

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG
(19) Weltorganisation für geistiges

Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
9. April 2015 (09.04.2015)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2015/048940 A1

- (51) **Internationale Patentklassifikation:**
C08G 73/02 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
- (21) **Internationales Aktenzeichen:** PCT/DE2014/000500
- (22) **Internationales Anmeldedatum:**
2. Oktober 2014 (02.10.2014)
- (25) **Einreichungssprache:** Deutsch
- (26) **Veröffentlichungssprache:** Deutsch
- (30) **Angaben zur Priorität:**
10 2013 016 750.7
2. Oktober 2013 (02.10.2013) DE
- (71) **Anmelder:** FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT
JENA [DE/DE]; Fürstengraben 1, 07743 Jena (DE).
- (72) **Erfinder:** ENGLERT, Christoph; Am Steiger 1, 07743
Jena (DE). TAUHARDT, Lutz; Salvador-Allende-Platz 1,
07747 Jena (DE). GOTTSCHALK, Michael; Friedrich-
Engels-Str. 37, 07749 Jena (DE). SCHUBERT, Ulrich, S.;
Botzstr. 5, 07743 Jena (DE).
- (74) **Anwälte:** DONATH, Dirk et al.; Patent- und
Rechtsanwaltskanzlei Bock Bieber Donath, Hans-Knöll-
Str. 1, 07745 Jena (DE).
- (81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

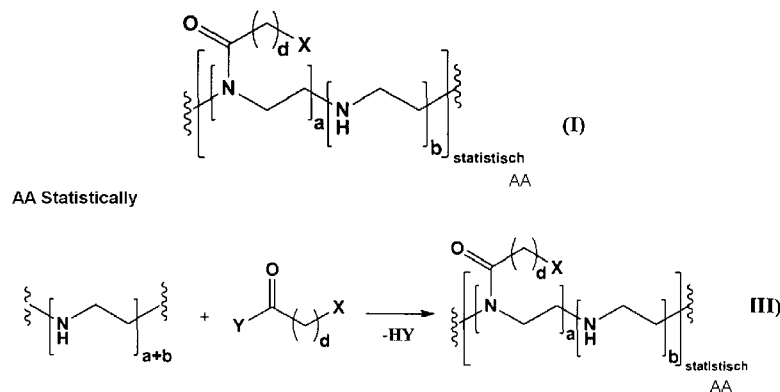
- (84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG,
KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist: Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

(54) **Title:** NEW POLY(ETHYLENE IMINE)-BASED COPOLYMERS FOR BONDING TO AND RELEASING GENETIC MATERIAL, IN PARTICULAR DNA/RNA, AND METHOD FOR THE PRODUCTION AND USE OF SAME

(54) **Bezeichnung :** NEUE POLY(ETHYLENIMIN) BASIERTE COPOLYMERE ZUR ANBINDUNG UND FREISETZUNG VON GENETISCHEM MATERIAL, INSBESONDERE VON DNA/RNA, SOWIE VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG UND VERWENDUNG



(57) **Abstract:** The copolymers according to a compound of the general formula I can be produced with little effort and tailored to needs and have a high functionality for universal effective uses without restriction of their binding affinity for genetic material. The new copolymers are produced by a synthesis according to general formula III.

(57) **Zusammenfassung:** Die Copolymere gemäß einer Verbindung der allgemeinen Formel I sind aufwandgering und maßgeschneidert herstellbar und weisen eine hohe Funktionalität für universelle effektive Verwendungen ohne Einschränkung ihrer Bindungsaffinität für genetisches Material auf. Hergestellt werden die neuen Copolymere durch eine Synthese der allgemeinen Formel III.



WO 2015/048940 A1

Neue Poly(ethylenimin) basierte Copolymere zur Anbindung und Freisetzung von genetischem Material, insbesondere von DNA/RNA, sowie Verfahren zu deren
5 Herstellung und Verwendung

Die Erfindung betrifft neue Poly(ethylenimin) basierte Copolymere, welche aus Ethylenimin- und 2-Oxazolineinheiten bestehen, aber im Vergleich zu bekannten Poly(ethylenimin) basierten Copolymeren (PEI) eine überraschend hohe Funktio-
10 nalität aufweisen. PEIs dieser Art sind zur Anbindung und Freisetzung von DNA/RNA bekannt. Des Weiteren schließt die Erfindung auch das Verfahren zu deren Herstellung sowie funktionsspezifische Verwendungen der vorgeschlagenen Copolymere ein.

Die vorgeschlagenen Poly(ethylenimin) basierten Copolymere können beispielsweise
15 zur Funktionalisierung von Oberflächen, zur Entwicklung von DNA-Chipsystemen für die mobile Analytik und als Materialien für antifouling Beschichtungen von Sensoren verwendet werden.

Es ist bereits 2-(3-butenyl)-2-oxazolin als Monomer bekannt (A. Gress, A. Völkel,
20 H. Schlaad; Thio-click modification of poly[2-(3-butenyl)-2-oxazoline] *Macromolecules* 40, 2007, 7928-7933), welches durch Funktionalisierung von (2-Chlorethylamin)-hydrochlorid mit *N*-Succinimidyl-4-pentenat, gefolgt von einem Ringschluss, dargestellt wird. Das über 3 Stufen hergestellte Monomer 2-(3-Butenyl)-2-oxazolin wird zu Poly(2-(3-butenyl)-2-oxazolin) polymerisiert. Das unter
25 vergleichsweise hohem Zeitaufwand erhaltene Homopolymer enthält keine freien Amingruppen, die zur Anbindung von genetischem Material, insbesondere DNA/RNA, von Nöten sind.

Bekannt sind auch Poly(ethylenimin) basierte Copolymere (H. Tian, F. Li, J. Chen,
30 Y. Huang, X. Chen: *N*-Isopropylacrylamide-Modified Polyethylenimines as Effective Gene Carriers, *Macromolecular. Bioscience* 12, 2012, 1680-1688), bei denen die Funktionalisierung mit *N*-Isopropylacrylamid durch eine sogenannte

Michael-Addition erfolgt. Diese synthetisierten Derivate zeigen Bindungsaffinität zu plasmid DNA. Allerdings führt die Funktionalisierung des PEI mittels besagter Michael-Addition zu Seitenketten ohne mögliche Mehrfachbindungen, wodurch die Funktionalisierung beschränkt ist. Insbesondere können auf diese Weise keine
5 Substrate mit funktionalisierter Oberfläche oder strukturierte Hydrogele, beispielsweise für Beads, Partikel etc., zur Anbindung und Freisetzung von genetischem Material hergestellt werden.

Es ist auch bekannt, dass N-Hydroxysuccinimid (NHS) oder das etwas polarere N-
10 Hydroxysulfosuccinimid (NHSS) unter milden Bedingungen mit carboxylhaltigen Komponenten (z. B. Butansäure) zu so genannten „Aminoacylestern“ reagieren (D. Sehgal, I. K. Vijay: A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation, Anal. Biochem. 218, 1994, 87-91).

Mit diesen Aminoacylestern können Aminogruppen funktionalisiert werden, jedoch ist
15 diese Funktionalisierung ausschließlich auf primäre Aminogruppen beschränkt. Keine Erwähnung findet außerdem die Einführung von funktionalisierten Seitenketten in Polymere. Wie vorgenannt, sind hier ebenfalls keine Mehrfachbindungen möglich, so dass wiederum keine Substrate mit funktionalisierter Oberfläche oder strukturierte Hydrogele, beispielsweise für Beads, Partikel etc., zur Anbindung und Freisetzung
20 von genetischem Material, insbesondere DNA/RNA, herstellbar sind.

Bekannt ist weiterhin die Funktionalisierung von verzweigtem PEI mit Acetat, Butanoat und Hexanoat durch EDAC/NHS (A. M. Doody, J. N. Korley, K. P. Dang, P. N. Zawaneh, D. Putnam: Characterizing the structure/function parameter space of
25 hydrocarbon-conjugated branched polyethylenimine for DNA delivery in vitro, J. Control. Release 116, 2006, 227-237). Wie bereits vorher erwähnt, ist die Funktionalisierung erneut nur auf primäre Aminogruppen beschränkt. Außerdem ist die Funktionalisierung von Polyethylenmin mittels Acet-, Propion- und Butansäureranhydrid beschrieben (S. Nimesh, A. Aggarwal, P. Kumar, Y. Singh,
30 K.C. Gupta, R. Chandra: Influence of acyl chain length on transfection mediated by acylated PEI nanoparticles, Int. J. Pharm. 337, 2007, 265-274). In beiden Fällen besteht Bindungsaffinität zu genetischem Material, wie DNA/RNA, jedoch sind

wiederum keine Mehrfachbindungen der eingeführten Seitenketten erwähnt, wodurch ebenfalls die Nachteile der Einschränkung vorbeschriebener Verwendungsfunktionalität gegeben sind.

5 Es sind des Weiteren Polyalkylenimin-Hydrogele mit einstellbaren Degradationsraten bekannt (M. Carnahan, J. Butlin: Crosslinked Polyalkyleneimine Hydrogels with Tunable Degradation Rates, WO 2009/102952 A2). Hierbei werden unterschiedlich funktionalisierte Polyalkylenimine, deren Reaktionsweg nicht
10 aufgezeigt wird, bzw. verzweigtes Polyethylenimin, mittels aktiviertem Polyethylenglycol vernetzt, sodass nur ein Teil der ursprünglichen Amin-Gruppen des PEIs für eine spätere biologische Anwendung zur Verfügung steht. Über das Verhältnis der Mengen des Ausgangspolymers und des Vernetzers erfolgt die Kontrolle des Vernetzungsgrades lediglich auf indirektem Weg. Der Fokus liegt hier
15 auf der Synthese von Hydrogelnetzwerken. Die Weiterverwendung von vorhandenen Funktionalitäten, beispielsweise auf Oberflächen oder zur Synthese strukturierter Hydrogele zur Anbindung und Freisetzung von genetischem Material, wird nicht weiter ausgeführt.

20 Weiterhin ist die partielle alkalische Hydrolyse von Poly(N-acetylethylimin) bekannt (Y. Chujo, Y. Yoshifuji, K. Sada, T. Saegusa: A Novel Nonionic Hydrogel from 2-Methyl-2-oxazoline, *Macromolecules* 22, 1989, 1074-1077). Eine anschließende Vernetzung zu Polymernetzwerken ist, wie bereits vorher beschrieben, nur über vorhandene Ethylenimineinheiten möglich. Diese stehen für die Anbindung und
25 spätere Freisetzung von genetischem Material nicht mehr zur Verfügung. Eine exakte Quantifizierung von freien Ethylenimineinheiten im hergestellten Hydrogel ist nicht möglich. Außerdem findet die Einführung von funktionalisierten Seitenketten in die Polymere keine Erwähnung, womit die Anwendungsmöglichkeiten, beispielsweise einer Oberflächenfunktionalisierung, entfallen. Eine Einführung von Seitenketten mit
30 ungesättigten Funktionalitäten ist auf dem Weg der Hydrolyse nicht möglich.

- 4 -

Bekannt ist die Alkylierung bzw. Acylierung von Polyethylenimininen und die Untersuchung der Freisetzung von Plasmid-DNA aus diesen Copolymeren (M. Thomas, A. M. Klibanov: Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells, PNAS 99, 2002, 14640-14645). Keine Erwähnung findet auch
5 hier die Einführung von ungesättigten funktionellen Gruppen und die Möglichkeit, die Copolymere mittels Vernetzer zu Hydrogelen umzusetzen.

Weiterhin ist speziell die partielle Acetylierung von Polyethylenimin über Acetanhydrid ausführlich untersucht (M. L. Forrest, G. E. Meister, J. T. Koerber, D.
10 W. Packl: Partial Acetylation of Polyethylenimine Enhances *In Vitro* Gene Delivery, Pharm. Res. 21, 2004, 365-371). Durch die Abwesenheit von Mehrfachbindungen in den Seitenketten sind ebenfalls die Nachteile der Einschränkung vorher beschriebener Verwendungsmöglichkeiten gegeben.

15 Die Funktionalisierung und Vernetzung von verzweigtem Polyethylenimin mit mono-, bi- oder multifunktionellen Komponenten findet ebenfalls Erwähnung (P. Tarcha, T. Merdan, E. Wagner, J. Klöckner: Chemically modified polycation polymer for siRNA delivery, WO 2007/084797). Die Möglichkeit, ungesättigte funktionelle Gruppen mittels Michael-Addition einzubringen, wird genannt, jedoch
20 bezüglich einer praktischen Umsetzung nicht weiter beschrieben. Demnach ergibt sich auch hier der fehlende Bezug zu einer möglichen Anwendung dieser Polymere zur Oberflächenfunktionalisierung oder Strukturierung von Hydrogelen, beispielsweise für Beads, Partikel etc., zur Anbindung und Freisetzung von genetischem Material, insbesondere DNA/RNA. Außerdem sind vorhandene
25 mögliche Ethylenimineinheiten innerhalb eines Copolymers über einen Linker verbunden.

Auch die Funktionalisierung mit langkettigen Säurehalogeniden ist bekannt (L. Yan, W. T. S. Huck, X.-M. Zhao, G. M. Whitesides: Patterning Thin Films of
30 Poly(ethylene imine) on a Reactive SAM Using Microcontact Printing, Langmuir 15, 1999, 1208-1214) bringt aber erneut den Nachteil der fehlenden Mehrfachbindung in der Seitenkette und damit verbundene Anwendungsmöglichkeiten mit sich.

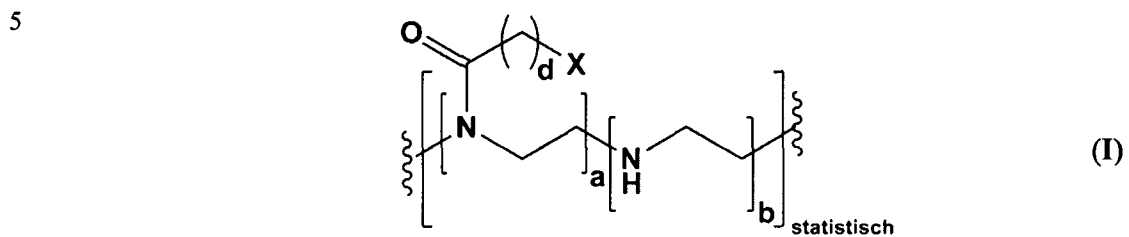
Bekannt ist die Synthese wasserlöslicher Copolymere verschiedenster Zusammensetzung (WO 2011/162366 A1). Die Einführung von Mehrfachbindungen in verzweigtes Polyethylenimin wird lediglich in Zusammenhang mit Ethylenglykoleinheiten in der Seitenkette, deren Ziel die Synthese wasserlöslicher Polymere ist, beschrieben. Eine Anbindung von genetischem Material wird durch die prozentual verringerte Dichte an positiven Ladungen, besonders für längere Seitenketten, extrem eingeschränkt. Die gewünschte Löslichkeitseigenschaft wird speziell durch eine hohe Anzahl an Ethylenglykoleinheiten erreicht, die jedoch eine Anbindung, insbesondere von DNA, erschweren. Um dennoch eine möglichst effiziente Anbindung von genetischem Material beobachten zu können, muss der Ethyleniminanteil im Copolymer eine bestimmte Größenordnung erreichen. Ausgehend von dieser Zusammensetzung ist jedoch eine Wasserlöslichkeit nicht mehr möglich. Eine Anwendung dieser ungesättigten, funktionalisierten Copolymere, beispielsweise zur Strukturierung von Hydrogelen, findet keine Erwähnung.

Es ist des Weiteren die partielle Hydrolyse von Poly(2-oxazolinen) bekannt (F. Wiesbrock, F. Stelzer, C. Slugovic, N. Noormofidi, V. Kaltenhauser, E. Kreutzwiesner, K. Rametsteiner: Use of contact biocides based on poly(2-substituted) oxazolines, WO 2012/149591). Die Synthese eines Mehrfachbindungsenthaltenden Copolymers auf diesem Reaktionsweg ist nicht möglich. Eine Hydrolyse führt zur Zerstörung der Mehrfachbindungsfunktionalität unter den benötigten Bedingungen.

Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, neue Poly(ethylenimin) basierte Copolymere zu schaffen, die möglichst aufwandgering und maßgeschneidert herstellbar sind sowie eine hohe Funktionalität für universelle effektive Verwendungen aufweisen, ohne jedoch deren Bindungsfähigkeit gegenüber genetischem Material, insbesondere DNA/RNA, einzuschränken.

Beispielsweise sollen Hydrogele aus den Poly(ethylenimin) basierten Copolymeren mit hoher Bindungsaffinität zu DNA/RNA darstellbar sein.

Gelöst wird diese Aufgabe durch neue Poly(ethylenimin) basierte Copolymere zur Anbindung und Freisetzung von genetischem Material, insbesondere DNA/RNA, bestehend aus Ethylenimin- und 2-Oxazolineinheiten, die eine Verbindung der allgemeiner Formel I aufweisen:



mit:

a, b: Anteil der jeweiligen Monomereinheiten (a, b > 0)

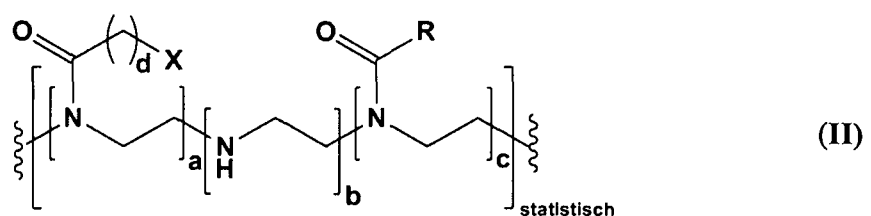
d: Länge der Seitenkette (1 bis 20)

X: funktionelle Gruppe der 2-Oxazolineinheit (über Doppel- oder
15 Dreifachbindung)

Copolymer-Kettenlänge zwischen 2 und 1000000 Einheiten

Dabei ist es vorteilhaft, wenn diese neuen Poly(ethylenimin) basierten Copolymere jeweils unterschiedliche Oxazolineinheiten gemäß der allgemeinen Formel II

20 aufweisen:



mit:

a, b, c: Anteil der jeweiligen Monomereinheiten (a, b, c > 0)

d: Länge der Seitenkette (1 bis 20)

X: funktionelle Gruppe der 2-Oxazolineinheit (über Doppel- oder
Dreifachbindung)

30 R: H- oder organischer Rest (z. B. Alkyl- und Aryl-Rest),

Copolymer-Kettenlänge zwischen 2 und 1000000 Einheiten

Die Zusammensetzung der maßgeschneiderten Copolymere kann auf einfache und schnelle Weise mit Hilfe der Kernspinresonanzspektroskopie bestimmt werden. Die Struktur der erfindungsgemäßen Copolymere ermöglicht Mehrfachbindungen im Copolymerückgrat und schafft damit Voraussetzungen für Funktionalitäten, ohne
5 allerdings gegenüber dem bekannten Stand der Technik die Bindungsaffinität für genetisches Material einzuschränken. Die besagten Funktionalitäten ermöglichen somit weitere Anwendungen, bei welchen die Bindung/Freigabe insbesondere von DNA und RNA voll unterstützt wird. Beispielsweise kann mittels an sich bekannter Click-Chemie (Thiol-en Photoaddition, Azid-Click) eine weitere Komponente an das
10 beschriebene Copolymer addiert werden. Der große Vorteil des hergestellten Copolymers ist die Eigenschaft, dass vorhandene und exakt quantifizierte Aminogruppen von dieser Reaktion unberührt bleiben. Ihre Affinität zur Anbindung und Freisetzung von genetischem Material bleibt somit ebenfalls unbeeinträchtigt und kann weiterhin über die Einstellung des PEI-Gehaltes im Copolymer beeinflusst
15 werden. Der Fokus liegt weiterhin auf der Einführung von kurzen, einfachen Seitenketten, welche keinen Einfluss auf eine biologische Anwendung haben und somit quantitative Aussagen zur Anbindung von genetischem Material zulassen.

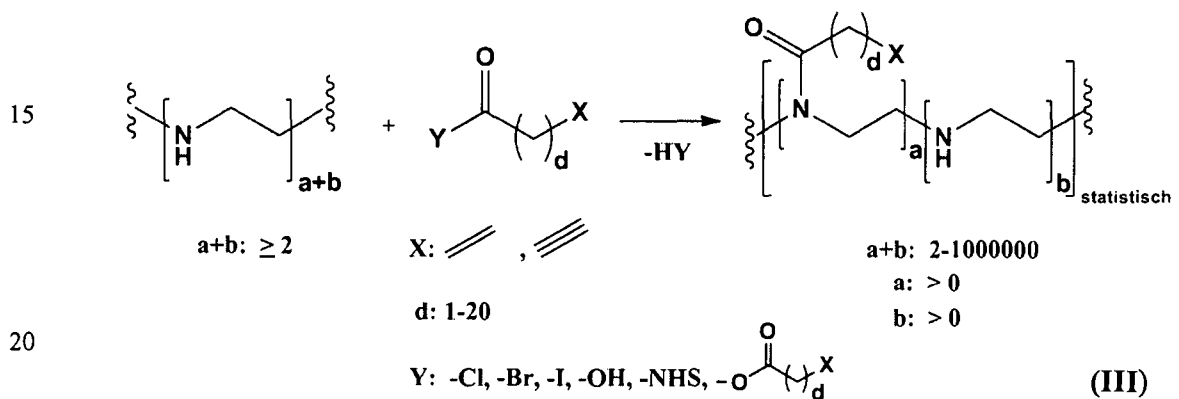
In den Unteransprüchen sind spezielle Verwendungen der vorgeschlagenen
20 Copolymere aufgrund deren vorbeschriebenen Funktionalitäten aufgeführt. Die Copolymere können beispielsweise auf funktionalisierten Oberflächen aufgebracht werden und eine Anbindung und Freisetzung von genetischem Material an ihnen ermöglichen. Durch unvollständige Oberflächenanbindung sind freie Mehrfachbindungen vorhanden, die zum schrittweisen Aufbau von
25 Hydrogelschichten auf der gewünschten Oberfläche genutzt werden können. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der Strukturierung von dreidimensionalen Polymernetzwerken, sogenannten Hydrogelen. Mit Hilfe eines bifunktionellen Linkers (Dithiol) können die Copolymere zu solchen Hydrogelen vernetzt werden. Ein entscheidender Nachteil von solchen Polymernetzwerken ist die Eigenschaft
30 ihrer absoluten Unlöslichkeit in jeglichen Lösungsmitteln. Daher ist eine Bestimmung des definierten PEI-Gehaltes in der Gelstruktur über (Lösungs-) Kernspinresonanzspektroskopie (wie für die Copolymere) nicht möglich. Über die

oben erwähnte Charakterisierung des Copolymers und die anschließende Vernetzung über die ungesättigten Funktionalitäten (Aminogruppen bleiben unberührt) kann dennoch eine exakte Aussage über den im Hydrogel vorhandenen PEI-Anteil gemacht werden.

5 Die einfache und schnelle Durchführung beispielsweise der Thiol-en Photoaddition durch Bestrahlung der Probe mit UV-Licht (365nm) führt außerdem zur Möglichkeit, maßgeschneiderte Hydrogelbeads in situ herzustellen. Auch hier kann die gezielte Anbindung und Freisetzung von genetischem Material stattfinden.

10 Dargestellt werden die neuen Poly(ethylenimin) basierten Copolymere erfindungsgemäß

durch eine Synthese der allgemeinen Formel III:



Vorteilhaft ist, wenn im Fall von $-OH$ oder $-NHS$ als Säure die Funktionalisierung in Gegenwart eines Aktivierungsreagenz, insbesondere EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) oder DCC (Dicyclohexylcarbodiimid) eingeführt wird.

Die funktionelle Seitenkette kann aber auch über eine nachträgliche Funktionalisierung mittels ungesättigter Säureanhydride oder -halogenide ($-Cl$, $-Br$, $-I$) eingeführt werden.

Die erfindungsgemäßen Copolymere weisen aufgrund ihres Syntheseweges sowohl ungesättigte Funktionalitäten als auch freie Aminogruppen auf. Die Synthese eines

Copolymers der Formel I bzw. II basiert erfindungsgemäß auf einer nachträglichen Funktionalisierung des Homopolymers Polyethylenimin (Formel III).

Das Syntheseverfahren erlaubt eine aufwandgeringe und verfahrenstechnisch einfache Durchführung, die sowohl im kleinen Maßstab als auch im
5 Hochdurchsatzverfahren möglich ist. Die Herstellung von maßgeschneiderten Copolymeren führt zu Substanzen mit exakt definierten Zusammensetzungen, die je nach Anwendungszweck variiert werden können. Ihre exakte Zusammensetzung kann auf einfache und schnelle Weise mittels Kernspinresonanzspektroskopie bestimmt werden. Dadurch können über einfache Variation der
10 Ausgangsstoffmengen umfangreiche Bibliotheken von Copolymeren unterschiedlichster Zusammensetzung erstellt werden.

Die Erfindung soll nachstehend anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

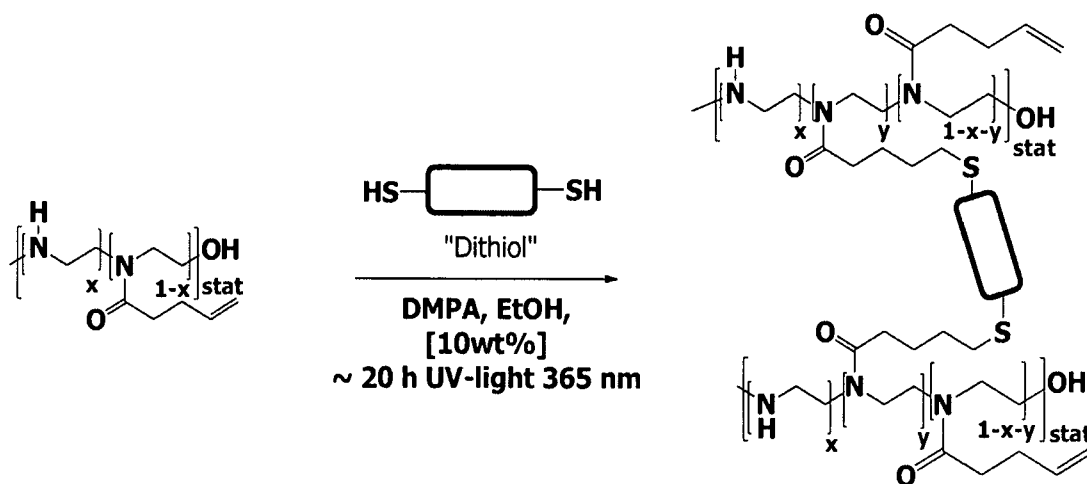
15

Beispiel 1:

Synthese von Hydrogelen mit exakt einstellbarem PEI-Anteil (zur späteren Anbindung und Freisetzung von genomischer Herings-DNA), wobei die Vernetzung
20 der Copolymere über eine photoinitierte Thiol-En Photoaddition analog zu Dargaville (T.R. Dargaville et al.: Poly(2-oxazoline) hydrogel monoliths via thiol-ene coupling, Macromol. Rapid Commun. 33, 2012, 1695-700) erfolgt.

Die nachstehende Formel zeigt die schematische Darstellung der Thiol-en Photoaddition von P(ButEnOx-co-EI) mit 2,2'-(Ethylendioxy)diethanthiol in
25 Anwesenheit des Katalysators DMPA unter UV-Licht (365 nm).

- 10 -



Poly[2-(3-Butenyl)-2-oxazolin-co-ethylenimin]-basierte Hydrogele:

5 In einem Mikrowellenvial wurde das Copolymer P(ButEnOx-co-EI) in Ethanol gelöst. In einem zweiten Vial erfolgte die Lösung des Photoinitiators 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon und des bifunktionellen Thiols, 2,2'-(Ethylendioxy)diethanethiol, ebenfalls in Ethanol (0.9:1.0 Thiol: Doppelbindung). Die kombinierten, klaren Lösungen (10 wt%) wurden 30 Minuten mit Stickstoff entgast und

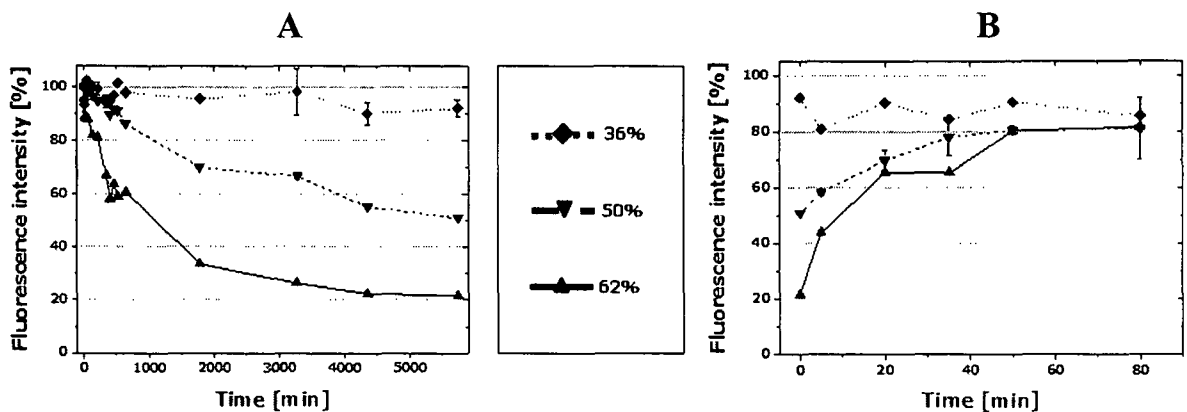
10 anschließend rund 24 Stunden UV-Licht (365 nm) ausgesetzt. Die einsetzende Gelbildung zeigte die erfolgreiche Hydrogelsynthese. Das erhaltene Gel wurde wiederholt mit Methanol und Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte eine Gefriertrocknung.

15 Es konnte eine Bibliothek aus verschiedenen Hydrogelen ausgehend von entsprechenden Copolymeren hergestellt werden. Die synthetisierten Substanzen konnten umfangreich charakterisiert werden (Quellwert, vapour TGA, FT-IR, EA, solid ¹H-/¹³C- NMR, SEM).

20 DNA-Studien – Ethidiumbromid-Test von P(ButEnOx-co-EI)-basierten Hydrogelen:

Die Hydrogele wurden 24 Stunden in HBG-Puffer (pH 7) gequollen. Anschließend wurde eine genomische DNA-Ethidiumbromid-Lösung hinzugefügt. Zu definierten Zeitpunkten wurde je ein Aliquot entnommen und nach erfolgter

Fluoreszenzmessung zurück pipettiert. Die gezielte Freisetzung der zuvor gebundenen DNA konnte unter Zugabe einer Heparinlösung und einer Temperaturerhöhung auf 70°C innerhalb kürzester Zeit erreicht werden.



5

Diagramm 1: Schematische Darstellung der Bindung (A) und Freisetzung (B) von genomischer Herings-DNA von Hydrogelen mit unterschiedlichem PEI-Gehalt mittels EB-Tests

Ergebnisse:

- 10 Eine Gelbildung tritt erst unterhalb eines PEI-Gehaltes von 75% auf. Die Hydrogele zeigen neben ihrer zu erwartenden Unlöslichkeit ein typisches Quellverhalten in Wasser, welches stark vom PEI-Gehalt und vom Vernetzungsgrad (Menge des Dithiols) der Gele abhängt. Die DNA Bindungs- und Freisetzungskapazität ist abhängig vom PEI-Anteil innerhalb der Hydrogelstruktur.
- 15 Zur gezielten Freisetzung ist neben einer Temperaturerhöhung auch die Anwesenheit von Heparin nötig. Dabei kann innerhalb kürzester Zeit (< 60 min) die DNA nahezu vollständig wieder freigesetzt werden.

Beispiel 2:

- 20 Formulierung von Hydrogelbeads über eine Thiol-en Photoaddition analog einer Suspensionspolymerisation.

Mit der Darstellung der vorgeschlagenen neuen Copolymere als Hydrogelbeads wird eine extreme Oberflächenvergrößerung und damit verbunden eine effektivere DNA-

Anbindung erreicht. Weiterhin besteht die Möglichkeit über die Änderung der Reaktionsbedingungen exakt definierte Beadgrößen einzustellen.

P(ButEnOx-co-EI)-basierte Hydrogelbeads:

5 Als Ausgangsstoff diente das Copolymer P(ButEnOx-co-EI_{50%}). Dieses Copolymer und eine entsprechende Menge des Katalysators DMPA wurden in Ethanol gelöst (8 wt%) und anschließend mit dem Dithiol 2,2'-(Ethylenedioxy)diethanethiol versetzt. Durch das Hinzufügen von Paraffinöl und dem Stabilisator Span[®]80 konnte ein Zweiphasengemisch erzeugt werden. Nach 25 min Ausgasen mit N₂ erfolgte
10 unter Rühren (375 rpm) bei Raumtemperatur und UV-Bestrahlung (365 nm) die Thiol-en Photoaddition. Nach 2,5 h wurde das entstandene Hydrogel abgetrennt und intensiv mit Ethanol und Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel sechs Stunden in Wasser gequollen und gefriergetrocknet.

15 **Beispiel 3:**

Anlagerung von Monoschichten an funktionalisierte Glasoberflächen über eine Thiol-en Photoaddition und die schrittweise Erzeugung von kovalent gebundenen Hydrogelschichten.

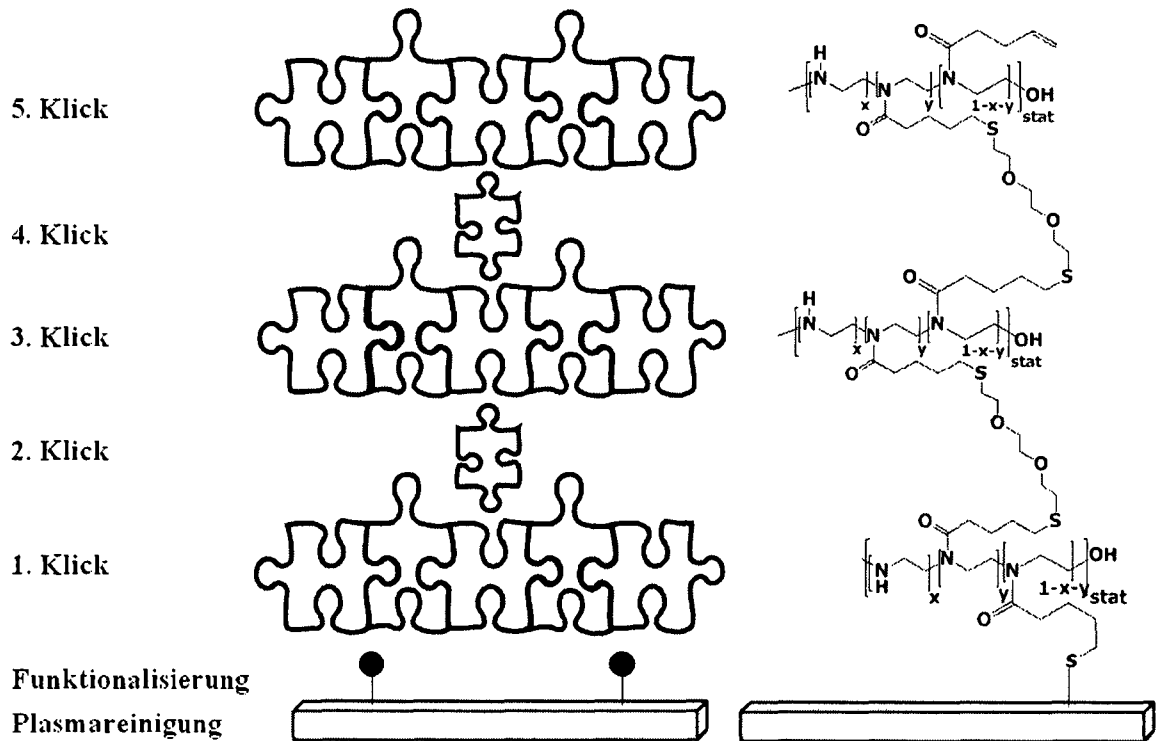
Mit der kovalenten Anbindung der vorgeschlagenen neuen Copolymere an thiol-
20 funktionalisierte Oberflächen kann die effektive DNA-Anbindung und Freisetzung von Oberflächen erreicht werden. Durch den Einbau des bereits erwähnten Dithiols können schrittweise Hydrogelschichten aufgebaut werden (Übersicht 1), welche je nach Schichtdicke unterschiedliche DNA-Affinität aufweisen. Diese Anwendung der Anbindung und Freisetzung von genetischem Material, insbesondere DNA/RNA,
25 von beschichteten Oberflächen soll beispielsweise in der mobilen Analytik (Chip-Diagnostik) zum Einsatz kommen.

In einem konischen Mikrowellenvial wurde das Copolymer P(ButEnOx-co-EI_{50%}) zusammen mit dem Photoinitiator 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon in Ethanol gelöst. Ein zuvor im Plasmaofen ausgeheiztes und mit 3-(Trimethoxysilyl)-1-
30 propanethiol funktionalisiertes 1 x 1 cm² großes Glasplättchen wurde so platziert,

dass das Rühren eines Rührfisches unterhalb der eingebrachten Glasplatte weiterhin möglich war. Das Vial wurde 30 Minuten mit Stickstoff entgast und anschließend rund 24 Stunden UV-Licht (365 nm) ausgesetzt. Die beschichtete Glasoberfläche (1. Klick) wurde wiederholt mit Wasser und Methanol gewaschen. Analog erfolgte der

5 2. Klick durch Zugabe des Vernetzers 2,2'-(Ethylendioxy)diethanethiol anstatt des Copolymers. Erneut wurden die genannten Waschschrirte durchgeführt. Die abermalige Reaktion mit dem beschriebenen Copolymer (3. Klick) führte zur formalen Ausbildung der Hydrogelschicht. Durch freie vorhandene Doppelbindungen konnte der schichtweise Aufbau bis zum 7. Klick durchgeführt

10 werden, wobei auch weitaus mehr Schichten möglich sind.



Übersicht 1: Chemischer Hintergrund der Beschichtung

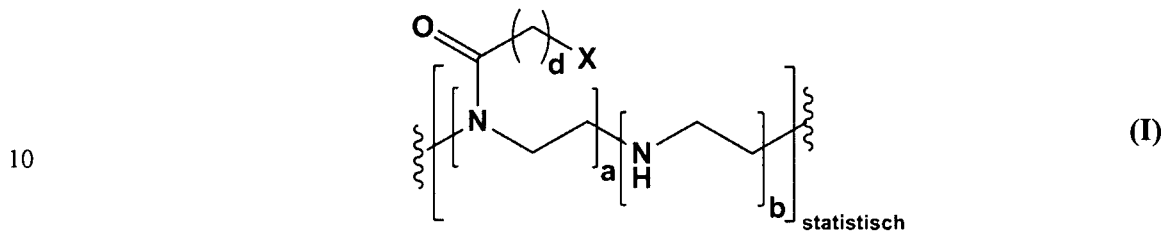
Die erfolgreiche Beschichtung der Glasoberflächen konnte mittels

15 Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden. Dazu wurde das beschriebene Copolymer mit dem Farbstoff Fluorescein markiert (~1%) und dieses beim nachzuweisenden Klick-Schritt an die Oberfläche addiert. Hierbei zeigte die behandelte Oberfläche auch nach intensivem Waschen eine erfolgreiche kovalente Anbindung durch eine

erhöhte Fluoreszenz der markierten Probe im Vergleich zu einer farbstofffreien Beschichtung. Messungen eines Kratzers auf den beschichteten Oberflächen mittels Rasterkraftmikroskop ergaben für die erste Schicht (1. Klick) eine Dicke von 15 nm. Für die Ausbildung einer Hydrogelschicht (3. Klick) konnte eine Höhe von 35 nm
5 bestimmt werden. Außerdem konnte eine erfolgreiche Anbindung mit Hilfe der Infrarotspektroskopie gezeigt werden.

Patentansprüche

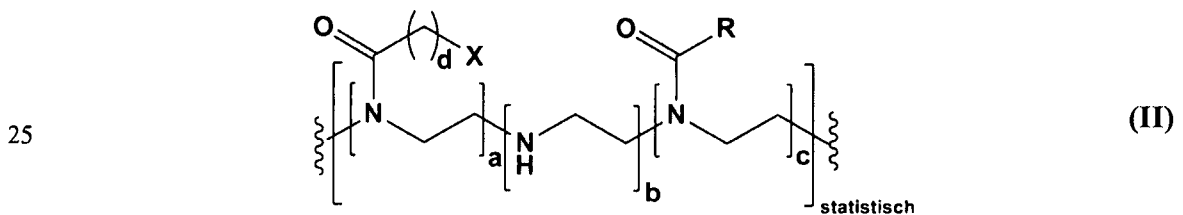
1. Neue Poly(ethylenimin) basierte Copolymere zur Anbindung und Freisetzung von
genetischem Material, insbesondere DNA/RNA, bestehend aus Ethylenimin- und
5 2-Oxazolineinheiten, gekennzeichnet durch eine Verbindung der allgemeiner
Formel I:



mit:

- a, b: Anteil der jeweiligen Monomereinheiten ($a, b > 0$)
15 d: Länge der Seitenkette (1 bis 20)
X: funktionelle Gruppe der 2-Oxazolineinheit (über Doppel- oder
Dreifachbindung)
Copolymer-Kettenlänge zwischen 2 und 1000000 Einheiten

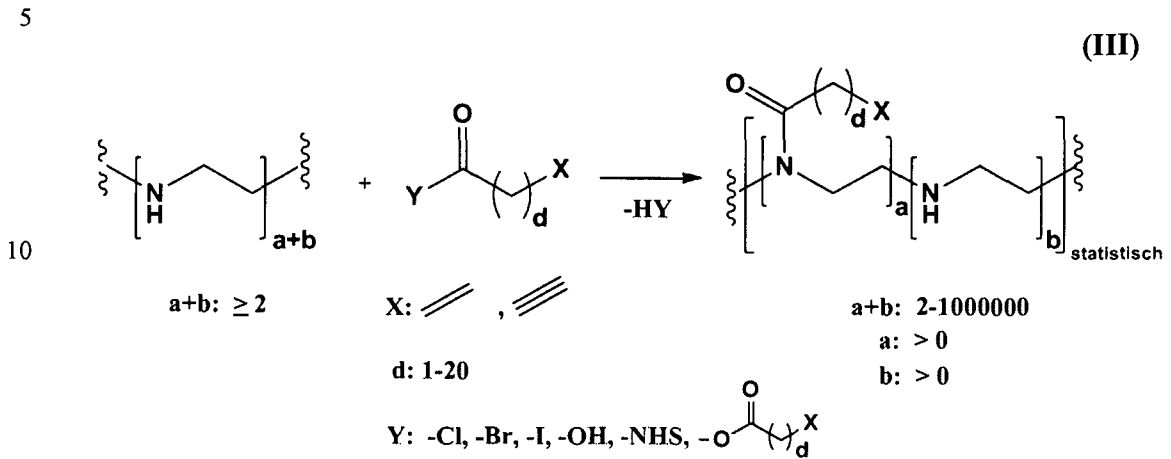
- 20 2. Neue Poly(ethylenimin) basierte Copolymere gemäß Anspruch 1, dadurch
gekennzeichnet, dass diese gemäß der allgemeinen Formel II jeweils
unterschiedliche Oxazolineinheiten aufweisen:



mit:

- a, b, c: Anteil der jeweiligen Monomereinheiten ($a, b, c > 0$)
d: Länge der Seitenkette (1 bis 20)
30 X: funktionelle Gruppe der 2-Oxazolineinheit (über Doppel- oder
Dreifachbindung)
R: H- oder organischer Rest (z. B. Alkyl- und Aryl-Rest),
Copolymer-Kettenlänge zwischen 2 und 1000000 Einheiten

3. Verfahren zur Herstellung von neuen Poly(ethylenimin) basierten Copolymeren, zur Anbindung und Freisetzung von genetischem Material, insbesondere DNA/RNA, bestehend aus Ethylenimin- und 2-Oxazolineinheiten, gekennzeichnet durch eine Synthese der allgemeinen Formel III:



4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass im Fall von $-\text{OH}$ oder $-\text{NHS}$ als Säure die Funktionalisierung in Gegenwart eines Aktivierungsreagenz, insbesondere EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid) oder DCC (Dicyclohexylcarbodiimid) eingeführt wird.

20

5. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die funktionelle Seitenkette über eine nachträgliche Funktionalisierung mittels ungesättigter Säureanhydride ($-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}_d\text{X}$) oder -halogenide ($-\text{Cl}, -\text{Br}, -\text{I}$) eingeführt wird.

25

6. Verwendung der neuen Poly(ethylenimin) basierten Copolymere gemäß Ansprüchen 1 oder 2, zur Funktionalisierung der Oberfläche eines Substrates, insbesondere Beads und Partikel, zwecks Anbindung und Freisetzung des genetischen Materials.

30

7. Verwendung der neuen Poly(ethylenimin) basierten Copolymere gemäß Ansprüchen 1 oder 2 zur Herstellung oder als Bestandteil von strukturierten Hydrogelen, insbesondere Beads und Partikel, zwecks Anbindung und Freisetzung des genetischen Materials.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DE2014/000500

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C08G73/02 A61K48/00
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C08G A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 3 251 778 A (DICKSON WOODROW J ET AL) 17 May 1966 (1966-05-17) column 1, line 13 - column 8, line 4; claims; examples 2,6,9,12; table I -----	1-5
X	EP 2 586 815 A1 (TORAY INDUSTRIES [JP]) 1 May 2013 (2013-05-01) cited in the application paragraphs [0001], [0007] - [0081]; claims; examples -----	1-7
X	WO 2013/137736 A1 (BENDER ANALYTICAL HOLDING B V [NL]) 19 September 2013 (2013-09-19) page 1, lines 6-14 page 4, line 9 - page 27, line 5; claims ----- -/--	1-5

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 29 January 2015	Date of mailing of the international search report 06/02/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Otegui Rebollo, Juan

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DE2014/000500

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/057628 A2 (BENDER ANALYTICAL HOLDING B V [NL]; HOOGENBOOM RICHARD [NL]; BENDER JO) 3 May 2012 (2012-05-03) page 1, lines 6-16 page 4, line 26 - page 10, line 3 page 11, line 5 - page 30, line 20; claims; examples 1,2 -----	1-5
X,P	CHRISTOPH ENGLERT ET AL: "Linear Poly(ethylene imine)-Based Hydrogels for Effective Binding and Release of DNA", BIOMACROMOLECULES, vol. 15, no. 4, 14 April 2014 (2014-04-14), pages 1124-1131, XP055164820, US ISSN: 1525-7797, DOI: 10.1021/bm4017572 the whole document -----	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DE2014/000500

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 3251778	A	17-05-1966	NONE

EP 2586815	A1	01-05-2013	CA 2802433 A1 29-12-2011
			CN 102971361 A 13-03-2013
			EP 2586815 A1 01-05-2013
			KR 20130139749 A 23-12-2013
			RU 2013103347 A 27-07-2014
			US 2013075665 A1 28-03-2013
			WO 2011162366 A1 29-12-2011

WO 2013137736	A1	19-09-2013	CN 104271638 A 07-01-2015
			EP 2825582 A1 21-01-2015
			WO 2013137736 A1 19-09-2013

WO 2012057628	A2	03-05-2012	AU 2012202543 A1 01-08-2013
			CA 2824471 A1 03-05-2012
			CN 103429268 A 04-12-2013
			EP 2661283 A2 13-11-2013
			JP 2014503017 A 06-02-2014
			KR 20130132916 A 05-12-2013
			US 2013345334 A1 26-12-2013
			WO 2012057628 A2 03-05-2012

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. C08G73/02 A61K48/00
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 C08G A61K

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 3 251 778 A (DICKSON WOODROW J ET AL) 17. Mai 1966 (1966-05-17) Spalte 1, Zeile 13 - Spalte 8, Zeile 4; Ansprüche; Beispiele 2,6,9,12; Tabelle I -----	1-5
X	EP 2 586 815 A1 (TORAY INDUSTRIES [JP]) 1. Mai 2013 (2013-05-01) in der Anmeldung erwähnt Absätze [0001], [0007] - [0081]; Ansprüche; Beispiele -----	1-7
X	WO 2013/137736 A1 (BENDER ANALYTICAL HOLDING B V [NL]) 19. September 2013 (2013-09-19) Seite 1, Zeilen 6-14 Seite 4, Zeile 9 - Seite 27, Zeile 5; Ansprüche ----- -/--	1-5

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. Januar 2015

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

06/02/2015

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Otegui Rebollo, Juan

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>WO 2012/057628 A2 (BENDER ANALYTICAL HOLDING B V [NL]; HOOGENBOOM RICHARD [NL]; BENDER JO) 3. Mai 2012 (2012-05-03) Seite 1, Zeilen 6-16 Seite 4, Zeile 26 - Seite 10, Zeile 3 Seite 11, Zeile 5 - Seite 30, Zeile 20; Ansprüche; Beispiele 1,2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-5
X,P	<p>CHRISTOPH ENGLERT ET AL: "Linear Poly(ethylene imine)-Based Hydrogels for Effective Binding and Release of DNA", BIOMACROMOLECULES, Bd. 15, Nr. 4, 14. April 2014 (2014-04-14), Seiten 1124-1131, XP055164820, US ISSN: 1525-7797, DOI: 10.1021/bm4017572 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-7

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2014/000500

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 3251778	A	17-05-1966	KEINE

EP 2586815	A1	01-05-2013	CA 2802433 A1 29-12-2011
			CN 102971361 A 13-03-2013
			EP 2586815 A1 01-05-2013
			KR 20130139749 A 23-12-2013
			RU 2013103347 A 27-07-2014
			US 2013075665 A1 28-03-2013
			WO 2011162366 A1 29-12-2011

WO 2013137736	A1	19-09-2013	CN 104271638 A 07-01-2015
			EP 2825582 A1 21-01-2015
			WO 2013137736 A1 19-09-2013

WO 2012057628	A2	03-05-2012	AU 2012202543 A1 01-08-2013
			CA 2824471 A1 03-05-2012
			CN 103429268 A 04-12-2013
			EP 2661283 A2 13-11-2013
			JP 2014503017 A 06-02-2014
			KR 20130132916 A 05-12-2013
			US 2013345334 A1 26-12-2013
			WO 2012057628 A2 03-05-2012
