



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

83161

C Patentti myönnetty
Patentti myönnetty 10.03.1991

(51) Kv.1k.5 - Int.c1.5

A 61K 9/127, 9/52, B 01J 13/02, A 61K 47/44

(21) Patentihakemus - Patentansökning 834364
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 29.11.83
(24) Alkupaivä - Löpdag 24.03.83
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 29.11.83
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. -
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 28.02.91
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan US83/00419
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

29.03.82 US 362994 P 29.03.82 US 362995 P
25.08.82 US 411466 P 06.12.82 US 447247 P
04.02.83 US 463900 P 24.03.83 US 476496 P

(71) Hakija - Sökande

1. The Liposome Company, Inc., One Research Way, Princeton Forrestal Center, Princeton,
N.J., USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Lenk, Robert Parker, RD #2, Box 118A, Lambertville, N.J., USA, (US)
2. Fountain, Michael Wayne, 53-15 Hunter's Glen, Plainsboro, N.J., USA, (US)
3. Janoff, Andrew Stuart, 22 Trafalgar Court, Lawrenceville, N.J., USA, (US)
4. Ostro, Marc Jeffrey, 1 Lincoln Place, North Brunswick, N.J., USA, (US)
5. Popescu, Micrea Constantine, 5 Parkway Avenue, Plainsboro, N.J., USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

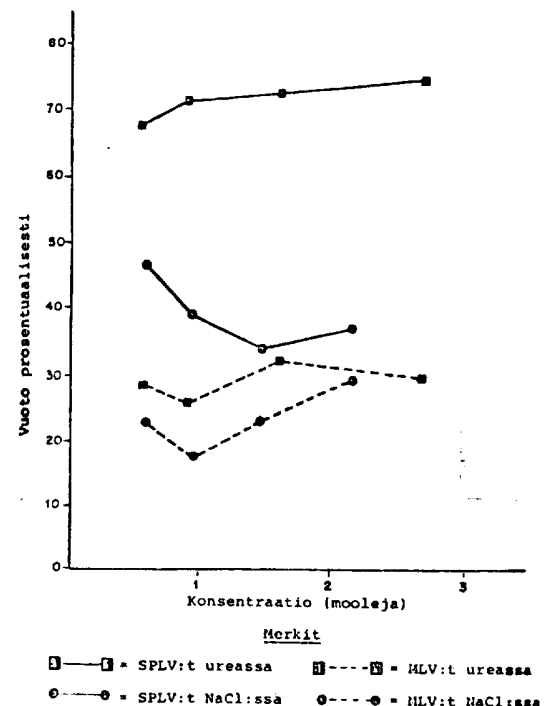
Stabiilit plurilamelliset rakkulat
Stabila plurilamellära blåsor

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

US A 4235871 (A 61K 9/10), US A 4224179 (B 01J 13/02),
Chemical Abstracts vol. 90 (1979), 18722e - Proc. Watt. Acad. Sci. U.S.A. 1978,
75 (9), 4194-8 (eng.)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Uusi ja olennaisesti parannettu lipidirakkuloiden tyyppi, joita kutsutaan stabiileiksi monikerroksisiksi rakkuloiksi (SPLV) samoin kuin niiden valmistusmenetelmä, siten että muodostetaan dispersio, jossa on ainakin yhtä amfipaattista lipidia kuten fosfatidyylikoliinia jossakin orgaanisessa liuotimessa, yhdistetään dispersio riittävän määrän kanssa vesifaasia, jolloin muodostuu kaksifaasinen seos, johon vesipitoinen faasi voidaan täydellisesti emulsoida, ja emulsoidaan vesifaasi ja haihdutetaan kaksifaasisen seoksen orgaaninen liuotin pois. SPLV:t ovat stabiileja varastoinnin aikana ja niitä voidaan käyttää in vivo yhdisteiden viivytettyyn vapauttamiseen ja sairauden hoitoon.



En ny och väsentligen förbättrad typ av lipidblåsor, som kallas för stabila plurilamellära blåsor (SPLV) liksom även förfarande för framställning av dessa, så att en dispersion bildas innehållande åtminstone en amfipatisk lipid, såsom fosfatidylkolin, i något organiskt lösningsmedel, dispersionen kombineras med en tillräcklig mängd vattenfas, varvid det bildas en tvåfasblandning i vilken vattenfasen kan fullständigt emulgeras, och vattenfasen emulgeras och det organiska lösningsmedlet av tvåfaskompositionen avdrives i sin helhet. SPLV är stabila under lagring och de kan användas för retarderad frigörelse av föreningar in vivo och behandling av sjukdomar.

Stabiilit plurilamelliset rakkulat

Tämä keksintö koskee liposomeja ja niiden käyttöä kantajina lääkkeen antosysteemeissä. Erikoisesti se koskee uutta lipidi-rakkulatyyppiä, jolla on ainutlaatuiset ominaisuudet, jotka antavat erikoisetuista kuten suuremman stabiilisuuden ja aineiden sulkemistehon.

Seuraavassa selostettavilla seoksilla ja menetelmillä on hyvin laaja käyttöalue kuten kantajasysteemeissä ja lääkkeiden antosysteemeissä määrättyyn kohteeseen. Kyseessä olevan keksinnön toteutusta havainnollistetaan esimerkeillä bruselloosin hoidosta, okulaari-infektioiden hoidosta ja lymfosyyttisen meningitis-viruksen aiheuttamien infektioiden hoidosta.

Liposomit

Liposomit ovat täysin suljettuja kaksikerroksisia membraaneja, jotka sisältävät suljetun vesipitoisen faasin. Liposomit voivat olla erilaisia unilamellisia rakkuloita (joissa on yksi ainoa membraani-kaksoiskerros), tai multilamellisia rakkuloita (sipulinkaltaiset rakenteet, joille ovat ominaisia samankeskeiset membraani-kaksoiskalvot, joista kukin on seuraavasta kalvosta vesikerroksen erottama).

Alkuperäiset liposomivalmisteet, Bangham et al (1965, J.Mol.Biol. 13:238-252), olivat orgaaniseen liuottimeen suspendoituja fosfolipidejä, joista liuotin haihdutettiin kuiviin ja jäljelle jäi vahamainen fosfolipidisakka reaktioastian pohjalle. Sen jälkeen lisättiin sopiva määrä vesifaasia, seoksen annettiin "paisua" ja tuloksena ovat liposomit, jotka olivat multilamellisia rakkuloita (niitä nimitetään tästä lähtien MLV:ksi) dispergoitiin mekaanisin keinoin. Tuloksena olevan membraani-kaksoiskerroksen rakenne on sellainen, että hydrofobiset (ei-polaariset) lipidin "häntäpäät" suuntautuvat kaksoiskerroksen keskustaan päin kun taas hydrofiiliset (polaariset) "etupäät" suuntautuvat kohti vesifaasia. Tähän tekniikkaan perustui

pienten ääniaalloilla käsiteltyjen unilamellisten rakkuloiden kehittäminen (niitä nimitetään tästä lähtien SUV:ksi); tästä on tehnyt selkoa Papahadjopoulos ja Miller (1967, Biochim. Biophys. Acta 135:524-638). Näillä "klassisilla liposomeilla" oli kuitenkin useita negatiivisia puolia, joista ei ollut vähin sisään suljetun vesitilan pieni volyymi lipidimoolia kohti ja rajallinen suurten makromolekyylien kapseloimismahdollisuus.

Ensimmäisiä yrityksiä suurentaa pidätetty volyymi oli inversien misellien tai liposomien esiasteiden muodostaminen, so. vesifaasin sisältävät rakkulat, joita ympäröi lipidimolekyylien yksittäiskerros, niin että polaaristen päiden ryhmät ovat suuntautuneet kohti vesifaasia. Liposomiesiasteet muodostetaan lisäämällä sisäänsuljettava vesiliuos polaarisen lipidin liuokseen jossakin orgaanisessa liuottimessa ja käsittelemällä ääniaalloilla. Liposomin esiasteet sitten haihdutetaan lipidiylimäärän läsnäollessa. Tuloksena olevat liposomit, jotka muodostuvat lipidi-kaksoiskerroksen sisäänsä sulkemasta vesifaasista, dispergoidaan vesifaasiin (ks. US-patenttia 4 224 179, julkaistu 23 päivänä syyskuuta 1980, M.Schneider).

Eräässä toisessa yrityksessä tällaisen sulkeuman tehokkuuden maksimoimiseksi Papahadjopoulos (US-patentti 4 235 871, 25 päivästä marraskuuta 1980) selostaa "käänteisfaasin haihdutusmenetelmää" oligolamellisten lipidirakkuloiden valmistamiseksi, jotka tunnetaan myös käänteis-faasi haihdutusrakkuloina (niitä kutsutaan tästä lähtien REV:ksi). Tämän menetelmän mukaan suljettava vesimateriaali lisätään polaarisen lipidin seokseen orgaanisessa liuottimessa. Sen jälkeen muodostetaan homogeeninen vettä-öljyssätyyppinen emulsio ja orgaaninen liuotin haihdutetaan, kunnes muodostuu geeli. Geeli muutetaan sitten suspensioksi dispergoimalla geelimäinen seos vesipitoiseen väliaineeseen. Saadut REV:t muodostuvat etupäässä unilamellisista rakkuloista ja joistakin oligolamellisista rakkuloista, joille on tunnusomaista vain harvat samankeskeiset kaksoiskerrokset ja suuri sisäinen vettä sisältävä tila. Jotkut REV:n permeabiliteetti-

ominaisuudet ilmoitetaan samanlaisiksi kuin MLV:n ja SUV:n (ks. Szoka ja Papahadjopoulos, 1978, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75:4194-4198).

Liposomeja, joihin voidaan sulkea suuri joukko yhdisteitä, voidaan siis valmistaa, mutta liposomien stabiilisuus varastoinnin aikana on aina rajoitettua. Tästä stabiilisuuden menetyksestä on seurauksena suljetun yhdisteen vuotaminen liposomeista ympäröivään väliaineeseen ja seurauksena voi olla myös liposomin sisällön kontaminoituminen ympäröivässä väliaineessa olevien materiaalien päästessä itse liposomin sisään. Tästä on seurauksena traditionaalisten liposomien hyvin lyhyt varastointiaika. Stabiilisuutta on yritetty parantaa lisäämällä liposomin membraaniin joitakin aineita (joita tullaan tästä lähtien kutsumaan "stabiloiviksi aineiksi"), jotka vaikuttavat lipidi-kaksoiskerrosten fysikaalisiin ominaisuuksiin (esimerkiksi steroidiryhmiä). Monet näistä yhdisteistä ovat kuitenkin suhteellisen kalliita ja tällaisten liposomien valmistaminen ei ole kannattavaa.

Traditionaalisten liposomien varastointipulmien lisäksi on useita yhdisteitä, joita ei voida tuoda näihin rakkuloihin. MLV:tä voidaan valmistaa vain olosuhteissa, jotka ovat lipidimembraanin faasi-transitiolämpötilan yläpuolella. Tämä sulkee pois kuumalabiilien molekyylien tuomisen liposomeihin, jotka muodostuvat fosfolipideistä, joilla on haluttuja ominaisuuksia, mutta joissa on pitkiä ja hyvin tyydytettyjä sivuketjuja.

Liposomien käyttö

Liposomien käyttämisestä terapeuttisiin tarkoituksiin on selostettu: Liposomit: From Physical Structures To Therapeutic Applications, Knight, toim. Elsevier, North-Holland Biomedical Press, 1981. On kirjoitettu paljon mahdollisuuksista käyttää näitä membraanirakkuloita lääkkeen antosysteemeissä, vaikka useita pulmakysymyksiä on vielä olemassa tällaisissa systeemeissä. Ks. esimerkiksi selostuksia US-patentissa 3 993 754, julkaistu

23 päivänä marraskuuta 1976, Yneh-Erh Rahman ja Elisabeth A.Cerny, ja US-patentissa 4 145 410, julkaistu 20 päivänä maaliskuuta 1979, Barry D. Sears. Liposomin lääkkeen antosysteemissä suljetaan lääke liposomin muodostamisen aikana ja annetaan sen jälkeen hoidettavalle potilaalle. Lääke voi olla vesiliukoinen tai liueta ei-polaariseen liuottimeen. Tyypillisiä tällaisia selostuksia on löydettävissä US-patentissa 4 235 871, 25 päivältä marraskuuta 1980, Papahadjopoulos ja Szoka, sekä US-patentissa 4 224 179, 23 päivältä syyskuuta 1980, M. Schneider.

Lääkkeen antosysteemille sopivia haluttuja ominaisuuksia ovat lääkkeen nopean ulosvuotamisen estokyky yhdessä lääkkeen viivytetyn vapautumisen kanssa, mikä pidentää lääkkeen vaikutusta. Tämä lisää lääkkeen tehoa ja sallii harvemmat lääkkeen antokerrat. Liposomivalmisteiden in vivo-käyttöön liittyviä pulmakysymyksiä ovat seuraavat; 1) liposomiin suljetut materiaalit vuotavat ulos, kun liposomeja inkuboidaan ruumiin nesteissä. Tämän katsotaan johtuvan plasman suuren tiheyden omaavien lipoproteiinien (HDL) aiheuttamasta liposomaalisten fosfolipidien lohkaisusta, tai fosfolipaasien aiheuttamasta liposomimembraanin degradaatiosta, muiden syiden ohella. Liposomien degradaation tuloksena in vivo on se, että lähes koko liposomien sisältö vapautuu lyhyessä ajassa, lääkkeen viivytetty vapautuminen ja lääkkeen ulospääsemisen estyminen jäävät siten saavuttamatta. 2) Toisaalta, jos käytetään hyvin stabiilia liposomia in vivo (so. liposomeja, jotka eivät vuoda kun niitä inkuboidaan ruumiin nesteissä), liposomien sisältö ei vapaudu silloin kun tarvittaisiin. Sen vuoksi ovat nämä stabiilit liposomit tehottomia terapeuttisten aineiden kantajina in vivo, koska viivytettyä lääkkeen vapautumista eli liposomien sisällön vapautumista, kun sitä tarvitaan, ei tapahdu. Kuitenkin silloin kun hoidetaan intrasellulaarista infektiota, on biologisten nesteiden stabilisuuden ylläpitäminen siihen pisteeseen saakka kun liposomi on tullut infektoidun solun sisään, kriittisen tärkeätä. 3) Antosysteemeissä käytettyjen liposomikantajien edullisuus kustannuksiin nähden. Esimerkkinä mainittakoon parannettu menetelmä leishmanialisten infektioiden kemoterapiassa käyttämällä liposomiin

kapseloitua anti-leismaniaalista lääkettä, joka menetelmä on selostettu US-patentissa 4 186 183 Steck ja Alving, julkaistu 29 päivänä tammikuuta 1980. Kemoterapiassa käytetyt liposomit sisälsivät useita stabilisaattoreita, jotka lisäsivät liposomien stabilisuutta in vivo. Kuitenkin, kuten edellä on mainittu nämä stabilisaattorit ovat kalliita ja näitä stabilisaattoreita sisältävien liposomien valmistaminen ei ole edullista. 4) Lopuksi probleema, joka tulee vastaan liposomien käytössä kantajina lääkkeiden antosysteemeissä, on kykenemättömyys saada aikaan paranemista taudissa, jota hoidetaan. Paitsi kykenemättömyys estää nopeata lääkkeen ulosvuotamista niin, että lääke vapautuisi viivytetysti, ovat useat muutkin selitykset mahdollisia sille seikalle, ettei tauteja voida parantaa. Esimerkiksi, jos liposomit saadaan sisään kohdesoluihin tai fagosyyttisoluihin (so. retikuloendotelialisoluihin), ne poistuvat nopeasti systeemistä tehden suljetun lääkkeen hyvin tehottomaksi muiden kuin RES-solujen sairauksien suhteen. Fagosytoosin jälkeen liposomien sisällöt menevät sisään fagosyyttisolujen lysosomeihin. Hyvin usein lysosomin sisällä olevat degradoivat entsyymit degradoivat sisään suljetun yhdisteen tai tekevät yhdisteen inaktiiviseksi muuttamalla sen rakennetta tai lohkaisemalla yhdisteen sen aktiivisesta kohdasta. Lisäksi saattaa olla, että liposomit eivät luovuta annosta, joka olisi kyllin tehokas johtuen aktiivisen yhdisteen alhaisesta sulkemistehokkuudesta rakkuloihin valmistuksen aikana.

Liposomeja ovat tutkijat käyttäneet myös mallimembraanisysteeminä ja "kohdesoluna" komplementin välittämissä immunokokeissa. Näissä kokeissa käytettyinä on kuitenkin tärkeätä, että liposomimembraani ei vuoda, kun sitä inkuboidaan seerumissa, koska nämä kokeet mittaavat liposomin sisällön vapautumista seerumikomplementin aktivoitumisen funktiona immunikompleksin muodostumisen kautta, joihin kuuluu joitakin immunoglobuliiniluokkia (esimerkiksi IgM- ja jotkut IgG-molekyylit).

Tämä keksintö esittelee uuden ja olennaisesti parannetun lipidirakkuloiden tyyppin, joita tästä lähtien tullaan nimittämään

stabiileiksi plurilamellisiksi rakkuloiksi (SPLV). Paitsi että ne ovat rakenteeltaan erilaisia kuin multilamelliset rakkulat (MLV), SPLV-rakkulat myös valmistetaan eri lailla kuin MLV:t, niillä on ainutlaatuisia ominaisuuksia verrattuna MLV-rakkuloihin ja niillä on useita etuja verrattuna MLV:n vastaaviin ominaisuuksiin. Näistä eroavaisuuksista johtuen SPLV:n ansiosta voidaan voittaa useita probleemeja, joita esiintyy aikaisemmin saatavissa olevien konventionaalisten lipidirakkuloiden yhteydessä. Keksinnön oleelliset tunnusmerkit on esitetty oheisissa patenttivaatimuksissa.

Kun SPLV-rakkuloita syntetisoidaan, muodostuu heterogeeninen lipidirakkuloiden seos. On ilmeistä, että lipidit SPLV:ssa ovat järjestyneet aivan uudeksi supramolekulaariseksi rakenteeksi. Useissa lipidirakkuloissa on hyvin suuri lukumäärä kaksoiskerroksia, toisinaan jopa niin suuri lukumäärä kuin sata kerrosta. Saattaa olla mahdollista, että tämä korkea kerroslukuaste osaltaan vaikuttaa useihin SPLV:n yllättäviin ominaisuuksiin, vaikka selitykset ovat pelkästään teoreettisia.

SPLV:llä on seuraavia ominaisuuksia: 1) SPLV:n huomattavasti lisääntynyt stabiilisuus puskurissa säilytyksen aikana; 2) SPLV:n parempi kyky kestää kovia fysiologisia ympäristöjä; 3) materiaalien kapseloiminen erittäin tehokkaassa määrässä; 4) kyky kiinnittyä kudoksiin ja soluihin pitkiksi ajanjaksoiksi; 5) kyky vapauttaa suljetut materiaalit viivytetysti ruumiin nesteisiin; 6) liposomaali-sisällön tuominen ja lopuksi dispergoiminen kohdesolun sytosoliin kauttaaltaan; 7) valmistuksen edulliset kustannukset; ja 8) yhdisteiden vapautuminen biaktiivisissa muodoissaan in vivo.

SPLV:ien ainutlaatuisten ominaisuuksien ansiosta ne ovat erikoisen käyttökelpoisia kantajina antosysteemeissä in vivo, koska ne estävät lääkkeen poisvuotamista ja pystyvät vapauttamaan lääkkeen viivytetysti. Seuraavassa selostetaan menetelmiä SPLV:n käyttämiseksi bioaktiivisten yhdisteiden antamiseksi in vivo ja patologioiden, kuten infektioiden hoitoon.

Kuvioiden selitys

Kuvio 1 esittää graafisesti membraanin stabilisuuden eroa (mikä käy ilmi vuotoprosentista) MLV:n ja SPLV:n välillä, joita käsitellään eri suuruisilla urean konsentraatioilla.

Kuvio 2 esittää graafisesti SPLV:n lipidi- ja vesifaasien pidätyskykyä silmäluomen kudoksissa hiirellä ja gentamysiinin viivytettyä vapautumista SPLV:stä in vivo.

Kuvio 3 esittää SPLV:n elektroni-spin-resonanssi-absorptiospektriä A) verrattuna MLV:n vastaavaan.

Kuvio 4 esittää graafisesti askorbaatin erilaista kykyä pelkistää doksyyli-spin-näytteitä SPLV:ssä ja MLV:ssä.

Kuvio 5 esittää graafisesti kaksivaiheisen hoidon tehokkuutta hiirellä oleviin *Brucella canis*-infektioihin käyttämällä SPLV:in suljettua streptomysiiniä, joka infektio perustuu infektoituneiden hiirien pernasta saatavaan *B.canikseen*.

Kuvio 6 esittää graafisesti kaksivaiheisen hoidon tehokkuutta hiirellä oleviin *B.canis*-infektioihin käyttämällä SPLV:hen suljettua streptomysiiniä, joka infektio perustuu infektoituneiden hiirien elimistä saatavaan *B.canikseen*.

Kuvio 7 esittää graafisesti kaksivaiheisen hoidon tehokkuutta marsuilla oleviin *Brucella abortus*-infektioihin käyttämällä SPLV:n suljettua streptomysiiniä.

SPLV:den valmistus

SPLV:tä valmistetaan menetelmän avulla, jolla saadaan tuotetta, joka on ainutlaatuista mihin muuhun tahansa edellä selostettuun liposomiin nähden.

SPLV:t ovat lipidirakkuloita, joissa on muutamasta harvasta yli sataan lipidi-kaksoiskerrosta. Membraanin kaksoiskerros muodostuu bimolekulaarisesta, amfipaattista lipidiä olevasta kerroksesta, jossa ei-polaariset hydrofobiset hiilivety-"häntäpäät" osoittavat sisäänpäin kohti kaksoiskerroksen keskusta ja polaariset, hydrofiiliset "etupäät" osoittavat kohti vesifaasia. Kaksoiskerrosten sisäänsä sulkemana on vesilokero, jonka osa muodostaa rakkulan ontelon ja jonka yksi osa on viereisten kerrosten välissä. Lipidikerrosten kanssa kompleksoitu-

neena voi olla useita proteiineja, glykoproteiineja, glykolipidejä, mukopolysakkarideja ja mitä muuta hydrofobista ja/tai amfipaattista ainetta tahansa.

SPLV:tä valmistetaan seuraavasti: amfipaattinen lipidi tai lipidien seos liuotetaan orgaaniseen liuottimeen. Monet orgaaniset liuottimet ovat sopivia, mutta parhaina pidetään dietyylieetteriä, fluorattuja hiilivetyjä ja fluorattujen hiilivetyjen ja eetterin seoksia. Tähän liuokseen lisätään vesifaasi ja aktiivinen, suljettava aineosa. Tämä bifaasinen seos konvertoitetaan SPLV:ksi emulgoimalla vesimateriaali liuottimen kanssa ja haihduttamalla liuotin. Haihdutus voidaan suorittaa ääniaalloilla käsittelyn aikana tai sen jälkeen millä haihdutustekniikalla hyvänsä, esimerkiksi panemalla inertti kaasu virtaamaan seoksen yli, kuumentamalla tai vakuuissa. Käytetyn liuottimen volyymin tulee olla riittävästi suurempi kuin vesimäärä, niin että vesipitoinen materiaali voidaan täydelleen emulgoida seokseen. Käytännössä voidaan karkeasti käyttää ainakin noin 3 volyymiä+1 volyymiä kohti vesifaasia. Todellisuudessa voi liuottimen ja vesifaasin suhde vaihdella jopa 100 volyymiin tai useampaan volyymiin 1 volyymiä kohti vesifaasia. Lipidin määrän tulee olla riittävä, niin että se ylittää sen määrän, joka on tarpeen emulsiopisaroiden päällystämiseen (noin 40 mg lipidiä per ml vesifaasia). Yläraja on vain käytännöllisistä kustannussyistä, mutta SPLV:tä voidaan tehdä käyttäen 15 g lipidiä per 1 ml vesifaasia.

Menetelmässä valmistetaan lipidirakkuloita, joissa on erilainen supermolekulaarinen järjestelmä kuin konventionaalisissa liposomeissa. Kyseessä olevan keksinnön mukaan voidaan koko menetelmä suorittaa lämpötilavälillä 4-60°C huolimatta siitä, mikä on käytetyn lipidin faasin transitiolämpötila. Tämän jälkimmäisen seikan etu on siinä, että kuumalabiileja aineita, joilla on haluttuja ominaisuuksia, esimerkiksi helposti denaturoituvia proteiineja, voidaan tuoda SPLV:hen, jotka on valmistettu fosfolipidistä kuten distearyylifosfatidyylikoliinista, mutta joita voidaan muuttaa konventionaalisiksi liposomeiksi

ainoastaan niiden faasin transitiolämpötilan yläpuolella. Menetelmä mahdollistaa tavallisesti yli 20 % käytettävissä olevasta vesiliukoisesta materiaalista kapseloitavaksi ja yli 40 % käytettävissä olevasta lipidi-liukoisesta materiaalista kapseloitavaksi. MLV:den avulla ei vesifaasin sulkeminen tavallisesti ylitä 10 %.

Useimmat amfipaattiset lipidit voivat olla SPLV:den aineksena. Sopivia hydrofiilisiä ryhmiä ovat, mutta eivät rajoitu niihin: fosfaatti-, karboksyyli-, sulfaatti- ja aminoryhmä. Sopivia hydrofobisia ryhmiä ovat, mutta eivät rajoitu niihin: tyydyttyt ja tyydyttämättömät alifaattiset hiilivetyryhmät ja alifaattiset hiilivetyryhmät, joissa on substituentteina ainakin yksi aromaattinen ja/tai sykloalifaattinen ryhmä. Parhaina pidettyjä amfipaattisia yhdisteitä ovat fosfolipidit ja läheistä sukua olevat kemialliset rakenteet. Esimerkkejä näistä ovat, mutta eivät rajoitu niihin: lesitiini, fosfatidyylietanoliamiini, lysolesitiini, lysofatidyylietanoliamiini, fosfatidyyliiseriini, fosfatidyyli-inositoli, sfingomyeliini, kardiolipiini, fosfatidii-nihappo ja serebrosidit. Spesifisiä esimerkkejä sopivista lipideistä ovat SPLV:den valmistuksessa fosfolipidit, joita ovat luonnon lesitiinit (esimerkiksi munalesitiini tai soi-japapulesitiini) ja synteettiset lesitiinit kuten tyydytetyt synteettiset lesitiinit (esimerkiksi dimyristyyli-fosfatidyylikoliini tai dipalmityyli-fosfatidyylikoliini tai distearyyli-fosfatidyylikoliini) ja tyydyttämättömät synteettiset lesitiinit (esimerkiksi diolyyli-fosfatidyylikoliini tai dilinolyyli-fosfatidyylikoliini). SPLV-kaksoiskerrokset voivat sisältää steroidikomponentin kuten: kolesteroli, koprostanoli, kolestanoli, kolestaani ym. Kun käytetään yhdisteitä joissa on hydrofiilisiä happamia ryhmiä (fosfaatti-, sulfaatti- jne.) on saatu SPLV anioninen; emäksisten ryhmien kanssa kuten amino, saadaan kationisia liposomeja; ja polyetyleenioksi- tai glykoliryhmien kanssa neutraaleja liposomeja. SPLV:den koko vaihtelee suuresti. Kokorajat ulottuvat noin 500 nm:stä noin 10 000 nm:iin (10 μ m) ja tavallisesti noin 1000 nm:stä noin 4000 nm:iin.

Käytännöllisesti katsoen voidaan mitä tahansa bioaktiivista yhdistettä sulkea SPLV:den sisään (sulkeminen määritellään tarkemmin sulkemiseksi vesilokeron sisään tai membraanikaksoiskerroksen sisään). Tällaisia yhdisteitä ovat, mutta eivät rajoitu niihin: nukleiinihapot, polynukleotidit, bakteereja, viruksia, sieniä, parasiitteja hävittävät aineet, tuumorin kehittymistä ehkäisevät aineet, proteiinit, toksiniit, entsyymit, hormonit, neurotransmitterit, glykoproteiinit, immunoglobuliinit, immunomodulaattorit, väriaineet, radioaktiiviset merkkiaineet, radioaaltoja läpäisemättämät aineet, fluoresoivat aineet, polysakkaridit, solun reseptoreja sitovat molekyylit, tulehduksia ehkäisevät aineet, glaukoomia hoitavat aineet, mydriaattiset yhdisteet, paikallispuudutusaineet jne.

Seuraavassa on esimerkki määrasuhteista, joita voidaan käyttää SPLV-synteesissä: SPLV:tä voidaan valmistaa lisäämällä 5 mmol fosfolipidiä 5 ml:aan dietyylieetteriä, joka sisältää 5 µg BHT:tä (butyylihydroksitolueeniä) ja lisäämällä sitten 0,3 ml vesifaasia, joka sisältää aktiivisen, kapseloitavan aineen. Saatava liuos, joka sisältää suljettavan materiaalin ja sulkemisesä käytettävän lipidin, käsitellään ääniaalloilla antamalla samalla inertin kaasun virrata seoksen yli ja poistamalla täten suurimman osan liuotinta. Tämän toteutusmuodon avulla saadaan erikoisen stabiileja SPLV:tä osittain sen vuoksi, että BHT:tä lisätään rakkuloihin.

Ks. myös Lenk et al., 1982, Eur.J.Biochem. 121:475-482, jossa tehdään selkoa menetelmästä liposomiin kapseloitujen vasta-aineiden valmistamiseksi käsittelemällä ääniaalloilla ja haihduttamalla kolesterolin ja fosfatidyylikoliinin liuos kloroformin ja eetterin seoksessa, johon on lisätty vesifaasi, mutta selostuksessa ei ilmoiteta lipidin ja vesifaasin suhteellisia määriä.

SPLV:den karakterisointi

SPLV:t ovat selvästi erilaisia ominaisuuksiltaan kuin liposomit, jotka ovat yksi- tai monilamellisia (esimerkiksi SUV:t ja REV:t). Pakaste-fraktuura-elektroni-mikroskopia ilmoittaa,

että SPLV-valmisteet ovat käytännöllisesti katsoen vapaita SUV:stä ja REV:stä, eli alle 20 % rakkuloista on unilamellisia. Niitä ei voida kuitenkaan erottaa MLV:stä elektronimikroskooppitekniikalla, vaikka useat niiden fysikaalisista ominaisuuksista ovat erilaisia. Seuraava yksityiskohtainen vertailu on täten kohdistunut SPLV:den erottamiseen MLV:stä.

SPLV:den stabiilisuus varastoitaessa

Lipidirakkulan stabiilisuus viittaa rakkulan kykyyn sekvestroida sen suljettu tila ulkopuoliselta ympäristöltä pitkän ajanjakson. Lipidirakkulalle on kaikkein tärkeintä ollakseen käyttökelpoinen, että se on stabiili varastoitaessa ja käsiteltäessä. Joissakin muissa käyttötarkoituksissa kuitenkin on suotavaa, että rakkula antaa sisältönsä vuotaa hitaasti ulos, kun sitä pannaan kohteeseen. Joissakin muissa käyttötarkoituksissa on suotavaa, että rakkula pysyy ehjänä lääkkeeksi antamisensa jälkeen kunnes se pääsee haluttuun vaikutuskohtaansa. Seuraavassa tullaan näkemään, että SPLV:llä on nämä halutut ominaisuudet, kun taas MLV:llä ei ole niitä.

On olemassa kaksi syytä, miksi rakkulat rupeavat vuotamaan. Toinen on lipidien auto-oksidointuminen, jolloin hiilivetyketjut muodostavat peroksideja, jotka destabiloivat kaksoiskerrokset. Tätä oksidointumista voidaan hidastaa äkkiyrkästi lisäämällä hapettumista ehkäiseviä aineita kuten butyylihydroksitolueeniä (BHT) rakkuloiden valmistuksessa. Rakkulat voivat vuotaa myös sen vuoksi, koska ulkopuolisessa ympäristössä olevat aineet hajottavat lipidien kaksikerrosjärjestelmän siten, että lipidit jäävät koskemattomiksi, mutta membraaniin kehittyy aukko.

Lipidirakkulavalmisteet ovat ensiksi valkoisia. Auto-oksidation tapahduttua valmiste muuttuu väriltään (ruskehtavaksi). Kun verrataan MLV:tä SPLV:hen, jotka on valmistettu käyttäen samaa lipidia ja vesipitoisia komponentteja, havaitaan että MLV:t muuttuvat väriltään yhden tai kahden viikon kuluessa, kun taas SPLV:t pysyvät valkoisina ainakin kaksi kuukautta.

Tätä tukee ohutlevykromatografiatutkimus aineosina käytetyistä lipideistä, mikä paljasti lipidien hajoamisen MLV:ssä mutta ei SPLV:n lipideissä. Kun näitä rakkuloita valmistetaan lisäämällä BHT:tä samoin kuin muita aineosia, MLV:t näyttävät hieman värjäytyneiltä yhden kuukauden kuluttua, kun taas SPLV:t pysyvät valkeina ja näyttävät stabiileilta ainakin 6 kuukautta ja jopa kauemmin.

Kun ne pannaan puskuriin, joka sisältää isotonista suolaliuosta pH:n ollessa neutraali, ovat SPLV:t, jotka sisältävät antibiootteja, stabiileja yli neljä kuukautta kuten on esitetty taulukossa I. Nämä datat ilmoittavat, ettei mikään antibiootti, joka alunperin kapseloitiin SPLV:den sisään, vuotanut ulos kokeen ajanjakson kuluessa.

Myös muut tosiseikat vahvistavat, että SPLV:t pystyvät pidättämään kapseloidun aineen erillään niin pienistä molekyyleistä kuin kalsiumioneista yli kuuden kuukauden ajan. Arsenazo III on väriaine, jonka väri muuttuu punaisesta siniseksi silloin kun pienen pieni määrä kaksiarvoista kationia on läsnä. Kun kapseloidaan tätä väriainetta SPLV:hen ja lisätään kalsiumkloridia varastointipuskuriin, on mahdollista mitata rakkuloiden stabiilius tutkimalla värin vaihtumista. Väri pysyy jatkuvasti muuttumattomana alkuperäisestä väristään ainakin 6,5 kuukautta todistaen sen, ettei väriainetta ole vuotanut ulos, eikä ioneja ole päässyt sisään.

Taulukko I

Munan fosfatidyylikoliinia sisältävien SPLV:den stabiilisuus sen jälkeen kun niitä on varastoitu suljetuissa säiliöissä 4°C:ssa 4 1/2 kk ajan^a

Kapseloitu lääke	Kapseloimis-määrä %:ssa alussa	Vuoto päällä kelluvaan ^b nesteeseen ^b	Kapseloidun lääkkeen määrä %:ssa, joka on bioaktiivista
Streptomysiini-sulfaatti	34,1	0	97
Spektinomysiini	37,2	0	84
Klooriamfenikoli	35,2	0	89
Oksitetrasykliini	18,8	0	91
Erytromysiini	0,4	0	97
Sulfameratsiini	6,3	0	93

^aSPLV:tä valmistettiin käyttäen 127 μ M munan fosfatidyylikoliinia (EPC) ja 25 μ M lääkettä. 4,5 kk:n varastoinnin loppupuolella 4°C:ssa SPLV:t erotettiin varastointipuskuriliuoksesta sentrifugoimalla. SPLV:n sisällön ja päällä olevan nesteen sarjalaimennuksia pantiin bakteerikentille bioaktiivisuuden määrittämistä varten ja verrattiin antibiootin standardilaimennuksiin.

^b0 ilmoittaa aineen määriä, jotka ovat havaitsemisen alapuolella.

Nämä kokeet osoittavat, että SPLV:t ovat riittävän stabiileja kestämaan varastointia ja käsittelyvaikeuksia. Vaikka onkin mahdollista valmistaa MLV:tä, jotka ovat näin kauan stabiileja, ne täytyy tehdä synteettisistä lipideistä kuten DSPC ja ne tulevat täten liiallisen kalliiksi.

SPLV:den stabiilisuus muissa ympäristöissä

Lipidirakkuloiden paneminen väliaineeseen, joka sisältää membraania hajottavia aineita, on tapa kokeilla erilaisia molekyylijärjestelmiä. Riippuen siitä, kuinka membraani on rakentunut, eri rakkulat antavat erilaisen vasteen tällaisiin aineisiin.

Seuraavissa kokeissa rakkuloita valmistettiin siten, että ne sisälsivät radioaktiivisen merkkimolekyylin (^3H inuliinin) suljetussa vesilokerossa. Inuliini, eräs polysakkaridi, jakaantuu vesifaasiin ja kun se on radioaktiivisesti merkitty, sitä voidaan käyttää lipidirakkuloiden sisällön seurantaan.

Kun rakkuloiden oli annettu olla jokin sopiva aika määrätyn aineen vaikutuksen alaisena, ne erotettiin väliaineesta sentrifugoimalla ja määrättiin radioaktiivisuuden suhteellinen määrä, joka pääsi karkuun rakkuloista väliaineeseen. Nämä tulokset on ilmoitettu taulukossa II; arvot on ilmoitettu vuotoprosentteina, mikä merkitsee radioaktiivisen materiaalin suhteellista osuutta ympäröivässä väliaineessa suhteessa rakkuloihin kapseloituun määrään alussa.

SPLV:t ovat stabiilimpia kuin MLV:t kloorivetyhapossa. Taulukko II ilmoittaa, että sekä MLV:t että SPLV:t, kun ne on tehty munalesitiinistä, tulevat epästabiileiksi, kun niihin vaikuttaa 0,125 N kloorivetyhappo yhden tunnin ajan. On kuitenkin huomattava, että SPLV:t ovat selvästi vähemmän herkkiä hapolle kuin MLV:t. Oletettavasti tämä erilainen vaste kuvastaa lipidien luontaista erilaisuutta reagoinnissa ympäristön suhteen.

Taulukko II

SPLV:den stabiilisuus muissa ympäristöissä

Inkubointiväliaine ^a	Vuoto-%	
	<u>MLV:t</u>	<u>SPLV:t</u>
Kloorivetyhappo 0,125M	90,5	55,2
Urea 1M	21,7	44,8
Guanidiini 0,5M	5,7	7,4
1,0M	8,3	10,1
Ammoniumasetaatti 0,5M	27,0	67,0
1,0M	25,9	54,7-63,1
Seerumi	76,2	57,8

^aInkubointiaika on 2-4 h, paitsi inkubointi HCl:ssä, joka oli 1 h.

SPLV:den vaste on myös erilainen kuin MLV:llä, kun annetaan urean vaikuttaa niihin (kuvio 1 ja taulukko II). Urea on molekyylili, jolla on sekä kaotrooppinen vaikutus (hajottaa veden rakenteen) että voimakas dipolimomentti. On havaittu, että SPLV:t ovat paljon herkempiä urealle kuin jollekin osmoottiselle aineelle kuten natriumkloridille samassa konsentraatiossa (kuvio 1). MLV:t eivät vuoda selvästi enemmän ureassa kuin mitä ne vuotavat natriumkloridissa. Vaikka tämän erilaisen käyttäytymisen selitykset ovat teoreettisia, näyttää siltä että vaste johtuu dipolivaikutuksesta ennemmin kuin kaotrooppisesta ominaisuudesta, koska guanidiini, samanlainen molekyylili kuin urea, ei tee SPLV:tä epästabiileiksi (taulukko II). Vaikka guanidiini on myös voimakkaasti kaotrooppinen, sillä ei ole voimakasta dipolimomenttia.

SPLV:t ovat herkkiä myös ammoniumasetaatille, kun taas MLV:t eivät ole (taulukko II). Mutta ei ammoniumioni (ammoniumkloridissa) eikä asetaatti (natriumasetaatissa) ole kumpikaan erikoisen tehokkaita SPLV:n destabiloimisessa. Täten näyttäisi siltä, että ei itse ioni vaan ammoniumasetatin polaarisuus on syynä vuodon indusoimiseen.

Aluksi nämä tulokset näyttävät yllättäviltä, koska SPLV:t ovat paljon stabiilimpia kuin MLV:t kun niitä inkuboidaan ruumiin nesteissä kuten seerumissa tai veressä. Voidaan kuitenkin ehdottaa jotakin teoreettista selitystä näille tuloksille (muutkin selitykset ovat tietenkin mahdollisia). Jos SPLV:den stabiilisuus perustuu sen membraanin kaksoiskerrosten ainutlaatuiheen rakenteeseen, jossa membraanin lipidien polaariset ryhmät ovat suunnattujen vesimolekyylien pilven tai hydraatiokuoren hydratoimia, silloin on mahdollista, että mikä tahansa aine, joka hajottaa tai häiritsee tällaisia hydratointikuoria, saa aikaan muutoksia membraanin rakenteen kokonaisuuteen, ja siten vuotamista.

Riippumatta siitä, ovatko teoreettiset selitykset SPLV:den stabiilisuuden hajoamisesta ureassa oikeita, osoittavat tulokset

karakteristisia eroavaisuuksia MLV:den ja SPLV:den rakenteessa. Tätä eroavaisuutta voidaan käyttää hyvin hyödylliseen tarkoitukseen käytännössä. Kuten edellä on selostettu, SPLV:t tulevat vain hitaasti vuotaviksi kun niitä pannaan silmään. Tämä haluttu sisällön hidas vapautuminen johtuu oletettavasti samanlaisesta destabiloitumisesta, kun SPLV:t joutuvat kyynel-nesteen vaikutuksen alaisiksi.

SPLV:t ovat stabiilimpia seerumissa kuin MLV:t. Lipidirakkuloiden useihin käyttötapoihin kuuluu niiden antaminen intraperitoneaalisesti kuten esimerkiksi brusellosiksen hoitamiseen. Ollakseen tehokkaita on rakkuloiden pysyttävä ehjinä riittävän kauan päästäkseen perille kohteeseensa. SPLV:t ja MLV:t, jotka on molemmat valmistettu munalesitiinistä, pantiin fetaali härän seerumiin, joka sisälsi aktiivisen komplementin (taulukko II). Kun se oli saanut vaikuttaa 48 h 37°C:ssa, olivat SPLV:t selvästi stabiilimpia kuin MLV:t.

SPLV:den tyypillisiä ominaisuuksia, kun niitä annetaan in vivo

SPLV:llä on useita tyypillisiä ominaisuuksia, jotka tekevät ne erikoisen sopiviksi kantaja-aineiksi lääkkeen antosysteemeissä in vivo:

A) SPLV:t ovat kestäviä vuotamisen suhteen. Kun SPLV:tä pannaan organismiin, sekä lipidikomponentti että sisään suljettu aktiivinen aineosa pysyvät kudoksissa niiden solujen pidättäminä, joihin ne on tuotu;

B) SPLV:tä voidaan rakentaa sellaisiksi, että ne vapauttavat sisältönsä viivytetysti. SPLV:den stabiilisuutta voidaan "säädellä" siten, että SPLV:t ovat hyvin stabiileja varastoinnin aikana ja ovat samaten stabiileja ruumiin nesteiden sisällä mutta kun niitä annetaan in vivo, saadaan hitaan aktiivisen aineosan vuotamisen ansiosta aktiivisen aineosan viivytetty vapautuminen;

C) Sulkeutuneen määrän suuruuden ja stabiilisuuden ansiosta lääkettä annettaessa vapautuu aktiivista aineosaa tehokas määrä; ja

D) SPLV:den valmistus on kustannuksiltaan edullista sen vuoksi, ettei tarvitse lisätä kalliita stabiloivia aineita kaksoiskerroksiin.

Seuraavat esimerkit osoittavat joitakin näistä SPLV:den tyypillisistä ominaisuuksista kun niitä annetaan ulkoisesti testieläinten silmiin. Näissä kokeissa käytetyt SPLV:t valmistettiin siten kuin edellä on selostettu paitsi että lipidikaksoiskerros ja aktiivinen aineosa tehtiin radioaktiivisiksi näiden komponenttien seuraamista varten silmäkudoksissa jonkin ajan kuluessa.

SPLV:t valmistettiin käyttäen 100 mg munan fosfatidyylikoliinia (EPC) ja 100 mg gentamysiinisulfaattia. Lipidikomponentti tehtiin radioaktiiviseksi lisäämällä hivenmääriä ^{125}I -fosfatidyylietanoliamiinia (^{125}I -PE) kaksoiskerroksiin, kun taas vesifaasin aktiivinen aineosa tehtiin radioaktiiviseksi lisäämällä ^{125}I -gentamysiinisulfaattia (^{125}I -GS). SPLV:t pestiin puskurissa usein, jotta poistettaisiin tehokkaasti aineet, jotka eivät olleet kapseloituneet tai menneet sisään.

Tasaosa SPLV-valmistetta poistettiin ja uutettiin orgaanisen faasin erottamiseksi vesifaasista. Kunkin faasin radioaktiivisuus mitattiin suhteen ^{125}I -PE: ^{125}I -GS määräämiseksi alussa eli cpm (signaaleja per minuutti) lipidifaasissa:spm vesifaasissa), mikä oli pantu SPLV:den sisään.

Uuttaminen tapahtui seuraavasti: 0,8 ml 0,4 M NaCl (vesipitoista), 1 ml kloroformia ja 2 ml metanolia sekoitettiin keskenään homogeeniseksi faasiksi. Sen jälkeen lisättiin 4 μl radioaktiiviseksi merkittyjä SPLV:tä ja sekoitettiin joukkoon; kun SPLV-komponentit liukenivat orgaaniseen faasiin ja vesifaasiin, niin seos, joka oli alussa samea, muuttui kirkkaaksi. Faasit erotettiin lisäämällä ja sekoittamalla siihen 1 ml 0,4 M NaCl

(vesipitoista) ja 1 ml kloroformia, joka sitten sentrifugoitiin 2800 x g 5 min ajan. Määräosa (1 ml) kustakin faasista poistettiin ja radioaktiivisuus (cpm:nä) mitattiin. (Suhde ^{125}I -PE: ^{125}I -GS alussa oli 1,55:1).

Viisitoista täysikasvuista naaraspuolista sveitsiläistä Webster-hiirtä anestesoitiin ja sidottiin kiinni (jotta vältettäisiin silmien hierominen). Yhtä suuret tasamäärät (2 μl) radioaktiiviseksi merkittyjä SPLV:tä suspensiossa siveltiin ulkoisesti kuhunkin silmään. Kolmen eläimen ryhmiä tapettiin sen jälkeen seuraavissa ajankohdissa: 1, 2, 3, 18 ja 24 h kuluttua. Yhdeksää naaraspuolista sveitsiläistä Webster-hiirtä (kontrollit) käsiteltiin identtisesti paitsi että kuhunkin silmään siveltiin ulkoisesti samat tasamäärät (2 μl) radioaktiiviseksi merkittyä gentamysiinisulfaattia. Kolmen kontrollieläimen ryhmiä tapettiin 1, 4 ja 8 h kuluttua.

Heti tappamisen jälkeen eläinten silmäluomet poistettiin, jauhettiin ja uutettiin (käyttäen edellä selostettua menettelytapaa), jotta erotettaisiin vesipitoiset komponentit lipidikomponenteista. Tällaisen faasin radioaktiivisuus määrättiin (samoin kuin saatujen radioaktiivisten signaalien kokonaislukumäärä). Lipidifaasista mitattu radioaktiivisuus ilmaisee silmäkudoksen pidättämät, SPLV-lipidit, kun taas vesifaasista mitattu radioaktiivisuus ilmaisee silmäkudoksessa olevan gentamysiinin pidättämisen. Kuvio 2 esittää graafisesti kummankin komponentin pidättämisen silmäluomen kudoksessa (ilmaistuna prosenteissa alkuperäisestä cpm-lukumäärästä, joka siveltiin silmään).

Kuvio 2 todistaa selvästi SPLV:n lipidikomponentin pysymisen silmäluomen kudoksessa yli 24 h ajan ja gentamysiinin viivytetyn vapautumisen SPLV:stä 24 h aikana (mikä kuvastuu gentamysiinin prosentuaalisesta määrästä, joka pysyy silmäluomen kudoksessa tämän ajan). Kuvio 2 esittää myös sen, että kapseloimaton gentamysiini (vesipitoinen gentamysiini, jota annettiin ulkoisesti) poistui nopeasti silmäluomen kudoksesta. Esimerkiksi gentamysiini liuoksessa (kontrolli) poistui silmäluomen kudoksesta

4 h sisällä (alle 5 % gentamysiinistä jäi silmäluomen kudokseen). Toisaalta yli 50 % SPLV:hin kapseloidusta gentamysiinistä pysyi silmäluomen kudoksessa tänä 4 h aikana; 24 h kuluttua nimittäin yli 15 SPLV:hen kapseloidusta gentamysiinistä oli pysynyt silmäluomen kudoksessa. Tämä osoittaa, että noin 85 % SPLV:hin kapseloidusta gentamysiinistä vapautui 24 h kuluessa kun taas 95 % kapseloimattomasta gentamysiinisulfaattista poistui 4 h aikana.

Taulukko III vertaa suhdetta SPLV-lipidifaasi:silmäluomen kudoksen pidättämä vesifaasi kullakin hetkellä. Tämän suhteen lisääntyminen ilmaisee gentamysiinin vapautumista SPLV:stä.

Mitattiin myös SPLV:hin kapseloidun gentamysiinisulfaatin bioaktiivisuutta, jonka silmäluomen kudokset pidättivät. Gentamysiinisulfaattia otettiin talteen silmäluomen kudoksista ottamalla määräosa silmäluomen uutteen vesifaasista, joka valmistettiin 3 h sen jälkeen kun SPLV:hin kapseloitua gentamysiinisulfaattia oli sivelty silmään. Vesifaasista tehtiin sarjalaimennuksia ja 2 μ l tasamääriä pantiin agarlevyillä olevien *Staphylococcus aureus*-kasvukenttien päälle; 24 h inkuboinnin jälkeen mitattiin inhiboidut alueet. Gentamysiinisulfaatti, joka oli otettu silmäluomen kudosuutteista eläimistä, joita oli käsitelty SPLV:hin kapseloidulle gentamysiinisulfaatilla, säilytti täysin bioaktiivisuutensa.

Taulukko III

SPLV:hin kapseloidun gentamysiinin viivytetty vapautuminen
sen jälkeen kun sitä on pantu ulkoisesti hiirien silmiin

<u>Aika lääkkeen levittämisen jälkeen</u>	<u>SPLV:den komponenttien kokonaismäärä, joka saa- tu silmäluomista (prosentissa annok- sesta alussa)</u>	<u>Suhde SPLV:n lipidi: vesifaasi, joka pysyi silmluomissa ($^{125}\text{I-PE} : ^{125}\text{I-GS}$)</u>
0	100 %	1,55
1 h	100 %	2,1
3 h	100 %	2,82
18 h	94 %	6,89
24 h	85,1 %	7,17

Elektroni-spin-resonanssi

Vaikka SPLV:t ja MLV:t näyttävät identtisiltä elektronimikroskooppisesti, ESR (elektronin-spin-resonanssi)-spektroskopia paljastaa eroavaisuudet niiden supramolekulaarisessa rakenteessa. SPLV:t voidaan erottaa MLV:stä niiden molekyylin "arkkitehtuurin" perustalla, mikä todistaa, että niillä on kehittyneempi molekyylijärjestys, lisääntynyt molekyylin liike ja askorbaatin parempi läpäisevyys. On hyvin luultavaa, että nämä eroavaisuudet molekyylin "arkkitehtuurissa" vaikuttavat osaltaan niiden erilaisiin biologisiin vaikutuksiin.

Elektroni-spin-resonanssi-spektroskopiassa tuodaan spin-näyte kuten esimerkiksi 5-doksyylistearaatti (5DS) lipidikaksoiskerrokseen.

Doksyylyliryhmän pariton elektroni absorboi mikroaaltoenergiaa kun näyte kytketään magneettiseen kenttään. Absorptiospektrin avulla voidaan määrätä kolme empiiristä parametriä: S, järjestysparametri; A_0 , hyperhieno kytkentäparametri; ja Tau, pyörähdyskorrelaatioaika. Tyypillinen lukema on esitetty kuviossa 3, jossa A on SPLV:n signaali ja B on MLV:n signaali ja molemmat on merkitty 5-doksyylistearaatin avulla. Spekitrit otettiin huoneen lämpötilassa, pyyhkäisyalue oli 100 Gauss'ia. Järjestysparametri s), joka on riippuvainen sekä $2 T_1$:stä että $2 T_{11}$:sta,

mittaa havaitun ESR-signaalin deviaation näytteen täydellisen yhtenäisestä suuntauksesta. Yhtenäisesti suunnatulla näytteellä $S = 1,00$, umpimähkäisellä näytteellä $S=0$. Hyperhienon kyt-kentäparametrin, A_0 , joka voidaan laskea $2 T_1$:stä ja $2 T_{11}$:sta, katsotaan kuvastavan paikallista polaarisuutta ja siten spin-näytteen kohtaa membraanin sisällä. Pyörähdys-korrelaatioaika (joka on riippuvainen W_0 :sta, h_0 :sta), $h-l$:stä, voidaan katsoa ajaksi, jonka molekyylit tarvitsevat "unohtaakseen" mitkä olivat niiden edelliset avaruussuunnat. Tyypillinen ESR-määräys eroavaisuuksista SPLV:den ja MLV:den välillä, joilla on 5-DS spin-näytteenä, on koottu taulukkoon IV.

Vaikka molemmissa tapauksissa spin-näyte raportoi samasta kaksoiskerroksen syvyydestä, SPLV:llä on selvästi kehittyneempi-asteinen molekyylijärjestys ja molekyylien liike suurempi kuin MLV:llä.

Vielä eräs eroavaisuuksien havainnollistamismahdollisuus SPLV:den ja MLV:den välillä on askorbaatin kyky pelkistää doksyyli-spin-näytteitä. On tiedetty jo jonkin aikaa, että askorbaatti pelkistää doksyyliosat oletettavasti niiden hydrok-syyliamiini-analogeiksi, jotka eivät absorboi mikroaaltoenergiaa magneettisessa kentässä. Vesiliuoksissa pelkistyminen tapahtuu nopeasti ja samanaikaisesti häviää ESR-signaali. Jos spin-näyte on suojatussa ympäristössä kuten lipidi-kaksoiskerroksessa, se saattaa pelkistyä hitaammin tai ei lainkaan hydrofiilisen askorbaatin vaikutuksesta. Täten nitroksidi-pelkistysastetta voidaan käyttää askorbaatin penetraatioasteen tutkimiseen lipidi-kaksoiskerrokseen. Kuvio 3 esittää jäännös-spin'in prosentuaalista määrää versus SPLV:n ja MLV:n suspendoitumisaika askorbaat-tiliuokseen. 90 min kohdalla askorbaatti on pelkistänyt 25 % MLV:hin suljetusta näytteestä, mutta 60 % SPLV:hin suljetusta näytteestä. SPLV:t mahdollistavat askorbaatin hyvin paljon voimakkaamman penetraation kuin MLV:t.

Taulukko IVSPLV:den ja MLV:den ESR-karakterisointi

	<u>TAU</u>	<u>S</u>	<u>Ao</u>
SPLV:t	$2,65 \times 10^9 \text{ s}$	0,614	14,9
MLV:t	$3,65 \times 10^9 \text{ s}$	0,595	14,9

Aktiivisen materiaalin sulkeminen SPLV:hin

Vielä eräänä erinomaisena esimerkkinä SPLV:den paremmuudesta traditionaalisten MLV:den suhteen mainittakoon, että SPLV:t pystyvät sulkemaan prosentuaalisesti enemmän käytettävissä olevaa aktiivista materiaalia ja säilyttävät materiaalin (ks. taulukkoa V).

SPLV:den vuorovaikutus solujen kanssa

Vielä eräs SPLV:den etu on siinä, että SPLV:llä on solujen kanssa vuorovaikutusta siten, että suhteellisen suuri osa rakkulan sisään kapseloiduista materiaaleista dispergoituu läpi solujen koko sytoplasman, eikä rajoitu fagosyyttisiin rakkuloihin.

Taulukko VMLV:den ja SPLV:den vertailu

<u>Kapseloidut aineet:</u>	<u>Käytettävissä olevasta materiaalista kapseloitu %,</u>	
	<u>MLV:t</u>	<u>SPLV:t</u>
Inuliini (vesipitoinen merkkiaine)	2-6 %	20-30 %
Härän seerumialbumiini	15 %	20-50 %
Streptomysiini	12-15 %	20-40 %
Polyvinyylipyrrolidoni (vesipitoinen merkkiaine)	5 %	25-35 %

Kun SPLV:t sekoitetaan solujen kanssa, nämä molemmat näyttävät sulautuvan yhteen. Yhteensulautumisessa SPLV:t, päinvastoin kuin MLV:t, ovat solujen kanssa vuorovaikutuksessa in vitro niin, että kaikki solut sisältävät ainakin jonkin verran materiaalia, joka on alunperin suljettu SPLV:hin. Tämä materiaali näyttää jakautuvan läpi jokaisen solun, eikä rajoitu ainoastaan fagosyyttisiin rakkuloihin. Tämä voidaan osoittaa lisäämällä

ferritiiniä SPLV-valmisteen vesifaasiin. Yhteensulautumisen jälkeen viljelyssä olevan solun kanssa ultrarakenneanalyysi paljastaa, että ferritiini on jakautunut kauttaaltaan sytosoliin, eikä ole sitoutunut intrasellulaarisiin membraaneihin. Vaikka tämä ilmiö on osoitettu myös MLV:ssä esiintyväksi, SPLV:n avulla voidaan siirtää suurempi määrä materiaalia.

SPLV:den kelluvuustiheys

Edellisten lisäksi on SPLV:llä alempi kelluvuustiheys kuin MLV:llä. Tämä on mitattu sitomalla fikoligradiettiin (ks. taulukkoa VI).

SPLV:den volyymi

Kun SPLV:t kootaan pelletteinä sentrifugoimalla 1000-100 000 x g, ne muodostavat pellettejä, joiden volyymi on huomattavasti suurempi kuin MLV:den samalla annetulla fosfolipidikonsentraatiolla. 16 000 x g voimalla ovat SPLV-pelletit suunnilleen kolmanneksen suurempia kuin MLV:t.

SPLV:den osmoottiset ominaisuudet

Fosfolipidi-kaksoiskerrokset ovat vettä läpäiseviä ja sen vuoksi MLV:den paneminen hypertoniseen ympäristöön ajaa sulkeutuneen veden ulos osmoottisen paineen vuoksi. SPLV:t kutistuvat enemmän kuin MLV:t. Lisäksi kutistuttuaan 16 h puskurissa, joka on 20 kertaa vahvempi kuin sisäinen suolakonsentraatio, SPLV:t eivät kutistu samaan lopulliseen volyymiin kuin MLV:t (SPLV-pelletit pysyvät 1/3 suurempina kuin MLV-pelletit). Tämä todistaa, että eroavaisuus pellettien koossa ei johdu vesipitoisen suljetun volyymin eroavuudesta.

SPLV:den käyttötavat

SPLV:t ovat erikoisen käyttökelpoisia systeemeissä, joissa seuraavat tekijät ovat tärkeitä: stabiilisuus varastoinnin aikana ja kontaktissa ruumiin nesteiden kanssa; suhteellisen korkeasteinen kapselointiaste; edulliset valmistuskustannukset; ja suljetun yhdisteen vapautuminen biologisesti aktiivisessa muodossaan.

Taulukko VI
Kelluvuustiheys

	<u>MLV:t</u>	<u>SPLV:t</u>
fikolissa	kerrokset yli 1 %	kerrokset yli 0,5 %
g/ml	1,071	1,0274

Riippuen antotavasta in vivo, voivat SPLV:t myös olla kestäviä vuodon suhteen (esimerkiksi silloin kun viivytetty vapautuminen on tärkeätä) tai ne voidaan antaa RES:n soluihin.

Edellä olevasta johtuen ovat keksinnön mukaiset SPLV:t käyttökelpoisia hyvin useissa systeemeissä. Niitä voidaan käyttää parantamaan lääkityksen terapeutista vaikutusta, infektioiden hoitoon, parantamaan entsyymien siirtymistä, oraaliseen lääkkeen antoon, ulkoiseen lääkkeen antoon, geneettisen tiedon viemiseen soluihin in vitro ja in vivo, rokotteiden tuottamiseen, rekombinanttien deoksiribonukleiinihapposegmenttien tuomiseen soluihin, tai diagnostisina reagensseina kliinisisissä kokeissa, jotka seuraavat suljettujen "tiedonantaja"-molekyylien vapautumista. SPLV:tä voidaan käyttää myös kapseloimiseen kosmeettisia valmisteita, pestisidejä, yhdisteitä, jotka viivytetysti vapautuessaan lisäävät kasvien kasvua ym.

Seuraavissa menetelmissä, jotka selostavat SPLV:den käyttöä, tarkastellaan SPLV:den tai minkä muun liposomi- tai lipidirakulan käyttöä, joilla on funktionaalisia yhtäläisyyksiä SPLV:den kanssa.

Bioaktiivisten yhdisteiden antaminen lääkkeeksi

Yhdisteiden tuominen soluihin in vitro (esimerkiksi eläinsoluihin, kasvisoluihin, alkueliöihin jne.) vaatii tavallisesti että yhdistettä sisältävät SPLV:t lisätään viljelyssä oleviin soluihin. SPLV:tä voidaan kuitenkin käyttää myös antamaan yhdisteitä in vivo eläimille (myös ihmiselle), kasveille ja alkueliöille. Riippuen antamistarkoituksesta voidaan SPLV:tä antaa hyvin useita antoteitä; ihmiselle ja eläimelle seuraavasti, vaikka antotapa ei rajoitukaan näihin: injektion avulla (esimerkiksi intravenööttisesti, intraperitoneaalisesti, intramuskulaarisesti, subkutaani-

sesti, intra-aurikulaarisesti, intramammaarisesti, intrauretraaliseksi jne.), ulkoisesti (esimerkiksi sairastuneisiin kohtiin) ja absorption kautta epiteelin tai limakalvon läpi (esimerkiksi okulaariepiteeli, suun limakalvo, rektaali- ja vaginaaliepiteelikalvot, hengitystiekalvot, nenä-nielu-limakalvot, suolen limakalvot jne.), kasveille ja alkueliöille, vaikka ei olekaan rajoitettu, antotapa on: suora antaminen organismiin, dispergoiminen organismin olinpaikkaan, lisääminen ympäristöön tai ympäröivään veteen jne.

Lääkkeen antotapa saattaa myös määrätä kohdat ja solut organismissa, mihin yhdiste annetaan. Esimerkiksi johonkin määrättyyn infektiokohtaan antaminen voidaan suorittaa helpoimmin ulkoisesti sivelemällä (jos infektio on ulkoinen). Verenkiertosteemiin (ja siis retikuloendoteelisoluihin) anto voidaan suorittaa kaikkein helpoimmin intravenöösin, intraperitoneaalisen, intramuskulaarisen tai subkutaanisen injektion avulla.

Koska SPLV:t mahdollistavat yhdisteen viivytetyn vapautumisen, voidaan annoksia, jotka muuten voisivat olla toksisia organismille, antaa yhtenä tai useampana antokertana organismiin.

Seuraavissa jaksoissa selostetaan SPLV:den käyttämisen yleiskaavoja ja ne valaisevat, mutta eivät rajoita kyseessä olevan keksinnön piiriä.

Patologisten tilojen hoito

Useita patologisia tiloja, joita esiintyy ihmisellä, eläimillä ja kasveilla, voidaan hoitaa tehokkaammin kapseloimalla sopiva yhdiste tai yhdisteet SPLV:hin. Näitä patologisia tiloja ovat, mutta eivät rajoitu niihin, infektiot (intrasellulaarinen ja ekstrasellulaarinen), kystat, tuumorit ja tuumorisolut, allergiat jne.

On mahdollista käyttää useampaakin strategiaa SPLV:den käyttämisessä tällaisten patologisten tilojen hoidossa; seuraavassa selostetaan joitakin yleiskaavoja, jotka ovat erikoisen käyttö-

kelpoisia sen seikan ansiosta, että SPLV:t annetaan in vivo makrofagien sisään.

Erään suunnitelman mukaisesti käytetään SPLV:tä terapeuttisten aineiden antamiseksi intrasellulaarisiin infektiokohtiin. Joissakin sairauksissa esiintyy retikuloendoteelisysteemin solujen infektiota, esimerkiksi bruselloosissa. Nämä intrasellulaariset infektiot ovat vaikeita parantaa useista syistä: 1) koska infektoituneet organismit sijaitsevat solujen sisällä retikuloendoteelisysteemissä, ne ovat sekvestroituneina kiertäviltä terapeuttisilta aineilta, jotka eivät voi läpäistä solumembraania terapeuttisesti riittävässä konsentraatiossa ja sen vuoksi ne ovat erittäin resistenttejä hoidon suhteen; 2) usein tarvitaan toksisia määriä terapeuttisia aineita tällaisten infektioiden voittamiseksi; ja 3) hoidon on oltava täysin tehokas, koska mikä tahansa jäännösinfektio hoidon jälkeen voi infektoida uudelleen isäntäorganismin tai voi siirtyä toisiin isäntiin.

Erään kyseessä olevan keksinnön toteutusmuodon mukaisesti annetaan SPLV:tä, jotka sisältävät sopivaa biologisesti aktiivista yhdistettä (mieluummin intraperitoneaalisesti tai intravenööttisesti) isäntäorganismiin tai potentiaaliseen isäntäorganismiin (esimerkiksi eläinlaumoja, yhtä hyvin infektoitumattomia kuin infektoituneita eläimiä voidaan hoitaa). Koska fagosyyttisolut ottavat sisäänensä SPLV:t, voidaan antamalla SPLV:tä, jotka sisältävät kapseloitua biologisesti infektiio-organismeja hävittävästi vaikuttavaa ainetta, suunnata bioaktiivinen aine infektiokohtaan. Kyseessä olevan keksinnön mukaista menetelmää voidaan siten käyttää eliminoimaan infektiota, jonka voi aiheuttaa jokin seuraavista useista mikro-organismeista, bakteereista, parasiiteista, sienistä, mykoplasmoista ja viruksista, mutta ei näihin rajoittuen: *Brucella* spp., *Mycobacterium* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Francisella* spp., *Histoplasma* spp., *Corynebacterium* spp., *Coccidioides* spp. ja lymfosyyttinen koriomeningitis-virus.

Valittu terapeuttinen aine riippuu infektiota aiheuttavasta organismista. Bakteeri-infektiot voidaan esimerkiksi torjua

kapseloimalla antibioottia. Antibiootti voi olla jossakin vesipitoisessa nesteessä SPLV:den sisällä ja/tai kiinnittyneenä rakkulan kaksoiskerrokseen. Sopivia antibiootteja ovat, mutta eivät rajoitu näihin: penisilliini, ampisilliini, hetasilliini, karbensilliini, tetrasykliini, tetrasykliini-hydrokloridi, oksitetrasykliini-hydrokloridi, klooritetrasykliini-hydrokloridi, 7-kloori-6-dimetyylitetrasykliini, doksisykliini-monohydraatti, metasykliini-hydrokloridi, minosykliini-hydrokloridi, rolitetrasykliini, dihydrostreptomysiini, streptomysiini, gentamysiini, kanamysiini, neomysiini, erytromysiini, karbomysiini, oleandomysiini, troleandomysiini, polymyksiini-B-kollistiini, natriumkefalotiiini, kefaloridiini, kefaloglysiini-dihydraatti ja kefaleksiini-monohydraatti.

Tällaisten hoitojen tehokkuus on osoitettu parantamalla bruselloosi (ks. esimerkkejä jäljempänä). Tämän keksinnön mukaisten stabiilien plurilamellisten rakkuloiden avulla voidaan toimenpiteen tehokkuutta ja kestoaikaa pidentää. On yllättävää, että tämä systeemi on tehokas sellaisten infektioiden hoitamisessa, joihin eivät tunnetut hoidot, kuten MLV:hin suljetut antibiootit tehoa. Tuloksellinen hoito on odottamatonta, koska mitkä tahansa vähäiset jäännösinfektiot leviävät ja infektiosykli alkaa uudestaan. Samoin on osoitettu menestystä lymfosyyttisen koriomeningitis-virus infektion hoidossa.

SPLV:t voidaan ohjata useihin eri infektiokohtiin, intra- ja ekstrasellulaarisiin. Eräässä toisessa kyseessä olevan keksinnön toteutustavassa esim. käytetään makrofageja aktiivisen aineen kantajana systeemisen ekstrasellulaarisen infektion kohtaan. Tämän ohjelman mukaisesti käytetään SPLV:tä terapeuttisen aineen antamiseen ei-infektoituneille makrofageille siten, että SPLV:t annetaan in vivo (mieluiten intraperitoneaalisesti tai intravenööttisesti). Makrofagit yhtyvät SPLV:den kanssa ja "kuormittuvat" terapeuttisella aineella; makrofagit pidättävät aineen tavallisesti 3-5 päivän ajan.

Kun "kuormitetut" makrofagit pääsevät infektiokohtaan, makrofagit ottavat sisäänsä patogeenin. Tästä johtuen patogeeni joutuu kontaktiin terapeuttisen aineen kanssa, joka on makrofagin sisällä ja se tuhoetaan. Tämä keksinnön toteutusmuoto on erikoisen hyödyllinen *Staphylococcus aureus* mastitiuksen hoitamiseen ihmisellä ja karjassa.

Jos infektoitunut tai sairastunut kohta on ulkoinen tai siihen päästään helposti, voidaan SPLV:hin suljettua terapeuttista ainetta sivellä ulkoisesti. Erikoisen edullinen sovellutus on myös silmätautien hoito. Okulaaritautien tapauksessa voidaan yhtä tai useampaa sopivaa vaikuttavaa ainetta sisältäviä SPLV:tä sivellä ulkoisesti sairastuneeseen silmään. Hyvin useat organismit aiheuttavat silmäinfektioita ihmisellä ja eläimillä. Sellaisia organismeja ovat, mutta eivät rajoitu näihin: *Moraxella* spp., *Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp., *Diplococcus* spp., *Flavobacterium* spp., *Hemophilus* spp., *Klebsiella* spp., *Leptospira* spp., *Mycobacterium* spp., *Neisseria* spp., *Propionibacterium* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Escherichia* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. ja bakteerien kaltaiset organismit kuten esimerkiksi *Mycoplasma* spp. ja *Rickettsia* spp. Näitä infektioita on vaikeata saada kokonaan häviämään konventionaalisia menetelmiä käyttämällä, koska vähäinenkin infektion jäännös hoidon jälkeen voi uusia infektion kyynelerityksen kautta. SPLV:den käyttöä on havainnollistettu parantamalla okulaari-infektioita, jotka aiheuttaa *Moraxella bovis* (ks. esimerkkejä jäljempänä).

Koska SPLV:t ovat vuodon kestäviä ja niiden sisältö vapautuu viivytetysti, voidaan SPLV:tä käyttää myös minkä tahansa sairauden hoitamiseen, joka vaatii pitempiaikaista kontaktia aktiivin hoitoaineen kanssa. Esimerkiksi glaukooma on sairaus, jolle on tunnusomaista intraokulaarisen paineen asteettainen nousu, joka aiheuttaa perifeerisen näkökyvyn progressiivista häviämistä ja hoitamattomana sentraalisen näkökyvyn häviämistä ja lopuksi sokeuden. Glaukooman hoidossa käytettäviä lääkkeitä voidaan antaa ulkoisesti silmätippoina. Joissakin tapauksissa hoito

vaatii kuitenkin tippojen antamista joka viidestoista minuutti, koska lääke poistuu nopeasti silmäkuopasta. Jos esimerkiksi glaukoomaa hoidetaan tämän keksinnön mukaisesti, voidaan terapeuttisia aineita kuten: pilokarpiini, floropryyli, fysostigmiini, karkoliini, asetatsolamidi, etotsolamidi, dikloorifenamidi, karbakoli, demekariumbromidi, di-isopropyyli-fosfofluoridaatti, ekotioplaattijodidi, fysostigmiini, tai neostigmiini, jne. sulkea SPLV:den sisään, joita sitten pannaan sairastuneeseen silmään.

Muita aineita, joita voidaan kapseloida SPLV:den sisään ja antaa ulkoisesti ovat mm. seuraavat ilman rajoituksia: mydriatit (esimerkiksi epinefriini, fenyyliepinefriini, hydroksi-amfetamiini, efedriini, atropiini, homatropiini, skopolamiini, syklopentolaatti, tropikamidi, enkatropiini, jne.); paikallisuudutusaineet; viruksia hävittävät aineet (esimerkiksi idoksuridiini, adeniini-arabinosidi, jne.); antimykoottiset aineet (esimerkiksi amfoterasiini B, natamysiini, pimarisiini, flusytosiini, nystantiini, timerosali, sulfameratsiini, tiobendatsoli, tolnaftaatti, grisioflulviini, jne.); parasiitteja hävittävät aineet (esim. sulfonamidit, pyrimetamiini, klindamysiini jne.); ja tulehduksia ehkäisevät aineet (esimerkiksi kortikosteroidit kuten ACTH, hydrokortisoni, prednisoni, medrysoni, beta-metasoni, deksametasoni, fluorometaloni, triamsinaloni, jne.).

Seuraavat esimerkit on annettu asian valaisemiseksi, eikä niiden tarkoituksena ole rajoittaa keksinnön piiriä.

Esimerkki: SPLV:den valmistaminen

Kuten jaksossa "SPLV:den valmistus" on selostettu, käsittää SPLV:den perusvalmistusmenetelmä lipidin tai lipidien seoksen liuottamisen johonkin orgaaniseen liuottimeen, jonka jälkeen lisätään vesifaasi ja kapseloitava materiaali, ja seos käsitellään ääniaalloilla. Parhaassa toteutusmuodossa liuos poistetaan ääniaalloilla käsittelyn aikana; orgaaninen liuotin voidaan

kuitenkin poistaa ääniaalloilla käsittelyn aikana tai sen jälkeen millä tahansa haihdutustekniikalla. Kaikissa oheisissa esimerkeissä käytetyt SPLV:t on valmistettu siten kuin on selostettu seuraavissa alajaksoissa (mitä tahansa menetelmää, jonka tuloksena on SPLV:tä, voidaan kuitenkin käyttää).

Antibioottia sisältävät SPLV:t

5 ml etyylietteriliuosta, jossa on 100 mg lesitiiniä, valmistettiin. Seos pantiin pyöreäpohjaiseen pulloon. Sitten liuos (0,3 ml), joka sisälsi 100 mg streptomysiinisulfaattia, pH 7,4, 5 mM:ssa HEPES'iä (4- β -hydroksietyyli-7-piperatsino-2-etaanisulfonihappoa)/0,0725 M NaCl/0,0725 M KCl, pipetoitiin lasiasastiaan, joka sisälsi lipidin dietylietteriliuosta. Seos pantiin sonikaattoriin (Laboratory Supplies Co., Inc.) tyyppiä 10536, useiksi minuuteiksi (80 kHz taajuus:lähtöteho 80 W) ja kuivattiin viskoosiksi tahnaksi antamalla heikon typpivirran kulkea sen yli.

Jäännöksenä olevaan viskoosiin tahnaan lisättiin 10 ml 5 mM HEPES'iä. Saatu SPLV-valmiste, joka sisälsi streptomysiiniä, suspendoitiin puskuriliuokseen, ravisteltiin useita minuutteja pyörresekoittimessa ja vapautettiin ei-kapseloituneesta streptomysiinistä sentrifugoimalla 12 000 x g 10 min ajan 20°C:ssa. Saatu paakku suspendoitiin 0,5 ml:aan 5 mM HEPES'iä.

Edellä selostettua menettelytapaa noudatettiin paitsi että streptomysiini korvattiin jollakin seuraavista: dihydrostreptomysiini, gentamysiini-sulfaatti, ampisilliini, tetrasykliinihydrokloridi, ja kanamysiini.

SPLV:t, jotka sisältävät muita membraanin aineosia

Noudatettiin menetelmää, joka on selostettu jaksossa "Antibioottia sisältävät SPLV:t", paitsi että munalesitiinin kanssa lisättiin jotakin seuraavista: 1) fosfatidiinihappoa, niin että moolisuhteeksi tuli 8:2 (lesitiini:disetyylifosfaatti); 2) stearyyliamiinia, niin että moolisuhteeksi tuli 8:2 (lesitiini:stearyyliamiini); kolesterolia ja stearyyliamiinia, niin että mooli-

suhteeksi tuli 7:2:1 (lesitiini:kolesteroli:stearyyliamiini); ja 3) fosfatidiinihappoa ja kolesterolia, niin että moolisuh- teeksi tuli 7:2:1 (lesitiini:fosfatidiinihappo:kolesteroli).

Pilokarpiinia sisältävät SPLV:t

Noudatettiin menetelmää jaksosta "Antibioottia sisältävät SPLV:t", paitsi että antibiootti streptomysiini korvattiin pilokarpiinilla.

SPLV:t, jotka valmistettiin BHT:n kanssa tai ilman sitä

Tislaamaton eetteri sisältää hapettumista ehkäisevää ainetta 1 μ g/ml butyylihydroksitolueenia (BHT) varastointitarkoituksiin. Jaksossa "Antibioottia sisältävät SPLV:t" selostettua menetelmää noudatettiin käyttäen tislaamatonta eetteriä liuottimena BHT:n lisäämiseksi SPLV-valmisteseeseen.

Valmistettaessa SPLV:iä ilman BHT-lisäystä, noudatettiin jaksos- sa "Antibioottia sisältävät SPLV:t" selostettua menetelmää käyt- täen tislattua eetteriä liuottimena.

Esimerkki: Lääkkeen antaminen in vitro SPLV:n välityksellä

Seuraavassa esimerkissä osoitetaan, kuinka antibioottia voidaan antaa viljelyssä oleviin makrofageihin SPLV:den välityksellä.

Peritoneaalisia makrofageja saatiin pesemällä peritoneum täysi- kasvuisilta C₅₇BLK-koirashiiriltä ja suspendoitiin ne "minimal essential medium'iin" (M.E.M.), pH 7,2, joka sisälsi 10 % kuumas- sa inaktivoitua vasikan fetaaliseerumia. Solut suspendoitiin konsentraatiolla 1×10^6 solua per ml 96-syvennyksisiin kudös- viljelyastioihin. Viljelyihin, jotka sisälsivät adherentteja peritoneaalimakrofageja, lisättiin B.canis-organismeja konsentraa- tiolla 1×10^6 CFU (kolonioita muodostavia yksiköitä) per ml. 12 h kuluttua ne bakteerit, jotka eivät olleet menneet sisään peritoneaaliin makrofageihin, poistettiin useilla pesukerroil- la M.E.M:llä. Kun peritoneaaliset makrofagiviljelyt oli pesty, ne jaettiin 5 ryhmään, joista kukin sisälsi 12 replikaatti- viljelyä ryhmää kohti. Ryhmä 1, jota nimitettiin kontrolliksi,

ei saanut mitään käsittelyä. Ryhmä 2 sai vesipitoista streptomysiinisulfaattia konsentraatiolla 1 mg/ml. Ryhmä 3 sai puskurilla täytettyjä SPLV:iä. Ryhmä 4 sai vesipitoista streptomysiinisulfaattia (1 mg/ml) sekä esivalmistettuja puskuritäytteisiä SPLV:tä. Ryhmä 5 sai SPLV:tä, jotka sisälsivät streptomysiinisulfaattia (1 mg/ml). 24 h kuluttua poistettiin päällä kelluvat nesteet useiden pesujen avulla ja peritoneaaliset makrofagit särjettiin pakastamalla ja sulattamalla ne useita kertoja. Särjettyjen makrofagien sarjalaimennuksia pantiin brucella-agarlevyille ja 4 vrk kuluttua laskettiin elossa olevat B.canikset käyttäen rajoittavan laimennuksen tekniikkaa. Taulukossa VII esitetyt tulokset osoittavat, että SPLV:hin suljettu streptomysiini oli täysin tehokasta tappamaan ja poistamaan intrasellulaarisen B.canis-infektion in vitro.

Koe toistettiin käyttäen B.abortus'ta täsmälleen samoin kuin on selostettu edellä paitsi että peritoneaalisia makrofageja saatiin pesemällä peritoneum täysikasvuisilta naaraspuolisilta albino marsuilta. Tulokset on myös esitetty taulukossa VII.

Taulukko VII

Kolonioita muodostavat yksiköt intrasellulaarista brusellaa, jotka eristetty sen jälkeen kun infektoituja makrofageja on käsitelty streptomysiiniä sisältävillä SPLV:illä

	<u>B.canis^a</u>	<u>B.abortus^b</u>
Kontrollit	2,6 _± 1,13x10 ³	3,1 _± 0,81x10 ⁴
Puskurilla täytetyt SPLV:t	2,82 _± 0,10x10 ³	2,9 _± 0,17x10 ⁴
Vapaa streptomy- siini ^c	3,11 _± 0,40x10 ³	3,3 _± 0,25x10 ⁴
Streptomysiini plus puskurilla täytetyt SPLV:t ^c	2,76 _± 0,20x10 ³	2,8 _± 0,42x10 ⁴
SPLV:hin suljettu streptomysiini ^c	0	0

^aKolonioita muodostavia yksiköitä (CFU) B.caniksesta (keskiarvo _± standardipoikkeama 12:sta replikaatista) eristettiin samasta lukumäärästä aikaisemmin infektoitujen hiirien (C₅₇Blk) peritoneaalisia makrofageja.

^bB.abortuksen CFU (keskiarvo $\pm$ standardipoikkeama 12:sta replikaatista) eristettiin samasta lukumäärästä aikaisemmin infektoidujen marsujen peritoneaalisia makrofageja.

^cStreptomysiinin konsentraatio 1 mg/ml.

Esimerkki: Intraselulaaristen infektioiden hoito

Seuraavat esimerkit osoittavat, kuinka SPLV:tä voidaan käyttää intraselulaaristen infektioiden hoitamiseen. Esitetyt datat todistavat: 1) SPLV:hin kapseloitujen antibioottien käyttämisen tehokkuutta sairauden hoitamisessa ja 2) suurempaa tehokkuutta, mikä saavutetaan antamalla multipeleita annoksia SPLV-valmisteita. Menetelmissä käytettyjen MLV:den ja SPLV:den vertailu kantaja-aineina menetelmissä on myös selostettu.

Bruselloosi aiheuttaa koko maailmanlaajuisia taloudellisia ja yleisiä terveysprobleemeja. Bruselloosin aiheuttaa *Brucella* spp.. Se on mukautunut useihin mammalia-lajeihin, myös ihmiseen, kotieläimiin ja useihin villieläimiin. Kuusi *Brucella*-lajia aiheuttaa bruselloosia eläimissä; ne ovat: *B.abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis* ja *B. suis*. Sekä kotieläimet toimivat varastoina bruselloosin potentiaalista leviämistä ajatellen muihin eläimiin ja ihmisiin.

Näitä infektioita ei voida poistaa antibiooteilla, koska infektiorganismit sijaitsevat retikuloendotelialisysteemin solujen sisällä ja ne ovat erittäin resistenttejä antibioottien bakteereja hävittävälle vaikutukselle. Vaadittavan antibiootin määrä ja hoidon pituus antavat tulokseksi joko toksisen efektin eläimessä tai vaarallisen korkeita antibiootin konsentraatioita eläimen kudoksissa. Lisävaikutena tämän sairauden hoidossa on se, että hoidon tulee olla täysin tehokas, koska mikä tahansa jäljelle jäävä infektio yksinkertaisesti leviää ja sykli alkaa taas alusta. Näiden tautien taloudellista vaikutusta kuvaavat miljoonien dollarien arvoiset karjat, jotka joka vuosi menetetään spontaanisina abortteina. Tällaisten infektioiden puhkeamisen

ainoa torjuntakeino on karanteeni ja eläinten teurastaminen.

Seuraavissa esimerkeissä kapseloidaan antibioottia SPLV:hin ja annetaan sitten kapseloitua aktiivista ainetta eläimille ympppäämällä sitä infektoituihin eläimiin intraperitoneaalisesti.

B.canis infektion yhden hoitokerran vaikutus käytettäessä
SPLV:hin kapseloitua antibioottia

80 täysikasvuista sveitsiläistä koirashiirtä infektoitiin intraperitoneaalisesti (i.p.) B.canis ATCC 23365:llä (1×10^7 CFU) ja jaettiin ne 8 ryhmään, joissa kussakin 10 hiirtä. Seitsemän päivää ympppäyksestä B.canis'ta käyttäen ryhmiä käsiteltiin seuraavasti: ryhmä 1, jota nimitettiin kontrolliksi, ei saanut mitään käsittelyä; ryhmä 2 sai puskurilla täytettyjä SPLV:tä (0,2 ml i.p.); ryhmä 3 sai vesipitoista streptomysiinisulfaattia (1 mg/kg ruumiinpainoa kohti) kokonaisuudessaan 0,2 ml i.p.; ryhmä 4 sai vesipitoista streptomysiinisulfaattia (5 mg/kg ruumiinpainoa kohti) kaikkiaan 0,2 ml i.p.); ryhmä 5 sai vesipitoista streptomysiinisulfaattia (10 mg/kg ruumiinpainoa kohti), kaikkiaan 0,2 ml i.p.; ryhmä 6 sai SPLV:tä, jotka sisälsivät streptomysiinisulfaattia (1 mg/kg ruumiinpainoa kohti) kaikkiaan 0,2 ml i.p.; ryhmä 7 sai SPLV:tä, jotka sisälsivät streptomysiinisulfaattia (5 mg/kg ruumiinpainoa kohti) kaikkiaan 0,2 ml i.p.; ja ryhmä 8 sai SPLV:tä, jotka sisälsivät streptomysiinisulfaattia (10 mg/kg ruumiinpainoa kohti) kaikkiaan 0,2 ml i.p. Päivänä 14 ympppäyksen jälkeen B.canis'ta käyttäen, kaikki eläimet tapettiin ja pernat otettiin irti aseptisesti. Pernat homogenoitiin ja laimennettiin sarjaksi brucella agar-levyille, jotta voitiin määrätä elossa olevien B.canis'ten lukumäärä pernoissa käsitellyn jälkeen. Tulokset 4 päivää kestäneen inkuboinnin jälkeen on esitetty taulukossa VIII.

Taulukko VIII

B.canis-organisimin kanssa infektoitujen hiirien yhden ainoan käsittely^a teho eri konsentraatioilla vapaata streptomysiiniä tai SPLV:hin suljettua streptomysiiniä

	Kolonioita muodostavia yksiköitä B.canis orga- nismeja per perna		b
	Ei käsittelyä	Puskurilla täytetyt SPLV:t	
Kontrolli	$3,46 \times 10^6 + 2,7 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6 + 0,66 \times 10^6$	
Streptomysiinin konsentraatio (mg/kg ruumiinpaino)	Vapaa streptomysiini	SPLV:hin suljettu streptomysiini	
1	$1,5 + 0,45 \times 10^6$	$1,01 + 0,25 \times 10^3$	
5	$2,12 + 1,71 \times 10^5$	$1,52 + 0,131 \times 10^4$	
10	$9,66 + 3,68 \times 10^4$	$1,32 + 1,00 \times 10^4$	

^aIntraperitoneaalinen ruiske kaikkiaan 0,2 ml (steriili suolaliuos)

^bElossa olevat B.canikset määrättiin CFU:n lukumääränä, jotka eristettiin per perna ja se ilmaistaan keskiarvo $\pm$ standardi-
poikkeama. 10 eläintä kohti per koe (triplikaattikokeet).

B.canis infektion multippelin käsittelyn teho käytettäessä antibioottia, joka on kapseloituna SPLV:hin

80 täysikasvuista sveitsiläistä koirashiirtä infektoitiin B.canis ATCC 23365:llä (1×10^7 CFU, i.p.) ja jaettiin 8 ryhmään, joissa kussakin 10 hiirtä. 7 päivän ja 10 päivän kuluttua ympä-
päämisestä B.caniksella, ryhmiä käsiteltiin seuraavasti: ryhmä 1, jota nimitettiin kontrolliksi, ei saanut mitään käsittelyä; ryhmä 2 sai puskurilla täytettyjä SPLV:tä (0,2 ml i.p.); ryhmä 3 sai vesipitoista streptomysiinisulfaattia (1 mg/kg ruumiinpainoa kohti) kaikkiaan 0,2 ml i.p.; ryhmä 4 sai vesipitoista strepto-
mysiinisulfaattia (5 mg/kg ruumiinpainoa kohti) kaikkiaan 0,2 ml i.p.; ryhmä 5 sai vesipitoista streptomysiinisulfaattia (10 mg/kg ruumiinpainoa kohti) kaikkiaan 0,2 ml i.p.; ryhmä 6 sai SPLV:tä, jotka sisälsivät streptomysiinisulfaattia (1 mg/kg ruumiinpainoa kohti) kaikkiaan 0,2 ml, i.p.; ryhmä 7 sai SPLV:tä, jotka sisäl-
sivät streptomysiinisulfaattia (5 mg/kg ruumiinpainoa kohti)

kaikkiaan 0,2 ml i.p.; ja ryhmä 8 sai SPLV:tä, jotka sisälsivät streptomysiinisulfaattia (10 mg/kg ruumiinpainoa kohti) kaikkiaan 0,2 ml i.p. Päivänä 14 ymppäämisen jälkeen B.caniksen kanssa, kaikki eläimet tapettiin ja pernat poistettiin aseptisesti. Pernat homogenoitiin ja tehtiin sarjalaimennukset brucella agar-levyille eloonjääneiden B.canisten lukumäärän laskemista varten pernoissa käsittelyn jälkeen. Tulokset 14 päivän inkuboinnin jälkeen on esitetty kuviossa 5.

Tulokset useista kaksivaiheisista käsittelyohjelmista B.canis-infektioiden suhteen in vivo, jotka on esitetty kuviossa 5 osoittavat että ryhmissä, jotka saivat vesipitoista streptomysiiniä 7 ja 10 päivää ymppäämisen jälkeen oli havaittavissa vain hyvin vähän eloonjääneiden B.caniksien vähenemistä pernoissa. Vain ryhmissä, jotka saivat SPLV:hin kapseloitua streptomysiiniä konsentraatiolla 10 mg/kg ruumiinpainoa kohti, joka annettiin 7 ja 10 päivänä ymppäämisen jälkeen, kaikki elinkykyinen bakteeri oli hävitetty pernoista infektoiduilla eläimillä.

Edellä selostetun kokeen lisäksi otettiin useista B.caniksella infektoitujen hiirien kudoksista näytteitä kahden käsittelyn jälkeen SPLV:hin kapseloidun streptomysiinin kanssa seuraavasti:

30 täysikasvuista sveitsiläistä koirashiirtä ympättiin B.canis ATCC 23365:llä (1×10^7 CFU, i.p.). 7 päivää ymppäyksen jälkeen eläimet jaettiin 3 ryhmään kussakin 10 eläintä. Ryhmä 1, jota nimitettiin kontrolliksi, ei saanut mitään käsittelyä; ryhmä 2 sai (päivinä 7 ja 10 ymppäyksen jälkeen) vesipitoista streptomysiinisulfaattia (10 mg/kg ruumiinpainoa kohti) joka kerta 0,2 ml i.p.; ryhmä 3 sai (päivinä 7 ja 10 ymppäyksen jälkeen) SPLV:tä, jotka sisälsivät streptomysiinisulfaattia (10 mg/kg ruumiinpainoa kohti) joka kerta 0,2 ml i.p. Päivinä 14-75 B.caniksella ymppäyksen jälkeen kaikki eläimet tapettiin ja seuraavat elimet poistettiin aseptisesti, homogenisoitiin ja laimennettiin sarjoiksi brucella agar-levyille B.caniksen eristämistä varten: sydän, keuhkot, perna, maksa, munuaiset, kivekset. 4 vrk inkuboinnin

jälkeen eloonjääneiden B.canisten lukumäärien tulokset per elin on esitetty kuviossa 6.

Tulokset eri kudoksista B.caniksen infektoimista hiiristä otetuista näytteistä kahden käsittelyn jälkeen streptomysiinillä, jotka on esitetty kuviossa 6, osoittivat että kaikki SPLV:ssä kapseloidulla streptomysiinillä käsiteltyjen hiirien kudoksenäytteet 14-75 vrk ympäyksen jälkeen B.caniksella olivat täysin vapaita elinkelpoisista B.canis organismeista. Eläimistä, joita ei oltu käsitelty tai joita oli käsitelty vesipitoisella streptomysiinillä, sellaisilla konsentraatioilla ja lääkkeenanto-ohjelmilla, jotka olivat identtisiä niiden kanssa, jotka saivat SPLV:hin kapseloitua streptomysiiniä, voitiin eristää elinkelpoisia B.canis organismeja kaikista kudoksenäytteistä, jotka oli otettu 14-75 vrk ympäyksen jälkeen B.canis organisin kanssa.

Hoidon tehokkuus käytettäessä MLV:tä ja SPLV:tä keskenään verrattuina

15 täysikasvuista koiraspuolista sveitsiläistä hiirtä ympättiin B.canis ATCC 23365:llä (1×10^7 CFU, i.p.). 7 vrk ympäyksen jälkeen eläimet jaettiin 3 ryhmään kussakin 5 hiirtä. Ryhmä 1, jota nimitettiin kontrolliksi, ei saanut mitään käsittelyä; ryhmä 2 sai (päivinä 7 ja 10 ympäyksen jälkeen) MLV:tä, joissa oli streptomysiinisulfaattia (10 mg/kg ruumiinpainoa kohti, i.p.). MLV:t oli valmistettu konventionaalaisella tekniikalla käyttäen 100 mg muna-fosfatidyylikoliinia (EPC) ja 2 ml steriiliä HEPES'iä, joka sisälsi streptomysiinisulfaattia (100 mg/ml). Suhde lipidi:streptomysiinisulfaatti oli 100 mg EPC: 28 mg streptomysiinisulfaattia 2 ml:ssa lopullista MLV-suspensiota; ryhmä 3 sai (päivinä 7 ja 10 ympäyksen jälkeen) SPLV:tä, jotka sisälsivät streptomysiini-sulfaattia (10 mg/kg ruumiinpainoa kohti i.p.), jotka oli valmistettu kuten jaksossa "Antibioottia sisältävät SPLV:t" on selostettu seuraavin muunnoksien: käytettiin 100 mg EPC:tä ja 0,3 ml HEPES'iä, joka sisälsi 100 mg streptomysiinisulfaattia. Suhde lipidi:streptomysiinisulfaatti SPLV:ssä oli 100 mg EPC:28 mg streptomysiinisulfaattia 2 ml:ssa

lopullista suspensiota. Päivänä 14 ympäyksen jälkeen B.caniksen kanssa kaikki eläimet tapettiin ja pernat poistettiin aseptisesti, homogenoitiin ja laimennettiin sarjoiksi brucella agar-levyille B.canis organismin eristämiseksi. Tulokset elossa olevista B.canis organismeista per elin 4 vrk inkuboimisen jälkeen on esitetty taulukossa IX.

Taulukko IX

Streptomysiinisulfaattia sisältävien MLV:den ja SPLV:den B.canis organismeja hävittävän tehon vertailu in vivo kahden käsittelyn jälkeen^a

	<u>Kolonioita muodostavia yksiköitä B.canis organismeja per perna^b</u>
Kontrolli	$2,7 \pm 1,0 \times 10^4$
MLV:t	$1,8 \pm 0,4 \times 10^4$
SPLV:t ^c	0

^aIntraperitoneaalisten injektoiden, 10 mg/kg ruumiinpainoa kohti, antovälit olivat 3 vrk. Kontrollieläimet eivät saaneet käsittelyä.

^bEloonjääneet B.canikset määrättiin CFU:n lukumääränä, jotka eristettiin per perna ja ilmaistaan keskiarvo $\pm$ S.D. 5:ltä eläimeltä per ryhmä (duplikaattimääritykset per eläin).

^cSuhde muna-fosfatidyylikoliini:streptomysiinisulfaatti oli 100 mg lipidiä:28 mg streptomysiinisulfaattia.

SPLV:hin suljettujen eri antibioottien tehokkuus infektion hoidossa

50 täysikasvuista sveitsiläistä koirashiirtä ympätettiin käyttäen B.canis ATCC 23365:tä (1×10^7 CFU, i.p.). Seitsemän päivää ympäyksen jälkeen eläimet jaettiin 10 ryhmään, kussakin 5 eläintä. Ryhmä 1, jota kutsutaan kontrolliksi, ei saanut käsittelyä; ryhmä 2 sai puskuritäytteisiä SPLV:tä (0,2 ml i.p.) päivinä 7 ja 10 ympäyksen jälkeen; ryhmät 3, 4, 5 ja 6 saivat vesipitoisia ruiskeita (0,2 ml i.p.), jotka sisälsivät dihydrostreptomysiiniä, gentamysiiniä, kanamysiiniä tai streptomysiiniä 10 mg/kg ruumiin-

painoa kohti i.p. päivinä 7 ja 10 ympäyksen jälkeen (huom. jokainen näistä antibiooteista tappaa tunnetusti *B.canis* organismin in vitro). Ryhmät 7, 8, 9 ja 10 saivat SPLV:tä, jotka sisälsivät dihydrostreptomysiiniä, gentamysiiniä, kanamysiiniä tai streptomysiiniä 10 mg/kg ruumiinpainoa kohti päivinä 7 ja 10 ympäyksen jälkeen. Päivänä 14 *B.canis*ta käyttäen tapahtuneen ympäyksen jälkeen kaikki eläimet tapettiin ja pernat otettiin aseptisesti, homogenoitiin ja liuotettiin sarjana brucella agar-levyille *B.canis*ksen eristämistä varten. Tulokset eloonjääneistä *B.canis*ksista per elin 4 päivää inkuboinnin jälkeen on esitetty taulukossa X.

Taulukko X

Vertailu eri antibioottien *B.canis*ksen hävittämiskyvyn välillä in vivo, kahden käsittelyn jälkeen^a

	Kolonioita muodostavia yksiköitä <i>B.canis</i> organismeja per perna ^b	
	Vesiliuokset	SPLV:hin suljettu antibiootti
<u>Käsittelemätön</u>	$3,93 \pm 1,51 \times 10^6$	$4,66 \pm 0,87 \times 10^6$
<u>Antibiootti^c</u>		
Dihydrostreptomysiini	$1,13 \pm 0,30 \times 10^5$	0
Gentamysiini	$7,06 \pm 2,53 \times 10^5$	0
Kanamysiini	$2,72 \pm 0,91 \times 10^5$	0
Streptomysiini	$1,01 \pm 0,17 \times 10^5$	0

^aIntraperitoneaalisten käsittelyjen, 10 mg/kg ruumiinpainoa kohti, väliä oli 3 vrk. Kontrollieläimet eivät saaneet mitään käsittelyä.

^bEloonjääneet *B.canis* per elin määrättiin per perna eristettyjen CFU:den lukumääränä ja ilmoitettiin keskiarvo $\pm$ standardipoikkeama viidestä eläimestä ryhmää kohti (duplikaattimääritykset eläintä kohti).

^cTehokkaasti *B.canis* organismeja tuhoavat antibiootit suspensioviljelyssä.

Testitulokset eri antibioottien tehokkuudesta *B.canis*-organismin avulla infektoidujen hiirien suhteen taulukossa X osoittavat, että antibiootit, jotka tuhoavat *B.canis*ksen tehokkaasti in vitro (esimerkiksi suspensioviljelyssä) ovat myös vain silloin tehokkaita tuhoamaan *B.canis*-infektioita in vivo, kun ne on kapseloitu SPLV:den sisään. Eläimet, jotka saivat joko vesipitoisia antibiootteja, puskuritäytteisiä SPLV:tä tai ei lainkaan käsittelyä, eivät missään tapauksessa selvinneet vapaiksi elossa olevista *B.canis*ksista eristetyissä pernakudoksissa.

B.canis organismin avulla infektoidujen koirien käsittely

Täysikasvuisia naaraspuolisia beagle-koiria ympätettiin käyttäen *B.canis* ATCC 23365:tä (1×10^7 CFU) oraalisesti ja vaginaalisesti. 7 päivää ympäyksen jälkeen koirat jaettiin 3 ryhmään. Ryhmä 1, jota nimitettiin kontrolliksi, ei saanut mitään käsittelyä; ryhmä 2 sai (päivinä 7 ja 10 ympäyksen jälkeen) vesipitoista streptomysiinisulfaattia 10 mg/kg ruumiinpainoa kohti (kukin antomäärä oli 5,0 ml, i.p.); ryhmä 3 sai (päivinä 7 ja 10 ympäyksen jälkeen) SPLV:tä, jotka sisälsivät streptomysiinisulfaattia 10 mg/kg ruumiinpainoa kohti (kukin antomäärä oli 3,0 ml, i.p.). Koottiin vagina-pyyhkäisytkkoja ja hepariinipitoisia verinäytteitä koirilta tasaisin väliajoin ennen tutkimuksen alkua, sen aikana ja sen päätyttyä. Nämä pantiin viljelyyn brucella agar-levyille *B.canis*ksen eristämistä varten. Tulokset on esitetty taulukossa XI. Kerättiin seeruminäytteitä ennen tutkimuksen alkua, sen aikana ja sen päätyttyä seerumi-vasta-aineen eristämiseksi *B.canis*selle. Nämä tulokset ovat myös taulukossa XI. 21 päivää *B.canis*ksen kanssa tapahtuneen ympäyksen jälkeen kaikki eläimet tapettiin. Seuraavat kudokset poistettiin aseptisesti, homogenoitiin ja laimennettiin sarjaan brucella agar-levyille *B.canis*ksen eristämiseksi: hepariinia sisältävä veri, vaginaerite, keuhkot, perna, nivelvoide, uterus, ovarium, polvi- taipeen imusolmukkeet, sylkirauhaset, kitarisat, välikarsinan imusolmukkeet, suoliliepeen imusolmukkeet, luuydin, kohdunkaulan pinnalliset imusolmukkeet, ja auksiliaariset imusolmukkeet. Tulokset eloonjääneistä *B.canis*ksista per kudokset 4 vrk inkuboinnin jälkeen on esitetty taulukossa XII.

Taulukko XI

Tulokset viljelyistä ja serologisista kokeista *B. canis*-infektoiduissa koirissa, joita käsiteltiin kaksivaihe-antibioottiohjelmalla

Päiviä <i>B.canis</i> - infektion jälkeen	Kontrolli				Streptomysiini ^b				SPLV:hin sul- jettu Strepto- mysiini ^c			
	R	M	B	V	R	M	B	V	R	M	B	V
<u>Esi-käsi- telty</u>												
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	ND	ND	+	+	ND	ND	+	0	ND	ND	+	+
4	ND	ND	+	+	ND	ND	+	+	ND	ND	+	+
<u>Jälki- käsitelty</u>												
8	0	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0
10	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0	0
21	1,5	2	+	+	1	2	+	+	0	0	0	0

a R (nopea lasilevy agglutinaatiotesti) ilmaisee seerumitiit-
terin ja *B.canis* antigeenin resiprookkisuutta ($\times 10^2$);
0 = ei havaittavaa tiitteriä.

M (2-merkaptetanoli-putki agglutinaatiotesti) ilmaisee
seerumitiitterin ja *B.canis* antigeenin resiprookkisuuden ($\times 10^2$);
0 = ei havaittavaa tiitteriä.

Kohdassa B (veriviljely) ja V (vaginaviljely) brucella
agarissa: + = suurempi tai yhtä suuri kuin 1 CFU; 0 =
ei havaittu kolonioita. Kontrollit eivät saaneet mitään
käsittelyä.

b Streptomysiinisulfaatti (vesipitoinen) 10 mg/kg ruumiin-
painoa kohti, i.p.

c SPLV:t, jotka sisältävät streptomysiinisulfaattia 10 mg/kg
ruumiinpainoa kohti, i.p.

Taulukko XII

Viljelytulokset kudoksenäytteistä *B.canis*-infektoiduilla koirilla, jotka olivat saaneet kaksivaiheisen antibiootti-hoito-ohjelman

Kudos ^b	SPLV:t, jotka sisältävät streptomysiiniä ^c	Streptomysiini ^d	Kontrolli ^e
Täysveri	0	+	+
Vaginapyyhkäisy	0	+	+
Keuhkot	0	+	+
Perna	0	+	+
Nivelvoideneste	N.D.	0	0
Uterus	0	+	+
Ovarium	0	+	+
Polvitaipteen imusolmukkeet	N.D.	+	+
Sylkirauhanen	0	0	0
Kitarisat	0	+	+
Välikarsinan imusolmukkeet	0	N.D.	+
Suolililiepeen imusolmukkeet	N.D.	0	0
Luuydin	0	+	+
Kohdunkaulan imusolmukkeet	N.D.	N.D.	+
Auksilaariset imurauhaset	0	+	+

a Eläimiä käsiteltiin päivinä 7 ja 10 infektion jälkeen.

b Nekropsiassa otetut näytteet laimennettiin sarjoiksi brucella-agarlevyihin; + = yhtä suuri tai suurempi kuin 1 CFU; 0 = ei kolonioita.

c SPLV:t, jotka sisälsivät streptomysiinisulfaattia, 10 mg/kg ruumiinpainoa kohti, i.p.

d Streptomysiinisulfaatti (vesipitoinen), 10 mg/kg ruumiinpainoa kohti, i.p.

e Kontrollit eivät saaneet mitään käsittelyä.

Tulokset viljely- ja serologisista testeistä koirilla, jotka oli infektoitu *B.caniksella* ennen kaksivaiheista antibiootin antoa, sen aikana ja jälkeen, on esitetty taulukossa XI. Kaikki eläimet olivat serologisesti negatiivisia aikaisemman *B.canis*-infektion suhteen mitattuna negatiivisina seerumitiittereinä, ja viljelynegatiivisia veriviljelyjen ja vaginapyyhkäisyjen viljelyjen suhteen. Kaikki eläimet havaittiin viljelypositiivisiksi sekä veri- että vaginaviljelyille ennen käsittelyjä päivinä 7 ja 10. Koirat, joita käsiteltiin vesipitoisella streptomysiinillä tai koirat jotka eivät saaneet mitään käsittelyä, pysyivät viljelypositiivisina veri- ja vaginaviljelyjen suhteen jälkikäsittelyn aikana ennen sen lopettamista päivänä 21. Ryhmä 3, joka sai liposomeja, jotka sisälsivät vesipitoista streptomysiiniä, tuli viljelynegatiiviseksi ensimmäisenä päivänä ensimmäisen käsittelyn tapahduttua ja pysyi negatiivisena läpi koko jälkikäsittelyvaiheen. Koirat, jotka eivät saaneet mitään käsittelyä tai vesipitoista streptomysiiniä, antoivat havaittavat seerumitiitterit *B.canis*-antigeeneja vastaan päivänä 21 ympäyksen jälkeen, kun taas ne, joita käsiteltiin SPLV:llä, jotka sisälsivät antibiootteja päivinä 7 ja 10 ympäyksen jälkeen, eivät kehittäneet mitään havaittavaa vasta-ainetta *B.canis*-antigeenille.

Tulokset *B.canis*-organismin eristämisestä infektoiduista koirista, joita käsiteltiin kaksivaiheisesti antamalla antibiootteja, ovat taulukossa XII ja ne osoittavat, että ainostaan käsittely SPLV:llä, jotka sisälsivät streptomysiiniä, oli tehokasta koirilla eliminoimaan elinvoimaiset *B.canis*-organismit täydellisesti kaikista elinnäytteiden kudosista.

B.abortuksen käsittely marsuilla

Viisitoista täysikasvuista naaraspuolista marsua ympättiin käyttäen *B.abortus* ATCC 23451 (1×10^7 CFU, i.p.). Seitsemän päivää ympäyksen jälkeen eläimet jaettiin 3 ryhmään, 5 eläintä kussakin. Ryhmä 1, jota nimitettiin kontrolliksi, ei saanut mitään käsittelyä. Ryhmä 2 sai vesipitoista streptomysiinisulfaattia, i.p. injektioina (0,2 ml) 10 mg/kg ruumiinpainoa

kohti päivinä 7 ja 10 ympäyksen jälkeen B.abortus-organismin kanssa. Ryhmä 3 sai SPLV:tä, jotka sisälsivät streptomysiinisulfaattia i.p. injektioina (0,2 ml) 10 mg/kg ruumiinpainoa kohti päivinä 7 ja 10 ympäyksen jälkeen B.abortuksen kanssa. Päivänä 14 ympäyksen jälkeen, joka suoritettiin B.abortuksen kanssa, kaikki eläimet tapettiin ja pernat poistettiin ja homogenoitiin aseptisesti ja laimennettiin sarjaksi brucella agarlevyille B.abortuksen eristämistä varten. Tulokset eloonjääneistä B.abortuksista per perna 4. päivänä inkuboinnin aloittamisesta, on esitetty kuviossa 7. Ainoastaan streptomysiiniä sisältävät SPLV:t olivat tehokkaita eliminoidaan B.abortukset, joita oli marsun pernassa. Eläimissä, jotka saivat vesipitoista streptomysiiniä tai jotka eivät saaneet mitään käsittelyä, identifioitiin elinvoimaisia B.abortus-bakteereja.

B.abortus-infektion hoitaminen lehmillä

Yhdeksää pahoin infektoitunutta eläintä käytettiin tässä koeksessa. B.abortus-bakteerin eristysnäytteet maidosta ja vaginatupoista tulivat negatiivisiksi ja pysyivät negatiivisina 6 viikon ajan SPLV:llä käsittelyn jälkeen, jotka sisälsivät streptomysiiniä. Kun infekto uusi näillä eläimillä, bakteerieristysnäytteitä löydettiin vain utareen neljänneksistä, jotka olivat positiivisia ennen käsittelyä.

Yhdeksän ristisiitettyä (hereford-jersey-Brangus), 22 kk ikäisiä, ei-graviideja, B.abortus-positiivisiksi todettuja lehmiä käytettiin testissä. Ainakin 4 kuukautta ennen tutkimuksen alkua eläimet ympättiin per conjunctivum käyttäen 1×10^7 CFU B.abortusta, kanta 2308 tiineyden keskivaiheilla, mikä päättyi aborttiin ja/tai B.abortus-viljelyn positiivisuuteen maito- tai uteruseriteessä ja/tai fetaalikudoksissa.

Lehmiä pidettiin individuaalisesti eristetyissä pilttuissa ja ne erotettiin kolmeksi ryhmäksi. Käsittely oli kaksi annosta käsittävä, 3 päivän välein, seuraavasti: 1) 3 lehmää injektoitiin intraperitoneaalisesti fysiologisella suolaliuoksella. 2) 3 lehmää injektoitiin intraperitoneaalisesti

vesipitoisella antibiootilla (streptomysiiniä 10 mg/kg ruumiinpainoa kohti) plus esivalmistettuja puskuritäytteisiä SPLV:tä. 3) 3 lehmää injektioitiin intraperitoneaalisesti SPLV:hin suljetun streptomysiinin kanssa (10 mg/kg ruumiinpainoa kohti. Koko injektion volyymi oli per injektio 100 ml per eläin.

Kahden ensimmäisen kuukauden aikana suoritettiin duplikaatti bakteeriviljelyjä maito- ja uteruseritteistä viikottain, mikäli eritteitä oli käytettävissä. Sitten kaikki eläimet tapettiin yliannoksella natriumpentobarbitolia ja seuraavat elimet otettiin talteen duplikaatteina bakteriologisia viljelyjä varten: 1) imusolmukkeet seuraavista kohdista: vasen ja oikea atlasnikama, vasen ja oikea nielun yläpuolinen, vasen ja oikea alaleuka, vasen ja oikea korva, vasen ja oikea lapa-luu, vasen ja oikea reisi, vasen ja oikea kainalokuoppa, vasen ja oikea polvitaive, vasen ja oikea suoliluu sisäpuolelta, vasen ja oikea nisärauhanen yläpuolelta, vasen ja oikea munuainen, keuhkoputki, välikarsina, suolilieve ja maksa; 2) rauhaset: kaikki neljä nisärahasen neljännestä, vasen ja oikea lisämunuainen ja kateenkorva (mikäli jäljellä); 3) elimet ja muut kudokset: perna, maksa, vasen ja oikea uteruksen sarvi, kohdunkaula, vagina, munuaiset ja kitarisa.

Nekropsia jälkeen kaikki kudokset jäähdytettiin ja pidettiin -70°C :ssa kuljetuksen aikana. Kudokset sulatettiin, liekitettiin alkoholilla ja siistittiin aseptisesti ennen punnitusta. Kun painot oli merkitty muistiin (0,2-1,0 g) kudot homogenoitiin 1 ml:aan steriiliä suolaliuosta ja laimennettiin steriilin suolaliuoksen kanssa $1:10^{-10}$ alkuperäisestä homogenaatin suspensiosta. Tasamääriä (20 μl) kustakin laimennuksesta sarjasuspensioista pantiin brucella agarlevyille ja asetettiin 27°C :een inkuboitumaan. Kustakin kudoksesta tehtiin duplikaattimääritykset.

Levyt tutkittiin joka päivä ja arvioitiin niiden bakteerikasvu. Kaikki koloniat, jotka ilmestyivät ennen 3. päivää,

eristettiin, siirrettiin ja gramvärjättiin identtisuuden määrittämiseksi. Päivinä 5, 6 ja 7 inkuboinnin aikana laskettiin ne koloniat, jotka olivat morfologian, kasvun ja gramvärjäyksen puolesta karakteristisia B.abortukselle: CFU per gramma kudosta määrättiin sen jälkeen. Tyypillisiä kolonioita siirrettiin uudelleen B.abortus-bakteerin vahvistamiseksi.

Bakteriologiset eristykset tehtiin kaikista kudoksenäytteistä ja laskettiin bakteerien määrä per gramma kudosta. Tulokset neljästä eläimestä - yksi plasebo-kontrolli ja kolme eläintä, joita käsiteltiin SPLV:hin suljetun streptomysiinin kanssa - on esitetty taulukossa XIII.

Taulukko XIII

Tulokset B.abortus-injektoitujen lehmien kudosis-
viljelynäytteistä

Kudos	Käsittelemätön kontrolli	SPLV:hin 1	suljettu streptomysiini 2	3
Lisämunuaisrauha- nen, vasen	0	0	0	0
Lisämunuaisrauha- nen, oikea	++	0	0	+
Atlasnikaman oikea imusolmuke	++	+	0	+
Atlasnikaman vasen imusolmuke	0	0	0	+
Kainalokuopan oikea imusolmuke	+++	0	+	0
Kainalokuopan vasen imusolmuke	++	0	0	0
Keuhkoputken imusolmuke	0	0	0	0
Kohdunkaula	0	0	0	0
Maksa	++++	0	0	0
Uteruksen vasen sarvi	0	0	0	+
Uteruksen oikea sarvi	0	0	0	0
Suoliluun oikea imusolmuke	++	0	0	0
Suoliluun vasen imusolmuke	++++	0	+	0
Munuaiset	0	0	0	0
Maksa	0	0	0	0
Keuhkot	0	0	0	0
Utareet vasen etu	0	+	+	0
Utareet vasen taka	0	0	0	+
Utareet oikea etu	++	0	0	0
Utareet oikea taka	++	0	0	0
Alaleuan imusolmuke oikea	+++	0	0	0
Alaleuan imusolmuke vasen	+++	0	0	0
Välikarsinan imusolmuke	++	0	+	0
Suoliliepeen imusolmuke	+++	0	0	0
Korvan imusolmuke vasen	+++	0	0	0
Korvan imusolmuke oikea	+++	0	0	0
Polvitaipeen imusolmuke, vasen	+	0	0	0
Polvitaipeen imusolmuke, oikea	+	0	0	0
Reiden imusolmuke vasen	+	0	0	0
Reiden imusolmuke oikea	0	0	0	0
Lapaluun imusolmuke vasen	0	0	0	+
Lapaluun imusolmuke oikea	++++	0	0	0
Munuaisten imusolmuke	0	0	0	0
Perna	+++	0	0	0
Utareen yläosan imusolmu- ke vasen	+++	+	0	0
Utareen yläosan imusolmu- ke oikea	0	0	0	0
Nielun yläosan imusolmu- ke vasen	+	0	0	0
Nielun yläosan imusolmu- ke oikea	0	0	0	0
Kateenkorva	0	0	0	0
Vagina	+++	0	0	0

0	Ei havaittavia bakteereja 0,3-1 g:n kudoksen viljelyssä.
+	Alle 200 koloniaa/g kudosta.
++	Yli 300 koloniaa/g.
+++	Yli 1000 koloniaa/g.
++++	Yli 100 000 koloniaa/g.

Esimerkki: Okulaarisairauksien hoito

Bakteerin aiheuttamat ja muut sen kaltaiset infektiot samoin kuin useat muut silmäsairaudet aiheuttavat maailmanlaajuisia taloudellisia ja yleisiä terveysprobleemeja ja johtavat, mikäli niitä ei hoideta tai hoidetaan väärin, näön menetykseen ja mahdollisesti kuolemaan septisemian vuoksi. Bakteeri-infektioiden ihmis- ja eläinsilmissä ilmoitetaan aiheutuvan useista bakteereista kuten seuraavat, mutta ne eivät rajoitu ainoastaan näihin: *Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp., *Leptospira* spp., *Moraxella* spp., *Mycobacterium* spp., *Neisseria* spp., *Propionibacterium* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *E. Coli* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. ja bakteerien kaltaiset organismit kuten *Mycoplasma* spp. ja *Rickettsia* spp. Sekä eläimet että ihmiset toimivat varastoina, joista infektiota aiheuttava bakteeri saattaa levitä toisesta toiseen.

Tällaisia bakteeri-infektioita ei voida hoitaa antibiooteilla ilman pitkällistä ja rasittavaa hoito-ohjelmaa, jossa on joko taajoja hoitokertoja jopa kahdenkymmenen minuutin välein ihmisillä joissakin infektioissa, tai vaarallisen korkeita antibiootin konsentraatioita kudoksissa. Nykyiset hoitomenetelmät ovat vaikeita useista muistakin syistä. Infektion aiheuttavat organismit silmän pintakudoksissa ovat joissakin tapauksissa erittäin resistenttejä antibioottien bakteereja hävittävälle vaikutukselle ja antibioottien ulkoisen antamisen tuloksena voi olla lääkkeen nopea häviäminen silmäkuo-

pasta kontaktiajan jäädessä hyvin erilaiseksi. Yleisenä sääntönä on, että silmän infektion hoidon on oltava täysin tehokas, koska mikä tahansa jäljelle jäänyt infektiio voi yksinkertaisesti infektoida uudelleen kyynelerityksen kautta ja sykli alkaa taas uudestaan. Lisäksi useissa tapauksissa infektion poistamiseen tarvittavat lääkekonsentraatiot voivat aiheuttaa näön heikentymistä ja joissakin tapauksissa voituloksena olla täydellinen sokeus. Tällaisten sairauksien ta- loudellinen merkitys kotieläinten tapauksessa on miljoonis- sa dollareissa, jotka vuosittain menetetään, koska ainoa mah- dollinen tapa taistella tällaisia infektiosairauksia vastaan on viivytetty lääkehoito ja karanteeni.

Seuraavissa esimerkeissä arvostellaan hoidon tehokkuutta käytettäessä vapaata antibioottia glyseriinissä verrattuna SPLV:hin suljettuun antibioottiin *M.bovis* silmäinfektioissa.

M.bovis aiheuttaa keratoconjunctivitis-infektion (pink eye) karjassa. Tälle tautitilalle on ominaista blefarospasmi, kyynelten erityys, conjunctivitis ja erilaiset cornean sameu- det ja ulceraatiot. Täysikasvuisilla lehmillä voi kehittyä lievää kuumetta ja hieman heikentynyt ruokahalu ja heikenty- nyt maidon tuotanto. Vaikka useat antibiootit tehoavat *M.bovis*kseen, niitä on annettava varhain ja hyvin usein pai- kallisesti tai subkonjunktiiivisesti injektoimalla.

Selostettujen esimerkkien mukaan terapeuttisen aineen vaikutuk- sen kesto ja tehokkuus ovat pidentyneet.

On yllättävää, että tämä systeemi on tehokas vain yhden tai kahden antokerran jälkeen, sillä tällaiset infektiot eivät anna vastetta yksinkertaiseen tavalliseen antibioottihoi- toon. Tavalliset hoidot jättävät usein pieniä infektion jään- nöksiä, jotka infektoivat silmän uudelleen, niin että infek- tiosykli alkaa uudestaan, ellei infektiota ole juuriaan myöten hävitetty usein toistetulla hoidolla.

Infektoituneen keratoconjunctivitiuksen hoitaminen hiirillä
160 kpl C 57 mustaa hiirtä jaettiin 8 ryhmään. Puolet kustakin ryhmästä joutui molempiin silmiin kohdistetun U.V.-säteilyn alaisiksi (cornealeesioiden synnyttämiseksi). Kaikkiin eläimiin ympätettiin sitten M.bovis-bakteereja tiputtamalla oikeaan silmään konsentraatiolla 1×10^6 bakteeria per silmä. 24 h ympäyksen jälkeen arvioitiin kaikkien eläinten cornean opaakkisuusaste. Kaikkia 8 ryhmää käsiteltiin antamalla ulkoisesti seuraava lääkitys kumpaankin silmään: ryhmät 1 ja 2 saivat 10 μ l SPLV:hin suljettua streptomysiiniä (30 mg/ml); ryhmät 3 ja 4 saivat 10 μ l streptomysiiniä (100 mg/ml); ryhmät 5 ja 6 saivat 10 μ l puskuritäytteisiä SPLV:tä suspendoituina vesipitoiseen streptomysiiniin (100 mg/ml); ja ryhmät 7 ja 8 saivat 10 μ l steriiliä suolaliuosta (huom. infektoitumatonta vasenta silmää käsiteltiin samoilla ulkonaisilla liuoksilla jotta voitaisiin määritellä, ärsyttääkö SPLV:den käyttö silmää; mitään ärsytystä ei havaittu). Kerran päivässä tarkastettiin olivatko eläinten cornealeesiot lisääntyneet vai vähentyneet ja päivinä 3, 5 ja 7 käsittelyn jälkeen oikeat silmät pyyhkäistiin tukolla ja M.boviksen eristykset suoritettiin eläimiltä. M.bovis-koloniat tutkittiin kolonioiden morfologian ja reaktiivisuuden perusteella fluoresoivasti merkittyyn M.bovis-nukan vasta-aineeseen. Tulokset, jotka on esitetty taulukossa XIV, paljastavat, että ainoastaan SPLV:hin suljettu streptomysiini oli tehokasta poistamaan infektion.

Kanin conjunctivitiuksen hoitaminen käyttämällä SPLV:hin suljettua antibioottia

M.bovis, ATCC kanta 10900, laimennettiin konsentraatioon 1×10^7 solua per ml steriiliin suolaliuokseen (0,085 % NaCl). Tasamääriä (0,1 ml) bakteerisuspensiota ympätettiin ulkoisesti kymmenen täysikasvuisen naaraskaniinin silmiin. Viljelynäytteitä otettiin päivittäin pyyhkäisemällä conjunctiivat ja panemalla tupot levyille, joissa oli verta agarissa M.boviksen eristämiseksi. Kolme päivää ympäyksestä kanit jaettiin 3 ryhmään: 2 eläintä ei saanut lainkaan käsittelyä (kontrollit); 4 eläintä sai streptomysiiniä steriilissä suolaliuoksessa (konsentraatio 10 mg/kg ruumiinpainoa) ja 4 eläintä

sai SPLV:hin suljettua streptomysiiniä steriilissä suola-
liuoksessa (konsentraatio 10 mg/kg ruumiinpainoa kohti).
Kaikki liuokset annettiin ulkoisesti jokaiseen silmään.
24 h kuluttua uudistettiin kaikkien kanien conjunctiivojen
pyyhkäisyt ja niitä jatkettiin päivittäin 7 päivän ajan.
M.boviksen eristämistulokset veri-agarlevyiltä on esitetty
taulukossa XV.

Taulukko XIV

Tulokset M.bovis-okulaari-infektion aiheuttaman hiiren
infektoituneen keratoconjunctivitiksen hoidosta

	Hiirien lukumäärä per 20 hiiren ryhmä										M-bovis-viljelyt ^a	
	Ennen käsittelyä Cornean sameusaste ^b					Käsittelyn jälkeen Cornean sameusaste ^b					Päiviä käsittelyn jälkeen	
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	3	5
<u>Ei-säteilytettyt hiiret</u>												
Kontrollit	16	3	0	1	0	18	2	0	0	0	4/5	4/5
Vapaa streptomysiini ^c	18	1	1	0	0	18	2	0	0	0	2/5	2/5
Puskuritäytteiset SPLV:t + vapaata streptomysiiniä ^c	17	2	1	0	0	18	1	1	0	0	2/5	3/5
SPLV:hin suljettu streptomysiini ^c	17	3	0	0	0	20	0	0	0	0	0/5	0/5
<u>UV-säteilytetyt hiiret</u>												
Kontrollit	1	1	5	9	4	10	3	1	2	4	5/5	5/5
Vapaa streptomysiini ^c	0	4	9	7	0	14	3	2	1	0	3/5	4/5
Puskuritäytteiset SPLV:t + vapaata streptomysiiniä ^c	0	3	5	10	2	11	2	4	3	0	3/5	3/5
SPLV:hin suljettu streptomysiini ^c	0	1	5	11	3	19	1	0	0	0	0/5	0/5

^a Silmäviljely positiivinen M.boviksen läsnäolon suhteen, määrättynä fluoresoivan vasta-aineen värjäyksen avulla.

^b Normaalin cornean tutkimus: 1 = normaalin kiillon menetys; 2 = pieniä sameita pisteitä; 3 = osittainen cornean samentuminen; 4 = cornean täydellinen samentuminen.

^c Annettu kaikkiaan 10 /ul (1,0 mg streptomysiiniä silmää kohti).

Taulukko XV

Tulokset kanin conjunctivasta otetuista eristeistä sen jälkeen kun oli ulkoisesti infektoitu *M.bovis*in kanssa ja käsitelty vesipitoisen streptomysiinin tai SPLV:hin kapseloidun streptomysiinin kanssa

Ryhmä	Eläimen numero	M.bovis-viljelyt ^a Päiviä infektoitumisesta						
		Esikäsitteily ^b		Jälkikäsitteily ^c				
		1	2	3	4	5	6	7
Kontrolli	1	0	+	+	+	+	+	+
	2	0	+	+	+	+	+	+
Streptomysiini ^d	1	0	+	+	+	+	+	+
	2	0	0	+	+	+	+	+
	3	0	+	+	+	+	+	+
	4	0	+	+	+	+	+	+
SPLV:hin suljettu streptomysiini ^e	1	0	0	+	0	0	0	0
	2	0	+	+	0	0	0	0
	3	0	+	+	0	0	0	0
	4	0	+	+	0	0	0	0

^a Viljelyistä tutkittiin *M.bovis*-kolonioiden läsnäolo veriagarlevyillä 24 h 37°C:ssa. Plus (+) merkitsee suurempaa tai yhtä suurta kuin 1 CFU *M.bovis*'ta per isolaatti; 0 merkitsee: ei havaittavia kolonioita.

^b Kaikki eläimet ympättiin 1×10^6 CFU *M.bovis*'ta ulkoisesti molempiin silmiin.

^c Eläimiä käsiteltiin 0,1 ml:lla liuosta ulkoisesti kumpaankin silmään.

^d Streptomysiiniä (10 mg/kg ruumiinpainoa kohti) steriilissä suolalioksessa.

^e SPLV:hin suljettua streptomysiiniä (10 mg/kg ruumiinpainoa kohti) steriilissä suolaliuoksessa.

Keratoconjunctivitiuksen hoito, joka on aiheutunut subkutaanisesta infektiosta

M.bovis, ATTC-kanta 10900 laimennettiin konsentraatioon 1×10^7 solua per ml steriiliin suolaliuokseen. Tasamääriä (0,1 ml) bakteerisuspensioita ympätettiin täysikasvuisten kanien silmiin, jotka oli aikaisemmin infektoitu kuten otsakkeen "Kanin conjunctivitiuksen hoitaminen käyttämällä SPLV:hin suljettua antibioottia" alla on selostettu ja joita ei oltu käsitelty SPLV:llä. Kaikkien 9 kanin oikeaan silmään ympätettiin 0,1 ml M.bovis'ta subkutaanisesti conjunctiiva-kudokseen ja kaikkien kanien vasempaan silmään ympätettiin 0,1 ml M.bovis'ta ulkoisesti. Viljelyä otettiin päivittäin molempien silmien conjunctiivoista kaikilta kaneilta ja pantiin veri-agarlevyille M.boviksen eristämiseksi. Kolme päivää ympäyksen jälkeen jaettiin kanit 3 ryhmään: 2 eläintä ei saanut mitään käsittelyä; 3 eläintä sai streptomysiiniä standardi oftalmisena glyseriinisuspensionä (streptomysiinin konsentraatio 10 mg/kg ruumiinpainoa kohti); ja 4 eläintä sai suolaliuossuspensiota, jossa oli SPLV:hin suljettua streptomysiiniä (10 mg streptomysiinisulfaattia per kg ruumiinpaino). Suspensio tai liuos annettiin ulkoisesti (0,1 ml) kuhunkin silmään. 24 h kuluttua ja kunakin viitenä seuraavana päivänä otettiin pyyhkäisy conjunctiivoista kaikilta kaneilta. M.boviksen eristystulokset veri-agarlevyiltä on esitetty taulukossa XVI. Kaikille eläimille suoritettiin nekropsia kokeiden päätyttyä ja conjunctiivat poistettiin kaikilta eläimiltä. Niistä suoritettiin vaskulaaritutkimus ja ne jauhettiin, homogenoitiin ja pantiin veri-agarlevyille M.boviksen eristämistä varten. Tulokset on esitetty taulukossa XVII.

Taulukko XVI

Tulokset kanin conjunctiivasta otetuista eristeistä sen jälkeen kun oli ympätty M.boviksen avulla conjunctiivamembraaneihin ja käsitelty streptomysiinillä oftalmisissa glyseriini-liuoksissa tai SPLV:hin suljetulla streptomysiinillä suolaliuoksessa

Ryhmä	Eläimen numero ^b	M.bovis-viljelyt ^a Päiviä infektoitumisen jälkeen ^c				
		Esikäsitelty		Jälkikäsitelty		
		1	2	3	4	5
Kontrolli	1	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+
Streptomysiini glyseriiniliuoksessa ^d	1	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+
SPLV:hin kapseloitu streptomysiini ^e	1	+	+	0	0	0
	2	+	+	0	0	0
	3	+	+	0	0	0
	4	+	+	0	0	0

^a Viljelyistä laskettiin M.bovis-kolonoidien lukumäärät veriagarlevyillä 24 h jälkeen 37°C:ssa. Plus (+) esittää suurempaa tai yhtä suurta kuin 1 CFU M-boviksia per isolaatti; 0 esittää: ei havaittavia kolonioita.

^b Kaikki eläimet ympättiin käyttäen 1×10^6 CFU M.bovista ulkoisesti molempiin silmiin 1×10^6 CFU M.bovista injektointiin conjunctiivamembraaneihin oikeanpuolisiin silmiin; ja 1×10^6 CFU M.bovista pantiin ulkoisesti vasemmanpuoleisiin silmiin.

^c Eläimiä käsiteltiin 0,1 ml:n kanssa liuosta ulkoisesti molempiin silmiin.

^d Eläimiä käsiteltiin ulkoisesti kumpaankin silmään käyttäen streptomysiiniä (10 mg/kg ruumiinpainoa kohti) oftalmisissa glyseriiniperusliuoksessa.

^e Eläimiä käsiteltiin ulkoisesti kumpaankin silmään käyttäen SPLV:hin suljettua streptomysiiniä (10 mg/kg ruumiinpainoa kohti) steriilissä suolaliuoksessa.

Taulukko XVII

Tulokset kanien silmäkuopan ja siihen liittyvien kudosten nekropsiasta ymppäyksen jälkeen käyttäen M.bovista conjunctiivakudokseen ja joko oftalmisessa glyseriiniliuoksessa olevalla tai SPLV:hin suljetulla streptomysiinillä steriilissä suolaliuoksessa tapahtuneen käsittelyn jälkeen^a

	<u>M.bovis- viljelyjen eristäminen</u>	<u>Oikean silmän vasku- laarisysteemin arvioi- minen^b</u>
Kontrolli A	+	2+
B	+	2+
<u>Streptomysiini glyse- riiniliuoksessa</u>		
A	+	2+
B	+	1+
C	+	2+
D	+	2+
<u>SPLV:hin kapseloitu streptomysiini</u>		
A	0	0
B	0	0
C	0	0
D	0	0

^a Merkkien selitykset ovat samat kuin taulukossa XII, suoritettu päivänä 5 infektion jälkeen.

^b Vaskulaarisysteemi arvioitu seuraavasti: 0 = suonet normaaleja; 1 = jotkut suonet selvästi laajentuneet ja pienemmät suonet sulautuneet niihin; 2 = hajanaista punaista, yksityiset suonet eivät helposti erotettavissa; 3 = diffuusia häränpunaista, vaskulaarivuotoa ja veren vuotamista conjunctiivaan.

SPLV:den tehokkuuden arvostelu verrattuna liposomi-valmisteisiin okulaari-infektioiden hoidossa

M.bovis (ATCC kanta 10900) laimennettiin konsentraatioon 1×10^7 solua per ml steriiliin suolaliuokseen. Tasamääriä (0,1 ml) bakteerisuspensiota ympätettiin täysikasvuisten kanien molempien silmien conjunctiivakudokseen. Pyyhkäistiin joka

päivä molempien silmien conjunctiivoja kaikilta kaneilta ja pantiin veri-agarlevyille *M.boviksen* eristämistä varten. 5 vrk ympppäämisen jälkeen kanit jaettiin 6 ryhmään: 2 eläintä ei saanut mitään käsittelyä (kontrollit); 3 eläintä sai SPLV:hin suljetun streptomysiinin suspensiota (10 mg streptomysiinisulfaattia per kg ruumiinpainoa) jonka laimennettuna suhteessa 1:100, O.D.₄₈₀ (optinen tiheys 480 nm:llä) oli = 0,928; 3 eläintä sai SPLV:hin kapseloidun streptomysiinin suspensiota (10 mg streptomysiinisulfaattia per kg ruumiinpainoa kohti), jonka O.D.₄₈₀ oli = 0,449, kun laimennus oli suhteessa 1:100; 3 eläintä sai SPLV:hin kapseloidun streptomysiinin suspensiota (10 mg streptomysiinisulfaattia per kg ruumiinpainoa), jonka, laimennettuna suhteessa 1:100, O.D.₄₈₀ oli = 0,242; 3 eläintä sai SPLV:hin kapseloitua streptomysiinin suspensiota (10 mg streptomysiinisulfaattia per kg ruumiinpainoa), jonka, laimennettuna suhteessa 1:100, O.D.₄₈₀ oli = 0,119; ja 2 eläintä sai multilamellisten rakkuloiden (MLV:t) suspensiota, jotka sisälsivät streptomysiiniä (10 mg streptomysiinisulfaattia per kg ruumiinpainoa), jonka O.D.₄₈₀ oli = 0,940 laimennuksessa 1:100. MLV:t tehtiin Fountain et al. menetelmän mukaisesti, Curr. Micro, 6:373 (1981) lisäämällä streptomysiinisulfaattia kuivaan lipidikalvoon, joka sen jälkeen pantiin pyörreliikkeeseen ja annettiin paisua 2 h ajan; ei-kapseloitunut streptomysiini poistettiin useiden sentrifugointien avulla.

Suspensioita annettiin ulkoisesti kuhunkin silmään. 24 h kuluttua otettiin pyyhkäisynäytteitä conjunctiivoista kaikista kaneista joka päivä 9 päivän aikana ja pantiin veriagariin levyille. Tulokset *M.boviksen* eristämisestä veriagarlevyillä on esitetty taulukossa XVIII. Kaikille eläimille suoritettiin nekropsia. Niissä tutkittiin kyyneleritykset ja conjunctiivat poistettiin aseptisesti kaikilta eläimiltä. Näistä tutkittiin vaskulaarisysteemi ja ne jauhettiin, homogenoitiin ja pantiin veriagarlevyille *M.boviksen* eristämistä varten. Tulokset on esitetty taulukossa XIX.

Esimerkki: Virusinfektioiden hoito

Lymfosyyttinen koriomeningitis-virus (LCMV), Arenavirus-ryhmään kuuluva, tunnetaan sairauksien aiheuttajana ihmisellä, ja LCMV-infektio on kuolettavan vaarallinen hiirillä, jotka ympättään intrakerebraalisesti tämän viruksen avulla. Hiirien kuoleman aiheuttavat immuunisolut, jotka reagoivat virusinfektoituneita soluja vastaan. Virus ei tapa soluja, joissa se moninkertaistuu, sen vuoksi täytyy terapeuttisen aineen, jota käytetään hiirille, joko inhiboida viruksen lisääntymisen niin että immuunisolut eivät aktivoidu, ja/tai inhiboida immuunisolujen aktivoituminen.

Seuraava esimerkki havainnollistaa virusinfektioiden hoidon tehokkuutta annettaessa SPLV:hin kapseloitua viruksia hävittävää yhdistettä.

Letaalin lymfosyyttisen koriomeningitis-virusinfektion hoito hiirillä

Sveitsiläisiin, 2 kk:n ikäisiin hiiriin ympättiin intrakerebraalisesti letaali annos LCM-virusta, so. 100 plakkia muodostavaa yksikköä (PFU) 0,5 ml ympäysmäärä per hiiri. Hiiret jaettiin 4 ryhmään, joissa 7 eläintä kussakin, ja niitä käsiteltiin päivinä 2, 3 ja 4 infektion jälkeen intraperitoneaalisin injektioin 0,1 ml/annos/hiiri seuraavasti: 1) "SPLV-R ryhmä" sai muna-fosfatidyylikoliini-suspensiota SPLV:ssä, jotka sisälsivät 3 mg ribavariinia/ml. SPLV:t valmistettiin käyttämällä 100 mg lipidia ja 0,3 ml liuosta, jossa oli 100 mg lääkettä/ml PBS-puskuria; lääkkeen kapseloimisaste oli 10 %; 2) "R-ryhmä" käsiteltiin ribavariiniliuoksella 3 mg/ml PBS; 3) "SPLV-ryhmä" käsiteltiin puskuritäytteisillä SPLV:llä (so. SPLV:t valmistettiin kuten edellä, mutta ilman ribavariinia); ja 4) "kontrolliryhmä" käsiteltiin PBS:llä. Päivänä 5 infektion jälkeen tapettiin 2 hiirtä kustakin ryhmästä ja niiden pernat homogenoitiin (2 pernaa/ryhmä homogenoitiin PBS:ssä 1/20 paino per volyymi puskuria). Plakkia muodostavat yksiköt (PFU) per ml määrättiin kustakin suspensiosta.

Jäljelle jääviä 5 hiirtä kussakin ryhmässä tarkkailtiin letaalisuuden suhteen kaksi kertaa päivässä 30 vrk aikana. Tulokset on esitetty taulukossa XX.

Taulukko XX osoittaa selvästi letaalisuuden lisääntymisen ja infektoiduista hiiristä löydettyjen virusten lisääntymisen. Vielä ei tiedetä, johtuvatko nämä tulokset ribavariinin viruksia hävittävästä vaikutuksesta joka vapautuu SPLV:stä vai johtuvatko ne isäntähiiren immuunimoduloitumisesta ribavariinin viivytetyn vapautumisen aikana SPLV:stä.

Taulukko XVIII

M.boviksen eristäminen infektoitusta kanin conjunctiivasta käsittelyn jälkeen SPLV:hin kapseloidun streptomysiinin laimennusten kanssa suolaliuoksessa tai MLV:hin kapseloidun streptomysiinin kanssa suolaliuoksessa

Ryhmä	Eläimen numero	M.boviksen eristäminen ^a													
		Päiviä infektoimisen jälkeen													
		Esikäsittely					Jälkikäsittely								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Kontrolli	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MLV:hin kapseloitu streptomysiini	1	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	0	+
	2	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0
SPLV:hin kapseloitu streptomysiini (laimentamaton)	1	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SPLV:hin kapseloitu streptomysiini (laimennus 1:2)	1	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0
	3	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0
SPLV:hin kapseloitu streptomysiini (laimennus 1:4)	1	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
	2	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+	0	0	0	0
	3	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+
SPLV:hin kapseloitu streptomysiini (laimennus 1:6)	1	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+

^a Kaikki eläimet ympättiin käyttäen 1×10^6 CFU M.bovista injektoimalla molempien silmien conjunctiivamembraaneihin. Conjunctivan pyyhkäisyjä pantiin veri-agarlevyille. Viljelyistä tutkittiin M.bovis-kolonioiden läsnäoloa veri-agarlevyillä 24 h kuluttua 37°C:ssa; (+) = suurempi tai yhtä suuri kuin 1 CFU; 0 = ei havaittavia viljelyjä.

Taulukko XIX

Tulokset kanin silmäkuoppa- ja siihen liittyvien kudosten nekropsiasta *M.bovis*-bakteerien kanssa suoritettun ympäyksen jälkeen conjunctiivakudokseen ja joko MLV:hin kapseloidun streptomysiinin, SPLV:hin kapseloidun streptomysiinin tai SPLV:hin kapseloidun streptomysiinin laimennusten kanssa suoritettun käsittelyn jälkeen^a

	<u>Eläin</u>	<u>M.boviksen eristäminen</u>	<u>Silmien vas-kulaarisysteemin arviointi^b</u>	<u>Kyynelten vuotaminen^c</u>
Kontrolli	1	+	1+	1+
	2	+	1+	1+
MLV:hin kapseloi-tu streptomysiini	1	+	1+	1+
	2	0	1+	0
SPLV:hin kapseloi-tu streptomysiini (laimentamaton)	1	0	0	0
	2	0	1+	0
	3	0	0	0
SPLV:hin kapseloi-tu streptomysiini (laimennus 1:2)	1	+	2+	2+
	2	0	0	0
	3	0	1+	0
SPLV:hin kapseloi-tu streptomysiini (laimennus 1:4)	1	0	0	0
	2	0	1+	0
	3	+	1+	0
SPLV:hin kapseloi-tu streptomysiini (laimennus 1:6)	1	+	1+	1+
	2	0	1+	0
	3	+	1+	0

^a Merkit ovat samat kuin taulukossa XIV, joka suoritettiin päivänä 14 infektoimisen jälkeen.

^b Vaskulaarisysteemi arvioitiin seuraavasti: 0 = suonet normaaleja; 1 = jotkut suonet laajentuneita ja pienemmät suonet sulautuneet niihin; 2 = hajanaista punaista, yksityiset suonet eivät helposti erotettavissa; 3 = hajanaista häränpunaista, vaskulaarivuotoa ja verenvuotoa conjunctiivaan.

^c Kyynelten valuminen arvioitiin seuraavasti: 0 = ei valumista; 1 = valuminen kasteli luomet ja luomien lähellä olevat karvat; 2 = valuminen kasteli luomet, silmien lähellä olevat karvat ja alueet.

Taulukko XXLetaalin LCM-virusinfektion hoito hiirellä^a

<u>Ryhmä</u>	<u>Letaalisuus^c</u>	<u>Pernasta löydetty virukset</u> (PFU x 10 ³ /ml) ^c
Kontrolli	5/5	7,0
SPLV-ryhmä	5/5	6,9
R-ryhmä	5/5	5,2
SPLV-R-ryhmä	3/5	3,4

^a Kaksi kuukautta vanhoihin hiiriin ympättiin intrakerebraalisesti letaali annos, so. 100 PFU LCM-virusta 0,05 ml:ssa ymppeä.

^b Letaalisuus ilmoitetaan numerona kuolleita/ryhmän lukumäärä.

^c Viidentenä päivänä infektoimisesta 2 hiirtä kustakin ryhmästä tapettiin ja niiden pernat homogenoitiin konsentraatioon 1 g pernaa/20 ml homogenaattia.

Patenttivaatimukset

1. Stabiilit plurilamelliset rakkulat, joiden rakkulakoko on 500 - 10 000 nm, tunnetut siitä, että niillä on muutamasta yli 100:aan lipidikaksoiskerrosta, jotka sulkevat väliinsä vähintään yhden veteen liunneen aineen, ja joilla lipidikaksoiskerroksilla on järjestäytynyt molekyyliarkkitehtuuri, joka luo supermolekulaarisen rakenteen, joka eroaa toisten multilamellisten rakkuloiden rakenteesta siten, että verrattaessa stabiileja plurilamellisia rakkuloita muihin multilamellisiin rakkuloihin, jotka koostuvat samantalaisesta lipidistä ja vesipitoisesta aineosasta, niin niillä on seuraavat ominaisuudet:

- (a) korkeampi liunneen aineen sisäänsulkeumisprosentti,
- (b) alempi kelluvuustiheys,
- (c) noin 1/3 suurempi tilavuus,
- (d) suurempi stabiilisuus auto-oksidatiota vastaan varastoitaessa puskurissa,
- (e) suurempi stabiilisuus ruumiinnesteissä,
- (f) suurempi sisältävän liunneen aineen vapautumisprosentti altistettaessa urealle, guanidiinille tai ammoniumasetaatille,
- (g) alhaisempi sisältävän liunneen aineen vapautumisprosentti altistettaessa suolahapolle tai seerumille, ja
- (h) annettaessa viljeltäville soluille jakautuu sisään suljettu sisältö kauttaaltaan solujen sytosoliin, ja että niitä voidaan valmistaa seuraavasti:

- (a) muodostetaan dispersio vähintään yhdestä amfipaattisesta lipidistä orgaaniseen liuottimeen,
- (b) yhdistetään kohdan (a) dispersio vesipitoisen faasin kanssa kaksifaasiseoksen muodostamiseksi, johon vesipitoinen faasi voidaan emulgoida täydellisesti, ja
- (c) poistetaan orgaaninen liuotin kaksifaasiseoksesta samanaikaisesti, kun vesipitoinen faasi emulgoidaan, jolloin vaiheet (a), (b) ja (c) suoritetaan lämpötilassa alueella 4-60°C ja saadaan stabiileja plurilamellisia rakkuloita, jotka ovat oleellisesti vapaita

multilamellisista rakkuloista (MLV), unilamellisista rakkuloista (SUV) ja käänteisfaasihaihdutusrakkuloista (REV).

2. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset rakkulat, tunnetut siitä, että lämpötila menetelmän kohdissa (a) ja (b) on alempi kuin ainakin yhden mainituista lipideistä transi-tiolämpötila.
3. Patenttivaatimuksen 2 mukaiset rakkulat, tunnetut siitä, että menetelmässä liuotin on hiilifluoridi tai dietyylieetteri tai niiden seos.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukaiset rakkulat, tunnetut siitä, että menetelmässä liuottimena käytetään hapettumista ehkäisevää ainetta sisältävää liuotinta, edullisesti butyy-li-hydroksitolueenia.
5. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset rakkulat, tunnetut siitä, että menetelmän vaiheessa (b) ainakin 20 % mainitusta materiaalista saadaan suljetuksi rakkuloihin.
6. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset rakkulat, tunnetut siitä, että liuottimen ja vesipitoisen faasin välinen tila-vuussuhde on välillä 3:1 ja 100:1.
7. Jonkin patenttivaatimuksen 1-6 mukaiset rakkulat, tunnetut siitä, että aine, joka suljetaan rakkuloihin, lisätään vesipitoisen faasin kanssa.

Patentkrav

1. Stabila plurilamellära blåsor med en blåsstorlek över 500 - 10 000 nm, kännetecknade av att de har från ett till över 100 lipiddubbelskikt, vilka innesluter däremellan minst ett till vatten löst ämne, och vilka lipiddubbelskikt har en organiserad moleky-larkitektur som skapar en supermoleky-lär struktur, som skiljer sig från de andra multilamellära blåsornas struktur så, att när man jämför de stabila plurilamellära blåsorna med de andra multilamellära blåsor, som består av en likadan lipid och en vattenhaltig beståndsdel, har de följande egenskaper:

- (a) högre inneslutningsprocent av löst ämne,
- (b) lägre flytningsdensitet,
- (c) cirka 1/3 högre volym,
- (d) större stabilitet mot autooxidation under lagring i buffert,
- (e) större stabilitet i kroppsvätskor,
- (f) större frigörelseprocent av inneslutet löst ämne vid utsättning för urea, guanidin eller ammoniumacetat,
- (g) lägre frigörelseprocent av inneslutet löst ämne vid utsättning för saltsyra eller serum, och
- (h) vid administrering till celler i kultur fördelas det inneslutna innehållet helt i cellernas cytosol,

och att de kan framställas som följer:

- (a) en dispersion av minst en amfipatisk lipid i ett organiskt lösningsmedel bildas,
- (b) dispersion från steget (a) kombineras med en vattenhaltig fas för bildning av en tvåfasblandning till vilken den vattenhaltiga fasen kan helt emulgeras, och
- (c) det organiska lösningsmedlet avlägsnas från tvåfasblandningen samtidigt som den vattenhaltiga fasen emulgeras, varvid stegen (a), (b) och (c) utförs vid temperaturintervall 4-60°C och man erhåller stabila plurilamellära blåsor, som är väsentligen fria från multilamellära blåsor (MLV), unilamellära blåsor (SUV) och omvändfasdunstningsblåsor (REV).

2. Blåsor enligt patentkravet 1, kännetecknade av att temperaturen vid stegen (a) och (b) är lägre än transitions-temperatur av minst en av nämnda lipider.

3. Blåsor enligt patentkravet 2, kännetecknade av att vid förfarandet lösningsmedlet är fluorkarbon eller dietyl-eter eller en blandning därav.

4. Blåsor enligt patentkravet 3, kännetecknade av att vid förfarandet som lösningsmedlet används ett lösningsmedel innehållande ett oxidation hindrande ämne, företrädesvis butyl-hydroxitoluen.

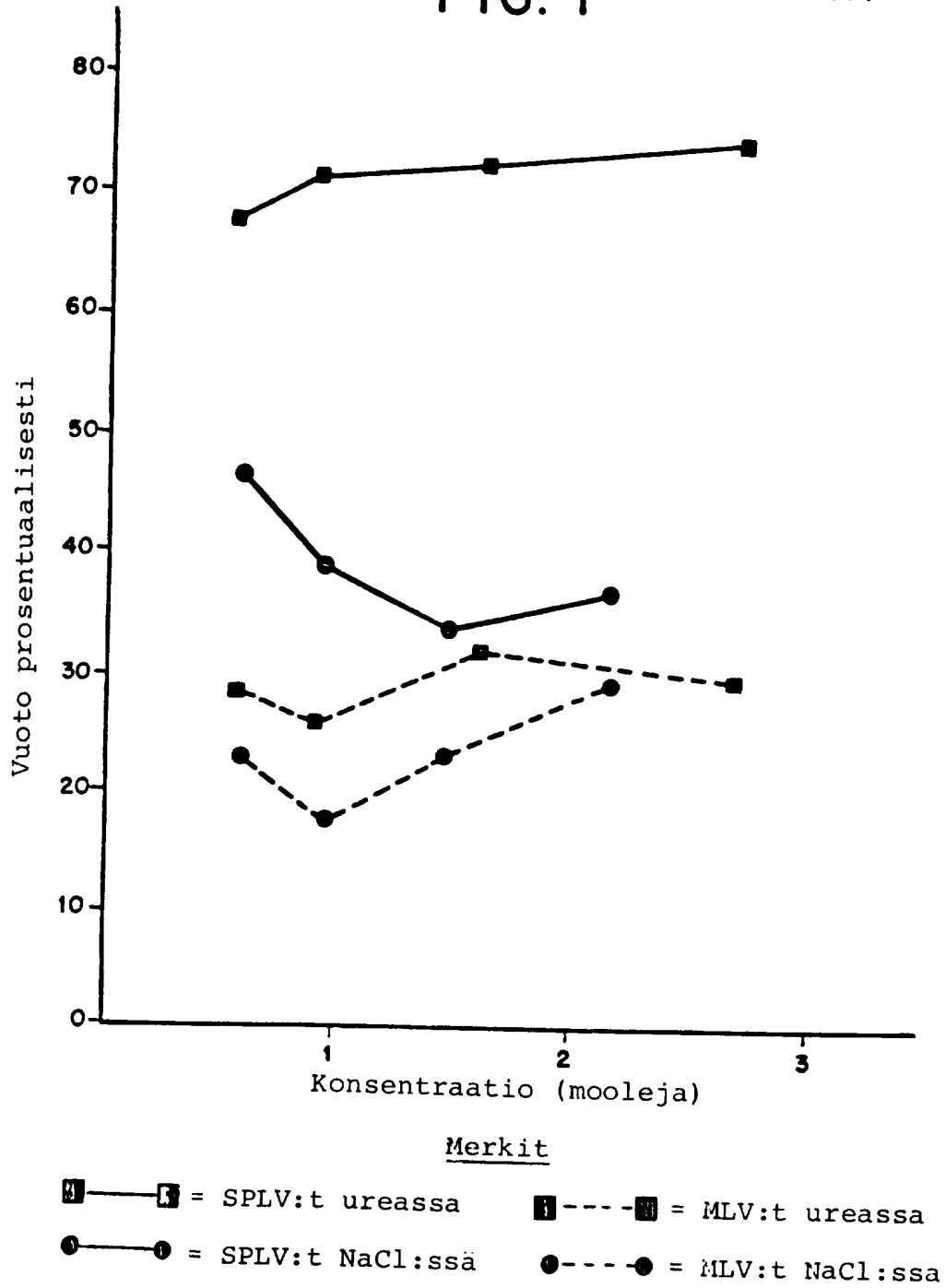
5. Blåsor enligt patentkravet 1, kännetecknade av att vid förfarandets steg (b) minst 20 % av nämnda material inneslutes i blåsorna.

6. Blåsor enligt patentkravet 1, kännetecknade av att volymförhållandet mellan lösningsmedlet och den vattenhaltiga fasen är mellan 3:1 och 100:1.

7. Blåsor enligt något av patentkraven 1-6, kännetecknade av att ämnet som inneslutes i blåsorna tillsättes med den vattenhaltiga fasen.

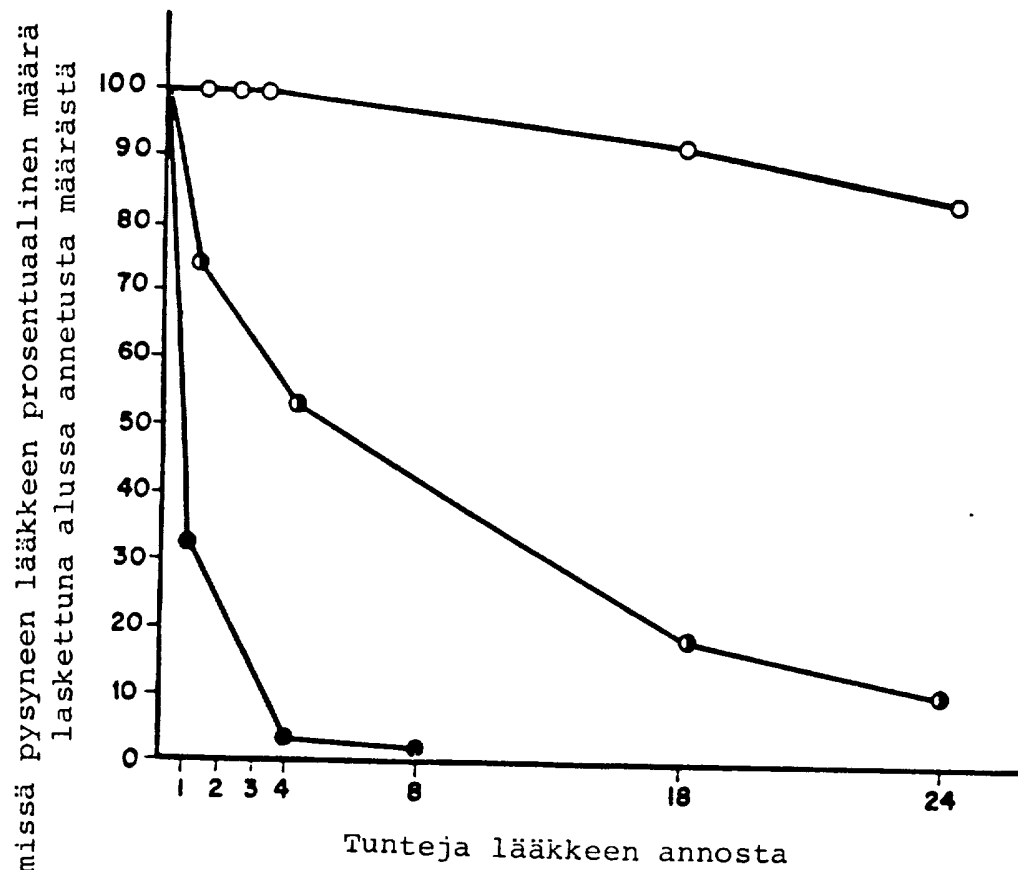
FIG. 1

1/7



2/7

FIG. 2

Merkit

- = SPLV:n lipidikomponentti
①—① = SPLV:n suljettu gentamysiini
●—● = Vapaa gentamysiini

FIG. 3

Elektroni spin resonansspektri

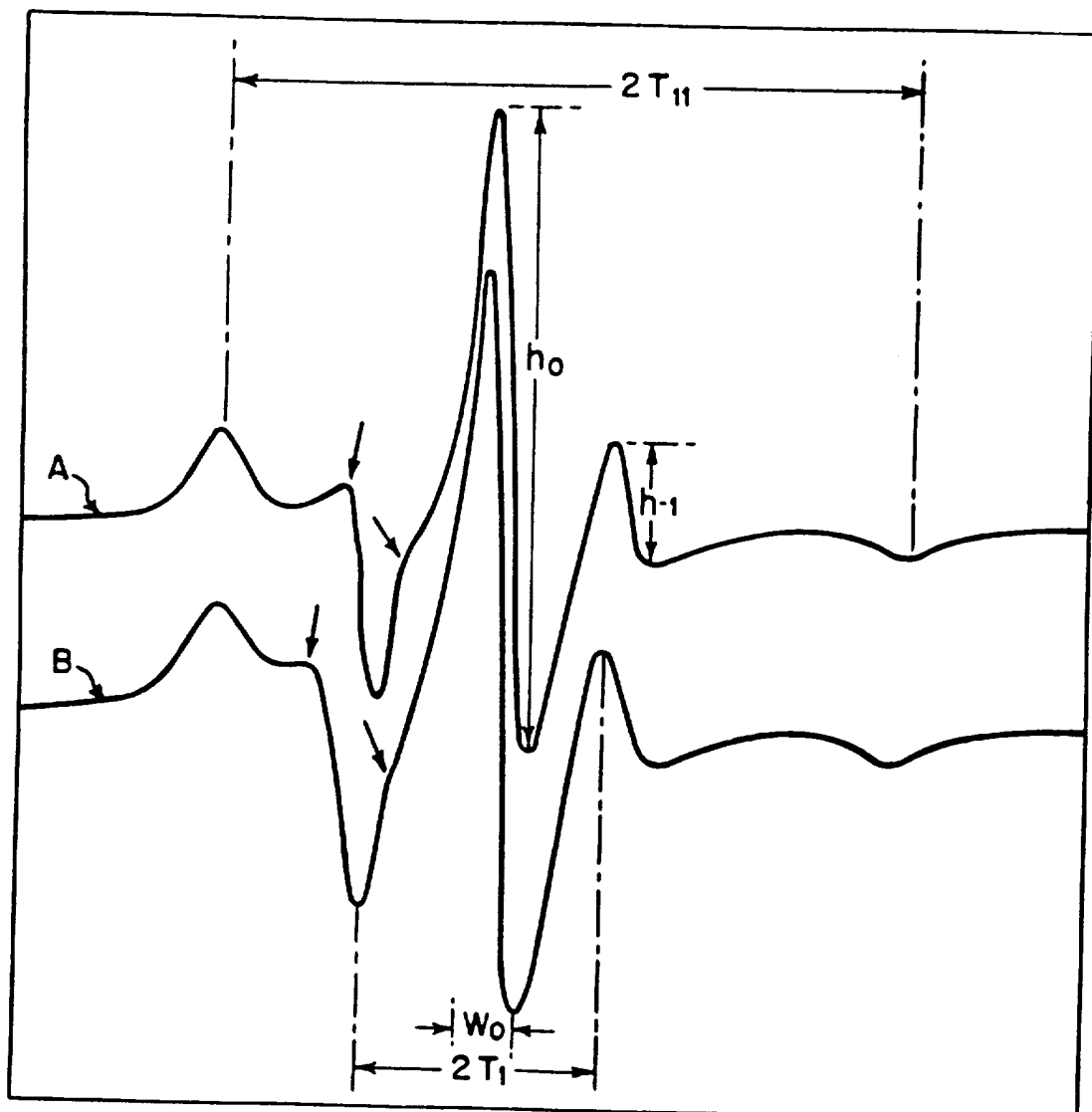


FIG. 4

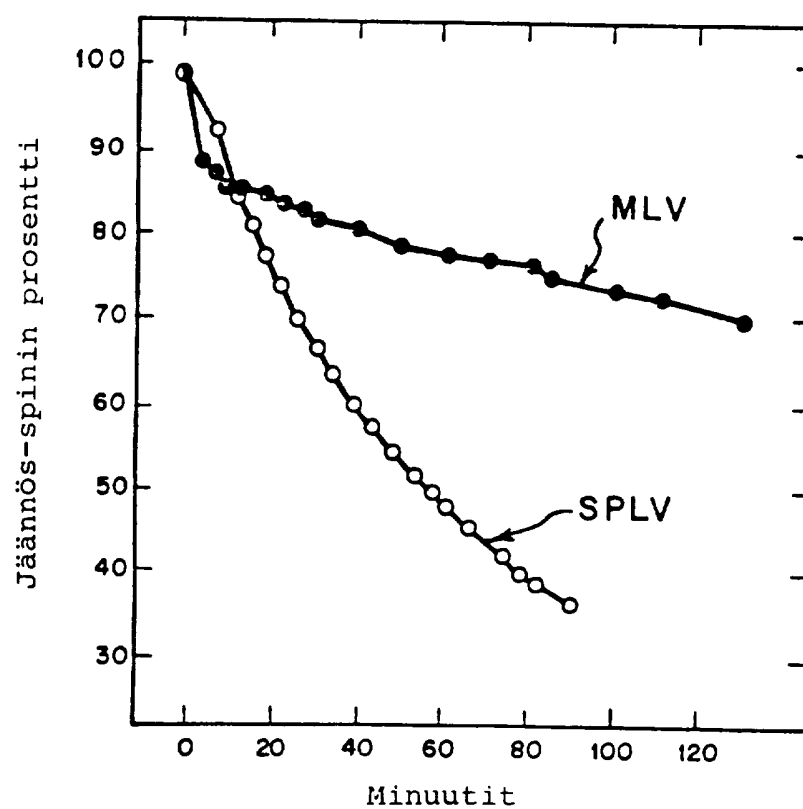
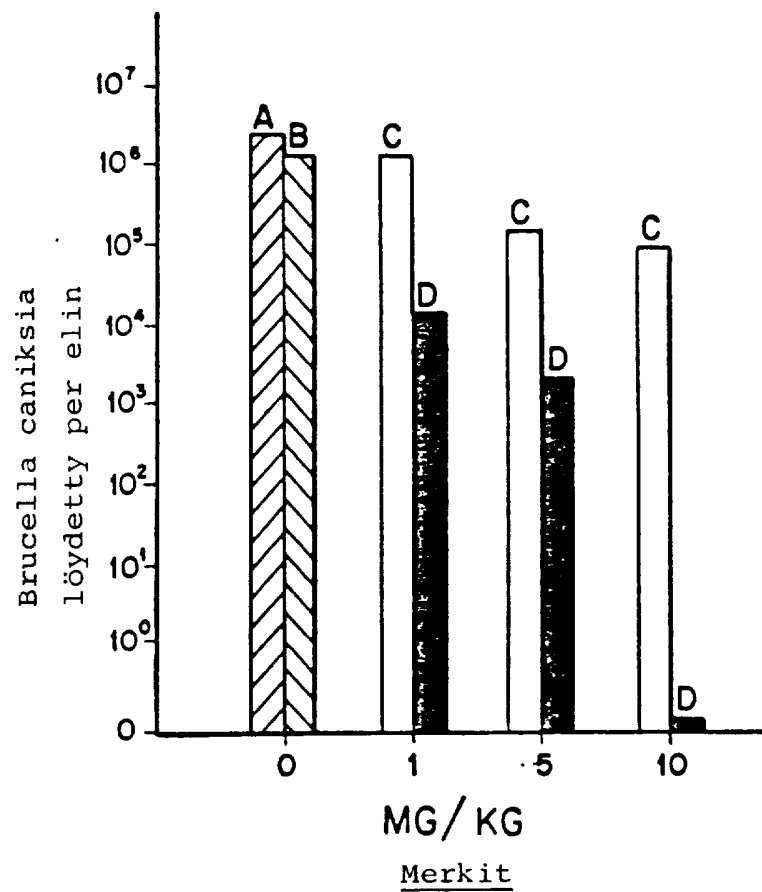


FIG. 5



A: kontrolli B: puskuritäytteiset SPLV:t
C: streptomysiini
D: SPLV:ihin suljettu streptomysiini

FIG. 6

Eloon jääneet Brucella canikset hiiren eri kudoksissa kaksivaiheisen käsittelyn jälkeen streptomysiinillä

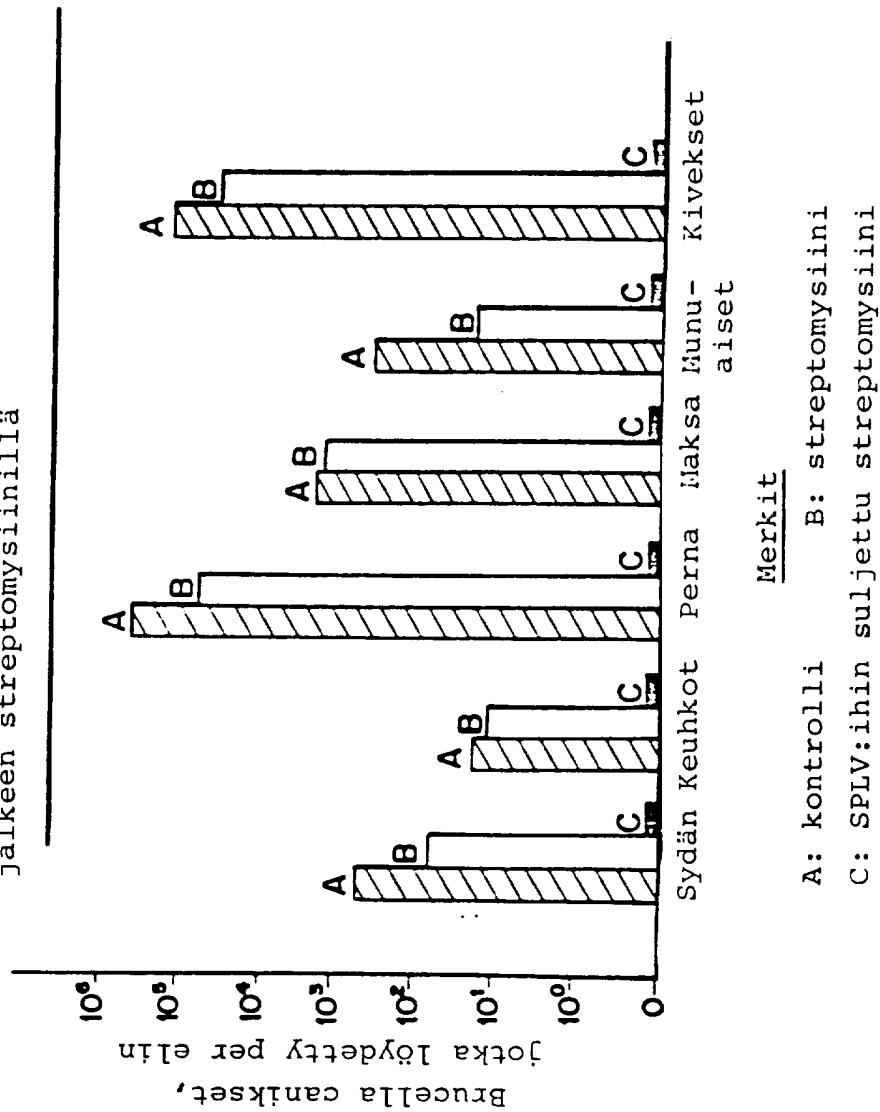


FIG. 7

Eloon jääneet Brucella abortukset marsujen pernoissa
kaksivaiheisen käsittelyn jälkeen streptomysiinillä

