

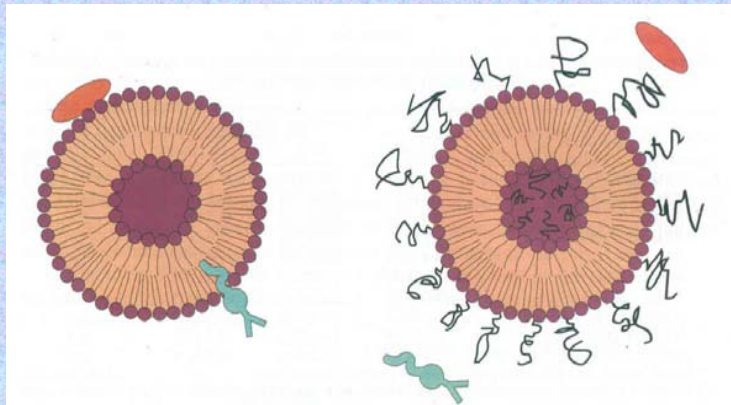
# Liposzómák diagnosztikai és terápiás alkalmazásai I.

Dr. Voszka István

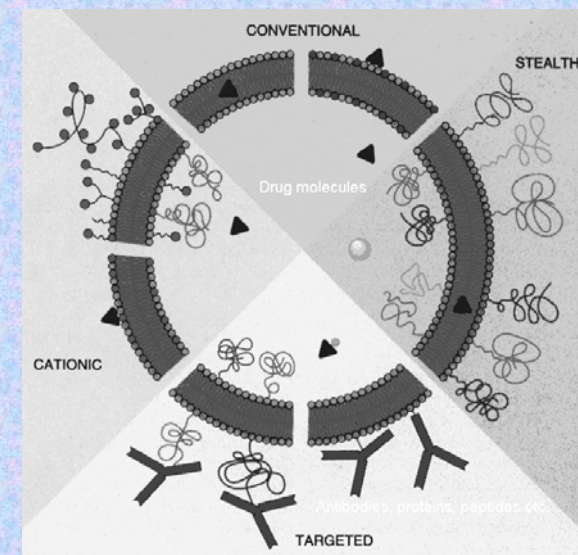
**Előny:**

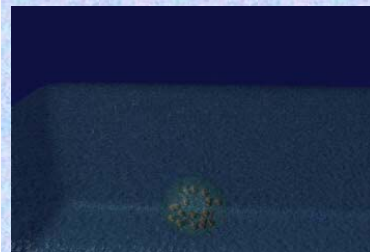
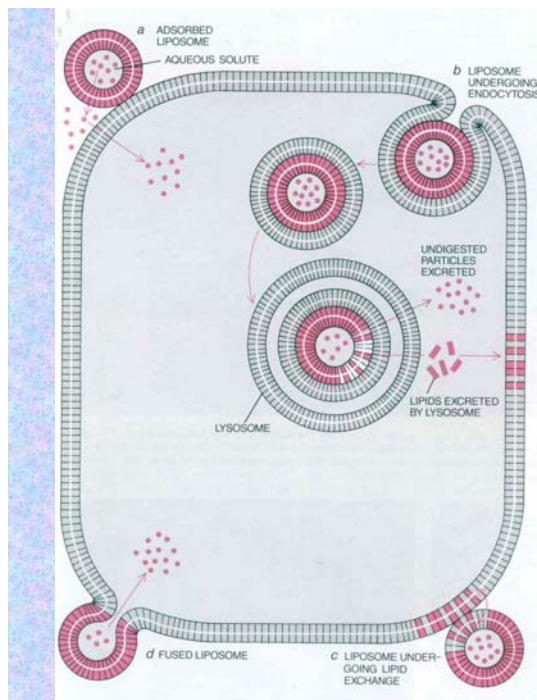
- célzott bejuttatás
- kevesebb mellékhatás
- kisebb dózis elegendő

- máj, lép vizsgálata vagy kezelése közönséges (C) liposzómákkal
- RES (MPS) telítése „üres” liposzómákkal → utána más területek vizsgálhatók
- „stealth” (S) liposzómák az immunrendszert jobban ki tudják kerülni
- speciális markerek, receptorok alkalmazása (immunliposzómák) → szervspecifikus célbajuttatás

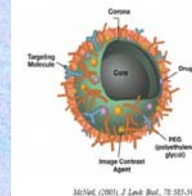


## Liposzómák csoportosítása





**Diagnosztikai alkalmazások:** diagnosztikában használatos anyagokat zárnak a liposzómákba



### 1. Röntgen-kontrasztanyag

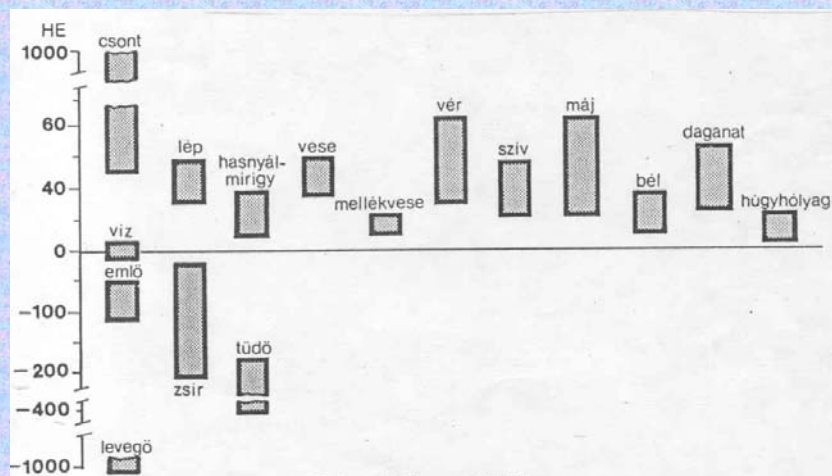
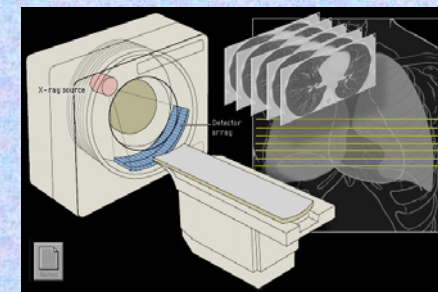
Pl. CT vizsgálatnál az egyes képelemek denzitását határozzák meg egy relatív skálán (Hounsfield-skála)

$$HE = \frac{\mu - \mu_{\text{víz}}}{\mu_{\text{víz}}} * 1000$$

A lágy szövetek relatív denzitása szűk tartományban van, ezért gyakran kontrasztanyag szükséges.

Liposzómában

- erősebb kontraszt
- hosszabb ideig



35. ábra. CT abszorpciós skála

A különböző szövetek és szervek vízhez viszonyított sugárelnyelési tartományai

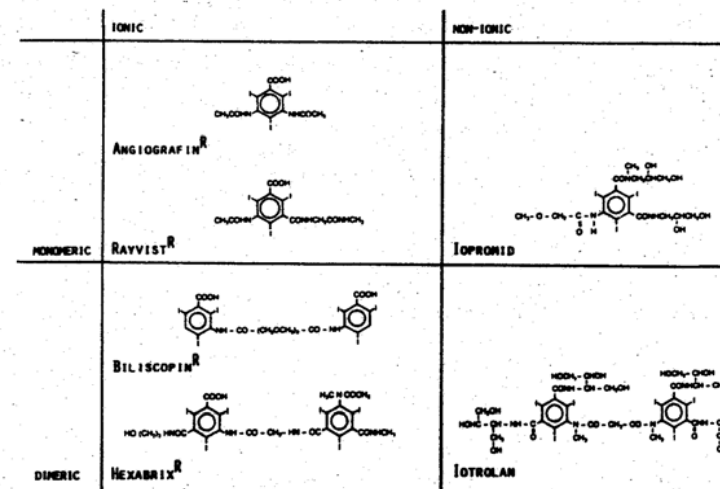


Fig. 1. Chemical structures of the radiocontrast agents used.



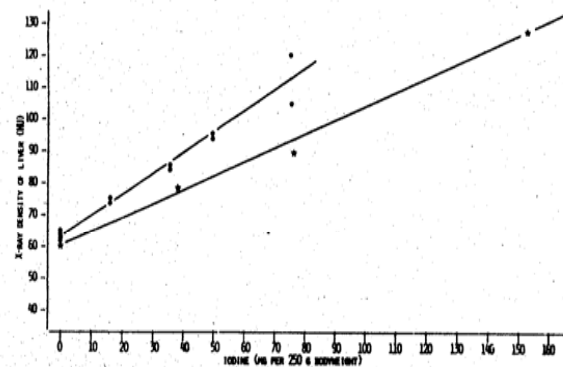


Fig. 4. Correlation between X-ray density of the liver and amount of iodine administered. (The values are average values from 10 different regions of the liver.) Dots: liposome encapsulated Angiografin, lipid mixture: egg-PC:CH = 7:3; rat liver, 60 min after iv. injection, stars: free radiocontrast agent, human liver, 40 sec after iv. injection (Claussen).

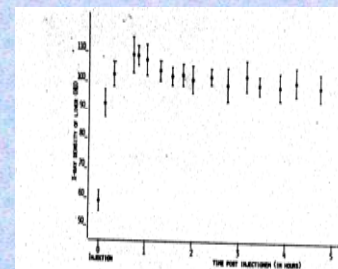


Fig. 5a. Time course of intensified X-ray density of the rat liver after iv. liposome encapsulated Angiografin. (The values are average values from 10 different regions of the rat liver, lipid mixture: egg-PC:CH = 7:3, injection iodine content: 90 mg iodine.)

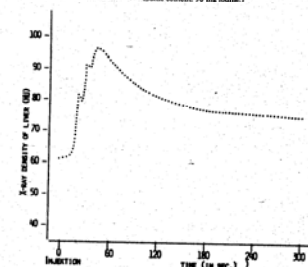


Fig. 5b. Time course of intensified X-ray density of the human liver after iv. injection of free radiocontrast agent (Claussen). (The values are average values from 10 different regions of the human liver.)

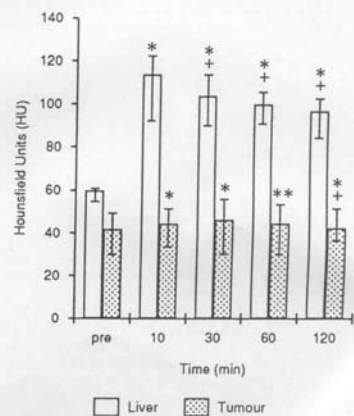


Fig. 1. Attenuation in normal liver tissue and tumorous tissue before and after injecting iodoxanol-liposomes. Median values and ranges. Levels of significance: comparison of values after CM administration to precontrast values; \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ . Attenuation 30, 60, and 120 min after injection compared to 10 min after injection; +  $p < 0.05$ .

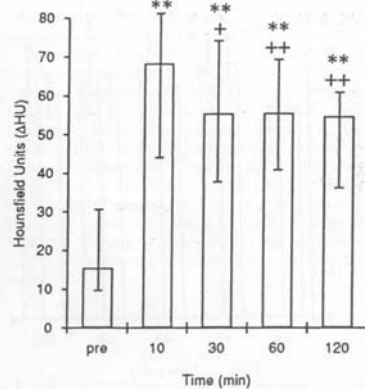


Fig. 3. Contrast expressed as the difference in attenuation ( $\Delta$ HU) between normal liver tissue and tumorous tissue before and after injecting iodoxanol-liposomes. Median values and ranges. Levels of significance: comparison of values after CM administration to precontrast values; \*\*  $p < 0.01$ . Contrast 30, 60, and 120 min after injection compared to 10 min after injection; +  $p < 0.05$  and ++  $p < 0.01$ .

## 2. Radioaktív izotópok

- Liposzómába zárva specifikussabb kötődés, pl. gyulladásos góchoz, tumorhoz

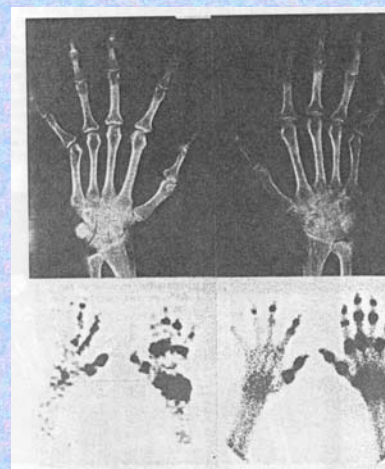
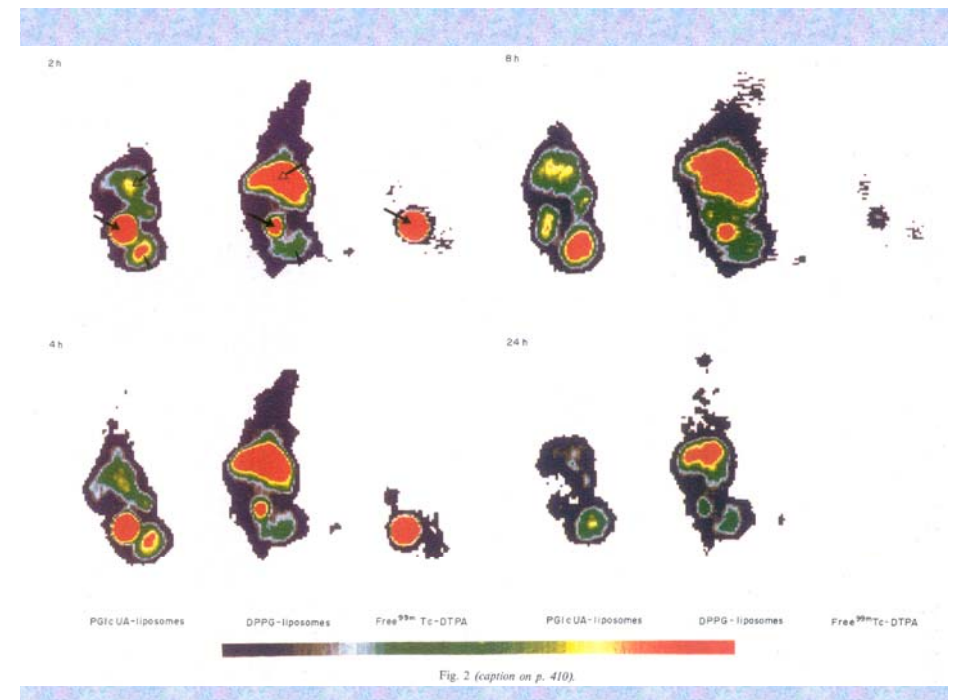
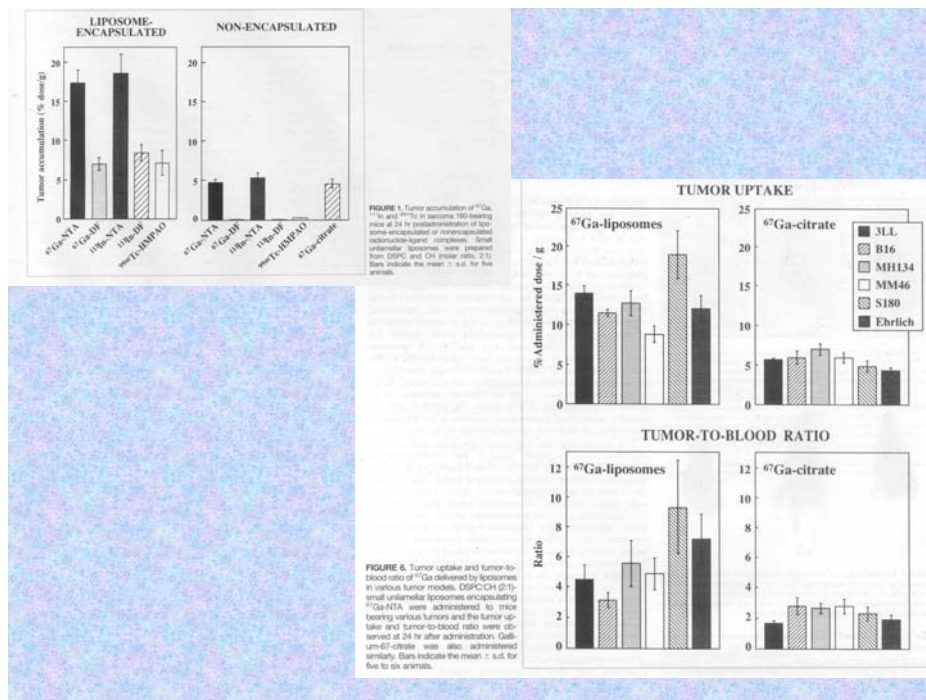
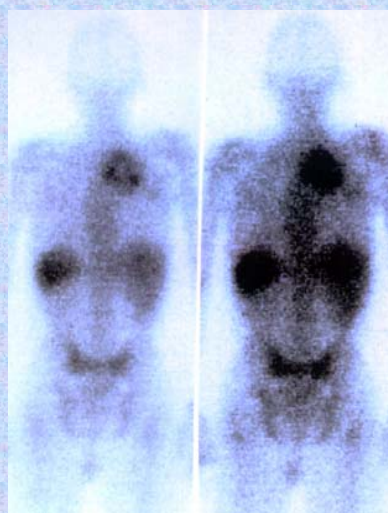


Fig. 2. Radiographs, liposome scan (bottom left), and bone scan (bottom right) of a patient with active psoriatic arthritis. Note lines of cartilage at wrists and erosions at metatarsophalangeal, proximal interphalangeal, and distal interphalangeal joints. Note also increased activity at these joints, especially the right hand on the bone scan. The liposome scan also shows increased activity, but there is more diffuse activity over the left index finger where clinically there was active tenosynovitis.



## Szcintigram 24 ill. 48 órával az izotópot tartalmazó Stealth liposzóma beadása után (hátnézet)



- A vizsgálati idő lerövidíthető **biotin tartalmú** liposzómákkal (avidinhoz kötődnek → aggregátumok → a makrofágok bekebelezik)

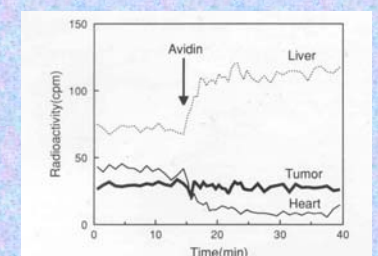
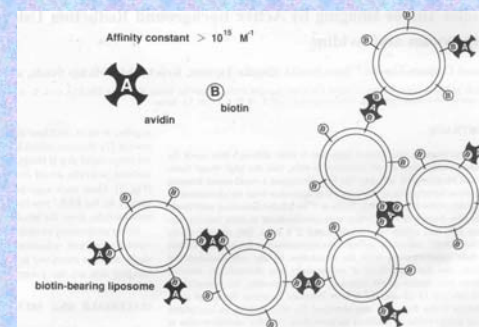
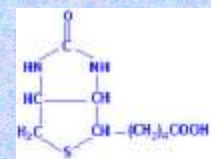


Fig. 7. Time-activity curves in the regions of interest over tumor, liver, and heart. Dynamic acquisition was started at 105 min after the administration of B-liposomes, and avidin was administered 1 s, after an additional 15 min.



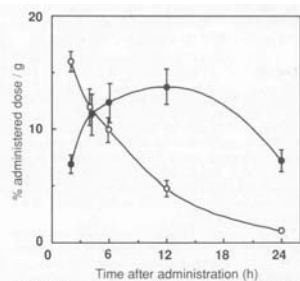


Fig. 2. Uptake and retention of  $^{67}\text{Ga}$  in tumour and blood of mice bearing sarcoma 180 after the administration of biotin-bearing liposomes encapsulating  $^{67}\text{Ga-DF}$ . ●, tumour; ○, blood. Each point represents the mean  $\pm$  SD for five animals.

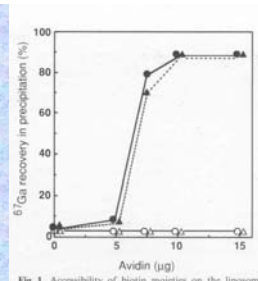


Fig. 1. Accessibility of biotin moieties on the liposomal surface to avidin. ●, biotin-bearing liposomes in mannitol buffer; ○, biotin-bearing liposomes in mouse serum; △, non-biotin-bearing liposomes in mannitol buffer; △, non-biotin-bearing liposomes in mouse serum.

Table 1. Effect of post-administration of avidin on the tissue distribution of  $^{67}\text{Ga}$  after the administration of biotin-bearing liposomes encapsulating  $^{67}\text{Ga-DF}$ .

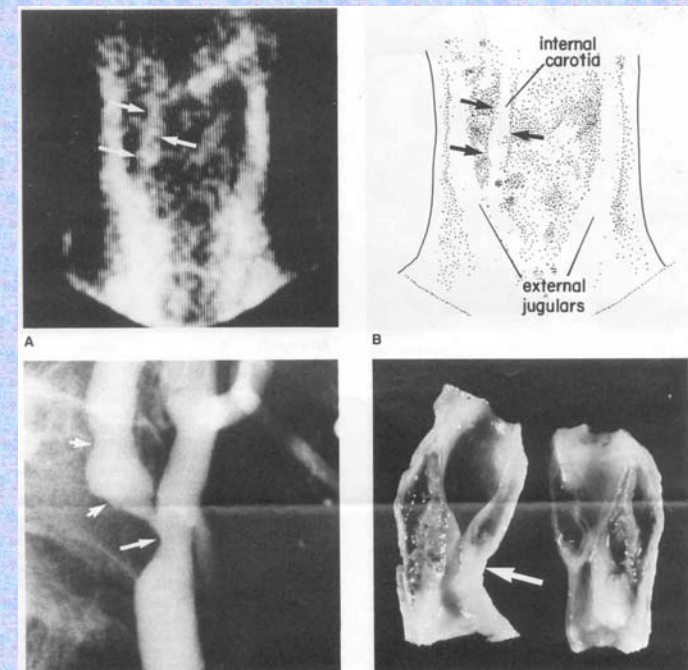
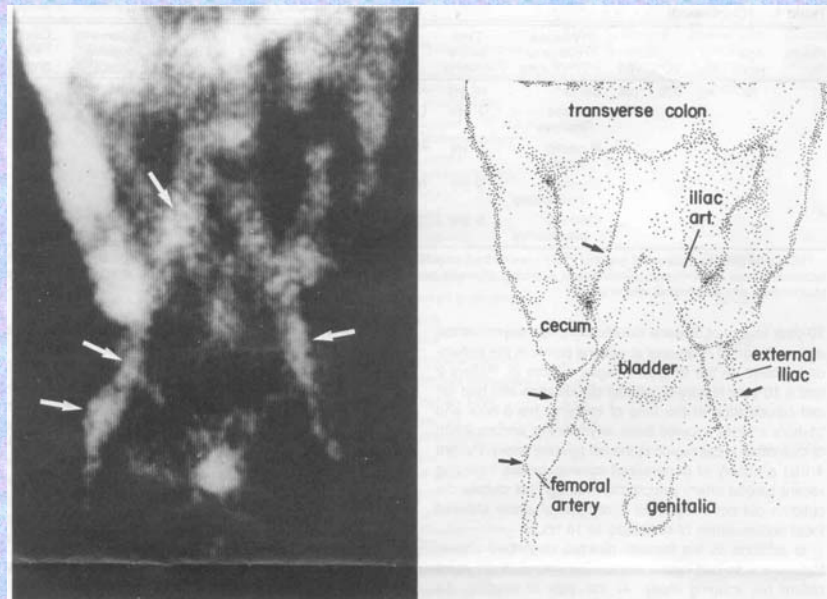
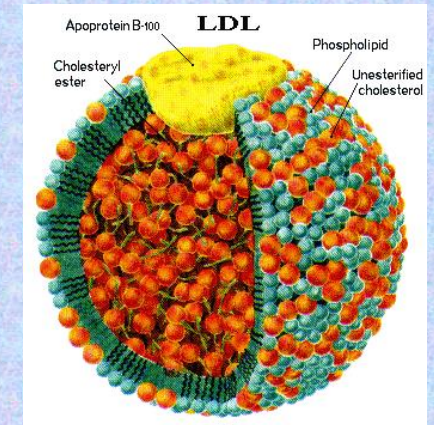
Tissue	% Administered dose/g tissue			
	Control	Avidin treated		
		10 $\mu\text{g}$	20 $\mu\text{g}$	30 $\mu\text{g}$
Tumour	12.06 $\pm$ 1.57 (100)	12.51 $\pm$ 1.73 (104)	11.03 $\pm$ 1.56 (91)	10.50 $\pm$ 1.72 (87)
Liver	7.82 $\pm$ 1.14 (100)	14.15 $\pm$ 2.21 (181)**	19.22 $\pm$ 2.39 (246)**	18.08 $\pm$ 2.13 (231)**
Spleen	11.26 $\pm$ 1.62 (100)	10.96 $\pm$ 1.18 (97)	17.00 $\pm$ 2.21 (151)**	16.32 $\pm$ 2.15 (145)**
Kidney	3.35 $\pm$ 0.56 (100)	3.57 $\pm$ 0.83 (107)	2.93 $\pm$ 0.40 (88)	2.43 $\pm$ 0.24 (72)**
Blood	13.48 $\pm$ 1.82 (100)	13.32 $\pm$ 1.21 (98)	3.85 $\pm$ 0.18 (28)**	0.76 $\pm$ 0.10 (5)**
Tumour/blood ratio	0.89	0.94	2.86	13.81

Each value represents the mean  $\pm$  SD for five animals.

\*\* Statistically significant difference from the control group at  $P < 0.01$ .

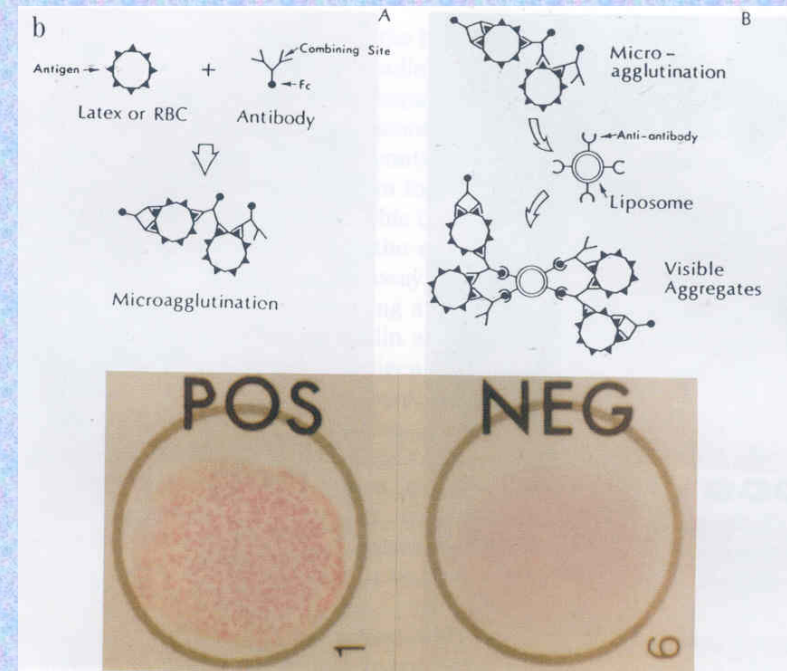
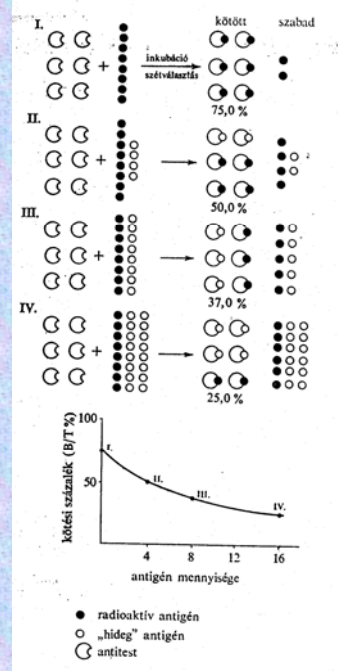
- **LDL** (low density lipoprotein – a koleszterin anyagcserében játszik szerepet; specifikus sejtfelszíni receptorhoz kötődik – immunliposzómához hasonló viselkedés) – pl. érlemezsedéses góccok kimutatása

LDL összetevői	
Fehérje	22 %
Foszfolipid	22 %
Koleszterin	8 %
Koleszterinészter	40 %
Triglicerid	8 %



### LIA (liposome immuno assay)

A liposzóma antigént tartalmaz és radioizotópot vagy fluoreszcens jelzőanyagot. Ismert mennyiségű antitest hozzáadása esetén az antigén koncentráció meghatározására alkalmas.

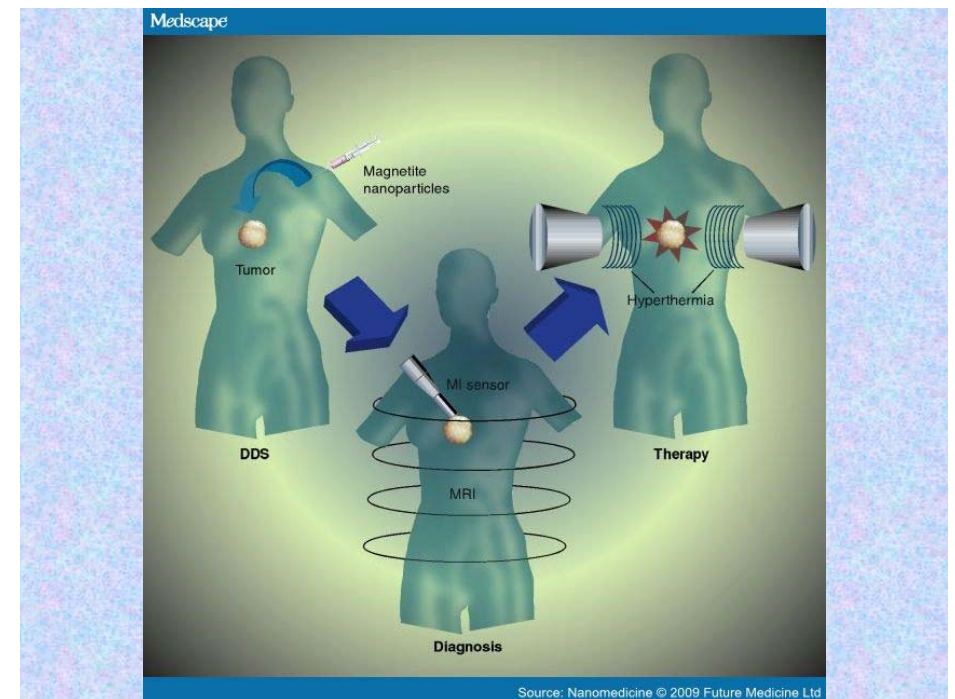
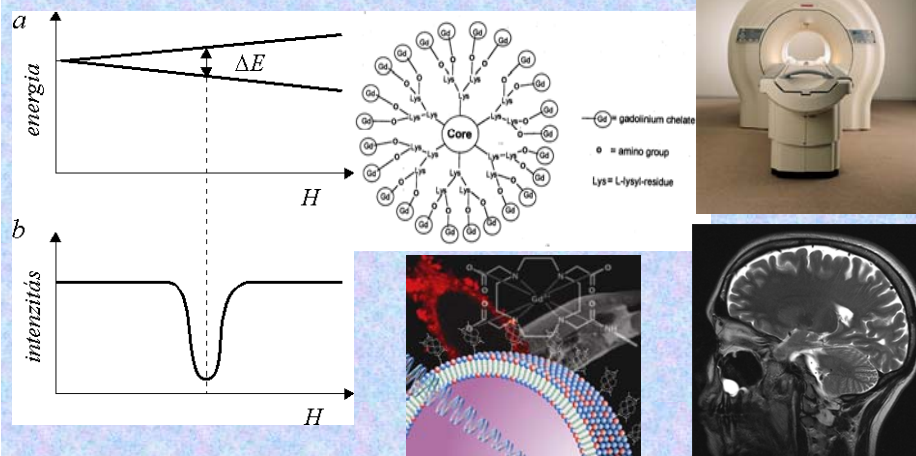


### 3. MR-kontrasztanyagok

Mágneses momentummal rendelkező atommagok mutathatók ki (pl.  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ )

Paramágneses anyagok (gadolinium, vas-oxid, mangán-tartalmú komplexek) használhatók kontrasztanyagként.

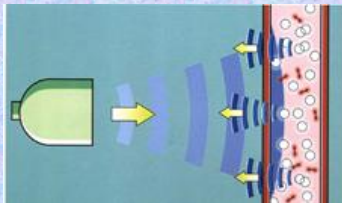
Liposzómába zárva specifikusabban juttathatók célba.



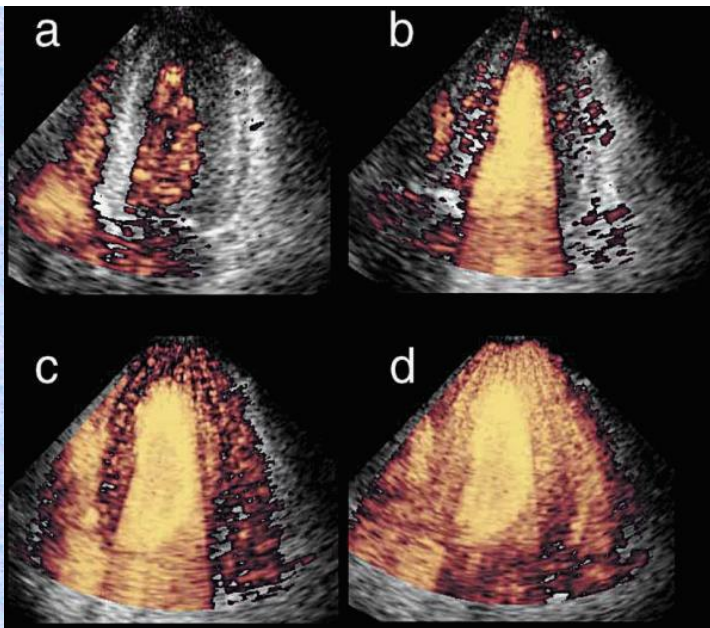
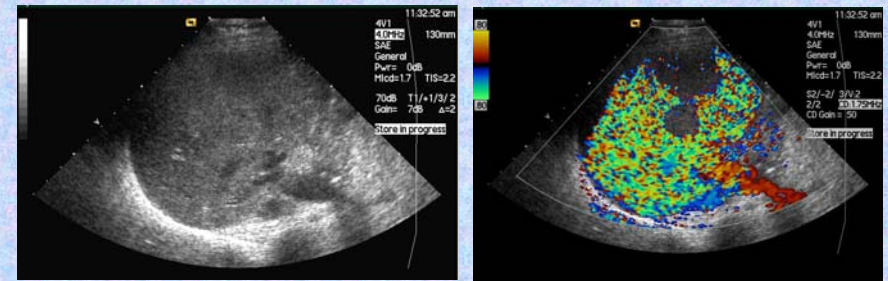


#### 4. UH kontrasztanyagok

- Az ultrahangos képalkotás biztonságos, noninvasív eljárás
- A kép minőségét javítja a kontrasztanyag alkalmazása (pl. levegőbuborékok) - erős UH reflexió
- Liposzómába zárva a levegőt (mikrobuborék) a kontrasztthatás javítható
- pl. echocardiográfia: a szövet-vér határ jól elkülöníthető, az esetleges trombus kimutatható



- Máj, lép multifokális elváltozásainak kimutatásához jól használható (pl. daganatáttétek)



Kuntz-Hehner St et al. Journal of Clinical and Basic Cardiology 2002; 5 (Issue 2): 145-148 ©

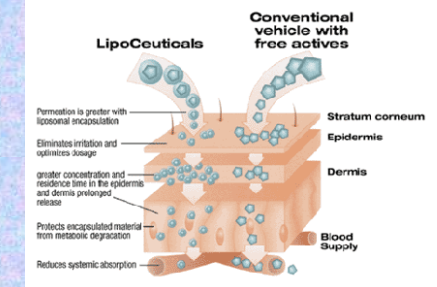
#### Terápiás alkalmazások

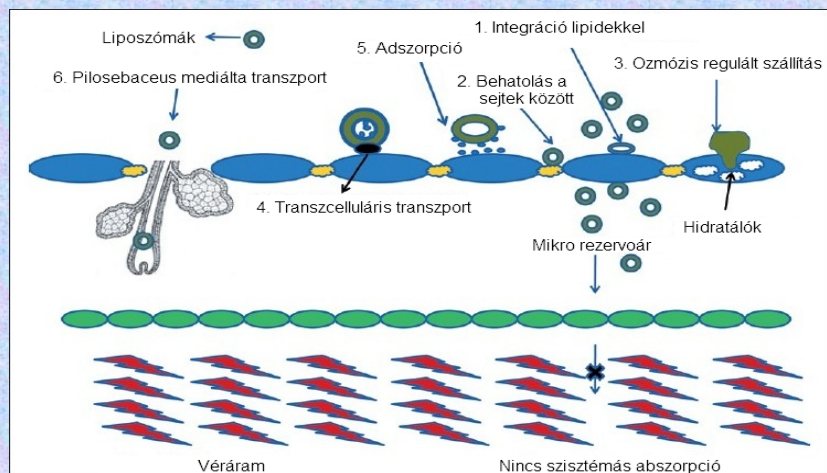
##### a) Lokális (helyi) alkalmazások

##### 1. Bőrfelület

- Cél:
- A gyógyszer jusson a bőr mélyebb rétegeibe
  - Ne kerüljön a szisztémás keringésbe (mellékhatások elkerülése)

- A liposzómák - könnyebben áthatolnak a bőr savköpenyén
- védik a hatóanyagot a lebontó enzimektől
  - a nagy MLV-k alkalmazása célszerű – nem tud a szisztémás keringésbe jutni
- pl. kortikoszteroidok, antibiotikumok, kozmetikumok zárhatók be.





A liposzmális hatóanyag bőrbe jutásának lehetséges útjai.

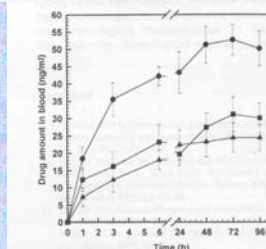
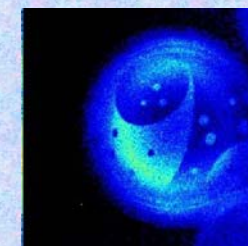
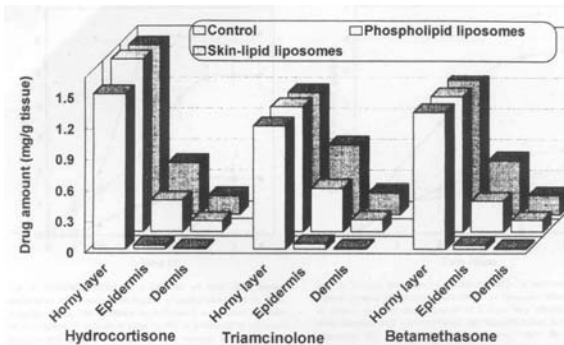


Fig. 5. Blood concentration of triamcinolone(2-<sup>14</sup>C)acetamide after one single topical application to guinea pig ears. Very similar results were obtained with hydrocortisone and betamethasone. Each value represents the average of five experiments  $\pm$ SD. ●, control formulation (control); ■, phospholipid-based liposomes; ▲, skin-lipid liposomes.

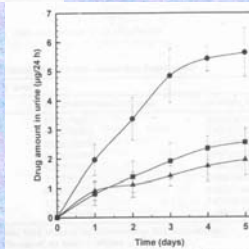
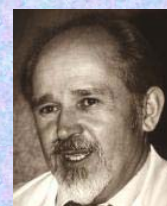
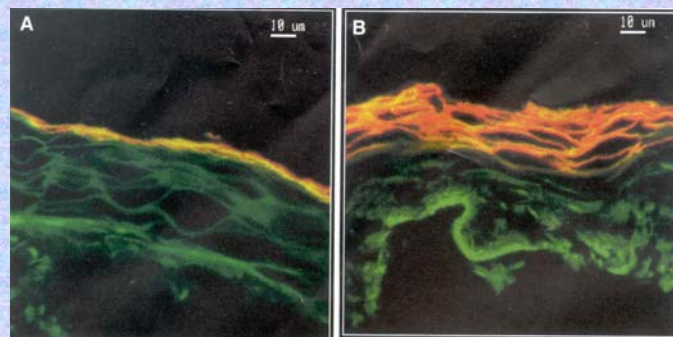
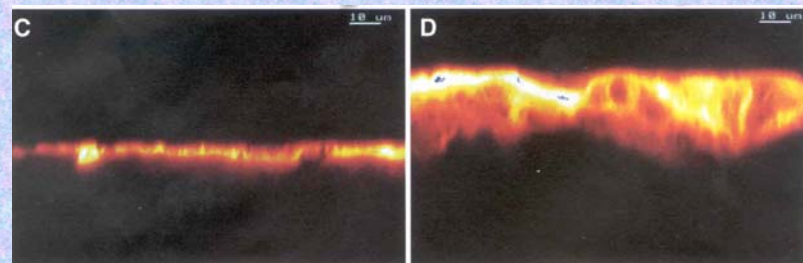
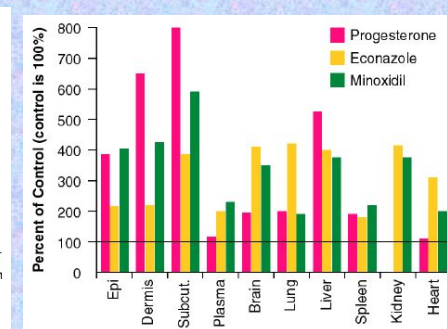
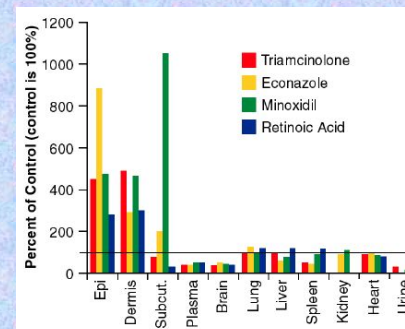


Fig. 6. Urinary excretion of triamcinolone(2-<sup>14</sup>C)acetamide after topical application, as control (control) or liposomal formulation, to guinea pig ears over a period of 5 days. Very similar results were obtained with hydrocortisone and betamethasone. Each value represents the average of five experiments  $\pm$ SD. ●, control formulation (control); ■, phospholipid-based liposomes; ▲, skin-lipid liposomes.



Michael Mezei  
1927-1997





## Helyi érzéstelenítők

### - Lidocaine

- liposzómás krém 4% hatóanyagtartalommal: elamax® illetve LMX4®



## Kozmetika

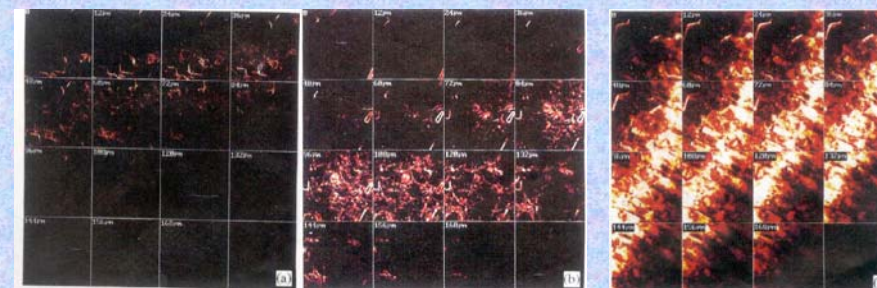


Some of the liposomal cosmetic products in Europe, the US and Japan.

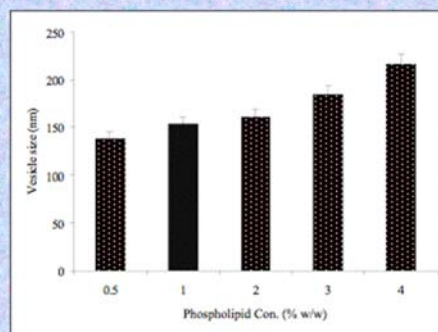
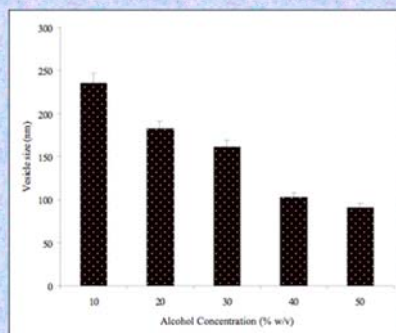
Product	Marketer	Liposomes and key ingredients
Capture	Christian Dior	liposomes in gel with ingredients
Plénitude	L'Oréal	tanning agents in liposomes
Effect du Soleil	L'Oréal	glyceropolyether with moisturizers
Niosomes	Lancôme (L'Oréal)	vitamins, retinolacetate
Nactosomes	Lancôme (L'Oréal)	non-ionic lipid
Esprit de Soleil	Payot (Ferdinand Muehlens)	thymoxin, hyaluronic acid
Formule Liposomes Gel	Parfums Givenchy	liposome gel
Fundamental Care	Estée Lauder	TMF, vitamin A palmitate, vitamin E, cerebroside, ceramide, phospholipid
Future Perfect Skin Gel		Feoproteins, trace elem. minerals, vitam.
Emulsion Nri Complexe	Chanel	ammonium liquid, democalmin
Liposome FRE	Payot	
Gel Lissant Contour des Yeux		
Heliotrop Liposome	Elektrobio	Aloe vera extract, rose water, soya phospholipid
Activ-Pflege	(Ernst Kunze GmbH)	proteoglycan
Intensive Reducer	Helena Rubinstein	
Anti-Cellulit Gel		
Inovita	Pharm/Apothek	thymus extract, hyaluronic acid, vitamin E
Kao Sofina Emolient Cream & Moisture Essence	Kao Sofina Cosmetic (Parfumerien Dr. Lenartz GmbH)	glycolipid PSL, Sphingolipid E
La Myrell Contour & Liposomes Repair Gel Konzentra	Cosmetics Margot Zimmer GmbH	BRF System, Repair Factor, thymus extract
Liposome Aktions Gel	Madame Nanette Biocosmetic	Aloe vera, thymus extract
Liposome Skin Vital Complex	Shulton (American Cyanamid)	20% liposome
Micro 2000 Complexe		
Anti-Stress		
Saneo 2 Liposome Ampule	Elizabeth Arden	hydrospheres fibrostimulin
Sympathik 2000	Gabriele Wyeth Kosmetik	
	Biopharm GmbH	thymus extract, vitamin A palmitate, soya phospholipid
Liosen	Geymonat	chestnut extract, hyalur. acid
TMH-Ampulle	Gerthard Klapp	mucopeolysaccharide, hyaluronic acid, liposome
Natipide II	Nattermann PL	Liposomal gel for do-it-yourself cosmetic
Eye Perfector	Avon, NY	soothing cream to reduce eye puffiness

## Etoszómák:

Lipid (szója foszfátidilkolin) – víz – etanol keverékéből létrehozott 2-3 rétegű lipidpreparátum. Mélyebben hatol be a bőrbe, mint a liposzóma. Elsősorban a szisztémásan ható gyógyszerek transzdermális bevitelében használatosak.



## Etoszómák



## 2. Nyálkahártyák (pl. száj, orr)

Könnyen átjárható a gyógyszerek számára

→ rövid ideig tartó helyi hatás,

kifejezettebb szisztémás hatás

Liposzómában hosszabb helyi és kisebb szisztémás hatás érhető el (pl. fekélyek kezelése)



## 3. Szem

Könnyen átjárható a gyógyszerek számára → rövid ideig tartó helyi hatás, kifejezettebb szisztémás hatás

Hagyományos gyógyszerek: - csekély penetráció a szembe  
- rövid hatástartam

Speciális molekulákat tartalmazó liposzómák a szem bizonyos részeihez nagyobb affinitással kötődnek.

Pl. cornea – ganglioizid-tartalmú

lencse – ConA tartalmú

Főleg a nagy MLV-k alkalmazásakor nő a hatóanyag koncentráció a csarnokvízben és a szem egyes részeiben.

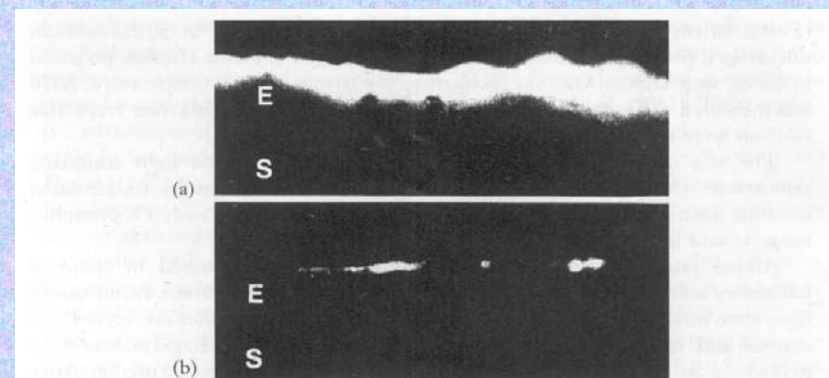


Figure 1. Rat cornea exposed *in-vivo* for 30 min to propidium iodide microencapsulated in liposomes (a) or to propidium iodide dissolved in buffer (b). Sections of frozen eyes were freeze dried and inspected by fluorescence microscopy. Note enhanced uptake of propidium iodide into the corneal epithelium (E) when encapsulated in liposomes. Penetration of the corneal stroma (S) is not seen. ( $\times 220$ ).



Vírusfertőzések (herpesz, citomegalovírus) kezelésére alkalmaznak oligonukleotidokat. A liposzómák megvédik ezeket a bontóenzimek hatásától és megnöveli az üvegtestben való tartózkodásuk idejét az üvegtestbe történő injekciózás esetén.

Corneához kötődés erőssége szerinti sorrend: pozitív > negatív > semleges. Ez elektrosztatikus kölcsönhatásra utal.

A kötődés a kettősrétegek számától is függ:

$MLV^+ > SUV^+ > MLV^- > SUV^- > MLV, SUV$

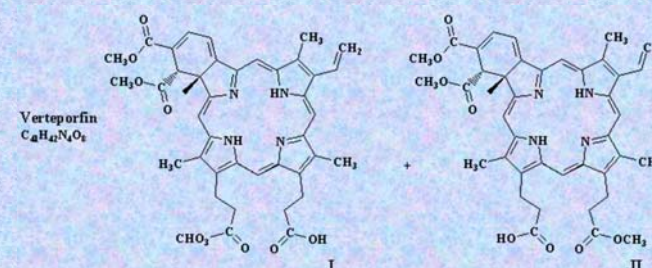
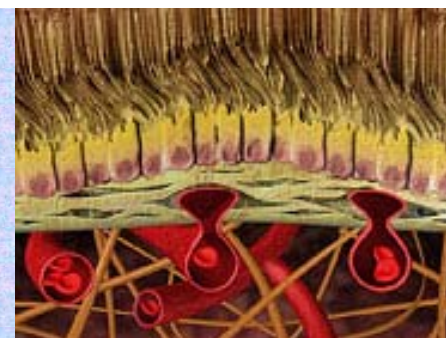
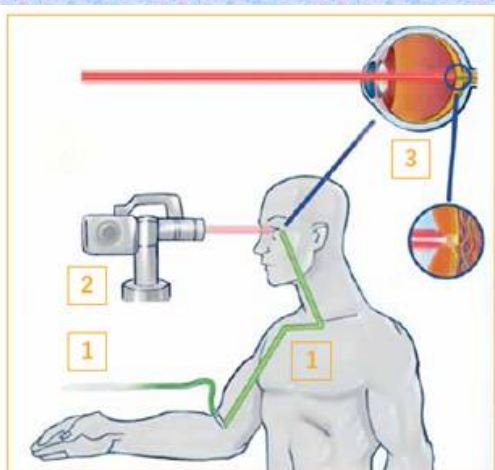
Acetazolamid bezárási hatásfoka és a kiszabadult hatóanyag aránya:

	Semleges	Negatív	Pozitív
Bezárás hatásfoka	41,06 %	29,27 %	49,58 %
Kiszabadult hatóanyag aránya 9 óra elteltével	33,8 %	13,36 %	26,7 %

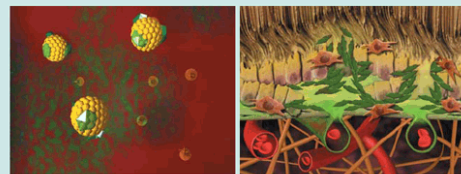


Fig. 1. Photographs showing gradual stages of healing and disappearance of *Candida* keratitis treated with: (A) fluconazole solution (first group), (B) and (C) fluconazole-loaded liposome in a rabbit (second group). (1) Before treatment. (2) One week after treatment. (3) Two weeks after treatment. (4) Three weeks after treatment.

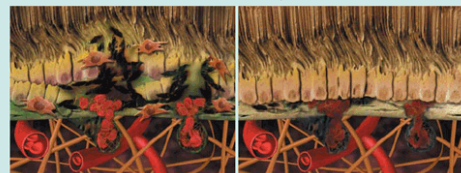
- Időskori macula elfajulás (age-related macular degeneration - AMD) kezelése liposzómás porfirinszármazék (Visudyne) és lézerkezelés kombinációjával. (fotodinámiás terápia (PDT))



#### Visudyne therapy – mechanism of action

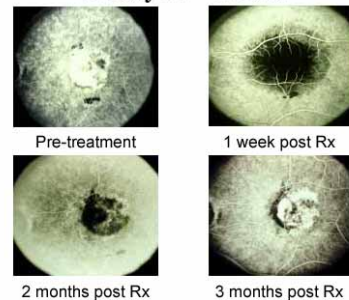


(a) Circulating verteporfin complexes with LDL. (b) Verteporfin selectively accumulates in neovascular tissue which is rich in LDL receptors.



(c) Light-activated verteporfin produces reactive forms of oxygen which cause structural and functional cell damage. (d) Verteporfin selectively occludes neovascular tissue, while sparing overlying retinal cells and Bruch's membrane.

#### Visudyne™ Effect



Pre-treatment

1 week post Rx

2 months post Rx

3 months post Rx

#### 4. Tüdő és légutak

Bevitel porlasztás és inhaláció során.

A tüdő felületaktív anyagához hasonló összetételű liposzómák a legjobban alkalmazhatók (főleg DPPC és PG)

A bejutás hatásfoka és mélysége főleg az aeroszol részecskeméretétől függ, nem a liposzómáétól.

A porlasztás során a bezárt anyag egy része elvesz. Ennek aránya függ a liposzóma összetételétől. Kisebb liposzóma méret ill. kisebb porlasztási sebesség esetén csökken a veszteség.

A liposzomás gyógyszerbevitel előnyei:

- Megelőzi a helyi irritációt és a tüdőbeli toxikus hatást
- Meghosszabbítja a terápiás gyógyszerkoncentráció fennállási idejét
- Nagy intracelluláris gyógyszerkoncentrációt idéz elő

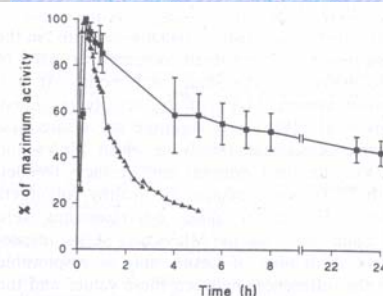
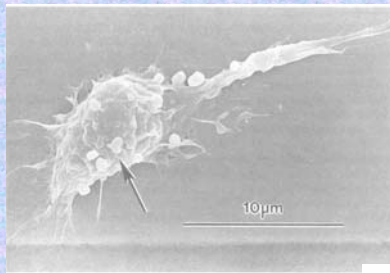


Fig. 1. The deposition and clearance of activity following inhalation of  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA in solution (▲) ( $n=1$ ) and entrapped in DPPC/Chol MLVs (■) ( $n=3$ , mean  $\pm$  S.D.)

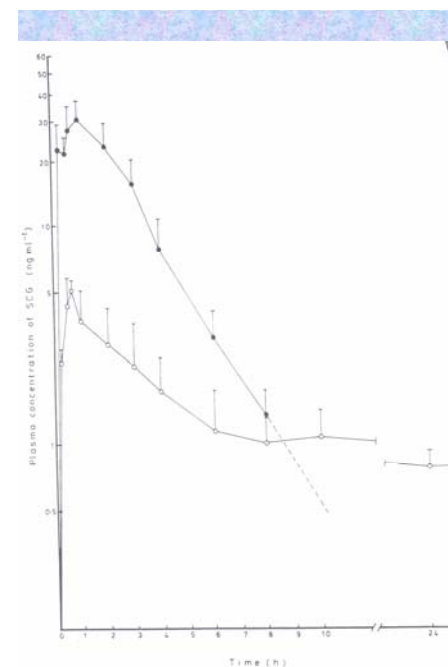


TABLE 1

Pulmonary absorption half-lives of drugs in the rat (compiled from Schanker and co-workers [13-16])

Drug	Absorption half-time (min)	Ref.
Salicylic acid*	0.6	[16]
Barbital*	0.9	[16]
Cortisone	1.0	[13]
Hydrocortisone	1.0	[13]
Dexamethasone	1.7	[13]
Isoniazid	1.9	[14]
p-Aminosalicylic acid	4.5	[14]
Erythromycin*	6.3	[16]
Erythromycin	12.0	[15]
Benzylpenicillin*	20.5	[16]
Benzylpenicillin	33.0	[15]
Sulphaguanidine	41.0	[14]
Ethambutol	41.0	[14]

\*Drugs administered by aerosol (DeVilbiss #42 air jet; 7.5 l/min; 20 psi); all others instilled.





tüdőtumor kezelés előtt



2 hét inhalációs doxil kezelés után