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül pH 7,5 mellett; és b) izoelektromos pontja körülbelül 7,5 fölött van, ezáltal egy olyan készítményt kapunk, ami az alábbi csoportból választható:

- i) részecskék, a liposzómákat kizárva, amiknek a zéta potenciálja körülbelül +25 mV és +100 mV közötti tartományban van körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül pH 7,5 mellett;
- ii) 7,5 fölötti izoelektromos ponttal rendelkező molekulák;
- iii) liposzómák, amik kationos lipideket tartalmaznak körülbelül 25 mólszázalék – 50 mólszázalék mennyiségben, amiknek zéta potenciálja körülbelül +25 mV és +100 mV közötti tartományban van körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül pH 7,5 mellett;
- iv) kationos lipid réteggel rendelkező magnetoszómák, amiknek zéta potenciálja körülbelül +25 mV és +100

- mV közötti tartományban van körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül pH 7,5 mellett; vagy
- v) kationos amfifileket tartalmazó olaj-a-vízben emulziók vagy mikroemulziók, amiket az jellemez, hogy a külső rétegben körülbelül 25-60 mólszázalékban tartalmazzanak két zsírsavláncot vagy alkilláncot, vagy zéta potenciáljuk a körülbelül +25 mV és +100 mV közötti tartományban van körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül pH 7,5 mellett.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett készítmény zéta potenciálja körülbelül +25 mV és +60 mV közötti tartományban van körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül pH 7,5 mellett, előnyösen a zéta potenciálja körülbelül +30 mV és +50 mV közötti tartományban van körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül pH 7,5 mellett.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett készítmény egy képalkotó vagy terápiás készítmény, ami tartalmaz egy képalkotó ágenszt, vagy egy terápián aktív adalékanyagot, és előnyösen a következő csoportból választhatjuk ki: vasoxid részecskék, festékek, fluoreszcens festékek, NMR jelölések, szcintigrafikus jelölések, aranyrészecskék, PET jelölések, ultrahang kontrasztanyagok és CT kontrasztanyagok, vagy a következő csoportból választhatjuk ki: citosztatikus és citotoxikus ágensek, azaz például taxánok, epothilon A, B és D, valamint ezek származékai, camptothecin, szervetlen komplexek, mitózis inhibí-

torok, hormonok, antraciklinek, ellenanyagok, topoizomeráz inhibitorok, gyulladáscsökkentő ágensek, alkaloidok, interleukinok, citokinek, növekedési faktorok, fehérjék, peptidek és tetraciklinek.

4. Az 1-3-igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a készítményt egy kationképző regenssel, azaz például etiléndiaminnal, hexametiléndiaminnal, trietiléntetraaminnal, 4-dimetilamino-butilaminnal, N,N-dimetilaminoetil-aminnal, dimetilamino-benzaldehiddel, polilizinnel, és kitozánnal végrehajtott reakcióval módosítjuk, ami az ágens izoelektromos pontját a nem-módosított ágenshez viszonyítva 7,5 fölé növeli.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az aktivált vaszkuláris hely egy angiogenesishez kapcsolódó helyet jelez, és a következő csoportból választható: a) az angiogenesis helyei; b) gyulladásos helyek; c) sebgyógyulási helyek; és d) a vér-agy gát és előnyösen azzal jellemezve, hogy az angiogenesishez kapcsolódó helyet az alábbi csoportból választjuk ki: diabeteszes retinopátia, krónikus gyulladásos betegségek, reumás arthritis, dermatitisz, pszoriázis, gyomorfekélyek, hematogén és szilárd tumorok, valamint ezek áttétei.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett állat egy emlős.

7. Terápiás készítmény, amit az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárással állítunk elő, és egy aktív adalékanyagot tartalmaz, ami hatékony egy angiogenesishez kapcsolódó betegség kezelésében és/vagy gátolja a gyulladást és/vagy elősegíti a csontgyógyulását vagy a sebgyógyulást, zéta potenciálja körülbelül +25

mV és +60 mV közötti tartományban van körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül pH 7,5 mellett, vagy izoelektromos pontja 7,5 fölött van, adott esetben a készítmény a beadására vonatkozó utasításokkal van jelölve vagy csomagolva, egy angiogenezishez kapcsolódó betegség kezelése céljából.

8. A 7. igénypont szerinti készítmény, amiben az aktív adalékanyagot az alábbi csoportból választjuk ki: éterlipid, alkil-lizolecitin, alkil-lizofoszfolid, lizolipid, alkil-foszfolid, az éterlipid előnyösen lehet 1-O-oktadecil-2-O-metil-rac-glicero-3-fosfokolin, 1-O-hexadecil-2-O-metil-sn-glicerin, hexadecil foszfokolin és oktadecilfoszfokolin.

9. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított diagnosztikai készítmény, ami diagnosztikusan hatékony mennyiséget tartalmaz egy aktív adalékanyagból, amivel egy angiogenezishez kapcsolódó betegséget lehet diagnosztizálni vagy leképezni, zéta potenciálja körülbelül +25 mV és +60 mV közötti tartományban van körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül pH 7,5 mellett, vagy izoelektromos pontja 7,5 fölött van, adott esetben a készítmény a beadására vonatkozó utasításokkal van jelölve vagy csomagolva, egy angiogenezishez kapcsolódó betegség diagnosztizálása vagy leképezése céljából.

10. A 7. vagy 9. igénypont szerinti készítmény, ami az alábbiakat tartalmazza:

- i) részecskék, liposzómák kivételével, amiknek a zéta potenciálja körülbelül +25 mV és +100 mV között van,

- körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül pH=7,5 értéknél;
- ii) olyan molekulák, amiknek az izoelektromos pontja 7,5 fölött van;
 - iii) liposzómák, amik kationos lipideket tartalmaznak, körülbelül 25 mól% és 50 mól% közötti tartományban, zéta potenciáljuk körülbelül +25 mV és +100 mV között van, körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül pH=7,5 értéknél;
 - iv) magnetoszómák, amiknek kationos lipidrétegük van, aminek a zéta potenciálja körülbelül +25 mV és körülbelül +100 mV között van körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, pH körülbelül 7,5
 - v) kationos amfifileket tartalmazó olaj-a-vízben emulziók vagy mikroemulziók, amiket az jellemez, hogy a külső rétegben körülbelül 25-60 mólszázalékban tartalmazzanak két zsírsavláncot vagy alkyláncot, vagy zéta potenciáljuk körülbelül a +25 mV és +100 mV közötti tartományban van körülbelül 0,05 mmol/l kálium-klorid oldatban, körülbelül pH 7,5 mellett.

11. A 7-10. igénypontok bármelyike szerinti készítmény használata egy olyan gyógyszer előállítására, amit szelektíve lehet irányítani és diagnosztikailag hatékony szinten lehet felhalmozni egy aktivált vaszkuláris hely közelében egy állatban, azaz például emberben.

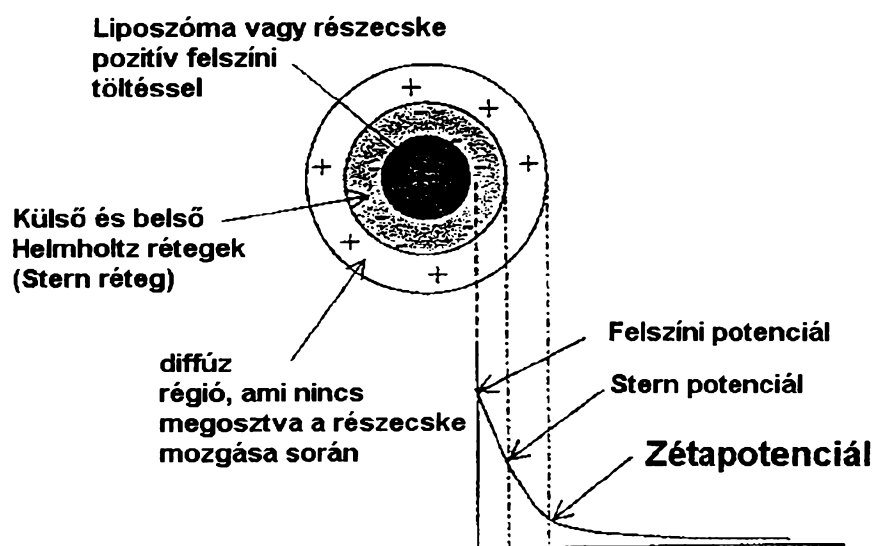
12. Eljárás egy készítmény optimális zéta potenciáljának meghatározására, azzal a céllal, hogy egy specifikus pontba irányítsuk, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

- i) mérjük a készítmény zéta potenciálját, miközben változtatjuk a kationos komponensek koncentrációját;
- ii) a zéta potenciál értékeket ábrázoljuk az y tengelyen, és a kationos komponensek koncentrációját ábrázoljuk az x tengelyen, ezzel hiperbolikus görbét kapunk; és
- iii) meghatározzuk a kationos komponens zéta potenciálját és koncentrációját abban a régióban, amelyikben a hiperbolikus görbének inflexiója van, mivel a hiperbolikus görbe inflexiós pont régiója optimális tartományt jelent a készítmény számára.

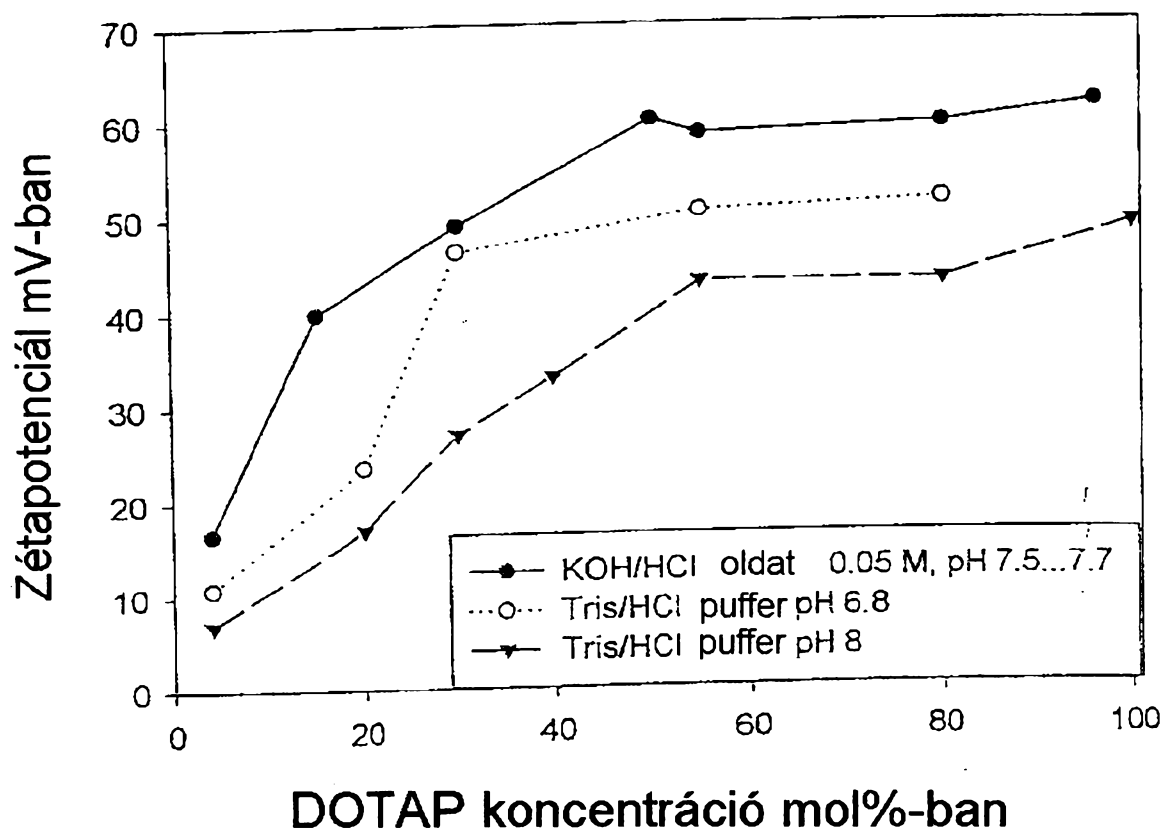
13. Eljárás egy készítmény szelektív irányítására egy állatban, azaz például egy emlősben az angiogenezis egyik helyére, azzal jellemezve, hogy tartalmazza azt a lépést, hogy az állatnak a 7-10. igénypontok bármelyike szerinti készítményt adjuk be, és hagyjuk, hogy a készítmény szelektíve felhalmozódjon hatékony szinten az angiogenezis helyének szomszédságában.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett készítményt az alábbi csoportból választható módon adjuk be: orális beadás, intravénás beadás, transzdermális beadás, szubkután beadás, intraperitoneális beadás, intratumorális beadás, intraarteriális beadás, intramuszkuláris beadás, instilláció és aeroszol beadás.

1. ábra

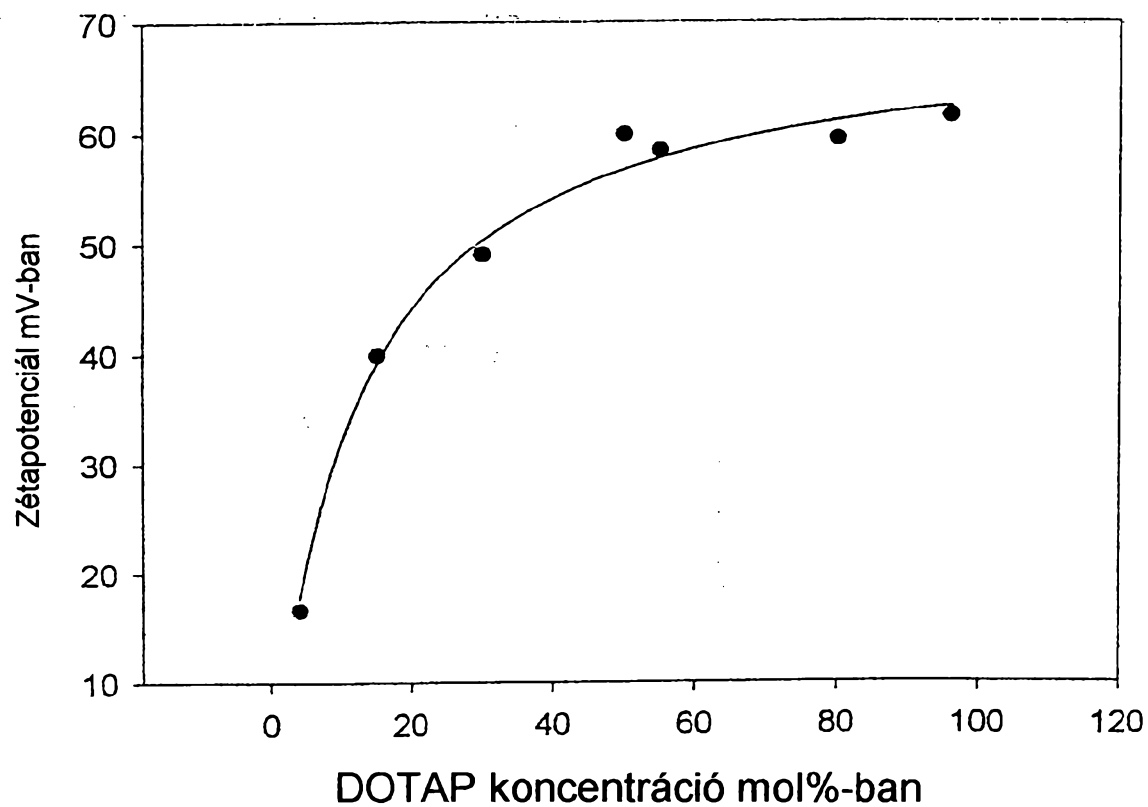


2. ábra



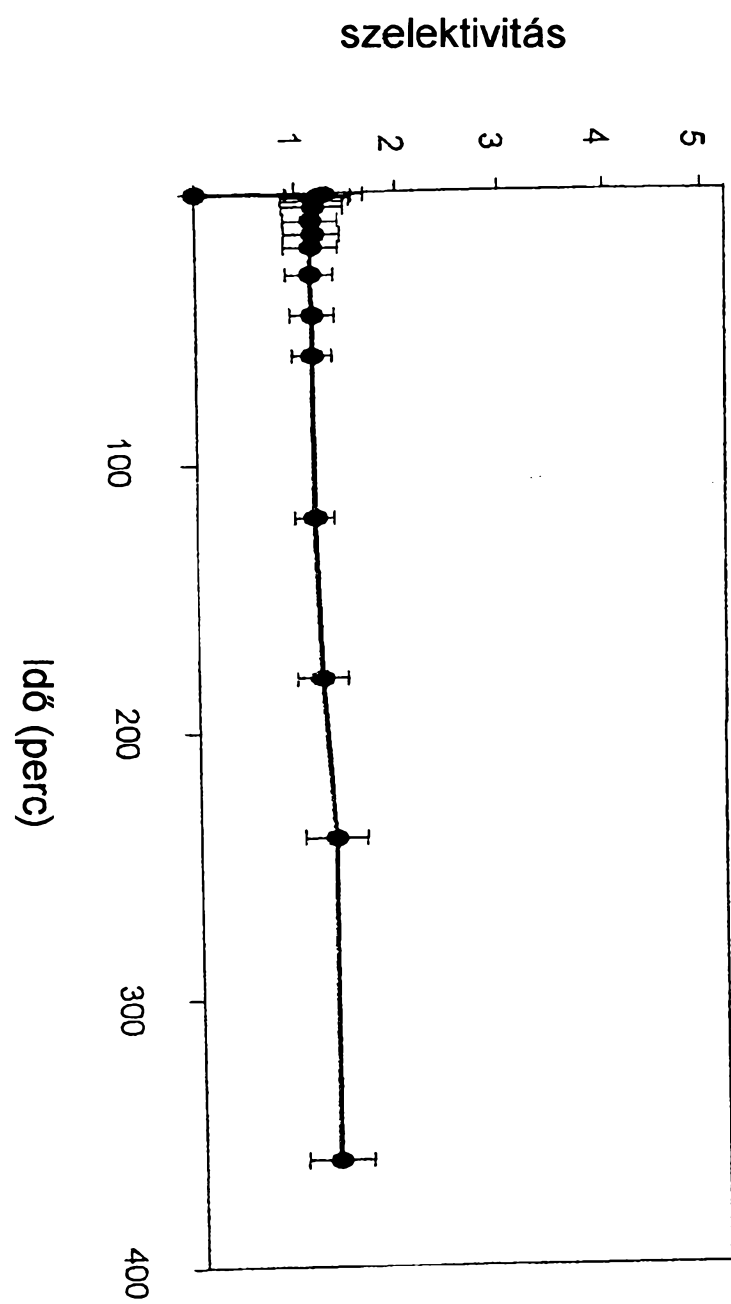
3. ábra

Kationos liposzómák zétopotenciálja



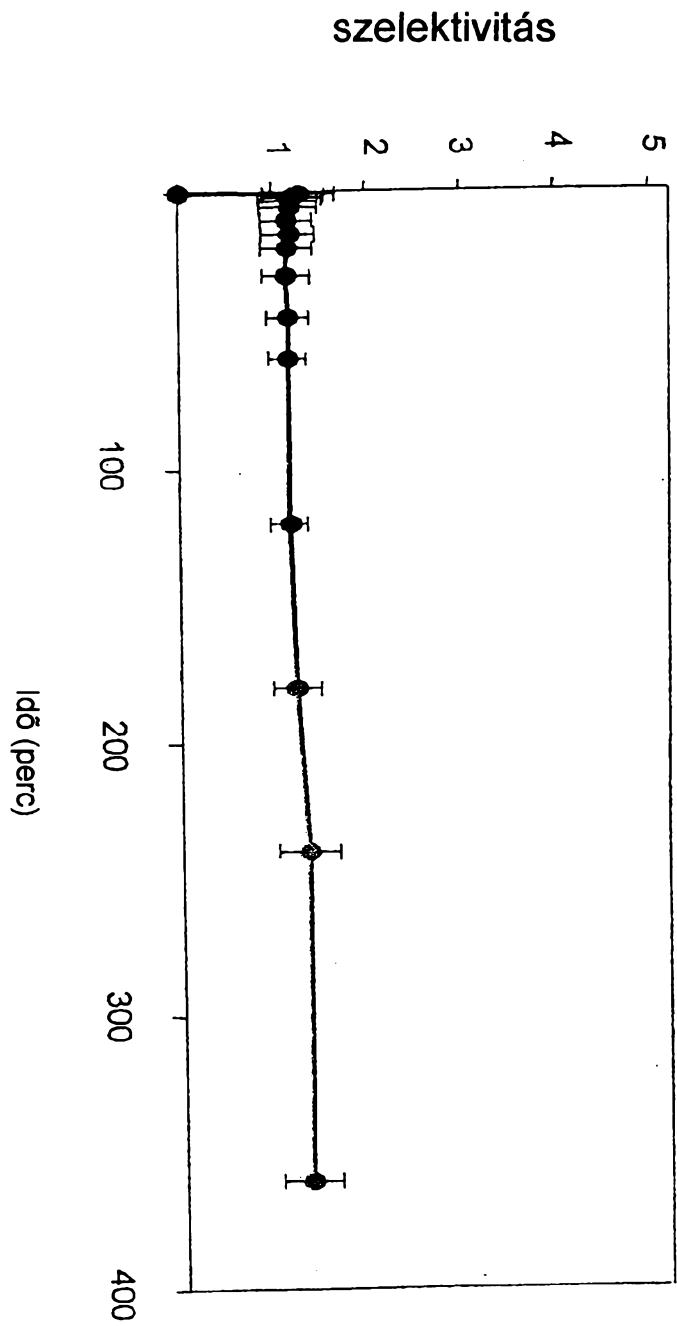
— görbeillesztés $Y = a(1 - e^{-bx})$ $R^2 = 0.985$
● eredeti adatok (0,05 mol KOH/HCL-ben, pH7.5...7.7)

4A. ábra



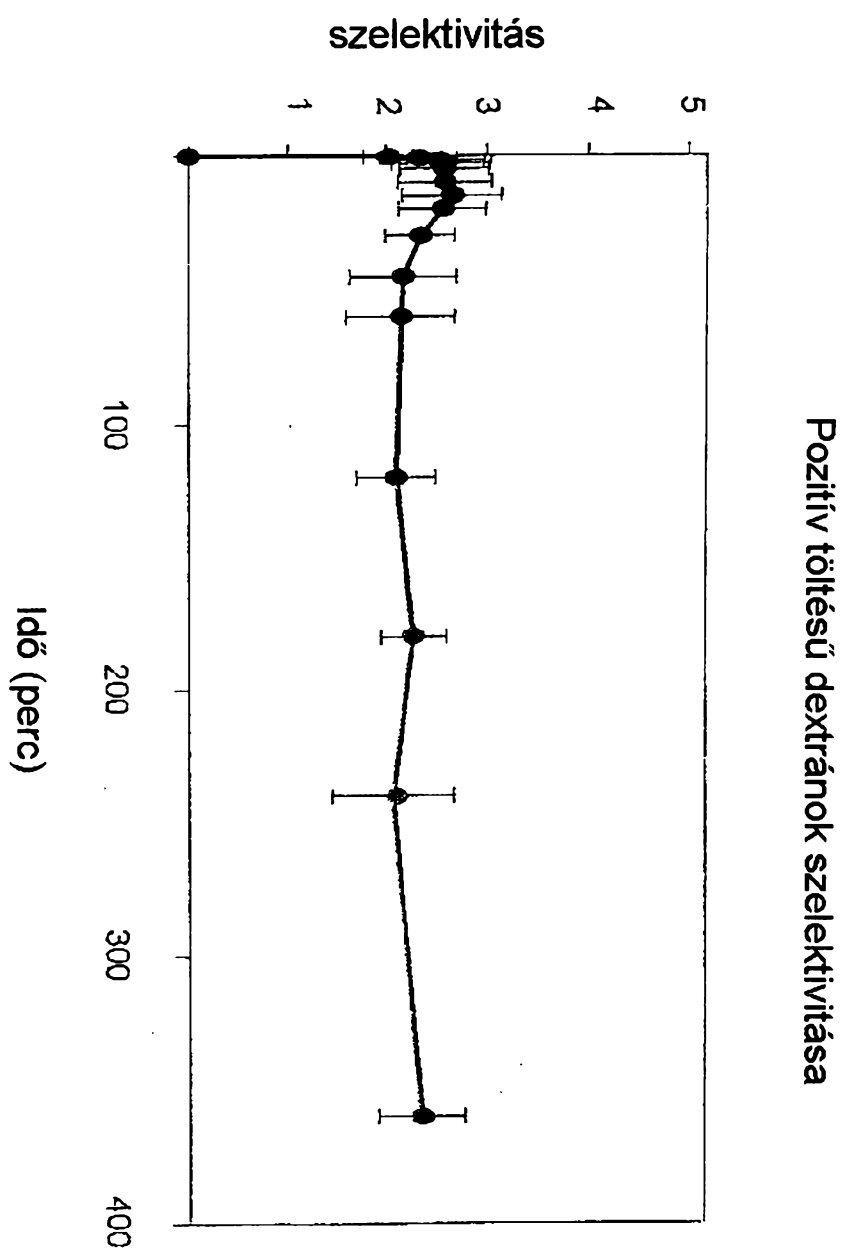
Semleges töltésű dextránok szelektivitása

4B. ábra



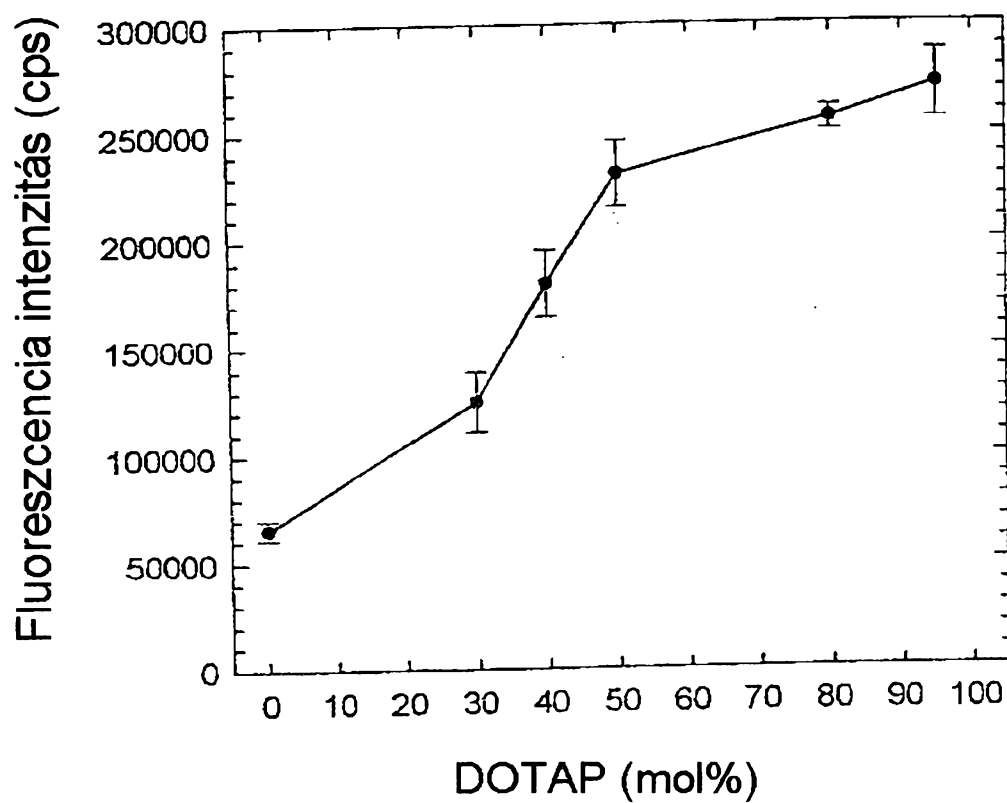
Negatív töltésű dextránok szelektivitása

4C. ábra



5A. ábra

Rhodaminnal jelzett liposzómák felvétele HUVEC-kel



5B. ábra

Rhodaminnal jelzett liposzómák felvétele HUVEC-kel

