



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **312809**

(13) B1

(51) Int Cl⁷ A 61 K 9/127

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19961778	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1994.11.03, PCT/US94/12579
(22) Inng. dag	1996.05.02	(85) Videreføringsdag	1996.05.02
(24) Løpedag	1994.11.03	(30) Prioritet	1993.11.04, US, 147898
(41) Alm. tilgj.	1996.06.25		1993.11.16, US, 152852
(45) Meddelt dato	2002.07.08		1994.01.11, US, 180089

(71) Patenthaver	The Liposome Company Inc, One Research Way, Princeton Forrestal Center, Princeton, NJ 08540-6619, US
(72) Oppfinner	Marc J. Ostro, Pennington, NJ, US Andrew Stuart Janoff, Yardley, PA 19067, US Sharma R Minchey, Monmouth Junction, NJ 08852, US
(74) Fullmektig	Bryns Zacco AS, 0106 Oslo

(54) **Benevnelse** **Fremgangsmåter for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning ved anvendelse av unilamellære liposomale arachidonsyremetabolitt formuleringer samt anvendelse derav**

(56) **Anførte publikasjoner** Ingen

(57) **Sammendrag**

En fremgangsmåte for administrering av en arachidonsyremetabolitt, så som prostaglandin E1 til et dyr er beskrevet. Metabolitten blir gitt til dyret, vanligvis et menneske, sammen med en unilamellær liposom som omfatter et lipid og en frigjørings-inhiberende vandig buffer. Fremgangsmåten kan bli anvendt for å behandle dyr som har fostyrrelser når det gjelder celleaktivering og adhesjon, betennelse eller toksemi.

Foreliggende oppfinnelse er rettet mot en fremgangsmåte for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning som omfatter unilamellære liposomale arachidonsyremetabolitt formuleringer og anvendelse derav.

- 5 De forskjellige prostaglandinene er gruppert i flere kategorier (A-I), som er forskjellige når det gjelder varierende substituenten på 5-karbonringen innført i 20-karbonfettsyreforløperen i løpet av prostaglandinsyntesen. Disse gruppene kan bli ytterligere delt inn basert på antall, og posisjon av dobbeltbindinger i prostaglandinkarbonkjedene. Prostaglandinene antas å virke på deres målceller ved hjelp av cellulære overflatereseptorer.
- 10 Disse reseptorene antas å bli koblet til andre messenger systemer hvorved prostaglandinvirkningen blir formidlet. Prostaglandinene kan innha et bredt spekter av biologiske aktiviteter.

- Enzymene i kroppen kan hurtig deaktivere prostaglandinene. Dette nødvendiggjør hyppige administreringer av høye doser av forbindelsene for å opprettholde terapeutiske effektive nivåer i serum. Dette øker kostnadene ved prostaglandinbehandling og fører til muligheten av uønskede bivirkninger. I det prostaglandindeaktivering oppstår hovedsakelig når blod passerer gjennom lungene blir forbindelsene generelt administrert intraarterielt. Liposomale formuleringer kan forlenge den sirkulatoriske halveringstiden til
- 20 arachidonsyremetabolittene, for eksempel prostaglandiner, og kan være behjelpelig med å unngå deaktivering derav i lungene. Slike liposomale formuleringer kan følgelig vanligvis tilveiebringe terapeutiske alternativer.

- Mizishuma et al. (J. Rheumatol. 14:97 (1987)) og Hoshi et al. (Drugs. Exptl. Clin. Res. 12(8):681 (1986)) beskriver lipidmikrosfærer inneholdende prostaglandin E₁ (PGE₁).
- 25 Som beskrevet i Mizishuma et al. (US-PS 4.493.847) og Imagawa et al. (US-PS 4.684.633) utgjør disse "mikrosfærene" prostaglandin-inneholdende fettemulsjoner som ikke er liposomer, og som har hverken de samme egenskapene, eller samme fordelene, som liposomale arachidonsyremetabolittformuleringer angitt heri. Shell og See (US-PS 4.820.732 og 4.955.878) beskriver behandlinger for redusering av feilfunksjonen i løpet av angioplasti prosedyrer som involverer administrering av prostaglandin-inneholdende sammensetninger til pasientene. Disse sammensetningene inneholder også en bærer. De flytende bærerene som er beskrevet, for eksempel dehydrerte alkoholer og saltvannsoppløsninger kan generelt ikke tilveiebringe forlenget frigjøring av en arachidonsyremetabolitt.
- 35 Fett-belastede mikrosfære bærere som er beskrevet antas å være like store som en rød blodcelle, dvs. minst 7 mikroner i diameter, og kan være mye større. Administrering av så store partikler til dyr kan forårsake vanskeligheter på grunn av at mikrosfærene

kan bli sittende fast og stenge små blodårer, for eksempel lungekapillærer. Liposomene anvendt i foreliggende oppfinnelse har derimot en maksimal størrelse på omtrent 5 mikroner eller mindre, og har fortrinnsvis en størrelse på omtrent 50 nm til omtrent 1 mikron. Disse liposomene kan trygt bli administrert til dyr for terapeutiske formål.

5

Liposomale formuleringer av medikamentene kan ha en forsterket terapeutisk indeks ved å redusere medikamentets toksisitet, øke dets effektivitet eller begge. Liposomale arachidonsyremetabolittformuleringer anvendt ved utførelse av denne oppfinnelsen er nyttige for å lindre eller forhindre sykdommer, forstyrrelser eller tilstander så som toksemiske forstyrrelser, inflammatoriske forstyrrelser og celleaktivering adhesjonsforstyrrelser.

10

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for administrering av en arachidonsyremetabolitt til et dyr og fremgangsmåten omfatter administrering til dyret en sammensetning som omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer og en unilamellær liposom som omfatter metabolitten, et lipid og en frigjørings-inhiberende vandig buffer. Dyret er fortrinnsvis et menneske og administrering omfatter intravenøs administrering.

15

20

Den unilamellære liposomen er en stor unilamellær liposom (LUV), fortrinnsvis en LUV som har en diameter på omtrent 100 nm. Arachidonsyremetabolitten administrert til dyret er et prostaglandin, fortrinnsvis et prostaglandin fra E eller I serien, og mest foretrukket, prostaglandin E₁. Lipidet er fortrinnsvis et mettet acylkjedelipid, mere foretrukket er dipalmitoyl, fosfatidylcholin (DPPC). Bufferen er fortrinnsvis en sitronsyrebuffer, mere foretrukket, en sitronsyrebuffer med en pH på omtrent 4,5.

25

Fremgangsmåten ifølge denne oppfinnelsen kan bli anvendt for å behandle dyr som har forstyrrelser karakterisert ved celleaktivering og adhesjon, betennelse eller toksemi, blant andre indikasjoner. Slike forstyrrelser innbefatter, uten begrensning: reperfusjonsskade, hjerteinfarkt, vaso-okklusiv sykdom, respiratorisk distressyndrom i voksne (ARDS), systemisk inflammatorisk responssyndrom (SIRS), vaskulitis, post-traumatisk sjokk, brannskade, vaso-okklusive forstyrrelser, artrittforstyrrelser, for eksempel gikt, reumatoid arthritis eller filary attires, og autoimmune sykdommer, for eksempel systemisk lupus erytematosus, juvenil diabetes, multippel sklerose eller Hashimotos tyroiditis. Spesielt foretrukne indikasjoner er ARDS og SIRS.

35

Fremgangsmåten omfatter administrering til dyret av en mengde av liposomen som omfatter en anti-forstyrrelse effektiv mengde av arachidonsyremetabolitten. Generelt omfatter den anti-forstyrrelses effektive mengden av metabolitten minst omtrent 10^{-12} g av metabolitten pr kg kroppsvekt til dyret, og utgjør vanligvis fra omtrent 10^{-12} g pr kg til 5 omtrent 10^{-3} g pr kg. Det er ønskelig at den effektive mengden av metabolitten er fra omtrent 10^{-8} g pr kg kroppsvekt til omtrent 10^{-4} g pr kg. Det er mere ønskelig at den effektive mengden av arachidonsyremetabolitten er omtrent 10^{-6} g pr kg kroppsvekt.

Lioposomet anvendt i foreliggende oppfinnelse kan omfatte et tørkebeskyttelsesmiddel, 10 og kan bli dehydrert, lagret og deretter rekonstituert før bruk. Tørkebeskyttelsesmiddelet utgjør fortrinnsvis et saccharid så som maltose, laktose, sukrose, dekstrose, raffinose eller trehalose. Saccharid tørkebeskyttelsesmiddelet er fortrinnsvis maltose.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan omfatte administrering av et ytterligere bioaktivt middel, så som et anti-inflammatorisk eller antimikrobielt middel, til dyret. 15

Foreliggende oppfinnelse omfatter en fremgangsmåte for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for behandling av en sykdom kjennetegnet ved celleaktivering og adhesjon, inflammasjon eller toksemi, kjennetegnet ved at den omfatter formuleringen:

- 20 (a) en farmasøytisk akseptabel bærer; og
- (b) et unilamellært liposom som omfatter:
 - (i) et lipid;
 - (ii) en frigjøringsinhiberende vandig buffer;
 - (iii) en antisykdomseffektiv mengde av en arachidoninsyremetabolitt som er 25 minst omtrent 10^{-12} g av metabolitten pr. kg. kroppsvekt av dyret som skal behandles, hvori nevnte frigjøringsinhiberende buffer øker styrken av metabolittlipidinteraksjoner eller etablerer elektrostatiske repulsjoner med metabolitten.

30 Foreliggende oppfinnelse vedrører også anvendelse av en sammensetning som omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer og et unilamellært liposom som omfatter en arachidoninsyremetabolitt, et lipid og en frigjøringsinhiberende vandig buffer, hvori nevnte frigjøringsinhiberende buffer øker styrken av metabolittlipidinteraksjoner eller etablerer elektrostatiske repulsjoner med metabolitten for fremstilling av en sammensetning for 35 behandling av et dyr som lider av en sykdom kjennetegnet ved celleaktivering og adhesjon, inflammasjon eller toksemi.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Figur 1. Virkningen av LUV-PGE1 på blodplate aggregasjonen. LUV-PGE1 ("C-53"), fremstilt i henhold til fremgangsmåtene angitt i eksempel 1, nedenfor. X-akse: kontroll, 0,1 mikrogram, 0,6 mikrogram, 1,1 mikrogram og 1,1 mikrogram post-administrering LUV-PGE1 pr kg kroppsvekt (mørkskravert: kollagen; lett skravert: U46613). Y-akse: prosent av kontroll.

Figur 2. Hjerterate vs. eksperimentvarighet i behandelnde/kontrollhunder. Fylte firkanter: LUV-PGE1; fylte trekanter: kontroll *: tomme liposomer; fylte diamanter: fri PGE1.

Figur 3. Venstre arterielt trykk vs. eksperimentell varighet. Fylte firkanter: LUV-PGE1; fylte triangler: kontroll; *: tomme liposomer; fylte diamanter; fri PGE1.

Figur 4. Infarktstørrelse som prosent av risikosone. X-akse: LUV-PGE1, fri PGE1, tomme liposomer, kontroll. Y-akse: infarktstørrelse/risikosone (%).

Figur 5. Myeloperoksidase frigjøring fra myokardialvev. X-akse: infarktsone, grensesone, risikoregion, kontrollsone (mørkt skravert: kontroll; skrålinjer; tomme liposomer: rette linjer: fri PGE1; kryss-skraverte: LUV-PGE).

Figur 6. Forhindring av lungeskade etter termisk hudskade med LUV-PGE1 behandling. X-akse: kontroll, brent, brent pluss LUV-PGE1. Y-akse: prosent albuminlekkasje (cpm høyre lunge/cpm blod).

Figur 7. Virkning av tomme liposomer eller fri PGE1 på lungelekkasje i rotter gitt IL-1 intratrachealt. X-akse: saltvannskontroll, IL-1, IL-1 + LUV PGE1, IL-1 + tomme liposomer, IL-1 pluss fri PGE1. Y-akse: lungelekkasje (cpm lunge/cpm blod).

Figur 8. Rotte endotoksemimodell. X-akse: tid (dager) post-LPS administrering; Y-akse: prosent overlevelse i behandlingsgruppen. Fylte firkanter: rotter administrert saltvannskontroll (0 µg/kg LPS); åpne firkanter: rotter administrert 10 µg/kg LPS; fylte diamanter: 15 µg/kg LPS; åpne diamanter: 25 µg/kg LPS; fylte trekanter: 50 µg/kg LPS; åpne triangler: 75 µg/kg LPS; fylte sirkler: 100 µg/kg LPS.

Figur 9. Inhibisjon av sekresjon av human monocytt TNF α og IL-1 β i respons til lipopolysaccharid (LPS). X-akse: fri PGE₁, LUV-PGE₁ (unilamellære liposomer inneholdende

de PGE₁ og fremstilt i henhold til prosedyrene beskrevet i dette eksempelet), placebo LUV (store unilamellære liposomer som ikke inneholder PGE₁), placebo LUV pluss fri PGE₁; y-akse: prosent inhibisjon av TNF α og IL-1 β sekresjon; uskravert: TNF α ; skravert: IL-1 β .

5

Figur 10. Attenuering av LPS-indusert dødelighet. X-akse: tid (dager) post-LPS administrering; y-akse; prosent overlevelse i behandlingsgruppen. Fylte firkanter: saltvannskontroll (LPS ikke administrert); fylte diamanter: LUV-PGE₁; åpne diamanter: placebo LUV pluss fri PGE₁; fylte trekkanter: placebo LUV; åpne triangler: LPS kontroll (ingen liposomer eller PGE₁); åpne firkanter: fri PGE₁.

10

Figur 11. Eliminering av fri PGE₁-indusert dødelighet. X-akse saltvannskontroll (ingen LPS, PGE₁ eller liposomer), LPS kontroll (LPS, men ingen liposomer eller PGE₁), LUV-PGE₁, placebo LUV pluss fri PGE₁, lateks mikrosfærer pluss fr PGE₁, placebo, LUV, lateks mikrosfærer; y-akse: prosent overlevelse i behandlingsgruppen.

15

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for administrering av en arachidonsyremetabolitt til et dyr. Fremgangsmåten omfatter administrering til dyret av en sammensetning som omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer og arachidonsyremetabolitten sammen med en unilamellær liposom. Dyret er fortrinnsvis et menneske og administreringen omfatter intravenøs administrering.

20

"Farmasøytisk akseptabel bærer" som anvendt heri innbefatter hvilke som helst av standardbærere, fortynningsmidler, eksipienter og lignende generelt for anvendelse når det gjelder administrering av bioaktive midler til dyr, spesielt mennesker. Slike bærere er velkjent innenfor fagområdet og blir generelt valgt med hensyn på et antall faktorer, så som det bestemte medikamentet som blir anvendt og administrasjonsveien som er velkjent for fagfolk innenfor dette området, eller som kan bli bestemt uten unødig eksperimentering. Egnede bærere innbefatter, men er ikke begrenset til saltoppløsninger så som fysiologiske saltvann (10 vekt-% av volum natriumklorid i vann), vandige dekstrose oppløsninger, for eksempel D5W (5 vekt-% volum dekstrose i vann), og lignende. Den farmasøytiske sammensetningen kan videre omfatte hjelpemidler så som konserveringsmidler, anti-oksyderingsmidler og lignende i mengder, og som kjent for fagfolk innenfor dette området.

30

35

Liposomer er selv-sammenstillende substrukturer som omfatter en eller flere bilag av amfipatiske lipidmolekyler hvor hvert bilag omgis rundt et vandig rom. Liposomene kan

være unilamellære, det vil si ha et enkelt lipidbilag, eller liposomene kan være multilamellære, dvs. med 2 eller flere lipidbilag. Liposomene ifølge oppfinnelsen er en unilamellær liposom. Liposomen er fortrinnsvis en stor unilamellær liposom (LUV), og fortrinnsvis en LUV med en diameter på omtrent 100 nm.

5

Liposomene kan bli fremstilt ved hjelp av forskjellige teknikker som er velkjente for fagfolk innenfor dette området. Se for eksempel Deamer og Uster, "Liposome Preparation: Methods and Mechanisms", in: Liposomes (M. Ostro, ed), Marcel Dekker (New York), s. 27-51 (1983); Cullis et al., in: Liposomes, From Biophysics to Therapeutics (M.J. Ostro, ed.), Marcel Dekker, s. 39-72 (1987)). Bangham's procedure (J. Mol. Biol. 13:238 (1965)) produserer ordinære multilamellære vesikler (MLV), dvs. liposomer med to eller flere lipidbilag, og involverer oppløsning av en eller flere amfile lipider i en eller flere organiske oppløsningsmidler. Lipidene blir deretter tørket, og de tørkede lipidene blir rehydrert med en vandig oppløsning for å danne MLV. Lenk et al. (US-PS 4.522.803, 5.030.453 og 5.169.637). Fountain et al (US-PS 4.588.578) og Cullis et al. (US-OS 4.975.282) beskriver fremgangsmåter for fremstilling av multilamellære liposomer som har et oppløst stoff innesluttet i deres vandige rom, i det konsentrasjonen av det oppløste produktet i hvert av rommene er vesentlig likt. Unilamellære liposomer kan bli dannet ved eter eller etanolinjeksjon eller infusjonsmetoder. Unilamellære liposomer kan bli produsert fra multilamellæreliposomer ved ekstrusjon av multilamellære liposomer, under trykk, gjennom filtere med definerte porestørrelser som beskrevet av Cullis et al. (US-PS 4.975.282) og Loughrey et al. (US-PS 5.059.421). Ekstrusjon, samt prosedyrer som homogenisering, møllesonikering og French Press anvendelse kan bli anvendt for å redusere liposomstørrelsen som kan bli bestemt ved hjelp av prosedyrer som fri-fraktur elektronmikroskopiske undersøkelser av liposomen, samt kvasi-elektrisk lysspredning.

"Arachidonsyre metabolitter" er prostaglandiner, eller forbindelsene kan bli omdannet til prostaglandiner, for eksempel kunstig eller i kroppen til dyret. Prostaglandiner er en gruppe på 20-karbonfettsyrer inneholdende en 5-karbin ring, pluss syv- og åtte-karbonkjeder, som er dannet fra arachidonsyre og andre 20-karbon fettsyrer med minst tre dobbeltbindinger (for eksempel "essensielle" fettsyrer 8,11,14-eikosatrenoisk syre, 5,8,11,14-eikosatetraenoisk syre; se for eksempel Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, supra). Arachidonsyre er det mest av av disse 20-karbonprostaglandin forløperene i mennesker.

35

20-karbon vesentlig fettsyreprostaglandinforløpere, mellomprodukter dannet i løpet av prostaglandinsyntesen, for eksempel prostanoisk syre, og strukturelle analoger som kan bli omdannet til disse forbindelsene, er "arachidonsyremetabolitter". "Prostaglandin-relaterte forbindelser", for eksempel leukotriener, tromboksaner, lipoksiner og prostacyk-
 5 liner, innbefatter forbindelser som er funksjonelt relaterte til prostaglandiner og som også kan bli oppnådd fra 20-karbon essensielle fettsyreprostaglandinforløpere. Prostaglandiner, prostaglandin-relaterte forbindelser og eikosanoider, samt strukturelle analoger som kan bli omdannet til slike forbindelser, utgjør også "arachidinsyre metabolitter". Arachidonsyre metabolitten administrert til dyr i henhold til foreliggende oppfin-
 10 nelse er et prostaglandin, fortrinnsvis et E eller I serie prostaglandin, og fortrinnsvis prostaglandin E₁.

"Assosiasjon" av en arachidonsyremetabolitt med en liposom betyr generelt at metabolitten er innesluttet i liposomets vandige rom, eller er assosiert med det indre eller ytre
 15 monolaget til liposomets bilag, for eksempel ved hjelp av elektrostatiske interaksjoner mellom metabolitten og hodegruppene til monolagets komponent amfipatiske lipider. En foretrukket fremgangsmåte for dannelse av unilamelære liposomale formuleringer ifølge oppfinnelsen er assosiasjon av metabolitten med lipidet i etanol i likhet med teknikken til Batzri et al., Biochem. et Biophys. Acta., 198:1015 (1973) ved anvendelse av
 20 en transmembran konsentrasjonsgradient som beskrevet i Bally et al. (US-PS 5.077.056). I denne teknikken blir lipid og prostaglandin oppløst sammen i et vandig-blandbart organisk oppløsningsmiddel så som etanol og deretter sakte tilsatt til en første vandig oppløsning. Eventuelt kan et konserveringsmiddel så som butylert hydroksytoluen (BHT) bli blandet sammen med lipidet i oppløsningen.

25 Den resulterende liposom dispersjonen kan bli redusert i størrelse i en mere homogen populasjon, for eksempel ved ekstrusjon gjennom et filter, fortrinnsvis med 100 nm porøstørrelse, i det filteret har enten rett stykke eller vridd stykke. Et foretrukket filter for anvendelse i denne prosessen er en aluminoumoksyd porøs film så som AnoporeTM
 30 filtre dannet av Anotec Separations. En slik populasjon av liposomer kan bli dannet ved ekstrusjonsprosedyrene ifølge US-PS 5.008.050. Slike ekstrusjonsprosedyrer hvor liposomene blir sendt gjennom et filter under trykk muliggjør dannelsen av homogene populasjoner av liposomer med hensyn på størrelse. Når liposomene blir sendt mer enn en gang gjennom filteret, vil antall passeringer som er nødvendige bli bestemt ut fra det
 35 som er nødvendig for å oppnå den ønskede liposomstørrelsen.

Filterstørrelsene som anvendes blir valgt ifølge den ønskede størrelsen på det endelige liposomproduktet. I foreliggende oppfinnelse er liposomer med en gjennomsnittlig diameter på mindre enn omtrent 200 nm foretrukket. Den individuelle liposomen anvendt i foreliggende oppfinnelse er fortrinnsvis mindre enn omtrent 500 nmi diameter. Liposomen har fortrinnsvis en diameter på omtrent 100 nm, i det liposomer med denne størrelsen generelt er kjent for å passere gjennom kapillærsjiktet til lungene og kan derfor passere gjennom til andre organer og vev. Et filter som har en porestørrelse på omtrent 100 nm blir fortrinnsvis valgt for anvendelse i ekstrusjonstrinnet. Størrelses-reduerte liposomer kan også bli sterilfiltrerte, så som ved passering gjennom et 220 nm Millipak filter (Millipore, Inc., Bedford, MA).

Den unilamellære liposomen anvendt i fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen omfatter metabolitt, et lipid og en frigjørings-inhiberende vandig buffer. Lipidet øker fortrinnsvis styrken til metabolitt-lipid interaksjonene og inhiberer følgelig frigjøring av metabolitten fra liposomen. Slike lipider er "frigjørings-inhiberende lipider". Lipidbaserte faktorer som øker styrken til prostaglandin-lipid interaksjonene innbefatter, men er ikke begrenset til, faktorer som gjør lipidbilagene mindre permeable for vann og andre små molekyler, for eksempel faktorer som øker Van der Waals, dipol-dipol og andre interaksjoner mellom acylkjedene og følgelig gjør at acylkjedene blir pakket nærmere sammen i bilaget. Antall dobbeltbindinger i bilagenes acylkjeder kan for eksempel påvirke kjedens arrangement med hensyn til hverandre i bilaget. Desto lavere antall dobbeltbindinger, desto nærmere blir acylkjedene pakket sammen, og følgelig presenterer en barriere overfor et prostaglandin som går gjennom bilaget. Foretrukne lipider har følgelig mettede acylkjeder. Foretrukket lipid med mettede acylkjeder er dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC). Andre lipider med mettet kjede kan også bli anvendt.

Vandige buffere i liposomer kan også inhibere eller forhindre frigjøringen av en arachidonsyre-metabolitt assosiert med en liposom. Slike vandige buffere er "frigjørings-inhiberende vandige buffere". Karaktertrekkene til foretrukne frigjørings-inhiberende buffere innbefatter, men er ikke begrenset til, evnen til å etablere elektrostatiske frastøtninger med metabolittene eller for å forsterke metabolitt-lipid interaksjonene. Buffere med en høyere buffringkapasitet og følgelig en større evne til å opprettholde ønsket pH vil bli bedre frigjørings-inhiberende buffere. Foretrukne frigjørings-inhiberende buffere er sitronsyrebuffere, spesielt sitronsyrebuffere som har en pH på omtrent 4,5.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan bli anvendt for å administrere en arachidonsyre-metabolitt til et dyr påvirket av en forstyrrelse kjennetegnet ved celleaktivering og ad-

hesjon, betennelse og/eller toksemi, blant andre indikasjoner. Fremgangsmåten omfatter administrering til dyret av en mengde av liposomen som omfatter en anti-forstyrrelses-effektiv mengde av metabolitten. Forstyrrelsene som kan bli behandlet i henhold til foreliggende oppfinnelse innbefatter, uten begrensning: reperfusjonsskade, systemisk inflammatorisk responssyndrom (SIRS), respiratorisk distress syndrom i voksne (ARDS), hjerteinfarkt, vaskulitis, brannskade, post-traumatisk sjokk, vaso-okklusive forstyrrelser, arthrit forstyrrelser, så som rheumatoid arthrit, gout og filary arthrit, og autoimmune forstyrrelser så som systemisk lupus erytematosus, juvenile diabetes, multippel sklerose og Hashimotos thyriudit.

10

Visse forstyrrelser er kjennetegnet ved unormal aktivering av celler, for eksempel blodplater og neutrofiler, i blodet, og ved påfølgende adhesjon av disse cellene til hverandre eller til aktiverte celler i det omgivende vaskulære endothelet. Slik celleaktivering og adhesjonsforstyrrelser er et betydelig problem innen mange forskjellige medisinske patologiske områder. Endothelceller, for eksempel vaskulære, plurale, perikardiale eller abominale endothelceller, kan bli aktivert av cytokiner, for eksempel interleukin-1 (IL-1), tumornekrosefaktor-alfa (TNF-alfa) eller bakterielle endotoksiner. På samme måte kan blodceller, spesielt neutrofiler og blodplater bli aktivert av midler så som GM-CSF, bakterielle endotoksiner, bakterielle kjemo tiltrekkende midler, TNF-alfa og C5a komponenten til komplement.

20

Aktiverte celler har addisjons seter på deres overflater hvorved de kan adherere til hverandre. Aktiverte og adhererte celler kan danne klumper som kan tilstoppe små blodårer som de som finnes i lunger og hjerte, og kan dermed redusere blodstrømningen til omgivende vev. De aktiverte cellene kan også adherere til aktiverte vaskulære endothelceller; og slik adhesjon kan føre til påfølgende degranulering av vaskulært endothel, eller til frigjøring av mediatorer for celledskade, så som superoksidanion (O_2^-) og proteolytiske enzymer.

25

Blant celleaktiverings- og adhesjonsforstyrrelser som foreliggende oppfinnelse er rettet mot er reperfusjonsforstyrrelser, som de som er relatert til reperfusjon av okkluderte blodårer, eller tilfeldig ved kirurgi hvor blodstrømmen temporært er stoppet (se for eksempel Seewaldr-Becker et al., "Effect of Anti-Adhesive Antibodies on Reperfusion injury", (Springer et al., eds.) i: Leukocyte Adhesion Molecules: Springer-Verlag, New York (1990), s. 138-148; og "Adhesion in Disease and Therapy", (Springer et al., eds.) i: Leukocyte Adhesion Molecules, Springer-Verlag, New York (1990), s. 85-156). Når det er en blokkering i en blodåre kan omgivene endotelceller, samt nedstrøms ischemisk

30

35

vev, bli skadet. Det kan til og med bli ytterligere skade på nærliggende endotelceller når okklusjonen blir fjernet. Slike skadede celler kan igjen indusere aktivering i neutrofiler og blodplater etter gjenopprettelse av blodstrømmen til de påvirkede områdene.

- 5 De samme cellene som blir aktivert og deretter gjennomgår intracellulær adhesjon kan også ha overflatereseptorer for arachidonsyremetabolitter. Uten å være begrenset til noen teori er det antatt at behandling med arachidonsyremetabolitter, ved binding til disse reseptorene, kan redusere celleaktiveringen og adhesjonsforstyrrelses-assosiert skade ved deaktivering av celleoverflate reseptorene ansvarlig for de forhøyede nivåene
10 av den intercellulære adhesjonen.

- PGE₁ og PGE₁₂ har blitt funnet å (se, Jugdutt et al., "Dissimilacts of Prostacyclin, Prostaglandin E Prostaglandin Myocardial Infarct ze after Coronarusion in Conscious", Circulation CH, 49(3):685-700 981) ha "scant"-effekt når det gjelder å redusere infarkt-
15 størrelsen hos hunder som ble reperfusert etter stimulering av et hjerteinfarkt ved passer- ing av en okkluderingslynge rundt en koronararterie i rapporterte tester ble prostaglan- din administrert via kontinuerlig arteriell infusjon over en 6 timer lang periode og resul- terte i administrering av en relativt stor medikament dose. Behovet for denne kontinuer- lige infusjonen antas å være at fri, dvs. ikke-liposomale prostaglandiner så som PGE₁
20 har en ekstrem kort halveringstid in vivo, og må bli kontinuerlig tilført for å oppretthol- de et effektivt blodnivå. Det antas videre at prostaglandin blir hurtig inaktivert når blo- det passerer gjennom lungene som nødvendiggjør arteriell infusjon i stedet for en enkle- re intravenøs administrering. Distribusjon av høye nivåer PGE₁ in vivo er kjent for å indusere systemiske effekter så som hyptensjon, tachykardia og diarrè.

- 25 Når pasienter blir utsatt for påkjenninger som kan føre til ARDS, så som traumer, brann- sår, sepsis, aspirasjon og hyperoksi, kan mange organer i kroppen andre enn lunger bli påvirket. Årsakene og kliniske forløp til denne tilstanden kan variere meget. For eksem- pel når det gjeldet et tilfelle hvor en pasient med alvorlig infeksjon hvor endotoksin blir
30 frigjort fra de bakterielle celleveggene blir betennelseskaskaden initiert og fører til sept- isk sjokk. Igjen på grunn av at sepsis/traumesyndrom ikke er begrenset i årsak til infek- sjoner er det mulig at endotoksin ikke er involvert, men til tross for dette blir frigjøring av faktorer så som TNF, IL-1 komplement og leukotriener utløst.

- 35 Angioplasti er en teknikk hvorved en ballong blir satt inn i en okkludert arterie og opp- blåst for å åpne blokkerte blodårer. Til tross for at denne teknikken har blitt rutinemes- sig ved behandling av koronar arterie sykdom i 6 måneder etter denne prosedyren opp-

lever over 33% av de behandlede pasientene restenose, eller reokklusjon av tidligere åpnete blodårer. Det antas at denne tilstanden begynner med skade på vaskulært endotel som ofte er et resultat av ballongprosedyren. Den eksponerte ekstracellulære matrisen vil hurtig bli bundet til flere lag av aktiverte blodplater. Når blodplatene blir bundet
5 vil de frigjøre forskjellige vekstfaktorer som vil resultere i proliferasjon av glatte muskelceller som ligger under åren til det punkt hvor åren blir reokkludert. Ved å forhindre blodplater fra å bli bundet til den ekstracellulære matrisen kan man ødelegge kaskaden av heneldser som resulterer i restenose. Akutt administrering ved tidspunkt for angioplasti prosedyren av et medikament som forhindrer blodplateadhesjon kan forhindre
10 re restenose.

Nylig har De Servi et al, European Heart Journal, "Prostaglandin E administration in unstable angina patients undergoing PTCA; preliminary results", august 1990, publisert resultatene fra et klinisk forsøk i pasienter med ustabil angina som ble gitt en intrakoronar infusjon av PGE₁ før og etter angioplasti. Medikamentet ble infusert over en 24-timer periode. Resultatene av denne studien viste at restenoseraten 6 måneder etter angioplasti i PGE₁-behandlet gruppe ble redusert med omtrent 50% i forhold til den ubehandlede kontrollgruppen, til tross for at behandling med PGE₁ bare varte i 24 timer.
20

Akutt myokardial infarkt (vanligvis angitt som hjerteinfarkt) refererer til en blokkering av blodtilførselen i musklene i hjertet og er vanligvis forårsaket av en blodkoagel. Der- som blodet blir forhindret fra å nå hjertet i for lang tid vil pasienten dø. Når en okklusjon av koronar arterien oppstår blir pasienten enten behandlet med et fibrinolytisk middel, så som vevsplasminogenaktivator (tPA) eller streptokinase, for å oppløse koagelen,
25 eller blokkeringen kan oppløse seg selv. I begge tilfeller blir blodstrømningen gjenopptatt til ischemisk (oksygen-tappet) region av hjertet. Denne gjenstrømningen av blod inn i hjertet blir kalt reperfusjon. Fordi reperfusjon er nødvendig for å redde pasientens liv forårsaker det ytterligere skade på hjertemuskelen betegnet reperfusjonsskade. Reperfusjonsskade er kjent for å være sluttresultatet av den inflammatoriske kaskaden.
30

I tillegg til problemet med reperfusjonsskade etter koagelfjerning kan pasienter som lider av hjerteinfarkt lide av andre sekundære problemer. Etter at den normale blodstrømningen blir gjenopprettet til hjertet blir både neutrofiler og blodplater aktivert. Aktiverte blodplater adhererer ofte til hverandre og begynner å reokkludere koronararterien som resulterer i en situasjon hvor raten av blodstrømningen til hjertet reduseres over tid.
35 I noen tilfeller vil fullstendig reokklusjon oppstå. PGE₁ forhindrer i tillegg til å forhindre

re neutrofil binding til endotelceller, blodplateaggregasjon og reduserer, om ikke eliminerer, den manglende tilbakestrømningen.

Sharma et al., The American Journal of Cardiology, "Intracoronary Prostaglandin E₁ Plus Streptokinase in Acute Myocardial Infarction", s 1161, desember 1998, vol. 58, har vist i et klinisk oppsett med akutt hjerteinfarkt at administrering av fri PGE₁ ved sakte intrakoronar infusjon sammen med intrakoronar streptokinase tilveiebringer positive kliniske resultater når sammenlignet med en kontrollgruppe med intrakoronar streptokinase alene. Resultatene viste redusert reperfusjonstid, redusert nødvendig streptokinasedose, øket prosentandel blodårer opprettet etter 10 dager og høyere ejeksjonsfraksjoner. Ulempen med studien er at medikamentet må bli gitt ved sakte intrakoronar infusjon som er arbeidskrevende og krever spesialiserte fasiliteter og trenet personale. Denne metoden krever også nøye titrering av PGE₁ dosen slik at signifikante fall i blodtrykket fremkommer.

Inflammasjon er en prosess med cytologiske og histologiske reaksjoner som oppstår i påvirkede blodårer, og omgivende vev, i respons til en skade se for eksempel Stedman's Medical Dictionary (illustrated) (24th edition, J.V. Basmajian et al., eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, MD (1982) s.707-708). Inflammatoriske responser til slike stimuli innbefatter lokale reaksjoner og resulterende morfologiske forandringer, destruksjon eller fjerning av skadede materialer og aktivering av repareringsmekanismer. Inflammasjon kan følgelig være en del av prosessen hvorved dyret leger seg selv.

Inflammasjon kan også oppstå i respons til unormale fysiologiske stimuli og kan forårsake problemer i kroppen. Ledd blir for eksempel betente når det gjelder arthrit tilstander så som gout, filary arthritis, rheumatoid arthrit og Lyme sykdom (se for eksempel Stedman's Medical Dictionary (illustrated), supra at s. 123-124). Disse tilstandene kan være karakterisert av ekstravasasjon av celler, dvs. vandring av celler fra sirkulasjonen og inn i det betente området. Midler, så som prostaglandiner, som kan inhibere slik ekstravasasjon, eller som ellers kan inhibere inflammatoriske responser overfor unormale fysiologiske stimuli, kan bli anvendt for å lindre betennelsen.

Toksemi i kliniske manifestasjoner observert i løpet av infeksjonsforløpet til infeksjøs midler, for eksempel mikrober, som inneholder toksiner og andre forbindelser som er giftige for vertsdyret. For eksempel blir det i løpet av infeksjonene med visse gram-negative bakterier så som E. coli, et lipopolysaccharid (LPS) frigjort fra celleveggen når det blir brutt ned. LPS kan deretter indusere celledød i vertsdyret. Toksemiske tilstander

oppstår i dyr hvor toksiner så som LPS er blitt gjort tilgjengelige, dvs. i septiske tilstander, eller tilstander med systemisk sykdom forårsaket av formering av mikroorganismer i sirkulasjon (se for eksempel Stedman's Medical Dictionary (illustrated), supra at s. 1274-1275 og 1464). Toksemi kan også være et resultat av eksponering av dyret overfor

5 traumatiske stimuli, for eksempel fysiologiske eller kjemiske traumer.

"Auto-immune forstyrrelser", så som systemisk lupus erythematosus, juvenile diabetes, multippel sklerose og Hashimotos tyroiditis, er kjennetegnet ved at dyrets immunsystem angriper egne vev.

10 "Anti-forstyrrelseeffektive" mengder av en arachidonsyremetabolitt eller hvilke som helst mengder effektive for å lindre, inhibere eller forhindre celleaktivering og adhesjon, betennelse, toksemi eller andre indikasjoner assosiert med forstyrrelsen som blir behandlet ifølge foreliggende oppfinnelse. Den effektive mengden av metabolitten omfatter

15 fortrinnsvis minst omtrent 10^{-12} g av metabolitt pr kg kroppsvekt til dyret, og fortrinnsvis fra omtrent 10^{-12} g kg til omtrent 10^{-3} g/kg. Det er mest ønskelig at den effektive mengden av metabolitten omfatter fra omtrent 10^{-8} g pr kg kroppsvekt til omtrent 10^{-4} g pr kg. Det er mest ønskelig at den effektive mengden omfatter omtrent 10^{-6} g arachidonsyremetabolitt pr kg kroppsvekt til dyret.

20 En betydelig lavere dosering av den liposomale metabolitten, sammenlignet med en dosering av fri metabolitt, er nødvendig for å oppnå ønsket effekt. Som angitt ovenfor, på grunn av hurtig metabolisme av frie prostaglandiner in vivo, har lange kontinuerlige infusjoner av relativt store doser av disse medikamentene vært nødvendig for å opprettholde et effektivt blodnivå i pasienten som blir behandlet. Hypotensjon, tachykardia og

25 diaré forårsaket av høye blodnivåer av prostaglandiner begrenser mengdene av frie prostaglandiner som kan bli administrert. De høye kostnadene til prostaglandiner gjør at det er meget dyrt å administrere slike store doser. Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse tilveiebringer effektiv administrering av arachidonsyremetabolitter ved reduserte

30 te kostnader og med reduserte bivirkninger.

Arachidonsyremetabolitten, for eksempel prostaglandin, behandling kan redusere skaden i dyr som er påvirket med forstyrrelser kjennetegnet ved celleaktivering og adhesjon, toksemi, betennelse og andre indikasjoner. I noen celler som har reseptorer for

35 cellulære aktiveringsmidler kan også ha overflatereseptorer for metabolittene. Det antas at når metabolittene blir bundet til deres reseptorer kan de deaktivere overflatereseptorene ansvarlige for de forhøyede nivåene av intercellulær adhesjon. Mekanismen for den-

ne deaktiveringen antas å være en protein kinase A-formidlet økning i intracellulære cAMP nivåer dannet av metabolitt/reseptor interaksjonen. Uten celle-cellebinding, kofaktorer så som O_2 - og forskjellige degradative enzymer kan ikke bli frigjort, og vevsskade blir forhindret.

5

PGE₁ er blitt vist å være en potent inhibitor av både neutrofil og blodplateaggregasjon, samt binding av disse cellene til aktiverte vaskulære endotelceller. Arachidonsyre metabolitter så som PGE₁ antas også å ha evnen til å både forhindre betennelse, og å stoppe denne når den er begynt. Det er blitt oppdaget at ekstracellulær frigjøring av neutrofiler
10 til mediatorer for betennelse kan bli modulert ved forhøyning eller deplesjon av intracellulære lagre av cyklisk adenosinmonofosfat (cAMP).

Det er blitt oppdaget at ekstracellulær frigjøring av neutrofilene til mediatorer for betennelse kan bli modulert ved forhøyning eller tapping av ekstracellulære lagre av syklisk
15 adenosin monofosfat (cAMP) og cyklisk guanosinmonofosfat (cGMP). Forhøyning av cAMP reduserer frigjøringen av mediatorer for betennelse, mens økninger i nivåer av cGMP forsterker utskillelse av mediatorene. cAMP blir noen ganger referert til som "universell bryter" på grunn av at økende intracellulære nivåer av cAMP kan stoppe betennelsen uansett faktoren som opprinnelig satte den i gang. Noen prostaglandiner så
20 som PGE₁ forhøyer cAMP og tilveiebringer følgelig hensikten for anvendelse av PGE₁ som et anti-inflammatorisk middel. PGE₁ kan tenkes som et middel som kan aktivere den universale avbrytelsen. Det er blitt vist in vitro at PGE₁ inhiberer bindingen av neutrofiler og blodplater til seg selv, samt til endotelceller, ved å forhindre aktivering av reseptorer nødvendige for å formidle celle-celle adhesjonen. Denne inhibisjonen er i
25 samsvar med forhøyning av intracellulært cAMP. Uten celle-celle binding kan kofaktorene så som O_2 - og forskjellige degradative enzymer ikke bli frigjort, og vevsskade blir følgelig eliminert. PGE₁ virker følgelig som et potent anti-inflammatorisk middel. Det kan både forhindre betennelse og stoppe dette uansett om den formidlende faktoren er IL-1, TNF, komplement, leukotriener eller andre.

30

Liposomer kan være spesielt fordelaktige bærere for levering av prostaglandiner til deres antatte virkningssteder. Uten å være bundet av noen spesiell teori eller mekanisme er det antatt at liposomene blir tiltrukket til de aktiverte cellene og adhererer til de aktiverte overflatene. Prostaglandin er deretter lett tilgjengelig ved skadestedet for å levere dets
35 anti-celle-celle adhesjonsvirkning. En teori for tiltrekking av liposomer til adhesjonsaktive celler er at liposomene er opsonisert ved fibronektin og vitronektin i blodet. Opsoneering er prosessen hvorved bakterier blir endret slik at de blir lettere og mere effektivt

innesluttet av fagocytter. Oponiserte liposomer blir lettere tiltrukket til aktiverte neutrofiler som uttrykker reseptorer for fibronektin og vitronektin for derved å levere assosiert prostaglandin til påvirkede seter.

- 5 Liposomale arachidonsyremetabolittformuleringer hvor metabolitten er assosiert med liposomen ved en pH gradient over liposomens lipidbilag kan være terapeutisk nyttig. Liposomale formuleringer som har en indre syrevandig buffer, så som en sitronsyrebuffer, spesielt en pH 4,5 sitronsyrebuffer, er foretrukket for etablering av tranbilag pH gradienter. Arachidonsyremetabolitter assosiert med liposomene ved slike gradienter forblir
10 assosiert med liposomen når pH gradienten blir opprettholdt. Når gradienten blir redusert i kroppen til dyrene hvortil det er blitt administrert liposom, og indre pH følgelig øker, blir arachidonsyremetabolitten generelt uassosiert med liposomen. Det er da mere sannsynlig at metabolitten, enn når den er assosiert med en liposom, har evne til å reagere med de tilsvarende overflate reseptorene på cellene, så som neutrofiler, som blir aktive
15 og som deretter gjennomgår intercellulær adhesjon.

- Unilamellæreliposomer anvendt i henhold til utførelsen av denne oppfinnelsen kan omfatte et tørkebeskyttelsesmiddel, som er generelt en hydrofil forbindelse, så som saccharid, urea, dekstran, albumin eller polyvinylalkohol, som har evne til å forhindre rear-
20 rangering av lipidene i liposomene, slik at når liposomene er rekonstituert etter dehydrering blir en vesentlig del av innholdet som opprinnelig er innesluttet i liposomene igjen deri. Tørkebeskyttelsesmidler er generelt sterke hydrogenbindingsakseptorer, og har vanligvis stereokjemiske trekk som er gunstige for å bevare det intramolekylære rommet til bilagsbestanddelene. Saccharider, så som mannose, galaktose, trehalose, raffinose,
25 maltose, sukrose, laktose eller dekstrose er foretrukne tørkebeskyttelsesmidler. Maltose er spesielt foretrukket.

- Saccharider blir vanligvis anvendt som tørkebeskyttelsesmidler i konsentrasjoner på fra omtrent 5 til omtrent 20%, fortrinnsvis med omtrent 10 vekt-% av vandig fase anvendt
30 for å danne liposomene. Mannitol kan bli anvendt sammen med hvilke som helst av saccharidene, men det er overraskende blitt oppdaget at når den blir anvendt alene opprettholder mannitol ikke liposomstørrelsen. Mannitol kan bli anvendt sammen med saccharidene i omtrent en 0-2% konsentrasjon, fortrinnsvis en 1% konsentrasjon. Den totale konsentrasjonen av saccharid som blir anvendt varierer fra omtrent 5% til omtrent
35 20%, fortrinnsvis 10% til 12%, mest foretrukket er omtrent 10%. Ytterligere konserveringsmidler så som BHT eller EDTA i formuleringer ved for eksempel 5 mg BHT pr ml etanol, og for eksempel 0,01% EDTA i 10% dekstrose kan også bli innbefattet.

Liposomal dehydrering muliggjør at liposomene blir lagret i lengre tidsperioder. De kan deretter bli gjenopprettet etter behov for administrering til individer. Dehydreringen blir fortrinnsvis utført ved anvendelse av et tørkebeskyttelsesmiddel i sammenheng med liposomene, i henhold til prosedyren til Schneider et al. (US-PS 4.229.360) og Janoff et al., (US-PS 4.880.635); innholdet er innkorporert heri som referanse). Alternativt kan tørkebeskyttelsesmiddelet bli utelatt dersom dehydreringen blir utført uten forhåndstørking og tilstrekkelig vann blir igjen i det liposomale preparatet for å opprettholde integriteten til en vesentlig del av liposomale bilag gjennom dehydrerings-rehydreringsprosessen.

Lyofiliserte prostaglandin-liposom formuleringer kan være stabile i minst 1 år når lagret ved 60°C eller 25°C. Innskudd av arachidonsyremetabolitt i liposommembranen, etterfulgt av lyofilisering, antas å verne metabolitten fra vann, og derved å inhibere hydrolyse. Stabilitetsstudier ved anvendelse av høytrykksvæskeskromatografi (HPLC) analyser av formuleringen har vist at etter lagring ved 60°C i 1 år var ingen degraderingsprodukter av PGE₁ tilstede. Når lyofiliserte liposomer skal bli anvendt blir rehydrering oppnådd ved tilsetning av en vandig oppløsning, for eksempel destillert vann, vann for injeksjon (WFI) eller buffer eller vandig oppløsning med hensiktsmessig pH, som beskrevet ovenfor, til liposomene. Liposomene kan deretter bli resuspendert inn i den vandige oppløsningen ved forsiktig blanding. Rehydrering kan bli utført ved omtrent 25°C.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan omfatte administrering av et ytterligere bioaktivt middel til dyret, dvs. et bioaktivt middel i tillegg til arachidonsyremetabolitten som liposomen er assoisert med. "Bioaktivt middel" som anvendt heri angir en hvilken som helst forbindelse eller sammensetning som kan bli administrert til dyr. Disse innbefatter midler som har biologisk aktivitet i dyr, samt de som er nyttige for billeddannelse av andre former for diagnostikk. Bioaktive midler innbefatter, men er ikke begrenset til: antivirale, antibakterielle, antisopp, antiparasittiske, antimetabolitiske, antiglaukomiske, antiinflammatoriske eller antineoplastiske forbindelser, steroler, karbohydrater, aminosyrer, peptider, proteiner, immunoglobuliner, immunomodulatorer, fargestoffer, toksiner, enzymer, hormoner, neurotransmittere, glykoproteiner, radiomarkører, radiopaque forbindelser, fluorescens forbindelser, cellereseptorproteiner, cellereseptorligander, mydriatiske forbindelser, bronkodilatorer, lokale anestesimidler, vekstfremmende midler, regenerative midler og lignende. Ytterligere bioaktive midler blir valgt for spesielle indikasjoner ifølge kriterier, for eksempel, behovet for å behandle andre tilstander i dyr,

velkjente for fagfolk innenfor dette området i lys av denne oppfinnelsen. Det ytterligere bioaktive middelet kan være en ytterligere arachidonsyremetabolitt.

Oppfinnelsen vil bli mer fullstendig beskrevet i følgende eksempler.

5

EKSEMPLER

Eksempel 1

10 Preparering av liposom

En 1500 ml batch av liposomal PGE₁ ble dannet av følgende komponenter:

Ingrediens	Pr 1500 ml	Pr ml
egg fosfatidylcholin (EPC)	7,06 g	4,4 mg
maltosemonohydrat	150,0 g	100 mg
etanol (vannfri)	8,38 ml	0,00558 ml
butylert hydroksytoluen (BHT)	45 mg	0,03 mg
PGE ₁ 15 mg	0,01 mg	
Vann for injeksjon, USP	qs 1500 ml	

15

Fremstilling:

1350 ml vann for injeksjon ble tilsatt til en beholder og innstilt med nitrogenspyling i minst 30 minutter. 150 g maltose (J.T. Baker, Phillipsburg NJ) ble tilsatt til vannet og blandet helt til dette var oppløst i det nitrogenspylingen fortsatte. Dette produserte 1440 ml blanding ved en pH på 4,81.

20

I en annen beholder ble 7,06 g egg fosfatidylcholin (EPC) (Nippon Oil and Fats, Hyogo, Japan) kombinert med 6 ml etanol (vannfri) og blandet helt til dette var oppløst, og 45 mg BHT ble tilsatt og blandet helt til dette var oppløst. Til denne blandingen ble 15 mg PGE₁ tilsatt og blandet helt til oppløst og gjenværende 2,37 ml etanol ble anvendt for å skylle gjenværende PGE₁ i veieholderen inn i blandingen.

25

Etanoloopløsningen ble trukket inn i en 10 ml glassprøyte og injisert gjennom en 14 gouge kanyle, sakte over en periode på 11 minutter inn i maltoseopløsningen med hurtig blanding og fortsatt nitrogenspyling. Ved tilsetning av etanol/lipidblanding ble

30

oppløsningen sløret og indikerte dannelse av liposomer. Suspensjonen ble deretter for-
tynnet til et sluttvolum på 1500 ml med gjenværende vann for injeksjon.

Liposomdispersjonen ble deretter ekstrudert 3 ganger gjennom et 0,2 μm porestørrelse
5 Nucleopore polykarbonat rett gjennom et stykke typefilter (Nucleopore, Pleasanton CA),
etterfulgt av 5 ekstrusjoner gjennom et tilsvarende 0,1 μm filter. Partikkelstørrelsen til
resulterende liposomer ble bestemt å være 0,169 μm (S.D. 0,041 μm) ved anvendelse av
kvasi-elastisk lysspredning (QLS) (Nicomp Particle Sizer). Liposomdispersjonen ble
deretter sendt gjennom et 0,22 μm Millipak steriliseringsfilter. Til slutt ble 10,5 ml ali-
10 kvoter av dispersjonen fylt inn i beholdere og lyofilisert ifølge prosedyrene angitt i ek-
sempel 2 for å danne et lyofilisert produkt, som kan bli anvendt øyeblikkelig eller lagret
for fremtidig bruk.

Det lyofiliserte produktet ble rehydrert med 10 ml 0,01 M acetatbuffer (pH 4,3), idet den
15 resulterende suspensjonen har pH på omtrent 4,3. Inneslutning av PGE_1 i liposomene
ble bestemt ved HPLC, og det ble oppdaget at minst 98% av tilgjengelig PGE_1 var inne-
sluttet i liposomene, i en konsentrasjon på omtrent 9,0 μg PGE_1 pr ml rehydrert suspen-
sjon.

20 Lyofiliseringsprosess

Splitt-topp, butyl-gummikork, flint lyofiliseringsbeholdere med kapasitet på 50 ml ble
fylt med 10,5 ml vandige-suspenderte liposomer, inneholdende PGE_1 . Disse beholderne
ble plassert på hyller i lyofiliseringsapparatet (PV-24 Stokes Lyophilizer). Beholderene
ble oppbevart ved 0°C i 1,5 timer. Hylletemperaturen ble deretter øket til -45°C i en rate
25 på 0,8°C pr minutt og holdt i 1 time hvoretter et vakuum på 100 μm Hg ble påført. Hyl-
letemperaturen ble deretter øket til -28°C i en rate på 0,5°C pr minutt, med et kontinuer-
lig vakuum ved 100 μg Hg.

Beholderene ble oppbevart ved -28°C i 50 timer ved 100 μm Hg vakuum. Hylletempera-
30 turen ble deretter øket til +25°C i en rate på 0,5°C/min. og holdt i 22 timer. Beholderene
ble deretter satt lokk på under delvakuum.

Akutt hjerteinfarkt/in vivo test av liposomal PGE_1

35 Rehydrerte liposomer ifølge eksempel 1 ble testet in vivo som et middel for redusering
av reperfusjonsskade ved behandling av hjerteinfarkt som er et resultat fra tilstoppede
blodårer. Totalt 53 kondisjonerte 25-35 kg hunder ble studert i dose-rangeringsforsøk og

infarktstudier. Hundene ble ekskludert fra analysene av følgende årsaker: omfattende kollateralisering til infarktsone (4), hjerteormer ved nekropsi (1) og hjertestans i løpet av okklusjon (1). 40 hunder overlevde hvor 27 var egnet for analyser; 7 hunder i kontrollen, liposomal PGE₁ (LUV-PGE₁) og liposom-kontroll (tom, eller "vanlig", liposomer) 5 grupper og 6 hunder i PGE₁-kontroll (fri PGE₁) gruppe.

Dose-rangeringsforsøkene ble utført for å bestemme en egnet dosering som kan anvendes i hjerteinfarktstudiene. Deldoser av liposomalt PGE₁ ble gitt mens hjerterate, gjennomsnittlig arterielt trykk, hjertebelastning og lungekapillær trykk ble målt. Blodprøve- 10 ne ble også tatt i intervaller for blodplateaggregasjonsstudier (figur 1). Doser høyere enn 2,0 µg/kg levert som en bolus over 10 til 20 minutter produserte en betydelig tachykardia og forbigående hypotensjon med en betydelig økning (dobling) i hjertebelastningen. Blodplateaggregasjonen ble delvis inhibert ved 0,1 µg/kg og ble totalt inhibert ved 0,6 µg/kg. En dose på 0,5 µg/kg levert over 10 minutter så ut til å øke hjerteraten og hjerte- 15 belastningen i liten grad. For å optimalisere de potensielle resultatene ble det valgt for å oppnå to doser av liposomal PGE₁ med hver 0,5 µg/kg. En injeksjon ble administrert like etter okklusjon av infarkt-relaterte arterier og den andre like før reperfusjonen. Dette regimet forsikrer en effekt i løpet av ischemi perioden og den innledende reperfu- sjonsperioden. Effekten av liposomal PGE₁ så ut til å være vedvarende en viss tid etter 20 administreringen. Denne observasjonen er betydelig for reokklusjon etter reperfusjon og restenose etter angioplasti som er direkte relatert til blodplateaggregasjon og adherering til endothelceller og ekstracellulær matrise.

Virkninger av liposomal PGE₁, fri PGE₁, tomme liposomer og en kontrollgruppe på 25 hjerteraten ble studert. Forsøkshundene ble bedøvd med natriumpentobarbital og opprettholdt med intravenøs pentobarbital og Inovar (droperidol/fentanyl). Arteriell okklusjon ble simulert ved ligering av venstre utgående aortaarterie. 10 minutter etter okklusjon ble 0,5 µg/kg liposom-bundet PGE₁ administrert intravenøst over 10 minutter inn i en første gruppe av hunder og en andre gruppe av kontrolldyr ble beholdt uten behand- 30 ling. Liposominfusjonen forårsaket en økning i hjerteraten som delvis ble motvirket av administrasjon av små mengder ytterligere inovar. Testene viste ingen vesentlige forskjeller i hjerterate i løpet av eksperimentet mellom kontroll og behandlede dyr. 100 minutter etter okklusjon ble en annen dose på 0,5 µg/kg administrert over 10 minutter. Etter 2 timer ble ligaturen fjernet og forårsaket en akutt reperfusjon av blodåren. 2 timer 35 senere ble hunden avlivet og hjertet ble undersøkt for hjerteinfarktskade. Resultatene er oppsummert i figur 2. Gruppen som mottok fri PGE₁ utviste en betydelig økning i hjerterate etter at den opprinnelige doseringen og fortsatte helt til reperfusjonen. Denne øk-

ningen var ikke tilstede i noen av de gjenværende tre gruppene av dyrene. Denne økningen er forårsaket av kompensatorisk tachykardia på grunn av vasodilasjon.

Totalt 7 hunder ble innbefattet i kontrollgruppen, og 7 hunder ble behandlet med liposomal PGE₁. I løpet av testperioden forble gjennomsnittlig aortatrykk relativt konstant, og det var ingen betydelig forskjell mellom kontroll og behandlede grupper. Gjennomsnittlig arterielt trykk økte i hver gruppe etter okklusjon, men det var ingen betydelige forskjeller mellom gruppene. Resultatene er oppsummert i figur 3.

Hjerteblodstrømningen, målt ved 15 µm radioaktive mikrosfærer, demonstrerte en betydelig økning i alle grupper av dyr etter okklusjon. Det var ingen betydelig forbedring i kolateral blodstrømning etter liposomal PGE₁ infusjon i testdyrene og dette tyder på at de mikrovaskulære vasodilatoriske effektene til liposomal PGE₁ var minimale.

Med reperfusjon økte blodstrømningen betydelig høyere i behandlede hunder sammenlignet med kontrolldyrene. Undersøkelse av hjertene viste at størrelsen på hjerteinfarkt uttrykt som en prosent av risikoregionen (dvs. område med lav strømning i løpet av ischemi), så ut til å være redusert med omtrent 50% i hunder behandlet med liposomal PGE₁, sammenlignet med ubehandlede kontrollhunder. I tillegg resulterte administrering av liposomal PGE₁ i en nesten total inhibisjon av blodplateaggregasjonen i blodet.

Figur 4 oppsummerer resultatene i de fire hundegruppene som mottok enten liposomal PGE₁, fri PGE₁, tunge liposomer eller saltvannskontroll. Liposomal PGE₁ ble gitt i to 0,5 µg/kg infusjoner over 10 minutter hver i en total dosering på 1,0 µg/kg. Fri PGE₁ ble kontinuerlig infusert over 90 minutter med .1 µg/kg/minutt eller en total dosering på 9 µg/kg.

Testene ble også utført for å måle infiltrering av hvite blodceller inn i ischemisk hjertevæv. Rett etter ekstrahering av hjertet fra dyrene ble prøvene oppnådd fra 1) infarktsone, 2) grensesonen til infarktsone innenfor risikoregionen 3) risiko (ischemisk) sone og 4) kontrollsonen utenfor risikoregionen. (Risikoregionen var den delen av hjertet som blir tilført av den okkluderte blodåren). Vevet ble flammefrosset ved anvendelse av flytende nitrogen og oppbevart ved -70°C helt til det ble analysert. Myeloperoksidase (et enzym som bare finnes i neutrofiler) aktiviteten ble deretter analysert for hver av de fire sonene i hvert dyrehjerte. Innledningsvis ble 6 kontrolldyr testet på denne måten til tross for at en av disse (CONT 4 i tabellen) ble betraktet som varierende i løpet av testen, men ble inkludert i tabuleringen for å oppnå en helhet. Bare 4 av dyrene behandlet med liposo-

mal PGE₁ (LIPO 1-4) ble inkludert i denne delen av studien. Resultatene er presentert i tabulær form i tabell 1 hvor nivået av myeloperoksidase uttrykt i tilfeldige enzymenheter for sammenlignende formål:

TABELL 1

MYELOPEROKSIDASE FRIGJORT FRA MYOKARDIAL VEV

		SONE			
	HUND	1	2	3	4
10		22,8	17,8	1,1	1,3
	KONT 1				
	KONT 2	18,2	0	6	0
	KONT 3	23,3	29,0	17,9	0,7
15	KONT 4	0	0	0	0
	KONT 5	23,5	24,4	19,6	3,9
	KONT 6	2,7	3,0	1,2	1,7
	GJENNOMSNIITT	15,1	12,4	7,6	1,3
20	STD	10,9	13,0	8,9	1,5
	LIPO 1	1,7	0	0	0,6
	LIPO 2	1,3	-	0	0,5
	LIPO 3	-	0	0	0
25	LIPO 4	2,7	0,5	0	0,2
	GJENNOMSNIITT	1,9	0,2	0	0,3
	STD	0,7	0,3	0	0,3

30 Ytterligere hunder ble testet i hver gruppe. Figur 5 oppsummerer resultatene av alle hunder egnet for analyser i hver av de fire testede gruppene.

I ovennevnte tabell indikerer en strek at ingen måling ble utført ved den bestemte verdien.

Eksempel 3In vivo tester for ARDS profylakse:

- 5 Respiratorisk distressyndrom i voksne (ARDS) er en tilstand som er sekundær overfor forskjellige forekomster inkludert, men ikke begrenset til, traumer, brannaspirasjon og hyperoksia. Tilstanden er kjennetegnet ved interstitiell ødemdød til kapillær skade. Når lungene blir fylt med væske blir pusting vanskelig og 5-60% av pasientene dør. Hendelse som fører til denne katastrofale konklusjonen kan variere avhengig av naturen til
- 10 den innledende hendelsen. Faktorer så som C3a, C5a, IL-1 og TNF aktiverer neutrofilene. Virkningsmåten til PGE₁ er avhengig av mekanismene for cellulær aktivering. I nærvær av PGE₁ kan ikke neutrofilene bli aktivert, og dersom de allerede er aktivert vil de bli stoppet og derved forhindre sykdom.
- 15 Studiene ble utført på gangermodeller for ARDS hvor lungeskaden var blitt indusert ved enten termisk skade eller ved direkte intratracheal injeksjon av IL-1. Som angitt i følgende eksempler forhindrer doser av liposomal PGE₁ lekkasje av væske inn i lungene og reduserer betydelig influks av neutrofiler inn i lungene.
- 20 Rehydrert liposomal PGE₁ ifølge eksempel 1 ble testet in vivo som et profylaktisk middel for forløpet av respiratorisk distressyndrom i voksne (ARDS). Testrottene ble delt inn i 3 grupper inneholdende 7 eller 8 dyr hver og behandlet med enten 8 µg/kg liposomal PGE₁ eller saltvann samtidig med og en etter termisk skade (ved nedsenkning i 70°C vann i 45 sekunder). Den første gruppen ble behandlet med liposomal PGE₁ og
- 25 den andre gruppen ble ikke behandlet med liposomal PGE₁, men ble utsatt for de samme traumene og en tredje gruppe ble hverken behandlet eller traumatisert. En time før ofring av rottene ble 125 I-albumin injisert intravenøst som en markør for væskelekkasje inn i lungen. 4 timer etter termisk skade ble dyrene ofret. Resultatene av studien er oppsummert i figur 6.
- 30 En effekt av en slik traumatisering er kjent for å være begynnelsen av ARDS og viser ved et øket nivå av albumin i lungene til påvirkede dyr. Ubehandlete traumatiserte dyr utviste alle forhøyede nivåer av albumin i lungene. 6 av disse 7 testede dyrene døde. Albuminnivået i dyrene behandlet med liposomal PGE₁ ble funnet å være så lav, eller
- 35 til og med lavere enn nivåene i den uttraumatiserte kontrollgruppen. Ingen av de 7 PGE₁ behandlede dyrene døde som et resultat av traume. Disse resultatene viser effektiviteten til liposomal PGE₁ som et profylaktisk middel på forløpet av ARDS.

In vivo tester for behandling av ARDS induisert ved intratracheal injeksjon av IL-1:

Intratracheal instillasjon av rekombinant IL-1 inducerer en neutrofil influks og lunge-skade i rotter (figur 7). Liposomal PGE₁ behandling vil redusere IL-1 induisert lunge-
5 skade og neutrofil influks. 50 ng kommersielt tilgjengelig interleukin 1 (IL-1) eller saltvann (i kontrollgruppen) ble ført inn i lufttrøret til rottene og induiserte neutrofil infiltrering i lungene og lekkasje av væske inn i alveoli. Intravenøs behandling av 6 µg/kg av enten rehydrert liposomal PGE₁ ifølge eksempel 1, fri PGE₁ eller tomme liposomer ble administrert 2,5 timer etter IL-1 tilførsel i rotter som hadde mottatt IL-1. Av de analyser-
10 te rottene mottok 40 bare saltvann, 54 mottok IL-1 og var ubehandlede, 6 mottok IL-1 og ble behandlet med liposomal PGE₁, 6 mottok IL-1 og ble behandlet med tomme liposomer, og 6 mottok IL-1 og ble behandlet med fri PGE₁.

4 1/2 time etter at IL-1 ble gitt, etter at mange neutrofiler allerede hadde blitt infiltrert
15 inn i vevet ble rottene injisert med 125 I albumin som en markør inn i blodstrømmen. En halv time etter at albumin var injisert ble dyrene ofret, lungen fjernet og lekkasje av væske inn i lungen ble kvantifisert ved å bestemme mengden av isotopen i vevet. En lungelekkasje indeks ble beregnet basert på tellinger pr minutt (cpm) av merket 125 I-albumin i lungen delt på mengden av merket 125 I-albumin i blodstrømmen. Lungelek-
20 kasjen blir uttrykt på y-aksen i figur 7. Som angitt i figur 7 forårsaker tilførsel av IL-1 uten behandling en 2,5-ganger økning av lungelekkasje over narregruppen eller dyr gitt saltvann. Når liposomal PGE₁ behandling ble gitt etter innførsel av IL-1 var lungelekkasjeindeksen lik det som fremkom i narrekontrollen. Behandling med hverken fri PGE₁ eller tomme liposomer hadde virkning på lungelekkasje.

25 Denne sekvensen av hendelser representerer det som kan oppstå i et klinisk oppsett. Skade ble induisert og behandlingen ble initiert ved et senere tidspunkt etter at hensiktsmessig diagnose ble utført.

Eksempel 4Endotoksemi studier i rotter5 Preparering av EPC-inneholdende PGE₁ MLV

- En egg fosfatidylcholin (EPC) stamopløsning (20 mg/ml i etanol) ble dannet som følger: 1 g tørket EPC ble løst opp i 50 ml absolutt etanol med forsiktig omrøring, i en 50 ml brun flaske med et teflon-belagt lokk. Den resulterende oppløsningen ble lagret ved -20°C. En PGE₁ stamopløsning (1 mg/ml i etanol) ble preparert som følger: 20 mg 10 tørket PGE₁ ble overført til 20 ml beholder hvortil det ble tilsatt 20 ml absolutt etanol. PGE₁ ble løst opp i etanol med forsiktig omrøring og den resulterende oppløsningen ble lagret ved -20°C.
- 15 En alikvot av EPC stamopløsningen (9,75 ml) og en alikvot PGE₁ stamopløsning (0,5 ml) ble kombinert i en 500 ml rundbunnet flaske. Etanol ble fjernet ved rotoavdampning ved omtrent 30°C i minst 2 timer. Tørket EPC/PGE₁ ble resuspendert i en pH 4,5 buffer (for eksempel 50 mM acetat, 150 mM NaCl, pH bragt til 4,5 med 10N NaOH; glasskulene var behjelpelig med resuspensjon av tørket EPC/PGE₁ (for å danne en liposomsuspensjon. Denne suspensjonen ble lagret ved 4°C.
- 20

Preparering av DPPC-inneholdende PGE₁ MLV

- En DPPC stamopløsning ble dannet som beskrevet ovenfor ved anvendelse av 1,035 g 25 dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC) oppløst i metylenklorid. Rehydrering av tørket DPPC/PGE₁ blandingen krevde oppvarming i et vannbad, med omdreining, ved omtrent 52°C, i omtrent 3-5 minutter.

30 Endotoksemi modell i rotte

- Feber, hypotensjon, forandringer i leukocyt antall og diarè er symptomer på gram-negative bakterielle infeksjoner. Disse infeksjonene kan føre til disseminert intravaskulær koagulasjon og irreversibelt sjokk. Et stort volum litteratur indikerer involvering av leukocytavledet IL-1, IL-6 og TNF- α i formidling av progresjonen av endotoksisk sjokk. På grunn av at in vitro dataene heri indikerer en inhibisjon av disse cytokinene fra dyrkede 35 monocytter er det blitt utviklet heri en in vivo modell for rotteendotoksemi ved anven-

delse av dødelighet som et sluttunkt, for å vurdere effektiviteten til PGE₁ og partikkel-formige formuleringer ved attenuering av LPS-indusert død.

Eksperimenter ble konstruert for å bestemme LD₅₀ for E. coli LPS (lipopolysaccharid: serotype 055.B5) i Sprague-Dawley rotter. Data fra disse eksperimentene er vist i figur 8 og indikerer at LD₅₀ er på 50 µg/kg. Denne LPS doseringen ble anvendt i påfølgende eksperimenter dersom ikke annet er angitt.

Sprague-Dawley hannrotter med vekt på 126-150 g ble akklimatisert i 2 dager i et dyreburch med mat og vann etter behov. Ved tid 0 ble grupper av rotter (n=16) injisert i.v. med enten E. coli lipo polysaccharid som en enkelt bolus, eller med en saltvanns- (uten LPS) kontroll. Dødeligheten ble vurdert ved forskjellige tidspunkter (dager) post-LPS administrasjon.

15 Inhibisjon av tumornekrosefaktor alfa (TNF-α) og interleukin-1 beta (IL-1β) syntese i repons til lipopolysaccharid (LPS) og PGE₁

Adherente humane monocytter ble stimulert med LPS (1 µg/ml/10⁶ celler) ved tid 0. Fri PGE₁ (ikke innesluttet i liposomer), LUV-PGE₁ (store unilamellære liposomer (LUV) fremstilt i henhold til prosedyrene beskrevet i dette eksempelet), LUV-PGE₁ "placebo-liposomer (LUV som inneholder PGE₁), LUV placeboliposomer pluss frie PGE₁, placeboliposomer eller en saltvannskontroll (uten PGE₁) ble injisert samtidig (10 µm PGE₁). Utskilt TNFα og IL-1β ble analysert i 3 timer. Resultater for disse eksperimentene er presentert i figur 9, αβ.

25

Attenuering av LPS-indusert dødelighet

Hann Sprague-Dawley rotter ble injisert i.v. med 50 µg LPS/kg kroppsvekt ved tid 0. Fri PGE₁, LUV-PGE₁ (40 µg/kg PGE₁), placebo LUV (LUV som ikke inneholder PGE₁; ekvivalente partikkelantall til antall liposomer gitt med 40 µg/kg PGE-LUV-PGE₁ dosen) eller placebo LUV (40 µg/kg lipid ekvivalens) pluss fri PGE₁ (40 µg/kg). Det var 12 rotter i hver behandlingsgruppe. Overlevelsen ble vurdert i hver gruppe 6, 12, 18 og 24 dager post-LPS administrasjon. Resultatene er presentert i figur 10.

Eliminering av fri PGE₁-indusert dødelighet

35 hann Sprague-Dawley rotter ble injisert i.v. med 50 µg/kg LPS ved tid 0. Fri PGE₁ (40 µg/kg), LUV-PGE₁ (40 µg/kg PGE₁), placebo LUV (40 µg/kg lipid ekvivalens, dvs. antall placebo LUV var lik antall LUV tilstede i sammenheng med en dose på 40 mikro-

gram prostaglandin E₁ pr kg kroppsvekt), lateks mikrosfære (antall ekvivalent med antall placebo LUV) eller lateks mikrosfære pluss fri PGE₁ samtidig injisert i.v. Overlevelsen i behandlingsgruppen (16 rotter) ble vurdert i 24 timer. Resultatene er presentert i figur 11.

P a t e n t k r a v

1.

5 Fremgangsmåte for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for behandling av en sykdom kjennetegnet ved celleaktivering og adhesjon, inflammasjon eller toksemi, k a - r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter formuleringen:

(a) en farmasøytisk akseptabel bærer; og

(b) et unilamellært liposom som omfatter:

10 (i) et lipid;

(ii) en frigjøringsinhiberende vandig buffer;

(iii) en antisykdomseffektiv mengde av en arachidoninsyremetabolitt som er minst omtrent 10^{-12} g av metabolitten pr. kg. kroppsvekt av dyret som skal behandles, hvori nevnte frigjøringsinhiberende buffer øker styrken av metabolittlipidinteraksjoner eller etablerer elektrostatiske repulsjoner med metabolitten.

15

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er egnet for intravenøs administrering.

20

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det unilamellære liposomet er et stort unilamellært liposom som har en diameter på omtrent 100 nm.

25

4.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at arachidoninsyremetabolitten er et prostaglandin.

30

5.

Fremgangsmåte ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at prostaglandinet er prostaglandin E1.

35 6.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at lipidet er et mettet acylkjedelipid.

7.

Fremgangsmåte ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at det mettede acylkjedelipidet er dipalmitoylfosfatidylkolin.

5

8.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at bufferen er en sitronsyrebuffer.

10 9.

Fremgangsmåte ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at sitronsyrebufferen har en pH på omtrent 4,5.

10.

15 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at sykdommen omfatter reperfusjonsskade, systemisk inflammatorisk responssyndrom, myokardialt infarkt, voksent respiratorisk "distress"-syndrom, vaskulitt, brannsårskade, post-traumatisk sjokk, en vaso-okklusiv sykdom, en artrittsykdom eller en autoimmun-sykdom.

20

11.

Fremgangsmåte ifølge krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at artrittsykdommen er reumatoid artritt, gikt eller filarartritt.

25 12.

Fremgangsmåte ifølge krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at den autoimmune sykdommen er systemisk lupus erythematosus, juvenil diabetes, multippel sklerose eller Hashimoto's tyroiditt.

30 13.

Fremgangsmåte ifølge krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at sykdommen omfatter systemisk inflammatorisk responssyndrom eller voksent respiratorisk "distress"-syndrom.

35

14.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den effektive mengden av metabolitten er fra omtrent 10^{-12} g metabolitt pr. kg. kroppsvekt av dyret til omtrent 10^{-3} g pr. kg.

5

15.

Fremgangsmåte ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at den effektive mengden av metabolitten er fra omtrent 10^{-8} g metabolitt pr. kg kroppsvekt av dyret til omtrent 10^{-4} pr. kg.

10

16.

Fremgangsmåte ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at den effektive mengden av metabolitten er omtrent 10^{-6} g metabolitt pr. kg av kroppsvekten til dyret.

15

17.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at liposomet omfatter et tørkingsbeskyttelsesmiddel.

20

18.

Fremgangsmåte ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at tørkingsbeskyttelsesmidlet er et sakkarid.

19.

25 Fremgangsmåte ifølge krav 18, k a r a k t e r i s e r t v e d at sakkaridet er maltose, laktose, dekstrose, trehalose, raffinose eller sukrose.

20.

30 Fremgangsmåte ifølge krav 19, k a r a k t e r i s e r t v e d at sakkaridet er maltose.

21.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et ytterligere bioaktivt middel.

35

22.

- Anvendelse av en sammensetning som omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer og et unilamellært liposom som omfatter en arachidoninsyremetabolitt, et lipid og en frigjørelsesinhiberende vandig buffer, hvori nevnte frigjøringsinhiberende buffer øker
- 5 styrken av metabolittlipidinteraksjoner eller etablerer elektrostatiske repulsjoner med metabolitten for fremstilling av en sammensetning for behandling av et dyr som lider av en sykdom kjennetegnet ved celleaktivering og adhesjon, inflammasjon eller toksemi.

23.

- 10 Anvendelse ifølge krav 22, hvori dyret er et menneske.

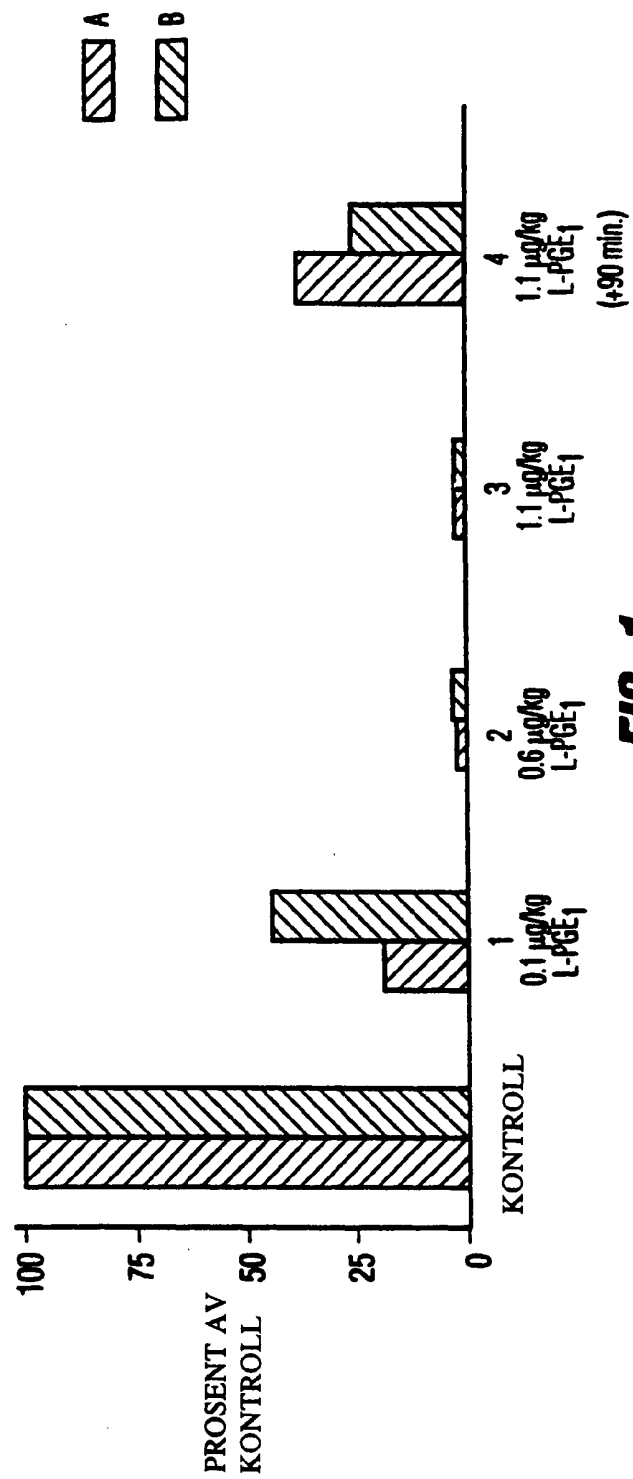
**FIG. 1**

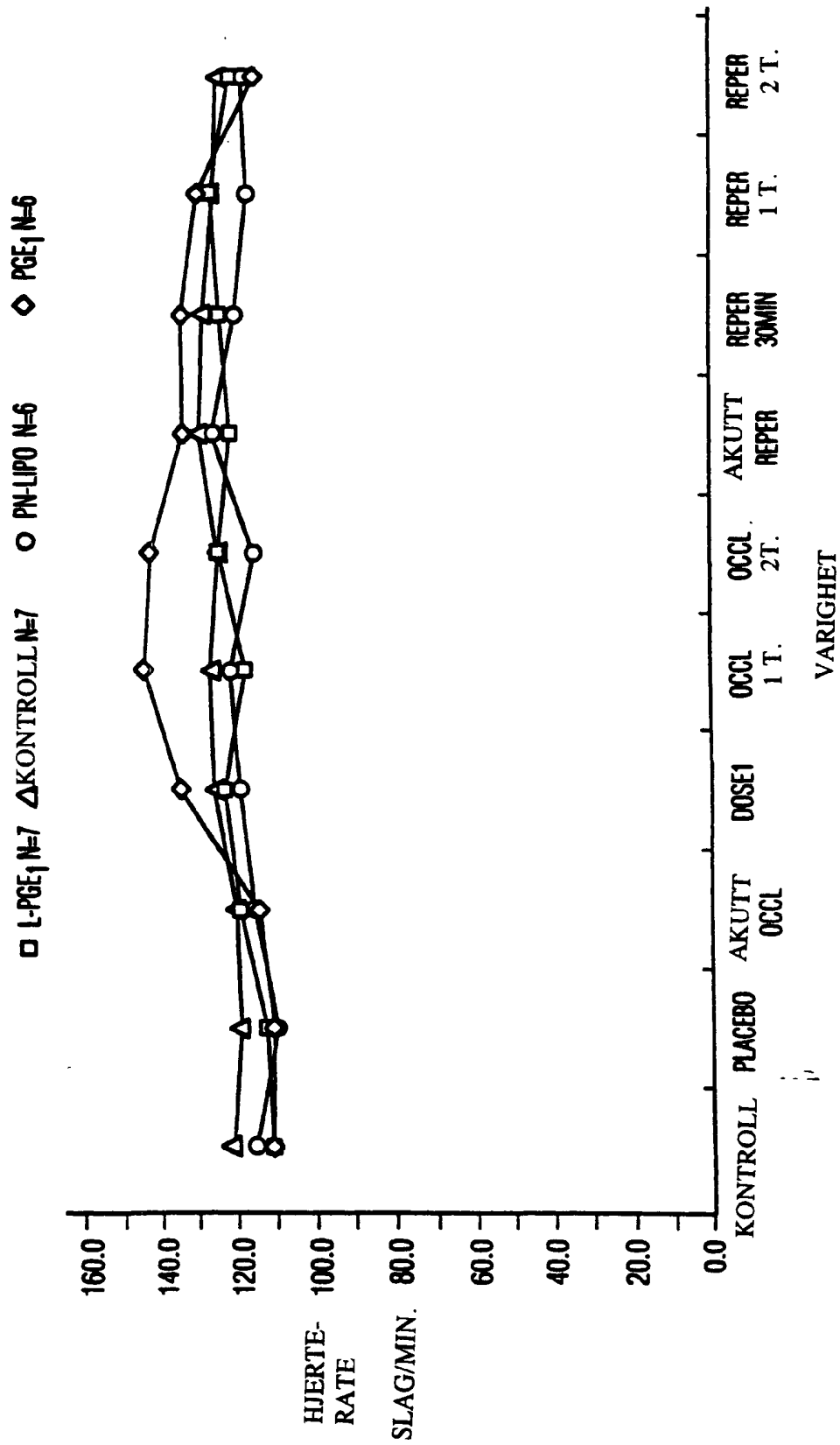
FIG. 2

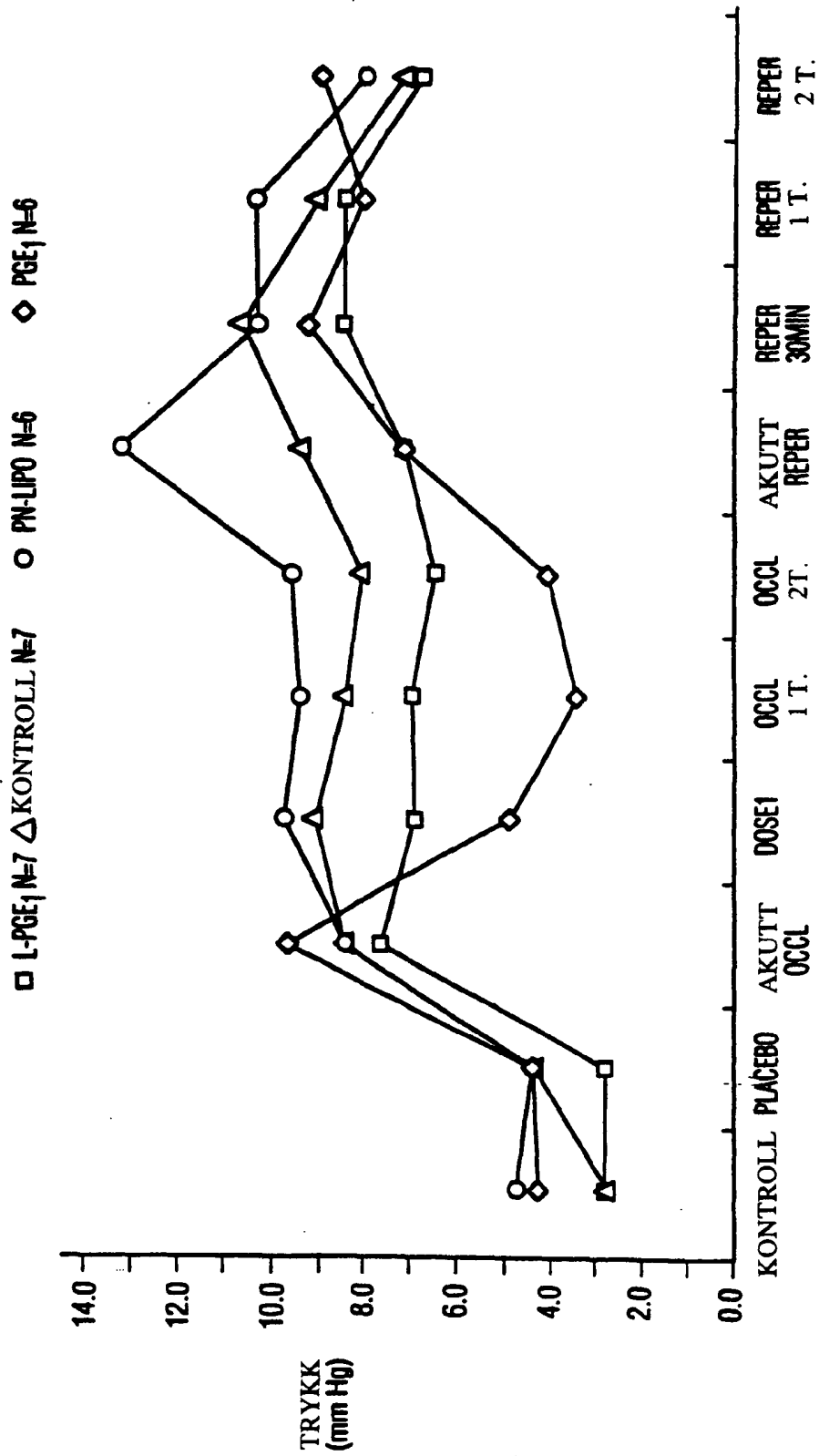
FIG. 3

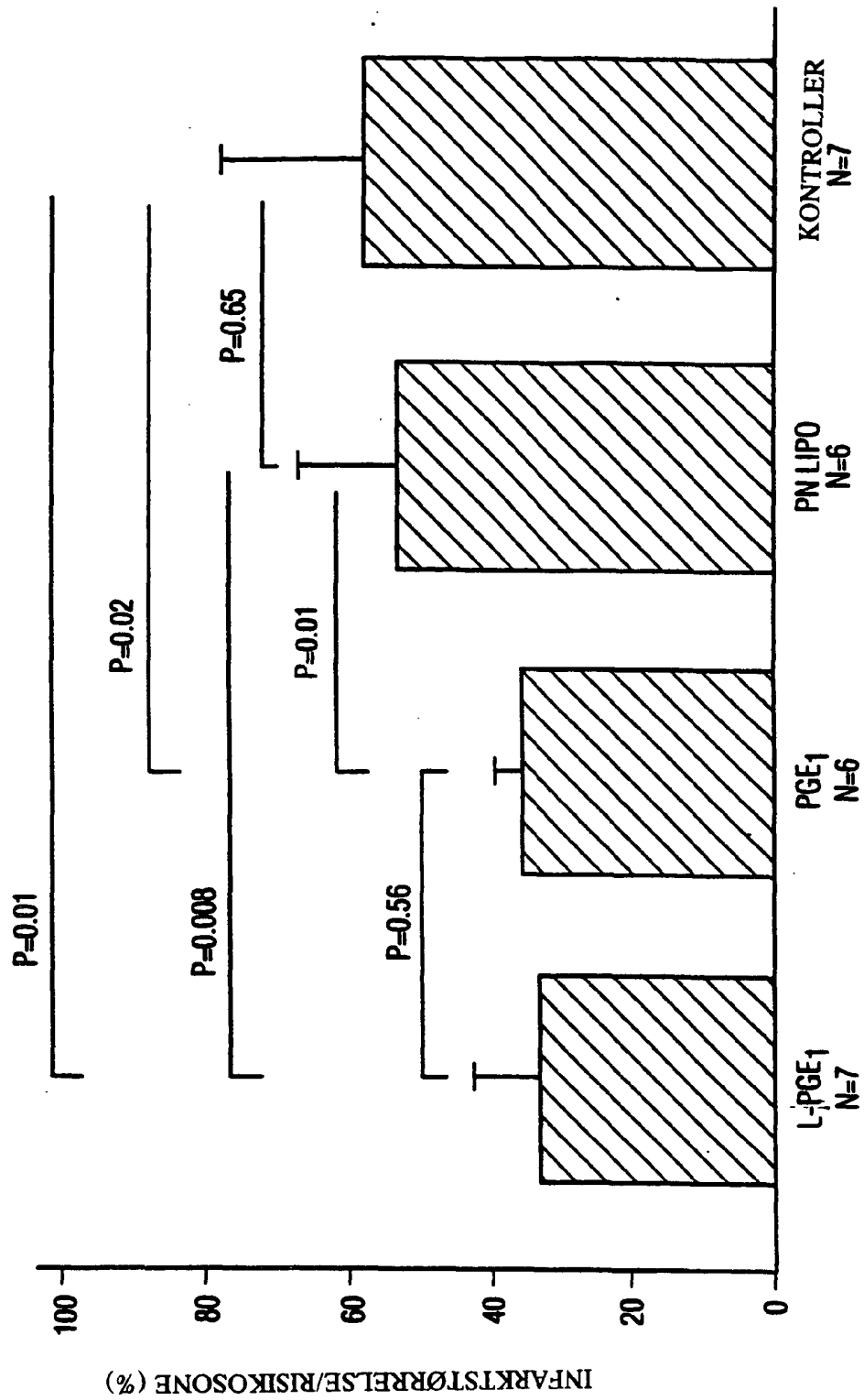
FIG. 4

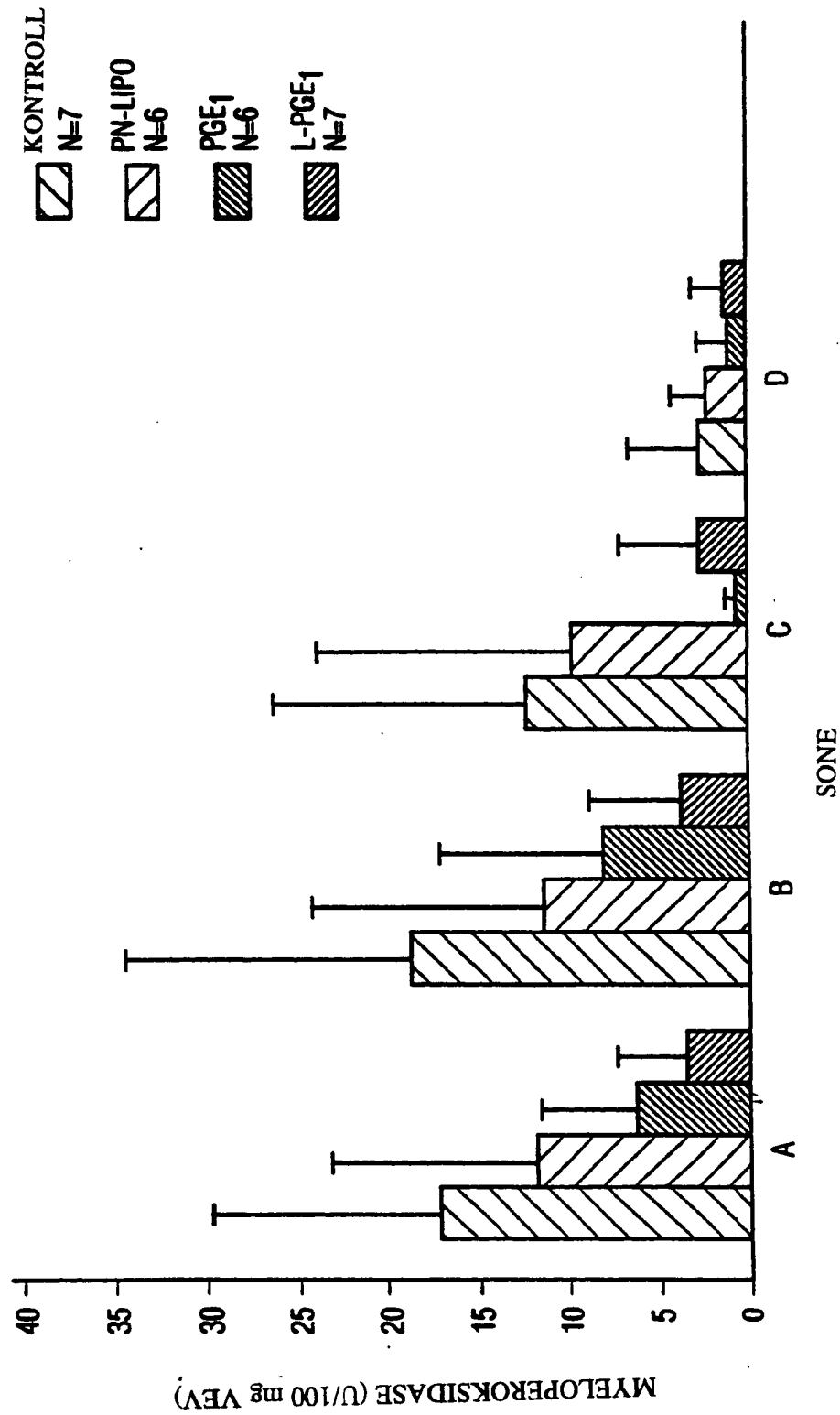
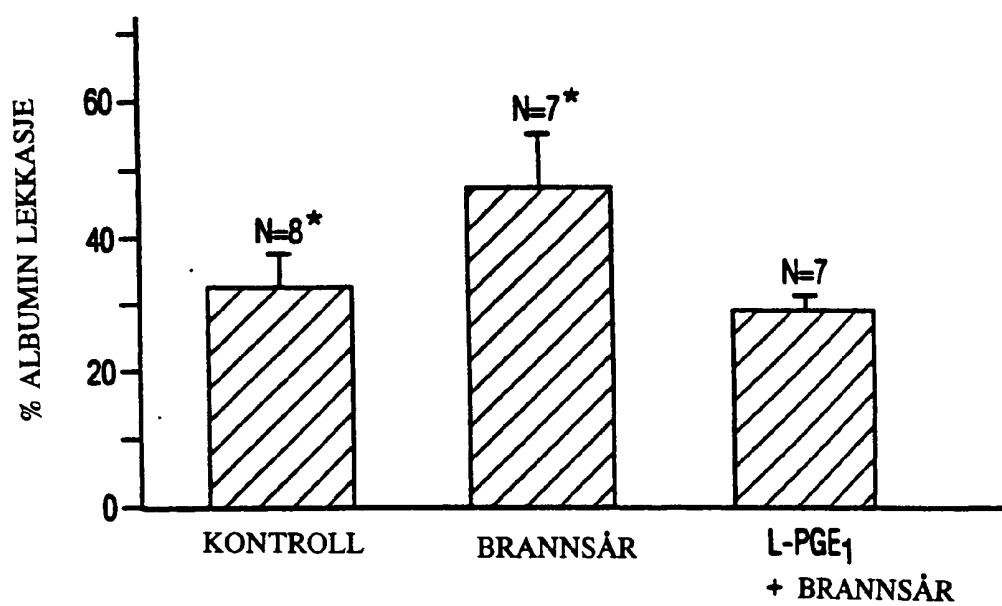
FIG. 5

FIG. 6

*P<0.06

FIG. 7

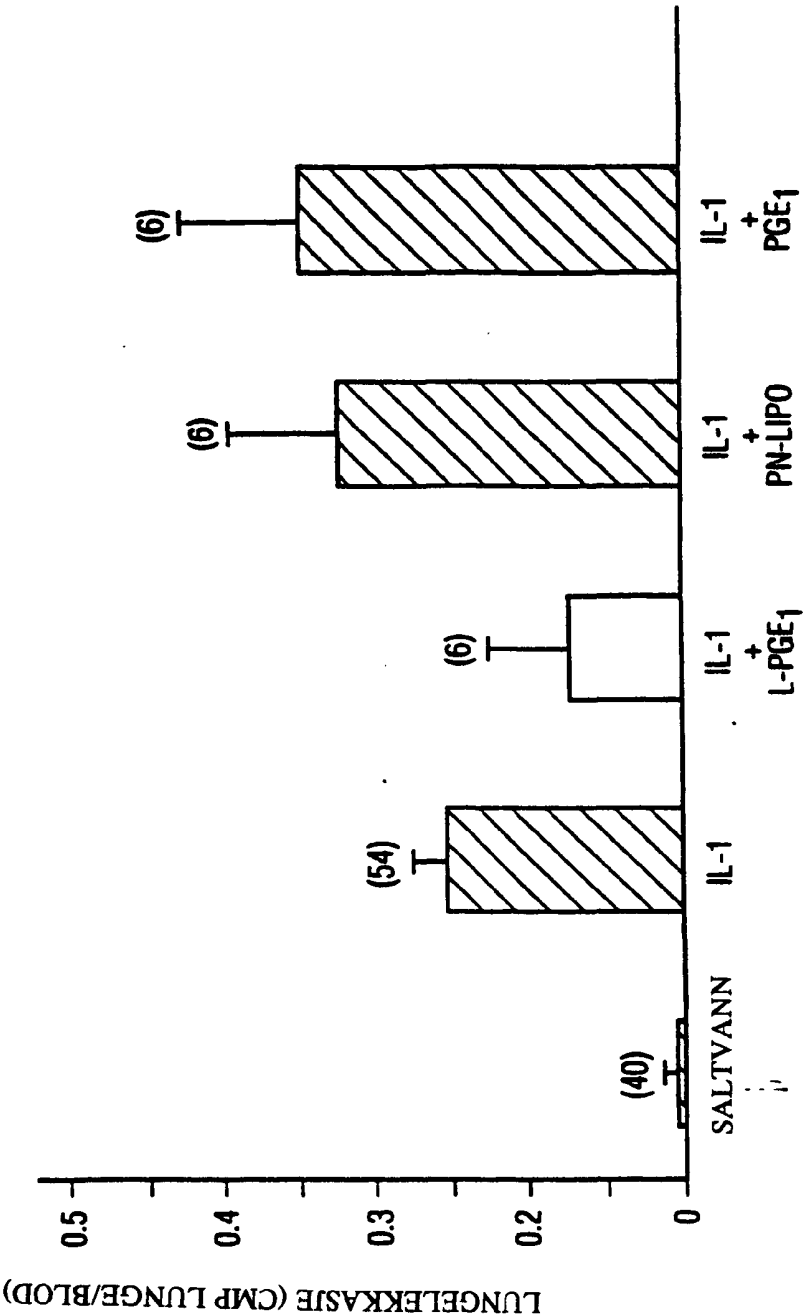


Fig. 8

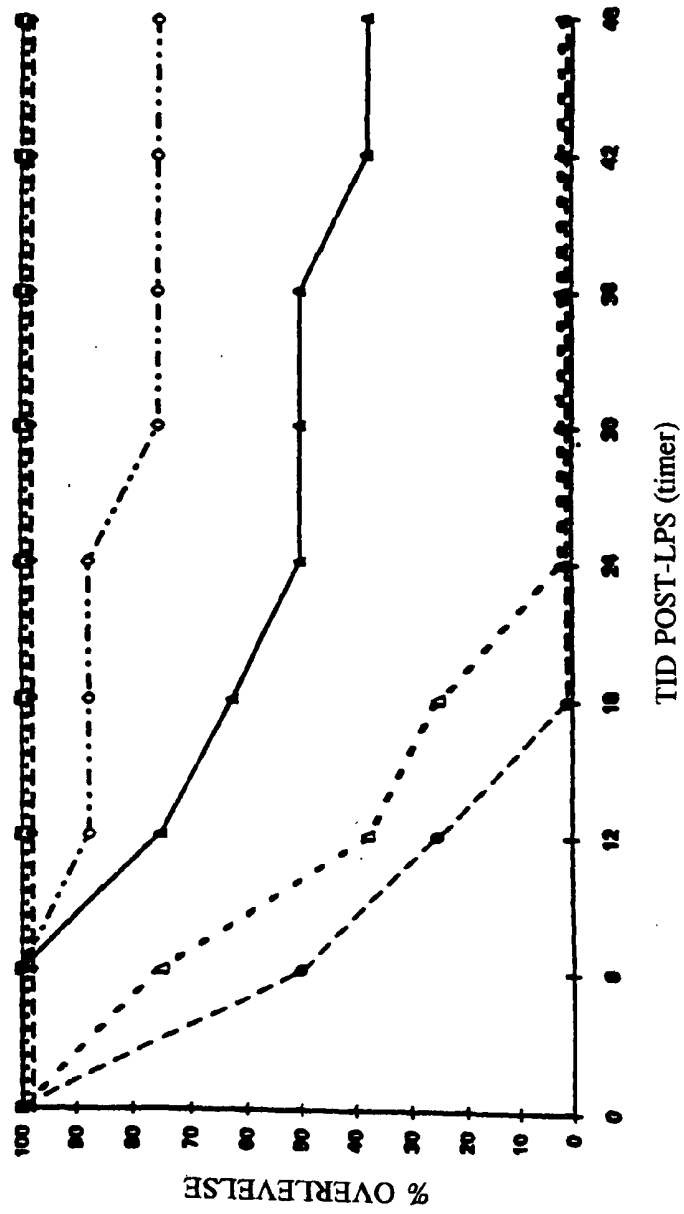
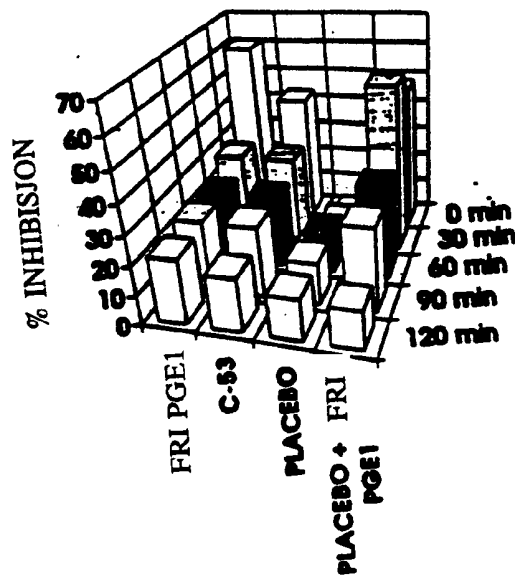


Fig. 9

10/11

Fig. 10

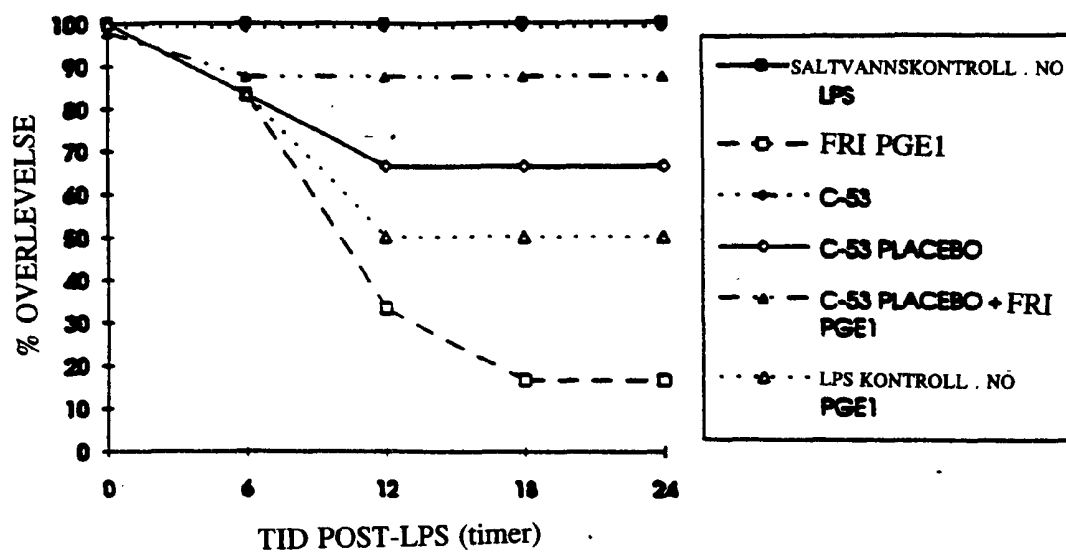


Fig. 11

