

(19) **DANMARK**



PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT**

(11) **154264 B**



(21) Patentansøgning nr.: 4729/80

(51) Int.Cl.⁴ **A 61 K 9/50**

(22) Indleveringsdag: 07 nov 1980

(41) Alm. tilgængelig: 09 maj 1981

(44) Fremlagt: 31 okt 1988

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 08 nov 1979 US 92342

(71) Ansøger: *Merck & Co. Inc.; Rahway, New Jersey, US, *California Institute of Technology; 1201 East California Boulevard; Pasadena; California 91109, US

(72) Opfinder: Marcia R. *Mauk; CA, John D. *Baldeschwieler; US, Ronald C. *Gamble; US, Tsung-Ying *Shen; US, Mitree M. *Ponpipom; US

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af lipid-vesikler**

(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer. Proc. Natt. Acad. Sci. USA, vol. 76, no. 2 (feb. 1979), 765-769.
Carbohydrat Research, 67, (1978), 55-63.
New England Journal of Medicine, vol. 295, no. 13 (1976), 704-710.

(57) Sammendrag:

4729-80

Lipid-vesiklerne består af et lipid-dobbeltlag, som indeholder celleoverfladereceptoranaloge (såsom dicetylphosphat, stearylamin 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)hexyl-1-thio- β -L-fucopyranosid; 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)hexyl-1-thio- β -D-galactopyranosid; 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)hexyl-1-thio- α -D-mannopyranosid; 6-(5-cholesten-3-yloxy)hexyl-2-acetamido-2-deoxy-1-thio- β -D-galactopyranosid; 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)hexyl-6-amino-6-deoxy-1-thio- β -D-galactopyranosid eller 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)hexyl-6-amino-6-deoxy-1-thio- α -D-mannopyranosid) cholestearol og distearoylphosphatidylcholin samt en effektiv mængde fysiologisk kompatibelt radioaktivt sporingsmateriale, cytotoxisk middel eller terapeutisk middel som en bestanddel af vesiklerne.

Lipid-vesiklerne fremstilles ved, at man opløser det pågældende aktivmateriale i vand, tilsætter den indgående celleoverfladereceptoranaloge, kolesterol og distearoylphosphatidylcholin og derpå underkaster den således fremstillede blanding en ultralydbehandling.
De således fremstillede med aktivmateriale belastede lipid-vesikler kan indgives eksempelvis til pattedyr på forskellige måder, og de vil kunne transporteres præferentielt gennem lymfesystemet og opkoncentreres i forskellige organer, hvor så aktivmaterialet frigøres i takt med vesikelvæggens nedbrydning.

UK 154264 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af lipid-vesikler, der kan anvendes som lymfe-systemførte transporthjælpemidler for terapeutiske og diagnostiske forbindelser.

- 5 Man har tidligere fremstillet lipid-vesikler og iagttaget dem gennem anvendelse af radioisotopmærkede liposomer, McDougall, I.R. Dunnick, J. K. McNamee, M.G., og Kriss, J.P. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71 3487-3491; Hwang, K.J. Mauk, M.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4991-
 10 4995; Hinkle, G.H., Born, G.S. Kessler, W.V., og Shaw, S.M. (1978) J. Phar. Sci. 67, 795-798. Disse vesikler indeholder forholdsvis små mængder af radioaktive ioner på grund af den begrænsede mængde radioaktive ioner, som er indesluttet i liposomerne ved anvendelsen af enkle ultralyd-behandlings-
 15 fremgangsmåder. Det interne vandige rumfang af vesiklerne er lille med det resultat, at kun nogle få procent af det samlede suspensionsrumfang, som indeholder de radioaktive ioner, indkapsles i vesiklen, og resten deraf går tabt for praktiske formål.
- 20 Den foretrukne ionophor (dette er et generisk udtryk, som beskriver forbindelser, der tiltrækker ioner eller er kraftigt forenelige med ioner) $[6S-6\alpha(2S_r, 3S_r), 8\beta R_r, 9\beta, 11\alpha]]$ -5-(methylamino)-2-[[3,9,11-trimethyl-8-[1-methyl-2-oxo-2-(1H-pyrrol-2-yl)ethyl]1,7-dioxasporo[5,5]undec-2-yl]methyl]-
 25 -4-benzoxazol-carboxylsyre, som i det følgende vil blive betegnet som ionophor A23187, er blevet anvendt til at kompleksdanne med og bære divalente kationer tværs igennem naturlige og kunstige lipidmembraner, Hyono, A., Hendriks, Th., Daemen, F.J.M., og Bonting, S.L. (1975) Biochim Biophys. Acta., 389 34-46; Sarkadi, B., Szasz, I., og Gardos, G. (1976) J. Membrane Biol., 26, 357-370; LaBell, E.F. og Racker, E. (1977) J. Membrane Biol., 31, 301-315; Pfeiffer, D.R., Taylor, R.W. og Lardy, H.A. (1978) Ann. N.Y. Acad. Sci. (under trykning).
- 30

Der foreligger ligeledes beviser for, at A23187 kan danne komplekser med trivalente kationer, f.eks. La^{+3} , Pfeiffer, D.R., Reed, P.W., og Lardy, H.A. (1974) Biochemistry, 13, 4007-4014.

5 Gregoriadis og medarbejdere har mærket liposomer ^{111}In gennem anvendelsen af ^{111}In -markeret bleomycin, Gregoriadis, G. og Neerunjun, E.D. (1975) Biochem. Biophys. Res. Comm., 65, 537-544; Gregoriadis, G. Neerunjun, D.E., og Hunt, R. (1977) Life Sci., 21 357-369. De rapporterede, at 27-80%
10 af den tilsatte radioaktivitet var knyttet til phospholipidet i negativt ladede liposomer, og de iagttog 2-4,5% inkorporering i positivt ladede liposomer.

Man har for nylig, jvf. Anal. Biochem. 94, 302 - 307 (1979), fundet en fremgangsmåde til rutinemæssig indføring af radioaktive ioner i lipid-vesikler med mere end 90% udbytte.
15 Ved denne fremgangsmåde inkorporerer man ionophoren i lipid-dobbeltlaget, og den anvendes til at bære udefra tilsatte radioaktive ioner til en chelator eller et cheleringsmiddel, som forinden er blevet opfanget i vesiklerne. Den
20 radioaktive ions binding til cheleringsmidlet er tilstrækkeligt stærk til, at det giver den drivende kraft for nettooverførslen af radioaktive ioner ind i vesiklerne. Disse radioaktivt mærkede vesikler viser nu mere end 100 gange forøgelse i den specifikke aktivitet i forhold til sådanne,
25 ne, som har modtaget tilsætning ved simpel ultralyd-behandling.

Man har nu ifølge den foreliggende opfindelse fundet, at det er muligt at fremstille lipid-vesikler med lipid-dobbeltlagsvægge bestående af kolesterol, distearoylphosphatidylcholin og et cholesterolsukkerderivat med ladede,
30 hydrophile hovedgrupper, som på kontrollerbar måde afgiver et hvilket som helst lægemiddel eller andet nyttigt middel, som bæres af eller befinder sig inde i den pågældende vesikel.

Endvidere har disse derivater den egenskab, at de efter
indsprøjtning i en pattedyrs-værtsorganisme hurtigt og for-
trinsvis akkumulerer i lymfesystemet og/eller i lungen,
miltten eller leveren. Eftersom sådanne vesikler belastes
5 med et stort udvalg af radioaktive sporingsmidler og læge-
midler frembyder vesiklerne fremstillet ved fremgangsmåden
ifølge opfindelsen en speciel metode til aflevering af
lægemidlet til sygdommens specifikke lokalisering. Vesikel-
væggen forbliver stort set intakt adskillige timer såle-
10 des, at den effektivt kan tjene som bæremiddel. Til sidst
nedbrydes vesikelvæggen, og lægemidlet frigives.

Lipid-vesikler indeholdende forbindelserne 6-(5-cholest-
en-3- β -yloxy)hexyl-1-thio- α -1), dets 6-amino-6-deoxyanaloge
eller dets β -D-galactoanaloge sammen med dipalmitoylphos-
15 phatidylcholin og endvidere lipid af uspecificeret natur
er omhandlet i Carbohydrate Research, bind 67 (1978) side
55 - 63.

Vesikler indeholdende forbindelserne 6-(5-cholesten-3 β -
yloxy)hexyl-1-thio- β -L-fucopyranosid eller det tilsvarende
20 β -D-galactoderivat sammen med distearoylphosphatidylcholin
og cholesterol, er omhandlet i Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
bind 76, side 765 - 769.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde af den i kravets indled-
ning angivne art.

25 Fremgangsmåden er ejendommelig ved det i kravets kendeteg-
nende del angivne.

De omhandlede vesikler fremstillet ved fremgangsmåden iføl-
ge opfindelsen anvendes ved administrering til et patte-
dyr, hvilke vesikler er karakteristiske ved den kontrollerede
30 frigivelse af det bårne middel og dets hurtige intakte
akkumulation i lymfesystemet og/eller lungen, miltten eller
leveren, hvor det endelig frigøres.

I denne sammenhæng forstås ved udtrykket "vesikler" små sække indeholdende væsker ved indkapsling og/eller inkorporering inden for vesikelvæggen.

5 Det skal forstås, at den tidligere omtalte ionophor ligeledes kan være til stede, når vesiklen bærer en radioaktiv kation. Ved en sådan udførelsesform kan en chelator ligeledes være til stede inden for vesiklen, og det er fortrinsvis nitrilotrieddikesyre (NTA). Man kan imidlertid anvende andre chelatorer for polyvalente metalioner såsom
10 ethylendiamintetraeddikesyre. Når vesiklerne bærer andre midler, såsom organiske materialer, som farmaceutiske forbindelser er anvendelsen af ionophor og cheleringsmiddel unødvendig.

Vesiklerne kan bære eller være forsynet med et stort antal
15 forskellige materialer inklusive enzymer til enzym-erstatningsterapi, hormoner, radionuclider, cellemodificerende midler, antigener, antistoffer, interferon-fremkalder, virus-underenhedspartikler, genetisk materiale, såsom RNA og DNA, samt lægemidler og farmaceutiske midler i almindelighed. Vesiklerne kan således som eksempel være antitumor-lægemidler, såsom methotrexat og actinomycin til brug
20 ved cancer-kemoterapi. Vesiklerne fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan ligeledes anvendes ved sygdomsterapi med glycogen-oplagring under anvendelse
25 af amyloglucosidaser indesluttet i vesiklerne.

De vesikler, som har affinitet for lymfesystemet, kan selvfølgelig anvendes til diagnose og behandling af tumorer og metastaser i lymfesystemet.

Radioisotoper, såsom Tc^{99m} , kan anvendes til diagnostiske formål, når de indføres i vesiklerne.
30

Vesiklerne anvendes ligeledes ved behandling af lysosomal-oplagringssygdomme til opfyldelse af udvalgte målceller, til eliminering af uønskede materialer i rummene uden om cellerne samt til modifikation af cellestruktur og celleaktivitet.

Det skal forstås, at det radioaktive sporingsmateriale, det cytotoxiske eller terapeutiske middel, der undertiden her simpelthen betegnes som det "bårne middel", kan indkapsles i vesikelvæggen. Det bårne middel kan alternativt være en del af, d.v.s. dispergeret i eller opløst i, de materialer, der danner vesikelvæggen.

Inkorporering af det bårne middel i vesiklen kan udføres på mange forskellige måder.

En fremgangsmåde, der generelt kan anvendes til vandopløselige og stabile midler, er at opløse midlet i vand, sædvanligvis under isotoniske forhold, at tilsætte de forskellige vesikelvægdannende bestanddele og at underkaste den samlede masse ultralydsbehandling.

Vandopløselige bårne midler kan ligeledes inkorporeres i vesiklerne fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen ved anvendelse af den fremgangsmåde, der er omtalt af Szoka et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 4194-4198 (1978). Denne fremgangsmåde er særlig nyttig for skrøbelige vandopløselige materialer såsom enzymer og hormoner.

Lipophile bårne midler kan inkorporeres ved ultralydsbehandling af vesiklerne og påfølgende tilsætning af det lipophile bårne middel. Denne fremgangsmåde er nøjere beskrevet af Huang et al., Biochemistry, 18, 1702-1707 (1979).

Immunoglobulin G er et eksempel på et lipophilt båret middel, som inkorporeres i vesikelvæggen ved denne fremgangsmåde.

Opfindelsen forklares nærmere ved hjælp af de efterfølgende eksempler, hvor dele og procentdele er angivet efter vægt, med mindre andet er angivet.

5 Sammenligningsdata, der gør brug af dicetylphosphat eller stearylamin i stedet for et af de cholesterolderivater, der anvendes i forbindelse med den foreliggende opfindelse, er omfattet af tabel 1 i det følgende.

10 De forkortelser, der er anvendt i tabellen og den efterfølgende beskrivelse samt på tegningen for de anvendte forbindelser, er som følger:

DSPC = distearoylphosphatidylcholin
 Chol = cholesterol
 DCP = dicetylphosphat
 SA = stearylamin
 15 Man = 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)hexyl-1-thio-~~A~~-D-mannopyranosid
 AcAmGal = 6-(5-cholesten-3-yloxy)hexyl-2-acetamido-2-deoxy-1-thio- β -D-galactopyranosid
 NH₂Gal = 6-(5-cholesten-3- β -yloxy)hexyl-6-amino-6-deoxy-
 20 1-thio- β -D-galactopyranosid
 NH₂Man = 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)hexyl-6-amino-6-deoxy-1-thio- β -D-mannopyranosid

På den medfølgende tegning viser fig. 1 - 3 de omhandlede vesiklers grad af intakthed, som bestemt ved PAC ("Perturbation Angular Correlation" - pertubationsvinkelkorrelation se f. eks. Hwang og Mauk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 4991-4995 (1977)) og sammenligner den med vesikler omfattende andre dobbeltlagskombinationer, og fig. 3 og 4 viser ændringerne i in vivo vesikelopførsel resulterende fra tilstedeværelsen af aminosukkerderivater
 30 af cholesterol anvendt i overensstemmelse med opfindelsen,

og fig. 4 viser endvidere forsinket udskillelse af visse komplekser af radioaktivt indium. I hver figur er den procentvise intakthed af vesikler afbildet mod tiden i timer.

5 På fig. 1 er resultaterne fra anvendelse af kombinationen DSPC:Chol vist med udfyldte cirkler og resultaterne fra DSPC:Chol:Man ved udfyldte trekanten. Begge sæt resultater er angivet til sammenligning med resultaterne under anvendelse af DSPC:Chol:NH₂Man, som er vist ved udfyldte kvadrater.
10 drater.

På fig. 2 vises to resultater med vesikler fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen. DSPC:Chol:NH₂Man gentages, igen vist med udfyldte kvadrater, og resultaterne fra DSPC:Chol:NH₂-Gal er vist med udfyldte cirkler.

15 Fig. 3 gentager kurverne fra fig. 1, men med udfyldte cirkler, kvadrater og trekanten i stedet for udfyldte cirkler, kvadrater og trekanten, og angiver også halveringstider for vesikler indeholdende DSPC:Chol:NH₂-Man (udfyldte trekanten viser en lavere dosis end udfyldte cirkler).

20 Fig. 4 viser igen kurven fra fig. 1 med DSPC:Chol (udfyldte cirkler) sammen med udskillelshastigheden for indiumkomplekser med EDTA og DTPA (udfyldte kvadrater og henholdsvis udfyldte trekanten).

Dette beskrives mere detaljeret i det følgende.

25 EKSEMPEL 1

Unilamellare vesikler med A23187 inkorporeret i dobbeltlaget blev fremstillet under anvendelse af de i tabel 1 anførte kolesterol-derivater (eller DCP eller SA). Ved en typisk

fremstilling blev cholesterol-derivatet sammen med fri cholesterol, DSPC og A23187 (0,04 μmol) opløst i chloroform, tørret til en tynd film ved 60⁰ C under en nitrogenstrøm og derpå tørret under vakuum natten over. Hvor det var ønsket, blev 1 μCi af tritueret cholesterylleat (specifik aktivitet 11 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) inkluderet i blandingen som mærkningsmateriale for lipid-fasen. De tørrede lipider blev derpå genhydratiseret med 0,5 ml 1 mM NTA i phosphatpufferet saltopløsning (PBS), som består af 0,9% NaCl, 5 mM natriumphosphat, pH 7,4. Blandingen blev underkastet ultralydsbehandling i et glycerolbad, der oprindeligt befandt sig ved stuetemperatur (Branson ultralydsapparat med mikrotip af titan og indstillet på styrke), indtil opløsningen blev klar (ca. 5 minutter). Efter lydbehandling blev vesiklerne inkuberet ved 60⁰ C i 10 minutter til udligning af eventuelle strukturfejl. Vesikelsuspensionen blev derpå centrifugeret ved 300 x g til fjernelse af titanfragmenter og stærkt aggregeret materiale. Det NTA, der befandt sig uden for liposomerne, blev derpå fjernet ved at lade præparatet passere igennem en søjle 0,8 x 35 cm "Sephadex[®] G-50", som var bragt i ligevægt med PBS, og som var konditioneret ved tidligere gennemhældning af lipid-vesikler til mætning af de irreversible bindingssteder. Vesiklerne blev elueret i søjlens tomme rum med typisk en fire gange fortynding og 95% genindvinding baseret på mærkningen med tritieret cholesterylleat.

EKSEMPEL 2

Fremgangsmåde til indføring - Efter chromatografering på "Sephadex[®]" blev vesikel-præparaterne ladet med $^{111}\text{In}^{3+}$ under anvendelse af inkuberingsblandinger, der typisk bestod af 500 μl vesikler, 35 μl 3,4 μM natriumcitrat (pH 7,4) og 1-50 μl $^{111}\text{In}^{3+}$ i 2 mM HCl alt afhængig af den ønskede aktivitet. Et rumfang på to gange PBS svarende til rumfanget af tilsætningen af $^{111}\text{In}^{3+}$ blev inkluderet i inkuberings-

blandingen. Inkuberingstid og temperatur varierede afhængig af vesikel-sammensætningen, som anført længere nede. Inkuberingerne blev afsluttet ved tilsætning af 50 μ l 10 mM EDTA (ethyldiamintetraeddikesyre) i PBS og umiddelbart påfølgende chromatografering af blandingen på "Sephadex[®] G-50", der var bragt i ligevægt med PBS. EDTA optager tilbageværende indium på ydersiden af vesiklerne således, at søjlen ikke bliver radioaktiv. I de nedenfor anførte resultater blev anvendt A23187 til opnåelse af indføring af lipid-vesikler med $^{111}\text{In}^{3+}$.

Når vesiklerne sønderdeles in vivo, frigives $^{111}\text{In}^{3+}$ -NTA kompleks, og $^{111}\text{In}^{3+}$ er tilgængeligt til binding til i nærhed værende makromolekyler. Binding af $^{111}\text{In}^{3+}$ til et makromolekyle forårsager en stor ændring i den effektive molekulære rotationskorrelationstid på det sted, hvor indiumkernen befinder sig, og som følge deraf er der en sænkning af den tidsintegrerede vinkelkorrelationsfaktor, $\langle G_{22}(\infty) \rangle$, se f. eks. Hwang og Mauk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 4991-4995 (1977). Denne $\langle G_{22}(\infty) \rangle$ værdi kan således anvendes til at overvåge omfanget af vesiklernes nedbrydning; dens værdi strækker sig fra ca. 0,62 for ^{111}In -NTA indeholdt i intakte vesikler til 0,18 for ionen bundet til serumproteiner. Stabiliteten og permeabiliteten for vesikler, der indeholder ^{111}In -NTA kompleks, blev ligeledes kontrolleret ved den såkaldte PAC-teknik. For alle de systemer, der er anført i tabel 1, forblev værdierne for $\langle G_{22}(\infty) \rangle$ høje efter inkubering ved 37° i 0,5 timer i nærvær af varmeinaktiveret kalveserum. Ved sønderdeling af vesiklerne ved hjælp af en lille tilsætning af isopropanol faldt værdien for $\langle G_{22}(\infty) \rangle$ til en værdi, der kunne forventes for $^{111}\text{In}^{3+}$ binding til serumproteiner.

EKSEMPEL 3

Til brug ved undersøgelser in vivo blev vesikler indeholdende ^{111}In -NTA indsprøjtet subcutant i mus af typen Swiss-

Webster (18 - 22 g) nær ryggens midtlinje på højde med scapulae. På passende tidspunkter blev musene aflivet, og man foretog umiddelbart derefter PAC-målinger på de dele af hudvævet, der viste signifikant radioaktivitet. Mængderne af radionuklider i samtlige organer og væv blev bestemt under anvendelse af en gammatæller af brøndtypen.

Tabel 1 viser den forøgede stabilitet iagttaget fra derivater af cholesterol anvendt i overensstemmelse med opfindelsen, og sammenligninger med fravær af sådanne derivater eller anvendelsen af andre forbindelser i stedet for.

Ændringerne i vesiklernes opførsel in vivo, som stammer fra tilstedeværelsen af amino-sukkerderivater af cholesterol, er særdeles dramatiske. Halveringstiden for vesikler, som er bærere af aminogalactose- og aminomannose-derivater er betydeligt længere end henholdsvis 100 og 600 timer (tabel 1 og fig. 3), hvor det er anført ved runde markeringer, end halveringstiden for andre derivater.

Mus blev indsprøjtet subcutant med vesikler indeholdende ¹¹¹In-NTA kompleks i suspension i 0,2 ml PBS. Vesiklerne bestod af DSPC:Chol:NH₂-Man:A23187 eller DSPC:Chol:NH₂-Gal:A23187. Injektionsstedet var på ryggen af dyret ved legemets midtlinje omtrent på niveau med skulderbladene.

Radioaktiviteten var ikke lokaliseret til indsprøjtningstedet, således som det var iagttaget med andre vesikelpræparater. Radioaktiviteten blev først og fremmest fundet (1) i huden på musens sideoverflade umiddelbart bag ved forbenene (dvs. i hvad der svarer til "armhulen"), eller (2) undertiden i huden på halsen ved kraniets underkant. Dette mønster for fjernelse af vesiklerne fra indsprøjtningstedet er, som det kunne forventes, ved udløb igennem lymfekanalerne til de regionale lymfeknuder.

En fugtigt udseende, blærelignende opsvulmet stribe i det tidligere beskrevne armhule-område var synlig uden forstørrelse inden for 1 time efter indsprøjtningen. Med unilamellare vesikler holdt opsvulmningen sig i op til 8 timer efter injektionen og med multilamellare vesikler op til 22 timer.

De efter injektionen iagttagne opsvulmninger svarer til radioaktivitetens lokalisering. Det mønster, som blev iagttaget i autoradiogrammer, viser, at opsvulmningen gengiver intakt overførsel af bolus ved indsprøjtningen. Radioaktiviteten er afgrænset inden for enkelte fibre eller kar.

Den indsprøjtede radioaktivitet koncentrerer hurtig således, at det radioaktive væv indeholder mindre end 65% af det oprindelige indsprøjtningssrumfang. Måling af $\langle G_{22}(\infty) \rangle$ værdier på dele af huden indeholdende radioaktivitet viser en oprindelig sænkning (ved ~ 18 timer), der ikke er iagttaget med andre vesikel-systemer (fig. 2). Denne sænkning stammer fra en geometrisk virkning af PAC spektrometeret. En reduktion af prøvestørrelsen fra en kugle med 200 μ l rumfang til en kugle med 75 μ l rumfang resulterer f.eks. i en 25%'s reduktion i værdien for $\langle G_{22}(\infty) \rangle$. Eftersom PAC-værdierne kun afspejler geometrien af den radioaktive del og ikke geometrien i det totale stykke væv, der er blevet analyseret, ville koncentrationen af vesikler i et lille område inden for et vævstykke resultere i en "kunstig" sænkning i procentandelen af intakte vesikler.

For alle andre undersøgte vesikel-systemer iagttog man ikke noget område med lokal opsvulmning, og vesiklerne forblev knyttet til huden ved injektionsstedet. Det vil være klart for fagmanden, at sådanne vesikler indeholdende bårnemidler, som forblev knyttet til injektionsstedet, ligeledes er af betydelig gavnlig virkning, eftersom vesiklerne gradvist frigiver de indeholdte bårnemidler igennem en længere tidsperiode. Dette er vist ved de i tabel 2 anførte data.

De virkninger, der er iagttaget ved aminomannose-derivaterne af cholesterol, er konstateret som værende afhængig af doseringen (tabel 1 og fig. 3), henholdsvis udfyldte cirkler og trekanten. Nedsættelse af andelen af aminomannose-derivat reducerer levetiden in vivo og reducerer udstrækningen af blæredannelse. For vesikler med DSPC:Chol:NH₂Man i de molære indbyrdes forhold 2:0,9:0,1 blev der ikke iagttaget lokaliseret opsvulmning. Kombination af mannose-derivatet af cholesterol med stearylamin førte ikke til de virkninger, som blev iagttaget med aminomannose-derivatet (tabel 1). De vesikler, som indeholder de forenede grupper, forbliver på injektionsstedet, og bevæger sig ikke til eller opkoncentrerer sig ikke ved bagsiden af forbenene, således som det blev iagttaget ved de amino-sukkerindeholdende vesikler. Den specificitet, der blev iagttaget ved amino-sukkerderivaterne, er derfor et resultat af overfladegruppernes stereokemi, og det er ikke en simpel additiv virkning af sukker plus ladning. De tidligere nævnte data viser, at en NH₂-gruppe anbragt på en mannose- eller galactoserest tilfører betydelig specificitet for lymfesystemet, når vesiklerne indgives subcutant.

En vigtig faktor, der skal tages hensyn til ved udviklingen af vesikel-systemer, som er i stand til at tilvejebringe kontrolleret aflevering af terapeutiske midler, er tilgængeligheden af det frigivne materiale til en given celleplacering eller celledelsplacering, hvad enten det indesluttede materiale frigives introcellulært eller ekstracellulært. Til opnåelse af sådan viden undersøgte man in vivo opførslen af indium-komplekser af ethylendiamintetraeddikesyre $[(^{111}\text{In-EDTA})^{-1}]$ og indium-komplekser med ethylen-triaminpentaeddikesyre $[(^{111}\text{In-DTPA})^{-2}]$. Disse indium-komplekser er meget stabile, og når de indgives subcutant, fjernes de hurtigt fra kredsløbet gennem nyrerne. Faktisk udskilles mere end 90% af $[(^{111}\text{In-EDTA})^{-1}]$ og $[(^{111}\text{In-DTPA})^{-2}]$

inden for henholdsvis 2,4 og 1,4 timer, når de bliver indgivet på denne måde, (fig. 4), henholdsvis udfyldte firkanter og trekkanter. Fig. 4 viser ligeledes virkningen af vesikelindkapsling på udskilleleshastigheden for komplekserne. For DSPC:Chol vesikler er elimineringen af $[(^{111}\text{In-EDTA})^{-1}]$ forsinket med ca. 8 timer i forhold til destruktionsen af vesiklerne, således som den måles ved PAC-teknikken på præparationer indeholdende $^{111}\text{In-NTA}$. Den forsinkede udskillelse af $[(^{111}\text{In-EDTA})^{-1}]$ komplekset angivet ved trekkanter og af $(^{111}\text{In-DTPA})^{-2}$ komplekset angivet ved firkanter antyder, at vesiklerne kan ødelægges inden for en celle eller et celleafsnit. Forlænget forsinkelse af udskillelse af $[(^{111}\text{In-DTPA})^{-2}]$ (fig. 4) er i overensstemmelse med denne hypotese, eftersom membranpermeabiliteten skulle nedsættes med stigende ladning på komplekset. For alle de undersøgte systemer iagttog man en forsinkelse mellem injektionstidspunktet og påbegyndelsen af vesikelødelæggelsen (fig. 3).

Halveringstiden for in vivo ødelæggelse af vesiklerne kan varieres over et område på 50 gange ved inkludering i lipid-dobbeltlaget af forskellige carbonhydridforbindelser med ladede hovedgrupper eller sukker- og amino-sukkerderivater af cholesterol. Herved tilvejebringes midler til kontrolleret aflejring og frigivelse af terapeutiske midler ved subcutan indsprøjtning. I kombination med egenskaben med hensyn til frigivelse på bestemte tidspunkter tillader lokalisering af vesikler i lymfевævene, anskueliggørelse og behandling af tumorer og metastaser i lymfesystemet. Derudover giver PAC-iagttagelser i kombination med studier over fordeling i vævene af vesikler indeholdende stabile indiumkomplekser værdifuld viden om mekanismerne knyttet til vesiklernes metabolisme. Sukkerderivaternes højtudviklede stereospecifikke virkning med hensyn til placeringen af phospholipid-vesiklerne udgør et betydeligt fremskridt inden for fagområdet.

TABEL 1

Hver enkel subcutan indsprøjtning af lipid-vesikler indeholder typisk 1,0 mg total lipid, 20 μCi $^{111}\text{In}^{3+}$ bundet til 1 mM NTA inden i samt phosphatpufret saltopløsning (0,9% NaCl, 5 mM natriumphosphat, pH 7,4) inden i og uden for vesiklerne. Det samlede indsprøjtningssrumfang er 200 μl . Data er baseret på PAC-målinger på huden. 100% intakt-niveauet svarer til $\langle G_{22}(\infty) \rangle$ værdien for vesiklerne forud for indsprøjtningen; 0% intakt svarer til $\langle G_{22}(\infty) \rangle$ for $^{111}\text{In}^{3+}$ bundet til serumproteiner.

	Præparat (molære forhold)	Tid (timer), hvori givne procentandele vesikler forbliver intakte		
		80%	50%	20%
15	DSPC:Chol (2:1) (kontrol)	9	21	43
	DSPC:Chol:DCP (2:0,5:0,5)**)	3	12	25
	DSPC:Chol:SA (2:0,5:0,5)**)	24	41	78
	DSPC:Chol:AcAmGal (2:0,5:0,5)	43	84	170*
	DSPC:Chol:NH ₂ Gal (2:0,5:0,5)	35	100	210
20	DSPC:Chol:NH ₂ Man (2:0,5:0,5)	200	600*	
	DSPC:Chol:NH ₂ Man (2:0,75:0,25)	55	95	250
	DSPC:Chol:NH ₂ Man (2:0,9:0,1)	30	55	120
	DSPC:Chol:Man:SA **) (2:0,5:0,25:0,25)	26	70	200*

* Ekstrapoleret værdi. **) Anvendes til sammenligning med vesiklerne, fremstillet ifølge opfindelsen

DSPC = distearoylphosphatidylcholin
 Chol = cholesterol
 DCP = dicetylphosphat
 30 SA = stearylamin
 Ac Am Gal = 6-(5-cholesten-3-yloxy)hexyl-2-acetamido-2-deoxy-1-thio- β -D-galactopyranosid.
 NH₂Gal = 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)hexyl-6-amino-6-deoxy-1-thio- β -D-galactopyranosid.
 35 NH₂Man = 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)hexyl-6-amino-6-deoxy-1-thio- α -D-mannopyranosid.

TABEL 2

Fordeling i vævene af genvundet ^{III}In ³⁺ efter intravenøs indsprøjtning af vesikler

Væv	DSPC:Chol:A23187			DSPC:Chol:NH ₂ Man:		
	1	3	24	1	3	24
Blod ^a	85,5 ±0,5	54,4 ±9,2	6,0 ±3,0	2,1 ±0,5	1,0 ±0,2	0,3 ±0,1
Hjerte	1,3	1,2	0,5	0,8	0,1	0,1
Lunge ^a	1,8 ±0,5	2,6 ±1,6	1,4 ±1,2	24,0 ±5,2	5,9 ±3,8	1,2 ±0,4
Lever ^a	12,2 ±0,1	20,4 ±3,6	31,0 ±10,0	31,8 ±3,8	66,9 ±8,3	65,8 ±1,0
Milt	1,4	2,3	4,2	3,5	7,4	8,5
Nyre	2,7	2,9	2,8	4,6	1,8	1,8
Mave	0,6	0,7	0,9	0,7	0,2	0,2
Tyndtarm	4,6	7,5	11,0	5,2	1,6	1,2
Tyktarm	1,1	2,6	4,0	1,7	0,8	0,8
Hjerne	0,5	0,5	6	0,2	b	b
Bugvæv	9,8	8,6	9,5	7,0	3,8	5,7
Brystvæv	10,0	9,2	6,2	7,0	3,1	4,2
Lemmer	6,1	5,7	9,1	3,3	3,4	5,4
Kranie	8,3	7,8	5,9	4,0	1,9	2,7
Hud	4,7	7,0	11,0	5,5	2,7	2,2

a værdier for blod, lunge og lever angivet med [±] middelfafvigelsen

b værdi mindre end 0,1

EKSEMPEL 4

I dette eksempel indsprøjtes vesiklerne intravenøst. De i tabel 2 anførte data viser, at NH_2Man -derivatet akkumuleres præferentielt, dvs. med målrettethed, oprindelig i lungen
 5 og efter 3 og 24 timer i leveren og milten, idet sidstnævnte er legemets største lymfeorgan.

Det må være underforstået, at de belastede vesikler kan ind-
 gives på en hvilken som helst konventionel måde under an-
 vendelse af pharmaceutisk acceptable bærestoffer. Man kan
 10 således anvende perorale og parenterale former for indgift.

EKSEMPEL 5

Idet man følger den i eksemplerne 1 - 2 anvendte fremgangs-
 måde fremstiller man lipid-vesikler, der er belastet med
 følgende blandinger.

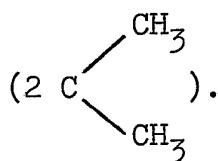
15 TABEL 3

Dobbeltlagspræparat (molforhold)	Båret middel
DSPC:Chol:AcAmGal (2:0,5:0,5)	Methotrexat
DSPC:Chol: NH_2Gal (2:0,5:0,5)	Actinomycin
DSPC:Chol: NH_2Man (2:0,5:0,5)	$\text{Tc}^{99\text{m}}$

De efterfølgende eksempler beskriver fremstillingen af visse
 celleoverfladeacceptorer, som anvendt ved udøvelsen af den
 foreliggende opfindelse.

EKSEMPEL 66-Deoxy-1,2:3,4-di-O-isopropyliden-6-phthalimido- α -D-galactose

- 5 Kaliumphthalimid (4,94 g) sættes til en opløsning af 6-deoxy-6-iod-1,2:3,4-di-O-isopropyliden- α -D-galactose (9,0 g) i N,N-dimethylformamid (50 ml). Suspensionen opvarmes under omrøring i 8 timer ved 130°C (badets temperatur). En anden portion kaliumphthalimid (1,25 g) sættes til den nedkølede, brune opløsning, som derpå opvarmes under omrøring i yderligere 8 timer ved samme temperatur. Opløsningen indampes under vakuum til en mørk sirup, som adskilles mellem ethyl-ether og vand. Det mørke, uopløselige materiale frafiltreres og bortkastes, og etherlaget vaskes tre gange med vand, tørres og indampes til en sirup (bestående af reaktionsproduktet og udgangsmaterialet). Denne blanding adskilles ved søjlechromatografi på silicagel med 5% ethylacetat i chloroform som elueringsmiddel. Den i overskriften angivne forbindelse isoleres som et krystallinsk materiale, der omkrystalliseres ud fra methanol til dannelse af 5,1 g (54%) af reaktionsproduktet, smp. 138 - 141°C; [litt. smp. 144,5 - 145,5°C]; NMR (chloroform-d) δ 5,42 (d, $J_{1,2}$ 5,0 Hz, H-1), 7,47 - 7,82 (4 aromatiske), 1,23, 1,37, 1,43 og 1,52.

EKSEMPEL 76-Deoxy-6-phthalimido-D-galactopyranose

- 25 En opløsning af 6-deoxy-1,2:3,4-di-O-isopropyliden-6-phthalimido- α -D-galactose (5,0 g) i iseddikesyre (50 ml) og vand (18 ml) opvarmes i 32 timer ved 80°C (badets temperatur). Opløsningen filtreres, og filtratet indampes under vakuum til

en krystallinsk masse. Omkrystallisation ud fra absolut ethanol fører til den i overskriften nævnte forbindelse (3,0 g, 76%), smp. 155°C (dek.), blødgøring ved 95°C.

EKSEMPEL 8

- 5 Trin A: 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-6-deoxy-6-phthalimido-
D-galactopyranose
-

6-Deoxy-6-phthalimido-D-galactopyranose (2,9 g) acetyleres med eddikesyreanhydrid (12 ml) i pyridin (20 ml) på normal måde til dannelse af 1,2,3,4-tetra-O-acetyl-6-deoxy-6-phthalimido-D-galactopyranose (4,30 g), (96%) som en blanding af α - og β -anomere i det indbyrdes forhold 1:1,6, $[\alpha]_D^{27} +52,5^\circ$, (c 1,0, chloroform); NMR (chloroform-d): δ 5,70 (d, $J_{1,2}$ 8,0 Hz, H-1 β), 6,33 (b, H-1 α).

- 15 Trin B: 2,3,4-Tri-O-acetyl-6-deoxy-6-phthalimido- α -D-galactopyranosylbromid
-

En opløsning af 1,2,3,4-tetra-O-acetyl-6-deoxy-6-phthalimido-D-galactopyranose (4,2 g) i dichlormethan (2 ml) behandles med 30 - 32% hydrogenbromid i iseddikesyre (10 ml) i 1 time. Reaktionsblandingen hældes ud i isvand, og reaktionsproduktet ekstraheres umiddelbart med dichlormethan. Det organiske lag vaskes med kold vandig natriumhydrogencarbonatopløsning og koldt vand, tørres og inddampes under vakuum til dannelse af den i overskriften nævnte forbindelse i form af en sirup (10,0 g, 91%); NMR (chloroform-d): 6,63 (d, $J_{1,2}$ 4,0 Hz, H-1), 7,58 - 7,90 (4 aromatiske), 1,96, 2,07 og 2,13 (3 OAc).

EKSEMPEL 92,3,4-Tri-0-acetyl-6-deoxy-6-phthalimido-1-thio- β -D-galactopyranose

- 5 (A) En opløsning af 2,3,4-tri-0-acetyl-6-deoxy-6-phthalimido- α -D-galactopyranosylbromid (4,0 g) og thiourinstof (0,67 g) i tør acetone (20 ml) opvarmes under tilbagesvaling i 4 timer. Opløsningen indampes under vakuum til en sirup, som fordeles imellem vand og dichlormethan. Det organiske lag ekstraheres igen med vand tre gange. De samlede vandige ekstrakter indampes til dannelsen af 2-S-(2,3,4-tri-0-acetyl-6-deoxy-6-phthalimido- β -D-galactopyranosyl)-2-thiopseudourinstof (3,40 g).
- 15 (B) Chloroform (9,0 ml) sættes til en opløsning af 2-S-(2,3,4-tri-0-acetyl-6-deoxy-6-phthalimido- β -D-galactopyranosyl)-2-thiopseudourinstof (3,4 g) i vand (10 ml) indeholdende kaliummetabisulfit (1,38 g). Blandingen opvarmes under omrøring og under tilbagesvaling i 15 minutter. Den nedkølede opløsning separeres, og det organiske lag tørres og indampes under vakuum til dannelsen af den i overskriften
- 20 nævnte forbindelse (2,5 g). Dette materiale anvendes direkte til fremstillingen af 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)hexyl-2,3,4-tri-0-acetyl-6-deoxy-6-phthalimido-1-thio- β -D-galactopyranosid.

EKSEMPEL 10

25 6-(5-Cholesten-3 β -yloxy)hexyl-2,3,4-tri-0-acetyl-6-deoxy-6-phthalimido-1-thio- β -D-galactopyranosid

- 30 Triethylamin (0,8 ml) sættes til en opløsning af 2,3,4-tri-0-acetyl-6-deoxy-6-phthalimido-1-thio- β -D-galactopyranose (2,5 g) og 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)-hexyliodid (3,3 g) i dichlormethan (20 ml). Opløsningen holdes ved stuetemperatur under nitrogen natten over og vaskes med vand, tørres og indampes under vakuum til en sirup (4,71 g). Dette ma-

teriale sættes til en silicagel-søjle og elueres med chloroform efterfulgt af 2% ethylacetat i chloroform. De udvalgte fraktioner forenes og inddampes under vakuum til dannelse af den i overskriften nævnte forbindelse (4,0 g, 78%); R_f 0,2 (CHCl₃-EtOAc. 95:5), $[\alpha]_D^{27}$ -93° (c 1,18, chloroform); NMR (chloroform-d): 7,60-7,91 (4 aromatiske), 1,93, 2,03 og 2,24 (3 OAc) 0,68 (CH₃-18).

EKSEMPEL 11

10 6-(5-Cholesten-3 β -yloxy)hexyl-6-amino-6-deoxy-1-thio- β -D-galactopyranosid

En suspension af 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)hexyl-2,3,4-tri-O-acetyl-6-deoxy-6-phthalimido-1-thio- β -D-galactopyranosid (710 mg) i methanol (10 ml) og n-butylamin (10 ml) opvarmes under tilbagesvaling i 16 timer. Opløsningen indampes til en krystallinsk masse. Der tilsættes chloroform, og det faste stof frafiltreres og vaskes med chloroform. De forenede filtrater indampes til en sirup, som sættes på en silicagel-søjle og elueres med chloroform-methanol-ammoniumhydroxid (80:20:2). De udvalgte fraktioner forenes og indampes til en sirup, som tritureres med ethylether til dannelse af krystaller (390 mg, 76%); R_f 0,28 (CHCl₃-MeOH-NH₄OH, 80:20:2), $[\alpha]_D^{27}$ -29,5° (c 1,05, chloroform), m.s.:m/e 665 (M⁺+1).

EKSEMPEL 12

25 6-(5-Cholesten-3 β -yloxy)hexyl-2-acetamido-2-deoxy-1-thio- β -D-galactopyranosid

A. 6-(5-Cholesten-3 β -yloxy)hexyl-2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-1-thio- β -D-galactopyranosid

30 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-1-thio- β -D-galactopyranose (10 mmol) behandles med 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)-

hexyliodid (10 mmol) i dichlormethan (30 ml) indeholdende 1,5-diazabicyclo[5.4.0]-undec-5-en (10 mmol). Omsætningen finder sted i løbet af 1 dag ved stuetemperatur og under nitrogen. Den således fremstillede opløsning vaskes med destilleret vand (20 ml) og tørres med vandfrit natriumsulfat. Den filtrerede opløsning koncentrerer til dannelsen af en sirup, som sættes på en silicagelsøjle og elueres med chloroform efterfulgt af 1% ethanol i chloroform. Den opnåede forbindelse dannes som et krystallinsk materiale i et udbytte på 43%, smp. 130 - 133 °C (ethanol), $[\alpha]_D^{25} -37^\circ$ (c = 1,5, chloroform).

B. 6-(5-Cholesten-3 β -yloxy)hexyl-2-acetamido-2-deoxy-1-thio- β -D-galactopyranosid

Reaktionsproduktet fra trin A omrøres med en basisk ionbytterharpiks, Bio-Rad AG 1-X2 (OH), i ethanol-tetrahydrofuran eller natriummethoxid i methanol til dannelse af titelforbindelsen, udbytte 85%, smp. 241 - 243 °C, $[\alpha]_D^{25} -35^\circ$ (c = 1,5, N,N-dimethylformamid).

EKSEMPEL 13

20 Fremstilling af 2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-methylsulfonyl- α -D-mannopyranosylbromid

En iskold opløsning i 60 ml tør CH_2Cl_2 af 14,9 g (34,9 mmol) 1,2,3,4,-tetra-O-acetyl-6-O-methylsulfonyl- β -D-mannopyranose, der var fremstillet ved den fremgangsmåde, der er beskrevet i J. Fernandez-Bolanos og R.G. Fernandez-Bolanos, An. Quim., 65 (1969) 1163-1164; Chem. Abstr., 72 (1970) 133105w, blev behandlet med 21 ml 30-32% s HBr i iseddikesyre og holdt 2,5 timer ved 25°C. Blandingen blev hældt ud i 400 ml under omrøring værende isvand, separeret, og den vandige fase blev vasket med tre 20 ml alikvote dele CH_2Cl_2 . De samlede organiske lag blev vasket med vand og

med mættet NaHCO_3 -opløsning, tørret med Na_2SO_4 , inddampet, tritureret med petroleumsether (kp. $30-60^\circ\text{C}$), filtret og lufttørret til dannelse af 14,6 g (93%) af det faste α -glycosylbromid, smp.: $167,5-168,5^\circ\text{C}$ (dekomp.):

5 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +120,0 \pm 0,05^\circ$ (c 1,01 CHCl_3); IR 1740 og 1725 (acetat) cm^{-1} .

Elementæranalyse for $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{BrO}_{10}\text{S}$:

Beregnet: C 34,91, H 4,28; Br 17,87; S 7,17

Fundet: C 35,04; H 4,18; Br 17,61; S 7,27.

10 EKSEMPEL 14

6-(5-cholesten- 3β -yloxy)hexyl-2,3,4-tri-O-acetyl-6-azido-6-deoxy-1-thio- α -D-mannopyranosid

Det mannosylbromid, der var fremstillet ved den i eksempel 13 beskrevne fremgangsmåde, blev omdannet ved hjælp af

15 isothiouroniumbromidet [85%, hvidt pulver, smp. $87-90^\circ\text{C}$ (dekomp.), IR 3600-3100, 1740, 1640 cm^{-1}] til den tilsvarende thiol [89% farveløs glasagtig masse, IR 2560, 1750-1730 cm^{-1}] i overensstemmelse med den fremgangsmåde, der er omtalt i M. Cerny, J. Stanek og J. Pacek, Monatsch.

20 94, 290-294 (1963). Thiolen blev koblet som i eksempel 9 til dannelse af 61% 6-(5-cholesten- 3β -yloxy)hexyl-2,3,4-tri-O-acetyl-6-D-methylsulfonyl-1-thio- α -D-mannopyranosid, i form af en hvid glasagtig masse, IR 1740 cm^{-1} . Til

25 sidst blev 1,14 g (1,32 mmol) af det forudgående mesylat, 0,49 g (7,5 mmol) NaN_3 og 40 ml tør DMF rørt sammen ved $70-75^\circ\text{C}$ under N_2 i 4,5 timer. Efter afdampning af opløsningsmidlet blev inddampningsresten opløst i 20 ml ether, vasket med tre 10 ml portioner H_2O , tørret med MgSO_4 , og inddampet til dannelse af 1,05 g (97%) af det i over-

30 skriften anførte azid i form af en farveløs glasagtig masse, der var homogen ved TLC (12%, EtOAc i benzen på

silicagel), $[\alpha]_D^{25} +12,6 \pm 0,5^\circ$ (c 1,02 CHCl_3); IR 2095 (azid), og 1755 (acetat) cm^{-1} . En prøve på 0,54 g blev yderligere rensed ved søjlechromatografi (silicagel, 12% EtOAc i benzen), hvilket førte til 0,417 g (75% ud-
 5 bytte) af en farveløs glasagtig masse, der størknede ved langvarig henstand, smp. 68-70°C.

Elementæranalyse for $\text{C}_{45}\text{H}_{73}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$:

Beregnet: C 66,22; H 9,02; N 5,15; S 3,93.

Fundet: C 66,53; H 8,98; N 5,04; S 3,98.

10 EKSEMPEL 15

Fremstilling af 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)hexyl-6-azido-6-deoxy-1-thio- α -D-mannopyranosid

15 Azidotriacetatet fra eksempel 14 blev afblokeret ved den fremgangsmåde, der er anført i eksempel 10, til dannelse af 62% af den i overskriften anførte azidotriol i form af en glasagtig masse, IR 3600-3100 (OH), 2095 (azid) cm^{-1} .

Elementæranalyse for $\text{C}_{39}\text{H}_{67}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$:

Beregnet: C 67,88; H 9,79; S 4,65.

20 Fundet: C 67,80; H 9,55; S 4,54.

EKSEMPEL 16

Fremstilling af 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)hexyl-6-amino-6-deoxy-1-thio- α -D-mannopyranosid

25 En opløsning af 0,163 g (0,236 mmol) af den azidotriol, der var fremstillet ved den i eksempel 15 angivne fremgangsmåde, i 4,0 ml CHCl_3 indeholdende 3,0 ml triethyl-

amin blev behandlet med tør gasformig H_2S ved stuetemperatur i 4,5 time. De flygtige bestanddele blev fjernet ved anvendelse af en rotationsfordamper, og reaktionsproduktet blev isoleret ved præparativ TLC (silicagel, 7:2:1 $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{koncentreret vandig NH}_3$) til dannels af 65,0 mg (41%) af et hvidt pulver, smp. udefinerbart; IR 3650 (NH_2), 3600-3100 (OH) cm^{-1} ; MS: 635 ($\text{M}^+ - \text{CH}_2 = \text{NH}^+$), 503, 470, 386, 368, 353. En prøve på 1 mg blev per-O-trimethylsilyleret med bis-(trimethylsilyl)tri-fluoracetamid i DMF ved 65-70°C i 15 minutter, MS: 1024 (M^+), 1009, 951 ($\text{M}^+ - \text{N}(\text{Si}[\text{CH}_3]_3)_2$), 523, 501, 368, 174 (basis top). Man optog en MS med høj opløsningsevne for det per-O-trimethylsilylerede saccharidfragment.

Analyse, beregnet for $\text{C}_{21}\text{H}_{52}\text{NO}_4\text{Si}_5^+$: 522,2744.

Fundet: 522,2721.

P a t e n t k r a v :

Fremgangsmåde til fremstilling af lipid-vesikler med lipid-dobbeltlagsvægge bestående af kolesterol, distearoylphosphatidylcholin og et kolesterol-sukkerderivat, k e n d e - t e g n e t ved, at man opløser en effektiv mængde fysiologisk kompatibelt radioaktivt sporingsmateriale, et cytotoxisk middel eller et terapeutisk aktivt stof i vand, tilsætter cholesterolen og distearoylphosphatidylcholinen og yderligere 6-(5-cholesten-3-yloxy)hexyl-2-acetamido-2-deoxy-1-thio- β -D-galactopyranosid, 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)-hexyl-6-amino-6-deoxy-1-thio- β -D-galactopyranosid eller 6-(5-cholesten-3 β -yloxy)hexyl-6-amino-6-deoxy-1-thio- α -D-mannopyranosid og underkaster den således fremstillede blanding en ultralydbehandling.

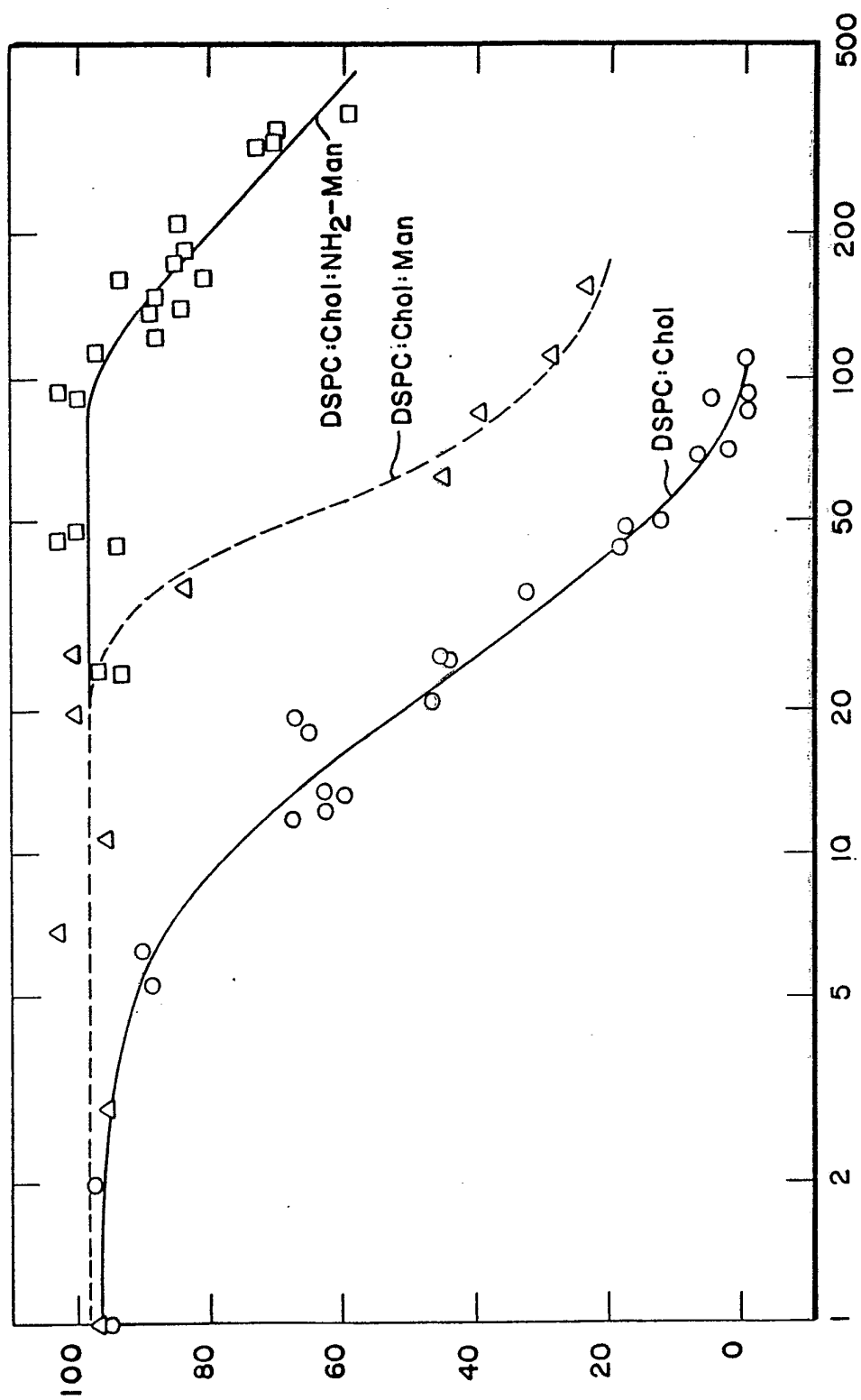


FIG.-1

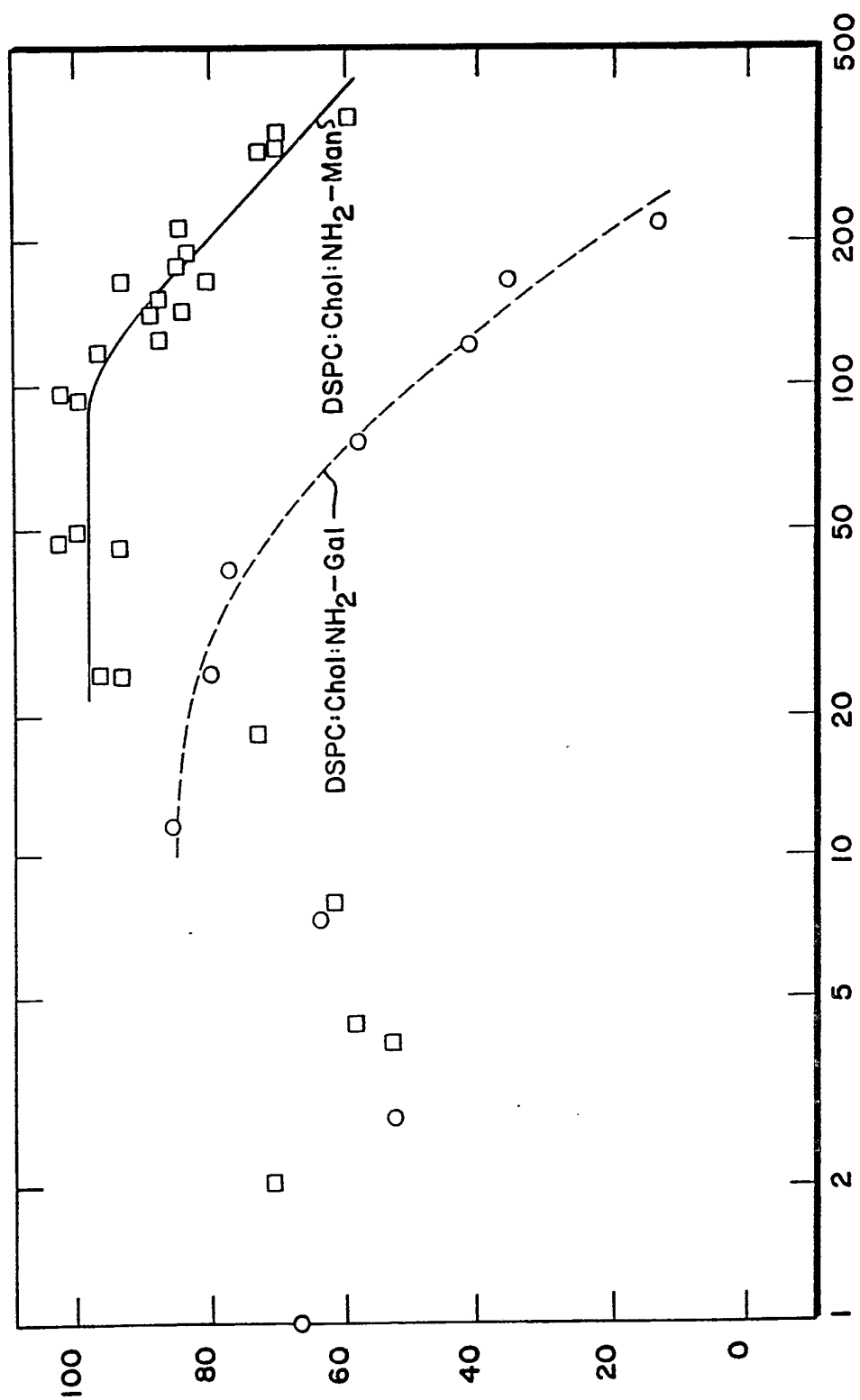


FIG.- 2

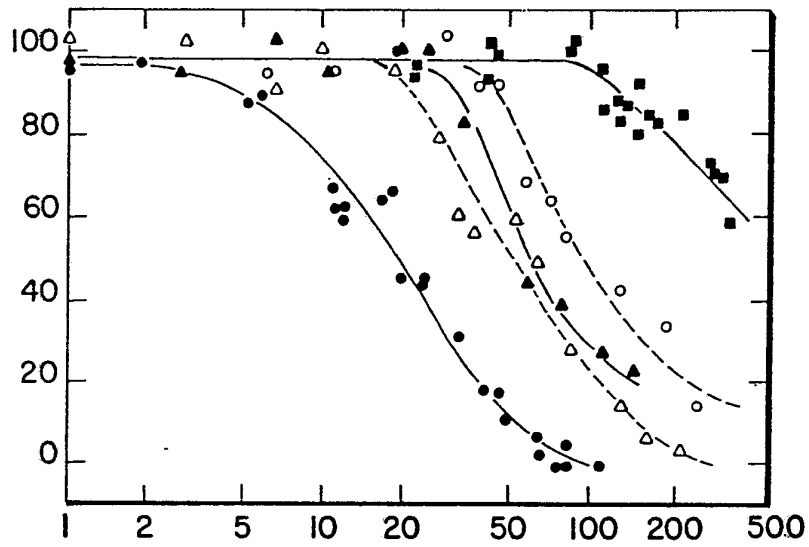


FIG.-3

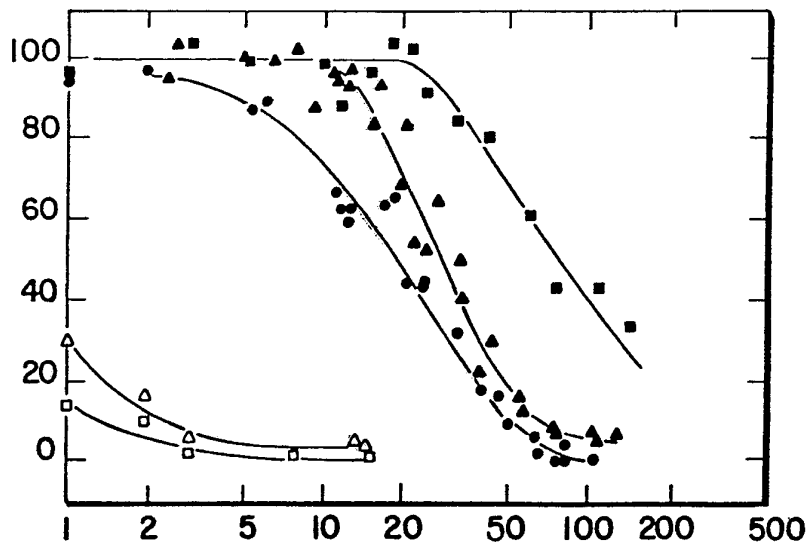


FIG.-4