



(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 10 2013 016 750.7

(51) Int Cl.: C08G 73/04 (2006.01)

(22) Anmeldetag: 02.10.2013

(43) Offenlegungstag: 02.04.2015

(71) Anmelder:

Friedrich-Schiller-Universität Jena, 07743 Jena,
DE

NIMESH, Surendra et. al.: Influence of acyl
chain length on transfection mediated by acylated
PEI nanoparticles. In: International Journal of
Pharmaceutics, Vol. 337, (2007), 265-374

(72) Erfinder:

Englert, Christoph, 07743 Jena, DE; Tauhardt,
Lutz, 07747 Jena, DE; Gottschaldt, Michael, Dr.,
07749 Jena, DE; Schubert, Ulrich S., Prof. Dr.,
07743 Jena, DE

TIAN, Huayu et.a.: N-Isopropylacrylamide-
Modified Polyethylenimines as Effective Gene
Carriers. In: Macromol. Biosci., Vol. 12, (2012),
1680-1688

(56) Ermittelter Stand der Technik:

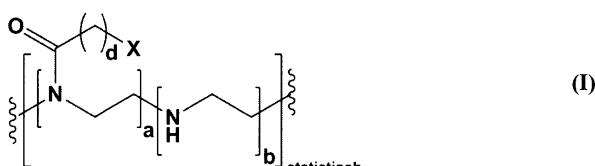
DE 197 26 186 A1
DE 201 22 328 U1
US 2008 / 0 112 916 A1
US 2009 / 0 215 166 A1
JP 2005- 137 253 A

Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

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

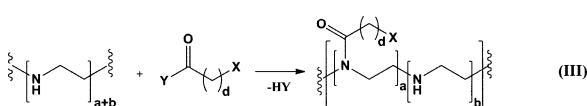
(57) Zusammenfassung: Die Copolymeren gemäß einer Verbindung der allgemeinen Formel I:



(I)

sind aufwandlering und maßgeschneidert herstellbar und weisen eine hohe Funktionalität für universelle effektive Verwendungen ohne Einschränkung ihrer Bindungsaffinität für genetisches Material auf.

Hergestellt werden die neuen Copolymeren durch eine Synthese der allgemeinen Formel III:



(III)

Beschreibung

[0001] 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 Funktionalität 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 zur Funktionalisierung von Oberflächen, zur Entwicklung von DNA-Chipsystemen für die mobile Analytik und als Materialien für antifouling Beschichtungen von Sensoren verwendet werden.

[0002] Es ist bereits 2-(3-butenyl)-2-oxazolin als Monomer bekannt (A. Gress, A. Völkel, 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 vergleichsweise hohem Zeitaufwand erhaltene Homopolymer enthält keine freien Amingruppen, die zur Anbindung von genetischem Material, insbesondere DNA/RNA, von Nöten sind.

[0003] Bekannt sind auch Poly(ethylenimin) basierte Copolymere (H. Tian, F. Li, J. Chen, 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 Substrate mit funktionalisierter Oberfläche oder strukturierte Hydrogele, beispielsweise für Beads, Partikel etc., zur Anbindung und Freisetzung von genetischem Material hergestellt werden.

[0004] Es ist auch bekannt, dass N-Hydroxysuccinimid (NHS) oder das etwas polarere N-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).

[0005] Mit diesen Aminoacylestern können Amingruppen funktionalisiert werden, jedoch ist diese Funktionalisierung ausschließlich auf primäre Amingruppen 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 von genetischem Material, insbesondere DNA/RNA, herstellbar sind.

[0006] 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 hydrocarbonconjugated 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 Amingruppen beschränkt. Außerdem ist die Funktionalisierung von Polyethylenimin mittels Acet-, Propion- und Butansäueranhydrid beschrieben (S. Nimesh, A. Aggarwal, P. Kumar, Y. Singh, K. C. Gupta, R. Chandra: Influence of acyl chain length an transfection mediated by acylated PEI nanoparticles, I. 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.

[0007] 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 Polyalkylenimin, deren Reaktionsweg nicht 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 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.

[0008] Weiterhin ist die partielle alkalische Hydrolyse von Poly(N-acetylethylimin) bekannt (Y. Chujo, Y. Yoshifumi, 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 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 ungesättigten Funktionalitäten ist auf dem Weg der Hydrolyse nicht möglich.

[0009] Bekannt ist die Alkylierung bzw. Acylierung von Polyethyleniminen 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 hier die Einführung von ungesättigten funktionellen Gruppen und die Möglichkeit, die Copolymeren mittels Vernetzer zu Hydrogelen umzusetzen.

[0010] Weiterhin ist speziell die partielle Acetylierung von Polyethylenimin über Acetanhydrid ausführlich untersucht (M. L. Forrest, G. E. Meister, J. T. Koerber, D. W. Packl: Partial Acetylation of Polyethylenimin 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.

[0011] 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 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 mögliche Ethylenimineinheiten innerhalb eines Copolymers über einen Linker verbunden.

[0012] Auch die Funktionalisierung mit langkettigen Säurehalogeniden ist bekannt (L. Van, W. T. S. Huck, X. - M. Zhao, G. M. Whitesides: Patterning Thin Films of Poly(ethylene imine) an 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.

[0013] Bekannt ist die Synthese wasserlöslicher Copolymeren 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 Copolymeren, beispielsweise zur Strukturierung von Hydrogelen, findet keine Erwähnung.

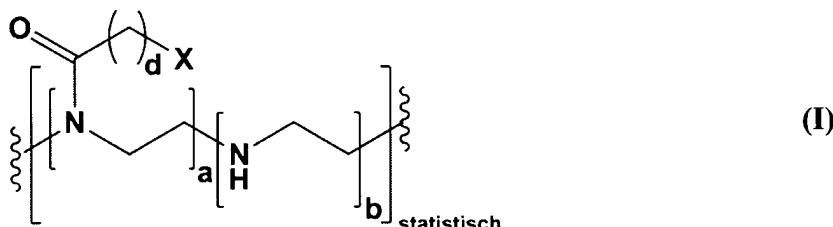
[0014] Es ist des Weiteren die partielle Hydrolyse von Poly(2-oxazolinen) bekannt (F. Wiesbrock, F. Stelzer, C. Slugovic, N. Noormofidi, V. Kaltenhauser, E. Kreutzwiesner, K. Rametsteiner: Use of contact biocides based on poly(2-substituted) oxazolines, *WO 2012/149591*). Die Synthese eines Mehrfachbindungs-enthaltenden Copolymers auf diesem Reaktionsweg ist nicht möglich. Eine Hydrolyse führt zur Zerstörung der Mehrfachbindungs-funktionalität unter den benötigten Bedingungen.

[0015] Der Erfundung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, neue Poly(ethylenimin)-basierte Copolymeren 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.

[0016] Beispielsweise sollen Hydrogele aus den Poly(ethylenimin) basierten Copolymeren mit hoher Bindungsaffinität zu DNA/RNA darstellbar sein.

[0017] Gelöst wird diese Aufgabe durch neue Poly(ethylenimin) basierte Copolymeren zur Anbindung und Freisetzung von genetischem Material, insbesondere DNA/RNA, bestehend aus Ethylenimin- und 2-Oxazolineinheiten, die eine Verbindung der allgemeiner Formel I aufweisen:



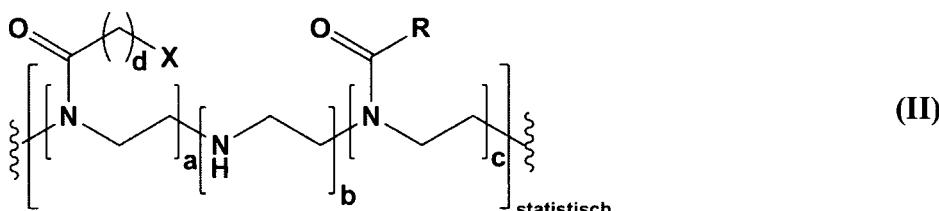
mit:

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 Dreifachbindung) Copolymer-Kettenlänge zwischen 2 und 1000000 Einheiten

[0018] Dabei ist es vorteilhaft, wenn diese neuen Poly(ethylenimin) basierten Copolymeren jeweils unterschiedliche Oxazolineinheiten gemäß der allgemeinen Formel II 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)

R: H- oder organischer Rest (z. B. Alkyl- und Aryl-Rest), Copolymer-Kettenlänge zwischen 2 und 1000000 Einheiten

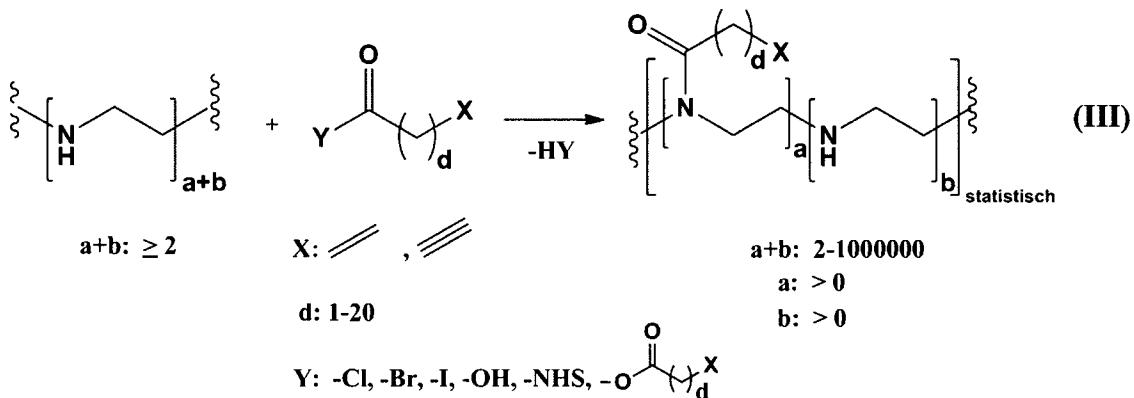
[0019] Die Zusammensetzung der maßgeschneiderten Copolymeren kann auf einfache und schnelle Weise mit Hilfe der Kernspinresonanzspektroskopie bestimmt werden. Die Struktur der erfundungsgemäßen Copolymeren ermöglicht Mehrfachbindungen im Copolymerrücken und schafft damit Voraussetzungen für Funktionalitäten, ohne 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 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 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.

[0020] In den Unteransprüchen sind spezielle Verwendungen der vorgeschlagenen Copolymeren aufgrund deren vorbeschriebenen Funktionalitäten aufgeführt. Die Copolymeren können beispielsweise auf funktionalisier-

ten 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 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 Copolymeren zu solchen Hydrogelen vernetzt werden. Ein entscheidender Nachteil von solchen Polymernetzwerken ist die Eigenschaft ihrer absoluten Unlöslichkeit in jeglichen Lösungsmitteln. Daher ist eine Bestimmung des definierten PEI-Gehaltes in der Gelstruktur über (Lösungs-)Kernspinresonanzspektroskopie (wie für die Copolymeren) 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.

[0021] Die einfache und schnelle Durchführung beispielsweise der Thiol-en Photoaddition durch Bestrahlung der Probe mit UV-Licht (365 nm) führt außerdem zur Möglichkeit, maßgeschneiderte Hydrogelbeads *in situ* herzustellen. Auch hier kann die gezielte Anbindung und Freisetzung von genetischem Material stattfinden.

[0022] Dargestellt werden die neuen Poly(ethylenimin) basierten Copolymeren erfindungsgemäß durch eine Synthese der allgemeinen Formel III:



[0023] Vorteilhaft ist, wenn im Fall von -OH oder -NHS als Säure die Funktionalisierung in Gegenwart eines Aktivierungsreagens, insbesondere EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) oder DCC (Dicyclohexylcarbodiimid) eingeführt wird.

[0024] Die funktionelle Seitenkette kann aber auch über eine nachträgliche Funktionalisierung mittels ungesättigter Säureanhydride oder -halogenide (-Cl, -Br, -I) eingeführt werden.

[0025] Die erfindungsgemäßen Copolymeren 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).

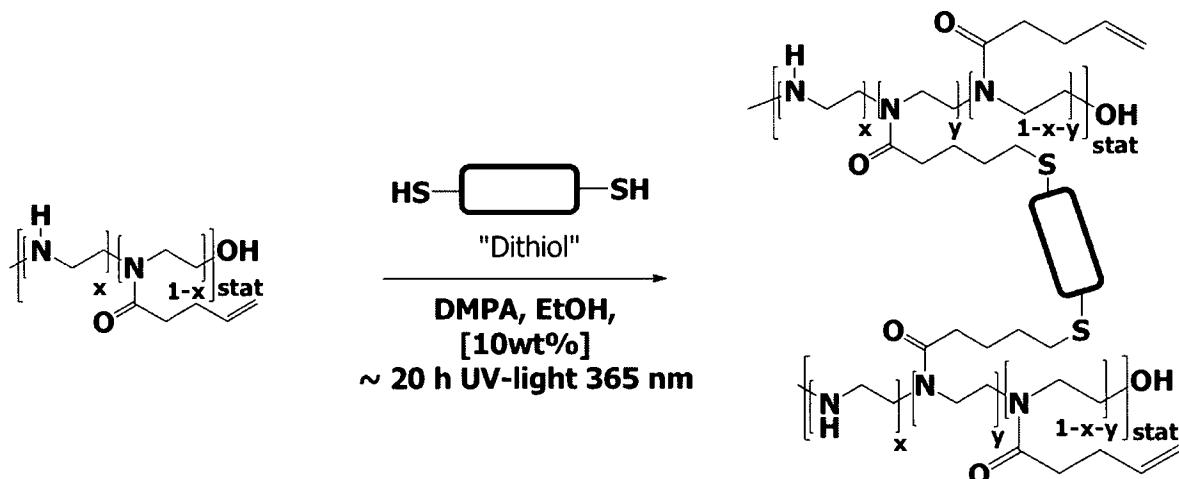
[0026] Das Syntheseverfahren erlaubt eine aufwandgeringe und verfahrenstechnisch einfache Durchführung, die sowohl im kleinen Maßstab als auch im Hochdurchsatzverfahren möglich ist. Die Herstellung von maßgeschneiderten Copolymeren führt zu Substanzen mit exakt definierten Zusammensetzungen, die je nach Anwendungszweck variiert werden können. Ihre exakte Zusammensetzung kann auf einfache und schnelle Weise mittels Kernspinresonanzspektroskopie bestimmt werden. Dadurch können über einfache Variation der Ausgangsstoffmengen umfangreiche Bibliotheken von Copolymeren unterschiedlichster Zusammensetzung erstellt werden.

[0027] Die Erfindung soll nachstehend anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Beispiel 1:

[0028] Synthese von Hydrogelen mit exakt einstellbarem PEI-Anteil (zur späteren Anbindung und Freisetzung von genetischer Herings-DNA), wobei die Vernetzung der Copolymeren 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.

[0029] Die nachstehende Formel zeigt die schematische Darstellung der Thiol-en Photoaddition von P(ButEnOx-co-El) mit 2,2'-(Ethylenedioxy)diethanethiol in Anwesenheit des Katalysators DMPA unter UV-Licht (365 nm).



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

[0030] In einem Mikrowellenvial wurde das Copolymer P(ButEnOx-co-El) in Ethanol gelöst. In einem zweiten Vial erfolgte die Lösung des Photoinitiators 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon und des bifunktionellen Thiols, 2,2'-(Ethylenedioxy)diethanethiol, ebenfalls in Ethanol (0.9:1.0 Thiol:Doppelbindung). Die kombinierten, klaren Lösungen (10 wt%) wurden 30 Minuten mit Stickstoff entgast und 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.

[0031] 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 -/ ^{13}C -NMR, SEM).

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

[0032] 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.

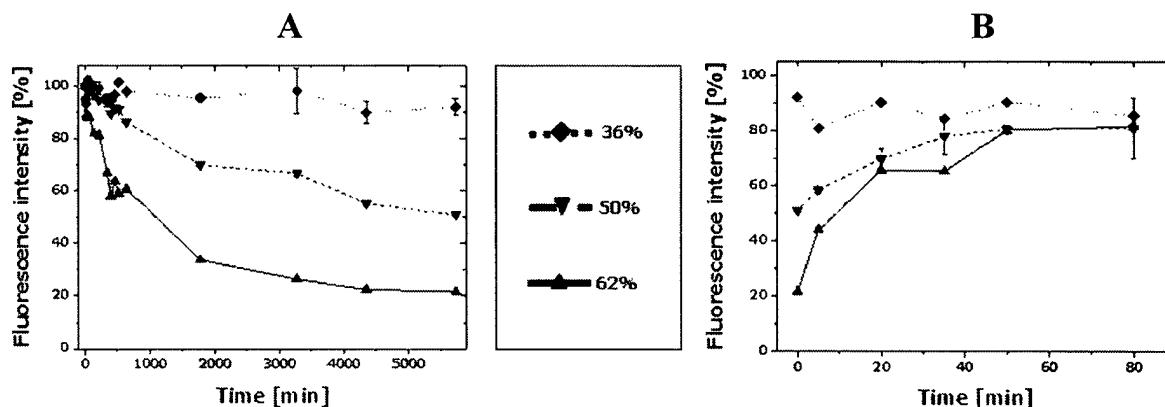


Diagramm 1: Schematische Darstellung der Bindung (A) und Freisetzung (B) von genomicscher Herings-DNA von Hydrogelen mit unterschiedlichem PEI-Gehalt mittels EB-Tests Ergebnisse:

[0033] 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 Eindungs- und Freisetzungskapazität ist abhängig vom PEI-Anteil innerhalb der Hydrogelstruktur. Zur gezielten Freisetzung ist neben einer Temperaturhöhung auch die Anwesenheit von Heparin nötig. Dabei kann innerhalb kürzester Zeit (< 60 min) die DNA nahezu vollständig wieder freigesetzt werden.

Beispiel 2:

[0034] Formulierung von Hydrogelbeads über eine Thiol-en Photoaddition analog einer Suspensionspolymerisation.

[0035] 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-El)-basierte Hydrogelbeads:

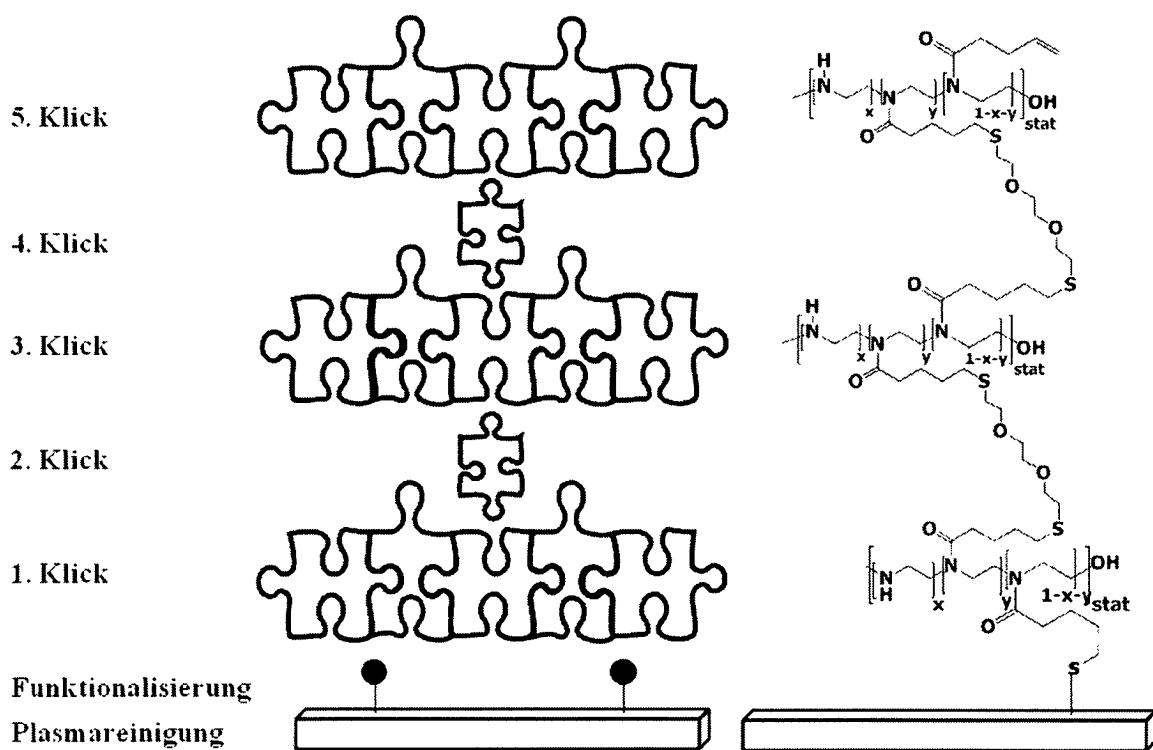
[0036] Als Ausgangsstoff diente das Copolymer P(ButEnOx-co-El_{50%}). Dieses Copolymer und eine entsprechende Menge des Katalysators DMPA wurden in Ethanol gelöst (8 wt%) und anschließend mit dem Dithiol 2, 2'-(Ethylenedioxy)diethanethiol versetzt. Durch das Hinzufügen von Paraffinöl und dem Stabilisator Span®80 konnte ein Zweiphasengemisch erzeugt werden. Nach 25 min Ausgasen mit N₂ erfolgte 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.

Beispiel 3:

[0037] Anlagerung von Monoschichten an funktionalisierte Glasoberflächen über eine Thiol-en Photoaddition und die schrittweise Erzeugung von kovalent gebundenen Hydrogelschichten.

[0038] Mit der kovalenten Anbindung der vorgeschlagenen neuen Copolymere an thiol-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, von beschichteten Oberflächen soll beispielsweise in der mobilen Analytik (Chip-Diagnostik) zum Einsatz kommen.

[0039] In einem konischen Mikrowellenvial wurde das Copolymer P(ButEnOx-co-El_{50%}) zusammen mit dem Photoinitiator 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon in Ethanol gelöst. Ein zuvor im Plasmaofen ausgeheiztes und mit 3-(Trimethoxysilyl)-1-propanethiol funktionalisiertes 1 × 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 ent gast 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 2. Klick durch Zugabe des Vernetzers 2,2'-(Ethylenedioxy)diethanethiol anstatt des Copolymers. Erneut wurden die genannten Waschschritte 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 werden, wobei auch weitaus mehr Schichten möglich sind.



Übersicht 1: Chemischer Hintergrund der Beschichtung

[0040] Die erfolgreiche Beschichtung der Glasoberflächen konnte mittels 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 bestimmt werden. Außerdem konnte eine erfolgreiche Anbindung mit Hilfe der Infrarotspektroskopie gezeigt werden.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

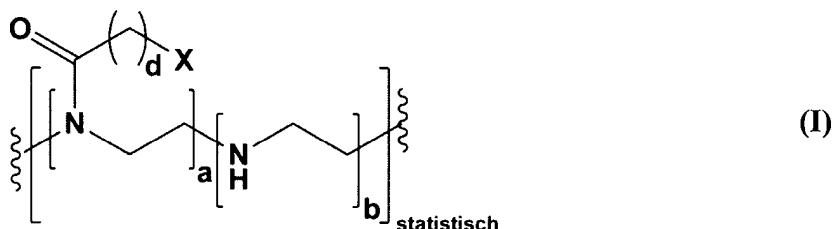
- WO 2009/102952 A2 [0007]
- WO 2007/084797 [0011]
- WO 2011/162366 A1 [0013]
- WO 2012/149591 [0014]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- A. Gress, A. Völkel, H. Schlaad; Thio-click modification of poly[2-(3-butenyl)-2-oxazoline] Macromolecules 40, 2007, 7928–7933 [0002]
- H. Tian, F. Li, J. Chen, Y. Huang, X. Chen: N-Isopropylacrylamide-Modified Polyethylenimines as Effective Gene Carriers, Macromolecular. Bioscience 12, 2012, 1680–1688 [0003]
- D. Sehgal, I. K. Vijay: A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation, Anal. Biochem. 218, 1994, 87–91 [0004]
- A. M. Doody, J. N. Korley, K. P. Dang, P. N. Zawaneh, D. Putnam: Characterizing the structure/function parameter space of hydrocarbonconjugated branched polyethylenimine for DNA delivery in vitro, J. Control. Release 116, 2006, 227–237 [0006]
- S. Nimesh, A. Aggarwal, P. Kumar, Y. Singh, K. C. Gupta, R. Chandra: Influence of acyl chain length an transfection mediated by acylated PEI nanoparticles, I. J. Pharm. 337, 2007, 265–274 [0006]
- Y. Chujo, Y. Yoshifiji, K. Sada, T. Saegusa: A Novel Nonionic Hydrogel from 2-Methyl-2-oxazoline, Macromolecules 22, 1989, 1074–1077 [0008]
- M. Thomas, A. M. Klibanov: Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells, PNAS 99, 2002, 14640–14645 [0009]
- M. L. Forrest, G. E. Meister, J. T. Koerber, D. W. Packl: Partial Acetylation of Polyethylenimine Enhances In Vitro Gene Delivery, Pharm. Res. 21, 2004, 365–371 [0010]
- L. Van, W. T. S. Huck, X. -M. Zhao, G. M. Whitesides: Patterning Thin Films of Poly(ethylene imine) an a Reactive SAM Using Microcontact Printing, Langmuir 15, 1999, 1208–1214 [0012]
- T. R. Dargaville et al.: Poly(2-oxazoline) hydrogel monoliths via thiol-ene coupling, Macromol. Rapid Commun. 33, 2012, 1695–700 [0028]

Patentansprüche

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



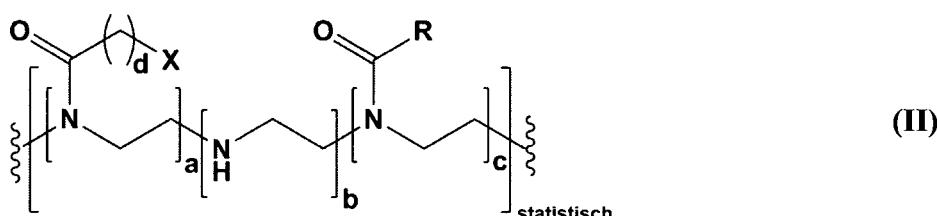
mit:

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

d: Länge der Seitenkette (1 bis 20)

X: funktionelle Gruppe der 2-Oxazolineeinheit (über Doppel- oder Dreifachbindung) Copolymer-Kettenlänge zwischen 2 und 1000000 Einheiten

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



mit:

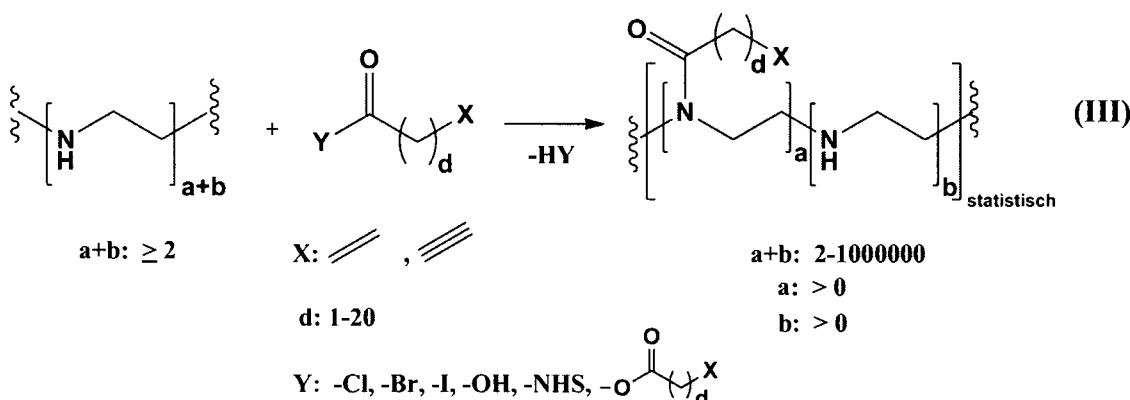
a, b, c: Anteil der jeweiligen Monomereinheiten ($a, b, c > 0$)

d: Länge der Seitenkette (1 bis 20)

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

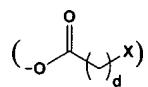
R: H- oder organischer Rest (z. B. Alkyl- und Aryl-Rest), Copolymer-Kettenlänge zwischen 2 und 1000000 Einheiten

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 -OH oder -NHS als Säure die Funktionalisierung in Gegenwart eines Aktivierungsreagens, insbesondere EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid) oder DCC (Dicyclohexylcarbodiimid) eingeführt wird.

5. Verfahren gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die funktionelle Seitenkette über eine nachträgliche Funktionalisierung mittels ungesättigter Säureanhydride



oder -halogenide (-Cl, -Br, -I) eingeführt wird.

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

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

Es folgen keine Zeichnungen