(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
A61K 47/48
C12N 15/8

(45) 공고일자 2003년08월02일
(11) 등록번호 10-0357839
(24) 등록일자 2002년10월09일

(21) 출원번호	10-1995-0704928	(65) 공개번호	특1996-0703342
(22) 출원일자	1995년11월07일	(43) 공개일자	1996년08월17일
번역문제출일자	1995년11월07일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1995/03045	(87) 국제공개번호	WO 1995/24221
(86) 국제출원일자	1995년03월07일	(87) 국제공개일자	1995년09월14일
(81) 지정국	국내특허 : 오스트레일리아 브라질 캐나다 체코 헝가리 일본 대한민국 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 슬로바키아 우크라이나 미국 중국 에스토니아 그루지야 리투아니아 라트비아 멕시코 슬로베니아 EA 유라시아특허 : 러시아 EP 유럽특허 : 핀랜드 포르투칼		

(30) 우선권주장 08/207494 1994년03월07일 미국(US)
08/316536 1994년09월30일 미국(US)

(73) 특허권자 더 다우 케미칼 캄파니
미국 미시간주 미드랜드시더 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 미시간
미국 미시간주 48109-1280 앤 아버 사우스 스테이트 스트리트 3003

(72) 발명자 토말리아,도날드에이.
미합중국미시간48640미들랜드웨스트치페와리버로드463
베이커,제임스알.
미합중국미시간48109앤아보어홀든드라이브3997
비엘린스카,아나유.
미합중국미시간48198입실란티골든레인1652
브라더즈,허버트엠.II세
미합중국미시간48640미들랜드웨스트애쉬비260
쳉,로버타씨.
미합중국미시간48642미들랜드올드파인트레일3873
파지오,마이클제이.
미합중국미시간48640미들랜드포레스트뷰스트리트4617
헤드스트랜드,데이비드엠.
미합중국미시간48642미들랜드웨스트치페와리버로드506
죤슨,제니퍼에이.
미합중국미시간48154리보니아린던35737
카플란,마고리
미합중국캘리포니아90292마리나델레이1/2플리트스트리트109
클라캠프,스코트엘.

미합중국펜실바니아16345러셀박스2681알디2
크루퍼,윌리암제이.쥬니어
미합중국미시간48657샌포드바든로드230
쿠코우스카-라탈로,욜란타
미합중국미시간48105앤아보르힐사이드코트4449
맥슨,바틀리디.
미합중국미시간48880세인트루이스기딩스플레이스226
피엘러,라스티.
미합중국미시간48640미들랜드노쓰사지노로드4512아파트먼트1218
톰린슨,이안에이.
미합중국미시간48642미들랜드버치필드드라이브3316
윌슨,레리알.

미합중국미시간48612베버튼사우쓰마틴로드5267
인,뤼
미합중국미시간48858마운트플레젠트사우쓰워싱톤코트1601아파트먼트피15
(74) 대리인 김창세, 장성구

심사관 : 휴-윤경애

(54) 생체활성및/또는표적화된덴드리머콘쥬게이트

명세서

<1> 발명의 분야

<2> 본 발명은 농업용, 약학용 및 기타 물질, 특히 생물활성이 있고/있거나 표적화된 물질의 담체로서 조밀 별형 중합체(dense star polymer)의 용도에 관한 것이다. 또한 생물반응 개질제의 담체로서, 표적화될 수 있는 가지형 중합체도 포함된다.

<3> 발명의 배경

<4> 최근에, 조밀 별형 중합체 또는 스타버스트™ (STARBURST) 중합체(덴트리테크 인코포레이티드(Dendritech Inc.)의 상표명)로 불리는 증합체가 개발되었다. 이들 조밀 별형 중합체의 크기, 형태 및 특성은 특정한 최종 용도를 만족시키기 위하여 분자적으로 변형될 수 있는 것으로 알려졌다. 조밀 별형 중합체는 중합체 단위당 고농도의 운반 물질의 전달, 조절된 전달, 표적화된 전달 및/또는 다중 전달을 위한 수단 또는 용도를 제공할 수 있다는 중요한 이점을 갖는다.

<5> 발명의 개요

<6> 본 발명은, 원하는 물질과 회합된 조밀 별형 중합체를 포함하는 중합체 콘쥬게이트화 물질(이후부터는 이들 중합체 콘쥬게이트를 종종 "조밀 별형 중합체 콘쥬게이트" 또는 "조밀 별형 콘쥬게이트" 또는 "콘쥬게이트"로 칭함), 이들 콘쥬게이트를 제조하는 방법, 이들 콘쥬게이트를 함유하는 조성물, 그리고 이들 콘쥬게이트 및 조성물을 사용하는 방법에 관한 것이다.

<7> 하나 이상의 표적 지향제(target director)및 한 단위 이상의 운반 물질과 회합된 조밀 별형 중합체도 또한 포함된다. 이러한 콘쥬게이트는 목적하는 용도(예컨대, 약학 또는 농업 용도)를 위해 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 배합될 수 있다.

<8> 본 발명의 콘쥬게이트는 특수한 전달이 요구되는 다양한 용도로 사용하기에 적합하며, 생물활성 약제를 전달시키기에 특히 적당하다. 본 발명의 바람직한 태양에서, 조밀 별형 콘쥬게이트는 하나 이상의 생물활성 약제와 회합된 하나 이상의 조밀 별형 중합체로 구성된다.

<9> 본 발명의 하나의 양상에서 조밀 별형 중합체 콘쥬게이트는, 하나 이상의 운반되는 생물활성 약제 한 단위 이상과 회합된 조밀 별형 중합체를 하나 이상 함유하며, 운반되는 생물활성 약제(예컨대, 생물반응 개질제)를 전달하는 데 사용되는데, 이 중합체는 (a) 개시 코어, (b) 대칭적 분지 연결을 갖는 두 개 이상의 동심의 가지형 층('세대')(이들 층은 코어 분지로부터 기하학적으로 진전하는 방식으로 방사상 연장됨으로써, 말단 기 대 코어 분지(들)의 비는 4:1 이상임), 및 (c) 말단 작용성 외부표면을 갖는다. 이들 조밀 별형 중합체는 다른 방법으로는 하기를 함유하는 가지형 중합체 콘쥬게이트로서 정의된다:

<10> (i) (a) 개시 코어, (b) 개시 코어에 연결된, 방사 대칭의 반복 단위로 구성되는 3세대 이상의 내부 층, 및 (c) 최외부 세대에 연결된 말단 작용성 원자 또는 원자단(말단 작용기)으로 구성되는 외부표면을 갖는 가지형 중합체, 및

<11> (ii) 상기 가지형 중합체와 밀접하게 회합된 하나 이상의 운반되는 생물 활성 물질.

<12> 이들 조밀 별형 중합체는 또 다른 방법으로는 가지형 중합체(i)가, 하나 이상의 원자가 또는 작용기를 복수개 갖는 코어(C)를 함유하는 하기 일반식(1)의 규칙적인 분지 구조를 갖는, 가지형 중합체의 부류로서 정의되는데; 여기에서, 상기 코어(C)의 하나 이상의 원자가는 (A)기를 통하여 (B)기에 결합되고, 상기 (B)기는 (A)기에 결합된 후, 둘 이상의 작용기(r_1, r_2 등)를 가지며, 상기 (A)기와 상기 (B)기의 결합에 의해 형성된 단위(AB)는 분지를 구성하고, 상기 분지(AB)는 3 이상의 원하는 세대수(G)로 반복되며, 각 최종 분지(AB) 중 (B)기의 작용기는 2개 이상(r_G)의 원자 또는 원자단(X)에 의해 차단된다.

$$C[AB(AB(AB....(AB(ABXr_G)r_{G-1})r_{G-2}....)r_2)r_1]_s \qquad (1)$$

<14> 상기 식에서,

<15> $r_1, r_2....r_{G-1}$ 및 r_G의 각 아래첨자 수 1, 2....G-1 및 G는 제 1 세대(즉, G가 1임)로서 코어(C)에 결합된 제 1 분지 또는 분지들(AB)을 계수한, 증가되는 분지(AB)의 각 세대 수를 나타내고, $r_1, r_2....$ 및 r_G는 각각 상응하는 세대의 분지(AB)중 (B)기의, 다음 세대의 다른 분지(AB)중 (A)기와 결합할 수 있는 작용기 수를 나타내며,

<16> s는 1 이상의 정수이지만, 코어(C)의 원자가 또는 작용기 수 이하이고, (A) 및 (B)기는 각각 각 세대에 있어서 동일하거나 또는 상이할 수 있으며,

<17> X는 최종 분지(AB)의 작용기(B)의 작용성을 차단하는 원자 또는 원자단을 나타내고, 동일하거나 또는 상이할 수 있다.

<18> 본 발명의 바람직한 콘쥬게이트는, 조밀 별형 중합체 콘쥬게이트가 하나 이상의 생물반응 개질제 한 단위 이상과 회합된 조밀 별형 중합체 하나 이상을 포함하는 콘쥬게이트를 포함한다. 이들 생물반응

개질제의 몇몇 예는 인터루킨, 인터페론, 종양 괴사 인자, 과립세포 콜로니 자극 인자, 바이러스, 바이러스 단편 및 다른 유전물질이다. 본원에 사용된 "유전물질"이란 용어는 뉴클레오티드계 물질을 말하며, 바이러스 및 바이러스 단편, 플라스미드, 파아지, 코스미드, 유전자 및 유전자 단편(즉, 엑손, 인트론), 단일쇄 및 이중쇄 데옥시리보핵산(DNA), 리보핵산(RNA), 리보솜 RNA(rRNA), 촉매 RNA(cRNA), 소핵 RNA(snRNA), 메신저 RNA (mRNA), 트랜스퍼 RNA(tRNA), DNA 및 RNA 올리고뉴클레오티드(단일쇄 및 이중쇄) 또는 올리고머 및 (안티-쎈스(anti-sense)) 올리고뉴클레오티드, 단백질 핵산(PNA), 및 치환된 핵산 올리고뉴클레오티드가 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. 유전물질 특히 바이러스 및 바이러스 단편은 몇몇 단백질과 착체화되거나 또는 커플링될 수 있다. 유전물질이라는 용어에는 또한 이하에 더욱 자세하게 기술되는 "개질된 뉴클레오티드"가 포함된다.

<19> 조밀 별형 콘쥬게이트는 조밀 별형 중합체의 유리한 특성으로 인하여 당해 분야에 공지된 다른 담체에 비하여 상당한 이점을 제공한다. 조밀 별형 중합체는 특정 유형의 가지형 중합체이다. 그러나, 본 발명의 광범위한 양상에서, 생물반응 개질제(특히, 유전물질)가 운반물질인 경우, 다른 유형의 가지형 중합체가 사용될 수 있다.

<20> "가지형 중합체"는 코어에 또는 코어로부터 분지 층이 연속적으로 또는 세대적으로 첨가됨으로써 형성되는, 규칙적인 가지형 분지를 나타내는 중합체이다. 가지형 중합체라는 용어는 코어, 하나 이상의 내부 분지 층, 및 표면 분지 층으로 특징지을 수 있는 "덴드리머(dendrimers)"를 포함한다(드보닉(Petar R. Dvornic) 및 토말리아(Donald A. Tomalia)의 문헌[Chem. in Britain, 641-645, 1994년 8월]을 참조). "덴드론(Dendron)"은 덴드리머를 형성하기 위하여 직접 또는 연결 잔기를 통하여 코어에 결합되거나 또는 결합될 수 있는 초점으로부터 떨어나온 분지를 갖는 덴드리머의 일종이다. 많은 덴드리머는 공동의 코어에 연결된 둘 이상의 덴드론을 포함한다. 그러나, 덴드리머란 용어는 넓게 사용되어 1개의 덴드론도 포함한다.

<21> 가지형 중합체는 대칭 및 비대칭 분지 덴드리머, 다단계(cascade) 분자, 아보롤(arborol) 등을 포함하지만, 이에 한정되지는 않으며, 가장 바람직한 가지형 중합체는 조밀 별형 중합체이다. 본원에 개시된, PAMAM 조밀 별형 덴드리머는 분지부의 길이가 같다는 점에서 대칭적이다. 분지는 선행 세대 분지의 말단 $-NH_2$ 기의 수소 원자에서 일어난다. 리신계 덴드리머는 분지부의 길이가 상이하다는 점에서 비대칭적이다. 한 분지는 리신 분자의 엡실론(epsilon) 질소에서 생기는 한편, 다른 분지는 선행 세대 분지에 분지를 결합시키는 반응성 카복시기에 인접한 알파 질소에서 생긴다.

<22> 고분지된 중합체, 예컨대 고분지된 폴리올은, 분지 층의 규칙적인 연속 첨가에 의해 형성되지는 않는다하더라도, 분지 패턴이 덴드리머의 경우에 근접하는 규칙도를 나타내는 가지형 중합체와 동등할 수 있다.

<23> 조밀 별형 중합체는 방사상 대칭성을 갖는(즉, 분지점에서), 규칙적인 가지형 분지로 특징지어지는 분자 구조를 나타낸다. 이들 방사상으로 대칭적인 분자는 "조밀 별형 구조(topology)"를 갖는 것으로 언급된다. 이들 중합체는 개시 코어 주위에 동심의 가지형 층을 제공할 수 있는 방식으로 제조된다. 조밀 별형 구조는 개시 코어 주위의 동심의 가지형 층에 유기 반복 단위가 순서대로 집합함으로써 이루어지며; 이는 다수의 분자 세대를 통하여 기하학적으로 진전하는 방식으로 중복성 및 자기-복제성(각 층내에)을 도입함으로써 이루어진다. 생성되는 고도의 작용화된 분자를 이들의 분지(나무와 같은) 구조 및 올리고머 특성에 따라 "덴드리머"로 칭하였다. 따라서, 조밀 별형 올리고머 및 조밀 별형 덴드리머 및 스타버스트™ 덴드리머라는 용어는 조밀 별형 중합체 또는 스타버스트™ 중합체라는 용어내에 포함된다.

<24> 크기 및 형태가 조절된 영역을 갖는 구조적 중합체는 반응성 말단기를 통하여 서로 회합되는(예컨대, 공유적으로 가교되거나 또는 이하에 정의되는 다른 회합을 통하여), 조밀 별형 "가교 덴드리머(bridged dendrimer)"로 불리는 덴드리머이다. 가교 덴드리머라는 용어는 또한 "조밀 별형 중합체" 또는 스타버스트™ 중합체라는 용어에 포함된다. 둘 이상의 조밀 별형 덴드리머가 서로 회합하는 경우. 이들을 "조밀 별형 회합물" 또는 "스타버스트™ 화합물"로 부르며, 역시 "조밀 별형 중합체" 또는 스타버스트™ 중합체라는 용어에 포함된다.

<25> 그러므로, 가지형 중합체는 가교 덴드리머 및 덴드리머 회합물을 포함한다. 가지형 중합체는 덴드리머의 세대적 단분산성 및 세대적 다분산성 용액 둘 다를 포함한다. 단분산성 용액 중 덴드리머는 실질적으로 모두 동일한 세대이며, 따라서 크기 및 형태가 균일하다. 다분산성 용액내의 덴드리머는 상이한 세대의 덴드리머의 분포를 포함한다.

<26> 가지형 중합체는 또한 표면이 개질된 덴드리머를 포함한다. 예를 들어. PAMAM 덴드리머의 표면은 아미노산(예컨대, 리신 또는 아르기닌)의 첨가에 의해 개질될 수 있다.

<27> 특정한 유형의 가지형 중합체를 "중합체", 예컨대 "조밀 별형 중합체", "비대칭 가지형 중합체", "다단계 중합체"로 부르는 것 또한 상기 유형의 가교 덴드리머, 상기 유형의 덴드리머 회합물, 상기 유형의 다분산성 덴드리머, 및 상기 유형의 표면개질된 덴드리머를 포함하는 의도인 것으로 이해되어야 한다.

<28> 생물반응 개질제의 가지형 중합체 콘쥬게이트는 광범위한 치료 및 진단 용도로서 유용하다. 예를 들어, 유전물질을 포함하는 생물반응 개질제의 가지형 중합체 콘쥬게이트는 유전자 치료법, 분석, 개질, 활성화, 안티-쎈스 용도 등의 분야에 넓은 응용성을 가지며; 단백질과 같은 비유전물질(예컨대, 인터루킨, 인터페론, 종양 괴사 인자, 과립세포 콜로니 자극 인자 및 기타 단백질)을 포함하는 생물반응 개질제의 가지형 중합체 콘쥬게이트는 치료제(예컨대, 항바이러스 약제)및 진단 약제로서 유용하다.

<29> 따라서, 가지형 중합체와 유전물질의 착체를 포함하는, 임의적으로는 DEAE-덱스트란 용액 내의 조성물; 및 제2 가지형 중합체를 함유하는 용액 내에 넣은, 제1 가지형 중합체 및 유전물질의 착체(제2 가지형 중합체가 제1 가지형 중합체보다 크다)를 포함하는 조성물이 포함된다.

<30> 본 발명에는 또한 이들 콘쥬게이트를 제조하는 방법이 포함된다. 예를 들어, 가지형 중합체 및 생물반응 개질제의 콘쥬게이트를 제조하는 방법은, 생물반응 개질제와 가지형 중합체의 회합을 용이하게 하는 온도의 적절한 용매중에서, 가지형 중합체를 생물반응 개질제와 반응시키는 것을 포함한다. 생물반

응 개질제가 유전물질이라면, 착체는 (1) 상기 유전물질과 상기 가지형 중합체의 착체화를 용이하게 하는 온도의 적절한 용매 중에서 상기 가지형 중합체와 상기 유전물질을 반응시키거나(상기 방법은 임의적으로 상기 착체를 DEAE-덱스트란의 용액중에 넣는 것을 포함함); 또는 (2) 유전물질과 제1 가지형 중합체의 회합을 용이하게 하는 온도의 적절한 용매중에서, 중합체를 유전물질과 반응시킴으로써 유전물질을 제1 가지형 중합체와 착체화시킨 후, 상기 착체를, 상기 제1 가지형 중합체보다 큰 제2 가지형 중합체를 함유하는 용액에 넣음으로써 제조한다. 보다 구체적으로는 상기 방법 (1)에 있어서는, 약 5 내지 10의 pH, 20 내지 40℃의 온도에서, 원하는 농도에 따라, 1㎖ 또는 20㎕ 유전물질 1 내지 10㎍을 충분한 가지형 중합체와 반응시켜, 전하비 약 3:1 내지 약 1:10,000의 유전물질:가지형 중합체 착체를 얻는다. 하기에서, 이들 방법에 대해 더욱 완전하게 논의한다.

<31> 이들 콘쥬게이트의 사용 방법은 가지형 중합체와 유전물질의 착체를 제공하고 상기 착체를 형질감염(transfection)시킬 세포에 이용가능하게 만드는 것을 포함하는, 유전물질의 세포 형질감염 및 생체내이용을 포함한다. 착체화는 유전물질을 안정화 및 축소(contract)시키고, 세포로의 이동 및 형질감염되는 동안 유전물질이 분해되는 것을 방지하며, 세포막을 통해 세포내(세포핵내를 포함하여)로 유전물질이 수송되는 것을 용이하게 한다.

<32> 또한, 본 발명의 방법은, 유전물질을 가지형 중합체와 착체화 시킨 후, 상기 착체를 형질감염시킬 세포에 이용가능하게 만드는 것을 포함하는 세포막을 통해 세포핵내로 유전물질을 수송하는 단계; 상기 유전물질을 분해 효소에 노출시키기 전에 상기 유전물질을 가지형 중합체와 착체화시키는 것을 포함하는, 세포로의 이동 및 형질감염시키는 동안 유전물질이 분해되지 않도록 보호하는 단계; 및 상기 유전물질을 가지형 중합체와 착체화시키는 것을 포함하는, 유전물질을 안정화 및 축소하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

<33> 도면에 대한 하기 설명으로써 본 발명의 이해를 돕는다.

<34> 제 1 도는 조밀 별형 덴드리머의 여러 세대를 도시한다.

<35> 제 2(A) 도는 비대칭(불균등) 분지점를 갖는 덴드리머를 도시한다.

<36> 제 2(B) 도는 대칭(균등) 분지점을 갖는 덴드리머를 도시한다.

<37> 제 3 도는 항체 크기(A)와 비교하여 여러 덴드리머류의 크기 [(B)의 I, II, III형]를 도시한다.

<38> 제 4 도는 여러 덴드리머 세대에 도입된 아스피린의 탄소-13 회전격자 완화시간(T_1)을 나타낸다(실시예 1). 세로측은 시간(초)이며, 가로축은 첨가된 PAMAM 조밀 별형 덴드리머의 세대이다.

<39> 제 5 도는 실시예 2의 역학적 분석의 결과를 나타낸다. 세로축은 수용체 상 중의 약제 백분율(%)이고, 가로축은 시간(시)이다.

<40> 제 6 도는 실시예 2에서 6.5세대 덴드리머가 pH 9.5에서 슈도에페드린의 투석율에 미치는 영향을 나타낸다. 세로축은 수용체 구획 중의 약제 백분율(%)이고, 가로축은 시간(시)이다.

<41> 제 7 도는 실시예 3에서 덴드리머 가수분해가 슈도에페드린의 투과성에 미치는 효과를 나타낸다. 세로축은 수용체 구획 중의 약제 백분율(%)이고, 가로축은 시간(시)이다.

<42> 제 8 도는 조밀 별형 중합체(세대=4.0)의 존재하에 pH 5.0 및 6.65에서 수용체 구획내로 방출되는 살리실산의 백분율과 살리실산 대조군을 비교한 것이다(실시예 4). 세로축은 수용체 구획 중의 약제 백분율(%)이고, 가로축은 시간(시)이다.

<43> 제 9 도는 pH 8.0에서 수용체 구획내에 조밀 별형 중합체(세대=4.0)를 가지는 공여체 구획으로부터 손실된 살리실산의 백분율과 살리실산 대조군을 비교한 것이다. 세로축은 공여체 구획 중의 약제 백분율(%)이고, 가로축은 시간(시)이다.

<44> 제 10 도는 조밀 별형 중합체(세대=4.5)의 존재하에 공여체 구획으로부터 손실되는 살리실산의 백분율을 살리실산 대조군과 비교한 것이다(실시예 4). 세축축은 공여체 구획 중의 약제 백분율(%)이고, 가로축은 시간(시)이다.

<45> 제 11 도는 여러 덴드리머 세대내로 혼입된 2,4-D의 탄소-13 회전격자 완화시간(T_1)을 나타낸다(실시예 15). 세로축은 시간(초)이고, 가로축은 첨가된 PAMAM 조밀 별형 덴드리머의 세대이다.

<46> 제 12 도는 형질감염 후의 루시페라제(luciferase) 활성을 검사함으로써, 상이한 DNA:덴드리머 전하비에서의 덴드리머의 DNA 형질감염 능력을 비교한 막대그래프이다(실시예 44). 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이고, 가로축상의 숫자는 표 XV에 기재된, 대조군 및 상이한 DNA 대 덴드리머 전하비에서의 상이한 덴드리머와 DNA 착체의 샘플번호(실시예 44에 설명되어 있음)이다.

<47> 제 13 도는 제 12 도에서 사용한 것과 동일한 DNA:덴드리머 착체를 사용하여, 상이한 DNA:덴드리머 전하비에서의 덴드리머의 DNA 결합력을 비교하는 전기영동 겔이다(실시예 44).

<48> 제 14 도는 DNA:덴드리머 착체에 사용된 덴드리머의 세대에 대하여 대조군과 비교한 형질감염 증가율을 나타낸 그래프이다(실시예 45). 세로축은 덱스트란 대조군에 대한 형질감염 증가율이고, 가로축은 덴드리머 세대이다. 검은 동그라미는 암모니아(NH_3) 코어 덴드리머이고, 검은 사각형은 에틸렌디아민(EDA) 코어 덴드리머이다.

<49> 제 15 도는 에틸렌디아민(EDA) 코어 덴드리머에 관하여, DNA 덴드리머 착체에 다양한 덴드리머를 첨가하는 순서가 RAT2 세포에서의 형질감염 효율에 미치는 영향을 비교하는 막대그래프이다(실시예 46). 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이고, 가로축은 제2 덴드리머의 농도(μM)이다. 빈 막대는 DNA를 G9 덴드리머와 착체화시킨 후, G5 덴드리머를 첨가한 경우의 결과이다. 빗금친 막대는 DNA를 G5 덴드리머와 착

체화시킨 후, G9 덴드리머를 첨가한 경우의 결과이다.

<50> 제 16 도는 암모니아(NH_3)코어 덴드리머의 경우인 것을 제외하고 제 15 도와 동일한 정보를 나타낸다(실시예 46). 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이고, 가로축은 제2 덴드리머의 농도(μM)이다. 빈 막대는 DNA를 G9 덴드리머와 착체화한 후 G5 덴드리머를 첨가한 경우의 결과이다. 빗금친 막대는 DNA를 G5 덴드리머와 착체화한 후, G9 덴드리머를 첨가한 경우의 결과이다.

<51> 제 17 도는 다양한 조건하에 여러 DNA-덴드리머 콘쥬게이트 및 대조군으로 형질감염을 수행한 후의 광단위/㎍ 단백질을 나타낸다(실시예 42). 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이고, 가로축상의 숫자는 표 XIII에 기재된, 대조군 및 여러 DNA 대 덴드리머 비에 따른 상이한 DNA:덴드리머 착체의 샘플 번호이다.

<52> 제 18 도는 제 17 도와 유사하지만, 더욱 광범위한 범위의 덴드리머:DNA 비에 대한 데이타를 나타낸다(실시예 42). 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이고, 가로축상의 숫자는 표 XIV에 기재된, 대조군 및 여러 DNA 대 덴드리머 비에 따른 상이한 DNA:덴드리머 착체의 샘플 번호이다.

<53> 제 19 도는 덴드리머 A 내지 S에 있어서, 덴드리머:DNA 콘쥬게이트의 형질감염에 관한 상대적 광단위/㎍단백질의 막대그래프이다(실시예 42). 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이고, 가로축은 사용된 덴드리머 및 DNA:덴드리머 비(축의 각 눈금 내 1:2, 1:2, 1:10, 1:10, 1:20 및 1:20)이다.

<54> 제 20 도는 몇몇 암모니아(NH_3) 코어 덴드리머와 길이가 15 뉴클레오티드인 합성 단일쇄 DNA의 착체화 특성을 비교한 전기영동 겔이다(실시예 47).

<55> 제 21 도는 방사능표지되고 길이가 23 뉴클레오티드인 합성 이중쇄 올리고머의 단핵세포주 내로의 시간에 따른 흡수량을, DNA 단독의 형질감염, 8세대(G8) 암모니아(NH_3) 코어 덴드리머[즉, G8(NH_3)덴드리머]와 착체화된 DNA의 형질감염 및 나트륨 아지드 존재하의 DNA-덴드리머 착체의 형질감염을 비교하여 도시한다(실시예 47). 세로축은 흡수량(10^2cpm/10^4세포)이고, 가로축은 시간(시)이다. 검은 사각형은 길이가 23 뉴클레오티드인 합성 단일쇄 올리고머를 나타내고, 검은 동그라미는 DNA/G8(NH_3) 덴드리머를 나타내며; 검은 삼각형은 DNA/G8(NH_3) 덴드리머 + 나트륨 아지드를 나타낸다.

<56> 제 22 도는 덴드리머-DNA 착체(DNA의 일부는 선형이고, 일부는 환형 또는 초나선형임)에 대해 도시한 형질감염의 막대그래프이다(실시예 48). 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이고, 가로축은 덴드리머-DNA 착체이다. 빈 막대는 DEAE-덱스트란이 존재하지 않는 경우의 결과이다. 검은 막대는 0.5μM DEAE-덱스트란이 있는 경우의 결과이다.

<57> 제 23(A) 내지 (D) 도는 다양한 전하비 및 다양한 조건하에서 G8(NH_3) 덴드리머 및 G8(EDA) 덴드리머의 DNA 착체화 능력을 나타내는 4개의 전기영동 겔을 포함한다(실시예 49).

<58> 제 24 도는 다양한 몰비에서 G8(NH_3) 덴드리머와 G11(EDA) 덴드리머의 DNA 결합 특성을 비교하는 전기영동 겔이다(실시예 50).

<59> 제 25 도는 광범위한 pH 범위에 걸쳐 G8(NH_3) 덴드리머와 G8(EDA) 덴드리머의 DNA 결합 특성을 나타내는 전기영동 겔이다(실시예 51).

<60> 제 26(A) 및 (B) 도는 염화나트륨 농도가 증가하는 염 용액중에서의 DNA-덴드리머 결합 안정성을 나타내는 전기영동 겔이다(실시예 52).

<61> 제 27 도는 여러 제한효소의 존재하에 G8(NH_3) 덴드리머 및 G11(EDA) 덴드리머와 착체화된 DNA의 안정성 및 보호를 예시하는 전기영동 겔이다(실시예 53).

<62> 제 28 도는 세포 뉴클레에이즈(nucleases)의 존재하에 G8(EDA) 덴드리머와 착체화된 DNA의 안정성 및 보호를 예시하는 전기영동 겔이다(실시예 54).

<63> 제 29 도는 다양한 DNA:덴드리머 전하비 및 다양한 DNA 농도에서 덴드리머와 착체화된 DNA의 형질감염 정도를, 덱스트란의 디에틸아미노에틸 에테르(DEAE-덱스트란)의 존재하의 동일한 혼합물에 대하여 비교한다. DEAE-덱스트란의 부재하에 덴드리머 대신에 지질, 즉, 대체물질 리포펙틴™ (LIPOFECTIN)을 사용하여 형질감염시키는 예이다(실시예 55). 세로축은 플라스미드 대조군, 덱스트란 대조군, 및 1㎍, 5㎍ 및 10㎍의 다양한 플라스미드 DNA 착체이고, 가로축은 상대적 광단위/㎍단백질이다. 빗금친 막대는 덴드리머/DEAE-덱스트란 경우의 결과이다. 교차 빗금친 막대는 덴드리머 단독인 경우의 결과이다. 반점이 찍힌 막대는 리포펙틴™ 경우의 결과이다.

<64> 제 30 도는 어떤 경우에는 DEAE-덱스트란의 존재하에, 다른 경우에는 DEAE-덱스트란의 부재하에, 변화하는 DNA:덴드리머 전하비에서의 (NH_3)덴드리머 및 (EDA)덴드리머의 형질감염 정도를 나타낸다(실시예 56). 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이고, 가로축은 DNA:덴드리머의 전하비이다. 실선의 검은 사각형은 G9(EDA) 덴드리머를 나타내고; 빗금선의 빈 사각형은 G9(EDA) 덴드리머 + DEAE-덱스트란을 나타내고; 실선의 검은 동그라미는 G9(NH_3) 덴드리머를 나타내며; 빗금선의 빈 동그라미는 G9(NH_3) 덴드리머 + DEAE-덱스트란을 나타낸다.

<65> 제 31 도는 G8(NH_3)덴드리머 및 G11(EDA)덴드리머를 사용한 것을 제외하고는 제 30 도와 비슷하며, DEAE-덱스트란이 항상 함께 존재한다(실시예 56). 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이고, 가로축은 DNA:덴드리머의 전하비이다. 검은 동그라미는 G8(NH_3)덴드리머를 나타내며; 검은 삼각형은 G11(EDA)덴드리머를 나타낸다.

<66> 제 32 도는 DEAE-덱스트란 또는 행크스(Hanks) 완충 염수(HBS)의 존재하의 DNA:G7(NH_3)덴드리머

착체의 형질감염 효능을 나타내는 그래프이다(실시예 57). 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이고, 가로축은 DNA:덴드리머의 전하비이다. 검은 동그라미는 행크스 완충 염수를 나타내고; 검은 삼각형은 DEAE-덱스트란을 나타낸다.

<67> 제 33 도는 DNA 대 덴드리머의 다양한 전하비에서의 DEAE-덱스트란 내 (NH_3)덴드리머-DNA 착체의 형질감염 증가율을 나타내는 그래프이다(실시예 58). 세로축은 형질감염의 증가율(DEAE-덱스트란 대조군에 대한)이고, 가로축은 덴드리머 세대이다. 빗금친 막대는 전하비 1:1을 나타내고, 빈 막대는 전하비 1:5를 나타내며, 교차 빗금친 막대는 전하비 1:10을 나타낸다.

<68> 제 34 도는 DEAE-덱스트란의 존재하 및 부재하에 다양한 전하비에서의 DNA-덴드리머 착체의 형질감염 효능을 나타내는 그래프이다(실시예 59). 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이고, 가로축은 DNA:덴드리머의 전하비이다(가장 오른쪽에 기재된 것은 플라스미드/DEAE-덱스트란 대조군임). 빈 막대는 DEAE-덱스트란을 나타내고; 검은 막대는 DEAE-덱스트란의 부재를 나타낸다.

<69> 제 35 도는 다양한 전하비 및 다양한 DEAE-덱스트란 농도에서의 DNA:덴드리머 착체의 형질감염 효능을 나타내는 막대 그래프이다(실시예 60). 세로측은 상대적 광단위/㎍단백질이고; 상부의 가로축은 DEAE-덱스트란 농도(μM)이고; 하부의 가로축의 각 눈금은 플라스미드 대조군을 비롯한 DNA:덴드리머의 다양한 전하비이다.

<70> 제 36 도는 상이한 세포주에서, 리포펙틴™ 매개성 형질감염과 비교한, 전하비 1:5의 DNA:덴드리머 착체의 형질감염 효율을 나타내는 막대 그래프이다(실시예 61). 세로축상의 숫자는 사용된 형질감염약제(실시예 61에 기재됨)를 나타내는 샘플 번호이고; 가로축은 상대적 광단위/㎍단백질이다. 시험한 세포주의 여러 눈금(그래프의 위에서부터)은 원숭이:COS 7; 인간:HMEC-1, 마우스:10-1; 마우스:NIH 3T3; 및 래트:클론9이다.

<71> 제 37 도는 형질감염시키기 어려운 두 세포주에서의 리포펙틴™ 매개성 형질감염과 비교한, 상기 세포주에서 전하비 1:5의 DNA:덴드리머 착체의 형질감염 효능을 나타내는 그래프이다(실시예 62). 세로축은 샘플 번호이고; 가로축은 상대적 광단위/㎍단백질이다. 사용된 세포주는 NRK52E의 경우 사선으로 빗금친 막대이고, YB2의 경우 검은 막대이다.

<72> 제 38 도는 리포펙틴™ 및 리포펙타민™(LIPOFECTAMINE) 매개성 형질감염과 비교한, DEAE-덱스트란 존재하 및 부재하의 다양한 DNA-덴드리머 착체의 형질감염 효능을 나타내는 그래프이다(실시예 63). 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이고; 가로축은 대조군을 비롯한 전하비 또는 투여량이다. 빈 막대는 G8(NH_3)덴드리머이고; 수직교차 빗금친 막대는 리포펙틴™을 나타내고; 빗금친 막대는 DEAE-덱스트란 존재하의 G8(NH_3)덴드리머를 나타내고; 반점이 찍힌 막대는 리포펙타민™을 나타내며: 사선교차 빗금친 막대는 DEAE-덱스트란 존재하의 G11(EDA)덴드리머를 나타낸다.

<73> 제 39 도는 DEAE-덱스트란, 디메틸설폭사이드(DMSO), 이들의 혼합물의 존재하, 또는 상기 모두의 부재하에, 다양한 전하비의 DNA:덴드리머 착체의 형질감염 효능을 나타내는 그래프이다(실시예 64). 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이고; 가로축은 플라스미드 대조군을 비롯한 전하비이다. 반점이 찍힌 막대는 DMSO 처리를 한 DEAE-덱스트란을 나타내고; 빗금친 막대는 DMSO 처리를 하지 않은 DEAE-덱스트란을 나타내고; 사선교차 빗금친 막대는 DMSO 처리를 하고 DEAE-덱스트란이 없는 경우를 나타내며; 수직교차 빗금친 막대는 DMSO처리를 하지 않고 DEAE-덱스트란이 없는 경우를 나타낸다.

<74> 제 40 도는 갈락토스 트리사카라이드 콘쥬게이트화된 덴드리머와 착체화된 ASGPR 표적화된 DNA의 형질감염 효능을 나타내는 그래프이다(실시예 65). 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이고; 가로축은 세포주 및 수용체 상태이다. 빈 막대는 콘쥬게이트화된 덴드리머를 나타내고; 빗금친 막대는 비콘쥬게이트화된 덴드리머를 나타낸다.

<75> 제 41 도는 콘쥬게이트화되는 갈락토스 트리사카라이드의 존재하 및 부재하의 G11(EDA)의 DNA 결합력을 예시하는 전기영동 겔이다(실시예 65).

<76> 제 42 도는 다양한 혈청 농도 및 다양한 덴드리머 농도에서의 G8(NH_3)덴드리머와 착체화된 DNA의 형질감염 효능을 나타내는 그래프이다(실시예 66). 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이고; 가로축은 혈청 농도이다. 빈 막대는 0.05μM G8(NH_3)덴드리머를 나타내고; 반점이 찍힌 막대는 0.1μM G8(NH_3)덴드리머를 나타내고; 빗금친 막대는 0.5μM G8(NH_3)덴드리머를 나타내며; 검은 막대는 덴드리머가 없는 경우를 나타낸다.

<77> 제 43 도는 다양한 표적화 비표적화 및 표면개질된 덴드리머와 착체화된 DNA의 형질감염 효능을 나타내는 그래프이다(실시예 67). 세로축은 플라스미드 대조군에 대한 증가율이고, 가로축은 다양한 DNA-덴드리머 착체이다. 빈 막대는 전하비 1:1의 DNA:덴드리머이고; 검은 막대는 전하비 1:5의 DNA:덴드리머이며, 대각선 빗금친 막대는 전하비 1:10의 DNA:덴드리머이다.

<78> 제 44 도는 덴드리머와 착체화된 DNA의 형질감염 효능(형질감염된 DNA의 발현을 측정함)을 나타내는 그래프이다(실시예 68). 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이고; 가로축은 다양한 DNA-덴드리머 착체이다. 막대는 형질감염과 수확사이의 시간(시)을 나타낸다. 빈 막대는 21시간을 나타내고; 좌측 위에서 우측 아래로 빗금친 막대는 45시간을 나타내고; 우측 위에서 좌측 아래로 빗금친 막대는 69시간을 나타내며; 검은 막대는 141시간을 나타낸다.

<79> 제 45 도는 DNA의 존재하 및 부재하, 및 DEAE-덱스트란의 존재하 및 부재하의, G8(NH_3)덴드리머 및 G8(EDA)덴드리머의 RAT2 세포주 내 세포독성을 나타내는 그래프이다(실시예 69). 세로축은 죽은 세포의 백분율이고; 가로축은 덴드리머의 농도(왼쪽 부분) 및 덴드리머-DEAE-덱스트란의 농도(오른쪽 부분)이다. 빈 막대는 G8(EDA)덴드리머를 나타내고; 빗금친 막대는 G8(NH_3)덴드리머를 나타낸다.

<80> 제 46 도는 다양한 세포주내의 G8(NH_3)덴드리머 및 G8(EDA)덴드리머의 세포독성에 관한 유사한

그래프이다(실시예 69). 세로축은 죽은 세포의 백분율이고; 가로축은 시험한 다양한 덴드리머의 농도이다. 빈 막대는 DEAE-덱스트란이 없는 경우를 나타내고; 검은 막대는 0.5μM DEAE-덱스트란의 경우를 나타낸다. 사용된 세포주(왼쪽으로부터 오른쪽으로 읽어서)는 클론9, NIH 3T3, 10-1 및 COS7이었다.

<81> 제 47(A) 내지 (F) 도는 상이한 두 세포주(이들 중 일부는 덴드리머를 사용하지 않고, 일부는 덴드리머를 사용하여, 또한 일부는 나트륨 아지드의 존재하에 덴드리머를 사용하여 형질감염시켰음)에서의 세포내 흡수량 및 DNA의 위치를 나타낸다(실시예 70). 모든 도면에 있어서, 세로축은 세포내 흡수량(10^2cpm/10^4세포)이고; 하부 가로축은 시간(시)이다. (A) 내지 (C) 도에서는 U937 세포를 사용하였고, (D) 내지 (F) 도에서는 RAT2 세포를 사용하였다. (A) 및 (D) 도에 있어서, 상부 가로축은 오직 DNA만이고. (B) 및 (E) 도에서는 DNA + 덴드리머이며, (C) 및 (F)도는 DNA + 덴드리머 + 나트륨 아지드이다. 모든 도면에 있어서, 검은 사각형은 핵을 나타내고, 검은 동그라미는 막을 나타내며, 검은 삼각형은 세포 단편을 나타낸다.

<82> 제 48(A) 및 (B) 도는 일부 세포가 β-갈락토시다제 효소를 발현시키는 RSV-lacZ DNA로 성공적으로 형질감염된, 세포의 사진이다(실시예 71).

<83> 제 49 도는 확대사진이며 RSV-lacZ 플라스미드를 시험 웰(well)당 3㎍을 사용한 것을 제외하고는, 제 48 도와 같다(실시예 71).

<84> 제 50(A) 및 (B)도는 RAT2 래트 섬유 아세포를 포함하며 (A)의 형질감염된 세포를 (B)의 형질감염되지 않은 세포와 비교한 점을 제외하고는, 제 48 도와 같다(실시예 71).

<85> 제 51(A) 내지 (C) 도는 유전물질 형질감염 방법을 예시한다.

<86> 제 52 도는 RSV-β-gal-NEO 플라스미드로 형질감염된 D5 세포로부터 수득한 클론 수를 나타내는 그래프이다. 본 발명을 포함한 몇가지 상이한 기법을 사용하여 모세포내로의 형질감염을 수행한 후, 제네티신(G418) 항생제(Gibco/BRL)로 내성 세포 클론을 선별하였다(실시예 72). 세로축은 클론의 수이고; 가로축상의 숫자는 샘플의 DNA 양 및 형질감염 조건을 나타내는 실시예 72의 샘플 번호이다. 빈 막대는 G418 내성 클론을 나타내고; 수직교차 빗금친 막대는 클론을 생성하는 β-갈락토시다제 효소를 나타낸다.

<87> 제 53 도는 본 발명을 포함한 몇가지 상이한 기법을 비롯하여)을 사용하여 RSV-β-gal-NEO 플라스미드로 형질감염시킨 RAT2 세포로부터 수득한 클론 수를 비교하는 그래프이다(실시예 72). 네오마이신 내성에 대해 제네티신(G418)으로 클론을 선별하고, 이어서 β-갈락토시다제 활성을 측정하였다. 세로측은 클론의 수이고; 가로축상의 숫자는 샘플의 DNA 양 및 형질감염 조건을 나타내는 실시예 72의 샘플번호이다. 빈 막대는 G418 내성 클론을 나타내고; 빗금친 막대는 클론을 발현시키는 β-갈락토시다제를 나타낸다.

<88> 제 54 도는 EBV-A DNA 플라스미드로 영구 형질감염된 MSU 1.2 세포의 생성을 나타내는 그래프이다. 세로축은 1×10^6세포 당 히그로마신 B 내성 콜로니를 나타내고; 가로축은 실시예 72의 샘플 번호이다.

<89> 제 55 도는 ICAM 발현 플라스미드로 형질감염된 다양한 세포 클론내의 FACS 분석(형광) 추적(tracing)을 나타낸다. 모든 도면에서 세로축은 세포 수이고, 가로축은 발현된 ICAM(형광)의 양이다(실시예 72).

<90> 제 56 도는 1:10의 DNA:덴드리머 전하비에서 pH 조절된 덴드리머 회합물로 형질감염시킨 후의 RAT2 세포내의 루시페라제™ 활성을 나타낸다. 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이다. 가로축은 시험에 사용된 샘플의 번호이다(실시예 74).

<91> 제 57 도는 1:10의 DNA:덴드리머 전하비에서 DEAE-덱스트란의 존재하에, 리신 개질된 덴드리머 및 비개질된 덴드리머를 사용하여 형질감염시킨 후의 RAT2 세포내의 루시페라제™ 활성을 나타낸다. 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이고; 가로축은 시험에 사용된 샘플이다(실시예 75).

<92> 제 58 도는 각각 다양한 덴드리머, 다분산성 덴드리머, 및 기타 형질감염 약제로 형질감염된, 두 세포주(COS1 및 RAT2)의 형질감염결과를 나타낸다. 세로축은 상대적 광단위/3㎍세포단백질이고; 가로축은 샘플 번호 및 사용된 다양한 형질감염 약제의 전하비이다(실시예 76).

<93> 제 59 도는 모세포가 RSV-β-gal 플라스미드 DNA로 형질감염된, 마우스 멜라노마(mouse melanoma) D5 세포의 염색된 세포 배양물의 사진이다. 안정한 형질전환체(콜로니)를 G418로 선별한다(실시예 72). 번호가 매겨진 각 배양물 내 모세포에 사용된 형질감염 비히클(vehicle)은 다음과 같다:

<94> 1. 10㎍ DNA 및 인산 칼슘

<95> 2. 10㎍ DNA 및 DEAE-덱스트란

<96> 3. 5㎍ DNA 및 0.5μM G8(NH_3)

<97> 4. 10㎍ DNA 및 0.5μM G8(NH_3)

<98> 5. 5㎍ DNA 및 0.2μM G8(NH_3)

<99> 제 60 도는 번호가 매겨진 다양한 패널로 제공된다. 패널 1은 1:10의 DNA:덴드리머 전하비에서 G11(EDA) 덴드리머와 착체화된 RSV-β-gal 플라스미드 DNA 10㎍을 생체내 주입한 D5 마우스 멜라노마 종양의 조직 박편의 현미경사진이다. 패널 1에서 볼 수 있는 어두운(청색) 얼룩으로 나타나는, β-gal을 발현하는 D5 세포의 존재에 의해 종양 세포의 성공적인 형질감염을 확인한다(실시예 77).

<100> 패널 2는 패널 1 조직에 대한 대조군의 현미경사진이고, 이때, D5 마우스 멜라노마 종양에는 G11(EDA) 덴드리머만을 주입하였다(실시예 77).

<101> 패널 3, 4 및 5는 하기의 DNA:덴드리머 착체의 전자현미경 사진이다(실시예 43):

<102> 패널 3 - 1:10의 DNA:덴드리머 전하비의 DNA와 G11(EDA)덴드리머;

<103> 패널 4 - 후속적으로 DEAE-덱스트란을 첨가하는 것을 제외하고, 패널 3과 동일함; 및

<104> 패널 5 - 1:10의 DNA:덴드리머 전하비의, DNA와 다분산성 크기의 덴드리머 혼합물.

<105> 제 61A 및 61B 도는, 하기의 3가지 상이한 조건하 및 상이한 전하비에서 상이한 조밀 별형 덴드리머 또는 이들의 혼합물을 사용하는 형질감염, 즉, 유전물질:덴드리머 착체만을 사용하는 형질감염(반점이 찍힌 막대): DEAE-덱스트란의 존재하에 동일한 유전물질:덴드리머 착체를 사용하는 형질감염(빗금친 막대); 및 클로로퀸의 존재하에 동일한 유전물질:덴드리머 착체를 사용하는 형질감염(검게 칠한 막대)을 비교하는 그래프이다. 제 61A 도에 나타난 데이터는 COS1 세포가 형질감염되었음을 나타내고, 제 61B 도에 나타낸 데이터는 RAT2 세포가 형질감염되었음을 나타낸다. 세로축은 상대적 광단위/3㎍단백질이다. 가로축상의 숫자는 실시예 73의 유전물질:덴드리머 착체 샘플 번호이다.

<106> 제 62 도는 리신계의 비대칭 분지된 덴드리머를 사용하는 형질감염을, 조밀 별형 덴드리머를 사용하는 형질감염과 비교하는 그래프이다(실시예 78). 세로축은 상대적 광단위/㎍단백질이고; 가로축은 사용된 덴드리머이다. 빈 막대는 DEAE-덱스트란이 없는 경우를 나타내고, 검은 막대는 DEAE-덱스트란이 있는 경우를 나타낸다.

발명의 상세한 설명

<107> 조밀 별형 중합체는 제 1 도에 도시되어 있는데, 여기에서 원으로 둘러싸인 1 [본원에서, "코어(1)"]는 개시 코어(이 도면에서 가장 왼쪽의 그림에서 나타낸 3-작용성의 개시 코어)를 나타내고; Z는 왼쪽에서 부터 2번째 그림에 처음으로 보이는 말단기를 나타내며 별형 분지 올리고머로 일컬어지고; A, B, C, D, 및 E는 조밀 별형 덴드리머의 특정 분자 세대를 나타내며; $(A)_n$, $(B)_n$, $(C)_n$, $(C)_n$, $(D)_n$ 및 $(E)_n$은 조밀 별형 가교 덴드리머를 나타낸다.

<108> 조밀 별형 덴드리머는 3가지의 구별되는 구성 특징. 즉, (a) 개시 코어, (b) 개시 코어에 방사상으로 결합되고 반복단위로 구성되는 내부 층(세대 G 또는 Gen), 및 (c) 최외부 세대에 결합된 말단 작용성의 외부 표면(즉, 말단 작용기)을 갖는 단일분자성 회합물이다. 조밀 별형 덴드리머 분자의 크기와 형태, 및 덴드리머 분자내에 존재하는 작용기는 개시 코어의 선택, 덴드리머 생성에 사용된 세대(즉, 각 세대가 다음 세대로 전진하면서 형성되는 층상 구조) 수, 및 각 세대에 사용된 반복단위의 선택에 의해 조절할 수 있다. 덴드리머는 임의의 특정 세대에서 단리할 수 있기 때문에, 원하는 특성을 갖는 덴드리머를 수득하는 방법이 제공된다. 조밀 별형 덴드리머의 특성을 가지기 위해서는, 상기의 3가지 구성 특징이 모두 존재해야 한다. 이들 특징은 드보닉 및 토말리아의 문헌[Chem. in Britain, 641-645, 1994년 8월]에 더 기술된 바 있다. 본원에 사용된 덴드리머는 그의 세대 수 및 사용된 개시 코어에 의해, 예컨대 G7(EDA) 덴드리머와 같이 나타낼 수 있다.

<109> 조밀 별형 덴드리머 성분의 선택은 덴드리머의 특성에 영향을 준다. 개시 코어의 유형은 덴드리머 형태에 영향을 주어, (선택된 개시 코어에 따라) 예컨대. 구형 덴드리머, 원통형 또는 막대형 덴드리머, 타원형 덴드리머, 또는 버섯형 덴드리머가 형성될 수 있다. 연속적인 세대의 구성(즉, 세대 수, 및 반복단위의 크기 및 특성)은 덴드리머의 크기 및 이들 내부의 특성을 결정한다.

<110> 조밀 별형 덴드리머는, 분지의 주변에 분포된 작용기를 갖는 가지형 분지를 함유하는 분지 중합체이기 때문에, 다양한 특성을 갖는 것이 제조될 수 있다. 예를 들어, 제 2(A) 도에 도시한 거대분자(덴케월터(Denkewalter)의 미국 특허 제 4,289.872 호와 같은), 및 제 2(B) 도에 도시된 것과 같은 본 발명의 조밀 별형 덴드리머는 분지의 길이로 인하여 뚜렷하게 상이한 특성을 갖는다. 제 2(A)도에 나타낸 유형의 덴드리머는 비대칭적(불균등한 단편)인 분지점, 외부(즉, 표면) 기(Z'로 나타냄), 및 내부 잔기(Z로 나타냄)를 가지지만 내부의 빈 공간은 매우 적다. 제 2(B)도에 나타낸 바람직한 유형의 덴드리머는, 표면기(Z'로 나타냄)를 갖는 대칭적(균등한 단편)인 분지점, 세대(G)의 함수로서 변하는 내부의 빈 공간을 갖는 상이한 두 내부 잔기(각각 X 및 Z로 나타냄)를 가진다. 제 2(B) 도에 도시된 것과 같은 덴드리머는 충분한 세대를 걸쳐 전진하여 빈 공간을 완전히 둘러싸고 포함함으로써, 주로 중공 내부와 고도로 밀집된 표면을 갖는 화합물을 제공할 수 있다.

<111> 조밀 별형 덴드리머의 본질은 원소 조성이라기 보다는 층상구조에 있다. 그러므로, 반복단위는 이들 단위가 중복성의 특성을 가지고 본원에 기술된 층상 구조로 회합하는 한, 어떠한 원소의 조합으로 구성될 수 있다. 이들 반복단위에 의해 안정한 분지 구조가 구성될 수 있다면, 이들 반복단위는 중합체 구조에서 통상적으로 볼 수 있는 모든 원소(예: 탄소, 수소, 산소, 황, 질소 및 규소)또는 덜 통상적인 원소로도 구성될 수 있다. 예를 들어, 반금속(metalloid) 및 전이 금속은 유기 잔기와 안정한 공유결합 화합물 및 착체를 형성하는 것으로 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 이들 유기 잔기와의 안정한 공유결합 화합물 및 착체는 분지된 물질(예컨대 수소화붕소, 붕산염, 수소화게르마늄, 수소화 주석 및 수소화납), 또는 비분지된 결합(예컨대 디알킬 아연 또는 수은)으로서 존재할 수 있다. 적당한 리간드를 사용하여 전이금속(예: 코발트)이 분지 단위(3가지의 별개의 리간드를 연결함으로써) 또는 비분지된 결합(2가지의 별개의 리간드를 연결함으로써)으로서 작용하게 할 수 있다. 그러므로, 본원에 기술된 유형에 적합하고 어떠한 원소라도 혼입시키는 분지 구조는 본 발명의 범주에 포함된다.

<112> 또한, 조밀 별형 덴드리머는 충분한 세대를 걸쳐 전진할 때, 덴드리머의 표면이 충분한 말단 잔기를 함유하는 "조밀 별형의 조밀 충진"을 나타내어, 덴드리머의 표면이 밀집되어 덴드리머 내부의 빈 공간을 둘러싸게 된다. 이처럼 밀집하게 되면, 덴드리머 내부의 안으로 또는 밖으로의 물질 확산을 억제하는 데 사용될 수 있는, 분자수준의 차단벽을 제공할 수 있다.

<113> 원하는 화학 작용기를 함유하는 반복단위를 선택하거나 또는 표면 작용기의 전부 또는 일부를 화학적으로 개질시켜 새로운 표면 작용기를 생성시킴으로써 덴드리머의 표면 화학을 예정된 방식으로 조절할 수 있다. 예를 들어, 이들 표면을 특정 부위를 향하여 표적화시키거나, 또는 특정한 기관 또는 세포,

예컨대 세망내피 세포에 의한 흡수에 저항하도록 만들 수 있다.

<114> 조밀 별형 덴드리머의 또 다른 용도에 있어서, 덴드리머 그 자체는 다양한 방식으로 서로 결합하여("회합"이라는 용어에 포함됨), 다가지형 잔기(조밀 별형 가교 덴드리머 또는 덴드리머 회합물) 또는 콘쥬게이트내의 담체로서도 적합한 조밀 별형 덴드리머 회합물을 생성할 수 있다.

<115> 또한, 특정 세대의 균일한 분지로부터 변동을 가지도록 덴드리머를 제조하여 덴드리머에 불연속성(즉, 덴드리머 내의 특정 위치에서 균일한 분지로부터의 변동) 및 상이한 특성을 부가하는 수단을 제공할 수 있다.

<116> 본 발명의 조밀 별형 콘쥬게이트에 사용된 조밀 별형 중합체는 당해 분야에 공지된 방법, 예컨대 그 개시내용이 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제 4,587,329 호에 따라 제조할 수 있다. 폴리아민 덴드리머는 암모니아, 또는 다수의 1급 아민기 또는 2급 아민기를 갖는 아민을 N-치환된 아지리딘(예: N-토실 또는 N-메실 아지리딘)과 반응시켜, 보호된 제 1 세대 폴리설폰아미드를 형성시킴으로써 제조할 수 있다. 그 다음, 제 1 세대 폴리설폰아미드를 산(예: 황산, 염산, 트리플루오로아세트산, 플루오로설폰산 또는 클로로설폰산)으로 활성화시켜, 제 1 세대 폴리아민 염을 형성한다. 바람직하게는, 증류에 의해 제거되기에 충분히 휘발성인 강산(예: 염산)을 사용하여 탈설포닐화 반응을 수행한다. 그 다음, 제 1 세대 폴리아민 염을 N-보호된 아지리딘과 추가적으로 반응시켜, 보호된 제 2 세대 폴리설폰아미드를 형성할 수 있다. 이 연속단계를 반복하여 고세대의 폴리아민을 제조할 수 있다.

<117> 폴리아미도아민은 먼저, 암모니아 한 분자를 메틸 아크릴레이트 세 분자에 마이클(Michael) 부가시키기에 충분한 조건하에서, 암모니아(또는 다수의 1급 및/또는 2급 아민기를 갖는 아민)를 메틸 아크릴레이트와 반응시켜, 코어 부가물을 형성시킴으로써 제조할 수 있다. 반응하지 않은 메틸 아크릴레이트를 제거한 후, 에틸렌디아민 분자의 아민기 하나가 코어 부가물의 메틸 카복실레이트기와 반응하도록 하는 조건하에서, 이 화합물을 과량의 에틸렌디아민과 반응시켜, 3개의 아미도아민 잔기를 갖는 제 1 세대 부가물을 형성시킨다. 반응하지 않은 에틸렌디아민을 제거한 후, 상기 제 1 세대 부가물을 마이클 부가반응 조건하에 과량의 메틸아크릴레이트와 반응시켜 말단 메틸에스테르 잔기를 갖는 제 2 세대 부가물을 형성한다. 이어서, 제 2 세대 부가물을 아미드 형성조건하에 과량의 에틸렌디아민과 반응시켜, 말단 아민 잔기를 갖는 순차적인 제 2 세대 가지형 분지를 포함하는, 목적하는 폴리아미도아민 덴드리머를 제조한다. 아미도아민 잔기를 함유하는 유사한 덴드리머는 코어화합물로서 유기 아민, 예컨대 4중-분지된 덴드리머를 생성시키는 에틸렌디아민 또는 5중-분지된 덴드리머를 생성시키는 디에틸렌트리아민을 사용하여 제조할 수 있다.

<118> 무수 조밀 별형 폴리에틸렌이민을 제조하기 위해서는, 설폰아미드 결합을 산 절단시킨 후, 물과 공비혼합물을 형성하는 용매(예: 벤젠 톨루엔, 크실렌 또는 메시틸렌, 바람직하게는 톨루엔)를 첨가하고 생성되는 물/용매 공비혼합물은 공비 증류, 예를 들어 딘-스탁 트랩(Dean-Stark-trap)에 의해 물을 제거시키면서 혼합물을 가열하여 환류시킴으로써 제거할 수 있다. 또 다르게는, 무수 폴리에틸렌이민이 용해되는 염소화 용매(예: 클로로포름)를 건조 단계에 사용할 수 있다. 염소화 용매 또는 물과 공비혼합물을 형성하는 용매를 첨가함으로써, 중합체를 태우거나 또는 분해시키는 온도로 중합체를 가열할 필요가 없어진다. 무수 폴리에틸렌이민은 항원 물질(예컨대 항체 또는 항체 단편)의 담체로서 특히 유용하다.

<119> 매우 균일한 크기 및 형태를 갖는, 가장 중요하게는 덴드리머의 표면적 단위당 더욱 많은 수의 작용기가 존재하는 덴드리머를 제조할 수 있으며, 이 덴드리머는 이 조밀 별형 중합체와 동일한 분자량, 동일한 코어와 단량체 성분 및 동일한 수의 코어 분지를 갖는 다른 중합체와 비교할 때, 분자 용적 단위당 더욱 많은 수의 작용기를 가질 수 있다. 덴드리머 작용기의 조밀도가 증가하면, 조밀 별형 중합체는 덴드리머 하나 당 더욱 많은 양의 물질을 운반할 수 있다. 덴드리머의 작용기의 수는 표면 및 내부안에서 조절될 수 있기 때문에, 이것은, 예컨대 덴드리머 하나 당 전달되는 생물활성 약제의 양을 조절하기 위한 방법을 또한 제공한다. 본 발명의 특히 바람직한 태양에서, 조밀 별형 중합체, 특히 조밀 별형 덴드리머는 생물활성 약제를 특정한 표적 기관, 또는 표적 생물체내의 특정한 결정기 또는 부위로 전달시킬 수 있는 생물활성약제의 표적화된 담체이다.

<120> 초기 세대의 조밀 별형 덴드리머(즉, 세대=1-7)와 전형적인 구형 미셀(micelle)사이에는 유사성이 있을 수 있다. 이들이 공통적으로 갖는 특징(예: 형태, 크기 및 표면 특성)을 비교하여, 덴드리머-미셀 유사성을 유도하였다.

<121> [표 I]

변 수	표준의 전형적인 미셀	조밀 별형 덴드리머
형태	구형	구형
크기(직경)	20 내지 60Å	17 내지 67Å
표면 결합 수	4 내지 202	Z=6 내지 192 (Z는 표면 기의 수임) (세대=2 내지 7)
면적($Å^2$)/표면 기	130 내지 $80Å^2$	127 내지 $75Å^2$

($Å=10^{-1}nm$; $Å^2=10^{-2}nm^2$)

<123> 표 1에서, 주사투과 전자현미경(STEM)에 의해 형태를 확인하였다. 고유점도[η] 측정 및 크기배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 크기를 확인하였다. 적정법 및 고자장(high field) NMR에 의해 표면 결합수를 확인하였다. SEC 유체역학측정법으로부터 면적/표면 기를 계산하였다.

<124> 초기 5세대의 조밀 별형 폴리아미도아민(PAMAM) 덴드리머는 거의 모든 면(즉, 형태, 크기, 표면

기의 수, 및 면적/표면 기)에서 전형적인 구형 미셀과 매우 유사한 미소체(microdomain)이다. 그러나, 이들은 미셀의 동력학적 평형 특성과 비교할 때 공유결합으로 고정되어 있으며 견고하다는 것이 주된 차이이다. 이러한 차이점은 이들 미소체를 봉입(encapsulation) 장치로서 사용하는 경우에 있어서 중요한 이점이다.

<125> 또한, 동심의 세대가 5세대를 초과하여 첨가되면, 표면의 밀집이 일어난다. 이러한 밀집은 표면의 차단특성을 증가시키며 표 II에 나타낸 대로, 상부(표면)기 하나 당 보다 작은 표면적을 나타낼 수 있다.

<126> [표 II]

PAMAM 덴드리머의 세대에 따른 특징

세 대	1	2	3	4	5	6	7	8	9
표면기, Z의 수	3	6	12	24	48	96	192	384	768
분 자 량	275	875	2411	5147	10,619	21,563	43,541	87,227	174,779
SEC로 측정한 직경*	10.4Å	15.8Å	22Å	31Å	40Å	53Å	67Å	76Å	88Å
덴드리머 당 표면적	366Å^2	783Å^2	1519Å^2	3018Å^2	5024Å^2	8,820Å^2	14,096Å^2	18,136Å^2	24,328Å^2
Z기 당 표면적	122Å^2	131Å^2	127Å^2	126Å^2	104Å^2	92Å^2	73Å^2	47Å^2	32Å^2
Z기 사이의 거리	12.4Å	12.8Å	12.7Å	12.6Å	11.5Å	10.8Å	9.8Å	7.75Å	6.28Å
기 공 율	311.6Å^3	1,470.2Å^3	4,737.9Å^3	11,427.0Å^3	---	---	---	---	---

* 단분산성($\frac{M_w}{M_n}$ = 1.02) 폴리에틸렌옥사이드 표준물질에 대해 보정한 크기배제 크로마토그래피 측정법에 의해 측정한 유체역학적 직경.

$1Å=10^{-1}nm$; $1Å^2=10^{-2}nm^2$; $1Å^3=10^{-3}nm^3$.

<128> 예를 들어, 아민말단 세대 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 및 9.0는 표면적이 각각 Z 기당 104, 92, 73, 47 및 32Å^{2}으로 감소하였다. 이 특징은 덜 밀집된 표면으로부터 통상 소포(리포좀) 또는 랑무르-블로제트(Langmuir-Blodgett) 형 막과 화합된 이층/단층 차단벽-유사 표면을 갖는, 더욱 밀집된 미셀-유사 표면으로의 전이에 상응한다.

<129> 이와 같은 표면 밀집이 일어나는 경우 중간 세대(G6 내지 G8)로부터 더욱 전진한 세대(G9 또는 G10)로 세대가 증가함에 따라 물리적 특징 및 형태(morphology)에 변화가 관찰될 것이다. 각 샘플로부터 메탄올 용매를 제거하여 무색의 연황색 고체 필름을 수득하고, 이어 사산화오스뮴으로 염색시킨 후, 7.0, 8.0 및 9.0 세대(G)의 주사투과 전자현미경(STEM) 사진을 얻었다. 예상된 형태 변화는 9.0세대에서 발생하였다. 9.0세대의 중공 내부는 직경이 약 63Å으로 측정되며 약 22Å 두께의 어두운 테두리로 둘러싸여 있다. 외관상으로 보기에, 메탄올성 용매는 22Å의 외막-유사 차단벽안에 갇혀 있어서 무색의 내부를 제공한다. 따라서, 9.0세대에서 조밀 별형 PAMAM은 위상적으로 소포(리포좀)와 같이 거동하고 있다. 그러나, 이 조밀 별형 PAMAM은 리포좀에 비하여 크기가 10^1배만큼(an order of magnitude) 작고 매우 단분

산성이며, 리포좀보다 훨씬 더 물리적으로 안정하다. 결과적으로, 본 발명의 덴드리머는 직경 약 63Å(약 131,000Å^{3}의 용적) 이상의 공간을 충진시키는 용매를 분자적으로 봉입시키기에 충분히 큰 빈 내부를 갖는다. 이들 미셀 크기의 원형은 상기 진전된 세대 단계에서 공유결합적으로 고정된 리포좀과 같이 거동하는 것으로 보인다. 상기 원형은 상기 거동으로 인해, 예컨대 포유동물의 다양한 질환을 치료하기 위한 조밀 별형 항체 콘쥬게이트에서 비킬레이트화 방사핵종용 담체로서의 능력을 추가로 가질 수 있다.

<130> 덴드리머상의 작용기의 수는 표면 및 내부안에서 조절될 수 있기 때문에, 이는 또한 덴드리머당 전달될 운반물질의 양을 조절하기 위한 수단을 제공한다. 하나의 태양에서, 덴드리머는, 예컨대 식물 또는 해충, 또는 표적 생물체내의 특정한 결정기 또는 부위로 운반물질(예컨대, 생물활성 약제)을 전달할 수 있는, 표적화된 약제의 담체이다.

<131> 본 발명의 콘쥬게이트에 사용하기에 적합한 덴드리머에는 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제 4,507,466 호, 제 4,558,120 호, 제 4,568,737 호 및 제 4,587,329 호에 기술되는 조밀 별형 중합체가 포함된다.

<132> 특히, 바람직한 태양은 하나 이상의 운반되는 농업용, 약학용 또는 기타의 물질과 회합된 하나 이상의 조밀 별형 중합체를 포함하는 조밀 별형 콘쥬게이트에 관한 것이다. 본 발명의 범주에 포함되는 조밀 별형 콘쥬게이트는 하기 일반식(I)로 표현되는 것을 포함한다:

$$(P)_x*(M)_y \qquad (I)$$

<134> 상기 식에서,

<135> 각 P는 덴드리머이고;

<136> x는 1 이상의 정수이고;

<137> 각 M은 운반물질의 단위(예컨대, 분자, 원자, 이온 및/또는 기타 기본단위)인데, 상기 운반물질은 동일하거나 상이할 수 있고, 바람직하게는 운반물질은 생물활성 약제이고;

<138> y는 1 이상의 정수이고;

<139> *는 운반물질이 덴드리머와 회합되었음을 나타내며,

<140> 단, 운반물질은 그 효능을 유지한다.

<141> 상기 식(I)에서 P는, 운반물질이 생물반응 개질제, 특히 유전물질인 경우, 조밀 별형 중합체 또는 가지형 중합체일 수 있다.

<142> 일반식 (I)의 바람직한 조밀 별형 콘쥬게이트는 M이 약제, 농약, 방사핵종, 킬레이트화제, 킬레이트화 금속, 독소, 항체, 항체 단편, 항원, 신호 발생제(예컨대, 형광체), 신호 반사제(예컨대, 상자성체), 또는 신호 흡수제(예컨대, 전자빔 불투과제), 방향제, 페로몬(pheromone), 또는 염료이다. "신호 발생제" 및 "신호 흡수제"라는 용어는 당해 분야의 숙련자에게 널리 공지되어 있다. 신호 발생제는 검출가능한 양의 에너지를 전자선(예: X-선, UV선, IR선, 가시광선 등) 형태로 방출할 수 있는 물질로서 정의할 수 있으며, 인광체 및 형광체(예컨대, 루시페라제 및 알칼리 포스파타제) 및 생체발광 마커(marker), 및 감마 및 X-선 방출체 또는 물질(예: 중성자, 양전자(positron), β-입자, α-입자 등)을 포함하고, 또한 방사핵종, 양전자 방출체 등을 포함한다. 신호 흡수제는 검출가능한 양의 에너지를 전자선 또는 전자물질 형태로 흡수하는 물질로서 정의할 수 있다. 몇가지 예로는 염료, 콘트라스트제(contrast agent) 및 붕소(중성자를 흡수함)가 있다. 주어진 물질은 신호 흡수제 및 신호 발생제 둘 다일 수 있다. 즉, 형광 또는 인광물질은 때로는 DNA 서열결정법에 사용되는 표지를 함유하는 빛(예: 불소)에 노출된 후, 빛을 흡수 및/또는 방출할 수 있고; 붕소는 중성자를 흡수하고 방사선을 방출하고, 상자성 입자는 표적화된 분자의 포획 및 에너지의 방출에 사용될 수 있으며, 이밖에도 이러한 예가 많이 있다. 페로몬이란 용어는 당해 분야의 숙련자에게 널리 공지되어 있으며, 예컨대, 문헌[McgGraw-Hill Encyclopedia of Science & Technology , 7판, Vol. 13, pp 361-361]; 및 문헌["Insect Pheromone Technology: Chemistry and Applications", ACS Symposium Series 190 1982)]에 정의 및 예시되어 있다. 적합한 방향제(예: 향수 및 향)의 예는 당해 분야의 숙련자에게 널리 공지되어 있으며, 악탄더(Steffen Arctander)의 문헌[Perfume and Flavor Chemicals, Vol. I 및 II, pub. Montclair, 뉴저지(1969)]에 예시 및 정의되어 있다. 염료 및 염료 잔기는 당해 분야의 숙련자에게 널리 공지되어 있으며, 예컨대 문헌[Webster's Third New International Dictionary , pp 706-710, pub. G. C. Merriam Company(1981)]; 커크-오트머(Kirk-Othmer)의 문헌[Encyclopedia of Chemical Technology , Vol. 8. pp 151-406, 3판, pub. John Wiley & Sons(1979)]에 예시 및 정의되어 있다. 상기 일반식(I)에서 x가 1이고 y가 2 이상인 것이 특히 바람직하다.

<143> 조밀 별형 덴드리머가, 임의적으로 연결기에 의해, 서로 공유결합되어(조밀 별형 가교 덴드리머) 다가지형 회합물(즉, x가 1보다 큼)을 형성하는 일반식(I)의 조밀 별형 콘쥬게이트가 또한 포함된다. 이들 조밀 별형 가교 덴드리머의 용도에는 국소조절성 방출제, 방사선 활막절제술(synovectomy) 등이 포함된다.

<144> 본원에 사용된 "회합"이란 용어는 운반물질(들)이 덴드리머 코어내에 물리적으로 봉입 또는 포획되거나, 덴드리머 전체에 부분 또는 완전 분산되거나, 또는 덴드리머 또는 이들의 혼합물에 결합되거나 연결(이 결합 또는 연결은 공유결합, 수소결합 흡착, 흡수, 금속결합, 반데르발스력 또는 이온결합, 또는 이들이 조합된 방법에 의한 것임)될 수 있다는 의미이다. 운반물질(들)과 덴드리머(들)의 회합은 임의적으로 연결기(connector) 및/또는 스페이서(spacer)를 사용하여 조밀 별형 콘쥬게이트의 제조 또는 사용을 용이하게 할 수 있다. 적합한 연결기는 조밀 별형 콘쥬게이트에 존재하는 표적 지향제(즉, T)의 효능 또는 다른 운반물질(들)(즉, M)의 효능을 거의 손상시키지 않고, 표적 지향제를 덴드리머(즉, P)에 연결시키는 기이다. 이들 연결기는 절단가능하거나 또는 절단불가능할 수 있고, 전형적으로는 표적 지향제와 덴드리머 사이의 입체장애를 피하는 데 사용되는데, 바람직한 연결기는 안정한 즉, 절단불가능한 것이다.

조밀 별형 덴드리머의 크기, 형태 및 작용기 밀도는 엄격하게 조절될 수 있기 때문에, 운반물질을 덴드리머와 회합시킬 수 있는 방법은 많다. 예를 들어, (a) 덴드리머의 표면 또는 근처에 위치한 물질(전형적으로는 작용기)과 운반물질(들)사이에 공유결합성. 쿨롱성(coulombic), 소수성 또는 킬레이트화 유형의 회합이 있을 수 있고; (b) 덴드리머 내부안에 위치한 잔기와 운반물질(들)사이에 공유결합성, 쿨롱성 소수성 또는 킬레이트화 유형의 회합이 있을 수 있고; (c) 내부(빈용적)안에 운반물질이 포획(예컨대, 물리적으로 조밀 별형 덴드리머의 내부 잔기내에 또는 내부 잔기와 회합하여)되도록 주로 중공인 내부를 갖게 덴드리머를 제조할 수 있는데(예컨대, 및 덴드리머 내에서 금속 이온을 킬레이트화하고 원자가 0의 상태로 환원시킴으로써 생성된 자성 또는 상자성 코어 또는 영역), 자성 내부를 함유하는 이들 덴드리머는 자석 등의 사용에 의해 다양한 덴드리머 표면과 착체화될 수 있는, 다양한 생물활성 물질을 수확하는 데 사용할 수 있으며, 운반물질의 방출은 확산 조절 부분을 갖는 덴드리머의 표면을 밀집시킴으로써 임의적으로 조절할 수 있고; 또는 (d) 전술한 현상의 다양한 조합을 사용할 수 있다.

<145> 본원에 "P"로 나타낸 덴드리머는 미국 특허 제 4,507,466호, 제 4,558,120 호, 제 4,568,737 호 또는 제 4,587,329 호에 기술된 조밀 별형 중합체를 포함한다.

<146> 바람직한 태양에서, 본원에 "M"으로 나타낸 운반물질은 약학물질이다. 조밀 별형 콘쥬게이트에 사용하기에 적합한 이러한 물질에는, 덴드리머의 물리적 상태(integrity)를 거의 방해하지 않으면서 조밀 별형 덴드리머와 회합될 수 있는, 포유동물의 진단 또는 치료를 위한 생체내, 생체외 또는 시험관내 용도용 임의의 물질, 예컨대 하기 물질이 포함되나, 이에 한정되지는 않는다:

<147> 약제[예: 항생제, 진통제, 항고혈압제, 강심제 등(이에 한정되지는 않음); 실례:
아세트아미노펜, 아시클로비르, 알케란, 아미카신, 암피실린, 아스피린, 비스안트렌, 브레오마이신, 네오카디오스타틴, 클로로암부실, 클로람페니콜, 시타라빈, 다우노마이신, 독소루비신, 플루오로우라실, 젠타마이신, 이부프로펜, 카나마이신, 메프로바메이트, 메토트렉세이트, 노반트론, 니스타틴, 온코빈, 페노바비탈, 폴리믹신, 프로부콜, 프로카바진, 리팜핀, 스트렙토마이신, 스펙티노마이신, 시메트렐,
티오구아닌, 토브라마이신, 트리메토프림 및 발반];

<148> 독소[예: 디프테리아 독소, 겔로닌, 엑소톡신 A, 아브린, 모덱신, 리신 또는 이들의 독성 단편(이에 한정되지는 않음)];

<149> 금속 이온[예: 주기율표의 VIIIA족(Fe, Co, Ni, Ru, Rh, Pd, Os, Ir, Pt), IVB족(Pb, Sn, Ge) IIIA족(Sc, Y, 란타나이드 및 악티나이드), IIIB족(B, Al, Ca, In, Tl), IA족 알칼리 금속(Li, Na, K, Rb, Cs, Fr), 및 IIA족 알칼리 토금속(Be, Mg, Ca, Sr, Ba, Ra) 및 전이금속(이에 한정되지는 않음)];

<150> 방사핵종[예: 악티나이드 또는 란타나이드 또는 기타 유사한 전이 원소, 또는 기타 원소로부터 생성되는 것(^{47}SC, ^{67}CU, ^{67}Ga, ^{82}Rb, ^{89}Sr, ^{88}Y, ^{90}Y, ^{99m}TC, ^{105}Rh, ^{109}Pd, ^{111}In, ^{115m}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{140}Ba, ^{140}La, ^{149}Pm, ^{153}Sm, ^{159}Gd, ^{166}Ho, ^{175}Yb, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{194}Ir, 및 ^{199}Au, 바람직하게는 ^{88}Y, ^{90}Y, ^{99m}Tc, ^{125}I, ^{131}I, ^{153}Sm, ^{166}Ho, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{67}Ga, ^{111}In, ^{115m}In, 및 ^{140}La(이에 한정되지는 않음)];

<151> 신호 발생제[그 존재로 인하여 검출가능하고 측정가능한 시스템의 혼란을 일으키는 것 어느 것이라도 포함한다. 신호 발생제는 검출가능한 양의 에너지를 전자선(예: X-선, 자외(UV)선, 적외(IR)선 등) 형태로 방출하는 물질로서 정의할 수 있고, 인광체 및 형광체, 및 감마 및 X-선 방출제, 또는 물질(예: 중성자, 양전자. β-입자 α-입자 등)을 포함하고, 방사핵종, 양전자 방출제 등을 포함하고, 그 예는 형광체, 인광체 및 방사선(예: 방사핵종, 입자 및 방사선원), 및 신호 발생제를 포함하지만 이로 한정되지 않는 상기 물질 하나 이상으로 표지된 뉴클레오타이드, 독소 또는 약제이며, 이에 한정되지는 않음];

<152> 신호 반사제[예: 상자성체 또는 자성체(예컨대, Fe, Gd, 또는 Mn), 니트록실 라디칼, NMR 이동시약(예: Eu 또는 Pr 염)(이에 한정되지는 않음)];

<153> 킬레이트화 금속[예: 킬레이트화제와 회합할 때 방사성이건 아니건 관계없이, 상기 임의의 금속 또는 그의 이온, 즉 콘트라스트제, 상자성체 또는 자성체, 금속 이온(이에 한정되지는 않음)];

<154> 신호 흡수제는 검출가능한 양의 에너지를 전자선 또는 전자물질 형태로 흡수하는 물질로서 정의할 수 있다. 몇몇 예로는 염료, 콘트라스트제. 전자빔 불투과제, 방향족 UV 흡수제, 및 붕소(중성자를 흡수함)가 있다. 주어진 물질은 신호 흡수제 및 신호 발생제 둘다일 수 있다. 즉, 형광성 또는 인광성 물질은 빛을 흡수하고 방출할 수 있고; 붕소는 중성자를 흡수하고 방사선을 방출할 수 있고, 이 밖에도 하기와 같은 많은 예가 있다. 예컨대, 콘트라스트제(예컨대, Gd, Mn 또는 Fe), 및 전자빔 불투과제(예: Pb 또는 Fe)(이들로 한정되지 않음); 항체(단클론성 항체 및 항-특이형 항체(anti-idiotype antibody)를 포함);

<155> 항체 단편 ;

<156> 호르몬;

<157> 생물반응 개질제(즉, 자극에 대한 생물체의 반응을 바꾸는 생물활성 약제(예: 인터루킨, 인터페론, 종양괴사인자, 과립세포 콜로니 자극 인자, 바이러스, 바이러스 단편 및 기타 유전물질, 이에 한정되지는 않음);

<158> 진단용 불투과제(예: 상기 신호 흡수제, 생체 염색제 등),

<159> 형광성 잔기; 및

<160> 소거제(예: 킬레이트화제 항원, 항체, 또는 치료 또는 진단 약제를 선택적으로 소거할 수 있는 잔기).

<161> 다른 태양에 있어서, 본 원에 "M"으로 나타낸 운반물질은 농업용 물질이다. 조밀 별형 콘쥬게이트에 사용하기에 적합한 이러한 물질에는 덴드리머의 물리적 상태를 거의 방해하지 않으면서 조밀 별형

덴드리머와 회합될 수 있는 식물 또는 비포유동물(미생물을 포함)의 생체내, 생체의 또는 시험관내 치료, 진단 또는 적용하는 임의의 물질이 포함된다. 예를 들어, 운반물질은 하기일 수 있다:

<162> 독소[예: 디프테리아 독소, 겔로닌, 엑소톡신 A, 아브린, 모덱신, 리신 또는 이들의 독성 단편(이에 한정되지는 않음)];

<163> 금속 이온[예: 약학 운반물질의 경우 상기 기술된 것];

<164> 방사핵종[예: 악티나이드 또는 란타나이드 또는 기타 유사한 전이 원소, 또는 기타 원소로부터 생성되는 것(^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{82}Rb, ^{89}Sr, ^{88}Y, ^{90}Y, ^{99m}Tc, ^{105}Rh, ^{109}Pd, ^{111}In, ^{115m}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{140}Ba, 140La, ^{149}Pm, ^{153}Sm, ^{159}Gd, ^{166}Ho, ^{175}Yb, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{194}Ir, 및 ^{199}Au), 또는 약학 운반물질의 경우 상기 기술된 것];

<165> 신호 발생제[그 존재로 인하여 검출가능하고 측정가능한 시스템의 혼란을 일으키는 것을 포함함(예: 형광체, 인광체 및 방사선, 또는 약학 운반물질의 경우 상기 기술된 것];

<166> 신호 반사제[예: 상자성 물질(예컨대, Fe, Gd, 또는 Mn), 또는 약학 운반물질의 경우 상기 기술된 것];

<167> 신호 흡수제[예: 콘트라스트제 및 전자빔 불투과제(예컨대, Fe, Gd 또는 Mn). 또는 약학 운반물질의 경우 상기 기술된 것];

<168> 페로몬 또는 호르몬:

<169> 생물반응 개질제[예: 인터루킨, 인터페론 바이러스, 바이러스 단편 및 기타 유전물질; 항미생물제, 살조류제(algicides), 구충제, 살진드기제, 살충제, 유인제, 기피제(repellents), 제초제 및/또는 살진균제를 비롯한 농약(예: 아세페이트, 아시플루오르펜, 알라클로르, 아트라진, 베노밀, 벤타존, 캅탄, 카보푸란, 클로로피크린, 클로르피리포스, 클로르설푸론, 시아나진, 사이헥사틴, 사이퍼메트린, 2,4-디클로로페녹시아세트산, 달라폰, 디캄바, 디클로포프 메틸, 디플루벤주론, 디노셉, 엔도탈, 퍼밤, 플루아지포프, 글리포세이트, 할록시포프, 말라티온, 나프탈람, 펜디메탈린, 퍼메트린, 피클로람, 프로파클로르, 프로파닐, 세톡시딤, 테메포스, 터부포스, 트리플루랄린, 트리폴린, 지넵 등)]; 및

<170> 소거제[예: 킬레이트화제, 킬레이트화 금속(방사성이든지 아니든지), 또는 치료 또는 진단 약제를 선택적으로 소거할 수 있는 잔기].

<171> 다른 태양에 있어서. 본원에 "M"으로 나타낸 운반물질은 면역 증강제이다. 조밀 별형 콘쥬게이트에 사용하기 적합한 이러한 물질에는, 덴드리머의 물리적 상태를 거의 방해하지 않으면서 조밀 별형 덴드리머와 회합될 수 있는, 면역 반응을 일으키는 임의의 항원, 합텐, 유기잔기, 또는 유기 또는 무기 화합물이 포함된다. 예를 들어, 운반물질은 말라리아(미국 특허 제 4,735,799 호), 콜레라(미국 특허 제 4,751,064 호)및 요로 감염증(미국 특허 제 4,740,585 호)에 대한 백신의 제조에 사용되는 합성 펩티드, 항세균성 백신 제조용 세균 다당류(미국 특허 제 4,695,624 호),및 AIDS 및 간염과 같은 질환을 예방하기 위한 항바이러스성 백신 제조용 바이러스 단백질 또는 바이러스 입자일 수 있다.

<172> 면역증강제용 담체로서 조밀 별형 콘쥬게이트를 사용하면, 항원-담체에 거대분자 구조를 부여하기 위해 사용되는 종래의 공지 또는 합성 중합체 콘쥬게이트와 관련된 용량 및 구조가 모호하다는 단점이 없다. 면역증강제용 담체로서 조밀 별형 덴드리머를 사용함으로써 콘쥬게이트의 크기, 형태 및 표면 조성을 조절할 수 있다. 이들을 적절히 선택하여 생물체에게 항원 제공을 최적화시킴으로써, 통상의 보조제(adjuvants)를 사용하는 경우보다 높은 선택성 및 큰 친화력을 갖는 항체가 얻어진다. 조밀 별형 덴드리머에 다중 항원성 펩티드 또는 기를 연결시키는 것(예: T- 및 B-세포 항원결정기(epitope)의 결합)이 또한 바람직하다. 이러한 디자인으로 인해 개선된 백신을 얻는다.

<173> 면역 반응을 유발할 수 있는 농약 또는 오염원(예: 카바메이트 트리아진 또는 유기포스페이트 성분을 함유하는 것)을 조밀 별형 덴드리머에 콘쥬게이트화시키는 것 또한 바람직하다. 목적하는 농약 또는 오염원에 대해 생산된 항체를 표준 방법에 의해 정제하고, 적합한 지지체상에 고정화시킨 후, 환경 또는 생물체내의 농약 또는 오염원을 검출하는 데 사용할 수 있다.

<174> 또 하나의 태양에서, 조밀 별형 콘쥬게이트에 사용하기에 적합한 운반물질(본원에서 "M"으로 표시)에는, 덴드리머의 물리적 상태를 거의 방해하지 않고 조밀 별형 덴드리머와 회합될 수 있는, 농업용 또는 약학용 물질이 아닌 물질, 예컨대 하기가 포함된다:

<175> 금속 이온[예: 알칼리 및 알칼리 토금속, 자성 내부, 또는 전술한 약학 운반물질의 경우와 같은 것];

<176> 신호 발생제[그 존재로 인하여 검출가능하고 측정가능한 시스템의 혼란을 일으키는 것을 포함함(예: 형광발생 물체, 인광체 및 방사선원, 또는 전술한 약학 운반물질의 경우와 같은 것];

<177> 신호 반사제[예: 상자성체(예컨대, re, Gd, 또는 Mn), 또는 전술한 약학 운반물질의 경우와 같은 것];

<178> 신호 흡수제[예: 콘트라스트제 및 전자빔 불투과제(예컨대, Fe, Gd 또는 Mn, 또는 전술한 약학 운반물질의 경우와 같은 것];

<179> 방향성 물질;

<180> 염료 물질 등; 및

<181> 소거제[예: 킬레이트화제 또는 다향한 약제를 선택적으로 소거할 수 있는 잔기].

<182> 바람직하게는 운반물질은 생물활성 약제이다. 본원에 사용된 "생물활성"이란 용어는 표적화된 물

질(예: 단백질, 유전자, 당단백질, 지질단백질, 지질), 표적화된 세포, 표적화된 기관, 표적화된 생물체[예컨대, 미생물, 식물 또는 동물(인간과 같은 포유동물을 포함)] 또는 기타 표적화된 잔기를 검출, 확인, 저해, 치료, 촉매 조절, 괴사, 중진 또는 개질시킬 수 있는 활성 물질(예: 분자, 원자, 이온 및/또는 다른 물질)을 의미한다.

<183> 일반식 (I)의 조밀 별형 콘쥬게이트는, 일반적으로 운반물질(M)과 조밀 별형 덴드리머(P)의 회합을 용이하게 하는 온도의 적절한 용매중에서 P를 M과 반응시킴으로써 제조된다.

<184> 적절한 용매는 P 및 M이 최소한 부분적으로 혼화성인 용매이며, 이 용매는 콘쥬게이트의 제조에 불활성이다. P 및 M이 최소한 부분적으로 서로 혼화성이라면, 용매가 필요없을 수 있다(예컨대, 반응이 순수함). 필요하다면, 적절한 용매 혼합물을 사용할 수 있다. 이러한 적절한 용매의 예는 물, 메탄올, 에탄올, 클로로포름, 아세토니트릴, 톨루엔, 디메틸설폭사이드 및 디메틸포름아미드이다.

<185> 일반식 (I)의 조밀 별형 콘쥬게이트를 제조하기 위한 반응 조건은 특정한 덴드리머(P), 운반물질(M), 및 형성된 결합(*)의 특성에 따라 다르다. 예를 들어, P가 알킬렌(예컨대, 메틸렌) 카복실레이트 표면을 갖는 PEI(폴리에틸렌이민) 조밀 별형 덴드리머이고, M이 방사핵종(예컨대, 이트륨)이라면, 반응은 실온의 물중에서 수행한다. 그러나, P가 에스테르 말단의 폴리아미도아민(PAMAM) 조밀 별형 덴드리머이고, M이 아스피린이라면, 반응은 실온의 클로로포름중에서 수행한다. 전형적으로, 온도는 실온 내지 환류 온도일 수 있다. 특정한 용매 및 온도의 선택은 당해 분야의 숙련자라면 알 수 있을 것이다.

<186> M:P 비는 덴드리머의 크기 및 운반물질의 양에 따라 달라진다. 예를 들어, 임의의 이온성 M 대 P의 몰비(몰의 비율)는 보통 0.1 내지 1,100:1, 바람직하게는 1 내지 50:1, 더욱 바람직하게는 2 내지 6:1이다. 임의의 약제, 농약, 유기물 또는 독소 M 대 P의 중량비는 보통 0.1 내지 5:1, 바람직하게는 0.5 내지 3:1이다.

<187> M이 방사핵종인 경우, 조밀 별형 콘쥬게이트를 제조할 수 있는 3가지 방법이 있다. 즉, (1) P를 킬레이트화제로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 메틸렌카복실레이트 표면을 갖는 PEI 또는 PAMAM은 이트륨 또는 인듐 같은 금속을 킬레이트화한다. (2) 킬레이트를 P에 공유결합시킬 수 있다. 예를 들어,아민 말단의 PEI 조밀 별형 덴드리머를 1 -(p-이소티오시아네이토벤질)디에틸렌트리아민펜타아세트산과 반응시킨 다음 킬레이트화시키거나, 또는 착체[예: 이소티오시아네이토벤질-2,3,2-테트(즉, 6-[4-(이소티오시아네이토벤질)]-1,4,8,11-테트라아자운데칸; 유럽 특허 공개 공보 제 0296522 호에 개시됨)로 킬레이트화된 로듐 클로라이드]를 반응시킬 수 있다. (3) 예비킬레이트화된 방사핵종을 소수성 또는 이온성 상호작용에 의해 P와 회합시킬 수 있다.

<188> 약학 물질과 함께 사용하기에 특히 바람직한 다른 조밀 별형 콘쥬게이트는 표적 지향제(본원에서 "T"로 표시)를 함유하고, 하기 일반식(II)으로 표현되는 콘쥬게이트이다:

$$(T)_e*(P)_x*(M)_y \qquad (II)$$

<190> 상기 식에서,

<191> 각 T는 표적 지향제이고;

<192> e는 1 이상의 정수이고;

<193> P, x, *, M 및 y는 상기에서 정의한 바와 같고;

<194> 단, M은 그 효능을 유지한다.

<195> 일반식 (II)의 조밀 별형 콘쥬게이트 중 바람직한 것은 M이 약제, 농약. 방사핵종, 킬레이트화제, 킬레이트화 금속, 독소, 신호 발생제, 신호 반사제 또는 신호 흡수제인 것이다. e가 1 또는 2인 콘쥬게이트; 및 x가 1이고 y가 2 이상인 콘쥬게이트도 또한 바람직하다. x가 1이고, e가 1이며, y가 2 이상이고, M 및 T가 동일하거나 또는 상이한 연결기에 의해 중합체와 회합된 콘쥬게이트가 특히 바람직하다.

<196> 또한, 일반식 (II)의 T 및/또는 M을 피복시키거나 또는 차폐시켜, 예컨대 간에 의한 면역원성 또는 RES 반응을 예방할 수 있다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 약제에는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 당해 분야에 공지된 기타 물질이 포함된다.

<197> 일반식 (II)의 조밀 별형 콘쥬게이트는 T*P를 형성시킨 후 M을 첨가하거나, 또는 P*M을 형성시킨 후 T를 첨가함으로써 제조한다. 어느 반응 과정이든지, 특정한 콘쥬게이트 성분에 해가 되지 않는 조건(예: 특정 pH, 온도 또는 염 농도)하에 필요하다면, 적합한 용매의 존재하에 수행한다. pH를 조절하기 위하여, 완충액을 사용하거나, 또는 적합한 산 또는 염기를 첨가한다. 반응 조건은 형성된 회합의 유형(*), 사용된 조밀 별형 덴드리머(P), 운반물질(M) 및 표적 지향제(T)에 따라 다르다. 예를 들어, T가 단클론성 항체이고 M이 킬레이트화된 방사핵종이라면, T*P 회합은 작용기(예: 물중 이소티오시아네이트; 또는 아세토니트릴 또는 디메틸포름아미드 같은 유기 개질제를 함유한 물중 이소티오시아네이트)에 의해 이루어진다. 보통, 콘쥬게이트화는 pH 7 내지 10, 바람직하게는 pH 8.5 내지 9.5의 완충액중에서 이루어진다. 그 다음, 바람직하게는 실온에서, 형성된 콘쥬게이트를 방사핵종(예: 이트륨 아세테이트)으로 킬레이트화시킨다. 또 다르게는, P 및 M을 T에 콘쥬게이트화시키기 전에, 일반적으로 물중에서 킬레이트화시킬 수 있다. T와의 콘쥬게이트화 반응은 적합한 완충액내에서 수행한다.

<198> T:P의 몰비는, 특히 T가 항체 또는 항체 단편일 경우, 바람직하게는 1:1이다. M:P의 몰비는 상기와 같다.

<199> 조밀 별형 콘쥬게이트를 표적화시킬 수 있는 표적 지향제는, 본 발명의 조밀 별형 콘쥬게이트에 사용될 때 상기 조밀 별형 콘쥬게이트의 적어도 일부가 목적하는 표적(예컨대, 단백질, 유전자, 당단백질, 지질단백질, 지질, 표적화된 세포, 표적화된 기관, 표적화된 생물체 또는 기타 표적화된 잔

기)에 전달되도록 하는 물질이며, 항체(바람직하게는 단클론성 항체), 항체 단편(예: Fab, Fab', $F(ab')_2$ 단편 또는 필수의 표적 특이성을 갖는 다른 항체 단편), 호르몬, 생물반응 개질제; 항원결정기; 표적 특이성을 나타내는 화학 작용기 등을 포함한다.

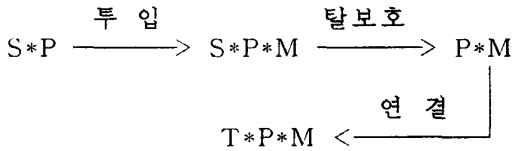
<200> 본원에 기술된 바람직한 조밀 별형 콘쥬게이트에 사용될 수 있는 항체 또는 항체 단편은 당해 분야에 널리 공지된 기법에 의해 제조할 수 있다. 적합한 항체의 예는 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE 같은 면역글로불린이다. 고특이성의 단클론성 항체는 당해 분야에 널리 공지된 혼성화 기법(예컨대, 콜러(Kohler) 및 밀스타인(Milstein)의 문헌[Nature 256: 495-497, 1975]; 및 문헌[Eur. J. Immunol. 6: 511-519, 1976]을 참조)에 의해 제조할 수 있다. 이러한 항체는 일반적으로 매우 특이적인 반응성을 가질 수 있다.

<201> 항체 표적화된 조밀 별형 콘쥬게이트에서, 임의의 항원 또는 합텐에 대하여 정해진 항체를 사용할 수 있다. 통상의 다클론성 항체를 사용할 수도 있으나, 단클론성 항체는 몇 가지의 이점을 제공한다. 선택된 단클론성 항체는 단 하나의 항원결정기에 대해 매우 특이적이다. 또한, 다량의 각 단클론성 항체는 조직배양(예컨대, 하이브리도마(hybridoma) 세포주)에 의해 제조할 수 있다. 본 발명에 사용된 항체는, 예컨대 종양, 세균, 진균, 바이러스, 기생충, 마이코플라스마, 분화 및 기타 세포막 항원, 폴리핵산(예: DNA 또는 RNA), 병원체 표면 항원, 독소, 효소, 알러지항원, 약제 및 임의의 생물활성 분자에 대하여 정해질 수 있다. 더욱 완전한 항원의 리스트는 미국 특허 제 4,193,983 호를 참조한다.

<202> 더 많은 항체 또는 단편을 덴드리머에 콘쥬게이트화시키는 것, 특히 상이한 특이성을 갖는 항체를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 종양에 위치하여 결합한 후 순환하는 세포독성, 진단성 또는 생물정력학적(biostatic) 화합물을 소거할 수 있는 능력을 갖는, 이작용성 콘쥬게이트를 디자인할 수 있다.

<203> 표적 지향제의 부재하에(또는 필요하다면 표적 지향제의 존재하에), 덴드리머의 표면 또는 근처에 위치할 수 있는 작용기 수로 인해, 이러한 모든(또는 상당 부분) 작용기는 음이온성, 양이온성, 소수성 또는 친수성으로 되어, 반대 전하를 갖는 목적하는 표적, 또는 소수성 또는 친수성의 상용가능한 표적으로의 조밀 별형 콘쥬게이트의 전달을 효과적으로 도울 수 있다.

<204> 보호된 핸들(handle)(S)을 갖는 P를 사용하는 일반식 (II)의 콘쥬게이트의 제조방법 역시 일반식 (II)의 콘쥬게이트를 제조하는 방법에 따른다. 반응식은 하기와 같다.



<206> 상기 식에서,

<207> S*P는 보호된 덴드리머이고;

<208> S*P*M은 M과 콘쥬게이트화된, 보호된 덴드리머이고;

<209> P*M은 M과 콘쥬게이트화된, 탈보호된 덴드리머(조밀 별형 콘쥬게이트)이며;

<210> T*P*M은 표적 지향제와 연결된 조밀 별형 콘쥬게이트이다.

<211> P*M에 악영향을 미치지 않는 적합한 용매를 사용할 수 있다. 예를 들어, S가 3급-부톡시카보닐인 경우, P*M은 수성 용매중에서 안정하고, S는 수성 산에 의해 제거할 수 있다.

<212> 운반물질이 약학 물질인 경우, 중합체가 직접 또는 연결기에 의해 회합된 조밀 별형 콘쥬게이트가 또한 바람직하며; 이들 조밀 별형 콘쥬게이트는 하기 일반식(III)으로 나타내진다:

$$[(T)_e\text{-}(C')_f]_g\text{*}(P)_x\text{*}[(C'')_h\text{-}(M_y)]_k \qquad \text{(III)}$$

<214> 상기 식에서,

<215> 각 C'는 동일하거나 또는 상이한 연결기이고;

<216> 각 C"는 동일하거나 또는 상이한 연결기이고;

<217> g 및 k는 각각 독립적으로 1 이상의 정수이고;

<218> f 및 h는 각각 독립적으로 0 이상의 정수이고;

<219> -은 연결기가 존재할 경우 공유결합을 나타내고;

<220> P, x, *, M, y, T 및 e는 상기에서 정의한 바와 같고,

<221> 단, M은 그 효능을 유지한다.

<222> 일반식 (III)의 조밀 별형 콘쥬게이트 중 바람직한 것은 M이 방사핵종, 약제, 독소, 신호 발생제, 신호 반사제 또는 신호 흡수제인 것이다. x가 1인 콘쥬게이트가 또한 바람직하다. 특히 바람직한 콘쥬게이트는 x, e, f, h 및 y가 각각 1이고, g가 1 이상이고, k가 2 이상인 것이다. 가장 바람직한 것은 x, e, f, h, y 및 g가 각각 1이고, k가 2 이상인 것이다. 또한 특히 바람직한 것은 M이 생물활성 약제(예: 방사핵종, 약제 또는 독소)인 조밀 별형 콘쥬게이트이다.

<223> C"로 나타낸 적합한 연결기는 조밀 별형 콘쥬게이트에 존재하는 운반물질의 효능 또는 표적 지향제(들)의 효능을 거의 손상시키지 않으면서 덴드리머에 운반물질을 연결시키는 기이다. 이들 연결기는 운

반물질의 활성 유형에 따라 안정하거나(즉, 절단불가능함) 또는 절단가능해야 하며, 전형적으로는 운반물질과 중합체사이의 입체장해를 피하기 위하여 사용된다.

<224> 가장 바람직한 콘쥬게이트는 덴드리머가 직접 또는 연결기(들)에 의해, 하나의 항체 또는 항체 단편과 회합된 것이다. 이들 바람직한 콘쥬게이트중의 중합체는 또한, 임의적으로 직접 또는 연결기(들)에 의해, 하나 이상의 다른 운반물질, 바람직하게는 방사성 동위원소와 회합될 수 있다. 이러한 조밀 별형 콘쥬게이트는 하기 일반식(IV)으로 나타내진다.

$$[(\text{항체})_e\text{-}(C')_f]_g\text{*}(P)_x\text{*}[(C'')_h\text{-}(M)_y]_k \qquad (IV)$$

<226> 상기 식에서,

<227> 각 항체는 원하는 항원결정기와 상호작용할 수 있는 항체 또는 항체 단편이고;

<228> -는 연결기가 존재할 경우, 공유결합 또는 쿨롱 결합을 나타내고;

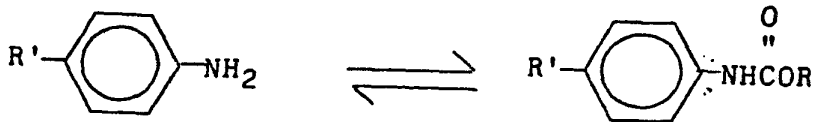
<229> P, x, *, M, T, e, y, C', C", g, k, f 및 h는 상기에서 정의한 바와 같고;

<230> 단, M은 그 효능을 유지한다.

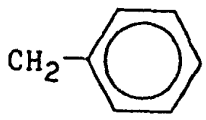
<231> 표적 지향제(T)와의 연결에 이용가능한 작용기(C' 또는 C")를 갖는 조밀 별형 덴드리머(P)의 상기 합성방법에 있어서, 바람직한 방법은 반응성 작용기를 합성 선구물질로서 보호시키는 것을 필요로 한다. 이러한 보호는 매우 고품질의 덴드리머 또는 콘쥬게이트의 합성을 가능하게 하기 때문에 바람직하다. 이 방법은 연결 작용기와 달리 반응되도록 하여 표적 지향제(T)에 결합하지 못하게 하는 방식으로, 한 단위의 운반되는 약학 물질(M)이 조밀 별형 덴드리머(P)의 말단 작용기에 화학결합되게 한다. 이어서, 원하는 연결 작용기로 탈보호 또는 합성 전환시킴으로써 조밀 별형 콘쥬게이트를 표적 지향제에 연결될 수 있게 한다.

<232> 바람직한 "연결 작용기"(이하부터 "핸들"이라고 칭함) 중 하나는 아닐린 잔기이다. 이 기는 표적 지향제에 연결시키는 데 직접 사용될 수 있거나, 또는 표적 지향제와 반응하기에 적합한 다른 작용기(예컨대, 이소티오시아네이트, 이소시아네이트, 세미티오카바지드, 세미카바지드, 브로모아세트아미드, 요오도아세트아미드 및 말레이미드)로 쉽게 개질될 수 있기 때문에 바람직하다. 아닐린 잔기는 조밀 별형 덴드리머 합성에 사용하기 위하여 쉽게 보호될 수 있기 때문에 표적 지향제와 연결하기 위한 핸들로서도 역시 바람직하고, 또는 니트로기 역시 합성의 마지막에 원하는 아미노 작용기로 전환될 수 있는 선구물질로서 사용될수 있다.

<233> 조밀 별형 덴드리머 합성과정 동안 아닐린의 아미노 작용기를 보호하기에 적합한, 다수의 보호기가 있다(그린(Theodora W. Green)의 문헌[Protective Groups In Organic Synthesis, Pub. John Wiley & Son. 뉴욕, 1981]을 참조). 바람직한 보호기의 종류는 R'가 덴드리머인 하기의 카바메이트이다.

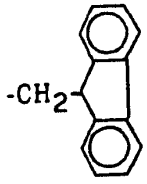


<235> 아민을 보호하기 위하여 많은 카바메이트가 사용되어 왔다. 스타버스트™ 덴드리머 합성에 가장 바람직한 카바메이트는 3급-부톡시카바메이트(R이 $-C(CH_3)_3$임)이다. 탈보호는 온화한 산 가수분해에 의해

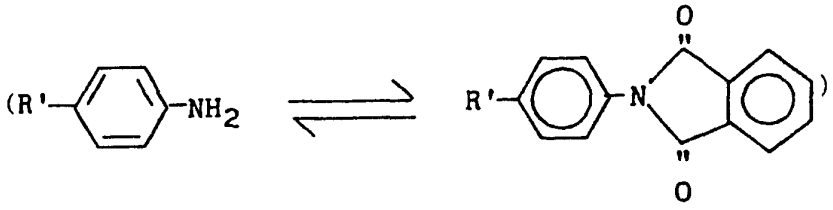


이루어진다. 벤질카바메이트 보호기(R이 임)가 또한 바람직하며, 이는 덴드리머가 산 가수분해되기 쉬운 경우에 바람직하다. 탈보호는 촉매적 수소화반응에 의해 이루어진다.

<236> 원하는 세대의 반응성 잔기를 보호하는 데 사용될 수 있는 다른 보호기에는 9-플루오레닐메틸카



바메이트(R이 임), 및 프탈이미드 보호기

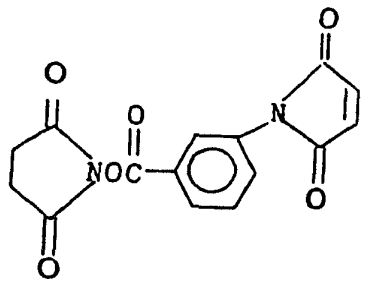
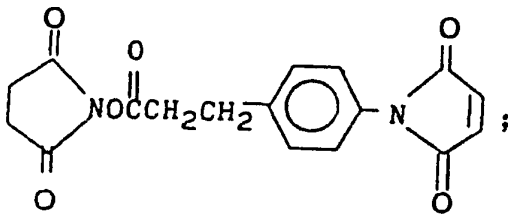
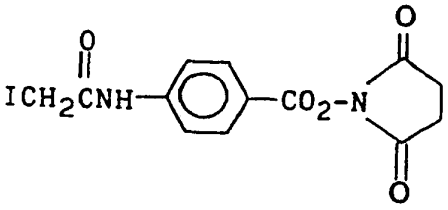
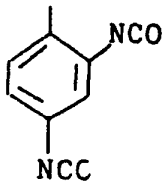


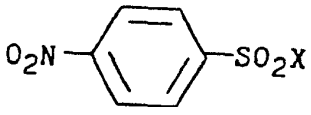
가 포함된다.

<237> 문헌에 널리 공지되어 있는, 아민에 사용하는 다른 보호기 역시 상기 합성 도식에 사용될 수 있다. 상기 바람직한 것은 대표적인 예로서 제공된 것이며, 사용할 수 있는 유일한 보호기인 것은 아니다. 반응 조건하에 안정하고, 조밀 별형 덴드리머의 보전성을 변화시키지 않으면서 제거할 수 있는 보호기를 사용할 수 있다.

<238> 또 다른 방법은 활성화된 아릴 할라이드(예컨대, 4-니트로플루오로벤젠 2,4-디니트로플루오로벤

젠)를 콘쥬게이트용 약제(예컨대, 조밀 별형 폴리에틸렌이민. PEI)상의 아미노-작용기와 반응시킨 후, 후속적인 콘쥬게이트화를 위해 니트로기를 아닐린 작용기로 촉매적 수소화 반응시키는 것을 포함한다. 니트로페닐 작용기는 모든 비환원성 반응 조건에 대하여 비교적 화학적으로 불활성이기 때문에, 사용하기 전에 추가의 개질이 필요한 약제(예컨대, 폴리아민)에 특히 유용하다. 콘쥬게이트화 반응에 적합한 다양한 커플링제(예: 1991년 6월 5일자로 공개된 유럽 특허 공개 공보 제 0430863호에 기술된 것)는 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 많은 반응 조건하에서 반응성이고 콘쥬게이트화에 사용될 수 있는 보다 일반적인 이작용성 연결제(예컨대, 활성 에스테르 또는 디이소시아네이트)에는 하기와 같은 것이 포함된다:


;

;

; 및

.


)를 사용하여 설폰아미드를 제공하는 것을 포함한다.

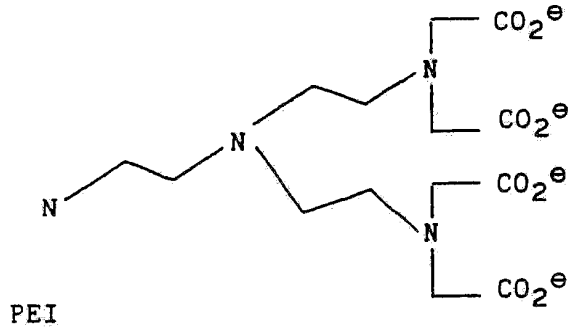
<240> 본 발명은 또한 니트로-치환된 아릴설포닐 할라이드(예컨대,

<241> 콘쥬게이트화시키기 위해 아미노페닐기를 도입시키는 공지 방법에 비하여, 상기 방법은 합성의 후반 단계에서 일어난다는 이점을 갖는다. 간소우(Gansow) 등의 방법(미국 특허 제 4,472,509 호)은 긴 합성과정의 초기 단계에 니트로페닐기를 도입하였고, 이로 인해 이용가능한 화학성에 제한이 있었다.

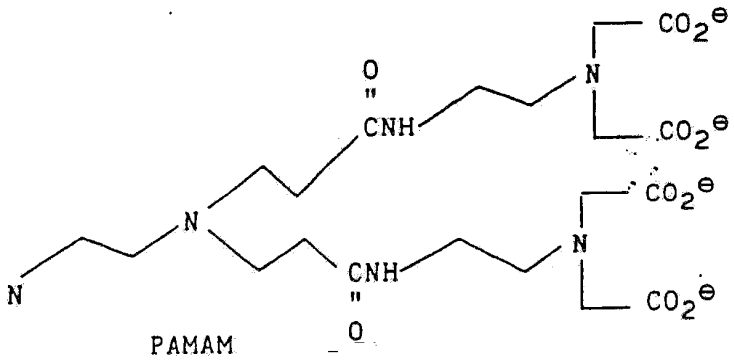
<242> 이 방법은 또한 나머지 다른 분자와 분명히 구별되는 핸들을 도입한다. 마나베(Manabe) 등은 잔여 아민에 의해 숙신산 무수물을 개환시켜 커플링기를 제공하고, 이로써 항체와의 콘쥬게이트화가 가능하였음을 개시하였다. 그러나, 이 방법은 킬레이트화기가 연결기와 동일하기 때문에, 중합체상의 임의의 비킬레이트화된 부위간의 구별 수단을 제공하지 않았다.

<243> 상기 방법은 아미노기를 함유하는 임의의 약제에 아미노페닐 작용기를 도입하여, 몇몇 생물활성 약제(예컨대, 단클론성 항체 또는 효소)와 콘쥬게이트화시킬 수 있다. 이 약제는 생물활성 약제(예컨대, 항체)의 탄수화물과의 산화성 커플링에 의해 콘쥬게이트화될 수 있다. 아미노페닐기는 또한 생물활성 약제의 리신 잔기의 측쇄 아미노와의 후속 반응을 위해 이소티오시아네이트 또는 이소시아네이트로 전환될 수 있다.

<244> 본 발명의 방법은 또한, 바람직하게는 PEI 아세테이트 덴드리머에 의해, 스타버스트™ 덴드리머와 란타나이드의 직접적인 킬레이화를 제공한다. 반면에, 덴케월터의 미국 특허 제 4,289,872 호에는 그가 제조한 중합체의 표면에 아세테이트를 단지 위치시킨다고 기술되어 있다. 그러나. 본 반응은 PEI 아세테이트가 PAMAM보다 훨씬 양호하게 작용함을 나타낸다. 즉, 이미노디아세테이트의 표면은 단지 층의 일부분일 뿐이며, 골격 특성 및 분지가 또한 매우 중요하다. 하기 PEI 아세테이트는 하기 PAMAM 아세테이트보다 양호한 킬레이트화 특성을 갖는다:



PEI



PAMAM

<246> 일반식 (IV)의 조밀 별형 콘쥬게이트 중 바람직한 것은 M이 방사핵종, 약제, 독소, 신호 발생제, 신호 반사제 또는 신호 흡수제인 것이다. x가 1인 콘쥬게이트가 또한 바람직하다. x, e. f, h 및 y가 각각 1이고, g가 1 이상이며, k가 각각 독립적으로 2 이상인 콘쥬게이트가 특히 바람직하다. x, e, f, h, y 및 g가 각각 1이고, k가 2 이상인 콘쥬게이트가 가장 바람직하다. T가 단클론성 항체 또는 그의 항원결정기 결합 단편인 조밀 별형 콘쥬게이트 또한 특히 바람직하며; M이 생물활성 약제(예: 방사핵종, 약제 또는 독소)이고 T가 표적 지향제(예: 항체, 단클론성 항체 또는 항체 단편, 바이러스 단편, 단일쇄 DNA, 폴리핵산 또는 유전자 단편)이거나, 또는 T가 존재하지 않는 것이 특히 바람직하다.

<247> 조밀 별형 콘쥬게이트는 다양한 시험관내 또는 생체내 진단 용도(예: 방사성면역측정법, 전자현미경법, 효소결합 면역흡착 측정법, 핵자기공명 분광측정법, 콘트라스트 형상화 및 면역섬광계수법); 분석 용도; 치료용도(암, 자가면역질환, 유전자 결함, 중추신경계 장애, 감염질환 및 심장 장애와 같은 질환의 치료에 사용하기에 적합한 항생물질, 방사핵종, 약제 또는 기타 약제의 담체로서); 생물억제 용도(제초제, 살진균제, 기피제, 유인제, 항미생물제 또는 기타 독소와 같은 농약을 전달하는 수단으로서)에 사용할 수 있거나, 또는 기타 유용한 약제를 제조하기 위한 출발물질로서 사용할 수 있다.

<248> 본 발명은 또한 조밀 별형 콘쥬게이트가 다른 적합한 비히클과 함께 제형화된 조밀 별형 콘쥬게이트 조성물에 관한 것이다. 조밀 별형 콘쥬게이트 조성물은 임의적으로는 다른 활성성분, 부가제 및/또는 희석제를 함유할 수 있다. 본 발명의 주사가능한 조성물은 현탁액 또는 용액 형태일 수 있다. 용액 형태에서, 착체는 생리학적으로 허용가능한 담체내에 용해되어 있다. 이러한 담체는 적합한 용매, 필요에 따라 보존제(예: 벤질 알콜) 및 완충액을 포함한다. 유용한 용매에는, 예컨대 물, 수성 알콜, 글리콜 및 포스포네이트 또는 카보네이트 에스테르가 포함된다. 덴드리머 약제 콘쥬게이트는 또한 소포 또는 리포좀내에 도입될 수 있다. 또한 콘쥬게이트는 분해가능하거나(즉, 락트산-글리콜산 공중합체 또는 폴리무수물 중합체) 또는 분해불가능한(에틸렌-비닐아세테이트 공중합체) 중합체성 숙주 시스템내에 캡슐화될 수 있다. 또한, 콘쥬게이트는 폴리(하이드록실에틸메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)을 포함하는 하이드로겔 메트릭스내에 도입될 수 있다. 다양한 장용제피(enteric coating)시스템을 사용하여 덴드리머 약제 콘쥬게이트가 위를 통과하는 것을 도울 수 있다.

<249> 덴드리머 약제 콘쥬게이트는 당해 분야의 숙련자에게 공지된 결합제를 사용하여 정제로 제형화될 수 있다. 이러한 투여 형태는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 18판, 1990, Mack Publishing Company, 펜실바니아 이스턴 소재]에 기술되어 있다. 적합한 정제에는 압축 정제, 당의정, 필름-코팅정, 장용피정, 다층의 압축 정제, 방출-조절 정제 등이 포함된다.

<250> 장용피 정제가 본 발명의 실시에 특히 유리하다. 장용제피막은 위안에서 완전한 상태로 잔류하지만, 소장에 도달하면 용해되어 제형의 내용물을 방출시킨다. 장용제피의 목적은 위의 내용물에 의해 불활성화되거나 또는 위점막을 자극함으로써 구역질 또는 출혈을 일으킬 수 있는 약제의 방출을 지연시키는 것이다. 이 외에, 이러한 피막을 사용하면, 장용성 피막위에 도포된 다른 약제는 위내에서 방출되는 한편 피막에 의해 보호된 나머지는 더 아래의 위장관에서 방출되는, 단순한 반복-작용 효과를 제공할 수 있다. 장용성 피막의 작용은 pH 및 효소적 특성면에서 위 및 장 각각의 환경 조성 차이에 기인한다. 장내 효소에 의해 분해되는 피복제를 제조하려는 시도가 되풀이되어 왔지만, 필름의 효소적 분해는 보다 느리기 때문에 상기 접근법은 보편적이지 못하다. 따라서, 가장 일반적으로 사용되는 장용성 피막은 위의 낮은 pH 환경에서는 분해하지 않고 남아 있지만, pH가 약 4 또는 5로 상승하면 쉽게 이온화되는 것이다. 가장 효과적인 장용성 중합체는 pK가 3 내지 5인 다가산(polyacid)이다.

<251> 장용피 정제를 제조하기에 유용한 중합체에는 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트, 폴리비닐 아세테

이트 프탈레이트, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스 프탈레이트, 메타크릴산 에스테르 공중합체 등이 포함된다.

<252> 본 발명의 농업용 물질의 태양에 있어서, 조밀 별형 콘쥬게이트는 농업(예: 곡물 또는 휴한지의 처리, 또는 농약으로서, 또는 동물의 생체내 또는 시험관내 시험의 처리)에 유용한 적합한 비히클로 제형화시킬 수 있다. 하나 이상의 본 발명의 조밀 별형 콘쥬게이트와 함께 존재할 수 있는, 농업적으로 허용가능한 담체 또는 희석제에는 과립 제제, 유화가능한 농축물, 용액 또는 현탁액에 통상 사용되는 담체 또는 희석제(예컨대, 톨루엔, 크실렌, 벤젠, 페놀, 물, 메탄, 탄화수소, 나프탈렌 등)가 포함된다.

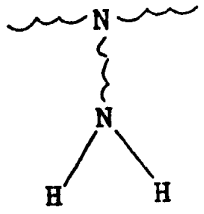
<253> 본 발명의 조밀 별형 콘쥬게이트에 사용하기에 바람직한 조밀 별형 중합체는 코어로부터 뻗어나온 하나 이상의 분지(이하부터 코어 분지라고 칭함), 바람직하게는 2개 이상의 분지를 가지고,이 때 상기 분자가 하나 이상의 말단기를 가지며, 단, (1) 말단기 대 코어 분지의 비가 1 보다 크고, 바람직하게는 2 이상이고, (2) 중합체 단위용적당 말단기의 밀도가, 유사한 코어 및 단량체 잔기를 갖고 동등한(comparable) 분자량 및 코어 분지 수를 갖는 연장된 통상의 별형 중합체의 1.5배 이상이고, 이 때 연장된 통상의 별형 중합체의 각 분지가 단 하나의 말단기를 가지며, (3) 분자용적이 상기 연장된 통상의 별형 중합체 분자용적의 약 80% 이하(눈금을 새긴 코레이-파울링-콜툰(scaled Corey-Pauling-Koltun, CPK) 분자 모델을 사용한 치수 연구에 의해 측정됨)인 조밀 별형 중합체로서 기술될 수 있는 중합체이다. 본원에 사용된 "별형 중합체" 또는 "덴드리머"를 수식하는 "조밀"이란 용어는 동일한 분자량을 갖는 연장된 통상(종래)의 별형 중합체보다 적은 분자 용적을 가짐을 의미한다. 조밀 별형 중합체와 비교하기 위한 기준으로서 사용된 연장된 종래의 별형 중합체는 조밀 별형 중합체와 동일한 분자량, 동일한 코어 및 단량체 성분 및 동일한 코어 분지 수를 갖는 것이다. "연장된"이란, 종래의 별형 중합체 개개의 분지가 그들의 최대 길이로 연장되거나 또는 신장됨을 의미한다. 또한, 말단기의 수는 종래의 별형 중합체 분자에서보다 조밀 별형 증합체 분자의 경우 더 큰 반면에, 말단기의 화학 구조는 동일하다.

<254> 본 발명의 콘쥬게이트에 사용된 덴드리머는 당해 분야에 공지된 방법에 의해 제조할 수 있다. 상기 덴드리머, 다양한 공반응물(coreactant) 및 코어 화합물 및 이들의 제조 방법은 미국 특허 제4,587,329 호에 기술된 대로일 수 있다. 예를 들어, 코어 화합물은 추가의 기가 결합될 수 있는 것일 수 있다[제 1 도 및 제 2(B) 도를 참조].

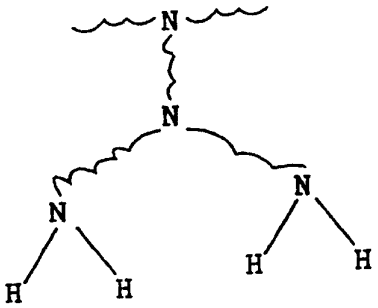
<255> 본 발명의 콘쥬게이트에 사용하기 위한 덴드리머는 부가반응 또는 치환반응시키기에 충분히 반응성인 말단기를 가질 수 있다. 이러한 말단기의 예로는 아미노, 하이드록시, 머캅토, 카복시, 알케닐, 니트릴, 알릴, 비닐 아미도, 할로, 우레아, 옥시라닐, 아지리디닐, 옥사졸리닐, 이미다졸리닐, 설포네이토, 실라닐, 포스포네이토, 크라운 에테르, 비피리딘, 클로로메틸페닐, 이소시아네이토 및 이소티오시아네이토가 있다. 예컨대 덴드리머 표면에 결합되는 다양한 길이의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 폴리아실폴리알킬렌이민(즉, 폴리아실폴리에틸렌이민)기를 사용하여 개질시켜, 말단기를 생물학적으로 불활성이 되도록, 예컨대 면역원성이 없도록 또는 간, 비장 또는 다른 기관에서의 비특이적인 흡수를 피하도록 할 수 있다. 덴드리머는 같은 코어 분지 수 및 코어 분지 길이를 갖는 종래의 연장된 별형 중합체보다 분자용적 단위당 말단기의 농도가 크다는 점에서 종래의 별형 또는 별형-분지 중합체와 구별된다. 따라서, 덴드리머의 단위용적당 말단기의 밀도는 보통 종래의 연장된 별형 중합체의 말단기 밀도의 1.5배 이상, 바람직하게는 5배 이상, 더욱 바람직하게는 10배 이상, 가장 바람직하게는 15 내지 50배이다. 조밀 중합체의 코어 분지당 말단기의 비는 바람직하게는 2 이상, 더욱 바람직하게는 3 이상 가장 바람직하게는 4 내지 1024이다. 바람직하게는 주어진 중합체 분자량에서, 조밀 별형 중합체의 분자용적은 종래의 연장된 별형 증합체 분자용적의 70용적% 미만, 더욱 바람직하게는 16 내지 60용적%, 가장 바람직하게는 7 내지 50용적%이다.

<256> 본 발명의 콘쥬게이트에 사용하기에 바람직한 덴드리머는 가지형 분지에 공유결합된 일가 또는 다가의 코어를 갖는 것으로 특징지어진다. 이러한 순차적인 분지는 하기 연속 단계에 의해 예시될 수 있다(G는 세대 수를 나타냄):

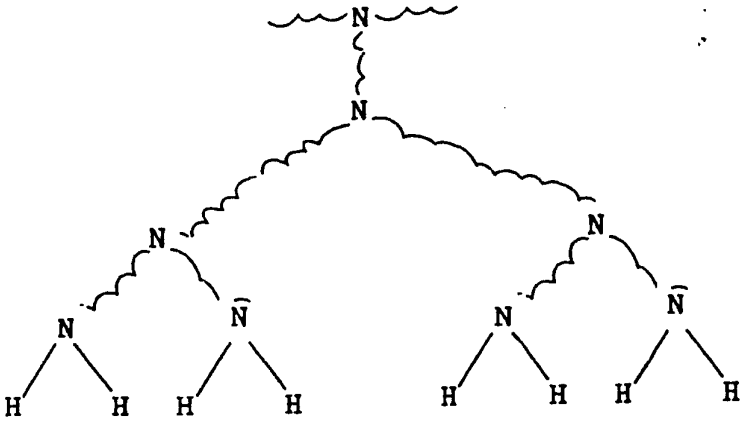
G = 1



G = 2



G = 3



<258> 수학적으로, 덴드리머의 제조에 관련되는 정확한 연속단계로 부터 각 덴드리머 분자내의 정확하고 예상가능한 화학양론을 유도한다. 예를 들어, 덴드리머내의 반복단위 수는 세대 수(G), 반복단위의 다중도(N_r). 및 코어분자 또는 코어원자의 다중성(N_c)에 따라 다르다. 분자 전체에 동일한 반복단위가 사용된 동종중합체성 덴드리머에서, 덴드리머내의 전체 반복단위 수, 중합도(DP)는 하기와 같다:

$$DP = N_c \frac{Nr^{G}-1}{N_r - 1}$$

<260> 덴드리머의 말단 잔기의 전체 원자가 또는 수(Y)는 하기와 같다:

$$Y = N_c N_r^{G} .$$

<262> 각 기는 후속적인 화학적 개질과정에서 변화하는 복수의 원자가 또는 다수의 원자가를 함유할 수 있기 때문에, 종종 덴드리머의 말단기 수(Z)를 고려하는 것이 더욱 편리하거나 또는 직관적이다. 그러므로, 말단기 수는 하기와 같이 정의된다:

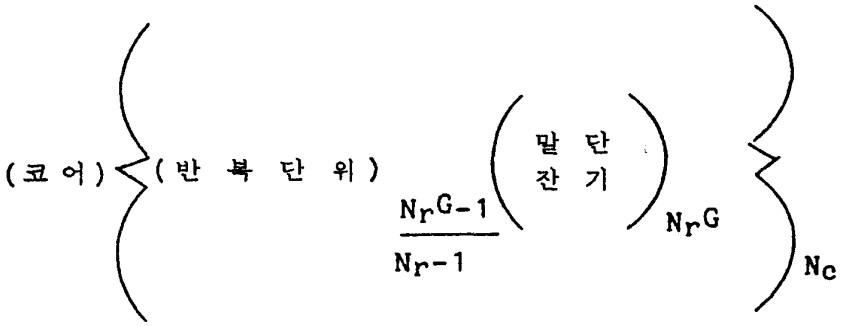
$$\text{덴드리머당 말단기 수}(Z) = \frac{N_c N_r^{G}}{\text{말단기의 다중도}}$$

<264> 폴리아민 합성에서 다중도 2를 갖는 아민 말단기에 의해 상기를 예시할 수 있다. 이 경우에 있어서, 덴드리머당 말단기 수(Z)는 하기와 같다:

$$\text{덴드리머당 말단기 수}(Z) = \frac{N_c N_r^{G}}{2} .$$

<266> 덴드리머의 후속적인 개질의 경우, 아민 기의 원자가는 사용된 화학에 따라 다르므로 이 수는 더욱 편리하다. 예를 들어, 1급 아민 말단기는 용이하게는 단 한 분자의 에스테르와 반응하여 아미드를 형성하거나, 또는 두 분자의 알킬화제와 반응하여(온화한 조건, 예컨대 에쉬베일러-클라케(Eschweiler-Clarke) 조건하에) 3급아민을 형성하거나, 또는 세 분자의 알킬화제와 반응하여(더욱 엄격한 조건하에, 예컨대 알킬설포네이트와의 반응) 4급 아민 염을 형성한다.

<267> 따라서, 본 발명의 덴드리머는 하기와 같은 그의 성분 부분들로 표현될 수 있다:



<269> 상기 식에서,

<270> 코어(I)는 개시 분자 또는 원자이고;

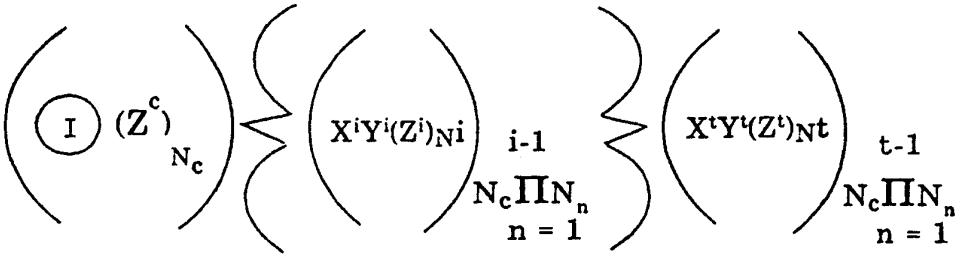
<271> 말단잔기는 반복단위의 결합부위를 차지하는 원자, 분자 또는 작용기(예컨대, 수소 또는 에스테르의 메톡시기)이고;

<272> G 및 N_r는 상기에서 정의한 바와 같고,

<273> 반복단위는 (N_r+1)의 원자가 또는 작용기를 갖는다(상기 정의한 바와 같음).

<274> 본 발명의 목적에 바람직한 덴드리머인 공중합체성 덴드리머는 다작용성 단량체 단위로부터 구성된, 고도로 분지된(가지형) 배열을 갖는 독특한 화합물이다. 덴드리머 분자는 다작용성 개시 단위[코어 화합물 코어(I)], 다작용성 반복단위 및 반복단위와 동일하거나 또는 상이할 수 있는 말단 단위로부터 제조된다. 코어 화합물은 식$(I)(Z^c)_{Nc}$로 표현되며, 이 때, 코어 (I)은 코어를 나타내고, Z^c는 코어(I)상의 이용가능한 결합 부위를 나타내고, N_c는 코어 작용기 또는 결합 부위 수(바람직하게는 2 이상, 가장 바람직하게는 3 이상임)를 나타낸다. 따라서, 덴드리머 분자는 다수(N_c)의 작용기(Z^c)에 결합된 다작용성 코어(I)을 포함하고, 이들 작용기 각각은 제 1 세대의 반복단위, $X^1Y^1(Z^1)_{N1}$의 단작용성 말미에 연결되며, 한 세대의 반복단위 중 각각의 Z기는 말단 열 또는 층에 도달할 때까지 다음 세대의 반복단위의 단작용성 말미에 결합된다.

<275> 덴드리머 분자에서, 반복단위는 단일 세대(i)내에서는 동일하지만 세대와 세대간에는 상이할 수 있다. 반복단위 $X^1Y^1(Z^1)_{N1}$에서 X^1은 제 1 세대 반복단위의 단작용성 말미이고, Y^1은 제 1 세대를 구성하는 잔기이고, Z^1은 제 1 세대 반복단위의 다작용성 상부의 결합 부위이며, 코어 화합물$(I)(Z^c)_{Nc}$ 또는 다른 세대의 결합부위와 동일하거나 또는 상이할 수 있고; N^1은 2 이상, 가장 바람직하게는 2, 3 또는 4로서, 제 1 세대내 반복단위의 다작용성 상부의 다중도를 나타낸다. 일반적으로, 반복단위는 일반식 $X^iY^i(Z^i)_{Ni}$(여기서, i는 제 1 세대 내지 (t-1) 세대 중 특정한 세대임)로 표현된다. 따라서, 바람직한 덴드리머 분자에서, 제 1 세대 반복단위의 각 Z^1은 제 2 세대 반복단위의 X^2에 연결되며, 세대에 걸쳐 세대 수 "i"에서 반복단위 $X^iY^i(Z^i)_{Ni}$ 중 각 Z^i 기가 세대 수 "i+1"의 반복단위의 말미(X^{i+1})에 연결되고 있다. 바람직한 덴드리머 분자의 최종 또는 말단 열은 말단 단위, $X^tY^t(Z^t)_{Nt}$ 를 포함하며, 여기에서 t는 말단 단위이고, X^t, Y^t, Z^t 및 N^t는, Z^t 기에 연결된 후속 세대가 없고 N^t가 2 미만(예컨대, 0 또는 1)인 경우를 제외하고는 X^i, Y^i, Z^i 및 N^i와 동일하거나 또는 상이할 수 있고, 모든 상기 말단 단위, $X^tY^t(Z^t)_{Nt}$ 는 서로 동일할 필요가 없다. 그러므로, 바람직한 덴드리머는 하기 분자식를 갖는다:



<277> 상기 식에서, i는 1 내지 (t-1)이고, 기타 기호는 상기 정의한 대로이다.

<278> Π함수는 한정된 범위내의 모든 값의 곱이다. 따라서

$$\prod_{n=1}^{i-1} N^n = (N^1)(N^2)(N^3)\ldots(N^{i-2})(N^{i-1})$$

<280> 이것은 가지형 분지 하나의 i번째 세대를 포함하는 반복단위 $X^iY^i(Z^i)_{Ni}$ 의 수이고, i가 10이라면,

$\prod_{n=1}^{0} N^{n}$ 은 1이다.

<281> 공중합체성 덴드리머에서, 한 세대의 반복단위는 하나 이상의 다른 세대의 반복단위와 구별된다. 바람직한 덴드리머는 이하에 기술된 구조식에 예시된 대로 매우 대칭적이다. 바람직한 덴드리머는 다른 시약과 접촉함으로써 작용화된 덴드리머로 전환될 수 있다. 예를 들어 말단 층 또는 열 중의 하이드록실을 산 염화물과 반응시켜 에스테르로 전환시키면 에스테르 말단 작용화된 덴드리머가 수득된다. 이 작용화반응은 이용가능한 작용기의 수로 정의되는 최대 이론수율로 수행될 필요가 없으며, 따라서 작용화된 덴드리머는 바람직한 덴드리머의 경우에서와 같은 높은 대칭성 또는 정확하게 정의된 분자식을 가질 수 없다.

<282> 동종중합체성 덴드리머에서, 모든 반복단위, $X^{i}Y^{i}(Z^{i})_{Ni}$ 는 동일하다. 모든 N^{i}의 값은 같기 때문에 (N_r로 정의됨), 반복단위의 수를 나타내는 곱 함수는 간단한 지수형태로 된다. 그러므로, 분자식은 하기와 같은 간단한 형태로 표현될 수 있다:

$$\left(\text{I}(Z^{c})_{N_c}\right)\left\{\left(X^{i}\,Y^{i}\,(Z^{i})_{Ni}\right)_{N_cN_r{}^{i-1}}\right\}\left(X^{t}Y^{t}(Z^{t})_{Nt}\right)_{N_cN_r(t-1)}$$

<284> 상기 식에서, i는 1 내지 ($_t$-1)이다.

<285> 상기 형태는 각각 $N_cN_r(^{i-1)}$ 반복단위인 $X^{i}Y^{i}(Z\ ^{i})_{Ni}$ 로 구성되는, 상이한 세대 i 사이의 구별을 나타낸다. 세대를 한 항으로 합하면 하기 식을 얻는다:

$$\left(\text{I}(Z^{c})_{N_c}\right)\left(X^{r}Y^{r}(Z^{r})_{Nr}\right)_{N_c\ \frac{N_r(t-1)-1}{N_r-1}}\left(X^{t}Y^{t}(Z^{t})_{Nt}\right)_{N_cN_r(t-1)}$$

<287> 또는

$$\left(\text{I}(Z^{c})_{N_c}\right)\left\{\left(X^{r}Y^{r}(Z^{r})_{Nr}\right)_{\frac{N_r(t-1)-1}{N_r-1}}\left(X^{t}Y^{t}(Z^{t})_{Nt}\right)_{N_r(t-1)}\right\}_{N_c}$$

코어 반복단위 말단 단위

<289> 상기 식에서, $X^{r}Y^{r}(Z^{r})_{Nr}$ 은 모든 세대 i에 사용되는 반복단위이다.

<290> 상기 식은 G가 (t-1)이면. 83페이지의 구조식과 본질적으로 같다.

<291> 결과적으로, 중합체 화합물이 이들 상기 일반식에 들어맞으면, 이 중합체는 조밀 별형 중합체이다. 반대로, 중합체 화합물이 이들 상기 일반식에 들어맞지 않으면, 이 중합체는 조밀 별형 중합체가 아니다. 또한 중합체가 조밀 별형 중합체인지 여부를 결정하기 위하여, 이를 제조한 방법을 알 필요는 없고 상기 식들에 적합한가의 여부만 알면 된다. 상기 식들은 또한 덴드리머의 세대(G) 또는 열을 나타낸다.

<292> 전술한 수학적 일반식은 코어 반응물 근처의 반복횟수 1회의 반응을 세대 1로 나타내는 것을 기본으로 한다. 따라서, 폴리아미도아민 조밀 별형 덴드리머의 경우, 메틸 아크릴레이트와 암모니아 코어의 반응생성물은 0.5세대로 부르고. EDA와 메틸 아크릴레이트의 후속 반응 생성물을 1.0세대로 부른다.

<293> 명명법을 바꾸는 경우, 반복횟수 1회는 1세대 대신 0세대로 호칭된다. 메틸 아크릴레이트와 암모니아 코어의 반응 생성물은 -0.5세대가 되고, EDA와 메틸 아크릴레이트의 후속 반응 생성물은 0세대가 될 것이다. 이러한 다른 명명법하에서는, 본원의 다른 곳에 사용된 모든 세대 수가 1씩 감소하게 된다.

<294> 상기의 고쳐진 명명법하에서, 중합도(DP)의 식은 하기 식으로 된다:

$$DP = N_c\left(\frac{N_r^{G+1} - 1}{N_r - 1}\right)$$

<296> 덴드리머의 말단 잔기 수(Y)의 식은 하기와 같다:

$$Y = N_c N_r^{G}$$

<298> 상기 식에서, Y는 전술한 말단 기와 다중도로 나눔으로써 Z(말단기 수/덴드리머)로 전환할 수 있다.

<299> 덴드리머 분지 셀의 수(N_{BC})는 하기와 같이 표현된다:

$$N_{BC} = N_c\left(\frac{N_r^{G} - 1}{N_r - 1}\right)$$

<301> 그 다음, 이론적 몰질량(M)은 하기와 같이 표현될 수 있다:

$$M = M_c + N_c\left[M_{RU}\left(\frac{N_r^{G+1}-1}{N_r-1}\right) + M_t N_r^{G+1}\right]$$

<303> 또는

$$M = M_c + N_c\left[M_{BC}\left(\frac{N_r^{G}-1}{N_r-1}\right) + M_t N_r^{G}\right]$$

<305> 상기 식에서,

<306> M_c는 개시 코어의 몰질량이고,

<307> M_{RU}는 반복단위의 몰질량이고,

<308> M_{BC}는 분지 셀의 몰질량이며,

<309> M_t는 말단 단위의 몰질량이다.

<310> 분명하게, P*M의 회합이 일어나는 방법 및 장소에 따라 달라지는, 약제(M) 대 덴드리머(P)의 비를 결정하는 몇가지 방법이 있다. 내부 봉입의 경우 M:P의 중량비는 일반적으로 10:1, 바람직하게는 8:1, 더욱 바람직하게는 5:1, 가장 바람직하게는 3:1이다. 이 비는 0.5:1 내지 0.1:1일 수 있다. 내부 화학양론이 사용된 경우, M:P의 중량비는 내부 봉입의 경우와 동일하다. 외부 화학양론을 결정할 경우, M:P의 몰/몰비는 하기 식에 의해 주어진다:

M :	P
(A) $5\ N_c N_t N_r^{t-1}$	1
(B) $3\ N_c N_t N_r^{t-1}$	1
(C) $1\ N_c N_t N_r^{t-1}$	1

<312> 상기 식에서,

<313> N_c는 코어 다중도를 의미하고,

<314> N_t는 평균 말단기 다중도를 의미하며,

<315> N_r은 분지점 다중도를 의미한다.

<316> $N_c N_t N_r^{t-1}$ 항목은 말단 잔기 수가 될 것이다. 따라서, 예컨대 상기 (A)는 단백질, 효소 또는 고도로 하전된 분자가 표면에 있을 경우의 결과일 수 있고; 상기 (B)는 아스피린, 2,4-D 또는 옥타노산일 경

우이고; 상기 (C)는 표면 에스테르기를 카복실레이트 이온 또는 기로 전환시키는 경우이다.

<317> 물론, 당해 분야의 숙련자라면 사용되는 덴드리머 성분 및 세대 수를 적절히 변화시킴으로써 다양한 크기의 다른 구조를 쉽게 제조할 수 있다. IgG 항체에 대해 3가지 상이한 계열의 덴드리머를 대강 비교한 결과를 제 3 도에 나타낸다. 제 3(B) 도로 나타낸 일련의 도면은, I은 조밀 별형 폴리아미도아민(PAMAM)을 나타내고; II는 조밀 별형 폴리에테르(PE)를 나타내며; III은 조밀 별형 폴리에틸렌이민(PEI)를 나타낸다. 제 1 도와 유사한 방식으로, 모든 3가지 계열(I, II 및 III)은 가장 왼쪽 그림에 개시 코어를 나타내고, 왼쪽으로부터 그 다음의 그림은 별형 분지 올리고머를 나타내며, 나머지 그림은 조밀 별형 올리고머 및 각각의 조밀 별형 가교 덴드리머를 나타낸다. 상기 일련의 축척 도면에서 덴드리머 크기가 제 3(A)도에 나타낸 IgG 항체의 전체 크기에 가깝거나 또는 사실상 그 크기보다 작음을 볼 수 있다. IgG 항체는 제 3 도의 가장 왼쪽에 나타나 있다. 축척은 1㎜가 3.5AÅ다. 제 3(A) 도에서, 가변 영역은 (A)로 나타내고; 불변 영역은 (B)로 나타내고; 탄수화물 결합 부위는 (C)로 나타낸다. 제 3 도에 나타낸 대략의 크기는 하기와 같다: (1)은 35 내지 40Å이고; (2)는 70Å이며, (3)은 60Å이다. 이들 크기 특성은 표적화가 혈관 시스템으로부터의 배출을 포함하는 경우에 바람직하다. 그러므로, 125Å 단위 이하의 덴드리머 직경은 혈관 시스템으로부터 연속 또는 천공된 모세관에 의해 공급되는 표적 기관으로의 배출이 가능할 수 있다는 점에서 특히 바람직하다. 이들 치수는 항체(제 3 도를 참조)와 같은 가능성있는 표적 성분의 크기와 비교하여 작다는 점에서 중요하다. 필적하는 분자량의 선형 중합체는 동일한 분자량의 덴드리머보다 회전운동의 반경(완전히 연장된 형태)이 더욱 크게 될 수 있다. 상기 유형의 선형 중합체는 다수의 허용된 표적 성분의 분자 인지 특성에 악영향을 미치는 것으로 예상된다. 콘쥬게이트는 예컨대 Fab, Fab', Fab'_2 또는 단일쇄 또는 이들의 일부, 또는 다른 적당한 항체 단편을 저분자용적의 덴드리머에 커플링시키는 것에 의해 혈관외 유출이 방해되지 않도록 최저의 분자용적을 갖는 것이 바람직하다.

<318> 덴드리머는 작은 용적의 공간중에서 다수의 금속 이온을 킬레이트화시킬 수 있기 때문에, 방사핵종 또는 강력한 상자성 금속 이온을 종양 부위에 전달시키는 데 바람직하다. 종양에 특이적인 항체 또는 항체 단편과 커플링시키면 항체를 단 한번만 개질시키면서 항체당 많은 금속을 전달할 수 있다.

<319> 덴드리머에 표적 지향제를 연결하는 것은 본 발명의 다른 양상이다. 본 발명의 바람직한 태양에서, 특히 표적 지향제로서 항체의 사용이 필요한 경우, 반응성 작용기(예: 카복실, 설프히드릴, 반응성 알데히드, 반응성 올레핀 유도체, 이소티오시아네이토, 이소시아네이토, 아미노, 반응성 아릴 할라이드, 또는 반응성 알킬 할라이드)를 편리하게 덴드리머에 사용할 수 있다. 공지된 기법, 예컨대 다음의 기법을 사용하여, 반응성 작용기를 덴드리머에 도입할 수 있다:

<320> (1) 상이한 반응성의 작용기가 혼입된 헤테로작용성 개시제(덴드리머 합성을 위한 출발물질로서)의 사용. 이러한 헤테로작용성 개시제의 경우, 하나 이상의 작용기는 덴드리머 형성의 개시 부위로서 작용할 것이고, 하나 이상의 다른 작용기는 표적 지향제로 연결하는 데는 이용가능하지만 덴드리머 합성을 개시할 수는 없을 것이다. 예를 들어, 보호된 아닐린을 사용하면, 아닐린 NH_2를 반응시키지 않고 분자내의 NH_2 기를 더 개질시킬 수 있다.

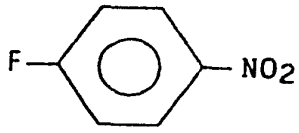
<321> 표적 지향제와의 연결에 이용할 수 있는 작용기는 하기 3가지 형태 중 하나의 개시제 분자의 일부일 수 있다:

<322> (a) 표적 지향제와의 연결에 사용할 수 있는 형태. 이것은 덴드리머 합성에 관련된 합성 단계의 어느 것도 이 중심에서 반응이 일어나지 않을 경우에 가능하다.

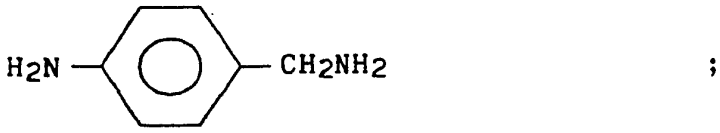
<323> (b) 표적 지향제와의 연결에 사용된 작용기가 덴드리머 합성에 관련된 합성 단계에서 반응성인 경우, 상기 작용기는, 관련된 합성 과정에 대해 이 작용기가 비반응성이 되도록 하지만 그 자신은 나머지 거대분자의 상태를 바꾸지 않는 방식으로 쉽게 제거될 수 있는, 보호기를 사용하여 보호될 수 있다.

<324> (c) 표적 지향제와의 연결에 사용되는 반응성 작용기에 대해 단순한 보호기를 형성할 수 없는 경우에는, 덴드리머 합성에 사용된 모든 합성 과정에서 비반응성인 합성 선구물질을 사용할 수 있다. 합성을 완료하면, 나머지 거대분자의 상태를 바꾸지 않는 방식으로, 이 작용기를 원하는 연결기로 쉽게 전환할 수 있어야 한다.

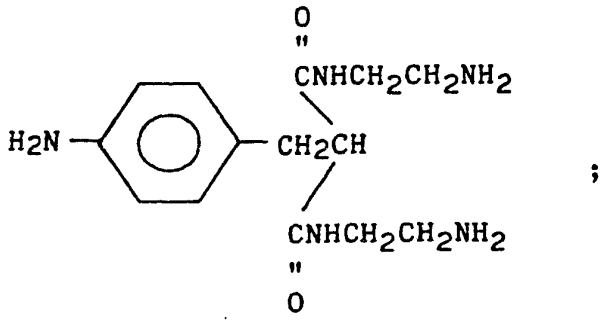
<325> (2) 원하는 반응성 작용기를 미리 제조한 덴드리머에 커플링(공유적으로)시킬 때, 사용되는 시약은 덴드리머의 말단 작용기와 쉽게 반응하는 작용성을 가져야 한다. 표적 약제와의 연결에 궁극적으로 사용되는 작용기는 보호된 작용기로서 또는 합성 선구물질로서 최종 형태를 가질 수 있다. 상기 연결 작용기가 사용되는 형태는 사용되는 합성 과정 동안의 상태 및 상기 기를 연결에 이용할 수 있도록 하는 데 필요한 어떠한 조건이라도 견디는 최종 거대분자의 능력에 따라 다르다. 적합한 연결제의 예는 당해 분야, 예컨대 유럽 특허 공개 공보 제 0430863 호(1991년 6월 5일 공개됨)에서 찾을 수 있다. 예를 들어, PEI에 바람직 경로는 하기 화합물을 사용한다:



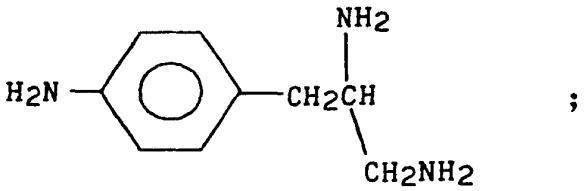
<327> 상기 (1)에 사용하기 위한 헤테로작용성 개시제의 예는 하기의 실례를 포함한다:



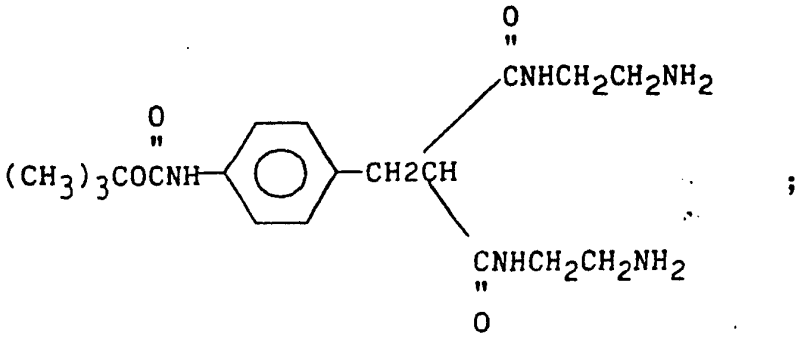
;



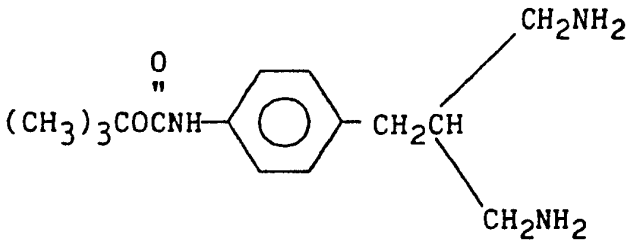
;



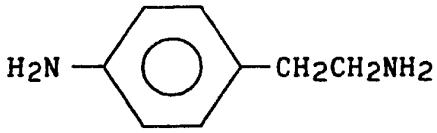
;



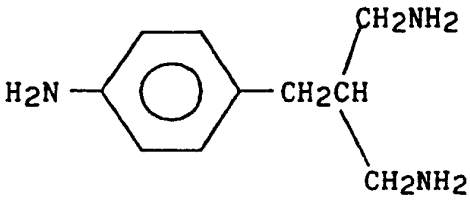
;



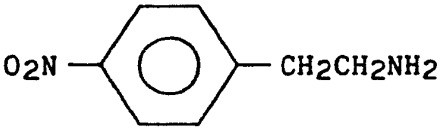
;



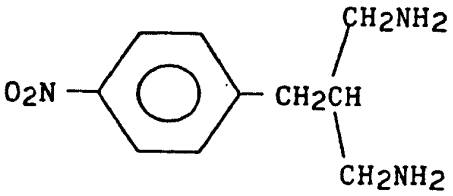
;



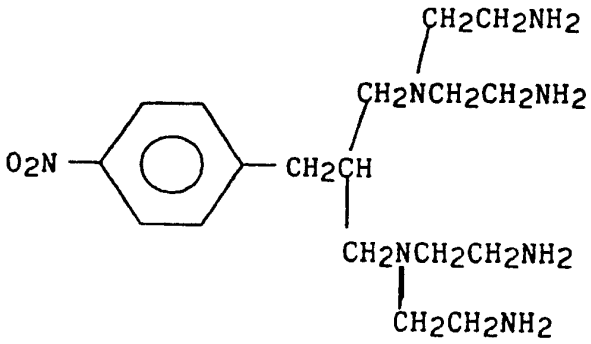
;



;



; 및



<330> 특히 중요한 다음 몇가지 화학이 있다:

<331> 1) 조밀 별형 또는 스타버스트™ 폴리아미도아민("PAMAM") 화학;

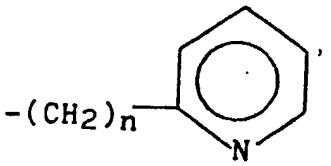
<332> 2) 조밀 별형 또는 스타버스트™ 폴리에틸렌이민("PEI") 화학;

<333> 3) PAMAM 표면을 갖는 조밀 별형 또는 스타버스트™ PEI 화합물;

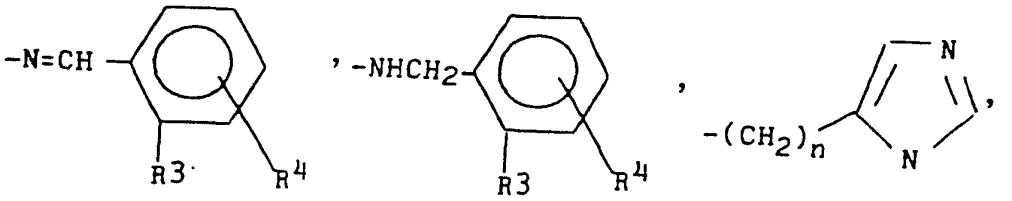
<334> 4) 조밀 별형 또는 스타버스트™ 폴리에테르("PE") 화학.

<335> 덴드리머 표면 작용기를 개질시키면 하기와 같은 다른 유용한 작용기를 얻을 수 있다:

$-OPO_3H_2$, $-PO_3H_2$, $-PO_3H^{(-1)}$, $-PO_3^{(-2)}$, $-CO_2^{(-1)}$, $-SO_2H$, $-SO_2^{(-1)}$, $-SO_3H$, $-SO_3^{(-1)}$, $-NR^1R^2$, $-R^5$, -OH, $-OR^1$, $-NH_2$, 폴리에테르, 과불소화 알킬, $-CNHR^1$, $-COH$, 아세테이트($-OCCH_3$),



<336>

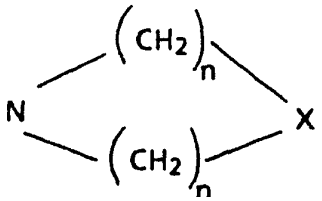


<337>

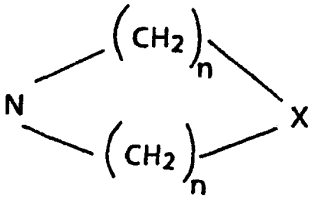
<338> 폴리에테르, 또는 기타 면역불감성 잔기

<339> 상기 식에서,

<340> R은 알킬, 아릴 또는 수소이고;



<341> R^1은 알킬, 아릴, 수소 또는 이고;



<342> R^2는 알킬, 아릴 또는 이고;

<343> R^3은 -OH, -SH, $-CO_2H$, $-SO_2H$ 또는 $-SO_3H$이고;

<344> R^4는 알킬, 아릴, 알콕시, 하이드록실 머캅토, 카복실, 니트로, 수소, 브로모, 클로로, 요오도 또는 플루오로이고;

<345> R^5는 알킬이고;

<346> X는 NR, O 또는 S이고;

<347> n은 1, 2 또는 3의 정수이며;

<348> 상기 모든 경우에 있어서, 알킬은 선형의 또는 분지된 C_1-C_{18} 탄화수소이고, 아릴은 하나 이상의 C_1-C_4 알킬, 브로모, 클로로, 요오도, 플루오로 또는 트리플루오로메틸 잔기로 치환될 수 있는 벤질 또는 나프틸이다.

<349> 작용기의 선택은 덴드리머를 디자인하는 특정한 최종 용도에 따라 다르다. 예를 들어, 작용기로서 1,4,7,10-테트라아자-사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA) 또는 1,4,7-트리스-(카보메톡시메틸)-1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸(DO3A 메틸 에스테르)을 갖는 덴드리머를 자기공명 형상화용 담체로서 또는 핵자기공명 시약으로서 사용할 수 있다.

<350> 이들 작용화된 덴드리머는, 예컨대 작용화된 기(예: DO3A 메틸 에스테르)를 에폭사이드 또는 C_1-C_{18} 알킬기로 치환된 에폭사이드와 반응시켜 하이드록시에틸화 생성물을 형성시킴으로써 제조한다. 하이드록시에틸화 생성물을 커플링제(예: 디사이클로헥실 카보디이미드(DCC))와 반응시킨 후, PAMAM 조밀 별형 중합체와 반응시킨다. 작용기로서 DOTA를 갖는 덴드리머는, 이소티오시아네이트 유도된 DOTA(예: 1-[1-카복시-3(4'-이소티오시아네이토페닐)프로필]-4,7,10-트리스(카복시메틸)-1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸)와 PAMAM 조밀 별형 중합체를 사용하여 제조할 수 있다. 다른 적합한 킬레이트를 공지의 합성 기법에 의해 첨가할 수 있다. 필요한 경우, 란타나이드 이온 또는 슈도란타나이드 이온을 통상의 방법에 의해 혼입할 수 있다.

<351> 항체를 덴드리머에 연결시키는 것은 본 발명의 다른 양상이다. 전형적으로는, 당해 분야에 널리 공지된 기법(예: 덴드리머의 작용기와, 항체 또는 항체 단편에 존재하는 탄수화물, 아미노, 카복실, 또는 설프히드릴 작용기 같은 잔기의 결합)에 의해 항체 또는 항체 단편을 덴드리머에 연결시킨다. 몇몇 경우에 연결기를 덴드리머와 항체 또는 항체 단편사이의 연결 수단 또는 스페이서로서 사용할 수 있다. 덴드리머와 항체 또는 항체 단편의 결합은 항체 또는 항체 단편의 면역반응성을 유의적으로 간섭하지 않는 방식으로, 즉 항원 인지 및 결합 부위의 일부가 아닌 항체 또는 항체 단편의 작용기를 통해 항체 또는 항체 단편을 결합시킴으로써 수행되어야 한다.

<352> 유전물질의 전달 및 형질감염

<353> A. 서 론

<354> 유전물질의 세포내로의 전달은 인간의 질병에 대한 치료제 및/또는 진단 약제로서 많은 이용가능성을 갖는다. 유전물질은 형질감염에 이어 전사 및 발현되어, 세포내 새로운 단백질을 만들어, 유전적 실수에 의해 초래된 이상 단백질 또는 결여 단백질을 대체할 수 있다. 또한 DNA 또는 RNA를 비롯한, 유전물질의 작은 단편은 세포내로 형질감염되어 세포 기능을 변화시키거나, 또는 특정 메신저 RNA를 수정함으로써 다른 유형의 유전적 결함을 고칠 수 있는 효소로서 작용할 수 있다. 개질된 형태의 안티쎈스 올리고뉴클레오티드와 같은 합성 유전물질을 세포내로 전달하여 특정 단백질의 생성을 차단할 수 있다. 이것은 비정상적으로 생육하는 세포(예: 암 세포)를 억제하는 데, 또는 정상 세포의 기능을 바꾸는 데(예: 기관이식시의 면역억제)에 유용할 수 있다. 압티머(aptimer)와 같은, 유전물질의 작은 단편도 또한 약제로서 작용할 수 있으며, 이러한 형태의 핵산을 전달하면 약제와 유사한 방식으로 세포 기능을 특이적으로 바꿀 수 있다.

<355> 유전자 전달 치료제에서 가장 중요한 부분은, 유전물질을 세포에 전달시키는 담체 또는 양식이다. 전달은 다수의 상이한 단계를 포함하는 복잡한 과정이다. 담체의 제 1 기능은 DNA에 결합하여 DNA를 가수분해 반응 또는 효소분해 반응으로부터 보호하는 것이다. 그 다음, 담체는 유전물질의 세포내로의 전달을 용이하게 해야 한다. 일단 세포내에 들어오면, 담체는 DNA가 엔도솜내에서 분해되지 않도록 보호하고 물질을 세포내의 특정 구획으로 향하게 하여야 한다. 이들 구획은 유전물질의 염색체내로의 도입, 또는 전달된 유전물질의 전사 및 번역을 통한 임시 발현을 위해 핵을 포함할 수 있다. 반면에, 안티센스 저해를 통한 리보솜 수정 또는 단백질 생성의 방해와 같은 기능을 위해 세포질의 소포체로의 수송이 필요할 수 있다. 일단 적당한 구획에 있게 되면, 유전물질도 작용할 수 있도록 담체로부터 방출되어야 한다. 따라서, 유전물질을 보호, 전달 및, 작용할 수 있게 하는 능력은 유전자 치료를 위한 담체의 중요한 특징이다.

<356> 유전물질의 담체가 수행하여야 하는 많은 활동외에도, 담체에 있어서 피해야 하는 중요한 것이 있다. 담체는 면역원성이어서는 안되고, 생체내에 투여되는 경우 운반 DNA에 대해서 면역 반응을 유도해서는 안된다. 또한, 담체가 조직 배양물내에 있든지 또는 개체내에 있든지 상관없이, 담체의 투여, 또는 세포내 표적에 효과적으로 도달하는 능력을 방해하는, DNA와 불용성 착체를 형성해서도 안된다. 중요하게는, 독성이 있는 담체는 투여가능한 물질의 양을 현저히 감소시켜 위험할 가능성이 있으므로, 담체는 시험관내의 세포 또는 생물의 생체내에서 독성이 없어야 한다.

<357> 2가지의 일반적인 유전물질 전달 형태가 있다. 둘 다 유전물질의 결합 및 보호, 유전물질의 세포내로의 전달 및 작용 활성을 위한 물질의 방출을 필요로 한다. 그러나, 두 전달 형태에는 주요한 차이가 있다. 한 형태는 전하 또는 기타 상호작용을 통하여 세포에 비특이적으로 결합하여 접촉하는 모든 세포에 본질적으로 DNA를 전달하는 담체를 사용한다. 이것은 시험관내 또는 생체내, 관절과 같은 폐쇄된 공간에서 일어날 수 있다. 이러한 유형의 담체는 세포가 조직 배양액에서 형질감염된 후 개체내로 재도입되는 치료법에서 특히 중요하다. 이러한 "생체외" 치료법은 다수의 상이한 질환 상태에 매우 유용하며, 담체는 유전물질을 결합 및 상호작용하는 거의 모든 세포내로 전달하는 데 매우 효율적인 담체이어야 한다. 다른 유형의 담체는 특이적으로 특정한 세포 형태만을 표적으로 한다. 이러한 담체에 커플링된 표적 지향제는 표적화된 세포내로의 흡수를 용이하게 하는, 세포상의 표적과 DNA 담체의 착체사이에서 특이적인 상호작용을 용이하게 한다. 이러한 담체를 사용하는 경우, 비표적화된 세포내에서 형질감염된 유전물질이 발현 또는 작용하면 유해할 수 있으므로, 세포의 비특이적인 전달은 바람직하지 않다. 표적 지향제는 또한 생체외 치료 또는 진단을 위하여 세포와 결합 및 전달의 증진을 통해 시험관내에서 세포의 형질감염을 증가시킬 수 있다. 이러한 경우에 있어서, 배양액 중의 모든 세포가 표적화되기 때문에 비특이적인 형질감염의 악영향은 문제가 되지 않는다.

<358> 유전자 치료 분야는 빠른 속도로 발전하고 있다. 유전자 치료 기법을 기술하는 많은 논문 및 참고서가 쓰여졌다. 왓슨(James D. Watson)등의 문헌[Recombinant DNA, 2판, 1992, 프리만 앤드 캄파니(W. H. Freeman and Company) 배포, 뉴욕]이 그러한 책 중 하나이다.

<359> 본 발명의 조밀 별형 중합체는 유전물질과 착체를 이루어 포유동물(예컨대, 인간)의 유전자 치료에 사용할 수 있다. 질환을 예방 또는 치료하는 방법은 유전물질과 착체화된 조밀 별형 중합체로 포유동물 세포를 형질감염시키는 것을 포함한다. 초기에 기술한 대로, 유전물질은 세포내에서 단백질을 생성하고, 세포 기능을 바꾸고, 약제로서 유전적으로 결함있는 기능을 고치는 등을 포함하는 다양한 이유때문에 세포내로 형질감염될 수 있다. 따라서, 특히 유전적 질환 또는 상태는 본 발명의 조밀 별형 중합체와 유전물질의 착체를 사용하여 예방 또는 치료할 수 있다.

<360> 유전물질:덴드리머 착체 용액에 사용된 유전물질의 양은 원하는 예방, 치료 또는 진단 효과를 얻기에 충분해야 한다. 이 양은 원하는 효과, 표적 세포의 성공적인 형질감염의 용이함, 덴드리머에 결합된 표적 지향제의 효율, 및 착체의 투여 방식(즉, 시험관내, 생체외, 생체내; 생체내일 경우에는, 특정 종양, 기관, 선 또는 다른 조직내로의 정맥내, 국소 또는 직접 주입방법)의 함수로서 달라질 것이다.

<361> 유전물질 및 그의 전하의 양이 결정되면, 선택된 유전물질:덴드리머 전하비의 함수로서 덴드리머의 사용량을 결정한다. 덴드리머를 용액에 충분히 사용하여 원하는 전하비를 얻는다. 선택된 전하비는 유전물질의 용액 농도에 영향을 미치는 동일한 변수의 함수로서, 또한 형질감염을 상승작용적으로 증진시키

기 위한 DEAE-덱스트란 또는 글리세롤의 사용 여부에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 유전물질:덴드리머 전하비는, 상기 변수의 함수로서, 약 10:1 내지 약 1:10,000(더 낮은 것도 가능함)일 수 있으나 더욱 바람직하게는 약 3:1 내지 1:1,000, 1:1 내지 1:100, 1.1 내지 1:15, 또는 1:5 내지 1:10일 수 있다.

<362> 유전자 발현에 영향을 미칠 수 있는 실질적인 유전자 재배열 또는 다른 변화를 피하기 위해서, 인간의 유전자를 포유동물 세포에 도입시키는 방법은, 유전물질과 착체화된 가지형 별형 중합체(들), 바람직하게는 조밀 별형 덴드리머로 포유동물 세포를 형질감염시킴으로써 수행할 수 있다.

<363> 유전자 전달은 조혈 세포, 피부섬유 아세포, 간세포 등과 같은 다양한 세포 유형을 형질감염시킴으로써 달성될 수 있다. 따라서, 유전적 질환을 예방하거나 치료하기 위한 방법은 유전물질과 착체화된 조밀 별형 중합체를 조혈 세포, 피부섬유 아세포, 간세포 등에 형질감염시키고, 형질감염된 세포를 포유동물에 투여하고, 상기 세포를 발현시켜 예방 또는 치료 효과를 얻는 것을 포함할 수 있다.

<364> 본 발명에 기술된 형질감염은 시험관내, 생체내 및 생체외 용도를 비롯한 다양한 목적에 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 조밀 별형 중합체와 유전물질의 착체의 시험관내 사용은 다양한 질환의 검출 또는 진단에 유용할 수 있다. 포유동물의 질환 또는 상태를 진단하는 방법은 본 발명의 조밀 별형 중합체와 유전물질의 착체를 사용하여 검출하거나 또는 진단할 수 있다.

<365> 본원에 기술된 덴드리머-유전물질 착체는, 본원에서 이 용어가 광범위하게 사용되기 때문에, 본 발명의 "콘쥬게이트"로도 또한 간주될 수 있다. 덴드리머(또는 조밀 별형 중합체, P)는 운반되는 생물반응 개질제인 M(생물활성 물질 이 경우에는 유전물질임)과 회합하여 본 발명의 콘쥬게이트를 형성한다. 표적 지향제, T도 또한 존재할 수 있다. 이로써 특이적인 세포로 유전물질의 지향적 전달이 가능하며, 이러한 독특한 특징은 이하에 더 기술한다.

<366> 유전물질을 전달하기 위한 담체로서 덴드리머의 작용을 이하에 기술한다. 세포의 비특이적인 형질감염 및 특이적인 표적 형질감염의 예를 제공한다. 어느 용도에서나 독성 또는 면역원성이 거의 관찰되지 않는다. 따라서, 덴드리머 담체는 유전자 전달 치료법에 필요한 모든 유형의 필수적인 담체를 포함할 수 있다.

<367> 상기 언급한 바와 같이, 본 발명의 조밀 별형 중합체는 유전자 전달을 비롯한, 농업용 물질의 담체로서 사용할 수 있다.

<368> 식물 세포내로 유전물질을 형질감염시키기 위한 다양한 선행기술 방법이 있다. 한 방법은 아그로박테리움 종(Agrobacterium sp.)의 사용을 포함한다. 전형적인 과정에서는, 먼저, 이. 콜라이(E. coli)내에서 복제될 수 있고 T-DNA(아그로박테리아에서 천연적으로 발생하는 Ti 플라스미드에서 발견되는 DNA)의 단편을 함유하는 플라스미드의 클로닝 부위에 유전자를 삽입함으로써 식물세포에 유전자를 도입한다. 이어서, 얻어지는 중간 셔틀 벡터(shuttle vector)를 이. 콜라이 세포내로 도입하고, pBR322 서열내에 암호화된 암피실린에 대한 내성에 의해 형질전환체를 선택한다. 그 다음, 접합(mating)에 의해 플라스미드를 이. 콜라이 세포로부터 아그로박테리움 세포로 전달한다. 일단, 아그로박테리움 내부에 들어가면, 플라스미드는 두 플라스미드상의 T-DNA 서열의 동종재조합방법에 의해 Ti 플라스미드내로 통합된다. 이 방법은 통합되는 플라스미드 전체(Ti 플라스미드내로 통합된 플라스미드)를 T-DNA의 좌우 경계사이에 위치시킨다. 통합되지 못한 플라스미드는 아그로박테리움에서 복제의 기점이 없기 때문에 축적되지 않는다. 재조합 Ti 플라스미드를 함유하는 아그로박테리아를 선택하여 식물 세포를 감염시키는데 사용한다. T-DNA를 흡수한 식물 세포는 카나마이신에 대한 내성을 부여하는, 식물 선택성 마커 NPTII로 동정한다. 이들 세포는 또한 목적하는 클로닝된 유전자를 함유한다.

<369> 또한, 유전물질은 바이러스 벡터에 의해 식물 세포로 형질감염된다. 바이러스 벡터는 감염된 식물 전체에 유전자를 분포시키도록 발생학적으로 적응시킨 바이러스이다. 바이러스 게놈이 외래 유전자를 포함하는 경우, 식물 전체에 또한 전체적으로 분포될 것이다. 바이러스 벡터는, 아그로박테리아에 덜 감수성인 단자엽 식물에 유전자를 전달하는 문제를 해결할 수 있다. 유전물질은 제미니바이러스(예컨대, 토마토 골든 모자이크 바이러스) 게놈의 A 성분의 피복 단백질-코딩 영역을 대체할 수 있다. 이들은 각각 이중쇄 복제 형태를 거치는, 두개의 단일쇄 DNA 분자로 구성된 게놈을 함유하는 DNA 바이러스이다. A 분자는 단독으로도 식물세포에서 복제할 수 있지만, B 분자는 감염성이 필요하다. A 및 B 유전자는 둘다 생산적 바이러스 감염을 위하여 세포내에 존재해야 한다.

<370> 유전물질을 식물세포내로 형질감염시키는 다른 방법은 물리적인 수단을 사용하여 유전물질을 직접 세포내에 도입하는 것을 포함한다. 유전물질을 식물 세포내로 도입하는 물리적인 방법의 하나는 전기이동이다. 전형적으로, 유전물질을 함유하는 고농도의 플라스미드 DNA를 원형질체의 현탁액에 첨가하고, 200 내지 600V/cm의 전장으로 이 혼합물에 충격을 가한다. 전기이동에 이어, 원형질체를 1 내지 2주동안 조직배양액에서 생육시킨 후, DNA를 흡수한 세포를 선택하기 시작한다. 일반적으로, 이 방법은 0.1 내지 1%의 효율을 나타낸다.

<371> 유전물질을 식물 세포내로 물리적으로 도입시키는 다른 방법은 관련 DNA로 코팅된 미세한 금속(예: 텅스텐) 비드의 사용을 포함한다. 이들 비드(즉, 직경 1㎛의 미세구)를 세포내에 직접 넣는다. DNA는 "건(gun)"으로부터 약 430m/초의 속력으로 발사되는 비드의 표면위에 간단히 침전된다. 표적은 필터(filter)상에 도말된 배 세포의 현탁 배양액, 및 완전한 잎 및 종자를 포함할 수 있다. 발사선상에서 세포는 죽지만, 이들을 죽이지 않고 발사물이 세포를 침투할 수 있는, 세포의 동심지대가 있다. β-글루쿠로니다제(GUS) 리포터(reporter) 유전자 벡터를 투입한 잎의 형태 분석 결과, 텅스텐 입자는 한 층 이상의 조직, 잎의 표피에 침투하여 엽육에 도달할 수 있다. 또한 유전물질을 엽록체에 도입하는 데 DNA-코팅된 미세구를 사용하기도 한다.

<372> 본 발명의 가지형 중합체, 및 특히 조밀 별형 중합체는 식물세포에 유전물질을 형질감염시키는데 사용할 때 상당한 이점을 제공한다. 예를 들어, 유전물질과 함께 조밀 별형 중합체(예컨대, 조밀 별형 덴드리머)가 세포를 형질감염시켜 상기 기술한 이점을 제공할 수 있도록 선행 기술을 변형시킬 수 있다. 특히, 전기이동 또는 미세 금속 비드를 사용하여 조밀 별형 중합체 및 유전물질이 식물 세포내로 형질감염되도록 할 수 있다.

<373> B. 덴드리머

<374> 하나의 양상에서, 본 발명은 가지형 중합체상에 유전물질을 운반시키는 개념 및/또는 이러한 착체에 의한 형질감염을 수행하는 개념에 관한 것이다. 광범위한 양상에서, 본원에 사용된 "가지형 중합체"란 용어는 조밀 별형 중합체를 포함하지만, 조밀 별형 중합체에 한정되는 것은 아니다. "가지형 중합체"는 코어에 또는 코어로부터 분지된 층을 연속적으로 또는 세대적으로 첨가함으로써 형성되는, 규칙적인 가지형 분지를 나타내는 중합체이다. "가지형 중합체"란 용어는 코어, 하나 이상의 내부 분지 층, 및 표면 분지 층으로 특징지어지는, "덴드리머"를 포함한다. (드보닉 및 토말리아의 문헌[Chem. in Britain, 641-645, 1994년 8월]을 참조). "덴드론"은 코어에 직접 또는 연결 잔기를 통해 연결되거나 또는 연결될 수 있는 하나의 지점으로부터 뻗어 나온 분지를 갖는 덴드리머의 일종이다. 많은 덴드리머는 공동의 코어에 연결된 2개 이상의 덴드론을 포함한다. 그러나, 덴드리머라는 용어는 광범위하게 사용되어 1개의 단일 덴드론도 포함한다.

<375> 가지형 중합체는 대칭 및 비대칭 분지 덴드리머, 다단계 분자, 아보롤 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 가장 바람직한 가지형 중합체는 조밀 별형 중합체이다. 본원에 개시된, PAMAM 조밀 별형 덴드리머는 분지부의 길이가 같다는 점에서 대칭적이다. 분지는 선행 세대 분지의 말단 $-NH_2$ 기의 수소 원자에서 일어난다. 실시예 78의 리신계 분지 덴드리머는 분지부의 길이가 상이하다는 점에서 비대칭이다. 한 분지는 리신 분자의 엡실론 질소에서 생기는 한편, 다른 분지는 선행 세대 분지에 이 분지를 결합시키는 반응성 카복시기에 인접한 알파 질소에서 생긴다.

<376> 고분지된 중합체, 예컨대 고분지된 폴리올은 분지 층의 규칙적인 연속 첨가에 의해 형성되지는 않는다하더라도, 분지 패턴이 덴드리머의 규칙도에 근접하는 규칙도를 나타내는 가지형 중합체와 같을 수 있다.

<377> 가지형 중합체는 가교 덴드리머 및 덴드리머 회합물을 포함한다. 가지형 중합체는 덴드리머의 세대적 단분산성 및 세대적 다분산성 용액 둘 다를 포함한다. 단분산성 용액 중의 덴드리머는 실질적으로 모두 동일한 세대이며, 따라서 크기 및 형태가 균일하다. 다분산성 용액 중의 덴드리머는 상이한 세대의 덴드리머의 분포를 포함한다. 바람직한 태양에서, 다분산성 가지형 중합체는 크기가 약 22 내지 약 110Å인 세개 이상의 상이한 세대를 갖는 덴드리머를 포함한다. 실시예 42의 샘플 P 및 Q는 이러한 다분산성 가지형 중합체의 실례이다.

<378> 가지형 중합체는 또한 표면 개질된 덴드리머를 포함한다. 예를 들어, PAMAM 덴드리머의 표면은 아미노산(예컨대, 리신)의 첨가에 의해 개질될 수 있다.

<379> "중합체", 예컨대 "조밀 별형 중합체", "비대칭 가지형 중합체", "다단계 중합체"로 부르는 어떠한 특정 유형의 가지형 중합체라도 상기 유형의 가교 덴드리머, 상기 유형의 덴드리머 회합물, 상기 유형의 다분산성 덴드리머, 및 상기 유형의 표면개질된 덴드리머를 역시 포함하도록 의도된 것으로 이해되어야 한다.

<380> 운반물질이 유전물질인 경우, 덴드리머의 표면은 주로 양으로 하전된 작용기로 구성되는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는, 이러한 양전하 작용성은 덴드리머 표면에 아미노 말단기를 제공함으로써 얻어진다. 양전하의 작용기는 또한 상기 표면에 화학적으로 도입될 수 있다(예컨대, 4급아민). 이러한 아미노 작용성은 상기한 폴리아민, 폴리아미도아민, 및 폴리알킬렌이민(예컨대, 폴리에틸렌이민 및 폴리프로필렌이민) 덴드리머에 의해 제공될 수 있지만, 다른 방법으로도 달성될 수 있다.

<381> 광범위하게는, 유전물질을 전달하는 데 사용되는 덴드리머는 구조상 구형, 타원형 또는 막대형이다. 가장 좁은 횡단면의 직경(들)은 바람직하게는 50Å 이상이다. 이 크기는 6세대 암모니아 코어[G6(NH_3)] PAMAM 덴드리머 또는 6세대 에틸렌디아민 코어[G6(EDA)](암모니아 코어의 크기보다 약간 큼) 덴드리머의 직경에 거의 대응한다(실시예 44, 제 12 도 및 제 13 도; 실시예 45, 제 14 도, 및 실시예 42, 제 19 도를 참조). 상기 크기의 상한은 시험한 적은 없지만, 직경이 약 110Å인 G11(EDA)PAMAM 덴드리머가 우수한 형질감염을 나타낸다고 알려져 있다. 직경 약 1000Å 이하의 덴드리머 회합물은 충분히 형질감염시키지만, 2,000 내지 5000Å의 회합물은 그렇지 않다는 자료에 기초할 때, 덴드리머 입자는 약 1,000Å의 직경을 가질 수 있거나, 또는 응집된 작은 입자는 직경이 약 1,000Å, 바람직하게는 50 내지 110Å 직경을 가질 수 있다고 생각된다. 이들 직경은 일반적으로 거대분자의 크기로 생각되며, 따라서 이들 덴드리머를 가지형 거대분자로 부른다.

<382> 작은 직경을 갖는 덴드리머도 유전물질로 세포를 형질감염시키는 데 사용될 수 있지만, 가장 좋은 결과는 보다 작은 DNA:덴드리머 착체가 가장 좁을 때의 직경이 약 50Å인 보다 큰 덴드리머와 회합될 때 얻어진다 (실시예 46, 제 15도 및 제 16도를 참조) 실시예 46(제 15 도 및 제 16 도)에서, DNA를 G5(EDA) 덴드리머 또는 G5(NH_3) 덴드리머(약 40Å의 직경)와 착체화시킨 후, 이 착체에 G9(EDA) 덴드리머 또는 G9(NH_3) 덴드리머(약 90Å의 직경)를 첨가함으로써, 우수한 형질감염을 얻었다. 흥미롭게도, 상기 순서를 바꾸면 효과적이지 못한 것으로 보인다.

<383> 상기의 순차적 방식에 사용될 경우, 작은 덴드리머는 가장 좁은 직경으로서 약 22Å, 즉, G3(NH_3) PAMAM 덴드리머에 상당하는 직경을 가질 수 있는 것으로 생각된다. 약 3세대(G3)미만의 덴드리머는 독립적으로 DNA와 착체화되지 않는 것으로 보인다. 큰 덴드리머는 최소 직경으로서 약 50Å 내지 약 1000Å 까지의 직경을 가질 수 있다.

<384> DNA와 착체화된, 상이한 두 크기의 덴드리머를 혼합하는 것 또한 형질감염을 증진시킬 수 있다. 이것은 특히 덴드리머의 혼합물이 크기면에서 다분산성일 경우, 즉 입경이 약 22 내지 약 110Å일 경우에 해당된다. 실시예 42의 샘플 P 및 Q는 이러한 다분산성 조성물의 실례이다.

<385> 구형의 덴드리머는, 일반적으로 구형의 개시제 또는 코어 물질, 가장 바람직하게는 코어로부터 돌출되어 통상 서로 같은 거리에 위치하는 3개의 반응 부위를 갖는 물질(예컨대, 암모니아)로 세대반응 순서를 시작함으로써 제조할 수 있다. (예컨대, 유럽 특허 공보 제 0 115 771 호, 및 미국 특허 제

4,507,466 호, 제 4,558,120 호, 제 4,568,737 호, 제 4,631,337 호, 제 1,587,329 호 및 제 4,737,550 호를 참조). 덴드리머는 코어로부터 그 길이를 따라 다양한 지점에서 방사상으로 돌출된 다수의 반응 부위를 갖는, 긴 중합체 코어(예컨대, 폴리에틸렌이민)로부터 출발함으로써 긴 타원형 또는 막대형 형상을 얻을 수 있다. (예컨대, 유럽 특허 공보 제 0 234 408 호 및 미국 특허 제 4,694,064 호를 참조). 타원형 덴드리머는 막대형 덴드리머에 사용된 코어보다 짧은 코어 물질(예컨대, 에틸렌디아민(EDA))로부터 출발한다.

<386> 구형 덴드리머에서, 구의 직경은 바람직하게는 상기한 바람직한 직경의 범위에 포함된다. 타원형 덴드리머 또는 막대형 덴드리머에서, 타원 또는 막대의 수직단면의 직경은 바람직하게는 상기에 언급한 바람직한 직경(들)이다. 수직단면은 완전한 원일 필요가 없으며, 따라서 단면을 가로지르는 위치에 따라 가변적인 길이의 직경을 가질 수 있다. 1,000Å 이하의 길이가 예상된다.

<387> 가교 덴드리머도 유전물질의 운반에 유용할 수 있다. 이들 구조의 형태는 매우 가변적일 수 있으나, 기본적으로 인접하는 조밀 별형 덴드리머들이, 특히 공유결합에 의해(비공유결합성 상호작용도 또한 가능함) 서로 회합함으로써 형성된다. 4개 또는 5개의 보다 작은 구형, 타원형 또는 막대형 덴드리머는 서로 가교되어 회합 단일분자 구조를 형성하여 보다 높은 세대의 덴드리머의 형질감염 효율을 갖게 될 수 있다.

<388> 가교 덴드리머 개념의 흥미로운 변형은 DNA 또는 RNA 물질이 별개의 덴드리머사이의 비공유결합성 격자로서 작용하는 거대분자 클러스터(cluster)를 형성하는 것을 포함하는데, 이 때 격자는 예컨대 정전기적 상호작용을 기본으로 하여 형성된다. 상기 모델은, 제 15 도 및 제 16 도에서와 같이 DNA를 먼저 작은 덴드리머(예컨대, G5)와 착체화 시킨 후, 이 DNA:덴드리머 착체를 큰 직경의 덴드리머(예컨대, G9)와 배합시킨, 상기한 실시예 46의 착체에 가까운 것으로 보인다.

<389> 큰 직경의 덴드리머 회합물은 카복실레이트-말단의 덴드리머의 코어 주위에 아미노-말단의 덴드리머를 끌어당김으로써 형성된다. 제제화에 사용된 2가지 덴드리머의 전하비 및 이들이 제조되는 농도에 따라 상이한 종류의 덴드리머 회합물이 형성된다. 형질감염 효율은 아미노-말단의 덴드리머 및 카복실레이트-말단의 덴드리머가, 덴드리머:덴드리머의 양전하 대 음전하 비가 바람직하게는 약 25:1내지 약 100:1이어서 전체적으로 양전하를 갖는 회합물(실시예 74)을 형성하게 되는 경우에 가장 큰 것으로 보인다. 적당한 비를 사용할 경우, 형질감염 효율은 DEAE-덱스트란(이것도 형질감염 효율을 증진시키는 작용을 함)의 존재하에, 동일한 DNA:덴드리머 전하비에서 사용된 모 아미노-말단 덴드리머의 경우에 관찰된 것 보다 클 수 있다.

<390> 완전세대(아미노-말단의) 및 반세대 카복실레이트-말단 덴드리머는, 아미노-말단 및 카복실레이트-말단 덴드리머의 비, 및 샘플 농도에 따라, 약 pH 6 내지 9에서 덴드리머 회합물을 형성한다. pH가 9보다 클 때, 완전세대 덴드리머의 양성자화된 1급아민은 탈양성자화되기 시작하여 회합물을 붕괴시킨다. pH가 6 미만일 때, 반세대 덴드리머의 카복실레이트 및 내부 3급아민은 양성자화 되어 반세대 덴드리머내에 양쪽성 이온을 형성시키며, 따라서 회합물을 분해시킨다. 알려진 바로는, PAMAM 덴드리머 회합물은 이러한 독특한 특성을 갖는, 유일한 물질이다.

<391> 세포밖의 pH는 7.2이고, 세포안의 pH는 약 5.0인 것으로 알려져 있다. 그러므로, 고분자량의 덴드리머 회합물을 pH 7.4에서 저세대의 덴드리머로부터 디자인 및 제조하여 덴드리머 회합물의 크기가 DNA 분자와 효과적으로 착체화되기에 충분히 크도록 하는 것이 합리적이다. 그러나, DNA와 결합하기 위하여, 이들 덴드리머 회합물은 총(net) 양전하를 운반해야 하며, 이는 완전세대의 덴드리머가 반세대의 덴드리머에 비하여 크게 과량이어야 한다는 의미이다. 상기 전달 시스템의 흥미로운 특징 중 하나는, 세포내로 착체가 들어간 후 덴드리머 회합물이 세포 내부의 낮은 pH로 인하여 붕괴되는 것이다. 이러한 분해는 또한 형질감염 효율을 증진시킬 수 있다.

<392> PAMAM 덴드리머 표면의 아미노기를 아미노산(리신)으로 공유결합에 의해 개질시키는 경우, 놀랄만한 독특한 형질감염 효율 향상을 나타내었다(실시예 75, 제 57 도). 플라스미드와 착체화된, 리신-개질된 G7(NH_3) 덴드리머를 사용하면 비개질된 G7(NH_3) 덴드리머에 비하여 루시페라제 유전자의 발현이 크게 증진되며, 또한 리신-개질된 G7(NH_3) 덴드리머로 형성된 착체는 G10(NH_3) 덴드리머와의 착체와 동등한 형질감염을 나타낸다(모든 실험은 DEAE-덱스트란의 존재하에 DNA:덴드리머 전하비 1:10에서 수행하였음). 이 실험은, PAMAM 덴드리머의 말단 아미노기의 경우 pKa가 약 9인 것에 비하여, 엡실론 아미노기의 pKa는 10.53이기 때문에, 덴드리머의 전하 밀도의 증가가 형질감염 과정에 영향을 준다는 것을 제시한다. 다른 표면개질 방법도 형질감염을 유사하거나 더욱 크게 증진시킬 것으로 예상할 수 있다.

<393> C. 덴드리머의 비특이적 형질감염 활성의 설명

<394> DNA:덴드리머 착체에 의한 비특이적(즉, 표적 지향화되지 않은) 형질감염의 정확한 기작은 공지되어 있지 않지만, 몇가지는 분명하다. 어떠한 이론에도 결부되는 것을 바라지 않지만, DNA는 전하 상호작용을 기본으로 하여 덴드리머에 결합하고, 가장 효율적인 형질감염은 착체가 과잉의 양전하내에서 형성될 때 일어나는 것으로 생각된다. DNA:덴드리머 착체와 세포간의 상호작용은 양전하의 착체가 세포 표면의 음전하의 인지질에 결합하는 것에 기인하는 듯하다. 혈청의 존재하에 또는 세포 표면에서 혈청을 세척 제거하지 못하고 형질감염시키면 세포 표면 전하를 중화시켜 착체가 세포에 부착되는 것이 방해됨으로써 형질감염을 방해하는 것으로 보인다. 특정 유형의 DNA:덴드리머 착체가 특정 세포의 비특이적 형질감염에 더욱 잘 작용한다는 것은 흥미롭다. 이 사실은 세포 표면에 차이가 있어, 이것이 특정 유형의 DNA:덴드리머 착체와의 상호작용을 용이하게 하는 것임을 시사한다. 가능하게는, 상이한 유형의 세포의 가장 효율적인 형질감염을 위하여 상이한 덴드리머를 사용하거나 또는 개발해야 한다.

<395> 유전자 전달 치료법에 사용된 유전물질 형태의 크기에 뚜렷한 차이가 있다면, 상이한 형태의 유전물질의 효율적인 비특이적 형질감염을 위하여 상이한 크기 및 전하 밀도의 덴드리머가 필요할 수 있다. 이론적으로, 전하 상호작용을 기본으로 하여 세포에 효과적으로 결합하는 유전물질:덴드리머 착체는 유전물질의 작은 단편(예: 극히 소수의 염기 길이의 올리고뉴클레이티드) 및 유전물질의 큰 단편(예: 큰 DNA 플라스미드)에 따라 매우 상이할 수 있다. 일반적으로, 유전물질이, 전하 상호작용에 기초하여 형질감염

을 위해 그 표면에 고밀도의 양전하를 갖는 작은 착체를 형성하는 것이 필요하다. 이 경우, 작은 덴드리머에 이어 큰 덴드리머를 사용하거나, 또는 다분산성 덴드리머를 사용하는 것은 DNA 전달에 가장 효율적인 독특한 착체를 형성하는 데 있어서 중요할 수 있다. 또한 DNA:덴드리머 착체를 형성시킨 후에 DEAE-덱스트란 또는 글리세롤을 형질감염 완충액에 첨가함으로써 놀랄만한 예상치 못한 세포 형질감염의 증진을 가져온다. 엔도솜으로부터 DNA의 방출을 돕거나 또는 엔도솜에서 DNA의 분해를 방지할 수 있는 다른 약제(예: 클로로퀸)를 형질감염 완충액에 첨가하는 것 또한 덴드리머 착체에 의해 형질감염을 증진시키는 데 중요할 수 있다. 그러나, 이러한 사실은 시험관내 비특이적인 형질감염에 독특한 것일 수 있으며, 상이한 조건 또는 물질의 혼합물(푸소젠성 펩티드)은 생체내 또는 표적-지향성 덴드리머 담체에 의한 형질감염을 증진시키는 데 더욱 효과적이다.

<396> D. 유전물질 및 이와 덴드리머의 착체화로 인한 콘쥬게이트의 형성

<397> 유전물질은 바이러스 및 바이러스 단편, 플라스미드, 파아지, 코스미드, 유전자 및 유전자 단편(즉, 엑손, 인트론), 단일쇄 및 이중쇄 데옥시리보핵산(DNA), 리보핵산(RNA), 리보솜 RNA(rRNA), 촉매 RNA(cRNA), 소핵 RNA(snRNA), 메신저 RNA(mRNA), 트랜스퍼 RNA(tRNA), DNA 및 RNA 올리고뉴클레오티드(단일쇄 및 이중쇄) 또는 올리고머 및 (안티-쎈스) 올리고뉴클레오티드, 단백질 핵산(PNA), 및 치환된 핵산 올리고뉴클레오티드를 비롯한(이에 한정되지는 않음) 뉴클레오티드계 물질이다. 유전물질, 특히 바이러스 및 바이러스 단편은 몇몇 단백질과 착체를 이루거나 또는 커플링될 수 있다. 유전물질이란 용어는 또한 이하에 더 자세하게 기술된, "개질된 뉴클레오티드"를 포함한다. 뉴클레오티드는 효소 분해에 대해 더욱 내성이고, 세포내 흡수를 증진시키도록, 또는 다른 목적을 위하여 개질될 수 있다. 세포에 의한 흡수 및/또는 효소 분해에 대한 내성을 개선시키기 위하여, 과학자들은 포스포디에스테르 주쇄의 네가티브 산소를 메틸 또는 황으로 치환시켜, 메틸 포스포네이트 또는 포스포릴 티오에이트를 제조해 왔다. 이 결과, 세포내 생체물질과 혼합될 때, 지속적인 보전성을 갖는 효소-저항성 합성 올리고뉴클레오티드 유도체 쇄를 얻는다. 뉴클레아제-저항성 쇄는 또한 합성 올리고 쇄에 2'-O-알릴 기를 포함시킴으로써 제조할 수 있다. 포스포릴 디티오에이트를 또한 제조하였다. 포스페이트 에스테르 및 포스포릴 아미데이트를 생성시킴으로써 개질을 수행하였다.

<398> 연구되어 온 다른 유형의 개질은 뉴클레오티드간의 포스포디에스테르 가교를 전혀 상이한 기(예:실록산 가교, 카보네이트 가교, 카복시메틸 에스테르 가교, 아세트아미드 가교, 카바메이트 가교, 티오에테르 가교 및 펩티드 가교)로 치환시키는 것이다. 포스페이트 가교를 치환하는 것 외에, 당 및 포스페이트 잔기를 합성 중합체로 치환시켜 가소성 DNA를 수득할 수 있다. 뉴클레오사이드 단위 자체를 개질시킬 수 있다.

<399> 본 명세서 전체에 걸쳐 사용된, "유전물질"이란 용어는 상기 제시된 방법 및 기타 방법 중 임의의 방법으로 개질된 뉴클레오티드 단편을 포함하는 것이다. 일반적으로, 본 발명의 계속되는 설명에서. "올리고뉴클레오티드"라는 용어는 모든 짧은 형태의 유전물질에 적용되는 것이다.

<400> 유전물질(즉, 핵산)은 길이가 3개의 염기(약 10Å)의 코돈(codon)으로부터 100억Å 또는 1미터의 인간 DNA로 급격하게 변화될 수 있다. 유전 치료법에 상이한 형태의 많은 유전물질을 사용할 수 있다. [예를 들어, 전형적인 인간 유전자의 길이는 약 34마이크론(μ)(340,000Å)이고; 이. 콜라이 mRNA의 평균 길이는 약 0.5마이크론(μ)이며, 가장 작은 RNA 분자인 것으로 생각되는 tRNA는 전형적으로 약 0.003마이크론(μ)이다. 가능하게는, 어떠한 유전물질이라도 본 발명에 사용할 수 있다.

<401> 유전물질과 덴드리머의 콘쥬게이트를 착체로 부른다. 본원에 사용된 용어 "착체"는 덴드리머와 운반물질의 콘쥬게이트 형태를 의미하며, 운반 물질과 덴드리머사이의 회합은 이온결합, 반데르발스력, 수소결합, 금속 결합 또는 이들의 조합에 의해 이루어진다. 착체에 있어서, 운반물질은 공유결합에 의하여 덴드리머와 회합하지 않는다.

<402> 세포에 의한 DNA:덴드리머 착체의 흡수는 비교적 저분자량, 단쇄 DNA 뉴클레오티드(실시예 47, 제 20 도 및 제 21 도) 및 고분자량의 DNA로써 설명하였다. 또한 유전자 전달 및 발현은, 제 22 도에서 환형 또는 초나선형 DNA 및 선형 DNA(실시예 48, 제 22 도)에 대해 나타내었고, 다른 실험 및 도면에서는 유전자 전체 및 긴 DNA 단편(예컨대, 6.5kb)에 대해 설명하였다. DNA:덴드리머의 경우에 관찰된 상기 흡수는, DNA만을 세포내로 넣는 경우보다 용이하며, 이것은 표적 세포의 능동적, 에너지 의존적 과정이다(실시예 47).

<403> 덴드리머에 유전물질을 결합시키기 위하여, 덴드리머를, 바람직하게는 후술되는 방식으로 생체내에서 사용하기 위해 미리 표적화된 덴드리머를 실온(20 내지 40℃) 및 약 5 내지 약 10의 pH에서 수용액중 유전물질과 혼합한다. 음전하 핵산은 덴드리머 거대분자의 양전하 표면과 착체화하여 격자 구조를 형성한다.

<404> DNA와 같은 유전물질은 약 10:1 정도의 유전물질 대 덴드리머 전하비에서 덴드리머와 안정한 착체를 형성하며, 약 2:1 이하의 전하비에서 더욱 착체화된다. (실시예 42에서, 샘플 4의 경우 전하비 1:0.6에서 효율적인 형질감염이 관찰된다; 표 XIV, 제 18도 및 제 32 도를 참조). 이 전하비는 또한 아가로스 겔중에서 측정할 때, DNA 착체화를 완전하게 한다) 낮은 전하비, 예컨대 1:10 또는 1:100에서, 착체는 계속적으로 매우 안정하며(실시예 49, 제 23 도를 참조), DEAE-덱스트란의 부재하에서도 형질감염이 관찰된다(실시예 56 및 제 30 도). 실시예 49, 제 23(A) 내지 (D) 도에 나타난 대로, 약 40:1 보다 큰 DNA:덴드리머 전하비에서 착체화는 최소로 된다. 다른 전하비 범위, 일부 덴드리머의 경우 약 1:1,000의 DNA:덴드리머 전하비에서, 또한 일부 덴드리머의 경우에는 약 1:10,000에서 양호한 형질감염이 관찰된다(실시예 56, 제 30 도). 다른 덴드리머 시스템에서는 1:1,000,000 정도의 전하비가 형질감염을 매개하는 데에 효과적일 수 있다.

<405> 실시예 50(제 24 도)에 나타난 대로, 전하비는 DNA:덴드리머 착체 형성에 있어서 결정 인자인 것으로 보이며, 같은 몰비(1:16)에서 G8(NH_3) 덴드리머보다 큰 표면 전하를 갖는 G11(EDA) 덴드리머는 DNA와 안정한 착체를 형성하는 반면에, 같은 몰비에서 DNA와 혼합된 G8(NH_3) 덴드리머는 그렇지 않다. 이것은 착체 형성이 몰비보다 전하비에 더욱 의존한다는 것을 나타낸다.

<406> DNA:덴드리머 착체는 매우 넓은 범위의 pH(즉, 5.2 내지 9.8)(실시예 51, 제 25 도) 및 넓은 범위의 염 농도(즉, 0 내지 1.5M)(실시예 52, 제 26 도)에 걸쳐 매우 안정하며 수용성이다. 유전물질을 덴드리머와 착체화시킴으로써 제한 엔도뉴클레아제 효소 또는 세포내 뉴클레아제의 존재하에서 분해되지 않도록 보호한다(실시예 53, 제 27 도 및 실시예 54, 제 28도). 이로써 상기 착체는 생체내 세포 형질감염에 적합하게 된다.

<407> DNA:덴드리머 착체를 사용하여 형질감염시킬 수 있는 세포당 유전물질의 양은 변화할 수 있으며, 어느 점까지 유전물질 양의 증가에 따라 형질감염의 정도가 증가하는 경향이 있다(실시예 55, 제 29 도) 임의의 전하비에서, 형질감염은 배양 웰(약 200,000세포)당 1㎍의 플라스미드 DNA에서보다 5㎍의 플라스미드 DNA에서 커지는 것으로 보이지만, 이 효과는 웰(well)당 10㎍의 플라스미드 DNA에서 안정 수준에 달하는 것으로 보인다.

<408> 유전물질의 농도가 약 1.0 내지 약 10.0㎍/㎖인 유전물질:덴드리머 용액이 시험관내 및 생체내에서 유용하다고 생각된다. 생체내 사용 농도 역시 투여 방식의 함수로서 변화한다. 혈류에서 희석이 된다는 것을 고려하여, 정맥내 주사용으로는 더 진한 용액을 사용한다. 부위 특이적인 투여, 예컨대 종양 또는 기관내로의 직접 주입의 경우는 더 묽은 용을 사용할 수 있다.

<409> 따라서, 약 1.0 내지 약 10.0㎍/㎖의 최종 농도를 얻기에 충분한 유전물질을 실질적으로 양의 표면 작용성인 충분한 가지형 중합체와 물중에서 혼합하여, 상기한 변수의 함수로서, 약 10:1 내지 약 1:10,000, 더욱 바람직하게는 약 3:1 내지 약 1:1,000, 또는 더욱 바람직하게는 약 1.5:1 내지 약 1:100, 또는 약 1:1 내지 약 1:15, 또는 약 1:5 내지 약 1:10의 유전물질:가지형 중합체 전하비를 얻는다. 혼합은 약 5 내지 약 10의 pH 및 약 20 내지 약 40℃의 온도에서 수행한다.

<410> 일반적으로 말하자면, 유전물질:덴드리머 전하비는 약 10:1 내지 약 1:10,000(더 낮을 수도 있음)일 수 있으나, 더욱 바람직하게는 약 5:1 또는 심지어 3:1 내지 1:10,000이다. 이 범위내에서 선택되는 비율은 증진제(예: DEAE-덱스트란, 글리세롤 또는 클로로퀸)의 사용 여부, 또는 표적 지향제의 사용 여부의 함수로서 달라질 수 있다. 전술한 넓은 범위가 여전히 적용가능하지만, 증진제를 사용하지 않은 경우 바람직한 전하비는 약 1:5 내지 1:10,000, 더욱 바람직하게는 1:10 내지 약 1:10,000이다. 유사하게, 증진제를 사용하는 경우 바람직한 전하비는 약 5:1 내지 약 1:10,000, 바람직하게는 약 1:1 내지 약 1:100, 더욱 바람직하게는 약 1:1 내지 약 1:15, 가장 바람직하게는 약 1:5 내지 약 1:10이다. 마지막으로 표적 지향제를 사용하는 경우에는, 비-지향 형질감염의 경우보다 더욱 큰 전하비를 사용하여 양호한 효과를 얻을 수 있는 것으로 생각된다. 따라서, 바람직한 범위는 약 10:1 내지 약 1:10, 더욱 바람직하게는 약 3:1 내지 약 1:10, 더욱 바람직하게는 약 1:1 내지 약 1:10이고, 몇몇 경우에서 가장 바람직하게는 약 1:1이다. 이러한 범위는 이하에 더욱 자세히 기술한다.

<411> 전형적으로, 착체는 처음에 약 1.0 내지 약 10.0㎍/20㎕의 유전물질 농도에서 혼합시킨 후, 50배 희석시켜 1㎖당 유전물질 1.0 내지 10.0㎍의 최종농도가 되도록 한다. 초기의 더 진한 또는 최종적인 유전물질 가지형 중합체 용액이 적합한 진단 또는 약학 조성물로서 포장될 수 있다.

<412> E. 형질감염의 증진

<413> 가지형 중합체만을 사용하여, 유전물질로 세포를 형질감염시킬 수 있으나, 주로 낮은 유전물질 대 덴드리머 전하비(예컨대, 약 1:5 이하, 바람직하게는 약 1:10 미만)에서 큰(G8보다 큰) 덴드리머를 사용하여 형질감염시킬 수 있다(실시예 56, 제 30 도 및 제 31 도) 덴드리머와 유전물질만을 사용하는 형질감염은 상기한 바와 같이, 먼저 유전물질을 저세대의 덴드리머(에컨대, G5)와 착체화시킨 후, 큰 덴드리머(예컨대, G9)를 첨가함으로써 증진시킬 수 있다(실시예 46, 제 15 도 및 제 16 도를 참조). 이것은 제 2 덴드리머를 약 0.1 내지 약 10마이크로몰의 농도로 사용할 경우 우수한 작용을 나타내는 경향이 있지만, 특정 농도는 덴드리머 유형에 따라 달라질 수 있다(제 15 도 및 제 16 도를 비교함). 제 1 덴드리머 및 이와 착체화된 유전물질은, 시험 웰당 약 1㎍의 유전물질을 착체화하기에 충분한 농도로 사용한다.

<414> 세포를 비특이적으로 형질감염시키는 착체는 상반되는 두 목표를 이루어야 한다. 첫번째는 DNA를 가능한 조밀하게 만들면서, 동시에 착체 표면에 큰 양전하 밀도를 갖게 하여 세포막의 음전하 인지질에 결합하는 것을 매개하는 것이다. 이러한 이중 활성의 필요성 때문에, 덴드리머의 다분산성 크기의 혼합물이, 작은 덴드리머가 DNA를 밀집시키는 것을 돕는 한편, 큰 덴드리머는 세포에의 결합을 매개함으로써, 비특이적 형질감염에 유용할 수 있음을 시사한다. 이것은 또한, 저세대의 덴드리머가 큰 덴드리머와 DNA에 의해 형성된 규칙적인 격자를 파괴하기 때문에, 더욱 작은 크기의 DNA:덴드리머 착체를 제조하는 데에도 도움이 될 수 있다. 이와 같은 개념은, 큰 덴드리머만으로 제조한 큰 DNA 덴드리머 착체와 비교하여, 다분산성 크기의 덴드리머를 사용하는 경우 작은 밀집된 DNA 착체를 나타내는 전자현미경 자료(즉, 제 60 도, 패널 3, 4 및 5)에 의해 지지된다.

<415> 형질감염은 또한 형질감염 완충액에 다양한 약제를 첨가함으로써 증진시킬 수 있다. 예상외로, DEAE-덱스트란이 형질감염 완충액내에 유전물질과 덴드리머의 착체와 함께 존재하는 경우, 상승효과적인 형질감염 결과가 얻어진다. 유전물질:덴드리머 전하비는 약 5:1 내지 약 1:10,000, 바람직하게는 약 1:1 내지 약 1:100, 더욱 바람직하게는 약 1:1 내지 약 1:15, 가장 바람직하게는 약 1:5 내지 1:10이다(실시예 56, 제 30 도; 실시예 57, 제 32 도, 실시예 58, 제 33 도; 실시예 59, 제 34 도; 실시예 42, 제 17 도). DEAE-덱스트란 농도는 바람직하게는 약 0.125 내지 2μM, 더욱 바람직하게는 약 0.25 내지 약 1μM의 비교적 좁은 범위일 수 있다(실시예 60, 제 35 도). 형질감염을 증진시키기 위하여, DEAE-덱스트란 용액에 넣기 전에 유전물질을 덴드리머와 착체화시켜야 한다. 이를 완료하면, 전하비 약 1:1 내지 약 1:100, 더욱 바람직하게는 약 1:5 내지 약 1:10의 DNA:덴드리머 착체에 의한 DEAE-덱스트란의 존재하에서의 형질감염은, 상이한 유형의 다양한 세포에서 DNA:덴드리머 착체만에 의한 형질감염보다 수십배 더 효과적이다(실시예 61, 제 36 도). 이것은 형질감염시키기 어려운 세포주에도 해당된다(실시예 62, 제 37 도). 상기는 또한 리포펙틴™ 및 리포펙타민™과 같은 다른 약제를 사용하는 형질감염보다 더 효과적이다(실시예 61 내지 63, 제 36 도 내지 제 38 도).

<416> 전형적으로, 유전물질:덴드리머 착체는 형성시킨 후, DEAE-덱스트란과 혼합시키기 전에 3 내지 5분간 방치한다. DEAE-덱스트란을 더 진한 착체 용액(즉, 1 내지 10㎍ 유전물질/20㎕용액) 또는 형질감염 완충액에 첨가할 수 있지만, 후자에 첨가하는 것이 바람직하며, 이를 사용하여 더 진한 유전물질:덴드리머 착체 용액을 희석시킨다.

<417> 시험관내 형질감염은 통상의 세포 교란(pertubation) 성분의 사용에 의해 증진되는 것으로 공지되어 있다. 본 발명에서, DEAE-덱스트란과 세포 교란제 DMSO의 효과를 비교한 실시예 64(제 39 도)에서 볼 수 있듯이, DEAE-덱스트란은 세포 교란제보다 더욱 양호하게 작용하는 것으로 보인다. DMSO 단독의 경우는 DEAE-덱스트란의 효과와 비교할 때 DNA:덴드리머 착체에 의한 형질감염에 거의 영향을 주지 않는 것으로 보인다. 흥미롭게도, DMSO는 DEAE-덱스트란과 함께 사용하는 경우 DEAE-덱스트란의 효과를 상승효과적으로 증진시키는 듯 하며, 이는 DEAE-덱스트란의 효과에는 세포 교란이 아닌 다른 작용이 포함됨을 제시한다.

<418> DNA:덴드리머 착체에 DEAE-덱스트란 또는 다른 약제를 첨가하는 것(착체가 형성된 후에)은 독특한 방식으로 형질감염을 증진시키는 데 효과적인 것으로 보이기 때문에, 비특이적 형질감염의 증진에 있어서 상기 약제의 역할을 더 이해하기 위하여 다른 종류의 실험을 수행하였다. DEAE-덱스트란을 첨가 및 비첨가한 DNA 덴드리머 착체의 전자현미경사진을 촬영하였다. DEAE-덱스트란의 첨가 또는 덴드리머의 다분산성 혼합물의 사용은 DNA:덴드리머 착체의 크기를 급격하게 감소시켰다(즉, 제 60 도, 패널 3, 4 및 5). 상기 약제로 얻어진 더욱 작은 크기의 착체는 세포에 더욱 잘 접근하고 형질감염시키기 쉬울 것이기 때문에, 이것은 이들 약제가 형질감염을 증진시키는 이유의 근거를 제공한다.

<419> DNA:덴드리머 착체는 세포 표면의 음전하의 인지질에 결합하는 초점으로서 작용하기 위해서 전기적으로 조밀한 양전하의 물질을 함유해야 한다. 이것은 표면 전하 밀도가 큰, 고세대 덴드리머를 사용하면 잘 이루어진다. 불행하게도, 이들 덴드리머는 세포가 흡수하기에 어려운 약 2,000 내지 5,000Å의 큰 회합물 또는 거대격자(macrolatice)에 DNA 를 착체화시키는 경향이 있다.

<420> DEAE-덱스트란은 분산제로서 작용하여, 큰 회합물을, 세포에 결합하기 위해 그 표면에 전하를 갖는 조밀 덴드리머를 여전히 보유하는 더욱 작은 착체로 감소시킨다. 다분산성 가지형 중합체, 즉 크기가 약 22 내지 약 110Å으로 변화하는 입자의 혼합물(예컨대, 실시예 42의 샘플 P 및 Q를 참조)은 2,000 내지 5,000Å의 회합물을 형성하지 않는 경향이 있다. 대신에 이들은 약 1,000Å 이하의 회합물을 형성하는 것으로 보이고, 이것은 DEAE-덱스트란을 사용하지 않고 유전물질을 효율적으로 형질감염시키는 것을 용이하게 한다. DEAE-덱스트란을 첨가(제 60 도, 패널 4) 및 비첨가한(제 60도, 패널 3), 균일한 크기의 덴드리머 G10(EDA)와 유전물질의 착체의 전자현미경 사진을 비교한 결과, 회합물 크기에 있어서 상당한 차이를 나타내었다. 다분산성 덴드리머(제 60 도, 패널 5)와 착체화된 유전물질의 전자현미경 사진은 제 60 도, 패널 4에 나타낸 것에 더 필적하는 회합물을 나타낸다.

<421> 놀랍게도, DEAE-덱스트란과 유사하게, 글리세롤도 또한 유전물질:가지형 중합체 착체 중 유전물질의 형질감염을 상승효과적으로 증진시키는 것으로 보인다. 글리세롤의 형질감염 용액 농도는 바람직하게는 약 2 내지 10중량%, 더욱 바람직하게는 약 2 내지 약 5중량%이다. 이것은 DEAE-덱스트란에 필적하는 분산 작용을 제공하는 것으로 보인다.

<422> 클로로퀸도 또한 형질감염을 증진시키며, 증진제로서 단독 또는 DEAE-덱스트란과 함께 사용하는 것에 상관없이, 놀랄만한 상승효과와 함께 형질간염을 증진시킨다. 어떠한 이론에도 결부되는 것을 바라지 않지만, 클로로퀸은 DEAE-덱스트란과는 완전히 상이한 방식으로 작용하는 것으로 생각된다. 클로로퀸은 엔토솜을 중화시켜, 유전물질:덴드리머 착체의 격리 및 빠른 분해를 방지하는 것으로 생각된다. 이것은 유전물질을 단독 또는 클로로퀸을 첨가하지 않은 DEAE-덱스트란의 존재하에 형질감염시킨 경우보다 유전물질이 더 많이 전사 및 번역되도록 한다(제 61A 도 및 제 61B 도, 및 실시예 73). 세포간에는 엔도솜에 착체를 가두는 능력면에서 차이가 있기 때문에, COS1세포(제 61A 도)및 RAT2 세포(제 61B 도)의 형질감염 결과의 차이에 의해 예시되는 바와 같이, 클로로퀸의 증진 효과는 상이한 세포주간에 상당히 달라진다.

<423> 조밀 별형 중합체 표면에 불규칙한 음전하의 작용기를 도입하는 것 또한 형질감염에 영향을 준다(실시예 67, 제 43 도). 이러한 음전하의 작용기는 주로 양전하의 표면(예컨대, 아미노 표면 작용기를 가짐)에 카복시기를 불규칙적으로 산재시킴으로써 얻어진다. 양(양이온성) 및 음(음이온성)의 작용기를 둘다 갖는 덴드리머는, 때때로 본원에서 양쪽성 표면을 갖는 덴드리머로 불린다. 전체적인 양의 표면 전하의 감소는 일반적으로, 1:5 또는 1:1과 비교하여 더 낮은 전하비(예컨대, 1:10)인 경우는 제외하고, 형질감염의 효율을 감소시키는 것으로 보인다(제 43 도).

<424> F. 표적 지향성 형질감염

<425> 덴드리머-유전물질 착체내로 표적 지향제를 혼입시키는 것은 목적하는 세포로 착체를 향하게 할 뿐만 아니라, 표적 잔기에 의한 세포의 형질감염을 증진시킬 수 있다(실시예 65, 제 40 도). 충분한 표적 지향제를 거대분자에 결합시켜 형질감염시킬 세포내 물질의 수용체 부위에 이를 끌어당겨 결합시키지만, DNA 착체화가 일어나지 않는 정도까지 표면 전하를 감소시키지는 않는다. 그 결과, 표적 지향제의 결합은 표적 지향제가 가지형 중합체 표면의 양이온성 특징을 거의 방해하지 않는 방식으로, 또는 거대분자 표면의 작용기에 비하여 소량을 사용하여 수행한다. 따라서, DNA와 안정한 착체를 형성하는(상기 언급한 전하비에서) 덴드리머의 능력은 표적 지향제의 존재에 의해 손상되지 않는다(실시예 65, 제 41 도).

<426> 덴드리머-유전물질 콘쥬게이트와 함께 표적 지향제를 사용하는 것은 본 발명의 가장 중요한 바람직한 양상 중 하나이다. 증진효과가 없을 경우 약 1:10 또는 1:5보다 큰 DNA:덴드리머 전하비에서는 비표적화된 형질감염이 효과적으로 일어나지 않는다는 사실은, 이들 착체가 세포 표면의 음전하의 인지질에 결합하기에 충분한 양전하를 갖지 않는다는 사실에 기인할 수 있다. 중요하게는, 상기 높은 유전물질:덴드리머 전하비(즉, 1:10 내지 1:1, 또는 가능하게는 3:1 또는 10:1)에서 형성된 착체는 여전히 표적화되어 표적 지향제에 의해 특정 세포를 형질감염시킬 수 있다. 상기의 높은 전하비에서 상기 방식으로 DNA:덴드리머 착체를 제조하는 경우 또는 혈청이 존재하는 경우 무작위적으로 발생되는 세포의 의도하지 않은

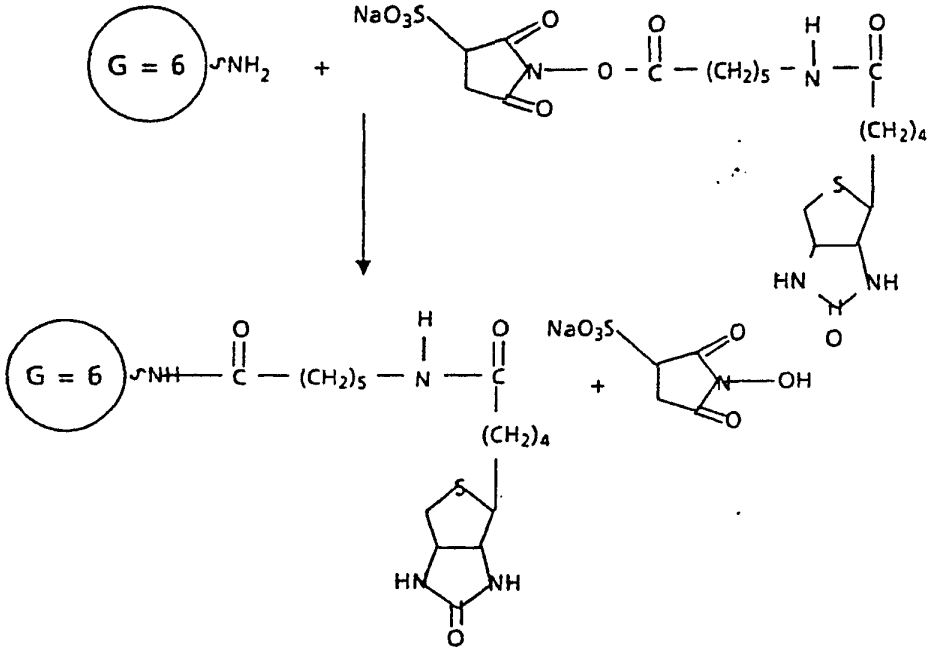
형질감염(많은 환경하에서 바람직하지 못할 수 있음)을 피할 수 있다(실시예 66, 제 42 도). 표적 지향제를 사용하는 경우, 1:1의 전하비가 많은 용도에서 바람직할 수 있다.

<427> 표적 지향제의 사용은 유전물질을 세포내로 생체내 형질감염시키는 데 매우 중요하다. DEAE-덱스트란은, 시험관내 용도 목적인 경우에는 유독하지 않지만, 형질감염 증진제로서 생체내에 사용하기에는 적합하지 않다. 증진제의 존재 또는 부재하에서 덴드리머-유전물질 착체는 혈청이 존재할 경우 세포를 거의 형질감염시키지 못한다(실시예 66, 제 42 도). 유전물질-덴드리머 착체가 특이적으로 표적화된 세포에 결합되는 것을 촉진하는 표적 지향제는, 혈청의 존재하에서도 상기 세포내로 유전물질의 형질감염을 용이하게 한다.

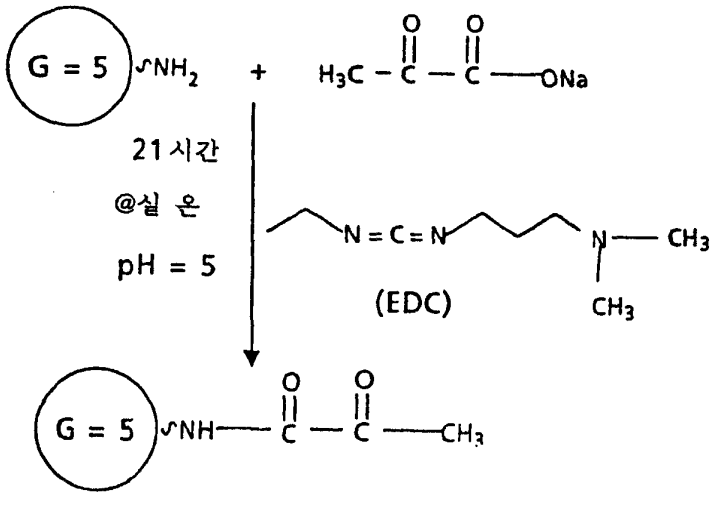
<428> 표적 지향제 또는 개질된 덴드리머 표면은 또한 시험관내에서 DEAE-덱스트란의 존재하에 덴드리머-유전물질 착체와 함께 사용되어 형질감염을 증대시킬 수 있다. 덴드리머상에 갈락토스 트리사카라이드 같은 표적 지향제가 존재하는 것은 상기 당의 수용체를 발현시키는 세포내 유전물질의 형질감염을 상당히 증가시키는 것으로 보인다. 이것은 비콘쥬게이트화된 G11(EDA) PAMAM 덴드리머를 사용하여 얻은 형질감염과 비교된다. (제 40 도를 참조)

<429> 적합한 표적 지향제는 특이성 및 높은 친화성을 가지고 결합하는 물질, 예컨대 항체, 항체 단편(예: Fab, Fab', $F(ab')_2$ 단편, 단쇄 항체, 또는 필수적인 표적 특이성을 갖는 다른 항체 단편), 당단백질, 단백질, 당지질, 호르몬, 추가의 생물반응 개질제, 항원결정기, 세포 영양물질, 표적 세포 특이성을 나타내는 화학 작용기 등을 포함한다. 표적 지향제를 덴드리머에 연결시키는 다수의 방법은 당해 분야의 숙련자라면 알 수 있을 것이다.

<430> 바람직한 표적 지향제인 바이오틴을, 아미노 작용성 표면을 갖는 덴드리머에 결합시키는 한 방법을 하기에 도식적으로 예시한다:



<432> 다른 가능성있는 표적 지향제인 피루브산을, 아미노 작용성 표면을 갖는 덴드리머에 결합시키는 것은, 64개의 피루베이트를 G5 덴드리머에 커플링시키는 것을 나타내는 하기의 반응에 따라 진행된다:



<434> 표적 지향제가 덴드리머의 전체적인 양이온성 표면 특징을 간섭하는 것을 최소화하기 위하여, 표적 지향제와 덴드리머의 작용화도는 최소이다. 따라서, 표적 지향제 대 덴드리머 거대분자의 화학양론적

비율은 약 1:1 내지 약 $N_cN_b^{G-1}$:1(여기에서, N_c 및 G는 상기 정의한 바와 같고, N_b는 분지 다중도임)이다. N_c가 3이고, N_b가 2인 덴드리머에서, $N_cN_b^{G-1}$ 말단기에 단 한 개의 표적 지향제를 사용하여, 몇몇 경우에 양전하 특징(예컨대, 아미노)의 작용기 및 산재된 음전하 카복실 작용기를 제공하는 데 이용가능한 $N_cN_b^{G-1}$ 대 1의 말단기가 되게 하는 것이 필요하다. 특히 조밀 별형 중합체 및 덴드리머의 경우 덴드리머의 일정한 구조로 인하여 다른 유형의 물질로는 이룰 수 없는 극도의 정확성으로 콘쥬게이트화될 수 있다. 이 정확성은 유전물질의 결합 및 운반 능력을 보유하는 표적화된 덴드리머의 제조를 가능하게 한다.

<435> 개개의 덴드리머 분자가 표적 잔기의 부착에 의해 변경(differentiate)될 수 있는 것처럼, 회합물도 또한 변경될 수 있다. 표적 잔기를 회합물 중의 모든 덴드리머, 또는 하나에만 또는 이들의 일부에 결합시킨 후, 다른 비변경된 덴드리머와 회합시킬 수 있다. 온화한 생리적 조건(즉, pH 7.4)하에 두 종류를 혼합하면, 두 종류는 정전기적 상호작용을 기본으로 하여 서로 회합될 것이다. 이 신규한 방법은 변경된 덴드리머 회합물을 합성하는 신규한 방법을 제공할 뿐만 아니라, 생리적 조건하에 표적 잔기를 전달할 수 있는 시스템을 제공한다.

<436> G. 유전물질-덴드리머 콘쥬게이트의 용도

<437> 본 발명의 유전물질-덴드리머 콘쥬게이트는 생체내 또는 시험관내 DNA 전달에 사용할 수 있다. 생체내 용도는 콘쥬게이트를 혈류내로 도입시켜 표적화된 세포에 도달시키는 것을 포함한다(예컨대, DNA:덴드리머 착체를 문맥 정맥에 주사하여 간세포에 도달하게 함). 또한, 착체를 목적하는 특정한 국소(예: 관절 또는 복막강)에 주사하여, 세포를 국소적으로 형질감염시킬 수 있다. 콘쥬게이트를 체내에 경피적으로 도입하는 방법 또한 사용할 수 있으며, 다른 기법도 약제를 체내로 도입하는 방법과 유사한 방식으로 사용할 수 있다.

<438> 덴드리머상의 표적 지향제는 콘쥬게이트를 세포 표면의 수용체로 향하도록 결합시키고, 이어 세포내이입에 의해 형질감염시키는 것을 용이하게 한다. 제 51 도는 세포의 형질감염시 표적화된 DNA:덴드리머 착체의 가설적 과정을 예시한다. "A"에서, DNA(10)는 표적 지향제(30)가 결합된 다수의 조밀 별형 덴드리머(20)로 착체화되고 밀집된다. "B"에서 콘쥬게이트(10-20-30)는 표적 지향제(30)에 의해 수용체(50)에서 세포(40)에 결합한다. "C"에서, 덴드리머(20)로부터의 DNA(10)의 분리가 나타내듯이 형질감염이 일어나, 후속적인 전사 및 번역을 용이하게 한다.

<439> 방사핵종 연구결과, 상당 부분의 형질감염된 유전물질이 진핵 세포의 핵에 들어가는 것으로 나타났다(실시예 70, 제 47 도, A 내지 F). 덴드리머 형질감염된 유전물질의 생성물은 우수한 지속성(substantivity)을 나타낸다(실시예 68, 제 44 도). 루시페라제™ 효소 활성은 형질감염된 지 21시간 후에 현저하고, 45시간 후에도 여전히 존재하며, 일부 활성은 심지어 69시간 후에도 계속된다. RSV-β-gal 플라스미드 및 덴드리머를 사용하여 세포에 전달된 lacZ 유전자의 발현은 제 48 도, 제 49 및 제 50 도에 사진으로 나타나 있다(또한 실시예 71을 참조). lacZ 유전자를 발현하는 세포는 상기 도면에서 어둡게 된 세포이다. 적당한 조건하에, 거의 모든 세포가 염색되며, 이는 배양액 중의 거의 모든 세포가 형질감염되었음을 나타낸다.

<440> DNA:덴드리머 착체 자체는 매우 낮은 세포독성을 갖는다(실시예 69, 제 45 도 및 제 46 도). 배양액중의 정상적인 세포치사율은 약 5 내지 10%이다. 세포 배양액에 DNA:덴드리머 착체를 첨가해도 치사(attrition) 속도를 거의 증가시키지 않는다. DNA:덴드리머 착체와 함께 DEAE-덱스트란을 첨가하면 독성이 증가되지만, 시험관내에서 그의 사용을 방해하기에 충분할 정도는 아니다(제 45 도 및 제 46 도). 상기는 상이한 유형의 다양한 세포에서 증명되었다(같은 도면).

<441> 본 발명에 따라 형질감염시킨 유전물질은 세포의 염색체 DNA에 영구히 도입될 수 있으며, 성공적으로 재생산되어 후속 세대의 클론내로 운반된다(실시예 72, 제 52 도 및 제 53도). 본 발명의 기법을 사용하여, C418(네오마이신) 내성 및 β-갈락토시다제를 발현시키는 유전자를 D5 및 RAT2 세포주에 성공적으로 형질감염시켰다. 두 유전자를 단 하나의 RSV-β-gal-NEO 플라스미드에 전달시켰다. 이들 세포주는 매 24시간마다 복제되었다. 형질감염시킨 지 4주 후, 새로 생성된 클론은 계속하여 네오마이신 내성 및 β-갈락토시다제를 발현시켰다. 본 발명의 기법을 사용하여 얻은 결과는 인산 칼슘 또는 DEAE-덱스트란만으로 형질감염을 매개하는 것과 같은 선행 기술에 비하여 매우 우수하다. 상이한 발현 플라스미드로부터 얻은 리포터(reporter) 유전자를 함께 형질감염시키는 경우(예컨대, 네오마이신 또는 β-갈락토시다제)에도, 유사한 결과를 얻는다.

<442> 조밀 별형 중합체가 아닌 다른 유형의 가지형 중합체(즉, 리신계의 비대칭 분지된 덴드리머)를 사용하여 유전물질의 형질감염을 또한 이룰 수 있고, 이는 실시예 73(제 54 도)에 설명되어 있다. 앞서 논의된 조밀 별형 중합체에 의한 형질감염의 모든 조건은 또한 다른 유형의 가지형 중합체를 사용하는 형질감염을 좌우한다. 예를 들어, DEAE-덱스트란은 또한 DNA:덴드리머 전하비 1:5 내지 1:10의 비대칭 리신 덴드리머에 의한 형질감염을 상승효과적으로 증진시킨다.

<443> [실시예]

<444> 하기의 실시예는 본 발명을 더 예시하지만, 본 발명의 범주를 한정시키려는 것은 아니다. 문자로 표시한 실시예는 출발물질의 제조방법에 관한 것이며; 숫자로 표시한 실시예는 본 발명의 생성물의 제조방법에 관한 것이다.

<445> 하기의 실시예에서, 달리 명시하지 않는 한, 하기의 용어 및 조건을 사용하였다.

<446> 용 어:

<447> 주위온도는 실온 또는 약 20 내지 약 25℃를 의미한다.

<448> ASGPR은 아시알로당단백질 수용체를 의미한다.

<449> BHA는 벤즈히드릴 아민을 의미한다.

<450> β-gal은 RSV-lacZ를 의미한다.

<451> 결합 완충액은 [Protocol for Dendrimer-Dextran Transfection, Day 2, Step 1, 용액의 제조에 관한 논의]하에 이후에 기술된 특정 완충용액을 의미한다.

<452> BOC는 3급-부톡시카보닐을 의미한다.

<453> Conc.는 농축 상태를 의미한다.

<454> Cyt는 단백질, 사이토크롬 c를 의미한다.

<455> DCC는 디사이클로헥실카보디이미드를 의미한다.

<456> DEAE-덱스트란은 양전하로 하전된 중합체인 덱스트란의 디에틸아미노에틸 에테르를 의미한다.

<457> DMEM은 둘베코(Dulbecco's) 변형 이글스(Eagles) 배지를 의미한다.

<458> DMF는 디메틸포름아미드를 의미한다.

<459> DMSO는 디메틸설폭사이드를 의미한다.

<460> DO3A는 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7-트리아세트산을 의미한다.

<461> DOTA는 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산을 의미한다.

<462> DTAF는 디클로로트리아지닐 플루오레세인을 의미한다.

<463> DTPA는 디에틸렌트리아민펜타아세트산을 의미한다.

<464> DTPMP는 디에틸렌트리아민펜타메틸렌포스폰산을 의미한다.

<465> DTT는 1,4-디티오트레이톨을 의미한다.

<466> EBV는 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스를 의미한다.

<467> EBV-A는 EBV 프로모터에 의해 유도된 카이네이즈 유전자로부터 얻은 히그로마이신(HYGROMYCIN) B™ 항생물질을 불활성화시키는, 히그로마이신 B 포스포트랜스퍼라제 단백질을 생성하는 발현 플라스미드를 의미한다.

<468> EDA는 에틸렌디아민을 의미한다.

<469> EDAC는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드를 의미한다.

<470> EDC는 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드를 의미한다.

<471> EDTA는 에틸렌디아민테트라아세트산을 의미한다.

<472> FACS 분석법은 형광 활성화된 세포 분류법을 의미한다.

<473> FITC는 플루오레세인 이소티오시아네이트를 의미한다.

<474> G 또는 Gen은 덴드리머의 세대를 의미한다.

<475> GC는 기체 크로마토그래피를 의미한다.

<476> GGE는 구배 겔 전기영동을 의미한다.

<477> HBS는 행크스 완충 염수를 의미한다.

<478> HEPES는 N-2-하이드록시에틸피페라진-N'-2-에탄설폰산을 의미한다.

<479> HOBT는 N-하이드록시벤조트리아졸을 의미한다.

<480> HPLC는 고성능 액체 크로마토그래피를 의미한다.

<481> HRP는 양고추냉이 퍼옥시다제를 의미한다.

<482> 히그로마이신 B™은 스트렙토마이세스 히그로스코피쿠스(Streptomyces hygroscopicus)에 의해 생성된 아미노글리코사이드계 항생물질이다.

<483> ICAM은 세포내 세포결합 분자를 의미한다.

<484> 면역글로불린은 Fab, $F(ab')_2$ 및 기타 단편을 비롯한, IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 의미한다.

<485> LC는 액체 크로마토그래피를 의미한다.

<486> 루시페라제™는 프로메가(Promega, 미국 위스콘신 메디슨 소재)로부터 구입가능한, 개똥벌레 루시페라제 유전자로부터 생성한 효소를 의미한다.

<487> 루시피렌™(LUCIFIREN)은 루시페라제™ 효소활성을 측정하기 위한 기질을 의미한다.

<488> MB+는 양이온 형태의 염료인 메틸렌 블루를 의미한다.

<489> NHS-LC-바이오틴은 바이오틴과 함께 사용된 링커를 갖는 표준 스페이서를 의미한다.

<490> NMP는 N-메틸피롤리디논을 의미한다.

<491> 밤새라는 것은 약 9 내지 18시간을 의미한다.

<492> PAMAM은 폴리아미도아민을 의미한다.

<493> PBS는 120mM NaCl, 2.7mM KCl 및 10mM 포스페이트 완충액(pH 7.4)을 함유하는 포스페이트 완충 염수(시그마 케미칼(Sigma Chemical)로부터 구입함)를 의미한다.

<494> PEI는 폴리에틸렌이민을 의미한다.

<495> P_i는 무기 포스페이트(완충액에 사용됨)를 의미한다.

<496> PTFE는 폴리테트라플루오로에틸렌을 의미한다.

<497> RSV-β-gal-NEO는 RSV 프로모터에 의해 유도된, lacZ 유전자로부터 β-갈락토시다제 단백질을, APH 유전자(NEO)로부터 아미노글리코사이드 포스포트랜스퍼라제 단백질을 생성시키는 발현 폴라스미드를 의미한다.

<498> RSV-lac는 RSV 프로모터에 의해 유도된 lacZ 유전자로부터 β-갈락토시다제 단백질을 생성하는 발현 플라스미드를 의미한다.

<499> RSV-luc는 RSV 프로모터에 의해 유도된 개똥벌레 루시페라제 유전자를 발현시키는 리포터 플라스미드를 의미한다.

<500> SDS는 나트륨 도데실설페이트를 의미한다.

<501> SP-세파덱스™ C-25 수지는 파마시아 인코포레이티드(Pharmacia Inc.)가 시판중인 황산 작용성을 갖는 양이온 교환 수지이다.

<502> TREN은 트리스-(2-아미노에틸)아민을 의미한다.

<503> THF는 테트라하이드로푸란을 의미한다.

<504> TLC는 박층 크로마토그래피를 의미한다.

<505> TMB는 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘을 의미한다.

<506> TRIS 글리신은 N-[2-하이드록시-1,1-비스(하이드록시메틸)에틸]글리신을 의미한다.

<507> TRIS는 트리스 아민 완충액, 즉 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄을 의미한다.

<508> 트리톤(Triton) X-100은 옥톡시놀-9를 의미하며, 일반적으로 일반식 $C_8H_{17}C_6H_4(OCH_2CH_2)_nOH$(여기에서, n은 평균 9임)에 따르는 에톡실화 알킬페놀인 계면활성제(롬 앤드 하스(Rohm and Hass)에서 시판중임)이다.

<509> X-gal은 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-β-D-갈락토사이드를 의미한다.

<510> <u>일반적인 실험방법</u>

<511> 질량 스펙트럼은, 피니간(Finnigan) TSQ 질량 분광계(Q^1MS 방식) 또는 VG ZAB-MS 고분해능 질량 분광계에서 얻었다(3:1의 디티오트레이톨:디티오에리트리톨을 사용하는, 크세논에 의한 고속원자충격법).

<512> ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 바리안(Varian) VXR-300, 브루커(Bruker) APC 300, IBM/브루커 NR-80 또는 제올(Jeol) FX 400 분광계를 사용하여 얻었다. 모든 스펙트럼은 달리 나타내지 않는 한, 30℃에서 얻었다. ^{1}H NMR은 상기 기재한 장치에 대하여 각각 300MHz, 80MHz 또는 400MHz에서 수행하였고, ^{13}C NMR은 상기 기재한 장치에 대하여 각각 75MHz, 20MHz 또는 100MHz에서 수행하였다,. NMR 값은 δ 대 TMS(테트라메틸실란)이거나, 또는 용매가 D_2O일 때 δ 대 DSS(2,2-디메틸-2-실라펜탄-5-설폰산, 나트륨염)이다.

<513> 적외선 스펙트럼(IR)은 니콜레트(Nicolet) 55X FT/IR 기기상에 기록되었다.

<514> 크로마토그래피 과정에 있어서, 대부분의 용매는 피셔(Fisher) HPLC급 물질이었다. 암모늄 아세테이트는 알드리치(Aldrich)사로부터 구입하였다. 물은 반스테드(Barnstead) 나노퓨어™(NANOpure) 물 여과 시스템을 사용하여 정제하였다. 유기 화합물의 예비 크로마토그래피는 표준 기법을 사용하는 정상중력 크로마토그래피 또는 스틸(C. W. Still)등의 문헌[J. Org Chem. 43, 2923-24(1978)]에 기술된 플래쉬(flash) 크로마토그래피에 의해 수행하였다.

<515> TLC 및 R_f 값은 이들 용매 시스템 및 시판중인 표준상 실리카 TLC 플레이트[GHLF 250마이크론, 아날테크 인코포레이티드(Analtech Inc.) 또는 메르크 키이셀(Merck Kiesel) 겔 60F_{254}]를 사용하여 기록하였다.

<516> 모든 백분율은 달리 나타내지 않는 한, 중량 기준이다.

<517> pH 스타트(stat)는 용액의 pH를 측정하고, 적당한 양의 미리 선택한 산 및/또는 염기를 첨가하여 예정된 원하는 값으로 용액의 pH를 조정하는 기계 장치이다.

<518> 고체 중 일부는 회전 증발기(부치(Buchi) 461) 및/또는 진공 오븐을 사용하여 수 시간동안 약 55 내지 60℃에서 건조시켰다. 또한, 버티스(Virtis) 모델 10-010 자동 동결 건조기 또는 스피드 박™(Speed Vac) 농축기를 사용하여 용매를 제거하였다.

<519> 사용한 HPLC 컬럼은 다음과 같았다:핸드-팩크트 Q-세파로스™(Hand-Packed Q-Sepharose, 파마시아사 제품) 1.5cm×25cm 또는 2.5cm×25cm ; 듀퐁 인스트루먼츠(DuPont Instruments)의 조르박스™

(Zorbax) 바이오 시리즈(Bio Series) GF-250(9.4mm×25cm); 세퍼레이션(Seperations) 그룹(캐나다 헤스페리아 소재)에서 구입한 바이닥(Vydac)™(캐나다 헤스페리아 소재의 세퍼레이션즈 그룹의 상표명); 파마시아사의 모노(Mono)-Q™ 및 SP-세파덱스(파마시아 바이오테크놀로지 프로덕츠(Pharmacia Biotechnology Products)의 상표명); 워터스 어소시에이츠(Waters Associates, 메릴랜드 밀포드 소재)사로부터 구입한 셉-팍™(Sep-Pak)(워터스 어소시에이츠의 상표명) C-18 카트리지(cartridge); 이소랩 인코포레이티드(Isolab Inc. 오하이오 애크론 소재)의 세파덱스™ G-25 1회용 컬럼(2.2㎖); 아미콘 디비젼(Amicon Division, W. R. Grace & Co., 메릴랜드 댄버 소재)사의 센트리콘™(Centricon)-30(아미콘의 상표명); 및 스페리솝(Spherisorb)™ ODS-1(페이스 세퍼레이션즈 리미티드(Phase Separations, Ltd)의 상표명).

<520> 원심분리 및 농축시, 소발(Sorvall) RT 6000B(듀퐁의 냉장 원심분리기)를 사용하였다. 스피드 박 농축기(사반트 인스트루먼츠 인코포레이티드(Savant Instruments Inc., 뉴욕 힉스빌 소재))를 사용하여 휘발성 용매를 제거하였다.

<521> 실시예 A: 2-카복사미도-3-(4'-니트로-페닐)프로판아미드의 제조

<522> p-니트로벤질 말로네이트 디에틸에스테르(2.4g, 8.13밀리몰)을 메탄올 35㎖에 용해시켰다. 이 용액을 교반하면서 50 내지 55℃로 가열하고 무수 암모니아의 스트림을 용액 전체에 64시간동안 폭기시켰다. 용액을 냉각시켜 얻어진 백색의 응집 생성물을 여과하고 비등 메탄올 225㎖로부터 재결정화시켜, 비스-아미드 1.85g(7.80밀리몰)을 수율 96%로 수득하였다[융점=235.6℃(분해점)]. 표제 구조물을 MS, ^{1}H 및 ^{13}C NMR 분광계에 의해 확인하였다.

<523> 분석: $C_{10}H_{11}O_4N_3$의 계산치

	C	H	N
이론치:	50.63	4.69	17.72
실측치	50.75	4.81	17.94

<525> 실시예 B: 1-아미노-2-(아미노메틸)-3-(4'-니트로페닐)프로판의 제조

<526> 2-카복사아미도-3-(4'-니트로페닐)프로판아미드(2.0g, 8.43밀리몰)을 질소대기하에 교반하면서 무수 THF 35㎖에 슬러리화시켰다. 이 혼합물에 보란/THF 착체(106㎖, 106밀리몰)를 주사기를 사용하여 첨가하였다. 그 다음 반응 혼합물을 48시간동안 가열환류시켜, 그 동안 현탁시킨 아미드가 용해되었다. 이 용액을 냉각시키고, THF를 회전 증발기를 사용하여 진공하에 제거하였다. 조생성물 및 보란 잔기를 에탄올 50㎖에 용해시키고,이 용액을 무수 염화수소 기체로 퍼징(purge)시켰다(purged). 이 용액을 1시간동안 환류시키고, 진공하에 용매를 제거하였다. 조질의 염산염을 탈이온수 15㎖에 용해시키고, 염화메틸렌 50㎖로 2회 추출하였다. 수층을 얼음욕 중에서 아르곤 블랑켓(blanket)하에 냉각시키고, 50% 수산화나트륨을 염기성(pH=11.7)이 될 때까지 천천히 첨가하였다. 이 염기성 수층을 염화메틸렌 25㎖로 4회 추출하고, 이들 추출액을 합한 후, 회전 증발기를 사용하여 증발시켜, 호박색의 오일 1.45g을 수득하였다. 이 오일을 디에틸에테르(50㎖)로 분쇄한 후 짧은 실리카겔(62 알드리치 등급) 컬럼을 통하여 가압하에 여과하였다. 컬럼을 에테르 100㎖로 세척한 후, 여액을 합하여 진공 건조시켜, 표제의 디아민 1.05g(5.02밀리몰)을 투명한 오일로서 수득하였다[융점=275-278℃(분해점) 비스HCl 염]. 표제 구조물을 MS, ^{1}H 및 ^{13}C NMR 분광계에 의해 확인하였다.

<527> 분석: $C_{10}H_{17}N_3O_2Cl_2$의 계산치

	C	H	N
이론치	42.57	6.07	14.89
실측치	43.00	6.14	15.31

<529> 실시예 C: 1-아미노-2-(아미노메틸)-3-(4'-아미노페닐)프로판의 제조

<530> 보란/THF 용액(70㎖, 70밀리몰)을 질소하에 캐뉼라(cannula) 바늘에 의해 4-아미노벤질 말론아미드(1.5g, 7.24밀리몰)를 함유하는 플라스크에 교반하면서 첨가하였다. 이 용액을 40시간동안 환류시켰다. 이 무색의 용액을 냉각시키고, 과량의 THF를 회전 증발기에 의해 제거하여, 투명한 젤라틴질의 오일을 얻었다. 이 오일에 메탄올(50㎖)을 조심스럽게 첨가하면 기체가 발생하였다. 무수 염화수소를 현탁액 전체에 폭기시켜 용해시킨 다음, 용액을 1분동안 환류시켰다. 메탄올/HCl 용액을 회전 증발기에 의해 제거하고, 생성된 염산염에 대해 동일한 용해/환류 절차를 다시 수행하였다. 생성되는 염산염을 물 10㎖에 용해시킨 후, 얼음욕 중에서 아르곤하에 냉각시켰다. 진한 수산화나트륨(50%)을 교반하면서 천천히 첨가하여 pH 11이 되게 하였다. 그 다음, 수성 부분을 클로로포름 100㎖로 2회 추출한 후, 이를 합하여 짧은 실리카겔 플러그(plug)를 통하여 건조시키지 않고 여과하였다. 진공하(회전 증발기)에 용매를 제거하여 표제 화합물(0.90g, 5.02밀리몰)을 수율 70%로 수득하였다(R_f=0.65; $CHCl_3$/MeOH/진한 NH_4OH=2/2/1). 표제 구조물을 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 분광계에 의해 확인한 후, 더 이상 정제하지 않고 사용하였다.

<531> 실시예 D: 6-(4-아미노벤질)-1,4,8,11-테트라아자-5,7-디옥소운데칸의 제조

<532> 4-아미노벤질 말로네이트 디메틸에스테르(2.03g, 8.43밀리몰)를 메탄올 10㎖에 용해시켰다. 이 용액을 새로 증류한 메탄올 10㎖ 중의 에틸렌디아민(6.00g, 103.4밀리몰)의 교반중인 용액에 질소하에 2시간에 걸쳐 적가하였다. 투명한 용액을 4일동안 교반하고, TLC 분석한 결과, 디에스테르(R_f=0.91) 전체가 비스-아미드(R_f=0.42 - 20%, 진한 NH_4OH/80% 에탄올)로 전환되었다. 이 물질은 닌히드린에 매우 포지티브하다. 메탄올 및 과량의 디아민을 회전 증발기에서 제거하고, 얻어지는 백색의 고체를 밤새 진공 건조(10^{-1}mm, 50℃)시켜, 조생성물(2.45g, 8.36밀리몰)을 수율 99%로 수득하였다. 분석용 샘플을 클로로포름/헥산으로 재결정화하였다(융점=160-161℃). 질량 스펙트럼, ^{1}H 및 ^{13}C NMR 데이타는 표제 화합물의 구조와 일치하였다.

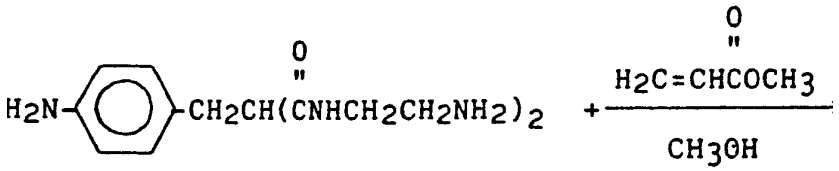
<533> 실시예 E: 메실 아지리딘과 1-아미노-2-(아미노메틸)-3-(4-니트로페닐)프로판의 반응

<534> 1-아미노-2-(아미노메틸)-3-(4-니트로페닐)프로판(400mg, 1.91밀리몰, 96% 이상의 순도)을 질소하에 순수 에탄올 10.5㎖에 용해시켰다. 메실 아지리딘(950mg, 7.85밀리몰)을 고체로서 교반중인 디아민 용액에 첨가하였다. 이 반응물을 25℃에서 14시간동안 자기 교반기를 사용하여 교반하여, 이 기간동안 백색 고무질의 잔사가 플라스크 벽면에 형성되었다. 에탄올을 따라내고 잔사를 다른 에탄올 15㎖로 분쇄시켜 반응하지 않은 아지리딘을 제거하였다. 고무질의 생성물을 진공건조시켜(10mm, 25℃) 테트라키스 메틸 설폰아미드(1.0g, 1.44밀리몰)을 수율 75%로 수득하였다(R_f=0.74; NH_4OH/에탄올=20/80). 표제 구조물을 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 분광계에 의해 확인하였다.

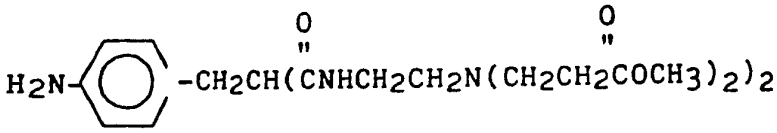
<535> 실시예 F: 2-(4-니트로벤질)-1,3-(비스-N,N-2-아미노에틸)디아미노프로판의 제조

<536> 실시예 E의 조질의 메틸설폰아미드(650mg, 0.94밀리몰)를 질소 퍼징된 진한 황산(98%) 5㎖에 용해시켰다. 이 용액을 질소하에 유지시키고 세게 교반시키면서 143 내지 146℃로 27분동안 가열하였다. 약간 색이 어두워지는 것(암색)이 관찰되며, 용액을 냉각시켜 교반중인 에테르 용액(60㎖)에 부어 넣는다. 침전된 백색의 염 케이크(cake)를 여과한 후 즉시 탈이온수 10㎖에 용해시켰다. 용액의 pH는 냉각시키면서 아르곤하에 50% NaOH를 사용하여 pH 11로 조정하였다. 얻어지는 용액을 에탄올 90㎖와 혼합하고 침전된 무기 염을 여과시켰다. 감압하에 조절의 아민으로부터 용매를 제거하고, 얻어지는 담갈색의 오일에 톨루엔 190㎖를 질소하에 첨가하였다. 이 혼합물을 세게 교반시키고, 잔류 톨루엔이 연황색의 색을 띨 때까지(포트내에 30 내지 40㎖가 잔류함) 공비증류(딘-스탁 트랩(Dean-Stark trap))에 의해 물을 제거하였다. 톨루엔을 냉각한 후 암색의 처리곤란한 잔사 및 염으로부터 따라낸다. 이 용매로부터 진공하에 용매를 스트리핑시키고, 얻어지는 담황색의 오일을 밤새 진공 건조시켜(0.2mm, 35℃), 표제의 생성물을 210mg(60%) 수득하고, 이를 MS, ^{1}H 및 ^{13}C NMR 분광계에 의해 분석하였다.

<537> 실시예 G: 하기 도식으로 표현되는 0.5세대의 스타버스트™ 중합체(아닐린 유도체를 함유함)의 제조:



화합물 #1

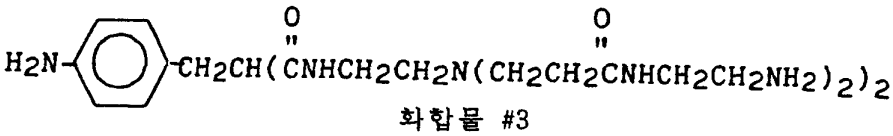


화합물 #2

<539> 메틸 아크릴레이트(2.09g, 24밀리몰)을 메탄올(15㎖)에 용해시켰다. 화합물 6-(4-아미노벤질)-1,4,8,11-테트라아자-5,7-디옥소운데칸(1.1g, 3.8밀리몰)(즉, 화합물 #1, 이 화합물의 제조방법은 실시예 D에 나와 있음)을 메탄올(10㎖)에 용해시키고, 2시간에 걸쳐 메틸 아크릴레이트 용액에 세게 교반하면서 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 주위온도에서 48시간동안 교반하였다. 온도를 40℃ 미만으로 유지하면서 회전 증발기에서 용매를 제거하였다. 에스테르(화합물 #2)를 황색의 오일(2.6g)로서 수득하였다. 아닐린 작용기의 카복시에틸화는 관찰되지 않았다.

<540> 실시예 H: 하기 도식으로 표현되는 1세대의 스타버스트™ 중합체(아닐린 잔기를 함유함)의 제조:

화합물 #2 + $H_2NCH_2CH_2NH_2$ → (CH_3OH)

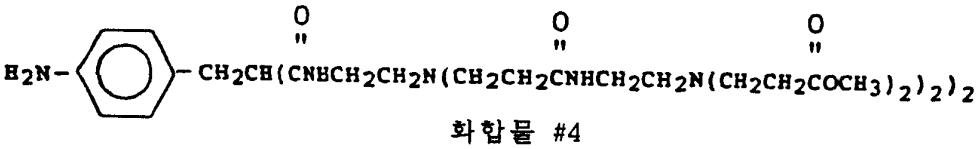


화합물 #3

<542> 에스테르(화합물 #2)(2.6g, 3.7밀리몰)를 메탄올(100㎖)에 용해시켰다. 이 용액을 온도가 40℃보다 높게 승온되지 않는 속도로 에틸렌디아민(250g, 4.18밀리몰)과 메탄올(100㎖)의 세게 교반중인 용액에 조심스럽게 첨가하였다. 첨가를 완료한 후, 반응 혼합물을 35 내지 40℃(가열 맨틀)에서 28시간동안 교반하였다. 28시간이 지난 후, 적외선 분광분석 결과, 에스테르가 검출되지 않았다. 용매를 60℃의 회전 증발기로 제거하였다. 톨루엔-메탄올-에틸렌디아민의 삼원 공비혼합물을 사용하여 과량의 에틸렌디아민을 제거하였다. 마지막으로, 잔여 톨루엔을 모두 메탄올로 공비시켰다. 메탄올을 제거하여, 표제 화합물(화합물 #3) 3.01g을 오렌지색의 유리질 고체로서 수득하였다.

<543> 실시예 I: 하기 도식으로 표현되는 1.5세대의 스타버스트™ 중합체(아닐린 잔기를 함유함)의 제조:

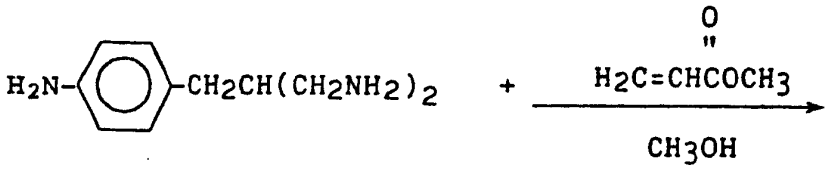
화합물 #3 + $H_2C{=}CHCOCH_3$ → (CH_3OH)



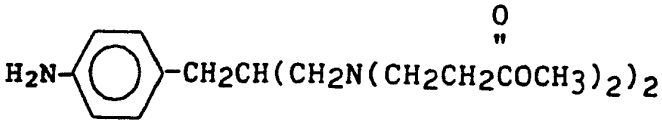
화합물 #4

<545> 아민(화합물 #3)(2.7g, 3.6밀리몰)을 메탄올(7㎖)에 용해시키고, 메탄올(15㎖)중의 메틸 아크릴레이트(3.8g, 44밀리몰)의 교반 용액에 주위온도에서 1시간에 걸쳐 천천히 첨가하였다. 첨가하는 동안 용액은 약간 가온됨이 관찰되었다. 이 용액을 주위온도에서 16시간동안 교반시켰다. 40℃의 회전 증발기에서 용매를 제거하였다. 용매를 모두 제거한 후, 과량의 메틸 아크릴레이트 에스테르(화합물 #4) 4.7g을 오렌지색 오일로서 수득하였다.

<546> 실시예 J: 하기 도식으로 표현되는 0.5세대의 스타버스트™ 중합체(아닐린 잔기를 함유함)의 제조:



화합물 #5

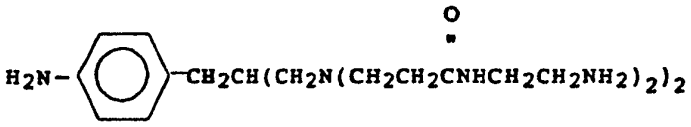


화합물 #6

<548> 트리아민(화합물 #5, 이 화합물의 제조방법은 실시예 C에 나와 있음)(0.42g, 2.3밀리몰)을 메탄올(10㎖)에 용해시키고, 메탄올(10㎖) 중의 메틸 아크릴레이트(1.98g 23밀리몰)에 1시간에 걸쳐 적가하였다. 혼합물을 주위온도에서 48시간동안 교반하였다. 온도가 40℃보다 높아지지 않도록 유지시키면서, 용매를 회전 증발기에서 제거하였다. 메탄올로 공비 증류를 반복하여 과량의 메틸 아크릴레이트를 제거하였다. 표제의 에스테르(화합물 #6)를 오렌지색 오일(1.24g)로서 단리하였다.

<549> 실시예 K: 하기 도식으로 표현되는 1세대의 스타버스트™ 중합체(아닐린 잔기를 함유함)의 제조:

화합물 #6 + $H_2NCH_2CH_2NH_2$ → (CH_3OH)

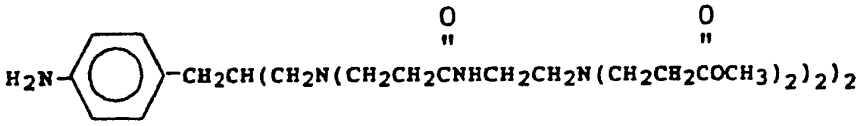


화합물 #7

<551> 에스테르(화합물 #6)(1.24g, 2.3밀리몰)을 메탄올(50㎖)에 용해시키고, 메탄올(100㎖) 중의 에틸렌디아민(73.4g, 1.22밀리몰)에 2시간에 걸쳐 첨가하였다. 소량의 발열이 관찰되었으며, 세게 교반하는 것을 계속하였다. 이 용액을 주위온도에서 72시간동안 교반시켰다. 이 용매를 60℃의 회전 증발기에서 제거하였다. 톨루엔-메탄올-에틸렌디아민의 삼원 공비혼합물을 사용하여 과량의 에틸렌디아민을 제거하였다. 마지막으로 모든 잔여 톨루엔을 메탄올과 함께 제거한 후, 진공 펌프로 48시간 동안 공기를 빼내어 표제의 아민(화합물 #7)(1.86g)을 황색/오렌지색 오일로서 수득하였다.

<552> 실시예 L: 하기 도식으로 표현되는 1.5세대(G1.5)의 스타버스트™ 중합체(아닐린 잔기를 함유함)의 제조

화합물 #7 + $H_2C{=}CHCOCH_3$ → (CH_3OH)



화합물 #8

<554> 아민(화합물 #7)(1.45g, 미량의 잔류 메탄올)을 메탄올(100㎖)에 용해시키고, 메탄올(20㎖) 중의 메틸 아크릴레이트(5.80g)의 교반 용액에 1.5시간에 걸쳐 천천히 첨가하였다. 이 용액을 실온에서 24시간 동안 교반시켰다. 용매를 제거한 후, 메탄올로 공비 증류를 반복하여 과량의 메틸 아크릴레이트를 모두 제거할 수 있었다. 진공펌프로 48시간동안 공기를 빼내어, 표제의 에스테르(화합물 #8)(2.50g, 1.8밀리몰)를 오렌지색 오일로서 단리하였다.

<555> 실시예 M: (G4.5) 덴드리머의 가수분해 및 칼슘염의 제조

<556> 4.5세대의 PAMAM(에스테르 말단을 가짐, 개시형태 NH_3)(2.11g. 10.92meq)을 메탄올 25㎖에 용해시키고, 여기에 10% NaOH(4.37㎖, 10.92meq)(pH=11.5 내지 12)를 첨가하였다. 실온에서 24시간이 지난 후, pH는 약 9.5이었다. 20시간이 더 지난 후, 회전 증발기를 사용하여 용액을 제거하고, 톨루엔 50㎖를 첨가한 후, 다시 증발시켰다.

<557> 얻어지는 오일을 메탄올 25㎖에 용해시키고, 디에틸 에테르 75㎖를 첨가하여 백색의 고무로서 침전시켰다. 액체를 따라내고, 고무를 회전 증발시켜, 매우 미세한 회백색의 분말을 수득하고, 이를 더 건조시켜, 생성물 2.16g(수율 98%)을 수득하였다. NMR 및 적외선 분석 결과 에스테르기가 발견되지 않았다.

<558> 4.5세대 PAMAM(에스테르 말단을 가짐, 개시형태 NH_3)의 나트륨 염을 투석에 의해 칼슘염으로 대체시켰다. 나트륨염(1.03g)을 물 100㎖에 용해시키고, 3㎖/분으로 중공 섬유 투석관(차단= 5000)에 통과시켰다. 관의 외부를 5% $CaCl_2$ 용액에 담구었다. 상기 과정을 반복하였다.

<559> 생성된 용액을 다시 투석시키고, 이번에는 물에 대하여 2회 더 반복하였다.

<560> 증발시켜 습윤된 고체 0.6g을 얻고,메탄올에 용해시킨 후(모두 용해되는 것은 아님) 건조시켜, 표제의 생성물 0.45g을 회백색의 결정으로서 수득하였다.

$C_{369}H_{592}O_{141}N_{91}Ca_{24}$ 분자량=9526.3

	C	H	N	Ca
이론치:	46.5	6.32	13.38	10.10
실측치:	47.34	7.00	13.55	8.83

<562> 실시예 N: 말단 카복실레이트기를 갖는 덴드리머의 제조

<563> 0.5세대의 스타버스트™ 폴리아미도아민을 가수분해시켜 이들의 말단 메틸 에스테르기를 카복실레이트로 전환시켰다. 이로써 주변에 분산된 음전하를 갖는 구형의 분자가 생성되었다. 덴드리머는 0.5세대(3개의 카복실레이트) 내지 6.5세대(192개의 카복실레이트)로 가수분해되었다.

<564> 이 생성물은 Na', K', Cs' 또는 Rb' 염으로서 생성시킬 수 있었다.

<565> 실시예 O: N-3급-부톡시카보닐-4-아미노벤질 말로네이트 디메틸에스테르

<566> 4-아미노벤질 말로네이트 디메틸에스테르(11.62g, 49밀리몰)을 3급부탄올:물(60:40, v/v) 50㎖에 교반하면서 용해시켰다. 디-3급부톡시디카보네이트(19.79g, 90밀리몰)를 첨가하고,이 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 회전 증발기에서 부탄올을 제거하여, 수중에서 황색 현탁액의 생성물을 얻었다. 염화메틸렌으로 추출하고, 건조시킨 후($MgSO_4$), 증발시켜, 황색의 오일(21.05g, 디-3급부톡시디카보네이트로 오염됨)을 수득하였다. 2-프로판올:물(75:25)로부터 재결정화시켜 담황색의 결정의 표제 생성물(11.1g, 33밀리몰, 67%)을 수득하였다. 이 구조를 ^{13}C NMR 분광계에 의해 확인하고, 순도는 HPLC 분석법에 의해 확인하였다(스페리솝™ ODS-1, 0.05M H_3PO_4, pH 3: CH_3CN 55:45). 이 물질을 더 이상 정제하지 않고 사용하였다.

<567> 실시예 P: N-3급-부록시카보닐-6-(4-아미노벤질)-1,4,8,11-테트라아자-5,7-디옥소운데칸

<568> 실시예 O에서 제조한, N-3급-부톡시카보닐-4-아미노벤질말로네이트 디메틸에스테르(8.82g, 26밀리몰)를 메탄올 50㎖에 용해시켰다. 이 용액을 새로 증류시킨 에틸렌디아민(188g, 3.13밀리몰) 및 메탄올 20㎖의 용액에 질소대기하에 적가하였다(2시간). 이 용액을 24시간동안 교반시켰다. 에틸렌디아민/메탄올 용액을 회전 증발기에서 제거하였다. 잔사를 메탄올에 용해시키고, 톨루엔을 첨가하였다. 회전 증발기에서 용매를 제거하여, 조생성물을 백색의 고체(10.70g, 에틸렌디아민으로 오염됨)로서 수득하였다. 샘플을 두개의 샘플로 나누어 정제하였다. 에틸렌디아민을 가두기(trap)위해 팀블(thimble)내에 설폰화된 이온교환 비드(bead)를 갖는 흡입 추출기를 사용하여 에틸렌디아민을 톨루엔으로 공비제거하면, 생성물의 부분적 인 분해가 일어나서, 갈색의 오일이 생성되었다. 나머지 생성물을 톨루엔으로부터 냉각시키면서 백색의 고체로서 단리하였다(2.3g, 수율 약 50%). GC(컬럼, 테낙스(Tenax) 60/80)로 메탄올 중의 10%용액을 분석한 결과, 샘플내에 에틸렌디아민은 검출되지 않았다(0.1% 미만). 또 다른 분별액을 메탄올에 용해시켜 10%(중량비)용액을 얻고, 역삼투압 방법에 의해 용매로서 메탄올을 사용하여, 에틸렌디아민으로부터 정제하였다(필름테크™(Filmtech) FT-30 멤브레인 및 아미콘™ TC1R 박채널 분리기; 멤브레인을 가교시키는 EDA). 생성물을 백색의 고체(2.7g)로서 단리하였고, GC 분석결과, 검출가능한 양의 에틸렌디아민을 발견할 수 없었다. ^{13}C NMR 데이타 및 HPLC 분석(스페리솝™ ODS-1, 0.05M H_3PO_4(pH 3); CH_3CN 55:45) 결과, 제안된 표제 구조와 일치하였다. 생성물을 더 이상 정제하지 않고 사용하였다.

<569> 실시예 Q: N-3급-부톡시카보닐-6-(4-아미노벤질)-1,4,8,11-테트라아자-5,7-디옥소운데칸으로부터의 0.5세대(G0.5)의 스타버스트™ 덴드리머의 제조

<570> 실시예 P에서 제조한, N-3급-부톡시카보닐-6-(4-아미노벤질)-1,4,8,11-테트라아자-5,7-디옥소운데칸(5.0g, 13밀리몰)을 메탄올 100㎖에 용해시켰다. 메틸 아크릴레이트(6.12g, 68밀리몰)를 첨가하고, 용액을 주위온도에서 72시간동안 교반하였다. HPLC(스페리솝™ ODS1, 아세토니트릴:0.04M 암모늄 아세테이트 40:60))에 의해 반응을 모니터링하여 원하는 생성물로의 전환을 최적화하였다. 용액을 30% 고체로 농축시킨 후. 메틸 아크릴레이트(3.0g, 32밀리몰)를 첨가하였다. HPLC에 의해 부분적으로 알킬화된 생성물이 검출되지 않을 때까지, 반응 혼합물을 주위온도에서 교반하였다. 회전 증발기를 사용하여 30℃에서 용매를 제거하고, 24시간동안 1mmHg에서 공기를 빼내어, 생성물을 황색의 점질 오일로서 수득하였다(수득량 7.81g). ^{13}C NMR 데이타는 표제의 구조와 일치하였다. 생성물을 더 이상 정제하지 않고 사용하였다.

<571> 실시예 R: N-3급-부톡시카보닐-6-(4-아미노벤질)-1,4,8,11-테트라아자-5,7-디옥소운데칸으로부터의 완전 1세대(G1.0)의 스타버스트™ 덴드리머의 제조

<572> 0.5세대 생성물(실시예 Q)(7.70g, 10.45밀리몰)을 메탄올 75㎖에 용해시키고, 에틸렌디아민(400㎖, 7.41밀리몰) 및 메탄올(50㎖)의 교반중인 용액에 2시간에 걸쳐 적가하였다. 반응 혼합물을 주위온도에서 48시간동안 교반하였다. 에틸렌디아민 및 메탄올을 회전 증발기에서 제거하여, 황색의 오일(11.8g, 에틸렌디아민으로 오염됨)로서 수득하였다. 생성물을 메탄올 90㎖에 용해시키고, 역삼투압법에 의하여 에틸렌디아민으로부터 정제하였다(필름테크™ FT-30 멤브레인 및 아미콘™ TC1R 박 채널 분리기, 용매로서 메탄올). 48시간 후, GC(컬럼, 테낙스™ 60/80) 분석결과, 에틸렌디아민이 검출되지 않았다. 회전 증발기에서 용매를 제거한 후, 진공 라인에서 24시간동안 공기를 빼내어, 황색의 유리질 고체로서 생성물을 수득하였다(6.72g). HPLC(PLRP-S 컬럼, 아세토니트릴:0.015M NaOH, 20분내에 10 내지 20% 구배) 및 ^{13}C NMR 분석결과, 표제의 구조와 일치하였다.

<573> 실시예 S: N-3급-부톡시카보닐-6-(4-아미노벤질)-1,4,8,11-테트라아자-5,7-디옥소운데칸으로부터의 1.5세대(G1.5)의 스타버스트™ 중합체의 제조

<574> 1세대 생성물(실시예 R)(2.14g, 25밀리몰)을 메탄올 12.5㎖에 용해시키고, 메탄올 5㎖ 중의 메틸 아크릴레이트(3.5g, 39밀리몰)를 첨가하였다. 용액을 주위온도에서 48시간동안 교반하면서, HPLC(스페리솝™ ODS-1 아세토니트릴:0.04M 암모늄 아세테이트, 60:40)에 의해 반응의 진행을 모니터링하였다. 또다른 메틸 아크릴레이트의 분취량(3.5g, 39밀리몰)을 첨가하고, 이 반응 혼합물을 주위온도에서 72시간동안 더 교반하였다. 회전 증발기에서 용매를 제거하고, 진공 펌프로 밤새 공기를 빼낸 후, 표제의 생성물을 황색의 오일(3.9g)로서 수득하였다. 이 생성물을 더 이상 정제하지 않고 사용하였다.

<575> 실시예 T: N-3급-부톡시카보닐-6-(4-아미노벤질)-1,4,8,11-테트라아자-5,7-디옥소운데칸으로부터의 완전 2.0세대(G2.0)의 스타버스트™ 중합체의 제조

<576> 1.5세대 생성물(실시예 2)(3.9g, 2.5밀리몰)을 메탄올 50㎖에 용해시키고, 에틸렌디아민(600g, 10몰) 및 메탄올(50㎖)의 교반 용액에 2시간에 걸쳐 적가하였다. 용액을 질소 대기하에 주위온도에서 96시간동안 교반하였다. 회전 증발기에서 에틸렌디아민/메탄올을 제거하여, 황색의 유리질 고체(4.4g, 에틸렌디아민으로 오염됨)를 수득하였다. 생성물의 10% 용액을 메탄올중에서 만들고, GC(컬럼, 테넥스 60/80) 분석 결과, 에틸렌디아민이 검출되지 않을 때까지 역삼투압법(필름테크™ FT-30 멤브레인 및 아미콘™ TC1R 박채널 분리기)에 의하여 에틸렌디아민으로부터 정제하였다. 용매를 제거하여, 생성물을 황색의 유리질 고체(3.52g)로서 수득하였다. ^{13}C NMR 데이타 및 HPLC 분석(PLRP-S 컬럼, 아세토니트릴:0.015M NaOH, 20분내에 10 내지 20% 구배) 결과, 표제의 구조와 일치하였다.

<577> 실시예 U: 2세대(G2.0) 스타버스트™ 중합체와 브로모아세트산의 반응에 의한 메틸렌 카복실레이트 말단의 스타버스트™ 덴드리머의 제조

<578> 제 2 세대 생성물(실시예 T)(0.22g, 0.13밀리몰)을 탈이온수 15㎖에 용해시키고, 온도를 40.5℃에서 평형화시켰다. 브로모아세트산(0.48g, 3.5밀리몰) 및 수산화리튬(0.13g, 3.3밀리몰)을 탈이온수 5㎖에 용해시킨 후, 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응 pH는 pH 스타트(0.1N NaOH로 적정함)를 사용하여 밤새 40.5℃에서 조심스럽게 pH 9로 유지시켰다. 역상 HPLC(스페리솝™ ODS-1 컬럼, 용출액 0.25M H_3PO_4 (pH 3)[NaOH]; 아세토니트릴 85:15)에 의해 모니터링하여, 주로 단 하나의 성분이 합성되었음을 확인하였다.

<579> 실시예 V: 이소티오시아네이토 작용화된 제 2 세대(G2.0) 메틸렌카복실레이트 말단의 스타버스트™ 덴드리머의 제조

<580> 제 2 세대 메틸렌카복실레이트 말단의 스타버스트™ 덴드리머(실시예 U)의 2.8nM 용액 5㎖를 물 20㎖에 희석시키고, pH를 진한 염산으로 0.5로 조절하였다. 실온에서 1시간이 지난 후, 혼합물을 HPLC에 의해 분석한 결과, 부톡시카보닐기가 제거되었음을 확인한 후, 50% 수산화나트륨으로 처리하여 pH를 7로 만들었다. pH 스타트(0.1N NaOH로 적정함)를 사용하여 pH를 7로 유지하고, 티오포스겐 225㎕를 첨가하였다. 실온에서 15분 후에, 혼합물의 pH를 1N HCl로 5로 조절하였다. 혼합물을 클로로포름(20㎖×2)으로 세척한 다음, 감압하에 회전 증발기에서 농축하였다. 회수된 잔사(0.91g)는 이소티오시아네이트 및 염의 혼합물이다.

<581> 실시예 W: 제 2 세대(G2.0) 스타버스트™ 폴리에틸렌이민 메탄 설폰아미드의 제조

<582> 에탄올 50㎖ 중의 N-메탄설포닐-아지리딘 125g의 용액에 트리스(2-아미노에틸)아민 25.0g을 첨가하였다. 용액을 실온에서 4일동안 교반하였다. 반응 혼합물에 용액의 균질성을 유지시시키는 데 필요한 만큼 물을 첨가하였다. 용매를 진공 증류에 의해 제거하여, 제 2세대 스타버스트™ PEI-메탄 설폰아미드(161g)를 황색의 유리질로서 수득하였다.

<583> 실시예 X: 메탄 설폰아미드의 절단에 의한 제 2 세대(G2.0) 스타버스트™폴리에틸렌이민의 제조

<584> 38% HCl 20㎖ 중의 제 2 세대 스타버스트™ PEI-메탄 설폰아미드(실시예 W) 5.0g의 용액을 유리 앰풀(ampule)에 밀봉하였다. 앰풀을 160℃에서 16시간동안 가열한 후, 얼음욕 중에서 냉각시킨 후, 개구시켰다. 진공 증류에 의해 용매를 제거하고, 잔사를 물에 용해시켰다. 50% NaOH로 용액의 pH를 10 이상으로 조절한 후 용매를 진공 증류에 의해 제거하였다. 잔사에 톨루엔(150㎖)을 첨가하고, 더 이상의 물이 제거되지 않을 때까지 혼합물을 딘-스탁 트랩하에 환류시키면서 가열하였다. 용액을 여과하여 염을 제거하고, 여액을 진공하에 농축시켜, 제 2 세대 스타버스트™ PEI 1.9g을 황색 오일로서 수득하였다.

<585> 실시예 Y: 제 3 세대(G3.0) 스타버스트™ 폴리에틸렌이민-메탄 설폰아미드의 제조

<586> 에탄올 100㎖ 중의 제 2 세대 스타버스트™ PEI(실시예 X) 10.1g의 용액에 N-메탄설포닐아지리딘 36.6g을 첨가하였다. 용액을 실온에서 1주일동안 교반하였다. 용액의 균질성을 유지시키는 데 필요한 만큼 물을 첨가하였다. 진공 증류에 의해 용매를 제거하여, 제 3 세대 스타버스트™ PEI-메탄 설폰아미드(45.3g)를 황색의 유리질로서 수득하였다.

<587> 실시예 Z: 메탄 설폰아미드의 절단에 의한 제 3 세대(G3.0) 스타버스트™ 폴리에틸렌이민의 제조

<588> 제 3 세대 스타버스트™ PEI-메탄 설폰아미드(실시예 Y)(5.0g)의 메탄 설폰아미드기를, 상기 실시예 X에서 제 2 세대 물질에 대해 기술한 것과 동일한 과정에 의해 제거하여, 제 3 세대 스타버스트™ PEI 2.3g을 황색의 오일로서 수득하였다.

<589> 실시예 AA: 제 3 세대(G3.0) 스타버스트™ 폴리에틸렌이민과 (4-플루오로)-니트로벤젠의 반응

<590> 제 3 세대 스타버스트™ 폴리에틸렌이민(실시예 Z)(1.06g, 1.2밀리몰)을 무수 에탄올 12㎖에 용해시켰다. (4-플루오로)니트로벤젠(120㎕, 1.2밀리몰)을 첨가하고, 이 반응 혼합물을 밤새 환류시켰다. 용매를 회전 증발기에서 제거하여 얻어진 밝은 황색의 오일을 물에 용해시켰다. 수성 용액을 클로로포름으로 세척하여, 반응하지 않은 (4-플루오로)니트로벤젠을 제거하였다. 물을 제거하여, 생성물을 짙은 황

색의 오일(0.80g)로 수득하였다. ^{13}C NMR 스펙트럼 결과 표제의 구조와 일치하였다. (통계적 분포의 특성을 결정하려는 시도는 하지 않았음) 이 생성물을 더 이상 정제하지 않고 사용하였다.

<591> 실시예 BB: 제 3 세대(G3.0) 스타버스트™ 폴리에틸렌이민의 니트로페닐 유도체와 글리콜로니트릴의 반응

<592> 제 3 세대(G3.0) 스타버스트™ 폴리에틸렌이민의 니트로페닐유도체(실시예 AA)(0.80g)를 탈이온수 20㎖에 용해시켰다. 수산화나트륨(2.80g, 50% w/w)을 교반중인 용액에 첨가하고, 이 용액을 질소를 퍼징시킨 후, 수산화나트륨 스크루버(scrubber)를 통하여 배기시켰다. 클리콜로니트릴(70% 수성 용액 2.85㎖)을 주위온도에서 첨가하였다. 몇분 후에 황색의 침전물이 형성되는 것이 관찰되었다. 2시간 후에, 온도를 천천히 승온시키고,이 용액을 24시간동안 질소를 퍼징시키면서 환류하에 유지시켰다. 물을 제거하여, 글리콜산 및 수산화나트륨으로 오염된, 황색 고체의 생성물을 수득하였다. ^{13}C NMR 스펙트럼 결과 표제의 구조와 일치하였다. 생성물을 더 이상 정제하지 않고 사용하였다.

<593> 실시예 CC: 상기 니트로페닐 유도체의 수소화에 의한 아미노페닐 메틸렌카복실레이트 말단의 제 3 세대(G3.0) 스타버스트™ 폴리에틸렌이민의 제조

<594> 실시예 BB로부터 얻은 황색의 고체(1.70g)를 탈이온수 10㎖에 용해시키면, 이 용액의 pH는 약 11이 되었다. 유리 파르(Parr) 쉐이커 병 중의 반응 혼합물에 목탄상 팔라듐(5% Pd/C 200mg)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 40psi(275kPa)의 수소압하에 두고, 파르 수소화 장치에서, 6시간동안 주위온도에서 진탕하였다. 그 다음, 반응 혼합물을 0.5㎛ 밀리포어™(Millipore) 여과기를 통하여 여과시켜, Pd/C를 제거하고, 용매를 진공하에 제거시킨 후 바이오겔(Biogel) P2 수지(물로 팽윤시킨 25g)를 통하여 겔 여과시켰다. HCl로 산성화시켜 오렌지빛 갈색 용액을 얻고, 이를 방새 질소로 퍼징시켰다. 용매를 진공하에 제거하여, 담갈색 고체인 염산염(3.98g, NaCl 및 글리콜산으로 오염됨, 생성물의 최대 이론 수득량 1.15g)으로서 표제의 생성물을 수득하였다. 이 생성물을 더 이상 정제하지 않고 사용하였다.

<595> 실시예 DD: 4-이소티오시아네이토페닐 메틸렌카복실레이트 말단의 제 3 세대(G3.0) 스타버스트™ 폴리에틸렌이민의 제조

<596> 실시예 CC의 생성물(3.98g)을 탈이온수 15㎖에 용해시키고, 이 용액의 분취량(2.5㎖)을 물 10㎖로 희석하였다. 수산화나트륨으로 이 용액의 pH를 7로 조정하였다. pH 스타트(1N NaOH로 적정함)를 사용하여 pH를 유지시키고, 티오포스겐 200㎕를 첨가하였다. 10분 후에, 염산으로 혼합물의 pH를 4로 조정하였다. 물을 회전 증발기에서 감압하에 제거하였다(발포를 방지하기 위하여 소량의 n-부탄올을 첨가하였음). 잔사를 염화메틸렌으로 세척한 후, 건조시켰다. 조질의 표제 생성물(0.95g), 이소티오시아네이트(0.14g) 및 염의 혼합물을 더 이상 정제하지 않고 사용하였다.

<597> 실시예 EE: 메틸렌카복실레이트-말단의 제 2 세대(G2.0) 스타버스트™ 폴리아미도아민(암모니아로부터 개시됨)의 제조

<598> 제 2 세대 스타버스트™ 폴리아미도아민(2.71g, 2.6밀리몰) 및 브로모아세트산(4.39g, 31.6밀리몰)을 탈이온수 30㎖에 용해시키고, pH 스타트를 사용하여 5N NaOH로 pH를 97로 조정하였다. 반응물을 0.5 시간동안 이 pH에서 유지시키고, 온도를 60℃로 천천히 승온시킨 후, 일정한 pH에서 3시간동안 60℃에서 유지시켰다. pH를 10.3으로 올린 후, 반응 혼합물을 방새 주위온도에서 pH 스타트의 조절하에 두었다. 반응 혼합물을 4시간동안 더 환류시킨 후, 후처리하였다. 용매를 제거하고, 메탄올로 미량의 물을 공비 증류하여 표제의 생성물(8.7g, 브롬화나트륨으로 오염됨)을 담황색의 분말로서 수득하였다. ^{13}C NMR 스펙트럼은 표제의 구조와 일치하였다(모노-알킬화반응의 결과인 소량의 결함 물질로 인한 약간의 오염이 있음).

<599> 실시예 FF: 메틸렌카복실레이트 말단의 제 2 세대(G2.0) 스타버스트™ 폴리에틸렌이민(암모니아로부터 개시됨)의 제조

<600> 제 2 세대 스타버스트™ 폴리에틸렌이민(2.73g. 6.7밀리몰)(실시예 X) 및 브로모아세트산(11.29g, 81밀리몰)을 탈이온수 30㎖에 용해시켰다. 온도를 30℃ 미만으로 유지시키면서 pH를 9.5로 천천히 증가시켰다. 온도를 55℃로 천천히 승온시키고, pH 스타트(5N NaOH로 적정함)를 사용하여 6시간동안 반응 pH를 9.5로 유지시켰다. pH를 10.2로 증가시키고,이 pH를 밤새 유지시켰다. 용매를 회전 증발기에서 제거하고, 메탄올을 사용하여 미량의 물을 공비 증류시켜, 표제의 생성물(17.9g, 브롬화나트륨으로 오염됨)을 황색 분말로서 수득하였다. ^{13}C NMR 스펙트럼은 표제의 구조와 일치하였다(모노-알킬화반응의 결과인 소량의 결함물질로 인한 약간의 오염이 있음).

<601> 실시예 GG: 3.5, 4.5, 5.5 및 6.5세대 스타버스트™ PAMAM의 제조

<602> 제 3 세대 PAMAM 스타버스트™ 2.46g의 10중량% 메탄올 용액에 메틸 아크릴레이트 2.32g을 첨가하였다. 이 혼합물을 실온에서 64시간동안 두었다. 용매 및 과량의 메틸 아크릴레이트를 제거한 후, 표제의 생성물(G3.5) 4.82g을 회수하였다(이론수율의 105%).

<603> 더욱 높은 반세대 스타버스트™ PAMAM의 제조

<604> 3.5, 5.5 및 6.5세대는 반응 농도, 반응 몰비 또는 반응시간에 별다른 차이없이 상기 기술한 대로 제조하였다.

<605> 실시예 HH: 4, 5 및 6세대 스타버스트™ PAMAM의 제조

<606> 예비증류시킨 에틸렌디아민 2000g에 메탄올중의 15중량%로서 4.5세대 스타버스트™ PAMAM 5.4g을 첨가하였다. 이것을 실온에서 48시간동안 두었다. 60℃ 미만에서 수흡인기 진공하에 회전 증발기에 의해 메탄올 및 대부분의 과량의 에틸렌디아민을 제거하였다. 회수된 생성물의 전체 중량은 8.07g이었다. 이때, GC 분석 결과, 생성물에는 여전히 에틸렌디아민 34중량%가 함유되어 있는 것으로 나타났다. 이 생성물의 5.94g 분량을 메탄올 100㎖에 용해시키고, 한외여과(ultrafiltration)시켜 잔여 에틸렌디아민을 제

거하였다. 이 한외여과는 아미콘™ YM2 멤브레인이 장착된 아미콘™ TC1R 박채널 재순환 분리기를 사용하여 수행하였다. 인-라인(in-line) 압력 릴리프 밸브(relief valve)를 사용하여 멤브레인에 걸쳐 55psig(380kPa)를 유지시켰다. 용매를 멤브레인을 통하여만 흐르게 함으로써 100㎖를 우선 15㎖로 농축시켰다. 이렇게 초기 농축시킨 후, 흐름을 일정부피 보유의 재순환 방식으로 18시간동안 전환시켰다. 이 시간이 흐른 후, 메탄올 60㎖를 멤브레인에 통과시켜, 여전히 모듈(module) 및 연결된 관내에 있는 생성물을 회수하였다. 이 생성물의 용매를 제거(strip)하고 제 5 세대(G5.0) 스타버스트™ PAMAM 2.53g을 회수하였다. GC 분석 결과 잔여 에틸렌디아민 0.3%가 생성물내에 잔류하는 것으로 나타났다.

<607> 4 및 6세대의 제조는 에틸렌디아민 대 출발물질의 중량비가 다른 것만을 제외하고, 상기와 같이 진행된다. 제 4 세대를 제조하기 위하여, 상기 비는 200:1이었고, 제 6 세대의 경우 상기 비는 730:1이었다.

<608> 실시예 II: 에폭시옥탄과의 반응에 의한 폴리아미도아민 덴드리머의 개질반응

<609> 메탄올 5㎖ 중의 제 6 세대 PAMAM 0.50g의 용액에 에폭시옥탄 0.56g을 첨가하였다. 실온에서 6일 후, 진공에서 용매를 증발시켜 무색의 오일 0.80g을 수득하였다. 이 물질은 클로로포름, 톨루엔 또는 메탄올에는 가용성이지만, 물에는 불용성이었다. ^{13}C-NMR 스펙트럼은 말단 아민에 C-8 알킬기가 결합된 덴드리머와 일치하였다.

<610> 실시예 JJ: 3급-부틸 글리시딜 에테르와의 반응에 의한 폴리아미도아민 덴드리머의 개질반응

<611> 메탄올 5㎖ 중의 제 6 세대(G6.0) PAMAM 0.50g의 용액에 3급-부틸 글리시딜 에테르 0.57g을 첨가하였다. 실온에서 6일 후, 진공에서 용매를 증발시켜 무색의 오일 1.0g을 수득하였다. 이 물질은 클로로포름, 톨루엔 또는 메탄올에는 가용성이지만, 물에는 불용성이었다. ^{13}C-NMR 스펙트럼은 말단 아민에 3-(3급-부톡시)-1-프로판-2-올기가 결합된 덴드리머와 일치하였다.

<612> 실시예 KK: 에폭시옥타데칸과의 반응에 의한 폴리아미도아민 덴드리머의 개질반응

<613> 메탄올 25㎖ 중의 제 6 세대(G6.0) PAMAM 0.50g의 용액에 에폭시옥타데칸 1.1g을 첨가하였다. 이 용액을 5일동안 환류하면서 가열하였다. 환류하는 동안, 용액으로부터 무색 점질의 오일이 침전되었다. 진공에서 용매를 증발시켜 백색의 기포 1.6g을 수득하였다. 이 물질은 클로로포름 또는 톨루엔에는 가용성이지만, 물 또는 메탄올에는 불용성이었다. ^{13}C-NMR 스펙트럼은 말단 아민에 C-18 알킬기가 결합된 덴드리머와 일치하였다.

<614> 실시예 LL: 스타버스트™ PEI와 소수성 에폭사이드의 반응

<615> 자석 교반기가 설치된 플라스크에 메탄올 5㎖ 중의 제 4 세대(G4.0) PEI(NH_3 코어; MW 1.955) 0.397g(2×10^{-4}몰) 및 메틸 10,11-옥소운데카노에이트(MW 214.3) 2.1g(9.6×10^{-3}몰)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1일동안 교반한 후 80℃에서 8시간동안 가온시켜, 갈색 점질의 시럽을 수득하였다. 개환 반응이 완료되어 카보메톡시 말단의 소수성 덴드리머가 생성되었음이 NMR 분석과 모델 시스템과의 비교 결과 확인되었다.

<616> 상기 소수성 덴드리머와 수중 수산화나트륨을 같은 중량으로 혼합하고 30 내지 60분동안 가열함으로써 소수성 덴드리머를 수용성 형태로 전환시켰다. 카보메톡시기가 검출되지 않는, 균질한 용액을 수득하였다. 과량의 NaOH 또는 NaCl을 첨가함으로써 나트륨 카복실레이트염이 흐려지고, 오일로서 상분리되었다.

<617> 실시예 MM: 아크릴산에 의한 PAMAM 덴드리머의 개질반응

<618> 2:1 아크릴레이트:아민 (반응 A)

<619> 아크릴산 3.84g 분량을 메탄올 3.84g과 혼합하고 얼음욕 중에서 10분동안 냉각시켰다. 그 다음, 아크릴산 용액을 교반하면서 G6(NH_3) PAMAM의 26.7%(w/w) 용액 18.72g을 첨가하였다. 이 반응액을 4℃에서 15분동안 놔두고, 질소로 블랑켓(blanket)시키고, 뚜껑을 덮은 후, 실온에서 5일동안 반응시켰다.

<620> 1:1 아크릴레이트:아민 (반응 B)

<621> 아크릴산 1.6g 분량을 메탄올 1.6g과 혼합하고 얼음욕 중에서 10분동안 냉각시켰다. 그 다음, 아크릴산 용액을 교반하면서 G6(NH_3) PAMAM의 26.7%(w/w)용액 18.72g을 첨가하였다. 이 반응액을 4℃에서 15분동안 놔두고, 질소로 블랑켓시키고, 뚜껑을 덮은 후, 실온에서 5일 동안 반응시켰다.

<622> 0.5:1 아크릴레이트:아민 (반응 C)

<623> 아크릴산 0.80g 분량을 메탄올 0.8g과 혼합하고 얼음욕 중에서 10분동안 냉각시켰다. 그 다음, 아크릴산 용액을 교반하면서 G6(NH_3) PAMAM의 26.7%(w/w)용액 18.72g을 첨가하였다. 이 반응액을 4℃에서 15분동안 놔두고, 질소로 블랑켓시키고, 뚜껑을 덮은 후, 실온에서 5일동안 반응시켰다.

<624> 0.25:1 아크릴레이트:아민 (반응 D)

<625> 아크릴산 0.40g 분량을 메탄올 0.4g과 혼합하고 얼음욕 중에서 10분동안 냉각시켰다. 그 다음, 아크릴산 용액을 교반하면서 G6(NH_3) PAMAM의 26.7%(w/w)용액 18.72g을 첨가하였다. 이 반응액을 4℃에서 15분동안 놔두고, 질소로 블랑켓시키고, 뚜껑을 덮은 후, 실온에서 5일동안 반응시켰다.

<626> 한외여과방법 및 건조방법

<627> 반응액으로부터 회전 증발기에서 용매를 제거하고, 회수된 고체를 약 150㎖의 물에 재용해시켰다. 용액 150㎖를 YM3(MWCO=3000) 플랫스톡(flatstock) 멤브레인상에서 4ℓ의 투과액이 얻어질

때까지 물로 한외여과시켰다. 회전 증발기에서 잔류액의 물을 고체 또는 점질의 액체가 남을 때까지 제거하였다. 그 다음, 반-건조 고체를 고진공하에 밤새 놔두어 잔여 물을 제거하였다.

<628> 결 론

<629> 다양한 비의 G6(NH_3) PAMAM 암모니아-코어 덴드리머와 아크릴산의 반응 생성물은 예상한 생성물이다. 이 생성물은 첨가된 아크릴산과 일치하는 전하 특징을 나타낸다. 과량의 아크릴산을 첨가한 경우, 생성물은 반세대 PAMAM 카복실레이트 염의 통상적인 합성에서 얻어지는 것에 근접한다. 아크릴산의 첨가량이 감소하면, 물질의 분석 결과는 약간 음으로 하전된 표면기를 갖거나, 양쪽성 표면을 갖는, 양으로 하전된 덴드리머와 일치하였다.

<630> 실시예 NN: 조밀 별형 덴드리머와 표적 지향제(예: 바이오틴, 인슐린 및 아비딘) 및 운반물질(플루오레세인)의 콘쥬게이트 형성

<631> G4(NH_3) PAMAM 스타버스트™ 덴드리머 및 6.0세대 스타버스트™ 덴드리머를 제조하였다. 플루오레세인-5-이소티오시아네이트(이성질체 I)(FITC)는 몰레큘라 프로브(Molecular Probes)로부터 구입하였다. 단실 클로라이드는 알드리치 케미칼 캄파니로부터 구입하였다. NHS-LC-바이오틴 및 아비딘은 피어스(Pierce)사로부터 구입하였다. 디클로로트리아지닐 플루오레세인(I) 및 인슐린은 시그마 케미칼로부터 구입하였다. 모든 시약은 더 이상 정제하지 않고 사용하였다.

<632> I. 바이오틴/덴드리머 콘쥬게이트와 커플링반응:

<633> A. 바이오틴-덴드리머 콘쥬게이트의 제조

<634> G6(NH_3) PAMAM 덴드리머의 원액(stock solution)을 100mM 포스페이트 완충액(pH 7.0) 내 1.8mg/㎖의 농도로 제조하였다. 다른 G6(NH_3)의 원료용액을 H_2O 내 1.9mg/㎖의 농도로 제조하였다. 각 용액으로부터 1㎖의 분취량을 취하여 각 용액에 고체상의 NHS-LC-바이오틴 5mg을 첨가하였다. 바이알(vial)을 5분 동안 세게 진탕하여 바이오틴을 용해시켰다. 실온에서 18시간동안 배양시켰다. 포스페이트 완충액 및 H_2O 중의 G4(NH_3)의 용액에 대해서도 유사한 반응을 수행하였다. G4(NH_3) 원액은 2.0mg/㎖이었고, 1㎖의 각 분취량에 NHS-LC-바이오틴 5mg을 첨가하였다.

<635> 다른 콘쥬게이트화는 더욱 낮은 리간드 대 아민 비에서 수행하였다. 예를 들어, 20개의 바이오틴을 G7(NH_3) PAMAM 덴드리머에 콘쥬게이트화시키기 위하여, 11.85% G7 덴드리머의 844㎕ 분취량을 보레이트 완충액(pH 9) 5㎖ 중의 NHS-LC-바이오틴 0.0244g에 첨가하였다. 3시간 후에, 반응 혼합물을 탈이온수에 대하여 투석시켜, 반응하지 않은 바이오틴을 제거하였다.

<636> 전기영동법

<637> 18시간 후에, 각 반응 혼합물 100㎕ 및 각 완전세대 원료용액을 취하여 전기영동 분석을 행하였다. 0.1% MB 및 50% 슈크로스 10㎕를 각 용액에 첨가하고, 5 내지 50% T 구배 하일린™(Hylinx) 겔(그라디포어(Gradipore)로부터 구입함)상에서 샘플을 전기영동시켰다. 사용한 완충액은 pH 8.3의 90mM 트리스, 80mM 붕산, 및 2.5mM EDTA이었다. 각 샘플 10㎕를 겔에 걸었다. 겔은 200V(일정)에서 30분동안 작동시켰다. 열(lane)의 지정은 하기에 기재된 바와 같았다:

<638> 1. G7(NH_3)

<639> 2. P_i 중의 G6, (NH_3)

<640> 3. G6(NH_3) w/P_i 중의 바이오틴

<641> 4. P_i 중의 G4, (NH_3)

<642> 5. G4(NH_3) w/P_i 중의 바이오틴

<643> 6. H_2O 중의 G6, (NH_3)

<644> 7. G6(NH_3) w/H_2O 중의 바이오틴

<645> 8. H_2O 중의 G4, (NH_3)

<646> 9. G4(NH_3) w/H_2O 중의 바이오틴

<647> 10. G4(NH_3)

<648> 11. Cyt c/G3.5(NH_3)

<649> 12. G5(NH_3)

<650> 결과 및 고찰

<651> 전기영동 결과, 개질되지 않은 덴드리머의 이동 거리와 비교할 때 바이오틴으로 처리한 덴드리머의 이동은 지연되는 것으로 명확히 나타났다. 덴드리머 표면에의 바이오틴 분자의 공유 결합으로 인하여 분자량이 증가하였다. 이 때문에 덴드리머는 고분자량의 분자를 지연시키는 GGE의 체 효과(sieving effert)로 인해 단거리로 이동한다.

<652> 덴드리머당 결합되는 바이오틴 분자수는 현재 공지되어 있지않다. 덴드리머상의 바이오틴 분자의

분포는 통계적이고, 실험한 샘플은 한 종류가 아니다.

<653> 일부 반응은, 이론적으로, 덴드리머상의 모든 표면기(제 1 도의 Z; 제 2 도의 Z')가 바이오티닐화되도록 이루어진다. 이러한 반응이 진행되는 동안 불용성 물질의 형성은 관찰되지 않았다.

<654> B. 덴드리머-플루오레세인(FITC) 콘쥬게이트의 제조

<655> 12.7%(w/w) G4(NH_3) 코어, PAMAM 덴드리머의 메탄올 용액 5㎖를 회전 증발기에서 진공하에 건조시켰다. 건조된 덴드리머 약 40mg(7.4μ몰)을 취하여 pH 9.0의 0.1M 포스페이트 완충액 5㎖에 용해시켰다.

<656> 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC I)(14.5mg, 37μ몰)를 암소에서 DMSO 2㎖에 용해시켰다. FITC I 용액을 교반중인 덴드리머 용액에 1 내지 2분에 걸쳐 적가하는 방식으로 첨가하였다. 반응 혼합물을 빛으로부터 차단시키고, 실온에서 15 내지 20시간동안 교반하였다. 용액은 밤색이었다.

<657> 교반이 끝난 후, 반응 혼합물을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 3000달톤)에 넣고, 한외여과시켜 반응하지 않은 FITC I을 제거하였다. 한외여과시키는 동안 pH 9.0의 0.1M 포스페이트 완충액 2㎖를 3회 첨가하였다. 한외여과시킨 후의 잔류물로부터 콘쥬게이트화된 제 4 세대(암모니아 코어) 덴드리머 FITC I를 회수하였다.

<658> C. 바이오티닐화/덴드리머-FITC I 콘쥬게이트의 제조

<659> G4(NH_3) PAMAM 스타버스트™ 덴드리머 FITC I(선행 섹션에서 제조함)의 원액 20mg/㎖를 사용하여 덴드리머-FITC I 원액 1㎖를 회수하고, 0.1M 포스페이트 완충액(pH=9.0) 3㎖에 첨가하였다.

<660> NHS-LC-바이오틴 10.0mg(18밀리몰)를 DMSO 0.5㎖에 첨가한 후, 진탕하여 용해시켰다.

<661> NHS-LC-바이오틴 용액을 덴드리머 용액에 30초에 걸쳐 첨가하고, 반응 혼합물을 암소에서 4시간동안 실온에서 교반시켰다. 그 다음, 반응 혼합물을 교반 플레이트를 치우고 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 3000달톤)에 넣고, 한외여과시켜 반응하지 않은 바이오틴을 제거하였다. 정제를 용이하게 하기 위하여, 한외여과시키는 동안 pH 9.0의 0.1M 포스페이트 완충액 2㎖를 8회 첨가하였다.

<662> D. 바이오티닐화 G4 덴드리머-FITC I/아비딘 착체의 형성

<663> 아비딘 3.0mg(45μ몰) 분량을 1mM 포스페이트 완충액(pH 7.1) 1㎖에 용해시켰다.

<664> 바이오티닐화 G4(NH_3) 덴드리머 FITC I(앞서 제조함)의 300㎕(10mg/㎖, 450μ몰) 분량을 아비딘 용액에 첨가하고, 실온에서 4시간동안 서서히 교반하였다. 그 다음, 반응 혼합물을 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 30,000달톤)에 넣고, 한외여과시켜 과량의 바이오티닐화 덴드리머를 제거하였다. 10mM 포스페이트 완충액(pH 7.1) 2㎖를 한외여과 과정중에 8회 첨가하여 정제를 용이하게 하였다. 생성되는 바이오틴-덴드리머/아비딘 착체를 마이크로농축기로부터 취하여 -10℃에 서 보관하였다.

<665> E. 덴드리머/디클로로트리지아닐 플루오레세인(I)의 제조

<666> G6(EDA) PAMAM 스타버스트™ 덴드리머(21.5% 고형분) 약 300㎕를 탈이온수 700㎕에 첨가하고 분산시켰다(64.5mg, 2.24μ몰). 탈이온수 4㎖를 추가로 첨가하여 덴드리머를 12.9mg/㎖의 농도로 희석시켰다.

<667> 디클로로트리아지닐 플루오레세인(이성질체 I) 하이드로클로라이드[DTAF(I)](6.0mg. 11.3μ몰)를 암소에서 메탄올 0.5㎖에 용해시키고, 트리에틸아민 2방울을 첨가하였다. DTAF(I) 용액을 30초에 걸쳐 교반 중인 덴드리머 용액에 적가하였다. 반응 혼합물을 빛으로부터 차단하고 실온에서 15 내지 20시간동안 교반하였다. 용액은 반응 전체를 통하여 투명하고 오렌지색인 채로 있었다.

<668> 교반한 후, 반응 혼합물을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기관(분자량 차단: 10,000달톤)에 넣고, 한외여과시켜 반응하지 않은 DTAF(I)을 제거하였다. 0.1M 포스페이트 완충액(pH 9.0) 2㎖를 한외여과 과정중에 15회 첨가하여 정제를 용이하게 하였다. 콘쥬게이트화된 G6(EDA 코어)덴드리머-DTAF(I) 약 3㎖을 정제과정에서 회수하였다.

<669> F. 다중-바이오티닐화/덴드리머-DTAF(I) 콘쥬게이트의 제조

<670> G6(EDA) PAMAM 스타버스트™ 덴드리머-DTAF(I)의 원액(선행 섹션에서 제조함) 20mg/㎖를 사용하여, 덴드리머-DTAF(I) 원액 0.425㎖(8.5mg, 0.003밀리몰)를 제거하고, 이를 0.1M 포스페이트 완충액(pH 9.0) 0.575㎖에 첨가하였다.

<671> NHS-LC-바이오틴 8.1mg(0.029밀리몰) 분량을 DMSO 0.3㎖에 첨가하고, 진탕하여 용해시켰다.

<672> NHS-LC-바이오틴 용액을 30초에 걸쳐 상기 덴드리머 용액에 첨가하고, 반응 혼합물을 암소에서 4시간동안 실온에서 혼합시켰다.

<673> 4시간 후, 반응 혼합물을 교반 플레이트를 치우고 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 10,000달톤)에 넣고, 한외여과시켜 반응하지 않은 바이오틴을 제거하였다. 0.1M 포스페이트 완충액(pH 9.0) 2㎖를 한외여과 과정중에 8회 첨가하여 정제를 용이하게 하였다.

<674> II. 인슐린/덴드리머 콘쥬게이트화 커플링반응:

<675> A. 단실화 덴드리머 콘쥬게이트의 제조

<676> 12.7%(w/w) G4(NH_3) PAMAM 덴드리머 용액의 메탄올 용액 5㎖를 회전 증발기에서 진공하에 건조시켰다. 건조된 덴드리머 약 40mg(7.4μ몰)을 취하여 0.1M 포스페이트 완충액(pH 9.0) 5㎖에 용해시켰다.

<677> 단실 클로라이드 10mg(0.037밀리몰) 분량을 아세톤 5㎖에 첨가하고 5 내지 10분동안 진탕하였다.

(이 용액은 진한 황색이었고, 그 안에 미량의 고체를 함유하였음)

<678> 단실 클로라이드 용액을 덴드리머 용액에 30초에 걸쳐 첨가하고, 이 반응 플라스크를 40℃의 수욕 중에 90분동안 두었다. 가열하는 동안, 반응 혼합물을 간헐적으로 진탕하였다. (이 용액의 색은 밝은 황색으로부터 흐린 황색으로 희미해져 갔다)

<679> 90분 후, 반응 플라스크를 가열상태로부터 꺼내어 실온으로 냉각시켰다. (반응 혼합물은 외관상 약간 흐릿하였다) 그 다음, 방사성 표지된 덴드리머를 용액 상태를 유지하면서 정제하였다. 반응물을 회전증발기에 넣고 30 내지 35℃에서 진공하에 아세톤을 제거하였다. 이로 인해 용액은 실질적으로 맑아졌다. 그 다음, 반응 혼합물을 2개의 원심분리 관에 옮기고, 5000rpm에서 30분동안 원심분리하였다. 원심분리한 후, 추가의 침전은 관찰되지 않았다.

<680> 그 다음, 단실화-제 4 세대 덴드리머 용액을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 30,000달톤)에 넣고, 한외여과시켜 결합되지 않은 단실 클로라이드를 제거하였다. 반응하지 않은 단실 클로라이드가 완전히 제거되었는지를 확인하기 위하여 한외여과액의 순도를 박층 크로마토그래피에 의해 모니터링하였다. 여액을 모아서 실리카겔 60 플레이츠(이. 메르크(E. Merck))에 에틸아세테이트(100%) 용매 시스템(UV광에 의해 가시화)을 사용한 TLC에 의해 시험하였다. 방사성 표지된 덴드리머는 기점에 잔류하는 반면, 나머지 단실 클로라이드는 R_f 0.3 근처에서 용출되었다. 단실화된 덴드리머로 생각되는 용액 약 1 내지 2㎖가 회수되었다.

<681> B. 인슐린/단실화 덴드리머 콘쥬게이트의 제조

<682> 2드램들이 바이알에서, 탈이온수 1.5㎖에 단실화 덴드리머(앞서 제조함) 0.5㎖를 첨가하여 10mg/㎖ 용액을 만들었다. 1㎖(10.0mg, 0.0019밀리몰)를 취하여 인슐린 커플링반응에 사용하였다.

<683> 제 2 의 바이알에서, 인슐린(소 췌장으로부터 수득함) 12.3mg(0.0020밀리몰)분량을 탈이온수 2㎖에 용해시켰다. 생성되는 용액은 외관상 탁해 보였으므로, 1N 염산 1방울을 사용하여 pH를 4로 낮추어 고체를 용해시켰다.

<684> 제 3 의 바이알에서, EDAC 88.7mg(0.46밀리몰) 분량을 탈이온수 1㎖에 용해시켰다.

<685> 인슐린 용액을 교반중인 덴드리머 용액에 1 내지 2분에 걸쳐 첨가하면, 즉시 탁해졌다. 1N 염산을 사용하여 pH를 7.0에서 4.0으로 조정하였다. (용액은 pH 4.2에서 맑아졌다) 계속 교반하면서, EDAC 용액을 매 10 내지 15분마다(1시간에 걸쳐) 200 내지 300㎕씩 증가시키면서 첨가하였다. 반응 혼합물의 pH는 1N 염산으로 3.90 내지 4.2로 유지시켰다. 마지막 EDAC를 첨가한 후, 반응물을 실온에서 밤새(15 내지 20시간) 교반시켰다.

<686> 그 다음 반응 혼합물을 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 3,000달톤)에 넣고, 탈이온수로 한외여과시킨 후(침전이 형성됨), 1N 염산 1방울을 첨가하여 재현탁시켰다. 이 과정을 2 내지 3회 반복하여 단실화 덴드리머/인슐린 콘쥬게이트를 재용해시켰다. 단실화 덴드리머/인슐린 콘쥬게이트 약 1㎖를 한외여과 과정으로부터 회수하였다.

<687> C. 인슐린/디클로로트리지아지닐 플루오레세인(I)의 제조

<688> 2드램들이 바이알에, 인슐린(소 췌장으로부터 수득함) 9.3mg(0.002밀리몰) 분량을 0.1M 포스페이트 완충액(pH=9.0) 2㎖에 용해시켰다. 디클로로트리아지닐 플루오레세인(이성질체 I) 하이드로클로라이드[DTAF(I)](4.1mg 0.008밀리몰)를 암소에서 메탄올 0.5㎖에 용해시키고, 트리에틸아민 2방울을 첨가하였다.

<689> DTAF(I) 용액을 교반중인 인슐린 용액에 2분에 걸쳐 적가하였다. 반응 혼합물을 빛으로부터 차단하고, 실온에서 6시간동안 교반한 후, 2 내지 8℃에서 밤새 정치시켰다. (용액은 반응 전체를 통하여 투명하고, 오렌지색인 채로 있었다)

<690> 다음 날 아침 반응 혼합물을 2개의 센트리콘™I 마이크로농축기 관(분자량 차단: 3,000달톤)에 넣고, 한외여과시켜 반응하지 않은 DTAF(I)를 제거하였다. 정제를 용이하게 하기 위하여, 한외여과시키는 동안 pH 9.0의 0.1M 포스페이트 완충액 2㎖를 10회 첨가하였다. 인슐린-DTAF(I) 약 2㎖를 정제과정에서 회수하였다.

<691> D. 인슐린-DTAF(I)/덴드리머 콘쥬게이트의 제조

<692> 2드램들이 바이알에, G4(NH_3) 덴드리머 1㎖(7.05mg, 0.0014밀리몰)을 첨가하고, 1N 염산을 사용하여 pH를 4.5로 조정하였다. 인슐린-DTAF(I)(앞서 제조함) 1㎖(10.1mg, 0.0020밀리몰) 분량을 교반중인 덴드리머에 첨가하고, 1N 염산을 사용하여 pH를 4.0으로 재조정하였다.

<693> 제 2 의 바이알에서, EDAC 54.3mg(0.28밀리몰)을 탈이온수 0.5㎖에 용해시켰다.

<694> EDAC 용액을 상기 반응 혼합물에 매 10 내지 15분마다(1시간에 걸쳐) 100㎕씩 증가시키면서 첨가하였다. 반응 혼합물의 pH를 1N 염산을 사용하여 3.90 내지 4.20으로 유지시켰다. 마지막 EDAC를 첨가한 후, 반응물을 실온에 6시간동안 계속 놔둔 다음, 2 내지 8℃에서 밤새 정치시켰다.

<695> 그 다음, 반응 혼합물을 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 10,000달톤)에 넣고, 탈이온수로 한외여과시키는 동안, 1N 염산을 사용하여 pH를 4 내지 5로 유지시켰다.

<696> 이 과정을 2 내지 3회 반복하고, 인슐린-DTAF(I)/덴드리머 콘쥬게이트를 투명한 오렌지색 액체로서 수득하였다.

<697> III. 덴드리머/아비딘 콘쥬게이트와 커플링반응:

<698> A. 덴드리머-아비딘 콘쥬게이트의 제조

<699> 2드램들이 바이알에서, G7(EDA) 덴드리머(21.9% 고형분) 120㎕를 탈이온수 0.8㎖에 첨가하였다. 희석된 덴드리머 0.5㎖를 취하여, 탈이온수 4.5㎖에 첨가하여 2.6mg/㎖ 용액으로 만들었다.

<700> 제 2 의 바이알에서, EDAC 3.0mg(0.045밀리몰) 분량을 탈이온수 0.5㎖에 용해시켰다.

<701> 아비딘 용액을 교반중인 덴드리머 용액에 1 내지 2분에 걸쳐 첨가하는 동안, 용액은 투명한 채로 있었다. 그 다음, 1N 염산을 사용하여 pH를 4.0으로 조정하였다. 계속 교반하면서, EDAC 용액을 매 10 내지 15분마다(1시간에 걸쳐) 100㎕식 증가시키면서 첨가하였다. 반응 혼합물의 pH를 1N 염산을 사용하여 4.5 내지 5.5로 유지시켰다. 마지막 EDAC를 첨가한 후, 반응물을 실온에서 밤새(15 내지 20시간) 교반시켰다.

<702> 그 다음, 반응 혼합물을 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단 100,000달톤)에 넣고, 100mM 포스페이트 완충액으로 한외여과시켜 반응하지 않은 덴드리머 또는 아비딘을 제거하였다. 정제를 용이하게 하기 위하여, 한외여과시키는 동안 pH 7.1의 10mM 포스페이트 완충액 2㎖를 8회 첨가하였다.

<703> 실시예 00: 피루브산-나트륨염에 의한 조밀 별형 덴드리머의 표적화

<704> EDC 0.5g을 H_2O 2㎖ 내 피르브산의 나트륨염 0.0065g과 혼합하였다. 용액의 pH를 5.0(pH 페이퍼에 의해 결정함)으로 조정하고, 이 용액을 5분동안 교반하였다. 이어. G6(NH_3) 덴드리머(32.45% 고형분) 62㎕(20mg)를 반응 혼합물에 첨가하고, 이 용액을 21시간동안 진탕하였다. 아미콘™ 마이크로콘(Microcon)-10 농축기에 의해 용액으로부터 과량의 EDC를 제거하는 정제과정을 수행하였다. 희석인자는 57×10^6이다. 피루베이트의 메틸기가 G6 덴드리머에 콘쥬게이트화될 때, 작은 ^{13}C-NMR 공명이 관찰되었고; 콘쥬게이트에 대하여 독특한 모세관 전기 영동 피크가 관찰되었다.

<705> 본 발명의 콘쥬게이트의 제조방법은 상기한 출발물질 또는 유사한 방식으로 제조한 출발물질, 또는 당해 분야에 기술된 출발물질, 또는 이용가능한 출발물질을 사용한다.

<706> 실시예 1: 2-(아세틸옥시)벤조산(아스피린)의 스타버스트™ 덴드리머내로의 혼입

<707> "프로브 분자"가 미셀의 내부에 봉입되었는지의 여부를 확인하는 방법으로 널리 허용된 방법은 비미셀화된 매질 대 미셀화된 매질에서의 그의 탄소-13-회전격자 완화시간(T_1)을 비교하는 것이다. 미셀화 매질에서 T_1이 상당히 감소하는 것은 미셀내에 "프로브 분자"가 봉입되어 있음을 나타낸다. 스타버스트™ 덴드리머는 미셀의 "공유적으로 고정된" 유사체이므로, 상기 T_1 완화시간 기법을 사용하여 다양한 약제학적 유형의 분자가 스타버스트™ 폴리아미도아민과 회합되어 있는 정도를 확인하였다. 하기의 실시예에서, (아세틸옥시)벤조산(I)(아스피린)의 T_1 값을 용매($CDCl_3$)에서 결정한 후, 다양한[I:덴드리머] 몰비에서 $CDCl_3$에서의 T_1 값과 비교하였다.

<708> 아스피린(I)의 다양한 스타버스트™ 폴리아미도아민 덴드리머 내로의 봉입은 세대의 함수이다.

<709> 다양한 반세대(에스테르 말단을 가지고, NH_3로부터 개시됨) 스타버스트™ 폴리아미도아민 덴드리머(G=0.5→5.5)를 $CDCl_3$ 중의 2-(아세틸옥시)벤조산과 혼합하여, 1.0:1의 산:3급아민을 수득하였다. 2-(아세틸옥시)벤조산 대 첨가한 스타버스트™ 덴드리머 세대의 T_1 값을 그래프로 그리면(제 4 도를 참조함 여기에서, ●은 C-4, □은 C-6, ○은 C-5를 나타냄), T_1은 2-(아세틸옥시)-벤조산의 탄소 4, 5 및 6에 대하여 2.5 내지 5.5 세대의 범위에 걸쳐 최소에 도달하는 것으로 나타난다. 이는 덴드리머(G=2.5→5.5)에서 2-(아세틸옥시)벤조산이 내부 회합함을 나타내며, 또한 폴리아미도아민 덴드리머(세대=2.5 이상)가 담체 물질로서 작용할 수 있음을 확인한다.

<710> 실시예 2: 스타버스트™ 덴드리머-PAMAM 으로부터의 슈도에페드린의 방출

<711> 슈도에페드린(0.83mg/㎖) 및 스타버스트™ PAMAM 덴드리머[1.0mg.㎖; G=6.5; 말단기(Z)=192(메틸에스테르)]를 탈이온 증류수에 용해시키고, 공여 상의 pH를 수산화나트륨 용액으로 9.5로 조정한 후, 실온에서 약 12시간동안 보관하였다. 슈도에페드린만의 용액을 같은 방법으로 처리하였다(대조군). 제 1 실험 및 동적 투석을 수행한 후, 약제 덴드리머 용액을 40℃에서 8시간동안 보관하였다. 사용한 투석막은 스펙트라포르™(SpectraPor) 7(MWCO 1,000, 스펙트럼 분리 셀의 직경 28.6mm)(반(half) 셀 용적 5 및 10㎖, 셀 크기:양 셀 모두 직경 38mm, 및 셀 깊이는 5 및 10㎖ 셀에 대하여 각각 10 및 20mm)이었다.

<712> 샘플은 하기의 슈도에페드린 조건에 대해 개발된 HPLC 과정에 의해 분석하였다:

<713> 컬럼: μ본다팍™(Bondapak) C-18

<714> 이동상: pH 3.2의 포스페이트 완충액 및 아세토니트릴(80:20)

<715> 유속: 0.3㎖/분

<716> 검출: UV(210nm)

<717> 체류 시간: 13.3분

<718> 투석막을 탈이온수로 세척하고, 사용하기 전, 수용체상내에 12시간 이상 담군 채로 두었다. 투석막을 공여체 및 수용체 구획사이에 위치시키고, 공여체 구획을 작은 자석 회전 막대로 교반시켰다. 공지된 용적의 공여체 및 수용체 용액을 각 구획에 넣고, 시간에 따라 수용체 구획으로 슈도에페드린을 옮겼다. 싱크(sink) 조건을 유지시키기 위하여, 수용체 상 전체를 주기적으로(매 30분마다) 제거하고 새로운 수용체 상으로 대체하였다. 샘플링한 수용체 상에서 슈도에페드린의 양을 측정하였다. 실험은 실온(22℃)에서 수행하였다. 수용체 상은 담색의 탈이온증류수이었다.

<719> 동적분석의 결과를 제 5 도에 나타내었다. 제 5 도에서, ●은 슈도에페드린(대조군)만을 나타내

고, ⓘ은 슈도에페드린 + 덴드리머를 나타내고, ⦿는 투석하기 전 8시간동안 40℃에서 보관한, 슈도에페드린 + 덴드리머를 나타낸다. 공여체 구획내에서 G6.5 덴드리머의 존재하에 슈도에페드린의 투석 속도는 감소하는 것이 분명하다. 공여체 용액을 40℃에서 보관하면, 투석 속도는 더 감소하는 것으로 보인다.

<720> 실험은 낮은 농도에서 반복하였다(약제 분자 수 대 말단기 수의 비는 동일하였음) G6.5 덴드리머 120㎍/㎖, 슈도에페드린 100㎍/㎖(122㎍/㎖ 염).

<721> 상기 저농도에서의 슈도에페드린(단독)의 동적투석 결과는 고농도에서의 결과와 거의 동일하였다. 제 6 도는 상기 실험의 결과를 요약한 것이며, 여기서 ●은 슈도에페드린(대조군)만을 나타내며, ○은 슈도에페드린 + 덴드리머를 나타낸다.

<722> 실시예 3:

<723> 다음의 변형조건을 사용하여 실시예 2의 과정을 반복하였다.

<724> 수용체 상: pH 7.4의 포스페이트 완충액

<725> 공여체 상: pH 7.4의 포스페이트 완충액 및 하기 비의 약제 및 덴드리머:

<726> 1. G6.5 : 약제 = 1 : 192

<727> 2. G5.5 : 약제 = 1 : 96

<728> 3. G4.5 : 약제 = 1 : 48

<729> 4. G6.5H : 약제 = 1 : 192

<730> 5. G5.5H : 약제 = 1 : 96

<731> 6. G4.5H : 약제 = 1 : 48

<732> 상기의 공여체 상 조성물과 슈도에페드린만을 동적 투석시켰다. 덴드리머 세대 수 뒤의 글자 "H"는 가수분해된 덴드리머를 나타낸다. 가수분해반응은 실시예 M 및 N에 기술된 과정에 의해 수행하였다.

<733> 상기 실험의 결과는 제 7 도에 요약되어 있으며 여기서 공여체 및 수용체 구획은 pH 7.4의 포스페이트 완충액을 함유한다. 슈도에페드린 단독(P)에 대하여, 세 실험의 평균 곡선을 플로팅하고(실선으로 나타냄), 다른 실험으로부터 얻은 하나의 전형적 예가 나타나 있다. 제 7 도에서, 하기의 기호는 표시된 세대의 덴드리머를 나타낸다:

<734> [표 III]

기 호	덴드리머 세대
⊖	5.5
●	6.5
◐	4.5
⊖	5.5H
○	6.5H
◑	4.5H

<736> 슈도에페드린은 pH 7.4에서 에스테르 말단의 덴드리머와 강하게 회합하지 않는 것으로 보인다. 말단 작용기를 카복실레이트 형태로 가수분해하는 것은 투석 속도에 극적인 효과(감소)를 갖는다. 세대수는 투석 속도에 영향을 주지 않는 것으로 보인다.

<737> 실시예 4: 살리실산과 PAMAM 스타버스트™ 덴드리머의 상호작용 연구

<738> 이 실시예는 살리실산과 PAMAM 스타버스트™ 덴드리머의 상호작용 특징을 평가하였다. 이들 덴드리머는 N-(2-아미노에틸) 아크릴아미드로부터 유도된 반복단위를 갖는 암모니아 개시성 코어로 구성되었다. 완전(아민 말단기) 및 반(에스테르 말단기) 세대 중합체를 이 연구에 포함시켰다. 이 실험에서 사용한 살리실산 대 스타버스트™ 덴드리머의 비를 사용하여, 완전세대 중합체 당 거의 1개의 살리실산 분자 대 1개의 말단 아민 작용기를 얻었다. 반-세대 중합체 실험에서, 같은 비를 사용하고, 고분자량의 중합체에 대하여 조정하였다.

<739> 실험은 평형 정지 셀 투석(equilibrium static cell dialysis) 방법을 사용하여 실온에서 수행하였다. 스펙트라포르™ 6 멤브레인(분자량 차단=1000)에 의해 분리된 스펙트럼 정지 투석 셀(반 셀 용적, 10㎖)를 모든 실험에 사용하였다. 살리실산의 수송은 적당한 셀 구획으로부터 분취량을 취하여 U.V. 검출기(296nm)를 사용하는 HPLC 분석(본다팍™ C-18 컬럼, 20:80(v/v)의 아세토니트릴/0.1M 포스페이트 완충액(pH=3.2) 용출 이동상, 유속 30㎖/시로 고정됨)에 의해 측정함으로써 시간의 함수로서 모니터링하였다.

<740> 살리실산 1mg/㎖ 및 스타버스트™ 중합체(세대=4.0) 2.5mg/㎖를 함유하는 용액 10㎖를 HCl 용액을 사용하여 pH 6.65 및 5.0으로 조정하고, 투석 셀의 공여체 구획에 넣은 후, 같은 pH로 조정한 같은 용적의 정제수를 수용체 구획에 넣었다. 살리신산의 수용체 구획내로의 수송을 모니터링하였다. 그 결과를 제 8도에 나타내었다. 제 8도에서, 산이 없는 경우는 ●으로 나타내고. 산 + 4.0세대의 덴드리머(pH 6.65)는 ○으로 나타내며, 산 + 4.0세대 덴드리머(pH 5.00)는 □로 나타낸다.

<741> pH 6에서 중합체의 아민기는 낮은 비율로 이온화되기 때문에, pH 5에서 살리실산과 크게 상호작용하여, 낮은 pH에서 적은 양의 화합물이 수송된다. 제 8 도에 나타낸 결과는 상기 두 pH에서 중합체의 존재하에 수송된 살리실산의 백분율이 살리실산 대조군에 비하여 매우 낮음을 나타낸다. 또한 예상한 대

로 pH 5.0에서보다 pH 6.65에서 살리실산이 많이 수송됨이 관찰된다. 이 데이타는 스타버스트™ 중합체와 살리실산의 상호작용은 pH에 의해 조절될 수 있음을 나타낸다. 중합체의 존재하에 살리실산의 양은 대조군 실험의 경우에 관찰되는 약 12시간의 평형점을 지나 계속 증가하기 때문에, 서방출 특성도 또한 상기 데이타로부터 알 수 있다.

<742> 살리실산과 스타버스트™ 중합체(세대=4.0)의 상호작용 특징을 더 연구하기 위하여, 실험을 pH 8.0에서 디자인하였다. 연구의 디자인은, pH 8.0으로 조정한 살리실산 용액(1mg/㎖)을 수용체 구획에 넣고 중합체 용액(2.5mg/㎖)을 수용체 구획에 넣는다는 것만 앞서 기술한 바와 다르다. 공여체 구획으로부터의 살리실산의 손실을 앞서 기술한대로 모니터링하였다. 이 실험의 결과를 제 9 도에 나타낸다. 제 9도에서, 산이 없는 경우는 -●-으로 나타내고, 산 + 4.0세대 덴드리머(pH 8.0)는 …△…으로 나타낸다.

<743> 제 9 도에 나타난 대로, 공여체 구획내 살리실산과 수용체 구획내 스타버스트™ 중합체의 평형 특징은 살리실산 대조군 실험의 경우와 상이하다. 분자의 pH 8에서의 이온화 특징을 기본으로 하여, 약 6 내지 7%이 상호작용이 예상된다. 관찰된 상호작용 정도는 4 내지 5% 정도이다. 낮은 회합율이 관찰되는 것은 실험상의 변수 또는 1보다 작은 이온화 상수에 의한 것일 수 있다.

<744> 이 실험은 시스템의 연속 상으로부터의 중합체에 의한 유리 살리실산의 흡수 또는 제거를 나타낸다. 이 유형의 작용으로 인하여 중합체와 관련된 킬레이트화 또는 분자 회합 형태의 특성을 나타내는, 분자의 작용성이 억제될 수 있었다.

<745> 에스테르 말단의 작용기를 갖는 반세대 스타버스트™ 중합체(세대=4.5)와 살리실산의 pH 6.6에서의 상호작용을 평가하였다. 살리실산(1mg/㎖)을 스타버스트™ 중합체(세대=4.5) 3.6mg/㎖와 pH 6.6에서 혼합하였다. 이 용액 10㎖를 공여체 구획에 넣고, 공여체로부터의 수송을 앞서 기술한 대로 모니터링하였다. 이 결과를 제 10도에 나타낸다. 제 10 도에서, 산이 없는 경우는 -●-으로 나타내고, 산 + 중합체는 …○…으로 나타낸다.

<746> 3급 아민기는 pH 6.6에서 이온화되지 않기 때문에, 상기 실험조건하에, 전하 상호작용은 일어나지 않는 것으로 예상된다. 제 10 도에 나타난 대로, 중합체(세대 4.5)의 존재하에 살리실산의 손실은, 초기 10시간의 투석시간 동안 살리실산 대조군 실험의 경우와 실질적으로 동일하다.

<747> 이 실시예에 제시된 데이타로부터 다음이 관찰된다:

<748> (1) 완전세대 PAMAM 스타버스트™ 중합체는 살리실산에 대한 담체로서 작용함

<749> (2) 완전세대 PAMAM 스타버스트™ 중합체는 살리실산에 대하여 서방출 작용성을 가짐

<750> (3) 완전세대 PAMAM 스타버스트™ 중합체의 살리실산 담체 특성은 pH에 의해 조절할 수 있음.

<751> 실시예 5: 나트륨 프로피오네이트 말단의 제 6 세대 스타버스트™ 폴리아미도아민에 의한 다중 킬레이트화의 입증

<752> 실시예 M 및 N에서 제조한, 나트륨 프로피오네이트 말단의 제 6 세대 폴리아미도아민(암모니아로부터 개시됨)(97.1mg, 2.45몰)을 탈이온수 1.5㎖에 용해시켰다. 0.5N HCl 0.5㎖를 첨가하여 pH를 6.3으로 감소시켰다. 염화철(III)(1.2M 용액 0.5㎖ 0.051밀리몰)을 첨가하여 연갈색의 젤라틴성 침전물을 생성시켰다. 60℃에서 0.5시간동안 가열하면, 젤라틴성 침전물이 가용성으로 되어, 균질한 오렌지색 용액으로 되었다. 이 용액을 바이오겔 P2 아크릴아미드 겔(10g, 2회)을 통하여 여과시켜, 오렌지색의 밴드(할라이드 오염이 없음)를 단리하였다. 진공하에서 용매를 제거하여, 오렌지색 필름으로서 생성물(30mg)을 수득하였다. 분석결과는 스타버스트™ 덴드리머 1몰 당 철(III)이온 약 20몰이 킬레이트화된 경우와 일치하였다.

<753> [표 IV]

실 측 치	이 론 치		
	$Na_4Fe_{20}H_{128}SB$	$Na_5Fe_{20}H_{127}SB$	$Na_6Fe_{20}H_{126}SB$
Na 0.39, 0.24 (0.31, 0.1%)	0.25	0.31	0.38
Fe 3.14, 3.11 (3.12, 0.02%)	3.05	3.05	3.04
C 47.11	49.87	49.84	49.81
H 7.33	7.31	7.30	7.29
N 14.81	14.49	14.48	14.47
O	25.03	25.02	25.01
MW	36632.23	36654.21	36676.18

$SB = C_{1521}H_{2467}N_{379}O_{573}$

<755> 상기 결과는 스타버스트™ 덴드리머 1몰당 20±2몰의 철(III) 이온의 킬레이트화를 확인한다.

<756> 실시예 6: 스타버스트™ 덴드리머 1몰당 1개보다 많은 로듐 원자를 함유하는 생성물의 제조

<757> 실시예 GG에서 제조한, 2.5세대 PAMAM(에스테르 말단, NH_3 으로부터 개시됨) 및 $RhCl_3 \cdot 3H_2O$(0.09g, 0.3밀리몰)를 디메틸포름아미드(DMF)(15㎖)내에서 혼합하여 70℃에서 4시간동안 가열하였다.

용액은 심홍색으로 변하였고, 대부분의 로듐은 용해되었다. 반응하지 않은 로듐을 여과에 의해 제거하고, 회전 증발기에서 용매를 제거하였다. 형성된 오일은 클로로포름 가용성이었다. 이를 물로 세척하고, 건조시킨 후($MgSO_4$), 용매를 제거하여 적색의 오일(0.18g)을 수득하였다. NMR 스펙트럼 결과, $CDCl_3$에서 킬레이트된 스타버스트™와 비킬레이트화된 스타버스트™는 아주 작은 차이를 나타내었다. 이 $CDCl_3$ 용액의 일부를 에탄올로 희석한 후, $NaBH_4$를 첨가하면, 로듐 침전물이 형성되었다. $RhCl_3 \cdot 3H_2O$는 클로로포름에 불용성이므로, 클로로포름에서 스타버스트™ 용액은 킬레이트화되는 것이 확실하다.

<758> 실시예 7: 스타버스트™ 중합체에 킬레이트화된 Pd를 함유하는 생성물의 제조

<759> 실시예 GG에서 제조한, 3.5세대 PAMAM(에스테르 말단, NH_3로부터 개시함)을 아세토니트릴(50㎖)에 교반하면서 용해시켰다. 팔라듐클로라이드(0.24g, 1.4밀리몰)를 첨가하고, 이 용액을 70 내지 75℃(수욕)로 밤새 가열하였다. $PdCl_2$가 스타버스트™ 내로 흡수되었다. 용매를 제거한 후, $CDCl_3$에서 NMR 분석한 결과, 킬레이트화가 일어났음을 확인하였다. $CDCl_3$ 용액을 에탄올로 희석한 후 $NaBH_4$를 첨가하면, 팔라듐의 침전물이 형성되었다. 킬레이트화된 생성물(1.23g)을 갈색의 오일로서 단리하였다.

<760> 실시예 8: 이트륨 아세테이트로부터의 트랜스 킬레이트화에 의한 메틸렌카복실레이트 말단의 제 2 세대 스타버스트™ 폴리에틸렌이민과 이트륨의 다중 킬레이트화의 입증

<761> 실시예 FF에서 제조한, 스타버스트™ 폴리에틸렌이민 메틸렌 카복실레이트 말단 물질(0.46g, 52.5% 활성의 잔여 브롬화나트륨, 0.18밀리몰 활성의 스타버스트™ 덴드리머)을 산화중수소 4.5㎖에 용해시켰다. 얻어지는 pH는 11.5 내지 12이었다. 이트륨 아세테이트의 용액은 이트륨 클로라이드(0.15g 0.5밀리몰) 및 나트륨 아세테이트(0.41g, 0.5밀리몰)를 산화중수소 1.5㎖에 용해시킴으로써 제조하였다(덴드리머 1몰당 2.9몰 이트륨). 이트륨 아세테이트 용액 0.5㎖ 분취량을 상기 덴드리머 용액에 첨가하고, ^{13}C NMR 스펙트럼을 75.5MHz에서 기록하였다.

<762> 이트륨 아세테이트의 ^{13}C NMR 스펙트럼(새틀러(Sadtler) ^{13}C NMR 표준 스펙트럼)은, 카복실 탄소에 대하여 184.7ppm 및 메틸 탄소에 대하여 23.7ppm의 2회의 공명을 나타낸다(나트륨 아세테이트의 경우 182.1 및 24.1ppm, 아세트산의 경우 177.7 및 20.7ppm과 비교함). 이들 밴드의 위치를 모니터링함으로써, 스타버스트™ 덴드리머의 킬레이트화 정도를 알 수 있다. 스타버스트™ 덴드리머가 킬레이트화되었는다는 것을 가장 잘 나타내는 신호는 α $-CH_2$(킬레이트화에 관련되는 메틸렌 카복실레이트기의 α $-CH_2$)이며, 이것은 비킬레이트화된 덴드리머는 58.4ppm, 킬레이트화된 덴드리머는 63.8ppm에서 나타난다. 이트륨으로 킬레이트화한 경우, α-CH_2의 회전격자 완화시간은, 예상한 대로, 0.24±0.01초로부터 킬레이트화의 표시인 0.14±0.01로 단축된다.

<763> 이트륨 아세테이트 용액 0.5㎖를 스타버스트™ 덴드리머에 첨가한 후에, 모든 이트륨은 덴드리머에 의해 킬레이트화되는 것으로 보이며, 나트륨 아세테이트의 아세테이트에 대한 신호(signal)에 의해 확인하였다. 제 2 의 이트륨 아세테이트 용액 0.5㎖ 분취량을 첨가한 후에도 같은 결과가 관찰되었다. 제 3 의 이트륨 아세테이트 분취량의 첨가시, 모든 이트륨이 스타버스트™ 킬레이트로서 흡수된 것으로 보이지 않으며, 아세테이트 카복실 공명이 183.8ppm으로 이동하는 것이 관찰되었는데, 이는 이트륨의 일부가 아세테이트와 회합한 것을 나타낸다. 덴드리머에 킬레이트화된 $-CH_2$ 기의 합체 면적이 증가하는 것은 첨가된 이트륨의 세번째 몰당량의 일부가 사실상 덴드리머와 킬레이트화되었음을 나타낸다. 상기 결과는 덴드리머가 덴드리머 분자(세대=2.0)당 2 내지 3개의 이트륨 이온으로 킬레이트화됨을 나타낸다.

<764> 실시예 9: 이트륨 아세테이트로부터의 트랜스-킬레이트화에 의한 메틸렌 카복실레이트 말단의 제 2 세대 스타버스트™ 폴리아미도아민과 이트륨의 다중 킬레이트화의 입증

<765> 이 실험에서는 실시예 8에 사용한 것과 동일한 실험 방법을 사용하였다. 스타버스트™ 폴리아미도아민 메틸렌-카복실레이트 말단물질(0.40g, 62.5% 활성의 잔여 나트륨 브로마이드, 0.12밀리몰)을 산화중수소 4.5㎖에 용해시켰다. 얻어진 pH는 11.5 내지 12이었고, 6N HCl로 9.4로 낮춘 후, 실험하였다. 이트륨 아세테이트의 용액은, 이트륨 클로라이드(0.1125g, 0.37밀리몰) 및 나트륨 아세테이트(0.0915g, 1.1밀리몰)을 산화중수소 1.5㎖에 용해시킴으로써 제조하였고 이로써 용액 0.5㎖ 당 금속 1몰당량이 함유된다.

<766> 첨가된 처음의 2몰당량의 이트륨 아세테이트는 스타버스트™ 폴리아미도아민에 의해 완전히 킬레이트화되었다. 세번째의 이트륨 1몰 당량을 첨가하자마자, 생성물의 침전이 일어나며, 이것만으로는 NMR 데이타를 수득할 수 없었다. 스타버스트™ 덴드리머에 의한 킬레이트화에 대한 대부분의 정보를 제공하는 신호는 킬레이트화 질소에 인접한 2개 탄소의 신호였다. 비킬레이트화된 덴드리머에서 이들 탄소의 화학적 이동은 α-CH_2의 경우 59.1ppm에서, 주쇄의 제 1 메틸렌 탄소의 경우에는 53.7ppm에서 일어났다. 킬레이트화의 경우, 이들 2개의 공명은 각각 60.8 및 53.1ppm의 다운필드(downfield)로 이동하는 것으로 관찰되었다. 트랜스 킬레이트화에 의해, 덴드리머 분자당 2개의 금속 이온이 쉽게 킬레이트화될 수 있는 것으로 나타났지만, 세번째의 1몰당량의 몇몇 비공지된 분별액의 킬레이트화의 경우에는, 생성물이 용액으로부터 침전됨을 나타냈다.

<767> 실시예 10: 메틸렌카복실레이트 말단의 제 2 세대 스타버스트™ 폴리에틸렌이민에 의한 ^{90}Y의 다중 킬레이트화의 입증

<768> 이트륨 클로라이드(3×10^{-2}M, 담체가 첨가되지 않은 ^{90}Y로 스파이킹시킴(spiked)) 및 실시예 FF의 메틸렌카복실레이트 말단의 제 2 세대 스타버스트™ 폴리에틸렌이민(6×10^{-2}M)의 표준 용액을 제조하였다. 이를 HEPES 완충액내에서 다양한 금속:스타버스트™ 비로 함께 반응시켰다. 세파덱스 G50 이온교환 비드를 사용하여, pH 10에서 10% NaCl:NH_4OH(4:1)를 용출시키면서 이온 교환 크로마토그래피를 수행하여 착체 수율을 결정하였다. 비착화된 금속은 컬럼상으로 제거되며, 착화된 금속은 용출된다. 웰 카운터(well

counter)를 사용하여 컬럼상의 방사능과 용출된 방사능을 비교함으로써 수율을 결정하였다.

<769> 실험의 정확도 범위내에서 이들 결과는 2.5세대 스타버스트™ PEI 아세테이트가 덴드리머 당 2 내지 3개의 금속을 킬레이트화시켜, 가용성 착체를 수득할 수 있음을 나타낸다.

<770> [표 V]

2.5세대 PEI 아세테이트와 ^{90}Y의 킬레이트화

(Y+3)의 용적	PEI의 용적	HEPES의 용적	이론적 M:L	착체화%	실제 M:L
5	30	370	0.1	110	0.1
10	30	360	0.2	101	0.2
20	30	350	0.4	95	0.4
30	35	340	0.5	97	0.5
30	30	340	0.5	102	0.5
60	30	310	1.0	99	1.0
120	30	250	2.0	100	2.0
(Y+3)의 용적	PEI의 용적	HEPES의 용적	이론적 M:L	착체화%	실제 M:L
180	30	180	3.0	94	2.8
250	30	120	4.1	80	3.3
300	20	80	7.5	44	3.3
300	20	70	5.0	40	2.0
300	20	70	5.0	41	2.0

표 V중의 모든 용적은 ㎕임.

<773> 실시예 11: 4-이소티오시아네이토페닐 메틸렌카복실레이트 말단의 제 3 세대 스타버스트™ 폴리에틸렌이민과 IgG 단클론성 항체의 콘쥬게이트화

<774> 실시예 DD의 이소티오시아네이트 10mg(50μ몰)을, 방사성 인듐-111 클로라이드로 스파이킹시킨 3mM 인듐 클로라이드 500㎕에 용해시키고, 1N NaOH 660㎕를 사용하여 pH를 9로 조정하였다. 그 다음, 전체 단클론성 항체 IgG CC-46의 분취량을 킬레이트화된 스타버스트™의 분취량과 혼합하였다. 이 혼합물을 진탕한 후, 18시간동안 방치했다. 그 다음, 이 혼합물을 HPLC(컬럼 듀퐁 조르박스 바이오스피어 GF-250; 0.25M 나트륨 아세테이트 용출액, pH 6) 및 UV 검출기(254nm) 및 방사능 검출기에 의해 분석하였다. 결과를 표 VI에 나타낸다.

<775> [표 VI]

스타버스트-IgG 콘쥬게이트

	1	2	3	4
IgG 용액(㎕)	20	20	20	20
킬레이트화된 스타버스트 용액(㎕)	5	20	50	100
IgG상의 방사능%	6	5	5	3
콘쥬게이트화된 IgG%	2	7	17	22

<777> 실시예 12: 4-이소티오시아네이토페닐 메틸렌카복실레이트 말단의 제 3 세대 스타버스트™ 폴리

에틸렌이민과 IgG 단클론성 항체의 콘쥬게이트화

<778> 실시예 DD의 이소티오시아네이트 4㎎(20μ몰)을 3㎜ 인듐클로라이드(60μ몰) 200㎕와 혼합하였다. 그 다음, 이 용액의 20㎕ 분취량을 방사성 인듐-111 클로라이드로 스파이킹시키고, 1N NaOH 30㎕ 및 0.1N HCl 10㎕를 첨가하여 pH를 9로 조정하였다. 인듐 킬레이트를 pH 9.5에서 50㎜ HEPES 완충액 중의 CC-49 전체 항체 IgG 150㎕(10㎎/㎖)와 혼합하였다. 실온에서 18시간이 지난 후, 예비 HPLC(컬럼 듀퐁 죠르바 바이오스피어 GF-250; 0.25M 나트륨 아세테이트 용출액, pH 6), UV 검출기(254㎚) 및 방사능 검출기에 의해 항체를 회수하였다. 회수한 항체를 아미콘 멤브레인에서 농축시키고, PBS 완충액(0.12N NaCl, 2.7㎜ KCl 및 10.0㎜ 포스페이트를 함유하는 pH 7.4의 포스페이트 완충된 염수)으로 교환시켰다. 회수한 항체는 약 0.5μCi/100㎍의 비활성(specific activity)을 나타내었다.

<779> 실시예 13: ^{111}In 표지된 스타버스트™ 항체 콘쥬게이트의 생체내 위치확인

<780> 실시예 12에서 제조한 표지된 스타버스트™ 항체 콘쥬게이트의 유용성은, 의식이 없는 마우스에서 인간 종양 이종이식편에 의한 생체내에서의 상기 물질의 흡수를 측정함으로써 증명하였다. 암컷의 무흉선증(athymic) 마우스에 인간 결장 암종 세포주인 LS174T(약 4×10^6 세포/동물)를 피하적으로 접종하였다. 접종한 지 약 2주 후에, 각 동물의 꼬리 정맥을 통하여 주사하였다. 마우스를 17 내지 48시간 후에 죽이고(한 번에 5마리의 동물씩), 종양 및 선택된 조직을 절제하여 중량을 재고, 감마 카운터에서 방사능을 측정하였다. 17시간 후에, 조직 g당 주사량의 13.5%가 종양에 위치함을 확인하였다. 48시간 후에, 조직 g당 주사량의 21.6%가 종양에 위치함을 확인하였다.

<781> 실시예 14: 스타버스트™ 덴드리머의 표면에 제초제 분자(2,4-D)의 결합

<782> 제 3 세대 PAMAM(개시 코어=NH_3)(2.0g, 0.8밀리몰)을 H_2O(10㎖)에 용해시키고, 톨루엔(20㎖)과 혼합시켰다. 그 다음, 2-상 시스템을 교반하고, 빙욕 중에서 냉각시키고, 이 때 톨루엔(10㎖)에 용해된 2,4-D[2,4-디클로로페녹시)-아세트산](2.4g, 12당량)의 산 클로라이드를 30분에 걸쳐 적가하였다. 첨가가 거의 끝날 무렵, NaOH(0.5g, 12.5밀리몰, 50% w/w 용액)를 첨가하고, 이 용액을 추가의 2시간동안 교반하였다. 그 다음, 반응 혼합물을 증발시켜 건조시키고, 얻어진 고체 잔사를 반복하여 $CHCl_3$/MeOH(1:1 v/v)에 흡수시키고 여과시켰다. 갈색의 고체는 $CHCl_3$에 완전히 불용성이고, 물에 불용성인 것으로 나타났으나; 아세톤을 첨가하면 용해가 용이해졌다. 갈색의 고체를 24시간동안 $CHCl_3$ 내에서 교반시키고, 이 용액을 여과시켰다(점성의 갈색 고체가 수득됨). $MgSO_4$상에서 건조시킨 후 여액을 농축시켜, 정치하여 고형화되는 점질의 오렌지색 오일을 수득하였다. ^{13}C NMR 결과는 2,4-D에 의해 표면에서 부분적으로 아미드화가 일어남을 나타내고, 2,4-D가 스타버스트™ 중합체에 결합된 경우와 일치한다.

<783> 실시예 15: 2,4-디클로로페녹시아세트산(2,4-D)의 스타버스트™ 덴드리머에의 봉입

<784> "프로브 분자"가 미셀의 내부에 봉입되었는지의 여부를 확인하는 방법으로 널리 인정된 방법은 비미셀화된 매질 대 미셀화된 매질 내에서의 그의 탄소-13-회전격자 완화시간(T_1)을 비교하는 것이다. 미셀화 매질에서 T_1이 상당히 감소하는 것은 미셀내에 "프로브 분자"가 봉입되어 있음을 나타낸다. 스타버스트™ 덴드리머는 미셀의 "공유적으로 고정된" 유사체이므로, 상기 T_1 완화시간 기법을 사용하여 다양한 제초제 유형의 분자가 스타버스트™ 폴리아미도아민과 결합되어 있는 정도를 확인하였다. 하기의 실시예에서, 2,4-디클로로페녹시아세트산(I)(2,4-D)의 T_1 값을 용매($CDCl_3$)에서 결정한 후, 다양한[I:덴드리머] 몰비로 $CDCl_3$에서의 T_1 값을 비교하였다.

<785> 2,4-D의 다양한 스타버스트™ 폴리아미도아민 덴드리머내로의 봉입은 세대의 함수이다.

<786> 다양한 반세대(에스테르 말단, NH_3로 개시됨) 스타버스트™ 폴리아미도아민 덴드리머(세대(Gen)=0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5 및 5.5)를 $CDCl_3$ 내 2,4-디클로로페녹시아세트산(I)과 혼합시켜 표 VII에서 나타낸 대로 1:3.5의 산:3급아민의 비 및 1:86의 산:덴드리머의 몰비를 얻었다. 2,4-디클로로페녹시아세트산 내의 다양한 탄소원자 및 3.5세대의 스타버스트™ PAMAM 덴드리머에 대하여 얻어진 완화시간(T_1)은 표 VIII에 나타낸 바와 같이 1:1의 산/아민 비 및 2,4-D 포화용액의 두 경우로 나타나 있다.

<787> [표 VII]

세 대	(A) 산/아민	(B) 산/아민	(C) 산/총 질소	(D) 몰비(산/스타버스트)
0.5	1	--	1	1
1.5	1	1.33	0.57	6
2.5	1(3.5)*	1.11(3.8)*	0.53(1.8)*	9(34)*
3.5	1(3.0)*	1.05(3.2)*	0.51(1.6)*	20(67)*
4.5	1	1.02	0.51	42
5.5	1	1.01	0.50	86

*는 2,4-D가 화학양론적인 양보다 큰 양으로 덴드리머 내부에 봉입되는 예를 나타낸다.

<789> [표 VIII]

2,4-D/G=3.5세대 PAMAM 스타버스트™의 T_1'

봉입 착체: 농축 효과

탄 소	(A) 1.1 산/아민		(B) 2,4-D로 포화됨	
	T_1	^{13}C**	T_1	^{13}C**
1	3.19± 12(152.73)		3.08± .09(152.30)	
3	0.34± .01(128.64)		0.29± .01(129.62)	
5	0.38± .01(127.41)		0.32± .01(127.34)	
2	3.28± .08(125.79)		2.72± .68(125.99)	
4	4.58± .16(123.27)		3.95± .07(123.16)	
6	0.31± .01(114.66)		0.28± .01(114.48)	
CH_2	0.16± .01(67.29)		0.146± .003(66 79)	
C=O	1.24± .07(170.12)			

**는 76.9ppm에서 클로로포름에 관계되는 13C 화학적 이동을 나타낸다.

<791> 상기 데이타는 화학양론적 양보다 많은 양의 2,4-디클로로페녹시아세트산(즉, [(I):3.5 세대 덴드리머]=67)은 포화상태(표 VIII의 컬럼 (A) 및 (B)를 참조)에서 어느 경우라도 T_1을 증가시키지 않고 사용할 수 있다. 사실상, 컬럼 (B)의 완화시간 T_1은 약간 감소하며, 따라서 화학양론적 양보다 큰 양의 2,4-디클로로페녹시아세트산이 덴드리머의 내부에 봉입되었음을 나타낸다. 예를 들어, [(I):3.5세대 덴드리머]의 몰비는 67인 반면에, [(I):2.5세대 덴드리머]의 몰비는 34이다(표 VIII의 컬럼 D를 참조).

<792> 제 11 도는 덴드리머 세대(즉, 0.5→5.5)의 함수로서의 2,4-디클로로페녹시아세트산 내 탄소-3, 5 및 6에 대한 T_1 값의 플로트이다. 아래의 점선(…)은 탄소-3 및 6에 대한 것이며, 위의 실선 탄소 5에 대한 것이다. 최소 T_1은 모든 경우에 있어서 2.5 내지 5.5세대에서 얻어지므로, 이는 이 덴드리머 세대 범위에서 혼입이 일어 남을 나타낸다. 제 11 도는 또한 트리에틸아민[$N(Et)_3$]의 존재하의 2,4-D의 T_1 값(B1 및 B2 지점) 및 [$N(Et)_3$+N-메틸아세트아미드의 T_1 값(A1 및 A2 지점)을 포함한다. 이들 값은 1.5 내지 5.5 세대의 덴드리머의 경우보다 훨씬 큰 값이므로, 덴드리머 분자내로의 지지 물질의 혼입을 더 지지하는 것으로 볼 수 있다.

<793> 실시예 16: 플루오레세인과 스타버스트™ 중합체를 함유하는 생성물의 제조

<794> 5-카복시플루오레세인(0.996g) 및 스타버스트™ 폴리에틸렌이민(세대=2.0;아민 말단, NH_3로부터 개시됨)(0.202g)의 샘플을 메틸렌 클로라이드 10㎖ 및 메탄올 5㎖내에서 혼합시키고, 10분동안 환류시켰다. 여과하면, 불용성의 적색 분말(0.37g)이 수득된다(대부분은 반응하지 않은 5-카복시 플루오레세인

임). 여액으로부터 연화점이 98 내지 103℃를 나타내는 빛나는 적색의 고체 0.40g을 단리하였고; 175 내지 180℃에서 빛나는 적색의 용융물로 발포시켰다. 이 생성물의 NMR 스펙트럼(D_2O)은 표면에 플루오레세인을 갖는 덴드리머의 경우와 일치한다.

<795> 실시예 17:

<796> 실시예 16에 기술한 것과 유사한 과정으로, 스타버스트™ 폴리에틸렌이민(세대=2.0; 아민 말단; NH_3로부터 개시됨)을 플루오레세인 이소티오시아네이트와 반응시켜 플루오레세인 방사성 표지 시약으로서 사용하기에 적합한, 빛나는 적색의 무지개빛의 고체를 수득하였다.

<797> 실시예 18: 폴리아미도아민 스타버스트™ 덴드리머내로의 R(+)-리모넨의 봉입

<798> 스타버스트™-PAMAM 덴드리머(분자량 약 175,000; 세대=9.0)의 메탄올 중의 5 내지 50중량% 용액을 메탄올 용액 중의 R(+) 리모넨에 포화될 때까지 적가한다. 용액을 실온(약 25℃)에서 수시간동안 교반한 후 실온의 뷔치 로토밥(Büchi rotovap)에서 휘발물질을 제거하여, 고체상의 생성물을 수득한다. 80℃보다 높은 온도로 가온시키면, 캡을 수득한다. 이들 생성물은 (R+)-리모넨을 천천히 방출시키는, 방향제 및 탈취제 제품으로서 우수한 원형이다.

<799> 실시예 19: 폴리아미도아민 스타버스트™ 덴드리머내로의 중금속 염의 봉입

<800> 스타버스트™-PAMAM 덴드리머(분자량 약 350,000; 세대=10.0)의 수중 5 내지 50중량% 고체 용액을 교반하면서, 납 아세테이트[$Pb(C_2H_3O_2)_2$] 포화 용액을 적가한다. 용액을 실온(약 25℃)에서 수시간 동안 교반한 후, 실온의 뷔치 로토밥에서 휘발물질을 제거하여, 고체상의 생성물을 수득한다. 이들 생성물의 주사투과 전자현미경 사진은 이들 중금속 Pb염이 덴드리머의 내부에 봉입되었음을 나타낸다. 중금속 염을 함유하는, 이들 필름은 전자선을 흡수하는 차폐제로서 유용하다.

<801> 실시예 20: 폴리아미도아민 스타버스트™ 덴드리머내로의 플루오레세인(수용성) 염료의 봉입

<802> 스타버스트™-PAMAM 덴드리머(분자량 약 175,000; 세대=9.0)의 수중 5 내지 50중량% 고체 용액을 교반하면서 플루오레세인, 이나트륨 염(애시드 옐로우(Acid Yellow) 73, CI. 45350; 유라닌; 알드리치 케미칼 캄파니(위스콘신, 밀워키 소재)로부터 구입가능함)을 포화될 때까지 적가한다. 이 용액을 실온(약 25℃)에서 수시간동안 교반한 후, 실온에서 휘발물질을 제거하여, 착색된 고체상의 생성물을 수득한다. 이들 염료 봉입된 덴드리머는 한외여과 멤브레인에 대한 우수한 참조 프로브이다.

<803> 실시예 21: 말단 형광 기를 갖는 덴드리머의 제조

<804> A. 아민 말단의 덴드리머와 N-단실 아지리딘의 반응

<805> 스타버스트™ 폴리에틸렌이민(PEI)(세대=3.0, 말단기(Z)=12, 분자량=920)의 샘플(1.5g, 1.6×10^{-3}몰)을 메탄올 20㎖에 용해시킨다. 이 용액을 교반하고, N-단실 아지리딘(캘리포니아 코스타메사 소재의 ICM 바이오메디칼즈(Biomedicals)) 용액 0.884g(3.84×10^{-2}몰)을 20분에 걸쳐 적가한다. 이 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반시킨다. 진공하에 용매를 제거하여 고체상의 생성물을 수득한다. NMR 및 적외선 분석으로 덴드리머 표면에 공유결합된 단실기를 갖는 생성물임을 확인한다.

<806> B. 아민 말단의 덴드리머와 단실 클로라이드의 반응

<807> 물 30㎖ 중의 스타버스트™ 폴리아미도아민(암모니아로부터 개시됨, G=4.0, 말단기(Z)=24, 분자량=5,147)(1.0g, 1.9×10^{-4}몰)의 용액을 톨루엔 80㎖가 들어있는 3구 플라스크에서 교반하는 한편, 얼음으로 냉각시키면서, 톨루엔 40㎖ 중의 단실 클로라이드 용액(1.2g, 4.5×10^{-3}몰)(5-디메틸-아미노-1-나프탈렌설포닐 클로라이드, 위스콘신 밀워키 소재의 알드리치 케미칼 캄파니의 제품)을 적가한다. 동시에, 10% NaOH의 용액(13.3몰, 10% 과량)을 반응 혼합물에 첨가하여, 오일상의 볼(ball)을 수득한다. 조질의 생성물을 물로 세척하고, 메탄올에 용해시킨 후, 디에틸 에테르로 침전시켜, 고체상의 생성물을 수득한다. NMR 및 적외선 분석 결과는 덴드리머 표면에 공유결합된 단실기의 경우와 일치한다.

<808> 실시예 22: 망간 PAMAM 조밀 별형 중합체의 제조

<809> 미국 특허 제 4,587,329호의 실시예 1에 기술된 과정에 따라, 제 3 세대의 에스테르 말단의 폴리아미도아민 조밀 별형 중합체를 제조한다. 에스테르 잔기는 조밀 별형 중합체를 0.1N NaOH에 용해시킴으로써 나트륨염 형태로 가수분해된다. 생성되는 조절의 조밀 별형 중합체 나트륨 염의 131mg(0.496밀리몰) 분량을 물(1㎖, pH 11.4)에 용해시키고, 0.5M HCl을 첨가하여 pH 7.0으로 중화시킨다. $MnCl_2\cdot4H_2O$ 26mg(2당량) 분량을 상기 중화된 용액에 첨가하고, 이 용액을 55℃에서 2일동안 가열한다. 바이오겔 P2 컬럼(15.0g, 150mm 길이×25mm 직경)을 사용하여, 얻어지는 연황색의 용액을 정제하고, 착색된 밴드를 단리한다. 생성물은 질산화은 시험법에 의해 클로라이드가 없는 것(예컨대, NaCl, $MgCl_2$)으로 확인되었다. 용출액을 스트리핑에 의해 건조시켜, 투명한 겔을 형성하고, 이를 고진공하에 건조시켜, 원하는 조밀 별형 중합체 착체 45mg을 수득하였으며, 이는 하기의 성분을 갖는 것으로 결정되었다:

$[NaMn_2H_7][C_{69}H_{105}N_{19}O_{33}]$

	Na	Mn	C	H	N
계산치	1.23	5.88	44.35	5.56	14.24
실측치	1.42	4.80	43.33	7.91	14.72.

<811> 상기와 유사한 방법으로 제 7 세대 나트륨 카복실레이트 말단의 폴리아미도아민 조밀 별형 중합체를 사용하여, 다음과 같은 성분을 갖는 것으로 확인된 부가적인 망간 조밀 별형 중합체 착체를 제조하였다:

$[Na_{30}H_{354}][Mn_{10}C_{3057}H_{4965}N_{763}O_{1149}]$

	Mn	C	H	N
계산치:	0.759	50.72	7.41	14.76
실측치	0.72	46.34	7.91	14.72.

<813> 전술한 착체의 완화성을 물에서 측정하고, 그 결과를 표 IX에 나타낸다. 비교하기 위하여, 2개의 공지된 착화제를 사용하여 망간 착체의 완화성을 핵자기공명법에 의해 측정한, 상응하는 완화시간으로부터 계산한다. 그 결과가 표 IX에 나타나 있다.

<814> [표 IX]

화 합 물	완 화 성 *	
	R_1	R_2
$MnCl_2$	5.2	>20
MnEDTA	2.9	--
MnDTPA	1.3	--
Mn[PAMAM-A(2.5G)]	3.63±0.02	16.35±0.78

* $(mM\cdot초)^{-1}$, 37℃, 90MHz 금속원자당 값.

<816> 실시예 23:

<817> 실시예 22의 과정에 따라, 철과 조밀 별형 중합체의 착체를 제조한다. 하나의 태양에서, 제 6 세대 폴리아미도아민의 산 형태의 나트륨염은, 미국 특허 제 4,587,329 호의 과량의 반응물 방법에 따라 제조한, 폴리아미도아민의 에스테르 형태를 1N NaOH에 용해시킴으로써 제조한다. 그 다음, 나트륨염(97mg, 2.4×10^{-3}밀리몰)을 물 2㎖에 용해시키고, 용액(pH 11.3)을 0.5M HCl로 pH 7로 중화시켰다. 이 중화된 용액에 $FeCl_3$ 수용액(0.102M, pH 1.4, 0.5㎖, 0.051밀리몰, 21.6당량)을 첨가한다. 생성되는 진한 오렌지색 용액(pH 4.9)을 55℃에서 23시간동안 가열한다. 이 용액을 주위온도로 냉각시키고, 겔 여과 크로마토그래피(바이오겔 P2 컬럼, 175×25㎜)에 의해 여과한다. 오렌지색의 용출액을 스트리핑시켜 진공하에 50℃에서 건조시키면, 하기의 분자식을 갖는 오렌지색의 고체 45mg을 수득한다: $[Na_5H_{127}]\{Fe_{20}[PAMAM-P(6.5G)]\}$(여기에서, PAMAM-P는 프로피오네이트 말단 형태의 조밀 별형 폴리아미도아민을 나타냄). 이 오렌지색의 고체는 일반식 $Na_5H_{127}Fe_{20}-(C_{1521}H_{2469}N_{379}O_{573})$의, 철과 폴리아미도아민 조밀 별형 중합체의 착체인 것으로 결정되었다.

	Na	Fe	C	H	N
계산치:	0.31	3.05	49.84	7.30	14.48
실측치:	0.31	3.12	47.11	7.33	14.81.

<819> 상기의 과정에 따라, 2 내지 6세대를 갖는, 아세테이트-말단의 폴리아미도아민 조밀 별형 중합체 또는 아세테이트-말단의 폴리에틸렌 이민 조밀 별형 중합체와, 철의 유사한 착체를 제조한다. 핵자기 공명법을 사용하여 이들 착체의 완화시간을 측정하고, 상응하는 완화성을 계산하여 표 X에 나타낸다.

<820> [표 X]

화 합 물	완 화 성*	
	R_1	R_2
$FeCl_3$	8.4±0.1	--
FeEDTA	1.7	--
FeDTPA	0.73	0.85
FeEHPG	0.95	1.1
Fe_2[PEI-A(2.5G)]	0.40±0.02	0.88±0.03
Fe_2[PAMAM-A(2.5G)]	0.77±0.01	--
Fe_2[PAMAM-P(2.5G)]	0.135±0.004	0.42±0.02
Fe_4[PAMAM-P(4.5G)]	0.038±0.006	1.01±0.05
Fe_{20}[PAMAM-P(6.5G)]	0.047±0.007	0.50±0.07
$Fe_{50\ 60}$[PAMAM-P(7.5G)]	약 0.3**	약 62**
{SPEI-[DTPA][Fe(DTPA)]$_2$}	1.094±0.050	1.70±0.02

* $(mM\cdot초)^{-1}$, 37℃, 90MHz. 금속원자당 값

** 착체당 값

<822> 실시예 24:

<823> 실시예 22의 방법을 사용하여, 실시예 23에 기술된, 폴리아미도아민 및 폴리에틸렌이민 조밀 별형 중합체와 가돌리늄의 착체를 제조하고, 이들의 완화시간을 측정하고, 완화성을 계산하여 표 XI에 그 결과를 나타낸다. 가돌리늄 착체의 제조방법의 예시로서, 미국 특허 제 4,587,329 호의 실시예 6에 이어, 과량의 브로모아세트산과 반응시켜(pH 9, 40℃) 제조한 폴리에틸렌이민 조밀 별형 중합체(제 2 세대)의 나트륨 아세테이트 형태 0.40g(0.16밀리몰)을 물 5㎖에 용해시켰다. 0.5N HCl을 사용하여 생성된 용액의 pH를 9.2로 낮추고. $GdCl_3$ 수용액 3.2㎖(0.31밀리몰)를 첨가한다. 1N NaOH를 사용하여 생성된 용액의 pH를 4.1에서 8.3으로 증가시키고, 이 용액을 24시간동안 정치시킨다. 그 다음, 용액으로부터 진공하에 휘발물질을 제거하고, 그 잔사를 켈렉스(chelex) 수지에서 2회 크로마토그래피한다. 회수되는 연황색의 고체는 Gd 대 N의 원자비가 2:1인 것으로 밝혀졌다.

<824> 실측치(%): C, 14.5; H, 2.1; N, 3.6; Gd, 7.9; Br, 28.7.

<825> 상기 과정에 따라 2 내지 6세대를 갖는 아세테이트-말단의 폴리아미도아민 조밀 별형 중합체 또는 아세테이트-말단의 폴리에틸렌이민 조밀 별형 중합체와, 가돌리늄의 유사한 착체를 제조한다. 핵자기 공명법을 사용하여 이들 착체의 완화시간을 측정하고, 상응하는 완화성을 계산하여 표 XI에 나타낸다.

<826> [표 XI]

화 합 물	완 화 성*
	R_1
$Gd(NO_3)_3$	8.6±0.3
$GdCl_3$	8.7±0.1
$GdCl_3$(0.15M 염수)	10.43±0.36
GdEDTA	6.5
GdDTPA	3.9
GdDOTA	약 4
Gd(PAMAM-A)	9.90±0.43
Gd_2(PAMAM-A)	13.00±0.33
Gd(PEI-A)	8.85±0.190
Gd_2(PEI-A)	15.35±0.17
Gd_2(PEI-A)+3PEI-A	8.0±0.19
Gd(DTPMP)	10.8±0.4
Gd_2(PEI-1)+2EDTA	약 6

* $(mM\ 초^{-1})$, 37℃ 90MHz. 금속원자당 값.

<828> 실시예 25: 브라디키닌 C와의 폴리아미도아민 스타버스트 콘쥬게이트의 제조

<829> 브라디키닌 강화제 C 4.7mg(시그마 케미칼 캄파니)을, N-하이드록시벤조트리아졸(HOBT) 7.1mg/㎖를 함유하는 N-메틸피롤리디논(NMP) 90㎕에 흡수시키고, 새로 제조한 디사이클로헥실카보디이미드(DCC)(27mg/㎖ NMP)의 용액과 혼합하였다. 실온에서 4시간이 지난 후, NMP(13.4mg/㎖) 중의 제 5 세대

(G5) PAMAM 60㎕를 상기 브라디키닌 혼합물에 첨가하였다. 실온에서 72시간이 지난 후 17mM 아세트산 1.5㎖를 첨가하였다. 이 혼합물을 원심분리하고 고체로부터 용액을 따라낸 다음, 이 고체를 묽은 아세트산 1.5㎖로 세척하였다. 용액 및 세척물을 합하고, 25mm PTFE 0.45㎛ 주사 여과기를 통하여 여과시켰다. 2개의 센트리콘™-10 마이크로농축기를 사용하여 한외여과에 의해 콘쥬게이트로부터 반응하지 않은 펩티드, HOBT 및 용매를 분리하였다. 콘쥬게이트를 17mM 아세트산 2㎖에 이어, PBS 완충액 2㎖로 세척하였다. 잔류액 450㎕에서 콘쥬게이트를 회수하고, 새로운 PBS 완충액 750㎕로 희석하였다.

<830> 4개의 콘쥬게이트 분취량을 115℃에서 20시간동안 진한 HCl로 가수분해시키고, 글루탐산에 대해 분석하였다. 형광 검출기가 장착된 역상 HPLC[컬럼: 와트만 파티실™(Whatman Partisil) 5CCS/C8(10cm); 길슨 스펙트라™(Gilson Spectra)/글로(Glo) 검출기; 내부 표준물질로서 티로신; 용출액 50mM 나트륨 아세테이트 및 메탄올; 구배 5분내에 12% 내지 30% 메탄올, 30% 메탄올에서 1분동안 유지시킨 후, 14분에 걸쳐 80% 메탄올로 증가시키고, 5분동안 80% 메탄올에서 유지시킴]를 사용하여 o-프탈알데히드/2-메르캅토에탄올 유도체로서 글루탐산을 정량하였다. o-프탈알데히드 유도체는 아미노산 용액 25㎕와 플루오르알데히드™ o-프탈알데히드 시약 용액(피어스 제품) 50㎕를 혼합시키고, 1분동안 혼합시킨 후, PBS 완충액(포스페이트 완충된 염수; 120밀리몰 나트륨 클로라이드, 2.7밀리몰 칼슘 클로라이드, 10밀리몰 포스페이트 완충액 염, pH 7.4) 0.05㎖로 희석시킴으로써 제조하였다. 콘쥬게이트의 25㎕ 분취량에서, 글루탐산 58나노몰을 발견하였다. 이는 콘쥬게이트상의 브라디키닌 C 1.74μ몰에 상응한다.

<831> 실시예 26: BOCPheLeuPheLeuPhe과의 폴리아미도아민 스타버스트™ 콘쥬게이트의 제조

<832> N-3급-부톡시카보닐-L-페닐알라닐-D-류실-L-페닐알라닐-D-류실-L-페닐알라닌(BOCPheLeuPheLeuPhe) 4.1mg(시스마 케미칼 캄파니 제품)를, HOBT 7.1mg/㎖를 함유한 NMP 100㎕에 흡수시키고, 새로 제조한 NMP 중 DCC 용액(36mg/㎖) 30㎕와 혼합시켰다. 실온에서 90분이 지난 후 NMP 중 5G PAMAM 용액(13.4mg/㎖) 60㎕를 첨가하였다. 실온에서 72시간이 지난 후, 실시예 24의 과정에 따라 콘쥬게이트를 단리하였다. 잔류액 750㎕에서 콘쥬게이트를 회수하였다.

<833> 4개의 콘쥬게이트 분취량을 115℃에서 20시간동안 진한 HCl로 가수분해시키고, 페닐알라닌에 대해 분석하였다. 형광 검출기가 장착된 역상 HPLC(용출액 구배가 20분에 걸쳐 12% 내지 80% 메탄올에 이어, 5분동안 80% 메탄올에서 유지시키는 것을 제외하고, 실시예 24의 HPLC 조건)를 사용하여 o-프탈알데히드/2-메르캅토에탄올 유도체로서 페닐알라닌을 정량하였다. o-프탈알데히드 유도체는 실시예 24에 나타낸 대로 제조하였다. 콘쥬게이트의 25㎕ 분취량에서, 페닐알라닌 26나노몰을 발견하였다. 이는 콘쥬게이트상의 BOCPheLeuPheLeuPhe 0.26μ몰에 상응한다.

<834> 실시예 27:

<835> 1,4,7-트리스-(카보메톡시메틸)-1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸(DO3A 메틸 에스테르)의 메탄올 용액에, 새로 제조한 무수 나트륨 메톡사이드 1.0당량을 첨가하고, 이 용액을 수시간동안 교반시킨다. 이 용액에 10,11-에폭시운데카노산 1당량을 첨가하고, 이 용액을 밤새 환류시킨다. 진공하에 용매를 제거하여, 조질의 하이드록시에틸화 생성물, 1,4,7-트리스-(카보메톡시메틸)-10-[2'-하이드록시-10'-카복시(데실)]-1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸을 수득한다. 이 생성물 2 내지 5당량을 디메틸포름아미드(DMF)에 용해시키고, 상응하는 디사이클로헥실카보디이미드(DCC) 및 N-하이드록시숙신이미드의 당량을 밤새 교반하면서 첨가한다. 이 용액에 2세대 PAMAM 1당량을 첨가하고, 다시 24시간동안 교반을 계속한다. 상응하는 DO3A 메틸 에스테르 콘쥬게이트를 메탄올 중 수성 수산화나트륨으로 처리하여 선택적으로 가수분해시킨다. DO3A 콘쥬게이트를 과량의 가돌리늄(III) 아세테이트[$Gd(OAc)_3$, pH 6으로 완충됨]로 처리한 후, 과량의 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA)과 함께 배양하고, 예비용 역상 HPLC를 사용하여 콘쥬게이트를 정제하여, 과량의 DTPA로 추가로 처리하여도 제거할 수 없는 2 내지 5당량의 가돌리늄을 함유하는, 하이드록시에틸 DO3A PAMAM 스타버스트™ 콘쥬게이트 생성물을 수득한다.

<836> 실시예 28:

<837> pH 9.0으로 완충된 2세대 PAMAM의 수용액에, 유럽 특허 공개 공보 제 0353450 호(1990년 2월 7일 공개됨)에 기술된 방법에 의해 제조한 1-[1-카복시-3(4'-이소티오시아네이토-페닐)프로필]-4,7,10-트리스(카복시메틸)-1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸 2 내지 5당량을 첨가한다. 이 용액을 실온에서 밤새 교반한다. 이 용액을 pH 6.0에서 과량의 $Gd(OAc)_3$로 처리하여, DTPA 처리로 제거할 수 없는 불활성으로 결합된 가돌리늄 2 내지 5당량을 함유하는, 티오우레아 결합된 DOTA PAMAM 스타버스트™ 콘쥬게이트를 제조한다.

<838> 실시예 29: IgG/덴드리머-FITC I 콘쥬게이트의 제조

<839> A: 플루오레세인 이소티오시아네이트에 콘쥬게이트화된 PAMAM 덴드리머의 제조

<840> G9(EDA) PAMAM 덴드리머의 메탄올 용액 2.2㎖를 회전 증발기에서 진공하에 건조시켰다. 건조시킨 덴드리머 약 300mg(7.4μ몰)을 재빨리 취하여 탈이온수 1㎖에 용해시켜, 원료 덴드리머 용액을 제조하였다. 원료 덴드리머 용액 200㎕를 혼합하고, 여기에 탈이온수 800㎕를 첨가함으로써, 60mg/㎖의 용액을 제조하였다. 10mg/㎖(최종 덴드리머 용액)의 최종 덴드리머 농도를 얻기 위하여, 0.1M 포스페이트 완충액(pH=9.0) 5㎖를 상기 60mg/㎖의 용액에 첨가하였다. 최종 덴드리머 용액 3㎖를 2드램들이 바이알에 옮겼다(30mg, 0.13μ몰).

<841> 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC I, 몰레큘라 프로브스 제품) 5mg을 암소에서 디메틸 설폭사이드 1㎖에 용해시켰다. 플루오레세인 이소티오시아네이트 용액(200㎕, 2.57μ몰)을 교반중인 덴드리머 용액에 첨가하였다. 얻어지는 반응 혼합물을 빛으로부터 차단하고, 실온에서 15 내지 20시간동안 교반하였다. 이 용액은 외관상 투명하고 호박색인 상태로 존재한다.

<842> 교반 후, 이 반응 혼합물을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기관(분자량 차단: 10,000달톤)에 넣고, 한외여과시켜 반응하지 않은 FITC I을 제거하였다. 한외여과시키는 동안, pH 9.0의 0.1M 포스페이트 완충액 2.0㎖를 10회 첨가하여 정제를 용이하게 하였다. 반응하지 않은 FITC I이 완전히 제거되었는지를

확인하기 위하여 한외여과액의 순도를 박층 크로마토그래피에 의해 모니터링하였다. 박층 크로마토그래피는 에틸아세테이트(100%) 용매 시스템을 사용하는 실리카겔 60 플레이츠(메르크사 제품)를 사용하여 수행하였다. 표지된 덴드리머는 기점에 잔류하는 반면 잔류하는 FITC I은 R_f 0.7 근처로 용출되었다. 콘쥬게이트화된 G9 PAMAM 덴드리머-FITC I 약 2㎖를 정제과정으로부터 회수하였다.

<843> B. 플루오레세인 이소티오시아네이트 및 IgG에 콘쥬게이트화된 PAMAM 덴드리머의 제조

<844> 토끼 면역글로불린(IgG, 시그마 케미칼 캄파니) 9.8mg을 30mM 나트륨 아세테이트 1㎖ 및 150mM 나트륨 클로라이드 완충액(pH=5.5)에 용해시켰다. IgG 용액에 나트륨 페리오데이트 1.5mg을 첨가하고, 용해될 때까지 서서히 교반하였다. 이 혼합물을 빛으로부터 차단하고, 실온에서 15 내지 18시간동안 서서히 교반하였다. 교반한 후, 이 반응 혼합물을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 10,000달톤)에 넣고, pH 6.0의 30mM 포스페이트 완충액(4×2㎖)으로 한외여과시켰다. IgG 디알데히드 용액 약 1 내지 2㎖를 정제과정으로부터 회수하였다.

<845> 단계 A로부터 얻은, 표지된 덴드리머-FITC I의 분취량(0.88 ㎖, 17.6mg, 0.075μ몰)을 IgG 디알데히드 용액에 적가하였다. (이것은 약 1.15:1의 표지된 덴드리머 대 항체를 나타냄). 표지된 덴드리머 용액을 첫 방울 첨가하는 것과 동시에, 반응 혼합물이 침전되었다. 20mM 포스페이트 완충액(pH=6.0) 3㎖를 추가로 첨가하였지만, 고체를 가용화시키지는 못하였다.

<846> IgG/덴드리머-FITC I 콘쥬게이트를 빛으로부터 차단하고, 실온에서 1시간동안 교반시켰다. 그 후, 나트륨 시아노보로하이드라이드 1.7mg을 첨가하고, 이 반응물을 실온에서 밤새(15 내지 20시간) 교반하였다. 용액은 일부가 침전된 형광빛 오렌지색이었다. 침전물을 포함한, 반응 생성물을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 10,000달톤)에 넣고, 한외여과시켰다. 이 과정동안 20mM 포스페이트 완충액(pH=6.0) 2㎖ 용적을 추가로 6회 첨가하여, 결합하지 않은 덴드리머-FITC I을 제거하였다. IgG/덴드리머-FITC I 콘쥬게이트를 회수하고, 호박색의 유리 바이알에 옮겨, -10℃에서 보관하였다.

<847> 실시예 30: IgG/덴드리머-단실(dansyl) 콘쥬게이트의 제조

<848> A: G9 PAMAM 덴드리머-단실 콘쥬게이트의 제조

<849> 실시예 29A에서 제조한 원료 덴드리머 용액 200㎕를 사용하고, 탈이온수 800㎕를 첨가하여, 60mg/㎖의 용액을 제조하였다. 10mg/㎖의 최종 덴드리머 농도를 얻기 위하여, 0.1M 포스페이트 완충액(pH=9.0) 5㎖를 60mg/㎖ 용액에 첨가하였다.

<850> 단실 클로라이드(13.9mg, 0.052밀리몰, 알드리치 케미칼 캄파니)를 아세톤 5㎖에 첨가하고, 5 내지 10분동안 흔들어 주었다 (이 용액은 진한 황색이었고, 미량의 고체가 존재하였음) 덴드리머 용액에 단실 클로라이드 용액을 30초에 걸쳐 첨가하고, 이 반응 플라스크를 40℃의 수욕 중에 90분동안 넣어 두었다. 가열시키는 동안, 반응 혼합물을 간헐적으로 진탕하였다. 반응 혼합물은 외관상 약간 흐릿하였고, 진한 황색으로부터 흐린 황색으로 희미해져 갔다. 90분 후, 반응 플라스크를 가열상태로부터 꺼내어 실온으로 냉각시켰다. 그 다음, 반응물을 회전증발기에 넣고 30 내지 35℃에서 진공하에 아세톤을 제거하였다. 반응생성물을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 100,000달톤)에 넣고, 한외여과시켜 결합하지 않은 단실 클로라이드를 제거하였다. 한외여과 과정중에 0.1M 포스페이트 완충액(pH=9.0) 2㎖를 10회 첨가하였다.

<851> 반응하지 않은 단실 클로라이드가 완전히 제거되었는지를 확인하기 위하여 한외여액의 순도를 박층 크로마토그래피에 의해 모니터링하였다. 실리카겔 60 플레이츠(메르크)와 에틸아세테이트(100%) 용매 시스템(UV광에 의해 가시화함)을 사용하여 박층 크로마토그래피를 수행하였다. 표지된 덴드리머는 기점에 잔류하는 반면, 잔류하는 단실 클로라이드는 R_f 0.3 근처로 용출되었다. 정제과정으로부터 콘쥬게이트화된 G9 PAMAM 덴드리머-단실 약 1 내지 2㎖가 회수되었다.

<852> B: 단실 및 IgG에 콘쥬게이트화된 PAMAM 덴드리머의 제조

<853> 토끼 면역글로불린(IgG, 시그마 케미칼 캄파니) 9.8mg을 30mM 나트륨 아세테이트 1㎖ 및 150mM 나트륨 클로라이드 완충액(pH=5.5)에 용해시켰다. IgG 용액에 나트륨 페리오데이트 1.5mg을 첨가하고, 용해될 때까지 서서히 교반하였다. 이 혼합물을 빛으로부터 차단하고, 실온에서 15 내지 18시간동안 서서히 교반하였다. 교반한 후, 이 반응 혼합물을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단 100,000달톤)에 넣고, pH 6.0의 20mM 포스페이트 완충액(4×2㎖)으로 한외여과시켰다. IgG 디알데히드 용액 약 1.9㎖를 정제과정으로부터 회수하였다.

<854> 단계 A로부터 얻은, 표지된 덴드리머-단실 용액의 분취량 1.25㎖(14.1mg ㎖)를 IgG 디알데히드 용액에 적가하였다. (이것은 약 1.15:1의 표지된 덴드리머 대 항체를 나타냄). 표지된 덴드리머 용액을 첫 방울 첨가하는 것과 동시에, 반응 혼합물이 침전되었다.

<855> IgG/덴드리머-단실 콘쥬게이트를 빛으로부터 차단하고, 실온에서 1시간동안 교반시켰다. 그 후, 나트륨 시아노보로하이드라이드 1.7mg을 첨가하고, 이 반응물을 실온에서 밤새(15 내지 20시간) 교반하였다. 침전물을 포함한, 반응 생성물을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기관(분자량 차단: 100,000달톤)에 넣고, 한외여과시켰다. 이 과정동안 20mM 포스페이트 완충액(pH=6.0) 2㎖ 용적을 추가로 6회 첨가하여, 결합하지 않은 덴드리머-단실을 제거하였다. IgG/덴드리머-단실 콘쥬게이트를 회수하고, 호박색의 유리 바이알에 옮겨, -10℃에서 보관하였다.

<856> 실시예 31: HRP 및 IgG에 콘쥬게이트화된 PAMAM 덴드리머의 제조

<857> A. IgG에 콘쥬게이트화된 PAMAM 덴드리머의 제조

<858> 토끼 면역글로불린(IgG, 시그마 케미칼 캄파니) 9.6mg을 30mM 나트륨 아세테이트 1㎖ 및 150mM 나트륨 클로라이드 완충액(pH=5.5)에 용해시켰다. IgG 용액에 나트륨 페리오데이트 1.5mg을 첨가하고, 용해될 때까지 서서히 교반하였다. 이 혼합물을 빛으로부터 차단하고, 실온에서 15 내지 18시간동안 서서히 교반하였다. 교반한 후 반응 혼합물을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 100,000달톤)에

넣고, pH 6.0의 20mM 포스페이트 완충액(4×2㎖)으로 한외여과시켰다. IgG 디알데히드 용액 약 1.5㎖를 정제과정으로부터 회수하였다.

<859> 실시예 29의 단계 A로부터 얻은, 덴드리머 원료용액 100㎕의 분취량을 탈이온수 100㎕에 첨가하여 15㎎/㎖의 용액을 수득하였다. 덴드리머 용액 100㎕를 탈이온수 900㎕로 더 희석시켜, 15㎎/㎖의 최종 농도를 얻었다. 최종 덴드리머 용액 1㎖를 IgG 디알데히드 용액에 적가하고, 이 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 침전물이 형성되었다. 그 후, 나트륨 시아노보로하이드라이드 1.7㎎을 첨가하고, 이 반응물을 실온에서 밤새(15 내지 20시간) 교반하였다. 침전물을 포함한, 반응 생성물을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 100,000달톤)에 넣고, 한외여과시켰다. 이 과정동안 20mM 포스페이트 완충액(pH=6.0) 2㎖ 용적을 추가로 4회 첨가하여, 결합하지 않은 덴드리머-IgG를 제거하였다. IgG/덴드리머 콘쥬게이트를 회수하고, 2드램들이 바이알에 옮겼다.

<860> B. PAMAM 덴드리머/IgG-HRP 콘쥬게이트의 제조

<861> 양고추냉이 퍼옥시다제(HRP, 2.6㎎, 피어스)를 탈이온수 0.5㎖에 용해시켜, HRP 용액을 제조하였다. 나트륨 페리오데이트 10.7㎎을 10mM 나트륨 포스페이트(pH=7.0) 5㎖에 용해시켰다. 페리오데이트 용액 약 1.6㎖를 실온에서 HRP 용액에 첨가하였다. 효소 반응 혼합물을 빛으로부터 차단시키고, 실온에서 30분동안 서서히 교반하였다. 산화된 HRP 생성물을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 10,000달톤)에 넣고, 한외여과시켰다. 이 과정동안 30mM 나트륨 아세테이트/150mM 나트륨 클로라이드 완충액(pH=5.0) 2㎖ 용적을 추가로 4회 첨가하였다.

<862> 산화된 효소 용액을 PAMAM 덴드리머-IgG 콘쥬게이트 혼합물에 교반하면서 첨가하였다. 침전물이 반응물에 잔류하지만, 이 혼합물을 실온에서 2시간동안 교반시켰다. 2시간 후, 나트륨 보로하이드라이드 2.1㎎을 탈이온수 1㎖에 용해시키고, 보로하이드라이드 용액 100㎕를 PAMAM 덴드리머-IgG-HRP 혼합물에 첨가하였다. 반응물을 2 내지 8℃에서 밤새(15 내지 20시간) 교반하였다.

<863> 침전물을 포함한, 반응 생성물을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 100,000달톤)에 넣고, 한외여과시켰다. 이 과정동안 20mM 포스페이트 완충액(pH=6.0) 2㎖ 용적을 추가로 4회 첨가하였다. IgG/덴드리머/HRP 콘쥬게이트를 회수하고, 2드램들이 바이알에 옮겨, -10℃에서 보관하였다.

<864> 실시예 32: IgG/단실화 PAMAM 덴드리머/HRP 콘쥬게이트의 제조

<865> A. HRP 용액의 제조

<866> 양고추냉이 퍼옥시다제(HRP, 2.6㎎, 피어스)를 탈이온수 0.5㎖에 용해시켜, HRP 용액을 제조하였다. 나트륨 페리오데이트 10.7㎎을 10mM 나트륨 포스페이트(pH=7.0) 5㎖ 용해시켰다. HRP 용액에 페리오데이트 용액 약 1.6㎖를 실온에서 첨가하였다. 효소 반응 혼합물을 빛으로부터 차단시키고, 실온에서 30분동안 서서히 교반하였다. 산화된 HRP 생성물을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 10,000달톤)에 넣고, 한외여과시켰다. 이 과정동안 30mM 나트륨 아세테이트/150mM 나트륨 클로라이드 완충액(pH=5.5) 2㎖들이 용적을 추가로 4회 첨가하였다. 산화된 효소 용액을 회수하고, 2드램들이 유리 바이알에 옮겼다.

<867> B: 단실 G4 PAMAM 덴드리머 용액의 제조

<868> 12.7%(w/w) G4(NH_3) PAMAM 덴드리머(NH_3 코어)의 메탄올 용액 5㎖를 제조하고, 회전 증발기에서 진공하에 건조시켰다. 건조된 덴드리머 약 40㎎(7.4μ몰)을 제거하여 0.1M 포스페이트 완충액(pH=9.0) 5㎖에 용해시켰다.

<869> 단실 클로라이드 10㎎(0.037밀리몰) 분량을 아세톤 5㎖에 첨가하고 5 내지 10분동안 흔들어 주었다. 이 용액은 진한 황색이었고, 미량의 고체가 존재하였다. 덴드리머 용액에 단실 클로라이드 용액을 30초에 걸쳐 첨가하고, 이 반응 플라스크를 40℃의 수욕 중에 90분동안 넣어두었다. 가열시키는 동안, 반응 혼합물을 간헐적으로 진탕하였다. 용액의 색은 흐린 황색이었다. 90분 후에, 반응 플라스크를 가열상태로부터 제거하여, 실온으로 냉각시켰다. 반응 혼합물은 외관상 약간 흐릿하였다.

<870> 회전 증발기를 사용하여 진공하에 30 내지 35℃에서 반응 혼합물을 증발시켜 아세톤을 제거하였다. 이 과정에 의해 용액은 맑아졌다. 그 다음, 반응 혼합물을 2개의 원심분리 관에 옮기고, 30분동안 5000rpm에서 원심분리시켰다. 그 다음 덴드리머 용액을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 3,000달톤)에 넣고, 2㎖의 용적으로부터 4회 한외여과시켜 결합하지 않은 단실 클로라이드를 제거하였다. 단실화 덴드리머 생성물 용액 약 1 내지 2㎖를 회수하였다.

<871> C: IgG/단실 G4 PAMAM 덴드리머 용액의 제조

<872> 토끼 면역글로불린(IgG) 6.9㎎ 분량을 50mM 포스페이트 완충액(pH=7.2) 1㎖에 용해시켰다. 나트륨 페리오데이트 14.8㎎ 분량을 첨가하고, 이 혼합물을 고체가 용해될 때가지 세게 섞어 주었다. 이 혼합물을 빛으로부터 차단시키고, 실온에서 30분동안 더 교반하였다. 그 다음, 이 용액을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 3,000달톤)에 넣고, 50mM 포스페이트 완충액(pH=7.2)을 사용하여 매회 2㎖의 용적으로부터 4회 한외여과시켜, 반응하지 않은 나트륨 페리오데이트를 제거하였다. 디알데히드 용액 약 1㎖를 회수하고, 단실화 덴드리머와의 커플링을 위한 예비 바이알에 옮겼다. B 부분으로부터 얻은 표지된 단실 덴드리머 분취량을 원액으로부터 취하여 3.0㎎/㎖의 최종 덴드리머 농도로 희석시켰다. 희석시킨 단실화 덴드리머 100㎕를 IgG 디알데히드 용액에 첨가하고 분산시켰다. 이것은 약 1.2:1비의 표지된 덴드리머 대 IgG를 나타낸다.

<873> IgG/단실화 덴드리머 콘쥬게이트를 빛으로부터 차단하고, 실온에서 1시간동안 교반시켰다. 그 후, 나트륨 시아노보로하이드라이드 1.4㎎을 첨가하고, 이 반응물을 실온에서 밤새(15 내지 20시간) 교반하였다. 용액은 투명하게 보였다. 전기영동 샘플 200㎕을 제거한 후, 나머지 용액은 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 100,000달톤)에 넣고, 한외여과시켰다. 이 과정동안 50mM 포스페이트 완충

액(pH=7.2) 2㎖ 용적을 추가로 4회 첨가하여, 결합하지 않은 단실 덴드리머를 제거하였다. 원하는 콘쥬게이트를 회수하였다.

<874> D: G4 PAMAM 덴드리머/단실/IgG-HRP 콘쥬게이트이 제조

<875> IgG/단실 G4 PAMAM 덴드리머 용액(C 부분에서 제조함) 650㎕(10.1mg)를 산화된 HRP 2.6mg에 첨가하였다. IgG/단실 덴드리머/HRP 콘쥬게이트를 빛으로부터 차단시키고, 실온에서 2시간동안 교반시켰다. 1시간 후, 나트륨 보로하이드라이드 2.1mg을 탈이온수 1㎖에 용해시키고, 보로하이드라이드 용액 100㎕를 PAMAM 덴드리머-IgG-HRP 혼합물에 첨가하였다. 반응물을 2 내지 8℃에서 밤새(15 내지 20시간) 교반하였다. 이 혼합물은 투명한 호박색의 액체였다.

<876> 반응 생성물을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 100,000달톤)에 넣고 한외여과시켰다. 이 과정동안 20mM 포스페이트 완충액(pH=6.0) 2㎖ 용적을 추가로 4회 첨가하였다. IgG/단실/덴드리머/HRP 콘쥬게이트를 회수하고, 호박색의 유리 바이알에 옮겨, -10℃에서 보관하였다.

<877> E. G4 PAMAM 덴드리머/단실/IgG-HRP 콘쥬게이트의 특징화(분석)

<878> IgG/덴드리머/HRP 콘쥬게이트의 분취량을 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB)을 사용하여 HRP 효소 존재에 대하여 평가하였다. HRP는 기질(예: TMB)의 과산화수소 산화반응을 촉매하여 전자를 TMB로부터 과산화물로 옮기므로써, 착색된 생성물을 수득한다. 그러므로 전자 1개가 손실되면 청색을 얻고, 전자 2개가 손실되면 황색을 얻는다.

<879> HRP 효소의 존재를 확인하기 위하여, 하기의 덴드리머/단실/IgG-HRP 콘쥬게이트를 제조하였다:

<880> (1) IgG/단실 G4 PAMAM 덴드리머 0.1mg/㎖

<881> (2) IgG/단실 G4 PAMAM 덴드리머/HRP 0.1mg/㎖

<882> (3) IgG/G9 PAMAM 덴드리머/HRP 0.1mg/㎖

<883> (4) 결합되지 않은 HRP를 함유하는, IgG/G9 PAMAM 덴드리머/HRP로부터의 한외여액

<884> TMB-디하이드로클로라이드를 사용하여 TMB 기질 용액을 제조하였다. 각각의 상기 희석된 샘플 200㎕를 TMB 기질 용액에 첨가하였다. 두 HRP 콘쥬게이트(#2 및 #3)는 즉시 녹색에 이어, 황색으로 변하였다. 한외여액(#4)은 밝은 황색으로 변하였다. IgG/덴드리머(#1)는 무색인 채로 남아 있었다. 4가지 샘플 모두를 실온에서 30분동안 배양한 후, 1N 황산 200㎕로 급냉(quench)시켰다. 효소 콘쥬게이트(#2 및 #3)의 황색은 더욱 진해졌다. IgG/덴드리머(#1)는 약간 녹색이고, UV광하에서 형광을 나타내었다.

<885> 모든 콘쥬게이트의 분취량을 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 분석하였다. 전기영동하기 위하여, 전기 영동 샘플 약 10㎍에 상응하는, 약 1mg/㎖의 샘플 농도를 제조하였다. 아미콘 그라디포어™ (하일린) 5 내지 50% T 구배 겔을 pH 4.0의 0.05M 나트륨 아세테이트 완충액(나트륨 아지드 내 0.025%)과 함께 사용하였다. 겔은 200V의 일정 전압에서 2시간동안 이동시켰다. 침전물을 함유하는 콘쥬게이트를 원심분리시킨 후, 전기영동 분석하였다. 상청액을 제거하여 전기영동을 시켰다. 하기의 샘플에 대하여 실험하였다.

<886> (1) G9 PAMAM 덴드리머

<887> (2) 단실화 G9 PAMAM 덴드리머

<888> (3) G9 PAMAM 덴드리머-FITC I

<889> (4) IgG(대조군)

<890> (5) IgG/단실 G9 PAMAM 덴드리머

<891> (6) IgG/G9 PAMAM 덴드리머-FITC I

<892> (7) IgG/G9 PAMAM 덴드리머/HRP

<893> (8) HRP(대조군)

<894> (9) IgG/단실 G4(NH_3) PAMAM 덴드리머/HRP

<895> (10) 개방(open)

<896> (11) #7의 반복

<897> (12) #9의 반복.

<898> 염색하기 전에, 겔을 UV광 아래에 놓아 형광성을 확인하였다. #2, 3 및 6 샘플이 형광성을 나타내었다.

<899> 염색하기 전에, TMB 처리한 후 겔을 가시화한 결과 #7, 8, 9, 11 및 12 샘플이 존재하는 것으로 나타났고, 겔의 고분자량 위치에서 효소의 존재를 확인하였다.

<900> 이어, 겔을 5% 아세트산 및 7% 메탄올내에서 0.25% 쿠마지블루(Coomassie Blue) 염색약으로 밤새 염색시켰다. #10 샘플만이 겔에서 염색되지 않은 레인이었다. #4 및 8 샘플은 저분자량 위치에 있었다. 모든 다른 샘플은 저분자량이 존재하지 않는 고분자량을 나타내었다.

<901> 실시예 33: G6 PAMAM 덴드리머/디클로로트리아지닐 플루오레세인의 제조

<902> G6(EDA) PAMAM 덴드리머 300㎕(21.5% 고형분)를 탈이온수 700㎕에 첨가하고, 분산시켰다(64.5mg, 2.24μ몰). 덴드리머를 탈이온수 4㎖로 더 희석시켜 12.9mg/㎖의 농도로 만들었다.

<903> 디클로로트리아지닐 플루오레세인 하이드로클로라이드 DTAF I(시그마로부터 구입가능함) 6.0mg(11.3μ몰)을 어두운 곳에서 메탄올 0.5㎖에 용해시키고 트리에틸아민 2방울을 첨가하였다. DTAF I 용액을 교반중인 덴드리머 용액에 30초에 걸쳐 적가하였다. 반응 혼합물을 빛으로부터 차단시키고, 실온에서 15 내지 20시간동안 교반하였다. 용액은 반응 전체를 통하여 투명하고 오렌지색인 상태로 있었다. 교반한 후, 이 반응 혼합물을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 10,000달톤)에 넣고, 한외여과시켜 반응하지 않은 DTAF I을 제거하였다. 이 과정동안, 0.1M 포스페이트 완충액(pH=9.0) 2㎖를 15회 첨가하였다. 콘쥬게이트화된 G6(EDA) PAMAM 덴드리머/DTAF I 약 3㎖를 회수하였다.

<904> 실시예 34: G5.5 PAMAM 덴드리머/아미노메틸 플루오레세인의 제조

<905> G5.5(NH_3) PAMAM 덴드리머 1㎖ 용액(4.2% 고형분, 42mg, 1.7μ몰)을 2드램들이 바이알에 첨가하였다.

<906> 별개의 바이알에서 4'-아미노메틸 플루오레세인(AMF) 6.6mg(1.7μ몰)을 탈이온수 0.5㎖에 용해시켰다. 트리에틸아민 2방울을 첨가하여 pH 9로 조정하였다.

<907> 제 3 의 바이알에서, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드(EDAC) 63.8mg를 탈이온수 1㎖에 용해시켰다.

<908> AMF 용액을 교반중인 덴드리머 용액에 실온에서 1 내지 2분에 걸쳐 첨가하였다. 1N 염산을 사용하여, 덴드리머-AMF 용액의 pH를 4.5 내지 5.5로 조정하였다. 용액은 투명한 채로 남아 있었다. 교반을 계속하면서, 혼합물에 EDAC 용액을 1시간에 걸쳐 15 내지 20분의 간격을 두고 200 내지 300㎕ 증가시키면서 첨가하였다. 반응 혼합물의 pH를 1N 염산을 사용하여 4.5 내지 5.5로 유지시켰다. 반응 혼합물을 빛으로부터 차단시키고, 실온에서 15 내지 20시간동안 교반하였다. 용액은 투명하고 오렌지색이었다.

<909> 교반한 후, 이 반응 혼합물을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 10,000달톤)에 넣고, 한외여과시켜 반응하지 않은 AMF를 제거하였다. 이 과정동안 0.1M 포스페이트 완충액(pH=9.0) 2㎖를 15회 첨가하였다. 콘쥬게이트화된 G5.5 PAMAM 덴드리머/AMF 약 2㎖를 회수하였다.

<910> 실시예 35: 3.0세대 PAMAM/이사토산 무수물 콘쥬게이트의 제조

<911> 3.0세대 PAMAM 2g을 메탄올에 용해시키고, 얼음욕 중에서 냉각시켰다. 이 용액에 이사토산 무수물 0.01g을 첨가하였다. 이 혼합물을 2시간동안 교반시키고, 얼음욕을 실온으로 가온시킨 후, 수일동안 계속 교반하였다. 그 다음, 메탄올을 회전 증발기에 의해 제거하고, 생성물을 물에 흡수시켰다. 이어서, 이 용액을 스펙타포르 #1 멤브레인을 사용하여 투석시켰다. 그 다음, 용액을 38㎖로 농축시키고, 340nm에서 조사한 후 420nm에서 검출함으로써 그의 형광 스펙트럼을 측정하였다. 형광성은 10,000배 희석한 후에도 여전히 검출되었으며, 이 반응은 100 내지 1,000배 희석 범위에서 1차적이었다.

<912> 실시예 36: 4.0세대 PAMAM 덴드리머/DTPA/Gd 콘쥬게이트의 제조

<913> A: 메틸 에스테르 말단의 4.0세대 PAMAM 덴드리머의 제조

<914> 메틸 아크릴레이트 및 에틸렌디아민의 연속반응에 의해 메틸 에스테르 말단의 3.5세대 PAMAM 덴드리머를 제조하였다. 그 다음, 미리 증류시킨 에틸렌디아민 1,000g에 메틸 에스테르 말단의 3.0세대 PAMAM 덴드리머 약 5g을 메탄올 중 15중량% 용액으로서 첨가하였다. 이 용액을 실온에서 48시간동안 정치시켰다. 메탄올 및 대부분의 과량의 에틸렌디아민을 회전 증발기에 의해 진공하에 60℃ 미만에서 제거하였다. 총 약 7.5g의 생성물을 회수하였다. 포획된 에틸렌디아민을 제거하기 위하여, 생성물을 메탄올 100㎖에 용해시키고 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 2,000달톤)을 한외여과시켰다. 대부분의 용액이 멤브레인을 통과하였을 때, 메탄올 몇 부를 추가로 첨가하고, 한외여과 과정을 반복하였다. 잔류액을 환저 플라스크에 옮기고 여과기 컵을 메탄올로 반복하여 세정한 후, 상기 잔류액과 합하였다. 회전 증발기에서 잔류 용액으로부터 휘발성 용매를 진공하에 제거하였다. 4.0세대 PAMAM(분자량 5,147달톤, 24개 말단기) 약 6g을 회수하였다.

<915> B: 4.0세대 PAMAM 덴드리머/DTPA 무수물 콘쥬게이트의 제조

<916> 물 300㎖ 중의 PAMAM(4g, 7.6×10^{-4}몰) 용액을 3구 플라스크에서 교반하였다. 그 후, N^3-(2.6-디옥소모폴리노에틸)-N^6-에톡시카보닐 메틸-3,6-디아자옥탄 이산(DTPA 무수물)의 고체형 29g(72×10^{-3}몰)을 소량씩 첨가하였다. 첨가하는 동안, 1N 수산화나트륨 수용액을 첨가하여 pH를 8.8 내지 9.2로 유지시켰다. 첨가를 완료하면, 추가의 30분동안 용액을 교반하였다. 이온교환 수지(H' 형태)를 첨가하여 용액의 pH를 pH 7로 조정하고, 얻어지는 슬러리를 흡입에 의해 여과하여 이온교환 수지를 제거하였다. 이 여액을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 5,000달톤)에 옮기고 한외여과시켰다. 여액을 수획하고, 동결-건조시켰다. 무색 박편의 분말 약 12g을 수득하였다. 생성물은 각 말단이 아미드 결합을 통해 DTPA의 카복실기 중 하나에 연결된 폴리아미도아민(24개의 말단 아미노기)이었다.

<917> C: 4.0세대 PAMAM 덴드리머/DTPA/Gd 콘쥬게이트의 제조

<918> 상기 기술한 킬레이트화제 약 10g을 물 600㎖에 용해시키고, Gd_2O_3 2.8g과 혼합시켰다. 이 슬러리를 80℃에서 약 90분동안 교반하였다. 실온으로 냉각한 후, 용액의 pH는 이온교환 수지를 첨가하여 pH 7로 조정하였다. 얻어지는 슬려리를 흡입에 의해 여과하여 이온교환 수지를 제거하였다. 이 여액을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 5,000달톤)에 넣고 한외여과시켰다. 여액을 수획하고, 동결-건조시켰다. 원자흡수 분광분석에 의해 Gd를 함유하는 것으로 밝혀진, 무색의 박편상 동결건조물 약 12g을 수득하였다.

<919> 실시예 37: 3.0세대 아미노 말단의 덴드리머/DTPA/Gd 콘쥬게이트의 제조

<920> A: 3.0세대 하이드록시 말단의 덴드리머의 제조

<921> 제 3.0세대 하이드록시 말단의 덴드리머를, 토말리아 등의 미국 특허 제 4,587,329 호의 실시예 11에 기술된 대로, 펜타에리트리틸테트라브로마이드 및 4-하이드록시메틸-2,6,7-트리옥사비사이클로[2.2.2]-옥탄으로부터 제조하였다. 미국 특허 제 4,587,329 호의 실시예 11의 C 단계의 과정에 따라, 제 2세대 하이드록시-말단의 폴리에테르 덴드리머를 상응하는 퍼브로마이드로 전환시켰다. 그 다음, 상기 실시예의 A 및 B 단계의 과정에 따라, C 단계의 브롬화 유도체를 먼저 4-하이드록시메틸-2,6,7-트리옥사비사이클로[2.2.2]-옥탄과 반응시킨 후, 물로 탈차폐시켜, 원하는 제 3 세대 덴드리머를 제조하였다.

<922> B: 3.0세대 클로라이드 말단의 덴드리머의 제조

<923> 교반기 응축기 및 첨가 깔대기가 설치된, 500㎖들이 3구 플라스크에 A 부분에서 제조한 제 3 세대 덴드리머 0.1몰을 투입하고, 새로 증류한 티오닐 클로라이드 15몰을 45℃ 미만의 온도가 유지되는 속도로 첨가한다. 첨가가 완료되면, 용액을 약 50℃로 가온시키고, 이 온도에서 약 4시간동안 유지시킨다. 과량의 티오닐 클로라이드를 진공하에 제거한다. 이 과정에 의해, 하이드록시기를 클로라이드 잔기로 전환시킨다.

<924> C: 3.0세대 아미노말단의 덴드리머의 제조

<925> B 부분에서 제조한 클로라이드 말단의 덴드리머를 큰 폴리올레핀 병에 옮기고, 매우 과량의 수산화암모늄 용액을 첨가하였다. 병을 밀봉하고, 내용물을 약 55℃에서 수일동안 보관하였다. 용액은 잔류 오일을 형성하고, 이를 작은 용적의 물에 재용해시키고, 중탄산나트륨을 첨가하여 pH를 8로 조정한 후, 원하는 아민을 클로로포름으로 추출하였다. 이 클로로포름 추출액을 무수 황산마그네슘상에서 건조시키고, 여과한 후, 잔류 오일로 농축시켰다. 이 과정에 의해, 클로라이드 말단의 덴드리머를 아미노 말단의 덴드리머로 전환시켰다.

<926> D: 3.0세대 아미노 말단의 덴드리머의 제조

<927> 또 다르게는, A 부분에서 제조한 하이드록시 말단의 덴드리머를 디메틸포름아미드에 용해시키고, 과량의 메탄설포닐 클로라이드와 반응시켰다. 디메틸포름아미드 용액을 물로 희석하고, 클로로포름으로 추출하여, 생성되는 토실레이트 에스테르를 단리하였다. 클로로포름 추출액을 묽은 중탄산나트륨 용액 및 물로 세척한 후, 무수 황산마그네슘상에서 건조시켰다. 여과하여 고체를 제거한 후, 여액을 농축시켜 건조시켰다. 더 이상 정제하지 않고 사용되는, 원하는 폴리메탄설포네이트 에스테르인 잔류 오일을 큰 폴리올레핀 병에 옮기고, 매우 과량의 수산화 암모늄 용액을 첨가하였다. 병을 밀봉하고, 내용물을 약 55℃에서 수일동안 보관하였다. 아미노-말단의 덴드리머를 C 부분에서 상기 기술한대로 단리하였다.

<928> E: 3.0세대 아미노 말단의 덴드리머/DTPA 콘쥬게이트의 제조

<929> 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA)과 이소부틸 클로로포르메이트의 반응에 의해 DTPA의 혼합 무수물을 제조하였다. 무수물(1 몰)을 디메틸포름아미드에 용해시키고, 이 용액을 같은 용매 내의 아민-말단의 덴드리머(C 또는 D 부분의)의 용액에 첨가하였다. 이 용액에, 염기성 환경을 유지시키기 위해 필요한 2,6-루티딘을 첨가하였다. 이 방법에 의하여, 덴드리머의 아미노 말단과 DTPA의 카복실 말단사이에 공유결합이 형성되었다.

<930> F: 3.0세대 아미노 말단의 덴드리머/DTPA 콘쥬게이트의 제조

<931> 또 다르게는, 아민-말단의 덴드리머(C 또는 D 부분의) 1밀리몰을 물 300㎖에 용해시켰다. 2시간 내에, N^3-(2,6-디옥소모폴리노에틸)-N^6-에톡시카보닐메틸-3,6-디아자옥탄 이산의 고체형 150밀리몰을 소량씩 용액에 첨가하였다. 1N 수산화나트륨을 첨가하여 pH를 약 9.0으로 유지시켰다. 용액을 추가의 30분동안 교반하고, 이온교환 수지(H' 형태)를 첨가하여 pH 7로 조정한 후, 여과하여 이온교환 수지를 제거하였다. 이 용액을 2개의 센트리콘™ 마이크로농축기 관(분자량 차단: 5,000달톤)에 넣고 한외여과시켰다. 여액을 수획하고, 동결-건조시켰다. 무색의 박편상 분말로서 DTPA-콘쥬게이트화된 덴드리머를 수득하였다.

<932> G: 3.0세대 아미노 말단의 덴드리머/DTPA/Gd 콘쥬게이트의 제조

<933> 주사용으로 DTPA-콘쥬게이트화된 덴드리머 약 10g을 물 600㎖에 용해시키고, Gd_2O_3 약 3g과 혼합시켰다. 이 슬러리를 80℃에서 약 90분동안 교반하였다. 냉각한 후, 이온교환 수지를 첨가하여 pH 7로 조정하였다. 이 용액을 여과시켜 수지를 제거한 후, 상기 기술한 대로 한외여과시켰다. 이 여액을 수획하여, 동결-건조시켰다. Gd/DTPA-콘쥬게이트화된 덴드리머를, 원자흡수 분광분석 결과 Gd를 함유하는 무색의 박편상 동결건조물로서 수득하였다.

<934> 실시예 38: 덴드리머내의 0가의 니켈

<935> 1% $NiCl_2$(수성) 10g에 0.5세대 디에틸렌트리아민(DETA) 코어 스타버스트™ 덴드리머(Na-염 형태) 177㎎을 첨가하였다. 용액은 담청색으로 변하였다. 이 용액에 28% 수성 수산화암모늄 0.5㎖를 첨가하면, 용액은 더욱 진한 청색으로 변하였다. 용액에 2.78% 수성 차아인산나트륨 12g을 첨가한 후, 가열하여 비등시켜, 청색의 상청액 용액과 함께 니켈 금속의 침전물을 수득하였다. 상청액을 진공하에 농축시켜, 금속화된 덴드리머를 과량의 아인산염(0.6)과의 혼합물로서 수득하였다. 중공 섬유 여과 장치(더 다우 케미칼 캄파니(The Dow Chemical Company)제품)상에서 한외여과시켜 정제를 수행하였다. (덴드리머를 첨가하지 않은 것만을 제외하고는 상기와 같은 과정을 수행한, 대조군의 반응 결과, 비등한 후, 니켈 금속이 완전히 침전한 무색의 용액을 추측하였다)

<936> 실시예 39: 덴드리머 내의 0가 니켈

<937> 1% 수성 $NiCl_2$ 10g에 1.5세대의 선형 폴리에틸렌이민(PEI) 코어 스타버스트™ 덴드리머(카복실산 나트륨 형태) 270㎎을 첨가하였다. 이 용액은 대조군 혼합물(스타버스트™가 첨가되지 않음)보다 진한 녹색으로 변하였다. 진한 수산화암모늄 0.5㎖를 첨가한 후 대조군은 청색이었고, 스타버스트™를 함유하는 용액은 여전히 녹색이었다. 2.78% 수성 차아인산나트륨 12g을 첨가하고, 가열하여 비등시키면, 대조군에서, 흑색의 니켈 금속의 침전이 일어나고, 무색의 용액을 수득하였다. 스타버스트™ 함유 용액은 동일한

조건하에 담녹색의 현탁액을 제공하였다. 담녹색의 현탁액을 원심분리시켜 소량의 고체(50mg)를 제거하고, 진공하에 농축시켜 담녹색의 분말 500mg을 수득하였다. 아미콘 YM2 멤브레인을 사용하여 금속화된 덴드리머 및 포스파이트의 상기 혼합물의 수용액을, 여액에 녹색이 더 이상 보이지 않을 때까지 계속 한외여과시켰다. 녹색의 잔류물 용액을 진공하에 농축시켜, 진녹색의 유리질 약 100mg을 수득하였다.

<938> 실시예 40: 에폭시옥탄 개질된 5.0세대 PAMAM 덴드리머의 제조

<939> 5.0세대 PAMAM 덴드리머 0.30g(2.7밀리당량)을 메탄올 10㎖에 용해시켰다. 에폭시옥탄 0.5g(알드리치사 제품, 3.9밀리몰)을 상기 용액에 첨가하였다. 그 다음, 용액을 40℃의 오일욕 중에서 3일동안 가열시켰다. 진공하에 증류시켜 용매를 제거한 후, 고진공하에 실온에서 잔사로부터 휘발성 물질을 제거하여, 개질된 덴드리머 0.60g(이론치의 93%)을 무색의 오일로서 수득하였다. ^{13}C 및 ^{1}H NMR 스펙트럼을 보면, 에폭시옥탄이 표면에 결합한 것으로 나타나며, 에폭시옥탄 덴드리머의 회합상태에 일치한다.

<940> 2.0, 3.0, 4.0, 6.0 또는 7.0세대 PAMAM 덴드리머를 사용하여 상기 과정을 반복하면, 상응하는 콘쥬게이트가 형성되었다.

<941> 실시예 41: 아브시스산 개질된 4.5세대 PAMAM 덴드리머의 제조

<942> 4.5세대 PAMAM 덴드리머의 수용액을 NaOH/MeOH(1mM, 10㎖)에 의해 가수분해시키고, NaOH/HCl에 의해 pH 11로 조정하였다. 이 용액에 매우 과량의 고체 아브시스산을 첨가하였다. 이 용액을 실온에서 세게 교반하였다. 1, 2, 6 및 24시간이 지난 후, 이 용액 500㎕를 제거하여 에펜도르프 시험관(1.5㎖들이 마이크로원심분리 시험관)에 넣고, 15,000rpm에서 1분동안 원심분리시켜 용해되지 않은 아브시스산을 제거하였다. 아브시스산 농도는 상청액의 흡광도(λ=260nm, ε=19400)로 부터 계산하였다.

<943> 상이한 세대의 PAMAM 덴드리머를 사용하여, 상기 과정을 반복하면, 세대가 증가할수록, 더욱 많은 아브시스산이 용해되었다. 5 및 6세대 덴드리머는 4세대의 덴드리머보다 상기 산을 더욱 많이 용해시켰다. pH 7에서, 단지 0.004M의 아비시스산이 물 및 β-CD 용액에 용해되는 반면 덴드리머 용액은 0.02 내지 0.08M 용해되었다. 반-세대의 덴드리머는 완전한 세대의 경우와 같은 양의 산이 용해되었다. 따라서, 아브시스산은 덴드리머 내부에 흡수된 것으로 생각된다.

<944> 상기 과정에 니페디핀(ε=8300, 클로로포름내)을 사용할 경우, 니페디핀은 물에 용해될 때까지 장시간이 걸리지만, 한번 용해되면, 덴드리머내로 매우 신속하게 흡수되었다.

<945> 덴드리머-덱스트란 형질감염의 계획안

<946> 형질감염의 계획안은 기본적으로 다음과 같다.

<947> 1일째: 6-웰 플레이트에 웰당 약 200,000세포를 접종한다(생육 특징에 따라 다름).

<948> 2일째: 단계 1: 하기의 용액을 제조한다:

<949> A. 덴드리머 희석 완충액

<950> 20mM HEPES(pH 7.9)

<951> 100mM KCl

<952> 0.2mM EDTA

<953> 0.5mM DTT

<954> 20%(v/v) 글리세롤

<955> B. 10×결합 완충액

<956> 10mM EDTA

<957> 40%(v/v) 글리세롤

<958> 50mM DTT

<959> 100mM TRIS HCl(pH 7.5)

<960> 1000mM NaCl

<961> 혼합하고 여과기 살균함

<962> C. 용액 1(일부 실시예에서 사용함)

<963> DEAE-덱스트란(파마시아 또는 시그마 케미칼) 25mg

<964> 1M TRIS(pH 7.4) 5.0㎖

<965> 무혈청 DMEM 95㎖

<966> 37℃ 쉐이커에서 30분동안 혼합하고, 여과기 살균함(각 웰 당 1㎖의 용액 1이 필요함)

<967> D. 용액 2(일부 실시예에 사용됨)

<968> PBS(pH 7.4) 중 10% DMSO

<969> 혼합하고, 여과기 살균함(각 웰 당 2㎖의 용액 2가 필요함).

<970> 단계 2: 하기와 같이 DNA/덴드리머 착체를 제조한다(각 웰 당 20㎕의 착체가 필요함):

<971> 적당한 용적의 10×결합 완충액 및 H_2O를 멸균 에펜도르프™ 시험관에 위치시킨다.

<972> 희석시킨 덴드리머에 이어 DNA를 첨가한다.

<973> (가능하다면, 진한 덴드리머 원액을 메탄올이 없는 물에 현탁시켜야 한다. 희석 완충액에 덴드리머를 희석시켜 약 10×최종농도로 되게 한 후, 결합 완충액에 첨가한다. 혼합하면 즉시 착체가 형성되는 것으로 보이지만, 이 혼합물을 3 내지 15분동안 정치시켜 착체를 형성시켜야 한다.)

<974> DNA/덴드리머 착체화 실시예: RSV-luc DNA 및 G10(EDA) 덴드리머

<975> 7.2kb의 RSV-luc 플라스미드 DNA는 ㎍당 1.71×10^{15} (-)전하를 갖는다. G10(EDA) 덴드리머는 ㎍당 2.64×10^{15}(+) 전하를 갖는다. 그러므로, 1:10의 전하비는 DNA 1㎍ 대 덴드리머 6.5㎍의 비를 필요로 한다. 원료 G10(EDA)는 236.4㎍/㎕의 농도이다. 희석 완충액내에 1:364로 희석시켜, 0.65㎍/㎕를 얻는다. 착체 20㎕(6-웰 플레이트내에서 한 웰의 세포내로 DNA 1㎍을 형질감염시키기에 충분한)를 제조하기 위하여, 10×결합 완충액 2㎕, 멸균 H_2O 7㎕, 희석된 덴드리머 10㎕ 및 DNA(1㎍/㎕) 1㎕를 혼합한다. 1개보다 많은 웰이 형질감염되거나 또는 다량의 DNA가 사용되는 경우에는, 같은 분량의 결합 완충액, 덴드리머 및 DNA를 사용하여 많은 용적의 DNA를 간단히 제조한다.

<976> 단계 3: 세포를 무혈청 매질 2㎖로 2회 세척한다.

<977> 단계 4: 각 웰에 1㎖의 용액 1을 첨가한다.

<978> 단계 5: 각 웰에 DNA/덴드리머 착체 20㎕를 첨가한다. 플레이트를 서서히 흔들어 주어 혼합한다.

<979> 단계 6: 37℃에서 3시간동안 배양한다.

<980> 단계 7: 무혈청 DMEM 2㎖로 1회 세척한다.

<981> 단계 8: 웰 당 2㎖의 용액 2로 2분동안 세포에 충격을 준다.

<982> 단계 9: 세포를 무혈청 DMEM 2㎖로 2회 세척한다.

<983> 단계 10: 매질을 5% 혈청을 함유하는 DMEM로 대체한다.

<984> 37℃에서 밤새 배양한다.

<985> 3일째: 하기의 용액을 제조한다.

<986> 용액 4 배양세포 용해(1×) 시약

<987> 25mM TRIS-포스페이트(pH 7.8)

<988> DTT 2㎖

<989> 2mM 1,2-디아미노사이클로헥산-N,N,N',N'-테트라아세트산

<990> 10% 글리세롤

<991> 1% 트리톤(Triton) X-100

<992> 용액 5 루시페라제 측정 시약

<993> 2mM TRIS 글리신

<994> 1.07mM $(MgCO_3)Mg(OH)_2\cdot5H_2O$

<995> 2.67mM $MgSO_4$

<996> 0.1mM EDTA

<997> 33.3mM DTT

<998> 270μM 보효소 A

<999> 40 μM 루시페린™

<1000> 530μM ATP; 최종 pH를 7.8로 조정함

<1001> 단계 1: 세포를 1×PBS(pH 7.4, Mg^{++}, Ca^{++}이 없는) 2㎖로 2회 세정한다.

<1002> 단계 2: 각 웰에 용액 4를 200㎕씩 첨가하고, 27℃에서 15분동안 정치시킨다.

<1003> 단계 3: 세포를 문질러 벗겨 내어 에펜도르프™ 시험관에 수득한다.

<1004> 단계 4: 각 세포 용해물의 단백질 농도를 결정한다.

<1005> 단계 5: 에펜도르프™ 시험관에 각 세포 용해를 20㎕ 이하를 분취한다.

<1006> 단계 6: 용액 5를 80㎕ 첨가하고, 즉시 화학발광성을 측정한다.

<1007> 몇가지 상이한 형태의 유전물질을 실시예에 사용하였다. 달리 나타내지 않는 한, 사용한 DNA는, 레스피라토리 신시셜 바이러스(Respiratory Syncitial Virus, RSV)로부터의 프로모터에 의해 발현되는 루시페라제 효소 유전자를 함유하는 세균 발현 플라스미드(RSV-luc)이었다. 덴드리머에 대한 유전물질의 농도는, 특정 실시예에서 나타낸 대로, 원하는 DNA:덴드리머의 전하비 또는 몰비를 기준으로 하여 결정하였

다. 형질감염 실시예에서, 달리 나타내지 않는 한, 시험 웰당(약 200,000세포) DNA 1㎍이 첨가되기에 충분한 DNA:덴드리머 착체를 사용하였다.

<1008> 대부분의 실시예에서, 조밀 별형 PAMAM 덴드리머를 사용한다. 따라서, 코어와 마찬가지로 세대 및 덴드리머의 직경이 달라지고, 몇몇 경우에서는 표면 작용성도 그러하다.

<1009> 몇 가지 상이한 세포주는 성공적으로 형질감염되었다. 실시예에서 달리 나타내지 않는 한, RAT2 세포를 형질감염시킨다.

<1010> DEAE-덱스트란을 실시예에 사용할 때, 달리 나타내지 않는 한, 농도는 0.5μM이다. 또한, 달리 나타내지 않는 한, 사용된 DNA:덴드리머 착체내의 DNA 양은 시험 웰 당 1.0㎍이다.

<1011> 전기영동

<1012> 전기영동에 사용된 아가로스 겔을 양극이 겔의 상부에 위치하고(도면에 보이는 대로), 음극이 겔의 하부에 위치하는(도면에 보이는 대로) 전장에 위치시킨다. DNA에 결합하여 형광을 발하는, 에티듐 브로마이드로 겔을 염색시키면, DNA가 겔에서 이동한 정도를 알 수 있다. 몇몇 실시예에서, 레인은 겔 플레이트의 상부 및 그의 중간에서 출발하여, 각 경우에서 도면의 하부를 향하여 이동해 간다. DNA의 착체화 및 전하의 중화는 음극으로의 이동이 지연될 때 일어나는 것으로 추정된다.

<1013> 실시예에 사용된 실험 기법은 상기에 기술되지 않은 정도까지 당해 분야의 숙련자에게 공지되어 있으며, 문헌에서 찾을 수 있으므로, 추가로 설명하지 않는다.

<1014> 실시예 42: 유전물질과 덴드리머 콘쥬게이트의 제조 및 실험(제 17 도 내지 제 19 도)

<1015> 상기 일련의 실험에서, 다양한 가지형 증합체를 DNA와 착체화시키고, 다양한 조건하에서 형질감염시켰다. 덴드리머에 착체화된 DNA는 이중 컬럼 세슘 구배 정제된 RSV-luc 플라스미드이었다. DNA 발현 플라스미드의 형질감염 결과, 루시페라제 유전자가 성공적으로 전사 및 번역되었다. 이 결과, 루시페라제 단백질, 루시페린™의 분해를 촉매하는 효소가 생성되며, 측정가능한 빛을 발생한다. 생성된 빛의 정량은 상기 유전자의 형질감염의 성공 정도의 척도이다.

<1016> 시험한 덴드리머는 다음과 같았다:

<1017> A. 분자량(MW)이 약 87,342이고 직경이 약 76Å인, G8(NH_3) 조밀 별형 덴드리머

<1018> B. MW가 약 21,591이고 직경이 약 53Å인, G6(NH_3) 조밀 별형 덴드리머

<1019> C. MW가 약 10.633이고 직경이 약 40Å인, G5(NH_3) 조밀 별형 덴드리머

<1020> D. MW가 약 43,508이고 직경이 약 67Å인, G7(NH_3) 조밀 별형 덴드리머

<1021> E. MW가 약 2,414이고 직경이 약 22Å인, G3(NH_3) 조밀 별형 덴드리머

<1022> F. MW가 약 5,154이고 직경이 약 31Å인, G4(NH_3)조밀 별형 덴드리머

<1023> G. MW가 약 1,044이고 직경이 약 15.8Å인, G2(NH_3) 조밀 별형 덴드리머

<1024> H. MW가 약 359이고 직경이 약 10.4A인, G1(NH_3) 조밀 별형 덴드리머

<1025> I. MW가 약 517이고 직경이 약 14Å인, G1(EDA) 조밀 별형 덴드리머

<1026> J. MW가 약 1,430이고 직경이 약 19Å인, G2(EDA) 조밀 별형 덴드리머

<1027> K. MW가 약 3,256이고 직경이 약 26Å인, G3(EDA) 조밀 별형 덴드리머

<1028> L. MW가 약 6,909이고 직경이 약 36Å인, G4(EDA) 조밀 별형 덴드리머

<1029> M. MW가 약 14,215이고 직경이 약 44Å인, G5(EDA) 조밀 별형 덴드리머

<1030> N. MW가 약 28,826이고 직경이 약 57Å인, G6(EDA) 조밀 별형 덴드리머

<1031> O. MW가 약 58,048이고 직경이 약 72Å인, G7(EDA) 조밀 별형 덴드리머

<1032> P. 하기 백분율의 조밀 별형 덴드리머의 블렌드:

1. G6(NH_3) 58.8%
2. G5(NH_3) 30.5%
3. G2(EDA) 1.86%
4. G2(NH_3) 1.10%
5. G1(EDA) 3.37%
6. G1(NH_3) 4.41%

<1034> Q. 하기 백분율의 조밀 별형 덴드리머의 블렌드:

1. G6(NH_3) 60.0%
2. G5(NH_3) 31 1%
3. G2(EDA) 1.90%
4. G2(NH_3) 1 12%
5. G1(EDA) 1.30%
6. G1(NH_3) 4.50%

<1036> R. G6(NH_3) 부분 분해된 조밀 별형 덴드리머

<1037> S. G7(NH_3) 부분 분해된 조밀 별형 덴드리머

<1038> 이들 덴드리머의 필수 데이타를 하기 표 XII에 기술한다:

[표 XII]

덴드리머	MW	표면 NH_2 기	덴드리머의 최소량[a]	
			DNA 0.5㎍[c]	DNA 1㎍[c]
A	87,342	384	0.1㎍	ND
B	21,591	96	0.1㎍	ND
C	10,633	48	0.1㎍	ND
D	43,508	192	0.1㎍	ND
E	2,414	12	*	0.5㎍
F	5,514	24	*	0.1㎍
G	1,044	6	*	*
H	359	3	*	*
I	517	4	*	*
J	1,430	8	0.5㎍	ND
K	3,256	16	0.1㎍	ND
L	6,909	32	0.1㎍	ND
M	14,215	64	0.1㎍	ND
N	28,826	128	0.1㎍	ND
O	58,048	256	0.1㎍	ND
P	25,951	96	*	0.1㎍
Q	25,951	96	*	0.1㎍
R	b	b	0.001㎎	ND
S	b	b	0.001㎍	ND

* = 결합이 관찰되지 않음
a = DNA를 완전히 착체화시키는 데(DNA의 음극으로의 겔 이동을 완전히 지연시키는 데) 필요한 덴드리머의 최소량
b = 다양한 크기의 혼합물; 정의는 실시예의 선행 페이지를 참조
c = DNA를 완전히 착체화시키는 데 필요한 덴드리머의 최소량
ND = 측정되지 않음

<1040> 표 XII은 세대가 G4 미만의 NH_3 코어(G, H, I)이외의 모든 덴드리머가 DNA와 결합하여 착체화하고 전하를 중화시킬 수 있음을 나타낸다.

<1041> DNA와 착체를 이룬 덴드리머가 형질감염에 유용한지의 여부를 결정하기 위하여, 다양한 조건하에 실험을 수행하였다.

<1042> 제 17 도는 RAT2 세포내로의 샘플의 형질감염 결과를, 하기 표 XIII에 나타낸 대로, 1 내지 18의 번호가 붙은 상이한 각 조건에 대하여 세포내 단백질 ㎍당 측정된 광 단위로 나타낸다:

<1043> [표 XIII]

샘플 번호	덴드리머 또는 대조군	전하비 DNA:덴드리머	조 건
1	D	1 0.7	a
2	S	1 0.7	a
3	Q	1 : 0.8	a
4	D	1 : 3.3	a
5	S	1 3.3	a
6*	형질감염되지 않은 RAT2	NA	a
7	D	1 . 0.7	b
8	S	1 : 0.7	b
9	Q	1 : 0.8	b
10	D	1 : 3.3	b
11	S	1 : 3.3	b
12*	덱스트란 단독	NA	b
13	D	1 : 0.7	c
14	S	1 : 0.7	c
15	Q	1 : 0.8	c
16	D	1 : 3.3	c
17	S	1 3.3	c
18*	RSV+ hsDNA-덱스트란	NA	c

* = 대조군

NA = 적용불가

a = DNA와 덴드리머를 결합 완충액내에서 착체화시키고, DMEM 내에서 형질감염시킴

b = DNA와 덴드리머를 HBS내에서 착체화시키고, DMEM내에서 형질감염시킴

c = DNA와 덴드리머를 결합 완충액내에서 착체화시키고, DEAE-덱스트란내에서 형질감염시킴

<1045> 샘플 6, 12 및 18은 대조군이다. 샘플 6은 형질감염되지 않은 RAT2 세포이다. 샘플 12는 샘플 2과 유사하나, DEAE-덱스트란을 첨가하였다. 샘플 18에서는, DEAE-덱스트란의 존재하에 벡터 및 청어 정자 DNA를 사용하여 형질감염을 시도한다. 표 XIII의 데이터는 G8 미만의 세대의 덴드리머는, DNA:덴드리머 착체가 DEAE-덱스트란내에 있지 않으면, 형질감염을 매개하지 않음을 나타낸다.

<1046> 광범위한 DNA:덴드리머 전하비를 사용하는 상기 결과를 확인하기 위하여, 제 18 도에 예시한 실험을 수행하였다. 시험 변수를 이하의 표 XIV에 나타낸다:

<1047> [표 XIV]

샘플 번호	덴드리머 또는 대조군	전하비 DNA:덴드리머	조 건
1	D	1 : 14.6	c
2	D	1 3.3	c
3	D	1 : 1.2	c
4	D	1 : 0.6	c
5	D	1 : 0.3	c
6	D	1 : 0.15	c
7	S	1 : 14.6	c
8	S	1 3.3	c
9	S	1 1.2	c
10	S	1 : 0.6	c
11	S	1 : 0.3	c
12	S	1 : 0.15	c
13	D	1 : 14.6	b
14	D	1 3.3	b
15	D	1 0.6	b
16	S	1 : 14.6	b
17	S	1 3.3	b
18	S	1 : 0.6	b
19	D	1 0.03	c
20	S	1 0.03	c
21	RSV 덱스트란*	NA	NA
22	RSV+ hsDNA덱스트란*	NA	NA
23	덱스트란 단독*	NA	NA
24	HBS 단독*	NA	NA

* = 대조군

NA = 적용할 수 없음

b = DNA와 덴드리머를 HBS내에서 착체화시키고, DMEM내에서 형질감염시킴

c = DNA와 덴드리머를 결합 완충액내에서 착체화시키고, DEAE-덱스트란내에서 형질감염시킴

<1049> 21 내지 24의 대조군은 각각 DEAE-덱스트란 중 벡터, DEAE-덱스트란 중 벡터 및 청어 정자 DNA, DEAE-덱스트란 및 HBS를 포함한다.

<1050> 이 결과는, 놀랍게도 DEAE-덱스트란의 존재하에서 DNA-덴드리머 착체가 세포의 형질감염에 더욱 효과적임을 나타낸다. 이는 또한 아미노(양전하) 표면 작용성을 갖는 순수한 덴드리머에 있어서, 과량의 덴드리머 양전하를 갖는 착체만이 효율적으로 형질감염시킬 수 있음을 제시한다(제 18 도의 4번 레인을 참조).

<1051> 광범위한 스펙트럼의 상이한 덴드리머의 형질감염 능력을 제 19도에 나타낸다(A 내지 S). DEAE-덱스트란의 존재하에 상이한 덴드리머(A 내지 S)와 착체를 이룬 DNA로 형질감염된 세포로부터 얻은, 단백질 ㎍당 상대적 광단위의 막대 그래프가 제시되어 있다. 3가지의 상이한 DNA 대 덴드리머의 전하비를 사용하였다: 1:2, 1:10 및 1:20(2번씩). 따라서, 제 19 도의 각 덴드리머 A 내지 S에 대하여 6개의 막대가 존재하며 처음 2개는 1:2의 DNA:덴드리머 전하비에서의 형질감염을 나타내고, 두번째의 쌍은 1:10, 세번째의 쌍은 1:20에서의 형질감염을 나타낸다. 대조군(RSV_a)은 DEAE-덱스트란의 존재하에 수행된 플라스미드 DNA의 형질감염을 포함한다. 다양한 DNA:덴드리머 비에서, 성공적인 형질감염, 전사 및 번역은 사용된 특정 유형의 덴드리머에 따라 달라진다는 것을 알 수 있다.

<1052> 실시예 43: DEAE-덱스트란의 존재하 및 부재하에서의 DNA:덴드리머 착체의 전자현미경 검사(제 60 도, 패널 3, 4 및 5)

<1053> DNA:덴드리머 착체를 형성시킨 후, DEAE-덱스트란 또는 다른 약제를 첨가하는 것은 독특한 방식으로 형질감염을 증진시키는 데 효과적인 것으로 나타났다. 비특이적인 형질감염을 바꾸는 데 있어서의 이들 약제의 역할을 더 이해하기 위하여, DEAE-덱스트란의 존재하 및 부재하에 DNA:덴드리머 착체에 대하

여 전자현미경 사진을 제작하였다. 본 실시예에서, DNA는 제 60도의 아래에 나타낸 대로 덴드리머와 착체를 이루었다.

<1054> 패널 3 - 전하비 1:10의, DNA:덴드리머 G11(EDA) 덴드리머

<1055> 패널 4 - DEAE-덱스트란 0.5μM중의, DNA:덴드리머 G11(EDA) 덴드리머

<1056> 패널 5 - 전하비 1:10의, 덴드리머의 다분산성 혼합물(화합물 B)과 착체를 이룬 DNA

<1057> 제 60 도에서, 패널 3, 4 및 5는 DNA:덴드리머 착체의 전자현미경 사진을 나타낸다. DNA는 1mM TRIS(pH 7.8)내에서 DNA:덴드리머 전하비 1:10으로 G11(EDA) 덴드리머와 착체를 형성하였다. 이 조건에서, 전자현미경 검사 결과, DNA 덴드리머 착체는 덴드리머 단독의 경우에서는 관찰되지 않는 불규칙한 회합물을 형성하는 것으로 밝혀졌다(제 60 도, 패널 3). DEAE-덱스트란을 0.5μM의 최종 농도로 첨가하면 DNA:덴드리머 착체의 크기가 매우 감소되었다(제 60 도, 패널 4). DNA가 1:10의 전하비로 덴드리머의 다분산성 혼합물(예컨대, 화합물 B로서 기재)과 착체를 형성하는 경우, 더욱 작은 착체(또한 큰 회합물이 전혀 없음)가 나타났다. 이 결과는 이들 약제가 형질감염을 중진시키는 이유에 대한 근거를 제공한다. 임의의 이론에 결부되는 것을 바라지 않지만, 상기 약제로 얻어지는 더욱 작은 크기의 착체가 세포에 접근하여 형질감염시키기가 더욱 쉬울 듯 하다.

<1058> 실시예 44: 상이한 DNA:덴드리머 전하비에서 표면 치환되거나 치환되지 않은 덴드리머의 DNA 결합 및 형질감염 능력의 비교(제 12 도 및 제 13 도)

<1059> 형질감염 효율에 대한 덴드리머의 표면 전하 감소의 효과를 결정하기 위하여, 하기의 실험을 수행하였다. DNA-덴드리머 착체를 아래의 표 XV에 기재된 다양한 덴드리머의 경우에 나타낸 전하비로 제조하였다. 상기한 바와 같이, "G" 수는 덴드리머의 세대를 나타내고; "NH_3" 또는 "EDA" 표시는 덴드리머 코어를 나타낸다. 치환된 덴드리머는 제 12 도의 샘플 26 내지 31 및 제 13 도의 레인 26 내지 31로 나타낸다. 치환된 덴드리머는 아크릴산과의 반응에 의해 개질된 양의 표면 전하의 아민을 함유하였다. 그러므로, 이들 치환된 덴드리머에서, 표면 아미노기의 수는 감소한다. 따라서, 25% 치환된 G6(NH_3) 덴드리머는 이론적으로 그의 표면 아미노기의 25%가 아크릴산의 카복실산과 반응하였다. 100% 치환된 G6 덴드리머에서, 각 표면 아미노기는 카복실기 하나와 반응하였다. 그러므로, 음으로 하전된 DNA와 상호작용하는데 이용가능한, 상기 덴드리머의 작용성 양전하가 감소한다. 표 XV의 항목 1 및 32는 "플라스미드 대조군" 또는 다른 말로 DNA 단독이다.

<1060> [표 XV]

레인 번호	세대 및 코어	DNA:덴드리머 전하비
1	플라스미드 단독	대조군
2	G5(NH_3)	1 : 1
3	G5(NH_3)	1 : 5
4	G5(NH_3)	1 10
5	G5(EDA)	1 1
6	G5(EDA)	1 : 5
7	G5(EDA)	1 : 10
8	G6(NH_3)	1 1
9	G6(NH_3)	1 : 5
10	G6(NH_3)	1 : 10
11	G6(EDA)	1 1
12	G6(EDA)	1 : 5
13	G6(EDA)	1 10
14	G7(NH_3)	1 : 1
15	G7(NH_3)	1 : 5
16	G7(NH_3)	1 10
17	G7(EDA)	1 : 1
18	G7(EDA)	1 : 5
19	G7(EDA)	1 10
20	G4(NH_3)	1 : 1
21	G4(NH_3)	1 5
22	G4(NH_3)	1 : 10
23	G4(EDA)	1 1
24	G4(EDA)	1 : 5
25	G4(EDA)	1 : 10
26	G6(NH_3)[a]	1 1
27	G6(NH_3)[a]	1 : 5
28	G6(NH_3)[a]	1 : 10
29	G6(NH_3)[b]	N.A.
30	G6(NH_3)[b]	N.A.
31	G6(NH_3)[b]	N.A
32	플라스미드 단독	대조군

a = 25% 치환됨

b = 100% 치환됨

N.A. = 적용불가; 100% 치환된 덴드리머를 25% 치환된 덴드리머와 동일한 양으로 혼합시켰음.

<1062> 상기 기술한 덴드리머 형질감염의 계획안에 따라, 용액내 DNA:덴드리머 착체의 샘플을 0.5μM 농도의 DEAE-덱스트란의 존재하에 형질감염시킬 세포에 첨가하였다. 제 12 도에서 볼 수 있듯이, G6 덴드리머가 더욱 효과적인 것으로 나타난다(컬럼 8 내지 19 및 컬럼 2 내지 7 및 컬럼 20 내지 25를 비교함). 덴드리머의 표면이 음의 작용기로 25% 치환되었을 경우, DNA 대 덴드리머의 전하비를 낮추는 것이 필요하다.

<1063> 표 XV에 기재된, 가지형 착체 및 대조군 샘플 1 내지 32를 전기영동시키기 위하여 아가로스 겔에 위치시켰다(제 13 도를 참조). 레인 1 및 32는 DNA만이 겔을 통하여 이동하는 정도를 나타낸다(제 13 도). 레인 2 내지 28은 이동하지 않는데, 이는 DNA가 덴드리머와 착체를 이루기 때문에 겔을 통한 이동이 지연됨을 나타낸다. 그러나, 가지형 중합체가 감소된 양전하 작용성을 갖는, 레인 29 내지 31에서는 이동이 관찰되었다. 낮은 DNA:덴드리머 비에서는 지연이 관찰되기 때문에, 100% 치환된 덴드리머에서도 일부 잔여 양전하 활성을 볼 수 있다(레인 30 내지 31). 제 12도 및 제 13도의 결과로부터, 덴드리머 표면의 양전하 밀도가 DNA 결합, 착체화 및 형질감염에 중요했음을 알 수 있다.

<1064> 실시예 45: DEAE-덱스트란 대조군과 비교한, 덴드리머 세대의 함수로서의 DNA 형질감염 효율의 증가(제 14 도)

<1065> 이 실시예에서는, G2 내지 G8(NH_3) 덴드리머 및 G3 내지 G11(EDA) 덴드리머를 사용하여 DNA와 덴드리머의 착체를 제조하였다. DEAE-덱스트란의 존재하에 DNA를 RAT2 세포에 형질감염시키는 이들의 능력을 단독의 DNA 및 단독의 DEAE-덱스트란을 사용하여 수행한 형질감염 정도와 비교하였다. DNA/DEAE-덱스트란 대조군과 비교한 각 덴드리머의 형질감염 증가율을 제 14 도에 나타낸다. 이 도면은 덴드리머의 세대가 5세대에서 10세대로 증가함에 따라 형질감염 효율이 증가하는 것을 나타낸다. 이는 증가된 표면적 및 덴드리머의 전하가 형질감염의 효율을 증가시킴을 제시한다.

<1066> 실시예 46: DEAE-덱스트란의 부재하에 RAT2 세포에서의 형질감염 효율에 대한 G9 및 G5 덴드리머

의 연속 첨가 효과의 결정(제 15 도 및 제 16 도)

<1067> 이 실시예에서는, 1. DNA를 먼저 G9 덴드리머와 착체화시킨 후, G5 덴드리머를 함유하는 용액을 첨가하거나: 또는 2. DNA를 먼저 G5 덴드리머와 착체화시킨 후, G9 덴드리머를 함유하는 용액을 첨가하였다.

<1068> EDA 코어 덴드리머를 사용하는 경우에 얻는 결과는 제 15 도에 나타내고, 암모니아 코어 덴드리머의 경우에 얻는 결과는 제 16 도에 나타낸다. 제 15 도 및 제 16 도에서, 착체에 첨가한 제 2 의 덴드리머의 농도는 막대 그래프의 가로좌표에 나타낸다. 첫번째 컬럼에서, "0" 농도는 제 2 의 덴드리머를 사용하지 않은 대조군이다.

<1069> 상기 두 경우에 있어서, G9 및 G5 세대를 첨가하여 각각 0.5μM 및 10.0μM 농도를 얻었다. 각 경우에 있어서, G5 덴드리머는 직경이 약 40Å인 반면, G9 덴드리머는 직경이 약 88Å이다. 두 경우에 있어서, 구형의 조밀 별형 덴드리머를 사용한다. G5 DNA:덴드리머 착체에 G9 덴드리머를 첨가하는 경우, 미리 착체화시킨 G9 덴드리머에 G5 덴드리머를 첨가하는 경우에 비하여 실질적으로 매우 우수한 형질감염 결과가 얻어진다. 이는 DNA:덴드리머 착체 형성이 두 단계, 즉 DNA를 착체화 및 축소화시킨 후, 이 착체를 세포에 부착하기 위한 양전하로 "피복"시키는 것을 포함할 수 있음을 나타낸다. 이들 두 단계 중 후자로 인해 큰 직경의 덴드리머가 더욱 큰 표면 전하 밀도를 갖게 되는 것으로 보인다.

<1070> 실시예 47: DNA 단편을 갖는 몇가지 (NH_3) 덴드리머의 착체화 특성 및 형질감염 능력의 비교(제 20도 및 제 21도)

<1071> 이 실시에에서는, DNA의 비교적 작은 단편을 상이한 덴드리머와 착체화시켰다. 제 20 도에 나타낸 데이터에서, 길이가 15 뉴클레오티드인 합성 단일쇄 DNA는, 아래의 표 XVI에 나타낸 DNA:덴드리머 전하비에서 G2 내지 G7(NH_3) 덴드리머와 착체화되었다.

<1072> [표 XVI]

레 인	DNA:덴드리머 전하비	덴드리머
1	6 : 1	G6(NH_3)
2	1 : 1	G6(NH_3)
3	1 1.5	G6(NH_3)
4	6 : 1	G7(NH_3)
5	1 : 1	G7(NH_3)
6	1 1.5	G7(NH_3)
7	6 : 1	G3(NH_3)
8	1 : 1	G3(NH_3)
9	1 : 1.5	G3(NH_3)
10	6 : 1	G4(NH_3)
11	1 1	G4(NH_3)
12	1 1.5	G4(NH_3)
13	5 : 1	G2(NH_3)
14	1 : 1	G2(NH_3)
15	1 2	G2(NH_3)
16	--	*

* DNA 크기 마커

<1074> 제 20 도는 다양한 착체의 아가로스 겔 전기영동을 나타낸다. 컬럼 1, 4, 7 및 10에서 볼 수 있듯이, 올리고뉴클레오티드의 실질적인 이동이 있었다. 이는 6:1의 DNA:덴드리머 전하비에서 안정한 착체가 형성되지 않는 것을 나타낸다. 그러나, 컬럼 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11 및 12에서 올리고뉴클레오티드의 이동이 없는 것은, 합성 올리고뉴클레오티드 DNA가 1:1 및 1:1.5의 전하비에서 G3 내지 G7(NH_3) 덴드리머와 안정한 착체를 형성하는 것을 나타낸다. 컬럼 13 내지 15는 올리고뉴클레오티드가 G2(NH_3) 덴드리머와 임의의 전하비에서 안정한 착체를 형성하지 않는 것을 나타낸다.

<1075> G8(NH_3) 덴드리머와 착체화된(1:10의 전하비에서), 방사성 표지된 23개 염기 쌍(bp)의 이중쇄 올리고뉴클레오티드의 성공적인 전달을 제 21 도에 나타낸다. 올리고머는 작용성 수용체 유전자가 아니기 때문에, 성공적인 전달은 방사성 표지된 DNA의 흡수량에 의해 측정하였다. 가로좌표상의 전달 개시 후의 시간에 대하여, 전달이 일어난 후의 세포 내에서의 방사성 계수를 제 21 도의 좌표에 나타내었다.

<1076> 세포내로의 DNA-덴드리머 흡수가 에너지 의존성이라는 사실은, 나트륨 아지드를 착체에 첨가할 경우 전달의 정도가, 거의 올리고뉴클레오티트 단독의 경우에 얻는 수준으로 상당히 감소된다는 데이타에 의해 알 수 있었다. 이는 덴드리머가 세포에 의한 저분자량의 핵산 흡수를 용이하게 할 수 있다는 것을 나타내었다.

<1077> 실시예 48: DEAE-덱스트란의 존재 및 부재하에 G8(NH_3) 덴드리머 및 G11(EDA) 덴드리머를 사용하는 환형(초나선형) 및 선형화된 RSV-luc RAT2 세포의 형질감염(제 22 도)

<1078> 이 실시예에서는 환형(초나선형) 형태 또는 선형 형태의 RSV-luc 유전자를 G8(NH_3) 및 G11(EDA) 덴드리머와 착체화시켰다. 선형화는 단일 부위 특이성 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 달성했다. 제 22 도에서, 1, 3, 5 및 7로 번호 붙여진 가로축상의 막대는 선형 형태의 플라스미드를 나타내는 반면, 2, 4,

6 및 8로 번호 붙여진 막대는 환형 형태의 DNA 플라스미드를 나타낸다. 제 22 도는 G8(NH_3) 또는 G11(EDA) 덴드리머를 사용하여 선형 및 환형 형태의 DNA를 둘 다 형질감염시켰으며, DEAE-덱스트란을 사용할 때, 모든 경우에서 형질감염이 증진되는 사실을 예시한다.

<1079> 실시예 49: 덴드리머의 독특한 DNA 결합 특성(제 23 도)

<1080> 이 실시예에서는, 안정한 DNA-덴드리머 착체를 효율적으로 형성시키기에 바람직한 DNA:덴드리머 전하비 및 결합 조건을 결정하였다. 약 40:1 내지 1:50의 전하비에서 DNA-덴드리머 착체가 형성되었다(제 23 도 및 이하의 표 XVII).

<1081> [표 XVII]

레 인	DNA:덴드리머 전하비
1	a
2	b
3	40 : 1
4	20 : 1
5	10 : 1
6	2 : 1
7	1 : 1
8	1 : 5
9	1 : 10
10	1 : 20
11	1 : 25
12	1 : 50

a = DNA 크기 마커

b = 대조군-덴드리머 부재하의 DNA

<1083> 이들 착체에 대하여 제 23 도(A 내지 D)에 나타낸 겔에서 전기영동을 수행하였다. 각 전기영동 겔의 레인 1은 DNA 크기 마커이고, 레인 2는 DNA 대조군, 즉 덴드리머가 없는 것이다. 제 23 도의 A 및 B 겔에서, G8(NH_3) 덴드리머를 사용하여 DNA를 착체화시켰다. 제 23 도의 C 및 D 겔에서, G8(EDA) 덴드리머를 사용하였다. 상부의 패널(제 23 도 A 및 C)에서, 임의의 단백질 불순물을 방출시키는 디티오트레이톨(DTT)의 존재하에, DNA를 침전시킬 수 있는 임의의 양이온을 착체화시키는 DETA에 노출시켜, 착체를 형성시켰다. 이들 두 단계는 DNA:덴드리머 착체를 잘못 나타낼 수 있는 오염물을 제거한다. 이 결과는 또한 착체 형성이 환원 조건이나 금속 이온의 존재를 필요로 하지 않는다는 것을 나타낸다.

<1084> 패널 A 및 C는 패널 B 및 D에서 얻은 결과에 필적한다. 20:1이상의 전하비에서 덴드리머와 착체화된 DNA는 안정한 착체를 형성하지 않는다(제 23 도에서 플레이트 A 내지 D의 레인 2 내지 5를 참조). DNA:덴드리머 착체는 2:1의 DNA:덴드리머 전하비에서 지연되기 시작하여, 1:50의 전하비에서도 계속 지연된다(제 23도에서 패널 A 내지 D의 레인 6 내지 12를 참조). 이는 낮은 DNA:덴드리머 전하비에서도 DNA가 계속 덴드리머와 착체화된다는 것을 나타낸다.

<1085> 실시예 50: 주로 전하비의 함수인 덴드리머의 DNA 결합 특성(제 24 도).

<1086> 이 실시예에서는, 이하의 표 XVIII에 나타낸 몰비로 플라스미드 DNA(2.9kb) 0.2㎍을 G8(NH_3) 및 G11(EDA)와 착체화시켰으며, 레인 1은 착체화되지 않은 DNA 크기 마커이다:

<1087> [표 XVIII]

레 인	DNA:덴드리머 몰비
1	a
2	1 : 0.32[b]
3	1 : 3.2[b]
4	1 : 16[b]
5	1 : 32[b]
6	1 : 64[b]
7	1 : 128[b]
8	1 : 0.32[c]
9	1 : 3.2[c]
10	1 : 16[c]
11	1 : 32[c]
12	1 : 64[c]
13	1 : 128[c]

a = DNA 크기 마커

b = DNA:G8 NH_3

c = DNA:G11 EDA

<1089> 이들 착체에 대하여 아가로스 겔에서 전기영동을 수행하여 그 결과를 제 24 도에 나타내었다 1:0.32, 1:3.2 및 1:16의 몰비에서(제 24 도의 레인 2 내지 4), DNA가 G8(NH_3) 덴드리머와 착체화되지 않는 것을 볼 수 있다. 반대로, 1:0.32 및 1:3.2(레인 8 및 9)의 몰비에서 DNA는 G11(EDA)와 착체화되지 않았다. 이는 G8(NH_3) 덴드리머보다 실질적으로 더 큰 표면 전하 밀도를 갖는 더 큰 G11(EDA) 덴드리머가 더 낮은 DNA:덴드리머 몰비에서 착체를 형성할 수 있으며, 덴드리머에 의한 DNA 착체화의 더욱 중요한 변수는 전하비임을 나타낸다.

<1090> 제 24 도의 레인 5 내지 7 및 11 내지 13에 나타난, 안정한 착체는 모두 DNA:덴드리머 5:1 보다 작은 전하비에서이다.

<1091> 실시예 51: 광범위한 범위의 pH에서의 DNA-덴드리머 착체의 안정성(제 25 도)

<1092> 이 실시예에서는, 10:1 및 1:5의 DNA:덴드리머 전하비에서 G8(NH_3) 및 G8(EDA) 덴드리머와 착체화된 DNA를, 100mM 나트륨 클로라이드 및 10mM 트리스를 함유하는 완충액내에서 pH를 이하의 표 XIX에 나타낸 대로 변화시키면서 제조하였다.

<1093> [표 XIX]

레 인	pH	DNA:덴드리머* 전하비(코어)
1	7.4	10:1(NH_3)
2	7.4	1:5(NH_3)
3	7.4	10:1(EDA)
4	7.4	1:5(EDA)
5	7.4	DNA 단독
6	5.2	10:1(NH_3)
7	7.0	10:1(NH_3)
8	9.8	10:1(NH_3)
9	5.2	1:5(NH_3)
10	7.0	1:5(NH_3)
11	9.8	1:5(NH_3)
12	5.2	10:1(EDA)
13	7.0	10:1(EDA)
14	9.8	10:1(EDA)
15	5.2	1:5(EDA)
16	7.0	1:5(EDA)
17	9.8	1:5(EDA)
18	5.2	DNA 단독
19	7.0	DNA 단독
20	9.8	DNA 단독

* G8

<1095> 생성되는 착체에 대하여 아가로스 겔에서 전기영동시키고, 그 결과를 제 25 도에 나타낸다.

<1096> 레인 1 내지 5는 표준 상태(pH 7.4)에서 수행한 착체화를 나타낸다. 예상한 대로, DNA는 10:1의 전하비(레인 1, 3, 6 내지 8, 및 12 내지 14)에서 덴드리머와 착체를 형성하지 않았으며, 덴드리머의 부재하에 전기영동시킨 DNA 대조군(레인 5 및 18 내지 20)은 겔에서 이동하였다. 10:1 전하비에서의 DNA의 부분 착체화(레인 1, 3, 6 내지 8 및 12 내지 14에서 관찰되는 얼룩에 의해 증명됨)도 또한 pH의 변화에 의해 영향받지 않았다. 반대로, 1:5 전하비에서 형성된 DNA 착체는 5.2 내지 9.8의 pH의 범위에서 안정성을 나타내며, 겔에서 이동하지 않았다(레인 9 내지 11 및 15 내지 17) 레인 9 및 15는 pH 5.2에서의 착체의 형성을 나타내는 반면에, 레인 17은 pH 9.8에서의 착체의 분리를 나타낸다. 따라서, G8(NH_3) 덴드리머로 형성된 착체는 pH 9.8에서 안정하지만 G8(EDA) 덴드리머로 형성된 착체는 그렇지 않았다. 이는 전하 특징이 두 덴드리머에 있어서 상이하고, 특정한 조건하에서 이들의 DNA 결합을 영향을 줄 수 있다는 것을 제시한다.

<1097> 실시예 52: 나트륨 클로라이드 농도를 증가시킬 때의 DNA-덴드리머 결합(제 26A 도 및 제 26B 도)

<1098> 실시예 52에서는, 나트륨 클로라이드의 농도를 이하의 표 XX에 나타낸 대로 증가시키면서, 5:1 및 1:5의 전하비에서 DNA를 G8(NH_3) 및 G8(EDA) 덴드리머와 착체화시켰다.

<1099> [표 XX]

레 인	NaCl 농도
1	*
2[a] & 10[b]	0
3[a] & 11[b]	50 μM
4[a] & 12[b]	100 μM
5[a] & 13[b]	200 μM
6[a] & 14[b]	500 μM
7[a] & 15[b]	750 μM
8[a] & 16[b]	1.0M
9[a] & 17[b]	1.5M

* DNA 크기 마커

a = 전하비 5:1

b = 전하비 1:5

<1101> 이들 착체에 대하여 전기영동을 수행하고, 그 결과를 제 26A 도 및 제 26B 도에 나타내었고; 제 26A 도는 G8(NH_3) 덴드리머-착체를 포함하고, 제 26B 도는 G8(EDA) 덴드리머-DNA 착체를 포함한다. 임의의 사용 조건하에 5:1의 전하비에서 완전한 DNA:덴드리머 착체가 형성되지 않았고, 그 결과 DNA는 겔에서 이동하였다(제 26A 도 및 제 26B 도의 레인 2 내지 9). 반대로, 나트륨 클로라이드 농도가 0(레인 2 및 10) 내지 1.5몰(레인 9 및 17)로 변할 때, 1:5의 전하비에서 완전한 DNA:덴드리머 착체가 형성되었으며 안정하였다. 따라서, DNA 덴드리머의 형성은 완충액의 이온 강도와 무관하게 일어난다.

<1102> 실시예 53: 제한 엔도뉴클레아제의 존재하의 덴드리머와 착체화된 DNA의 안정성(제 27 도)

<1103> 이 실시예에서는, 플라스미드 pRSV-lac DNA 0.20μg을 1:10의 전하비에서 G8(NH_3) 또는 G11(EDA)와 착체화시키고, HindIII 또는 EcoR1 제한 엔도뉴클레아제 효소와 37℃에서 1시간동안 배양하였다. 그 다음 샘플을 SDS로 처리하여 덴드리머로부터 DNA를 분리시킨 후, 아가로스 겔에서 전기영동시켰다(제 27 도, 이하의 표 XXI에 나타낸 레인).

<1104> [표 XXI]

레 인	플라스미드 착체
1	DNA 크기 마커
2	비분해된 플라스미드 DNA
3	HindIII으로 분해시킨 플라스미드 DNA
4	HindIII으로 분해시킨 G8 NH_3와 착체화된 플라스미드 DNA
5	HindIII으로 분해시킨 G11 EDA와 착체화된 플라스미드 DNA
6	EcoR1로 분해시킨 플라스미드 DNA
7	EcoR1로 분해시킨 G8 NH_3와 착체화된 플라스미드 DNA
8	EcoR1로 분해시킨 G11 EDA와 착체화된 플라스미드 DNA

<1106> HindIII 또는 EcoR1로 분해시킨, 비착체화된 플라스미드 DNA는 플라스미드 내 제한 부위의 수와 일치되는 단편에서 이동하였다(제27 도에서 레인 3 및 6을 레인 2의 분해된 DNA와 비교함). 이와는 반대로, 착체화된 DNA는 주로 분해되지 않은 채로 잔류하였으며(레인 4, 5, 7 및 8), 이는 덴드리머 착체화가 DNA를 엔도뉴클레아제에 의해 분해되지 않도록 보호함을 나타낸다.

<1107> 실시예 54: 세포내 뉴클레아제의 존재하의 DNA-덴드리머 착체의 안정성(제 28 도)

<1108> 실시예 54는, U937 세포의 세포질로부터 얻은 세포내 뉴클레아제를 사용하여 DNA를 비특이적으로 분해시켰다는 것을 제외하고는, 실시예 53과 유사하다. 덴드리머가 DNA에 완전히 착체화되거나(1:5) 또는 불완하게 착체화되는(5:1) 전하비에서, 플라스미드 DNA(2.9kb)를 G8(EDA) 덴드리머에 착체화시켰다. 그 다음, DNA:덴드리머 착체를 세포 추출물과 함께 37℃에서 4시간동안 배양하였다. 이어, SDS를 첨가하여 DNA를 덴드리머로부터 분리시키고, 이 샘플을 아가로스 겔에서 전기 영동시켰으며(제 28 도), 레인은 이하의 표 XXII에 나타낸 바와 같았다:

<1109> [표 XXII]

레 인	샘 플
1	DNA 크기 마커
2	플라스미드 대조군; 세포 추출물 없음, 덴드리머 없음
3	플라스미드 대조군 분해; 세포 추출물 5㎍, 덴드리머 없음, SDS 없음
4	플라스미드 DNA:G8(EDA)(1:5); 세포 추출물 없음
5	플라스미드 DNA:G8(EDA)(1:5); 세포 추출물 5㎍
6	플라스미드 DNA:G8(EDA)(5:1); 세포 추출물 없음
7	플라스미드 DNA:G8(EDA)(5:1); 세포 추출물 5㎍

<1111> 완전한 플라스미드의 이동은 레인 2에서 나타나는 반면에 세포내 뉴클레아제에 의해 분해된 플라스미드의 이동은 레인 3에 나타난다. 레인 3을 레인 2와 비교한 결과, DNA가 세포내 뉴클레아제에 노출되면 다양한 크기의 작은 단편으로 분해되는 것으로 나타났다(레인 3에서 관찰되는 흐려짐(smear)에 의해 나타나는 대로).

<1112> 레인 4에서, 1:5 전하비의 DNA:덴드리머 착체를 세포 추출물에 노출시키거나 또는 SDS에 노출시키지 않고, 전기영동시켰다. 안정한 DNA:덴드리머 착체의 경우 예상된 대로 이동이 관찰되지 않는다.

<1113> 레인 5에서, 같은 1:5 전하비의 착체를 세포 추출물(5㎍)에 노출시킨 후, SDS로 분해시킨 다음, 전기영동시켰다. 레인 5를 레인 3 및 4와 비교하여 알 수 있듯이, 플라스미드는 주로 완전한 채로 잔류한다. 이는 DNA가 덴드리머에 착체화되어 있는 동안에는 DNA의 분해가 거의 또는 전혀 일어나지 않음을 나타낸다.

<1114> 레인 6에서, 세포 추출물에 노출시키지 않은 5:1 DNA:덴드리머 착체를 전기영동시켰다. 예상한 대로, 착체는 안정하지 못하며, DNA는 겔내에서 이동한다. 레인 7에서, 같은 착체를 세포 추출물 5㎍에 노출시킨 후, SDS로 처리하여, 덴드리머로부터 DNA를 방출시키고, 전기영동시켰다. 착체가 안정하지 못하기 때문에, DNA는 거의 완전하게 분해되었고, 다양한 분해된 단편의 상이한 이동을 제 28 도의 레인 7에서 볼 수 있다. 이는 DNA를 덴드리머에 완전히 착체화시키면 DNA가 뉴클레아제 분해로부터 보호됨을 나타낸다.

<1115> 실시예 55 : 리포펙틴™을 사용한 형질감염과 비교한, DEAE-덱스트란의 존재하 또는 부재하의 G8(NH_3) 덴드리머에 착체화된 DNA의 형질감염(제 29도)

<1116> 이 실시예에서는, 다양한 DNA:덴드리머 전하비(1:100 내지 1:1)에서 DNA를 G8(NH_3) 덴드리머와 착체화시켰다. 그 다음, 이를 DEAE-덱스트란의 존재하 또는 부재하에 다양한 양의 DNA(1,5 및 10㎍)로 형질감염시켰다. 전술한 양의 DNA를 또한 리포펙틴™ 20㎍으로 형질감염시켰다.

<1117> 발광 생성(광단위/㎍단백질)으로 나타나는, 상기 형질감염의 결과를 제 29 도에 제시한다. 대조군, 즉 DEAE-덱스트란 존재하의 DNA 또는 단독의 DNA에서는 매우 적은 형질감염이 일어난다. DEAE-덱스트란의 존재하에 1:100 내지 1:1(DNA:덴드리머)의 전하비에서, 웰당 DNA 10㎍, 5㎍ 및 1㎍으로 제조한 DNA:덴드리머 착체의 경우에 실질적인 형질감염이 이루어졌다. 낮은 전하비에서 다량의 DNA를 착체화시킨 경우에는 DEAE-덱스트란의 부재하에서도 DNA:덴드리머 착체에 의해 실질적인 형질감염이 이루어졌다. DEAE-덱스트란의 부재하에서는, DNA:덴드리머 착체에 의한 형질감염은 오직 고세대의 덴드리머(G7보다 큰)의 경우에만 일어난다.

<1118> 형질감염이 상당한 경우, 이 결과는 지질계 형질감염 약제, 리포펙틴을 사용하여 얻은 결과에 유리하게 비교된다.

<1119> 실시예 56: DEAE-덱스트란의 존재하 또는 부재하의, 다양한 덴드리머와 착체화된 DNA의 형질감염(제 30 도 및 제 31 도)

<1120> 이 실시예에서는, 다양한 DNA:덴드리머 전하비에서 G9(EDA), G9(NH_3)(제 30 도), G8(NH_3) 및 G11(EDA)(제 31 도) 덴드리머와 착체화된 DNA의 형질감염 결과를 나타낸다. DEAE-덱스트란의 존재하의 DNA의 형질감염은 전하비가 DNA:덴드리머 약 1:5(0.2) 내지 약 1:100(0.01)으로 변화할 때 상당히 증진되었다(제 30도 및 제 31 도). 4:1(4.0)의 높은 전하비 및 1:10,000(0.0001)의 낮은 전하비에서도, 형질감염이 약간 관찰되었다. DEAE-덱스트란의 부재하의 형질감염은 오직 DNA:덴드리머의 전하비가 1:5 미만일 때 상당하며, G9(NH_3)의 경우 전하비가 1:1,000, 심지어는 1:10,000로 낮아질수록 증가하는 경향이 있다(제 30 도). 이는 가능하게는 더 낮은 유전물질 덴드리머 전하비가 DEAE-덱스트란의 증진효과를 대신할 수 있음을 제시한다.

<1121> 실시예 57: DEAE-덱스트란 대 HBS 내에서의, G7(NH_3) 덴드리머와 착체화된 DNA의 형질감염

<1122> 이 실시예에서는, 제 32 도의 가로좌표에 나타낸 전하비의 DNA-덴드리머 착체를 DEAE-덱스트란 또는 HBS의 존재하에 RAT2 세포로 형질감염시켰다. 형질감염 결과는 상대적 광단위/㎍세포 단백질의 발광성에 의해 측정하였다(제 32 도에 나타나 있음). 도면에서 볼수 있는 대로, DEAE-덱스트란은 전하비가 약 1:15 내지 약 1:1, 특히 1:0.6인 착체의 경우 형질감염을 상당히 증진시켰다. HBS에서는 실질적으로 형질감염이 이루어지지 않았는데, 이로써 7세대 이하의 덴드리머에 의한 형질감염은 DEAE-덱스트란의 첨가를 필요로 함을 확인하였다.

<1123> 실시예 58: 형질감염 효율에 대한 덴드리머 세대 및 DNA/덴드리머 전하비의 영향(제 33 도)

<1124> 이 실시예에서는, 1:1, 1:5 및 1:10(DNA:덴드리머)의 전하비에서 G4 내지 G8(NH_3) 조밀 별형 덴드리머와 착체화된 DNA를 DEAE-덱스트란의 존재하에 RAT2 세포에 형질감염시켰다. DEAE-덱스트란 DNA 대조군 혼합물에 대한 형질감염의 증가율을 생성되는 각 착체에 대하여 제 33도에 나타낸다. 모든 전하비의 G6, G7 및 G8 덴드리머(직경이 약 50Å보다 큰)의 경우 대조군에 비하여 매우 상당한 개선이 관찰되나, G4 및 G5 덴드리머의 경우에는 개선이 거의 보이지 않는다. 또한, 전하비가 1:5 또는 1:10인 경우, 전하비가 1:1인 착체와 비교하여 형질감염이 실질적으로 증진되었다.

<1125> 실시예 59: 광범위한 DNA:덴드리머 전하비에 따른 형질감염에 대한 DEAE-덱스트란의 효과(제 34 도)

<1126> 이 실시예에서는, 1:1에서 1:3805로 전하비를 달리하면서 DNA를 G8(NH_3) 덴드리머와 착체화시켰다. DEAE-덱스트란의 존재하 및 부재하의 형질감염 결과를 상대적 광단위/㎍단백질의 발광도로서 제 34 도에 나타낸다. 1:1 및 1:100일 때, DEAE-덱스트란의 존재하 또는 부재하에 최소의 형질감염이 이루어졌다. 그러나 1:5 및 1:10의 전하비의 경우에는, 형질감염은 DEAE-덱스트란의 사용에 의해 다시 상승효과적으로 증진되었다. 따라서, DEAE-덱스트란은 오직 적당한 전하비에서 형성된 DNA:덴드리머 착체의 형질감염을 증진시킬 수 있다.

<1127> 실시예 60: 형질감염 효율에 대한 다양한 DEAE-덱스트란 농도의 효과(제 35 도)

<1128> 이 실시예에서는, 1:1 내지 1:100(DNA:덴드리머)의 전하비에서 형성된 DNA:G11(EDA) 덴드리머 착체를 사용하여 다양한 농도의 DEAE-덱스트란(0 내지 2μM)의 존재하에 RAT2 세포를 형질감염시켰다. 상대적 광단위/㎍세포 단백질의 발광으로서 측정된 형질감염 결과를 제 35 도에 나타낸다. 모든 조건에서, 약간의 형질감염이 나타났으며, DEAE-덱스트란 0.125 내지 2μM 농도에서 DEAE-덱스트란은 형질감염을 증진시키는 경향을 나타내었다. 그러나, 0.25 내지 1μM의 DEAE-덱스트란 농도 및 1:5또는 1:10의 DNA:덴드리머 전하비일 때 증진이 가장 뚜렷하였다. 이는 전하비와 DEAE-덱스트란 농도를 둘 다 최적화하면 상승효과적으로 형질감염의 개선을 얻을 수 있음을 나타낸다.

<1129> 실시예 61: 덴드리머 대 리포펙틴™을 사용한 DNA 형질감염의 비교(제 36 도)

<1130> 이 실시예에서는, DNA 5㎍을 1:5 전하비의 G8(NH_3) 덴드리머와 착체화시키고, 5가지의 상이한 세포주를 형질감염시키는 데 사용하였다. 제 36 도에 나타낸 5가지의 세포 유형의 형질감염을 리포펙틴™에 의해 매개되는 형질감염과 비교하였다. 또한 DEAE-덱스트란에 의해 증진된 DNA:덴드리머 착체의 형질감염을, 착체만 사용한 형질감염과 교하였다. 제 36도에서, 형질감염 약제는 하기의 번호와 같다: 1은 2가지 상이한 농도(20㎍ 및 2㎍)에서의 리포펙틴™이고; 2는 덴드리머 및 DEAE-덱스트란이고; 3은 단독의 덴드리머이고; 4는 대조군으로서의 단독의 DEAE-덱스트란이며; 5는 플라스미드 대조군이다.

<1131> 제 36 도에 나타낸 대로, DEAE-덱스트란의 존재하에 DNA:덴드리머 착체를 사용한 형질감염은, 인간 HMEC-1 세포를 제외한 모든 세포에서, 시험 웰당 2 또는 20㎍의 리포펙틴™에 의해 얻어진 형질감염보다 훨씬 우수하였다. DEAE-덱스트란의 존재하의 DNA:덴드리머 착체의 형질감염도 또한 DNA-덴드리머만을 사용하여 얻은 형질감염보다 우수하였다. 몇몇 세포(예컨대, 래트:클론9, 마우스:NIH3T3 및 마우스:10-1)에서, DNA:덴드리머 착체만을 사용한 형질감염은 2 또는 20㎍의 리포펙틴™을 사용하여 얻은 형질감염보다 우수하다. 이는 DNA:덴드리머 착체를 광범위한 세포를 형질감염시키는 데 사용할 수 있다는것을 나타내지만, 형질감염 효율은 상이한 세포 유형간에 다를 수 있음을 제시한다.

<1132> 실시예 62: 현재 이용가능한 형질감염 약제로 형질감염시키기에 어려운, 또 다른 세포주의 형질감염(제 37 도)

<1133> 다른 기법으로 형질감염시키기에 특히 어려운 것으로 밝혀진 또 다른 세포주의 형질감염을 DNA:덴드리머 착체로 시도하였다. DNA를 1:5 DNA:덴드리머 전하비에서 G8(NH_3) 덴드리머와 착체화시키고, DNA:덴드리머 착체가 세포주 NRK52E 및 YB2를 형질감염시키는 정도를 20㎍ 또는 2㎍의 시판중인 형질감염 약제 리포펙틴™에 의한 동일한 세포의 형질감염과 비교하였다. 제 37 도에서, 약제는 제 36 도에서와 같이 번호를 붙인다.

<1134> 제 37 도에서, 형질감염 결과는 상대적 광단위/㎍단백질의 발광으로 나타낸다. 어느 세포에서나 DNA-덴드리머 착체를 DEAE-덱스트란과 함께 사용하여 가장 우수한 결과를 얻었다. 리포펙틴™은 NRK52E 세포주에서 효율적인 형질감염을 나타내지만, YB2 세포주에서는 작용하지 않았고 DEAE-덱스트란 중의 DNA:덴드리머 착체는 YB2 세포주에서는 매우 우수한 성능을 나타내었다. 이 경우도, 전체적인 형질감염 효율은 상이한 세포주간에 다르다는 것을 나타낸다.

<1135> 실시예 63: 2가지 상이한 지질 약제:리포펙틴™ 및 리포펙타민™과 덴드리머를 사용한 DNA 형질감염의 비교(제 38 도)

<1136> 이 실시예에서는 G8(NH_3) 덴드리머 또는 G11(EDA) 덴드리머와 착체화된 RSV-luc DNA로 RAT2 세포주를 형질감염시켰다. 1:1, 1:5 및 1:10(DNA:덴드리머)의 전하비를 시험하였다. 몇몇 경우에, DEAE-덱스트란을 사용하여 형질감염을 증진시켰다. 이 형질감염 결과를 리포펙틴™ 2, 10 및 20㎕ 또는 리포펙타민™ 2, 12.5 및 25㎕를 사용한 형질감염과 비교한다.

<1137> 제 38 도에 나타낸 결과는 1:5 또는 1:10 DNA:덴드리머 전하비에서 덴드리머와 착체화된 DNA의 DEAE-덱스트란의 존재하에서의 뛰어난 형질감염 정도를 나타낸다. 리포펙타민™은 형질감염을 이루지 못하였으나, 매우 제한된 범위의 농도에서는 효과적이었다. 리포펙틴™은 상기 세포주에서 최소 활성을 나타내었다.

<1138> 실시예 64: 형질감염 효율에 대하여 DEAE-덱스트란과 비교한, DMSO에 의한 세포막 투과 효과(제 39 도)

<1139> DEAE-덱스트란이 단지 교란제 또는 투과제로서 작용할 것이라는 전제를 시험하기 위하여, 세포에 DMSO 처리를 한 경우와 하지 않은 경우에 G9(NH_3) 덴드리머와 착체화된 DNA에 의한 RAT2 세포의 형질감염을 비교하였다. 제 39 도에 나타낸 결과는 덱스트란 부재하의 형질감별과 비교하여 DEAE-덱스트란을 사용한 경우 형질감염이 3배 증진됨을 나타낸다. 사실상, DMSO는 DEAE-덱스트란의 부재하에서 형질감염에 아무런 효과를 나타내지 않았다. 따라서, DEAE-덱스트란의 증진효과는 단지 세포의 교란이나 투과에 기인한 것이 아니다.

<1140> 흥미롭게도, DMSO 및 DEAE-덱스트란을 혼합하는 것은 특히 1:5 및 1:10의 DNA:덴드리머 전하비에서 덴드리머와 착체화된 DNA의 형질감염을 더욱 상승시키는 것으로 보인다. 이는 상기 두 약제가 상이한 기작에 의해 작용함을 제시한다.

<1141> 실시예 65: 세포를 형질감염시키기 위한 콘쥬게이트화된 덴드리머의 사용(제 40 도 및 제 41 도)

<1142> 덴드리머와 표적 지향제(갈락토스 트리사카라이드)의 콘쥬게이트화는 안정한 DNA:덴드리머 착체의 형성을 방해하지 않았으며(제 41 도), 형질감염 효율을 증진시키는 데 사용될 수 있었다(제 40도). 이 실시예에서는, G11(EDA) 덴드리머를 갈락토스 트리사카라이드와 콘쥬게이트화시켰다. 그 다음 DNA를 표적화된 덴드리머와 착체화시키고, 이 착체를 RAT2, HepG2, NIH3T3 및 AL 세포를 형질감염시키는데 사용하였다. 콘쥬게이트화되지 않은 덴드리머도 또한 DNA와 착체화시키고, 대조군으로서 사용하였다. 제 40 도에 나타낸 결과는 표적 지향제의 결합이 갈락토스 트리사카라이드의 수용체를 발현시키는 HepG2 및 AL 세포의 형질감염을 증진시킴을 나타낸다.

<1143> DNA:덴드리머 착체를 또한 전기영동시켰다. 제 41도에서, 이하의 표 XXIII에 따라 DNA 1㎍을 표적 지향제의 존재하 또는 부재하에 G11(EDA) 덴드리머와 착체화시켰다:

<1144> [표 XXIII]

레인 번호	덴드리머 농도(μM)
1	DNA 단독
2	0.1[a]
3	0.05[a]
4	0.025[a]
5	0.1[b]
6	0.05[b]
7	0.025[b]

a = 콘쥬게이트화되지 않음

b = 콘쥬게이트화됨

<1146> 매우 낮은 덴드리머 농도, 즉 높은 DNA:덴드리머 전하비에서는, 비표적화된(즉 콘쥬게이트화되지 않은) 덴드리머, 또는 갈락토스 트리사카라이드 콘쥬게이트화된 덴드리머에 의해(레인 3, 4, 6 및 7을 참조) 안정한 착체가 형성되지 않는다(예상한 대로임). 그러나, 적당한 전하비에서 콘쥬게이트화되지 않거나 또는 콘쥬게인트화된 덴드리머에 의해 안정한 착체가 형성되었다(제 41 도의 레인 2 및 5를 참조). 이는 표적화된 형질감염에서의 콘쥬게이트화된 덴드리머의 가능성있는 유용성을 나타낸다.

<1147> 실시예 66: 비표적화된 형질감염에 대한 혈청의 효과(제 42 도)

<1148> 이 실시예에서는, 생체내에서의 표적 지향제의 필요성을 예시하고, 혈청의 농도를 변화시키면서 DNA:덴드리머 G8(NH_3) 착체를 사용하여 형질감염을 시도하였다. 제 42 도에 나타낸 결과는 혈청 농도가 증가하면 DEAE-덱스트란의 존재하에서도 DNA:덴드리머 착체에 의한 RAT2 세포의 형질감염이 저해된다는 것을 나타낸다. 따라서, 표적 지향제와 같은 다른 방법은 생체내에서 DNA:덴드리머 착체의 세포에의 결합을 매개시키는 데 사용해야 한다.

<1149> 실시예 67: 형질감염 효율에 대한 가능성있는 표적 지향제 및 다른 덴드리머 표면 개질의 영향(제 43 도)

<1150> 이 실시예에서는, G5 및 G6(NH_3) 덴드리머를 덴드리머당 바이오틴 20개, 덴드리머당 피루베이트 100개 또는 덴드리머당 피루베이트 64개와 콘쥬게이트화시키거나, 또 다르게는 상기 덴드리머의 표면 작용성 아미노기의 25%를 아크릴산과 반응시킴으로써 이들의 표면을 개질시켰다. 그 다음 덴드리머를 사용하여 RSV-luc 플라스미드 DNA와 착체화시키고, RAT2 세포를 형질감염시켰다. 형질감염 정도는 상대적 광단위/㎍단백질로 나타낸다. 시도된 모든 형질감염은 DEAE-덱스트란의 존재하에 수행하였다. 음전하 작용기의 치환이 일어나지 않았다고 가정하고, 치환된 덴드리머의 전하비를 결정하였다. 제 43 도에 나타낸 형질감염 결과는 이들 표면 개질이 비개질된 G6(NH_3) 덴드리머를 사용한 형질감염에 비하여 형질감염에 악영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다.

<1151> 실시예 68: 덴드리머-매개성 형질감염 후의 루시페라제™ 활성의 지속성(제 44 도)

<1152> 이 실시예에서는, DEAE-덱스트란의 존재하 및 부재하에 DNA:덴드리머 착체를 사용하여 형질감염

시킨 RAT2 세포에서, 시간에 따른 루시페라제™의 활성을 결정하였다. 21시간, 45시간, 69시간 및 141시간에서 활성을 측정하였다. 이 결과를 제 44도에 나타낸다.

<1153> DEAE-덱스트란의 존재하 또는 부재하에, 덴드리머와 착체화된 DNA의 형질감염 정도는, DNA만으로 형질감염시킨 경우(플리스미드 대조군)보다, 특히 21시간 및 45시간에서 상당히 더 컸다. 각 착체의 전하비는 1:10이었다 이 결과는 21 및 45시간에서 DEAE-덱스트란의 존재하의 DNA:덴드리머 형질감염에 특히 현저하다. 이는 덴드리머에 의해 형질감염될 때 장기간동안 유전자가 발현됨을 나타낸다.

<1154> 실시예 69: 세포독성(제 45 도 및 제 64 도)

<1155> 이 실시예에서는, DEAE-덱스트란의 존재하 및 부재하에 DNA:덴드리머 착체의, 다수의 상이한 세포 형태: RAT2 세포(제 45 도), 클론9 세포, NIH3T3 세포, 10-1 세포 및 COS7 세포(제 46 도)에 대한 세포독성을 결정하기 위한 시험을 수행하였다. 제 45 도에서, 막대 그래프상의 여러 숫자는 다음을 나타낸다: 1은 배지 대조군이고; 2는 DNA를 포함하는 배지 대조군이고, 3은 덴드리머이고; 4는 DNA를 포함하는 덴드리머이고; 5는 DEAE-덱스트란 대조군이고; 6은 DNA를 포함하는 DEAE-덱스트란 대조군이고; 7은 DEAE-덱스트란을 포함하는 덴드리머이고; 8은 DNA 및 DEAE-덱스트란을 포함하는 덴드리머이다. 배양액 중의 정상적인 세포 생존율은 90 내지 95%이다. DNA 덴드리머 착체단독은, 클론9 세포주를 제외하고는 세포 생존율에 거의 또는 전혀 영향을 주지 않았고, 클론 9 세포주에서는 DNA-덴드리머 착체에 의해 치사정도가 약 2배였다. DEAE-덱스트란의 첨가는 세포독성을 다소 증가시켰지만, 시험관내에서 이 혼합물을 사용하지 못할 정도는 아니다.

<1156> 실시예 70: 덴드리머를 사용하여 형질감염된 방사성 표지된 DNA의 흡수 및 세포내 위치 확인(제 47 도)

<1157> 이 실시예에서는, G8(NH_3) 덴드리머를 사용하여 방사성 표지된 DNA(2.9kb)를 RAT2 및 U937 세포에 형질감염시켰다. 세포를 막, 핵 및 세포질과 관련된 분획으로 분획화하여 얻은 위치 확인 결과와 함께 세포내로의 전체적인 전달을 제 47A 도 내지 제 47F 도에 나타낸다. 따라서, 핵 및 막 분획중의 방사성 표지된 DNA의 양을 개별적으로 결정하였다.

<1158> 제 47A 도 내지 제 47C 도에서, DNA 단독(47A), DNA + 덴드리머(47B), 및 DNA + 덴드리머 + 나트륨 아지드(47C)를 사용하여 U937 세포를 형질감염시켰다. 동일한 일련의 형질감염을 RAT2 세포에서 수행하였다(각각 제 47D, E 및 F 도).

<1159> 이 결과는 DNA 및 덴드리머를 사용할 때의 실질적인 세포내 흡수는 물론 실질적인 핵 흡수를 나타낸다(제 47B 및 E 도). DNA 매개성 형질감염의 에너지 의존성은 나트륨 아지드 첨가에 의해 나타나는데(제 47C 및 F도), 이 때 DNA 흡수 정도는 대략 DNA만을 세포와 배양시킬 때 관찰되는 정도로 감소되는 것으로 나타났다(제 47A 및 D도).

<1160> 실시예 71: 형질감염된 세포의 현미경사진(제 48A 도, 제 48B 도, 제 49 도, 제 50A 도 및 제 50B 도)

<1161> 이 실시예에서는, 각각 G11(EDA) 조밀 별형 덴드리머 및 C8(NH_3) 조밀 별형 덴드리머를 사용하여, RSV-β-gal 폴라스미드 DNA로 형질감염시킨 D5 마우스 멜라노마 및 RAT2 래트 섬유 아세포의 현미경 사진을 촬영하였다. 성공적으로 형질감염된 세포는 제 48 도 내지 제 50 도에서 어두운(청색) 세포로서 나타난다.

<1162> 제 48A 도에서, 웰당 1㎍의 유전물질을 함유하는 DNA-덴드리머 착체를 사용하여 D5 세포의 형질감염을 수행하였다. 제 48B 도는 착체중의 DNA 양을 5㎍/웰로 증가시킬 때 더욱 많은 세포가 형질감염된다는 것을 나타낸다. 제 49 도는 웰당 3㎍의 유전물질을 사용한, 몇가지 형질감염된 세포의 확대도이다.

<1163> 제 50A 도는 웰당 3㎍의 유전물질로 형질감염된 RAT2 래트 섬유 아세포의 현미경 사진이다. 제 50B 도는 형질감염되지 않은 세포를 나타내는 대조군이다. 이들 결과는 DNA:덴드리머 착체를 사용할 경우, 배양액 중의 세포가 대부분(50 내지 95%) 형질감염되었음을 나타낸다.

<1164> 실시예 72: 안정하게 형질감염된 D5, RAT2, MSU 1.2 세포주를 수득하는 상이한 방법의 비교(제 52 도, 제 53 도, 제 54 도, 제 55 도 및 제 59 도)

<1165> 이 실시예에서는, 배양 웰당 5 또는 10㎍의 G418 항생물질(네오마이신) 내성 및 β-갈락토시다제 또는 미그로마이신 B 내성 유전자를 함유하는 플라스미드를 사용하여 D5, RAT2, MSU 1.2 세포주의 형질감염을 시도하였다. 제 52 도에서, D5 세포주 및 웰당 지시된 양의 RSV-β-gal 플라스미드 DNA를 사용하여 하기의 형질감염 기법을 비교하였다:

<1166> 1. 0.125M 칼슘 포스페이트의 존재하에 10㎍;

<1167> 2. 0.5μM DEAE-덱스트란의 존재하에 10㎍;

<1168> 3. 1:13의 DNA:덴드리머 전하비로 G8(NH_3) 덴드리머 0.5μM과 착체화된 5㎍; 및

<1169> 4. 1:7의 DNA:덴드리머 전하비로 G8(NH_3) 덴드리머 0.5μM과 착체화된 10㎍.

<1170> 제 53 도에서는, RAT2 세포주 및 웰당 지시된 양의 플라스미드 DNA를 사용하여 하기의 형질감염 기법을 비교하였다:

<1171> 1. 0.125M 칼슘 포스페이트의 존재하에 10㎍;

<1172> 2. 0.5μM DEAE-덱스트란의 존재하에 10㎍;

<1173> 3. 1:6의 DNA:덴드리머 전하비로 G8(NH_3) 덴드리머 0.2μM과 착체화된 5㎍;

<1174> 4. 1.3의 DNA 덴드리머 전하비로 G8(NH_3) 덴드리머 0.2μM과 착체화된 10㎍;

<1175> 5. 1:13의 DNA:덴드리머 전하비로 G8(NH_3) 덴드리머 0.5μM과 착체화된 5㎍; 및

<1176> 6. 1:7의 DNA:덴드리머 전하비로 G8(NH_3) 덴드리머 0.5μM과 착체화된 10㎍.

<1177> 유전물질을 덴드리머와 착체화시킨 후, 0.5μM DEAE-덱스트란을 형질감염 배지에 포함시켰다.

<1178> 세포를 G418 항생물질 또는 히그로마이신 B를 함유하는 배지에 넣었다. 이들 세포는 24시간의 복제 사이클을 가진다(즉, 매 24시간마다 복제함). 4주째에, 배양세포를 G418 내성 및 β -갈락토시다제 및/또는 히그로마이신 내성을 발현하는 클론의 수에 대해 평가하였다.

<1179> 제 54 도에서는, MSU 1.2 세포주 및 웰당 지시된 양의 EBV-A-히그로마이신 플라스미드 DNA를 사용하여 하기의 형질감염 기법을 비교하였다:

<1180> 1. 0.5μM DEAE-덱스트란의 존재하에 5㎍;

<1181> 2. 0.125μM 칼슘 포스페이트의 존재하에 5㎍;

<1182> 3. 1:2의 DNA:덴드리머 전하비로 G11(EDA) 덴드리머와 착체화된 5㎍;

<1183> 4. 1:5의 DNA:덴드리머 전하비로 G11(EDA) 덴드리머와 착체화된 5㎍;

<1184> 5. 1:10의 DNA:덴드리머 전하비로 G11(EDA) 덴드리머와 착체화된 5㎍;

<1185> 6. 1:20의 DNA:덴드리머 전하비로 G11(EDA) 덴드리머와 착체화된 5㎍; 및

<1186> 7. 리포펙타민™ 10㎍과 착체화된 5㎍.

<1187> 이것은 세포주를 안정하게 형질감염시키는 데 있어서, DNA 덴드리머에 의한 형질감염이 리포펙타민™ 보다 더욱 효율적이라는 것을 나타낸다.

<1188> 제 59 도는 제 52 도에 제시된 형질감염을 예시한다. D5 세포주 및 웰당 지시된 양의 RSV-β-gal 플라스미드 DNA를 사용하여 하기의 형질감염 기법을 비교하였다:

<1189> 1. 0.125M 칼슘 포스페이트의 존재하에 10㎍;

<1190> 2. 0.5μM DEAE-덱스트란의 존재하에 10㎍;

<1191> 3. 1:13의 DNA:덴드리머 전하비로 G8(NH_3) 덴드리머 0.5μM과 착체화된 5㎍;

<1192> 4. 1:7의 DNA:덴드리머 전하비로 G8(NH_3) 덴드리머 0.5μM과 착체화된 10㎍;

<1193> 5. 1:6의 DNA 덴드리머 전하비로 G8(NH_3) 덴드리머 0.2μM과 착체화된 5㎍.

<1194> 덴드리머 형질감염에 의해 생성된, 증가된 콜론 수에 주목한다.

<1195> 제 55 도는 DNA:덴드리머 전하비 1:10의 ICAM 발현 플라스미드 및 G11(EDA) 덴드리머를 사용한 D5 세포주의 형질감염을 예시한다. ICAM 유전자를 발현시키는 클론을 먼저 네오마이신 내성에 대하여 선택하였다. 플루오레세인과 콘쥬게이트화된 항-ICAM 항체를 사용하는 형광 활성화된 세포 분류법(FACS)에 의해 네오마이신 내성 클론을 더 분석하였다. 하기의 세포주 및 클론을 비교한다:

<1196> 1. D5 세포주, 항-ICAM 항체에 대하여 네가티브(염색되지 않음)

<1197> 2. IC-21 세포주, 항-ICAM 항체로 포지티브하게 염색됨

<1198> 3. DNA:덴드리머 전하비 1:10의, G11(EDA) 덴드리머 및 DNA 15㎍으로 형질감염시킨 후의 클론 #23

<1199> 4. 상기와 같이 수득한 클론 #27

<1200> 5. 상기와 같이 수득한 클론 #31

<1201> 6. 상기와 같이 수득한 클론 #9.

<1202> 점선으로 나타낸 포지티브하게 염색된 세포의 프로파일을, 형질감염에 사용된 ICAM 네가티브 대조군 D5 세포주(제 55A 도)의 프로파일에 겹쳐 놓았다. 이 결과는 DNA:덴드리머 형질감염에 의하여, 형질감염된 유전자로부터 다량의 ICAM을 발현시키는, 영구적인 세포주를 생성할 수 있었다는 것을 나타낸다.

<1203> 제 52 도, 제 53 도, 제 54 도, 제 55 도 및 제 59 도에서 볼수 있듯이, 4주째에서, G418 내성 및 β-갈락토시다제 유전자, 및 히그로마이신 내성 및 ICAM 유전자 모두를 계속 발현시키는 클론의 수는, 칼슘 포스페이트 또는 DEAE-덱스트란, 또는 리포펙타민™ 단독의 존재하에 형질감염을 시도한 경우에 비하여 본 발명에 따라(즉 유전물질과 가지형 중합체를 착체화시켜) 형질감염을 수행하였을 때 두드러진다. 이는 안정하게 형질감염된 세포주를 생성시키는 데 있어서 DNA:덴드리머에 의한 세포의 형질감염이 다른 이용가능한 기법보다 더욱 더 효과적임을 나타낸다.

<1204> 실시예 73: 다양한 전하비 및 3가지의 상이한 조건하에서 상이한 덴드리머 및 덴드리머 혼합물을 사용한 COS1 및 RAT2 세포의 형질감염 비교(제 61A 도 및 제 61B 도)

<1205> 이 실시예에서는, 시험 웰당 1㎍의 RSV-luc를 지시된 덴드리머 또는 대조군과 이하의 표 XXVI에 기술한 지시된 전하비로 착체화시켰다:

<1206> [표 XXVI]

샘플번호	형질감염 약제	유전물질:덴드리머 전하비
1	G8:G8.5 전하비 50의 G8(NH_3) 및 G8.5(NH_3) 덴드리머의 회합물 (이하의 실시예 74의 샘플 13)	1 : 10
2	상기 샘플 1과 동일함	1 : 20
3	상기 샘플 1과 동일함	1 : 50
4	G6:G6.5 전하비 100의 G6(NH_3) 및 G6.5(NH_3) 덴드리머의 회합물 (이하의 실시예 74의 샘플 8)	1 : 10
5	상기 샘플 4와 동일함	1 : 20
6	상기 샘플 4와 동일함	1 : 50
7	실시예 42의 샘플 Q, 다분산성 덴드리머 블렌드	1 : 10
8	상기 샘플 7과 동일함	1 : 50
9	G10(NH_3)	1 : 20
10	G10(NH_3)	1 : 50
11	리포펙타민™	적용불가능함: 제조사의 권고사항에 따라 사용함

<1208> 전술한 혼합물을 사용하여, 3가지의 상이한 조건하에 COS1(제 61A 도) 및 RAT2(제 61B 도) 세포를 형질감염시켰다. 3가지 조건 모두에서 DMEM은 필수적인 사용배지였다. 제 61A도 및 제 61B 도에서 반점찍힌 막대에 의해 나타낸 실시예에서는, 유전물질:덴드리머 착체를 단독으로 사용하였다. 빗금친 막대에 의해 나타낸 실시예에서는 0.5μM DEAE-덱스트란의 존재하에 형질감염을 수행하였다. 검은 막대로 도시되는 실시예에서는, 클로로퀸 25㎍/㎖의 존재하에 형질감염을 수행하였다.

<1209> 이 실험으로부터 얻은 결과는 클로로퀸의 효율성이 형질감염된 세포의 함수이고(제 61B 도); 적어도 일부 세포에서, 클로로퀸의 사용으로 인해 현저히 우수한 형질감염 효율을 얻음(제 61A 도)을 나타낸다.

<1210> 실시예 74: pH 조절된 덴드리머 회합물의 제조 및 이들 회합물의 형질감염 연구에의 사용

<1211> 말단 아미노기를 갖는 덴드리머 및 나트륨 카복실레이트기를 갖는 덴드리머의 용액으로부터 덴드리머 회합물을 제조하였다. 이 실시예에서 사용한 상이한 덴드리머의 비는 이하의 표 XXIV에 나와 있다:

<1212> [표 XXIV]

샘 플	$G_n.5$ NH_3	G_n NH_3	전하비 $G_n/G_n.5$
1	G6.5	G6	0.5
2	G6.5	G6	1
3	G6.5	G6	2.5
4	G6.5	G6	5
5	G6.5	G6	10
6	G6.5	G6	25
7	G6.5	G6	50
8	G6.5	G6	100
9	G6.5	G6	200
10	G6.5	G8	25
11	G6.5	G8	50
12	G6.5	G8	100
13	G8.5	G8	50
14	G8.5	G8	100
15	*	G6	*
16	*	G8	*

* 는 적용불가능함을 의미한다.

<1214> "5" 세대 수(예컨대, G8.5 및 G6.5)는 이들이 반세대 덴드리머(이 경우에는, 반세대 PAMAM 덴드

리머)임을 나타낸다. 반세대 열에서, 이들 덴드리머는 카복실레이트 말단인 반면에, 완전세대 열에서는 아미노 말단이다.

<1215> 전형적인 덴드리머 회합물 배합법을 이하에 기술한다. 원액은 트리스 완충액(pH 7.4)에서 G8.5(NH_3) 덴드리머(2.34중량%) 및 G8(MH_3) 덴드리머(2.28중량%)로 제조하였다. 50:1의 전하비로 덴드리머 회합물을 제조하기 위하여, G8.5(NH_3) 덴드리머 용액 8.8mg을 G8(NH_3) 덴드리머 용액 15.4mg와 혼합하였다. 그 다음, 얻어지는 용액을 트리스 완충액으로 희석시켜 전체 용액 중량 2.0689g으로 만들었다. 전체 용액 농도는 0.74중량%였다. 제 56도는 덴드리머 회합물로 형질감염시킨 후 RAT2 세포에서의 루시페라제 활성을 나타낸다. G6.5(NH_3)와 G8(NH_3) 덴드리머사이에 형성된 회합물 및 G8.5(NH_3)와 G8(NH_3) 덴드리머사이에 형성된 회합물은, 회합물 배합에 적당한 아미노-말단 덴드리머 대 나트륨 카복실레이트-말단 덴드리머 비를 사용하는 경우, 모 완전세대 덴드리머 자체와 비교할 때 크게 증진된 형질감염 효율을 나타낸다.

<1216> 실시예 75: 리신-개질된 덴드리머의 제조 및 개질된 덴드리머 벡터를 사용하는 형질감염 연구(제 57 도)

<1217> 무수 디메틸포름아미드 내의 G7(NH_3)(0.50g, 11μ몰) 용액에 N,N'-디-3급-부톡시카보닐-L-리신의 p-니트로페닐 에스테르를 신속하게 첨가하면서 세게 교반하였다. 약 5분 후에, 트리에틸아민으로 혼합물의 pH를 약 8.5로 조정하였다. 이 혼합물을 24시간동안 교반한 후, 세게 교반하면서 물에 천천히 첨가하였다. 그 다음, 트리에틸아민(0.6㎖) 및 포화 NaCl(35㎖)을 상기 수성 혼합물에 첨가한 후 2일동안 교반하였다. 상청액을 따라 내고, 회수한 조질의 생성물을 진공하에 40℃에서 12시간동안 건조시켰다. 건조시킨, 조절의 생성물을 디에틸에테르 중에서 세게 교반한 후, 추가의 디에틸에테르로 생성물을 세정하였다. 건조시킨 고체 생성물(0.96g, 수율 78%)의 NMR 분석결과는 N,N'-디-3급-부톡시카보닐-L-리신이 덴드리머의 표면에 결합한 것에 일치하였다.

<1218> 그 다음 생성물(0.35g, 3.3μ몰)을 무수 메틸렌 클로라이드에 용해시킨 후, 혼합물에 트리플루오로아세트산(3㎖)을 천천히 첨가함으로써 리신 잔기로부터 3급-부톡시카보닐 보호기를 제거하였다. 발생되는 기체를 질소 스트림으로 플라스크 밖으로 내보내었다. 3시간이 지난 후, 이 혼합물을 질소 스트림(40℃)하에 농축시킨 후, 샘플을 진공하에 건조시켰다. 조절의 생성물을 물 1리터에 대하여 24시간동안 투석하여(10,000 분자량 차단 멤브레인) 정제하였다. 입자화된 고체를 여과 및 진공하에서 농축시켜 제거한 후, 무색의 고체를 수득하였다(0.26g, 69% 수율). ^{1}H 및 ^{13}C 핵자기 공명 분광계, 크기배제 크로마토그래피, 모세관 전기영동 및 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동에 의한 생성물의 분석결과는 모두 정확한 구조를 나타내었다.

<1219> 제 57 도는 비개질된 G7(NH_3) 내지 G10(NH_3) 덴드리머(모두 1:10의 DNA 덴드리머 전하비 및 DEAE-덱스트란의 존재하에)와 비교하여, 리신-개질된 G7(NH_3) 덴드리머를 사용하여 RAT2 세포내로 형질감염시킨 경우에 생성되는 단백질 ㎍ 당 상대적 광단위를 나타낸다. 리신-개질된 덴드리머는 놀랍게도 같은 세대의 비개질된 덴드리머와 비교하여, 높은 형질감염 효율을 나타내며, 사실상 이 형질감염 효율은 비개질된 G10(NH_3) 덴드리머의 효율과 동등하다.

<1220> 실시예 76: 덴드리머의 다분산성 혼합물을 사용한, COS1 및 RAT2 세포주에서의 형질감염 효율(제 58 도)

<1221> 이 실시예에서는, 이하의 표 XXV에 나타낸 대로, DNA를 G11(EDA) 덴드리머, G11, G3, G2 및 G1(EDA) 덴드리머의 혼합물, 및 덴드리머의 다분산성 혼합물과 착체화시켰다.

<1222> [표 XXV]

샘 플	덴드리머 또는 대조군	DNA:덴드리머 전하비
1	G11(EDA)	1 : 10
1	G11(EDA)	1 : 20
1	G11(EDA)	1 : 100
2	혼합물 1(EDA)[a]	1 10
2	혼합물 1(EDA)[a]	1 : 20
2	혼합물 1(EDA)[a]	1 . 100
3	혼합물 2(EDA)[b]	1 : 10
3	혼합물 2(EDA)[b]	1 : 20
3	혼합물 2(EDA)[b]	1 . 100
4	Q[c]	1 · 10
4	Q[c]	1 : 20
4	Q[c]	1 . 100
5	리포펙타민 TM	6㎕
5	리포펙타민 TM	10㎕

a = G1(EDA), G2(EDA) 및 G3(EDA) 덴드리머의 혼합물
b = 90%의 G11(EDA) 및 10%의 혼합물 1의 혼합물
c = 실시예 42에서 기술한 덴드리머의 혼합물, 다분산성 덴드리머 블렌드

<1224> 상기 착체를 사용한 형질감염으로부터 얻은 결과를 제 58 도에 나타내었다. COS1 세포에서, 다분산성 혼합물로 얻은 형질감염 효율은 G11(EDA); G11, G1, G2 및 G3(EDA)의 혼합물; 또는 리포펙타민™으로 얻은 효율보다 훨씬 높았다. 이 차이는 특히 1:10 및 1:20의 DNA:덴드리머 전하비에서 크다. 그러나, COS1 및 RAT2 세포주에서 얻은 결과의 비교는, 같은 유형의 덴드리머 제조물을 사용한 두 세포에서의 형질감염 효율의 차이를 나타낸다. 예를 들어, 다분산성 혼합물(실시예 42의 덴드리머 Q)은 COS1 세포보다 RAT2 세포의 형질감염에 보다 덜 효과적인 것으로 보인다. 이 특성은 가능하게는 유전자 전달에 있어서 유용할 수 있다.

<1225> 실시예 77: (제 60 도, 패널 1 및 2)

<1226> DNA:덴드리머 착체를 생체내에서 세포를 형질감염시키는 데 사용할 수 있는지의 여부를 결정하기 위하여, D5 델라노린 세포를 동일 유전형의 마우스내에 피하 접종하였다. 직경이 약 0.5cm인 종양이 발생하며, 여기에 단독의 RSV-β-gal DNA 또는 G11(EDA) 덴드리머와 착체화된 RSV-β-gal DNA, 및 대조군으로서 단독의 덴드리머를 직접 주입하였다. 24시간 후에, 동물을 죽여, 종양을 포르말린에 고정시키고, 절개하고 X-gal로 염색시켜, β-갈락토시다제 효소의 발현을 검출하였다. 제 60 도의 패널 1에서 볼 수 있듯이, 기초 염색(덴드리머를 주입한 종양, 패널 2)에 비하여 DNA:덴드리머 착체를 주입한 종양에서는 상당한 수의 세포가 형질감염의 증거(X-gal 염색)를 나타내었다. 독성이나 또는 조직 손상의 증거는 어느 종양에서도 발견되지 않았다. DNA만을 주입한 종양의 염색은 발현의 증거를 보이지 않았으며 이는 생체내 형질감염이 DNA:덴드리머 착체의 사용에 의해 증진되었음을 나타낸다.

<1227> 실시예 78: 리신계의 비대칭-분지된 덴드리머 및 G8(NH_3) 및 G11(EDA) 조밀 별형 덴드리머로 형질감염시킨 후의 RAT2 세포내 루시페라제™ 활성의 비교(제 62 도)

<1228> 이 실시예에서는, 리신계의 비대칭-분지된 덴드리머를 조밀 별형 덴드리머와 형질감염 능력면에서 비교하였다. 리신계 덴드리머는 일반적으로 미국 특허 제 4,289,872 호, 제 4,360,646 호 및 제 4,410,688 호의 지시에 따라 제조하였다. DEAE-덱스트란의 존재하 및 부재하에 형질감염을 수행하였다. 모든 경우에 있어서, DNA:덴드리머의 전하비는 1:5이었다. 충분한 DNA:덴드리머 착체를 사용하여 시험 웰당 1㎍의 DNA를 수득하였다. 컬럼 1내지 16에 사용한 덴드리머는 하기와 같다:

<1229> 1. G1 TREN 코어 리신계의 비대칭 분지된 덴드리머;

<1230> 2. G3 TREN 코어 리신계의 비대칭 분지된 덴드리머;

<1231> 3. G3 TREN 코어 리신계의 비대칭 분지된 덴드리머;

<1232> 4. G4 TREN 코어 리신계의 비대칭 분지된 덴드리머;

<1233> 5. G5 TREN 코어 리신계의 비대칭 분지된 덴드리머;

<1234> 6. G1 BHA 코어 리신계의 비대칭 분지된 덴드리머 트리플루오로아세테이트 염;

<1235> 7. G2 BHA 코어 리신계의 비대칭 분지된 덴드리머 트리플루오로아세테이트 염;

<1236> 8. G3 BHA 코어 리신계의 비대칭 분지된 덴드리머 트리플루오로아세테이트 염;

<1237> 9. G4 BHA 코어 리신계의 비대칭 분지된 덴드리머 트리플루오로아세테이트 염;

<1238> 10. G5 BHA 코어 리신계의 비대칭 분지된 덴드리머 트리플루오로아세테이트 염;

<1239> 11. G6 BHA 코어 리신계의 비대칭 분지된 덴드리머 트리플루오로아세테이트 염;

<1240> 12. G7 BHA 코어 리신계의 비대칭 분지된 덴드리머 트리플루오로아세테이트 염;

<1241> 13. G8 BHA 코어 리신계의 비대칭 분지된 덴드리머 트리플루오로아세테이트 염;

<1242> 14. G8 BHA 코어 리신계의 비대칭 분지된 덴드리머 유리 아민(트리플루오로아세테이트 염이 없음);

<1243> 15. G8(NH_3) 조밀 별형 덴드리머; 및

<1244> 16. G11(EDA) 조밀 별형 덴드리머.

<1245> 제 62 도에서 볼 수 있듯이, 리신계의 비대칭 분지된 덴드리머는, 적어도 TREN 코어를 갖는, G4 및 G5에서 상당한 형질감염을 나타내기 시작한다. 비대칭 분지된 덴드리머의 트리플루오로아세테이트 염은 BHA 코어 덴드리머의 경우에 형질감염을 다소 저해하는 것 같다. 트리플루오로아세테이트 염이 없는 G8 BHA 코어 덴드리머는 양호한 형질감염을 나타내는 것으로 보인다.

<1246> 조밀 별형 덴드리머의 경우와 같이, 리신계의 비대칭 분지된 덴드리머는 모두 DEAE-덱스트란의 존재하에 1:5의 DNA:덴드리머 전하비에서 우수한 형질감염을 나타낸다.

<1247> 본 발명의 다른 태양은, 당해 분야의 숙련자라면 본 명세서의 요지 또는 본원에 개시된 발명의 실시로부터 알 수 있을 것이다. 본 명세서 및 실시예는 단지 예로서 간주해야 하며, 본 발명의 정확한 범위및 요지를 하기의 청구항으로 나타낸다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

하나 이상의 생물반응 개질제 한 단위 이상과 회합된 조밀별형 중합체 하나 이상을 포함하는 조밀 별형 중합체 콘쥬게이트(dense star polymer conjugate)로서,

이 때, 상기 조밀 별형 중합체가 하나 이상의 용매 가용성의 방사상 대칭 덴드리머를 포함하고, 이 때 덴드리머는 코어로부터 뻗어나온 하나 이상의 코어 분지를 갖고 상기 분지는 하나 이상의 말단기를 가지며,

단, (1) 말단기 대 코어 분지의 비가 2 이상이고, (2) 중합체의 단위 용적당 말단기의 밀도가, 유사한 코어 및 단량체 잔기, 및 동등한 분자량 및 코어 분지 수를 갖고 각 분지가 단 하나의 말단기를 갖는 연장된 통상의 별형 중합체의 1.5배 이상이며, (3) 분자용적이, 눈금을 새긴 코레이-파울링(scaled Corey-Pauling) 분자 모델을 사용한 치수 연구에 의해 측정된 상기 연장된 통상의 별형 중합체의 분자 용적의 약 80% 이하이고, 규칙적인 가지형 분지를 가지며;

상기 생물반응 개질제가, 복수의 덴드리머 입자 사이로 연장되고 이들을 서로 연결시키는 유전물질이고;

상기 유전 물질 대 덴드리머의 전하비가 1:1 내지 1:100인 콘쥬게이트.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

2개 이상의 생물반응 개질제가 존재하는 콘쥬게이트.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 조밀 별형 중합체가 주로 아미노 작용성 표면 기를 포함하는 콘쥬게이트.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 조밀 별형 중합체가 약 50Å 이상의 단면 치수를 갖고,

상기 치수가 상기 조밀 별형 중합제의 가장 좁은 치수인 콘쥬게이트.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 유전 물질 대 덴드리머의 전하비가 1:1 내지 1:15인 콘쥬게이트.

청구항 6

하기 일반식(II)의 조밀 별형 중합체 콘쥬게이트:

$$(T)_e * (P)_x * (M)_y \qquad (II)$$

상기 식에서,

각 P는 조밀 별형 중합체이고;

x는 1 이상의 정수이고;

각 M은 한 단위 이상의 생물반응 개질제이고, 이 때 상기 생물반응 개질제는 동일한 생물반응 개질제 또는 상이한 생물반응 개질제일 수 있고;

y는 1 이상의 정수이고;

각 T는 하나 이상의 표적 지향제(target director)이고;

e는 1 이상의 정수이고;

*는 생물반응 개질제가 조밀 별형 중합체와 회합되었음을 나타내며;

이 때, 상기 조밀 별형 중합체가 하나 이상의 용매 가용성의 방사상 대칭 덴드리머를 포함하고, 이 때 덴드리머는 코어로부터 뻗어나온 하나 이상의 코어 분지를 갖고 상기 분지는 하나 이상의 말단기를 가지며,

단, (1) 말단기 대 코어 분지의 비가 2 이상이고, (2) 중합체의 단위 용적당 말단기의 밀도가, 유사한 코어 및 단량체 잔기, 및 동등한 분자량 및 코어 분지 수를 갖고 각 분지가 단 하나의 말단기를 갖는 연장된 통상의 별형 중합체의 1.5배 이상이며, (3) 분자용적이, 눈금을 새긴 코레이-파울링 분자 모델을 사용한 치수 연구에 의해 측정된 상기 연장된 통상의 별형 중합체의 분자 용적의 약 80% 이하이고, 규칙적인 가지형 분지를 가지며;

상기 생물반응 개질제가, 복수의 덴드리머 입자 사이로 연장되고 이들을 서로 연결시키는 유전물질이고;

상기 유전 물질 대 덴드리머의 전하비가 1:1 내지 1:100이고,

단, 생물반응 개질제는 그 효능을 유지한다.

청구항 7

하기 일반식(III)의 조밀 별형 중합체 콘쥬게이트:

$$[(T)_e\text{-}(C')_f]_g * (P)_x * [(C'')_h\text{-}(M)_y]_k \qquad (III)$$

상기 식에서,

각 C'는 동일하거나 또는 상이한 연결기이고;

각 C"는 동일하거나 또는 상이한 연결기이고;

g 및 k는 각각 독립적으로 1 이상의 정수이고;

e는 1 이상의 정수이고;

f 및 h는 각각 독립적으로 0 이상의 정수이고;

-은 연결기가 존재할 경우 공유결합을 나타내고;

각 P는 조밀 별형 중합체이고;

x는 1 이상의 정수이고;

T는 표적 지향제이고;

각 M은 한 단위 이상의 생물반응 개질제이고;

y는 1 이상의 정수이고;

*는 운반되는 생물반응 개질제가 중합체와 회합되었음을 나타내며;

이 때, 상기 조밀 별형 중합체가 하나 이상의 용매 가용성의 방사상 대칭 덴드리머를 포함하고, 이 때 덴드리머는 코어로부터 뻗어나온 하나 이상의 코어 분지를 갖고 상기 분지를 하나 이상의 말단기를 가지며,

단, (1) 말단기 대 코어 분지의 비가 2 이상이고, (2) 중합체의 단위 용적당 말단기의 밀도가, 유사한 코어 및 단량체 잔기, 및 동등한 분자량 및 코어 분지 수를 갖고 각 분지가 단 하나의 말단기를 갖는 연장된 통상의 별형 중합체의 1.5배 이상이며, (3) 분자용적이, 눈금을 새긴 코레이-파울링 분자 모델을 사용한 치수 연구에 의해 측정된 상기 연장된 통상의 별형 중합체의 분자 용적의 약 80% 이하이고, 규칙적인 가지형 분지를 가지며;

상기 생물반응 개질제가, 복수의 덴드리머 입자 사이로 연장되고 이들을 서로 연결시키는 유전물질이고;

상기 유전 물질 대 덴드리머의 전하비가 1:1 내지 1:100이고,

단, 운반되는 생물반응 개질제는 그 효능을 유지한다.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 덴드리머가 폴리아미도아민 또는 폴리알킬렌이민인 콘쥬게이트.

청구항 9

제 6 항, 제 7 항 또는 제 8 항에 있어서,

상기 표적 지향제 T가 다클론성 또는 단클론성 항체 또는 그의 단편인 콘쥬게이트.

청구항 10

제 6 항, 제 7 항 또는 제 8 항에 있어서,

진단 약제로 사용하기 위한 콘쥬게이트.

청구항 11

한 단위 이상의 유전물질과 착체화된 가지형 중합체 하나 이상을 포함하는 조성물로서,

이 때, 상기 가지형 중합체가 중합체 표면의 상당 부분에 걸쳐 양전하의 표면 작용성을 갖는 가지형 중합체를 포함하고, 상기 유전물질 대 가지형 중합체가 1:1 내지 1:100의 전하비로 착체화되고;

이 때 상기 가지형 중합체는 코어로부터 뻗어나온 하나 이상의 코어 분지를 갖고, 상기 분지를 하나 이상의 말단기를 가지며,

단, (1) 말단기 대 코어 분지의 비가 2 이상이고, (2) 중합체의 단위 용적당 말단기의 밀도가, 유사한 코어 및 단량체 잔기, 및 동등한 분자량 및 코어 분지 수를 갖고 각 분지가 단 하나의 말단기를 갖는 연장된 통상의 별형 중합체의 1.5배 이상이며, (3) 분자용적이, 눈금을 새긴 코레이-파울링 분자 모델을 사용한 치수 연구에 의해 측정된 상기 연장된 통상의 별형 중합체의 분자 용적의 약 80% 이하이고, 규칙적인 가지형 분지를 가지며;

상기 유전물질이 복수의 가지형 중합체 입자 사이로 연장되고 이들을 서로 연결시키는 조성물.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 양전하의 표면 작용성이 가지형 중합체 표면의 아미노기에 의해 생성되는 조성물.

청구항 13

제 11 항 또는 제 12 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가 덴드리머 표면의 75% 이상에 걸쳐 양전하의 표면 작용성을 갖는 덴드리머를 포함하는 조성물.

청구항 14

제 11 항 또는 제 12 항에 있어서,

DEAE-덱스트란 또는 글리세롤을 함유한 용액중에 가지형 중합체와 유전물질의 착체를 포함하는 조성물.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

상기 유전물질 및 상기 가지형 중합체가 1:1 내지 1:15의 전하비로 착체화되는 조성물.

청구항 16

제 14 항에 있어서,

상기 유전물질 및 상기 가지형 중합체가 1:5 내지 1:10의 전하비로 착체화되는 조성물.

청구항 17

제 14 항에 있어서,

상기 착체가 0.125 내지 2μM 농도의 DEAE-덱스트란을 함유한 용액 중에 존재하는 조성물.

청구항 18

제 17 항에 있어서,

상기 조성물 중의 DEAE-덱스트란의 농도가 0.25 내지 1μM인 조성물.

청구항 19

제 14 항에 있어서,

상기 착체가 2.0 내지 10.0용량% 농도의 글리세롤을 함유한 용액중에 존재하는 조성물.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

상기 착체가 2.0 내지 5.0중량% 농도의 글리세롤을 함유한 용액중에 존재하는 조성물.

청구항 21

제 14 항에 있어서,

상기 조성물이 DMSO를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 22

제 14 항에 있어서,

상기 조성물이 클로로퀸을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 23

제 11 항에 있어서,

표적 지향제가 상기 가지형 중합체와 회합되는 조성물.

청구항 24

제 11 항에 있어서,

상기 유전물질 및 상기 가지형 중합체가 1:1 내지 1:15의 전하비로 착체화되는 조성물.

청구항 25

제 24 항에 있어서,

상기 유전물질 및 상기 가지형 중합체가 3:1 내지 1:10의 전하비로 착체화되는 조성물.

청구항 26

제 23 항, 제 24 항 또는 제 25 항에 있어서,

DEAE-덱스트란 또는 글리세롤을 함유한 용액중에 가지형 중합체와 유전물질의 착체를 포함하는 조성물.

청구항 27

제 23 항에 있어서,

상기 표적 지향제가 다클론성 또는 단클론성 항체 또는 그의 단편인 조성물.

청구항 28

제 23 항에 있어서,

상기 표적 지향제가 갈락토스 트리사카라이드, 바이오틴, 피루브산, 인슐린 또는 아비딘인 조성물.

청구항 29

제 11 항, 제 23 항 또는 제 24 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가 20Å 최소 치수 내지 1,000Å 최대치수의 입자를 포함하는 조성물.

청구항 30

제 29 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가 형태상 일반적으로 구형, 타원형 또는 막대형인 조밀 별형 덴드리머를 포함하는 조성물.

청구항 31

제 11 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가 양전하의 표면 작용성을 갖는 덴드리머와 음전하의 표면 작용성을 갖는 덴드리머의 25:1 내지 100:1의 양전하:음전하 비의 회합물을 포함하는 조성물.

청구항 32

제 11 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가, 그 표면의 상당 부분에 걸쳐 실질적으로 그 표면에만 아미노산을 갖는 조밀 별형 중합체를 포함하는 조성물.

청구항 33

제 32 항에 있어서,

상기 아미노산이 리신 또는 아르기닌인 조성물.

청구항 34

제 11 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가 가교된 조밀 별형 덴드리머의 회합물을 포함하는 조성물.

청구항 35

제 11 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가, 최소 치수 약 20Å의 직경을 갖는 입자로부터 약 110Å의 직경을 갖는 입자까지, 상이한 크기의 덴드리머 입자의 분산물을 포함하고, 상기 분산물 중 중간 직경의 다른 입자가 존재하는 조성물.

청구항 36

제 11 항, 제 12 항, 제 23 항, 제 24 항, 제 25 항, 제 27 항 또는 제 28 항에 있어서,

유전물질이, 제1 가지형 중합체보다 큰 제2 가지형 중합체를 함유하는 용액중에 들어 있는 제1 가지형 중합체와 착체화된 조성물.

청구항 37

제 36 항에 있어서,

상기 제 1 및 제 2 가지형 중합체가 조밀 별형 중합체인 조성물.

청구항 38

제 36 항에 있어서,

상기 제1 가지형 중합체가 22 내지 50Å 최소 직경을 갖고,

상기 제2 가지형 중합체가 50 내지 1,000Å 최소 직경을 갖는 조성물.

청구항 39

제 38 항에 있어서,

상기 제1 및 제2 가지형 중합체 중 하나 또는 둘 모두가 구형의 덴드리머를 포함하는 조성물.

청구항 40

제 39 항에 있어서,

상기 제1 및 제2가지형 중합체 둘 모두가 구형의 덴드리머를 포함하는 조성물.

청구항 41

제 11 항, 제 12 항, 제 23 항 또는 제 24 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가 비대칭 분지된 가지형 중합체를 포함하는 조성물.

청구항 42

제 41 항에 있어서

상기 비대칭 분지된 가지형 중합체의 단량체 구성 블록이 아미노산인

조성물.

청구항 43

제 42 항에 있어서,

상기 아미노산이 리신 또는 아르기닌인 조성물.

청구항 44

제 11 항, 제 12 항, 제 23 항, 제 24 항 또는 제 25 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가, 양전하의 표면 작용성을 갖는 덴드리머와 음전하의 표면 작용성을 갖는 덴드리머의 25:1 내지 100:1의 양전하:음전하 비의 회합물을 포함하는 조성물.

청구항 45

제 11 항, 제 12 항, 제 23 항, 제 24 항 또는 제 25 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가 그 표면의 상당 부분에 걸쳐 실질적으로 그 표면에만 아미노산을 갖는 조밀 별형 중합체를 포함하는 조성물.

청구항 46

제 45 항에 있어서,

상기 아미노산이 리신 또는 아르기닌인 조성물.

청구항 47

제 11 항, 제 12 항, 제 23 항, 제 24 항 또는 제 25 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가, 최소 치수 약 20Å의 직경을 갖는 입자부터 약 110Å의 직경을 갖는 입자까지, 상이한 크기의 덴드리머 입자의 분산물을 포함하고, 상기 분산물 중 중간 직경의 다른 입자가 존재하는 조성물.

청구항 48

제 11 항, 제 12 항, 제 23 항, 제 24 항 또는 제 25 항에 있어서,

상기 조성물이 클로로퀸을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 49

하나 이상의 약학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체를 함유하는, 제 1 항, 제 2 항, 제 4 항, 제 5 항 내지 제 7 항, 제 제 8 항, 제 11 항, 제 12 항, 제 23 항, 제 24 항, 제 25 항, 제 27 항, 제 28 항, 제 31 항 내지 제 34 항, 제 36 항 중 어느 한 항에 따른 콘쥬게이트 또는 조성물을 포함하는 제제.

청구항 50

유전물질과 가지형 중합체의 착체화를 용이하게 하는 온도하에 적합한 용매내에서 상기 가지형 중합체와 상기 유전물질을 반응시키는 단계, 및

상기 착체를 DEAE-덱스트란 또는 글리세롤을 함유하는 용액에 넣는 단계를 포함하는, 가지형 중합체와 유전물질의 착체를 제조하는 방법.

청구항 51

제 50 항에 있어서,

상기 가지형 중합체를 유전물질과 착체화시키기 전에 표적 지향제를 상기 가지형 중합체에 결합시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 52

제 50 항 또는 제 51 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가 주로 양이온성 표면을 가지고, 상기 방법이 유전물질을 상기 가지형 중합체에 정전기적으로 결합시켜 상기 착체를 생성시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 53

유전물질과 제1 가지형 중합체의 회합을 용이하게 하는 온도하에 적합한 용매내에서 제1 가지형 중합체와 유전물질을 반응시킴으로써 유전물질을 상기 제1 가지형 중합체와 착체화시키는 단계; 및

상기 제1 가지형 중합체보다 큰 제2 가지형 중합체를 함유하는 용액에 상기 착체를 넣는 단계를 포함하는, 가지형 중합체-유전물질 착체를 형성시키는 방법.

청구항 54

제 53 항에 있어서,

상기 가지형 중합체를 유전물질과 착체화시키기 전에 표적 지향제를 상기 가지형 중합체에 결합시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 55

제 53 항 또는 제 54 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가 주로 양이온성 표면을 가지고, 상기 방법이 상기 유전물질을 상기 가지형 중합체에 정전기적으로 결합시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 56

1 내지 10㎍/㎖의 최종 농도를 얻기에 충분한 유전물질을 양전하의 표면 작용성을 갖는 충분한 가지형 중합체와 물중에서 혼합하여, 1:1 내지 1:100의 유전물질:가지형 중합체 전하비를 얻는 단계를 포함하는, 가지형 중합체-유전물질 착체를 형성시키는 방법.

청구항 57

제 56 항에 있어서,

상기 착체가 형성된 후 이 착체에 충분한 DEAE-덱스트란을 첨가하여, 0.125 내지 2μM DEAE-덱스트란 농도를 얻는 단계를 포함하는 방법.

청구항 58

제 56 항에 있어서,

상기 전하비가 1:1 내지 1:15인 방법.

청구항 59

제 58 항에 있어서,

상기 전하비가 1:5 내지 1:10인 방법.

청구항 60

제 56 항 및 제 57 항 내지 59 항 중 어느 한 항에 있어서,

충분한 DEAE-덱스트란을 첨가하여 0.25 내지 1μM의 DEAE-덱스트란 농도를 얻는 방법.

청구항 61

제 56 항 및 제 57 항 내지 제 59 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가 50Å의 최소 직경 내지 1,000Å의 최대 직경을 갖는 방법.

청구항 62

제 56 항 및 제 57 항 내지 제 59 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가, 최소 치수 20Å의 직경을 갖는 입자부터 110Å의 직경을 갖는 입자까지, 상이한 크기의 덴드리머 입자의 분산물을 포함하고, 상기 분산물 중 중간 직경의 다른 입자가 존재하는 방법.

청구항 63

제 56 항 및 제 57 항 내지 제 59 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 가지형 중합제가 양전하의 표면 작용성을 갖는 덴드리머와 음전하의 표면 작용성을 갖는 덴

드리머의 25:1 내지 100:1의 양전하:음전하 비의 회합물을 포함하고, 상기 회합물의 직경이 약 1,000Å 이하인 방법.

청구항 64

제 56 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가 그 표면의 상당 부분에 걸쳐 실질적으로 그 표면에만 아미노산을 갖는 조밀 별형 중합체를 포함하는 방법.

청구항 65

제 64 항에 있어서,

상기 아미노산이 리신 또는 아르기닌인 방법.

청구항 66

제 56 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가 22 내지 50Å의 최소 직경을 갖는 비교적 작은 덴드리머 입자를 포함하고;

상기 착체를 형성시킨 후 최소 직경이 50 내지 110Å 가지형 중합체를 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 67

제 56 항, 제 57 항 내지 제 59 항 및 제 64 항 내지 제제 66 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 가지형 중합체 입자가 이에 결합된 표적 지향제 잔기를 포함하는 방법.

청구항 68

제 56 항 및 제 57 항 내지 제 59 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 착체가 형성된 후 이 착체에 충분한 글리세롤을 첨가하여, 2 내지 10중량% 글리세롤 농도를 얻는 단계를 포함하는 방법.

청구항 69

제 68 항에 있어서,

상기 글리세롤 농도가 2 내지 5중량%인 방법.

청구항 70

제 68 항에 있어서,

상기 전하비가 1:1 내지 1:15인 방법.

청구항 71

제 67 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가 약 50Å의 최소 직경 내지 약 1,000Å의 최대 직경을 갖는 방법.

청구항 72

5 내지 10의 pH, 및 20 내지 40℃의 온도하에, 1 내지 10㎍/20㎕의 농도를 얻기에 충분한 유전물질을 양전하 표면 작용성을 갖는 충분한 가지형 중합체와 물중에서 혼합하여, 1:1 내지 1:100의 유전물질:가지형 중합체 전하비를 얻는 단계를 포함하는, 사용시 희석할 수 있는 농축된 가지형 중합체-유전물질 착체를 형성시키는 방법.

청구항 73

제 72 항에 있어서,

상기 전하비가 1:1 내지 1:15인 방법.

청구항 74

제 73 항에 있어서,

상기 전하비가 1:5 내지 1:10인 방법.

청구항 75

제 72 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가 약 50Å의 최소 직경 내지 약 1,000Å의 최대 직경을 갖는 방법.

청구항 76

제 72 항 및 제 73 항 내지 제 75 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가, 최소 치수 약 20Å의 직경을 갖는 입자부터 약 110Å의 직경을 갖는 입자까지, 상이한 크기의 덴드리머 입자의 분산물을 포함하고, 상기 분산물 중 중간 직경의 다른 입자가 존재하는 방법.

청구항 77

제 72 항, 제 73 항 또는 제 74 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가 양전하의 표면 작용성을 갖는 덴드리머와 음전하의 표면 작용성을 갖는 덴드리머의 25:1 내지 100:1의 양전하:음전하 비의 회합물을 포함하고, 상기 회합물의 직경이 약 1,000Å 이하인 방법.

청구항 78

제 76 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가 그 표면의 상당 부분에 걸쳐 실질적으로 그 표면에만 아미노산을 갖는 조밀 별형 중합체를 포함하는 방법.

청구항 79

제 78 항에 있어서,

상기 아미노산이 리신 또는 아르기닌인 방법.

청구항 80

제 72 항, 제 73 항 또는 제 74 항에 있어서,

상기 가지형 중합체 입자가 이에 결합된 표적 지향제 잔기를 포함하는 방법.

청구항 81

제 80 항에 있어서,

상기 가지형 중합체가 22 내지 50Å 최소 직경을 갖는 비교적 작은 덴드리머 입자를 포함하고;

상기 착체가 형성된 후 그 입자가 50 내지 110Å의 최소 직경을 갖는 가지형 중합체를 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 82

제 11 항에 있어서,

유전물질의 세포 형질감염(transfection) 및 생체내 이용을 달성하기 위한 조성물.

청구항 83

제 11 항에 있어서,

유전물질을 세포막을 통하여 세포내 핵으로 수송하기 위한 조성물.

청구항 84

제 11 항에 있어서,

유전물질을 세포로 수송하고 세포내로 형질감염시키는 도중 분해로부터 보호하기 위한 조성물.

청구항 85

제 14 항에 있어서,

유전물질의 세포 형질감염 및 생체내 이용을 달성하기 위한 조성물.

청구항 86

제 85 항에 있어서,

표적 지향제가 상기 가지형 중합체에 결합되는 조성물.

청구항 87

제 36 항에 있어서,

유전물질의 형질감염 및 생체내 이용을 달성하기 위한 조성물.

청구항 88

제 87 항에 있어서,

제1 및 제2 가지형 중합체 중 하나 이상이 표적 지향제에 결합되는 조성물.

요약

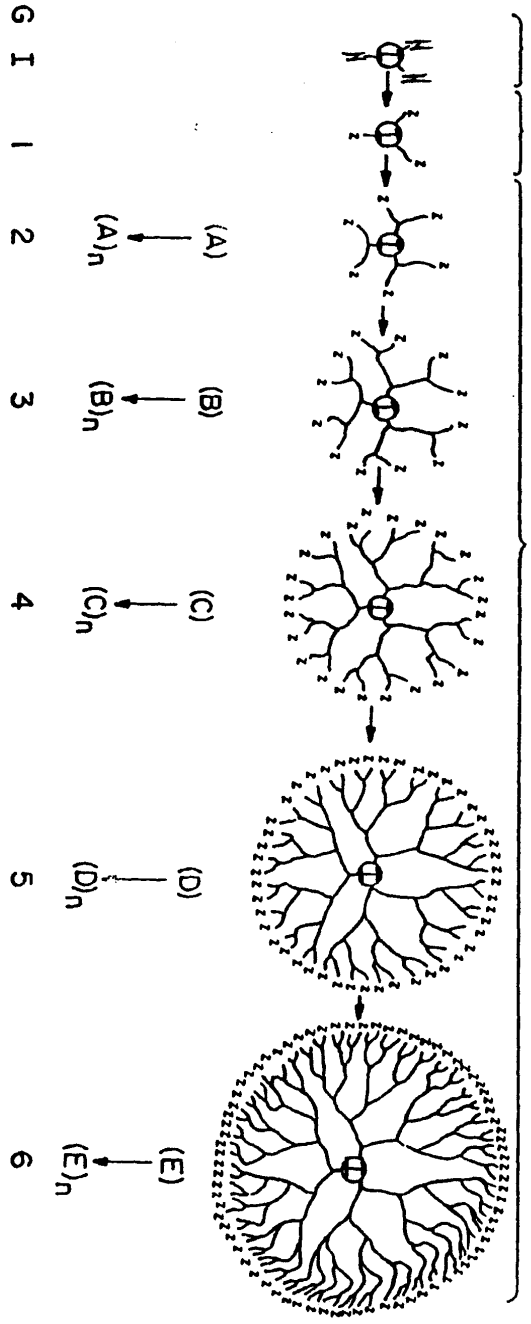
생물반응 개질제가 될 수 있는 한 단위 이상의 운반물질과 회합된 하나 이상의 덴드리머를 포함하는 구성된 가지형 중합체 콘쥬게이트를 제조하였다. 이 콘쥬게이트는 또한 표적 지향제를 가질 수 있으며, 표적 지향제가 존재하는 경우 운반물질은 생물활성 약제일 수 있다. 바람직한 가지형 중합체는 생물반응 개질제와 착체화된 조밀 별형 중합체이다. 이들 콘쥬게이트 및 착체는 이들의 독특한 특성으로 인해 특히 유리한 특성을 갖는다.

대표도

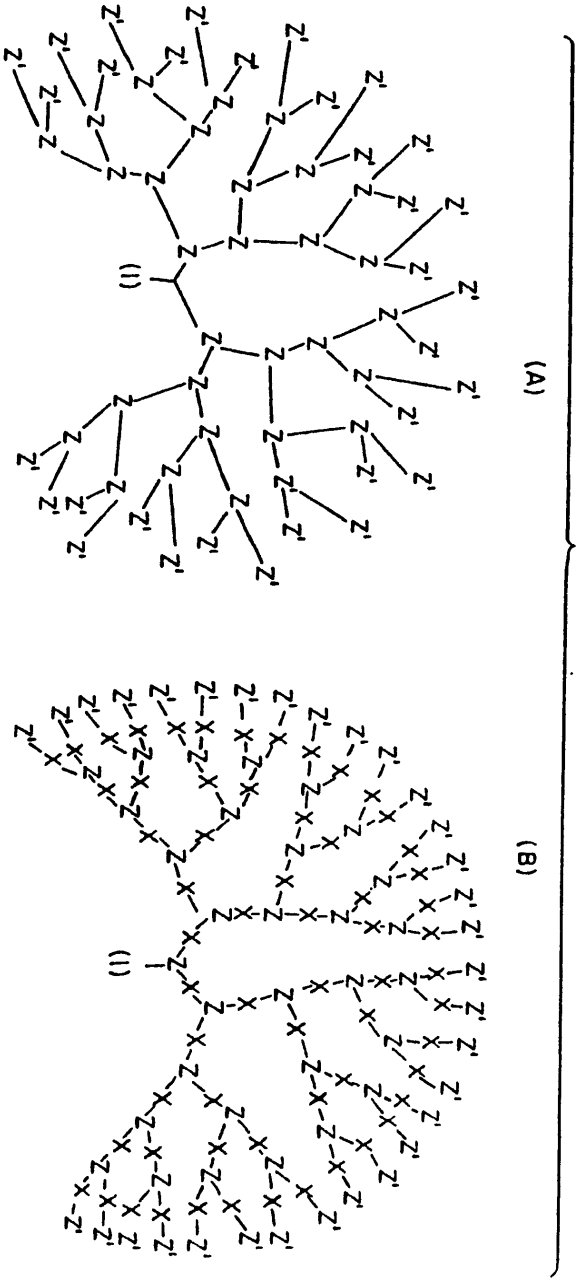
도1

도면

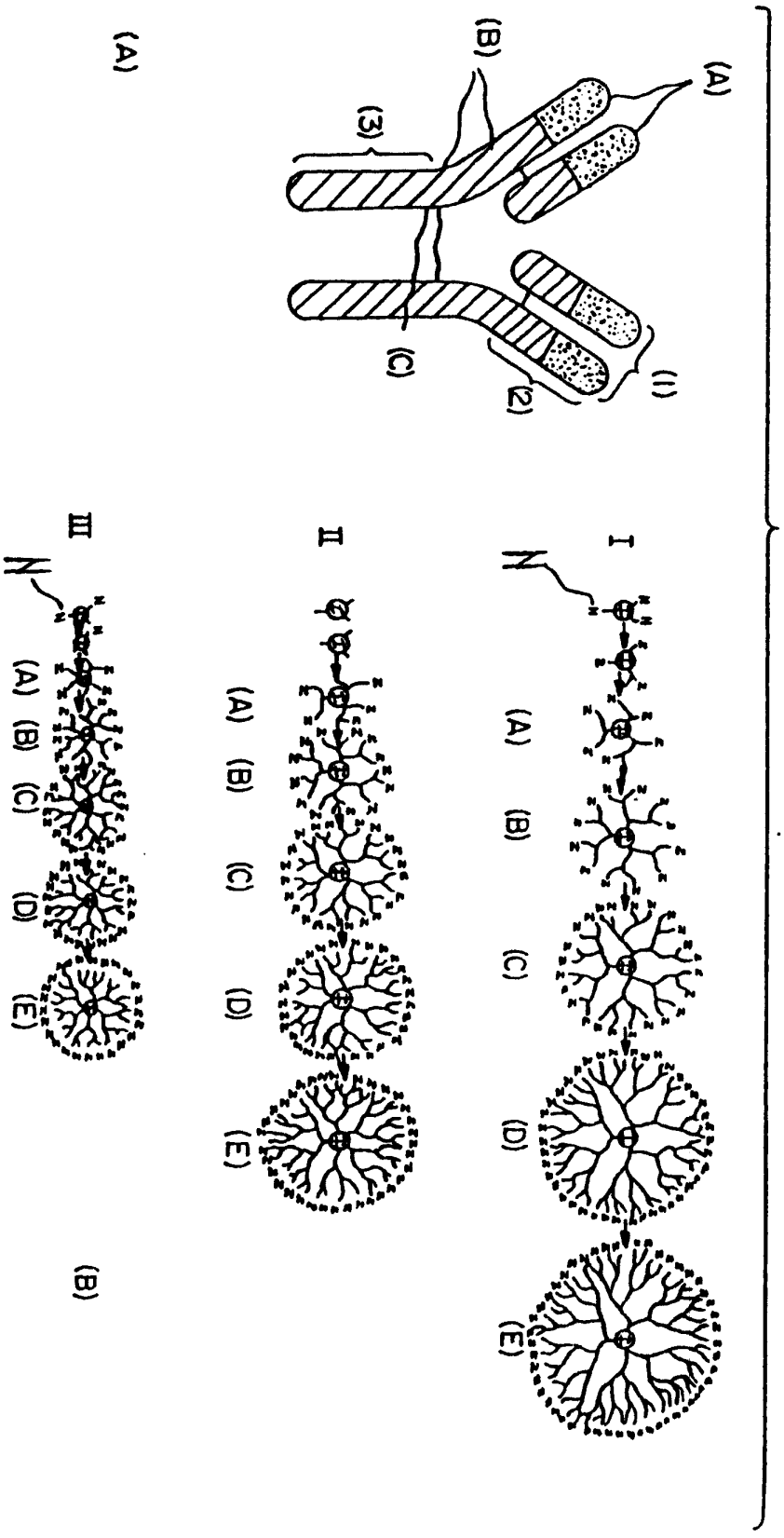
도면1



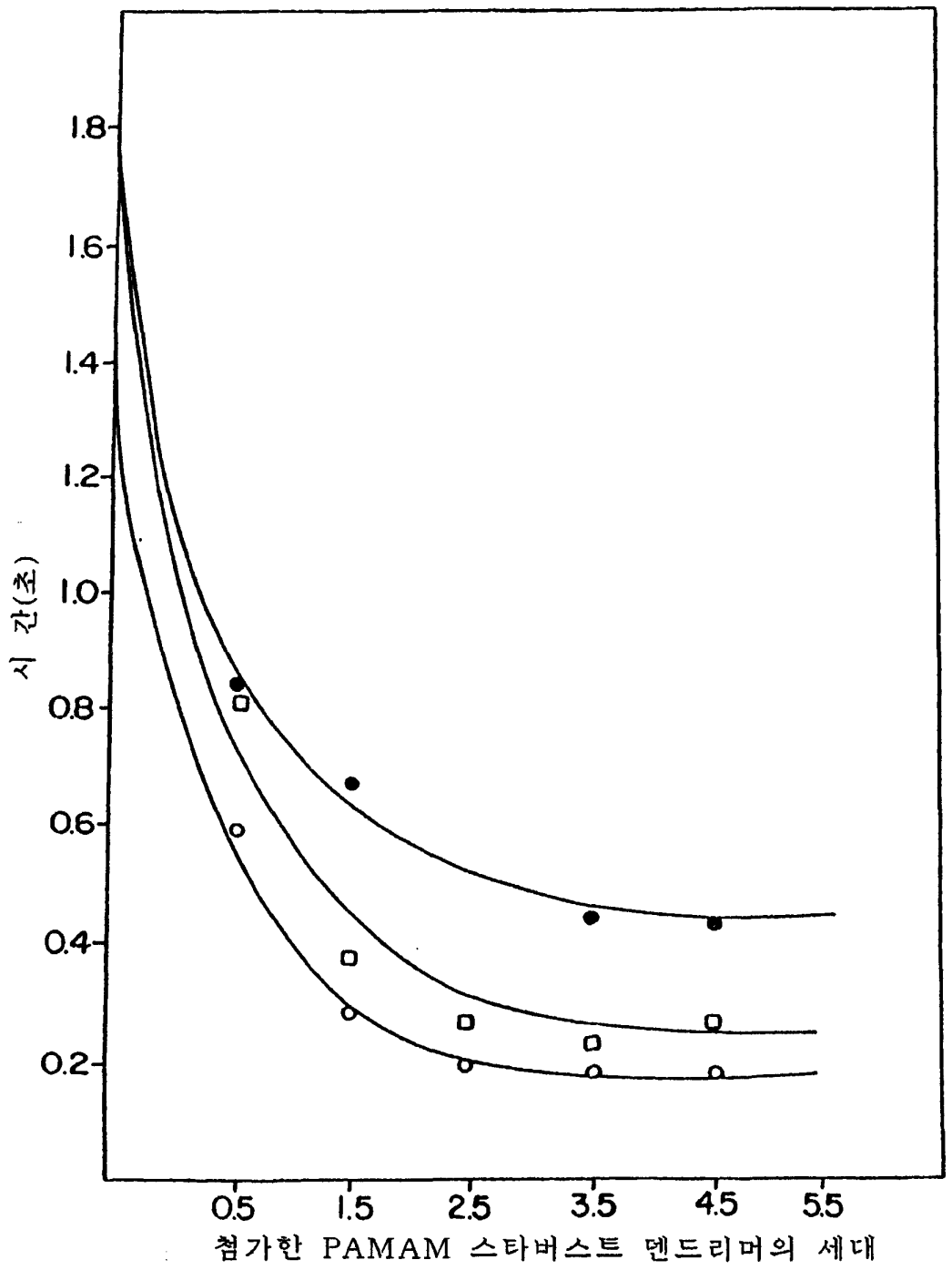
도면2



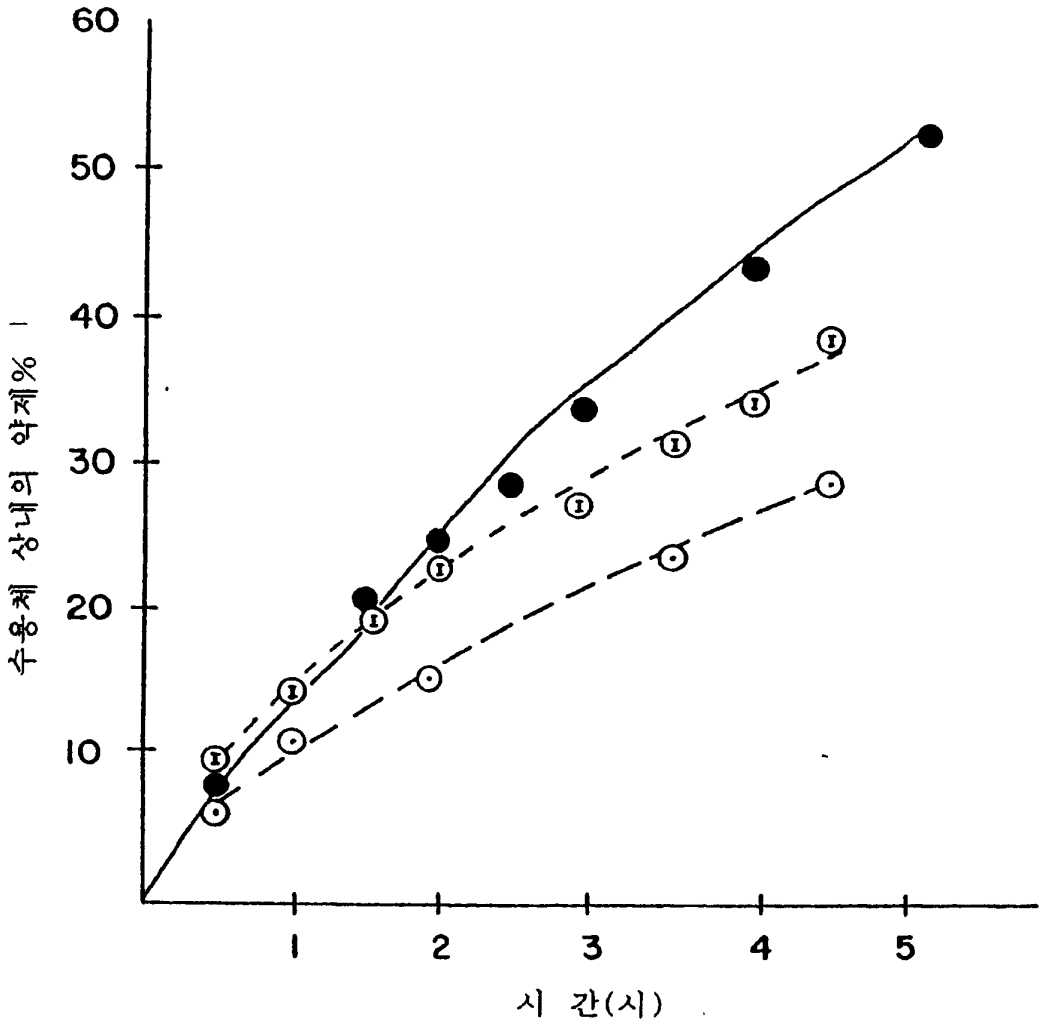
도면3



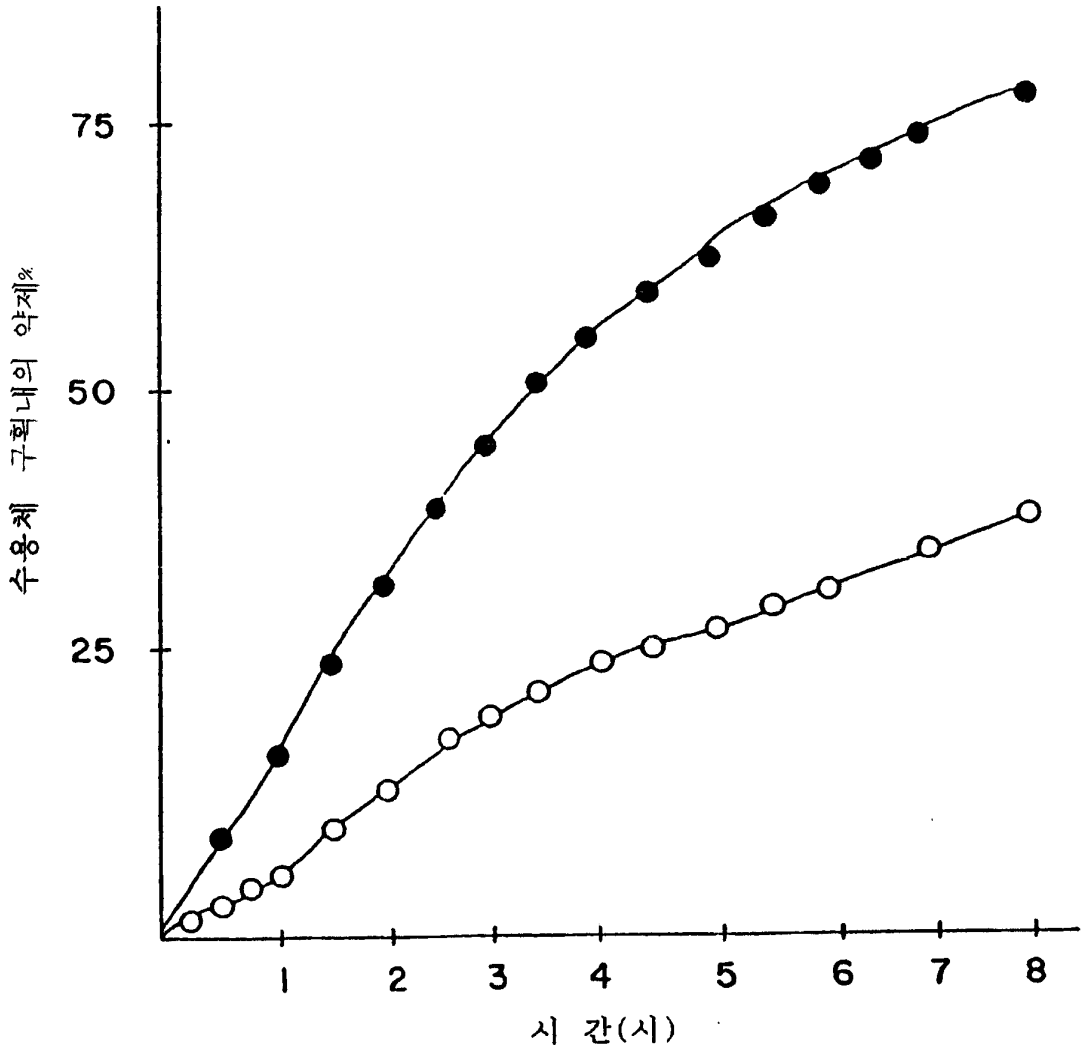
도면4


1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
시 간(초)
0.5
1.5
2.5
3.5
4.5
5.5
첨가한 PAMAM 스타버스트 덴드리머의 세대

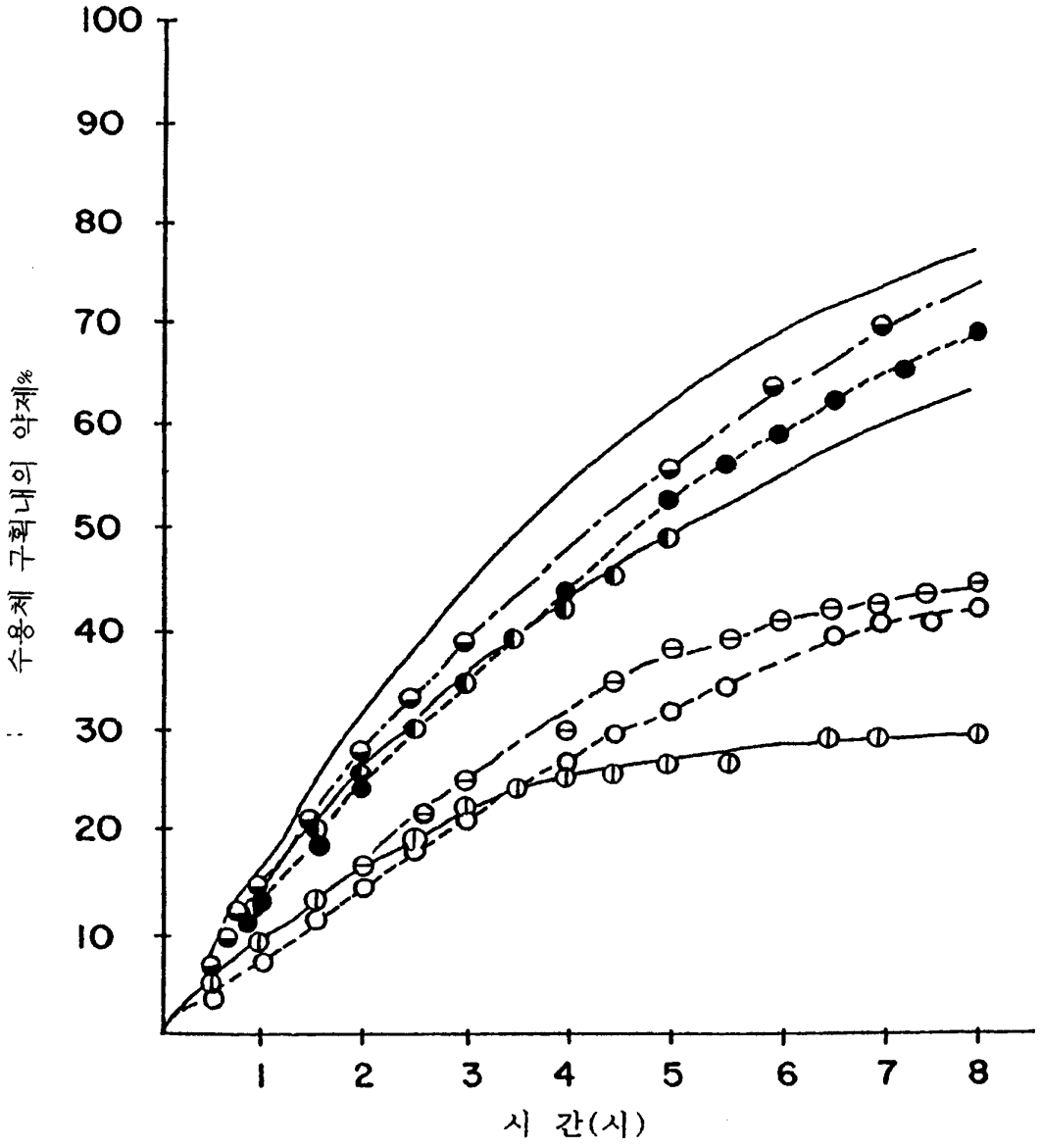
도면5



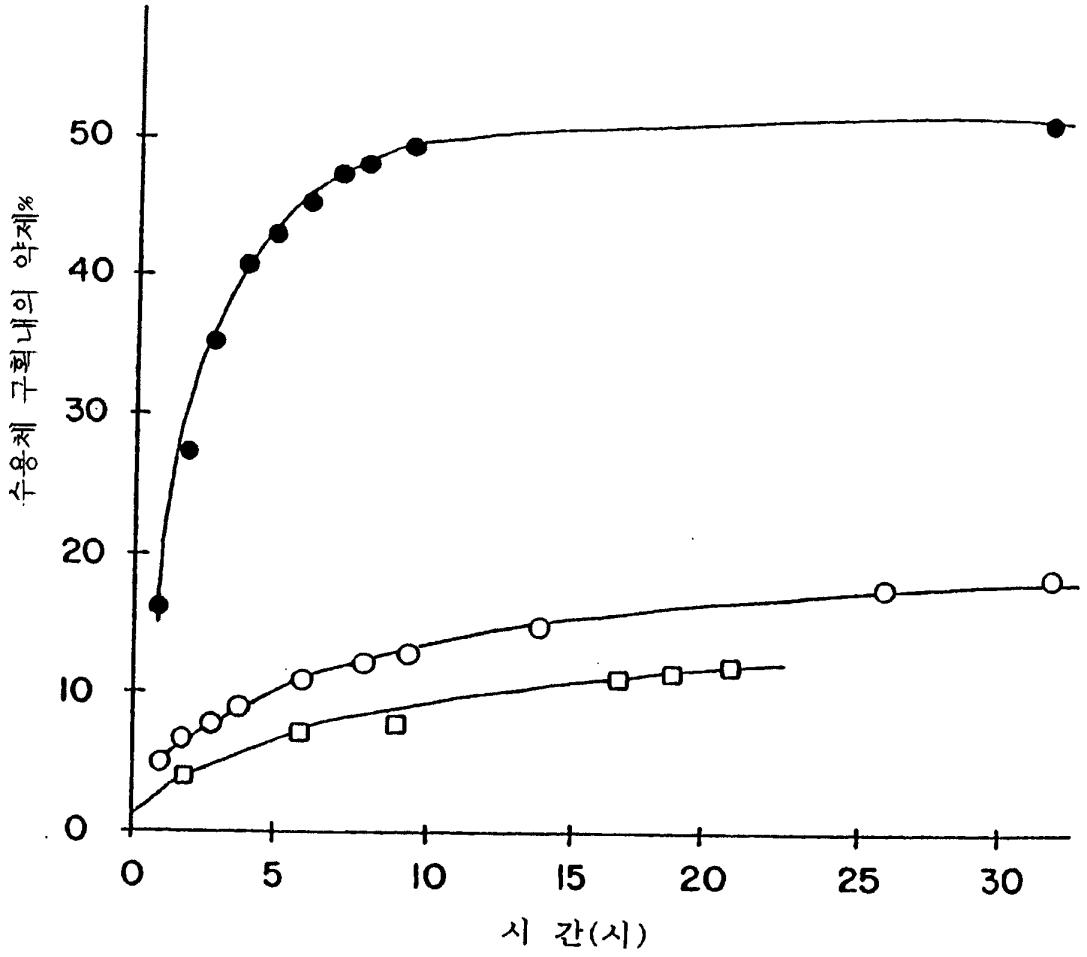
도면6



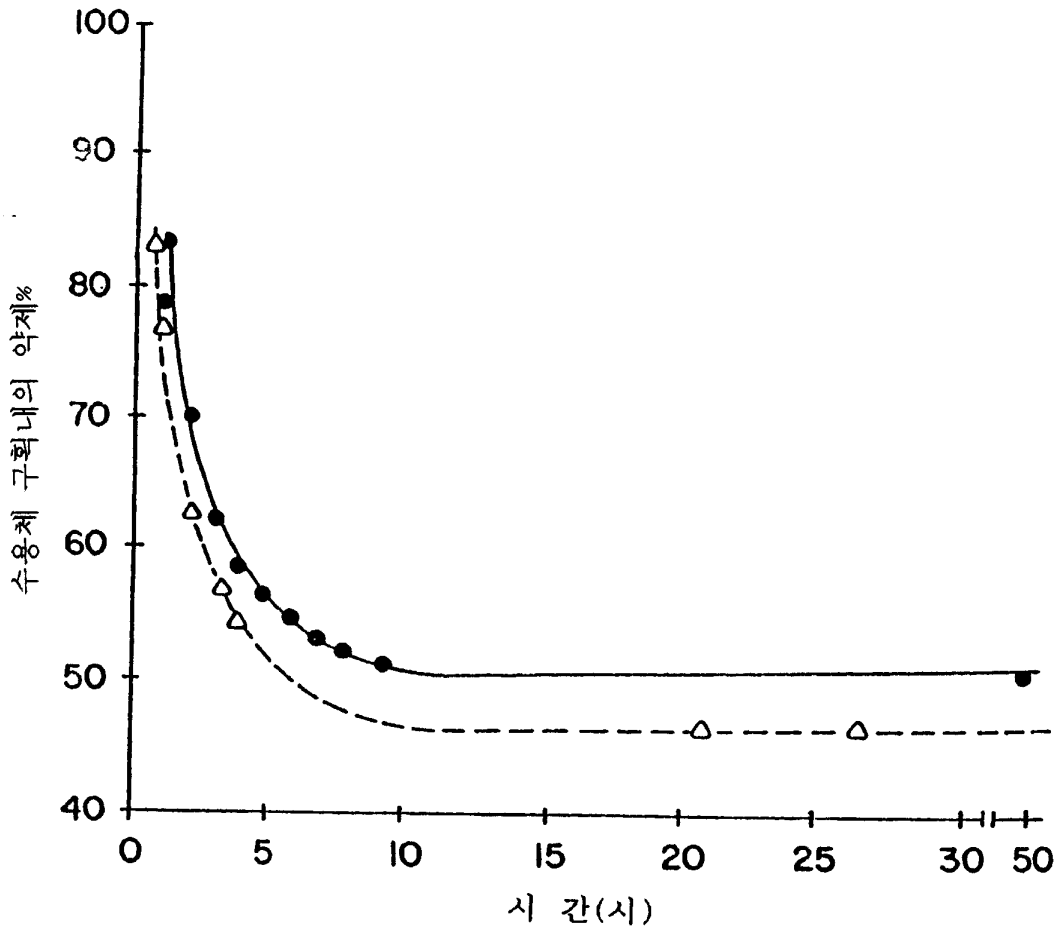
도면7



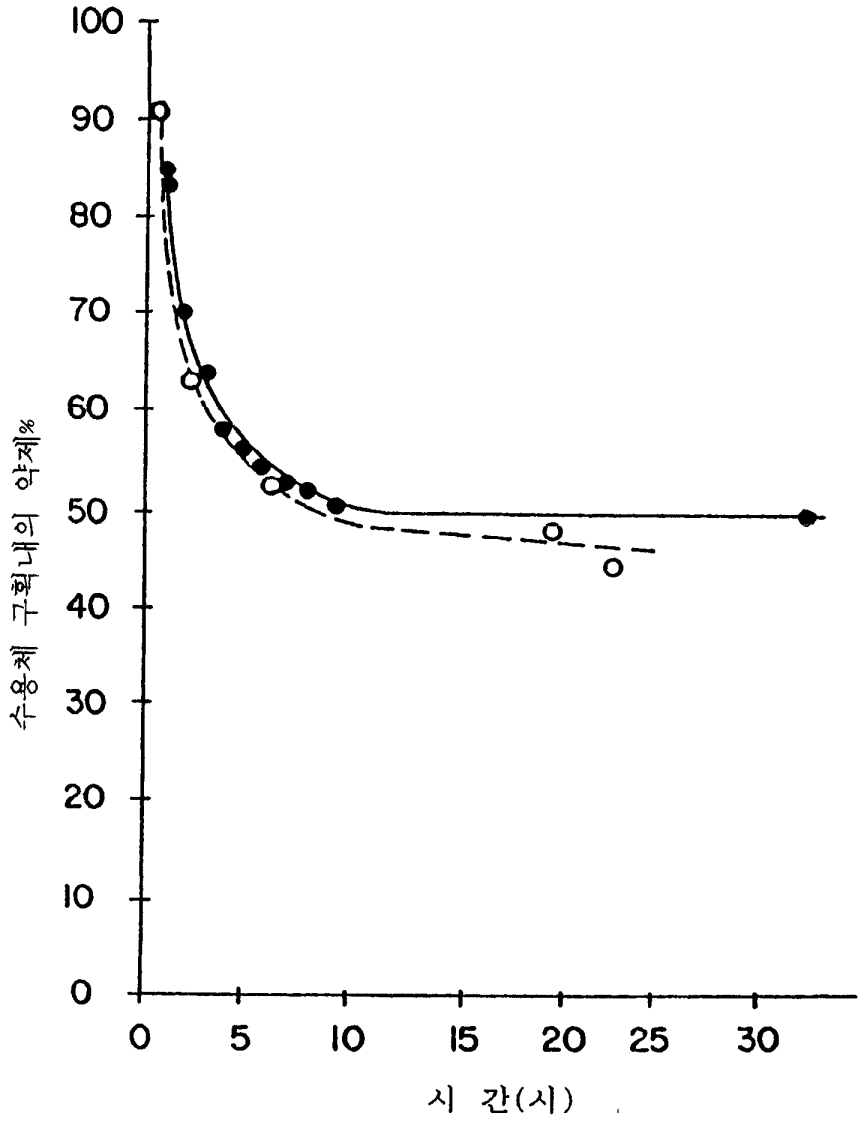
도면8



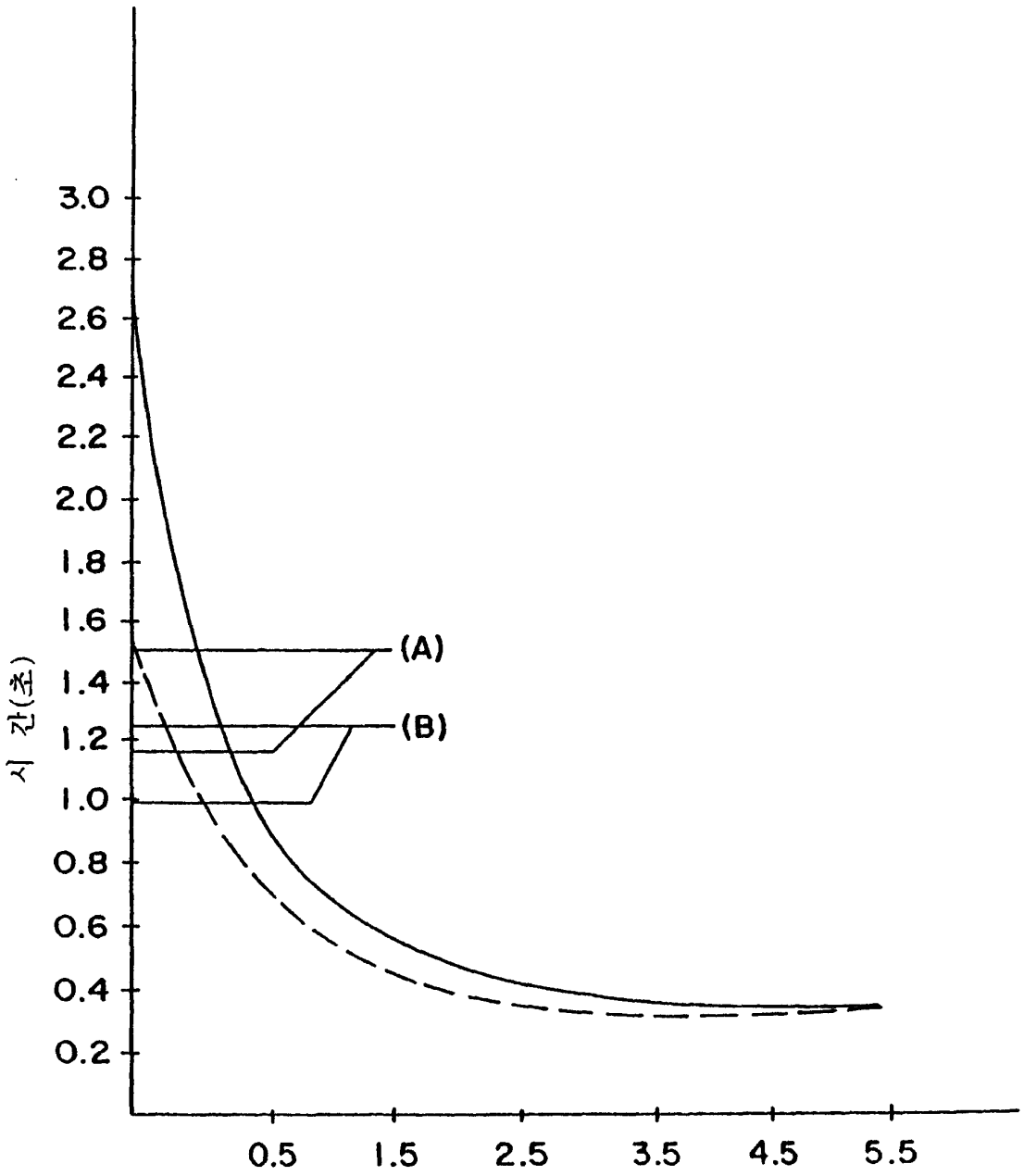
도면9



도면10

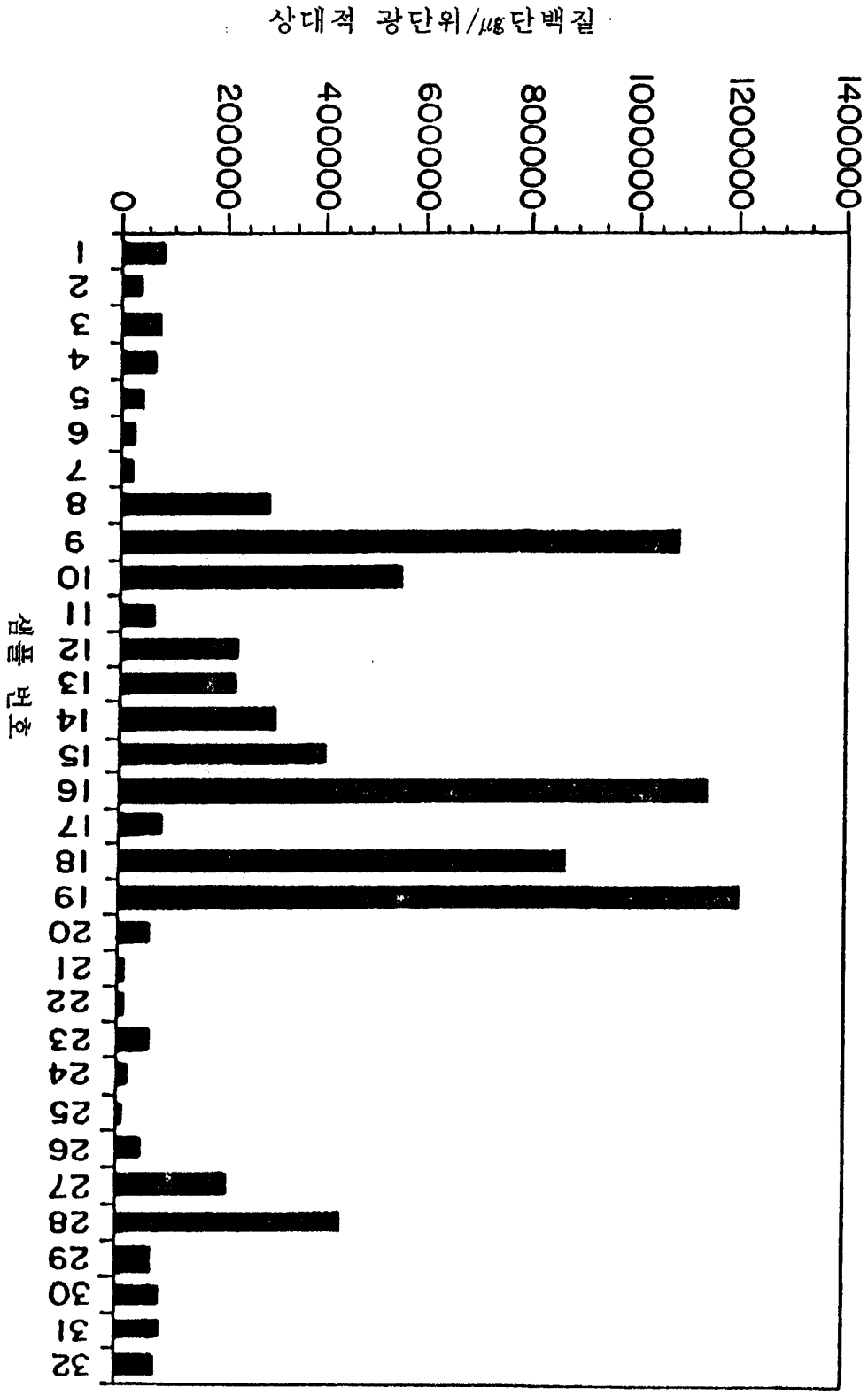


도면11

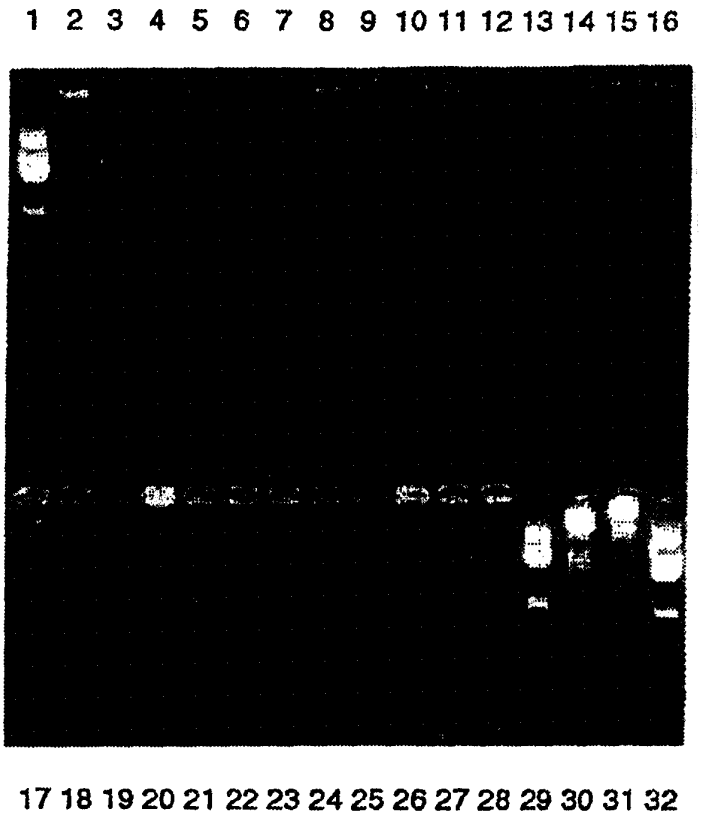


첨가한 PAMAM 스타버스트 덴드리머의 세대

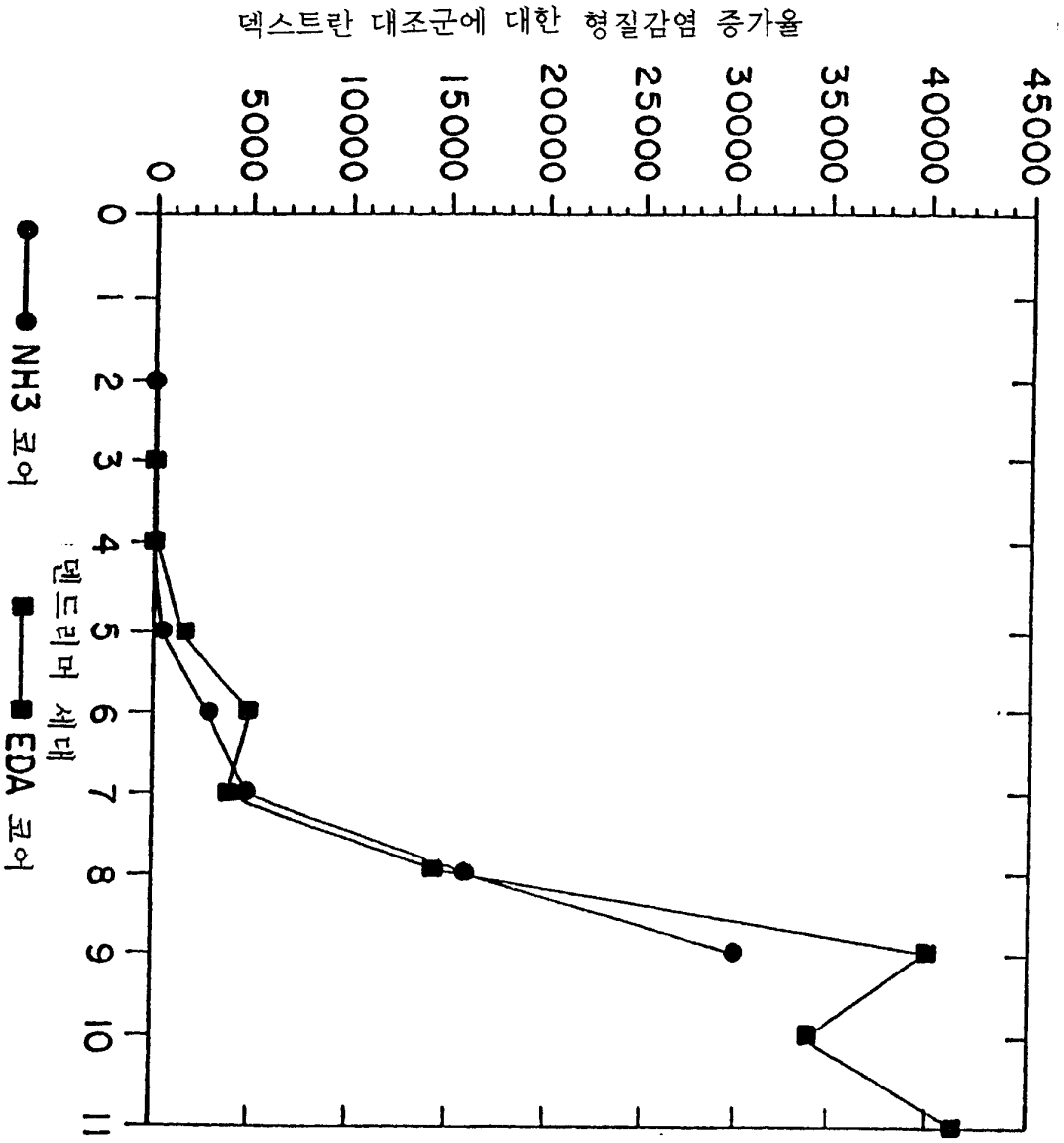
도면12


상대적 광단위/μg단백질
0
200000
400000
600000
800000
1000000
1200000
1400000
분획 튜브 번호
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

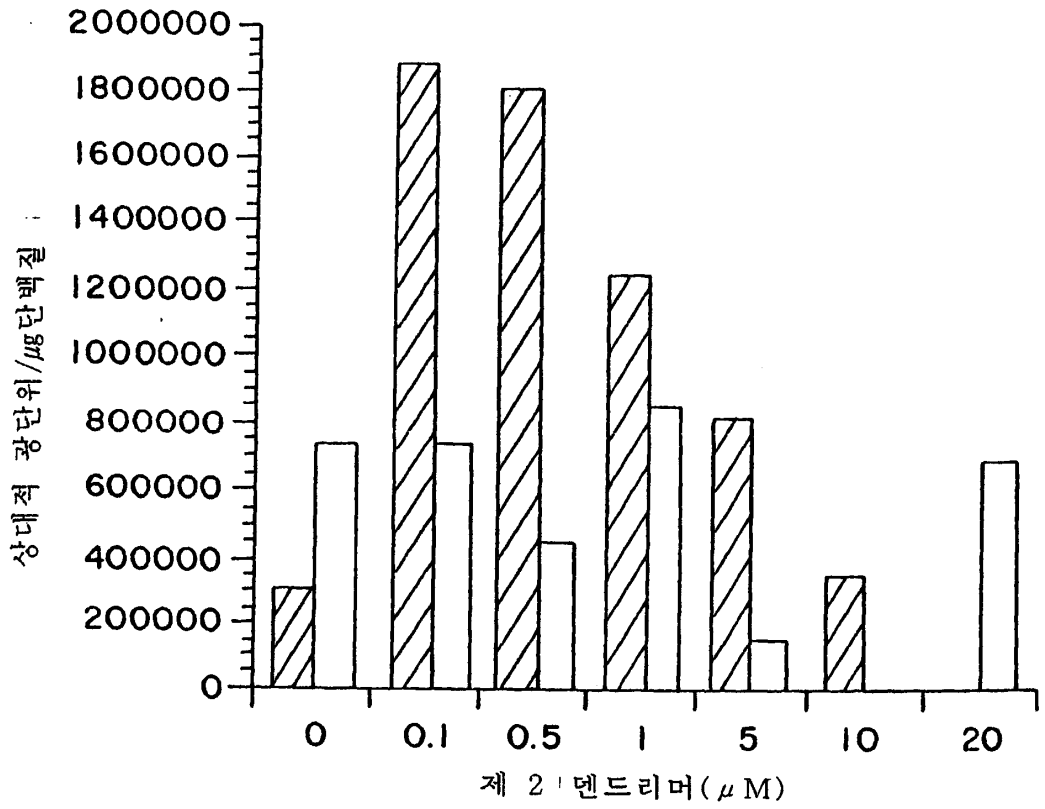
도면13


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

도면14


덱스트란 대조군에 대한 형질감염 증가율
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
40000
45000
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
델크리머 세대
NH3 포어
EDA 포어

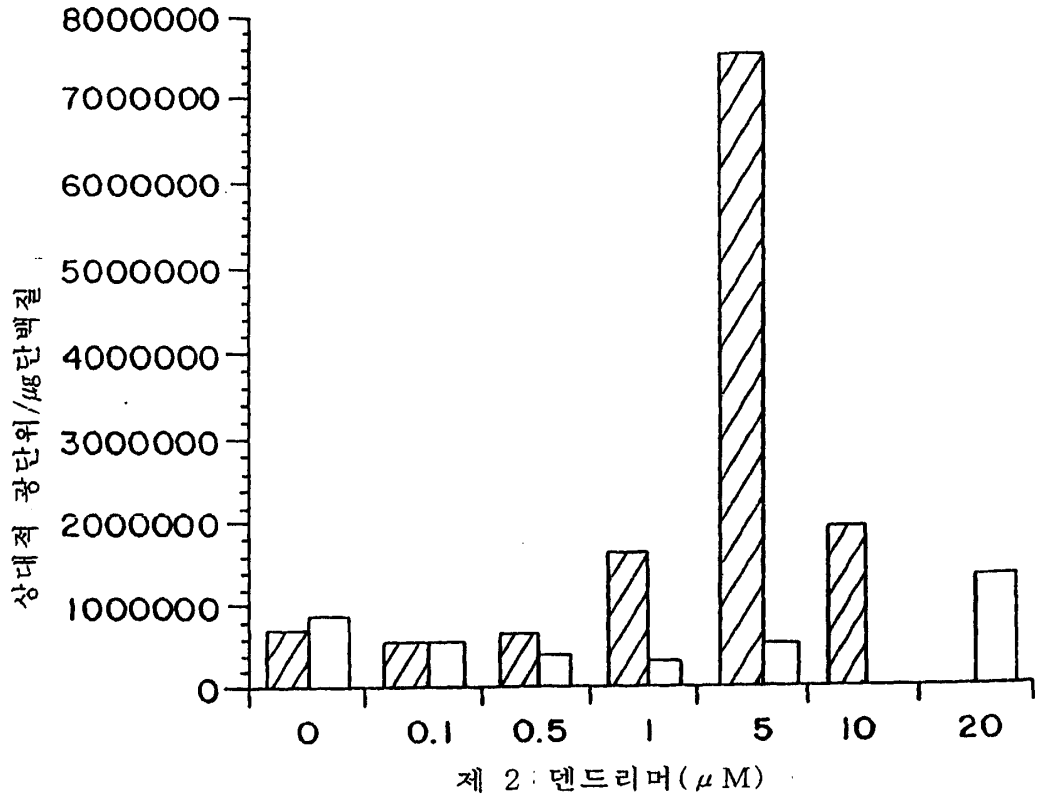
도면15



DNA를 G9 덴드리머와 착체화시킨 후 G5 덴드리머를 첨가

DNA를 G5 덴드리머와 착체화시킨 후 G9 덴드리머를 첨가

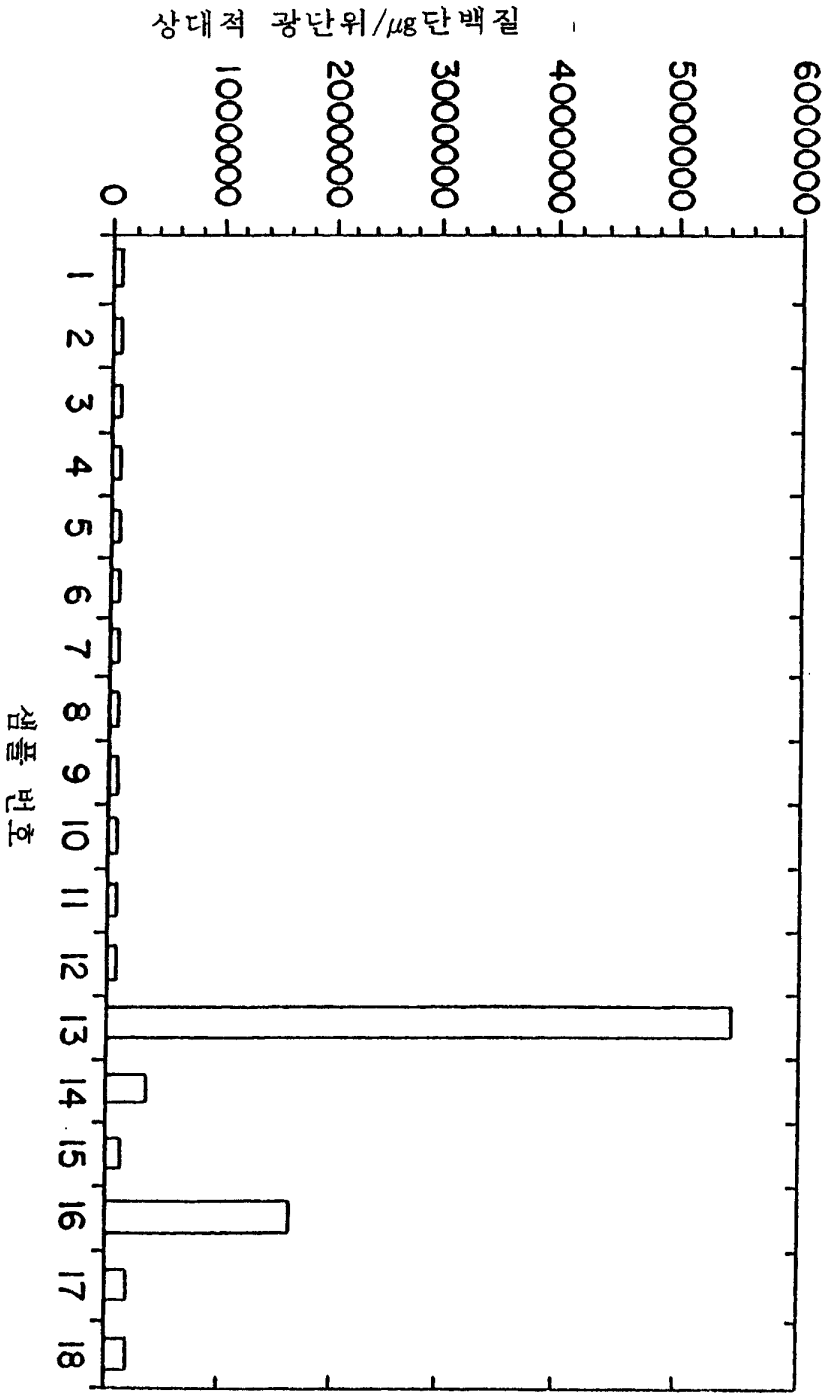
도면16



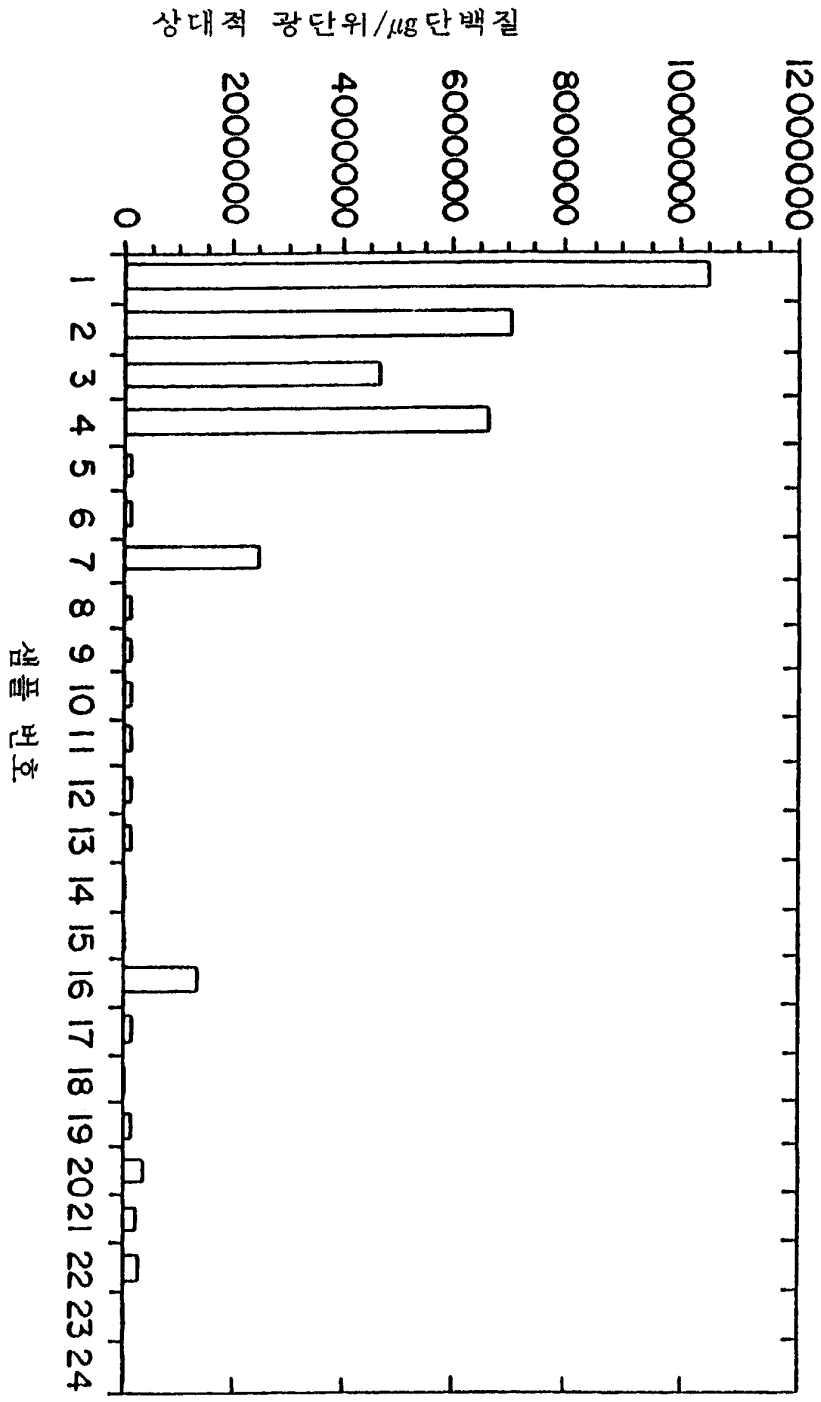
DNA를 G9 덴드리머와 착체화시킨 후 G5 덴드리머를 첨가

DNA를 G5 덴드리머와 착체화시킨 후 G9 덴드리머를 첨가

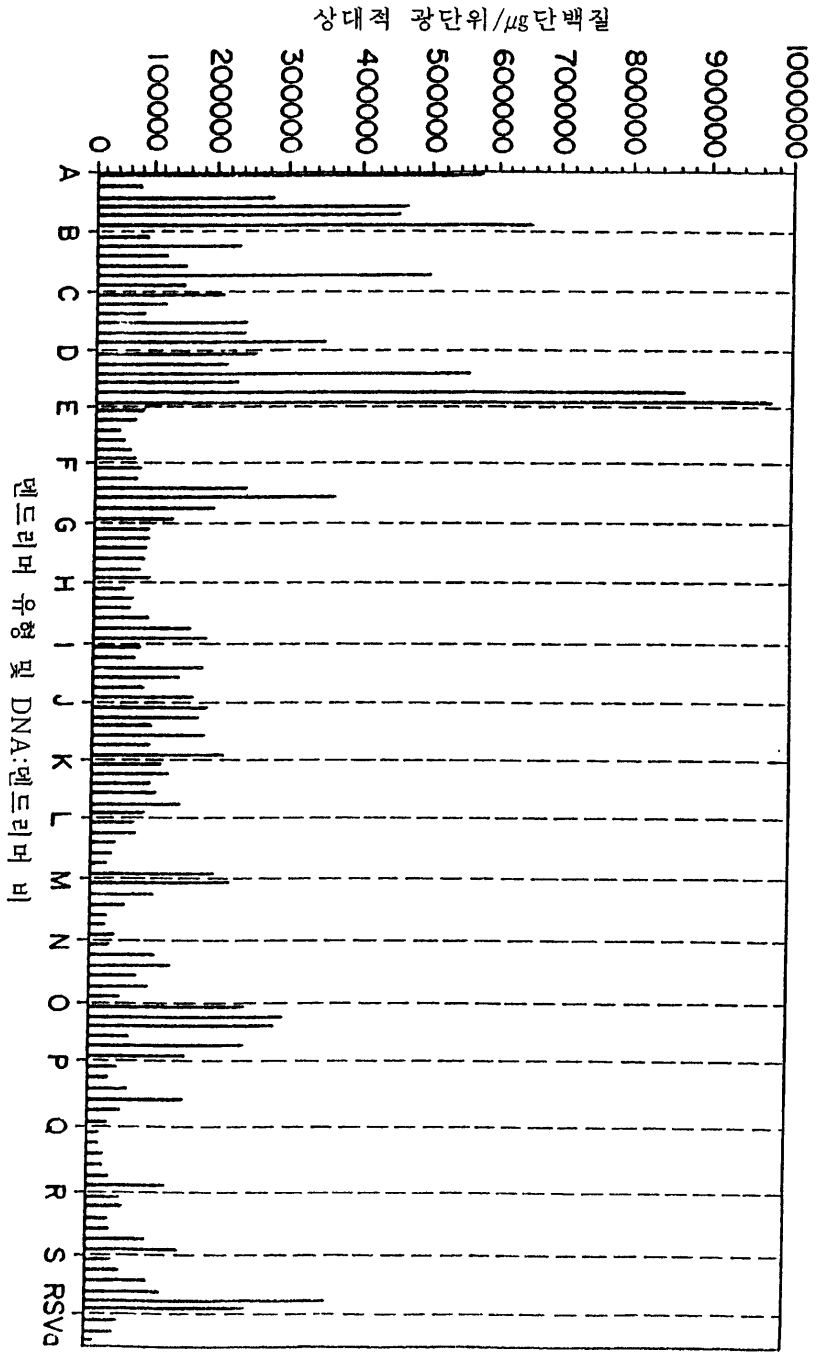
도면17


상대적 광단위/μg단백질
0
1000000
2000000
3000000
4000000
5000000
6000000
샘플 번호
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

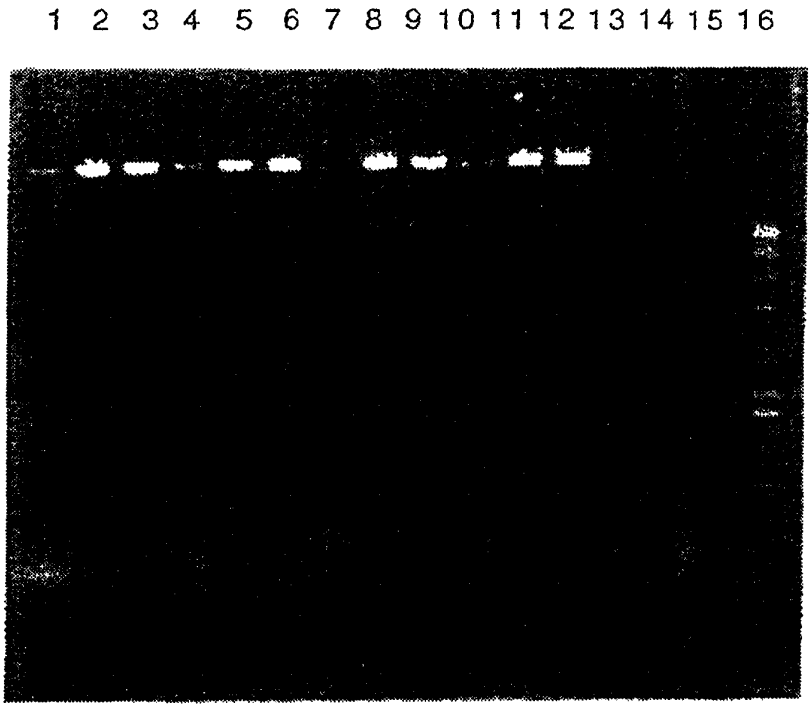
도면18


상대적 광단위/μg단백질
0
2000000
4000000
6000000
8000000
10000000
12000000
샘플 번호
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

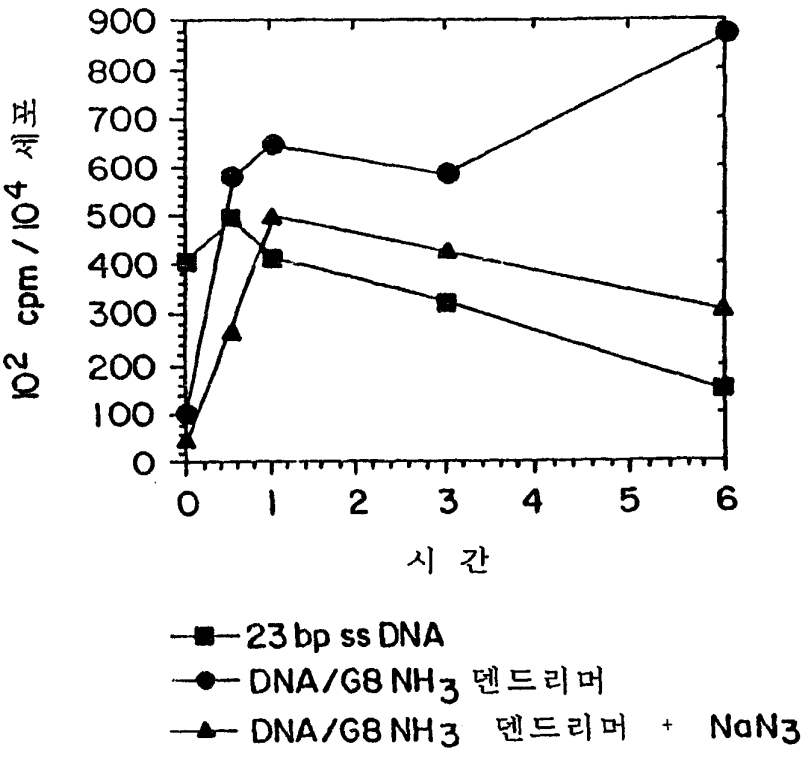
도면19


상대적 광단위/μg단백질
0
100000
200000
300000
400000
500000
600000
700000
800000
900000
1000000
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
RSVa
덴드리머 유형 및 DNA:덴드리머 비

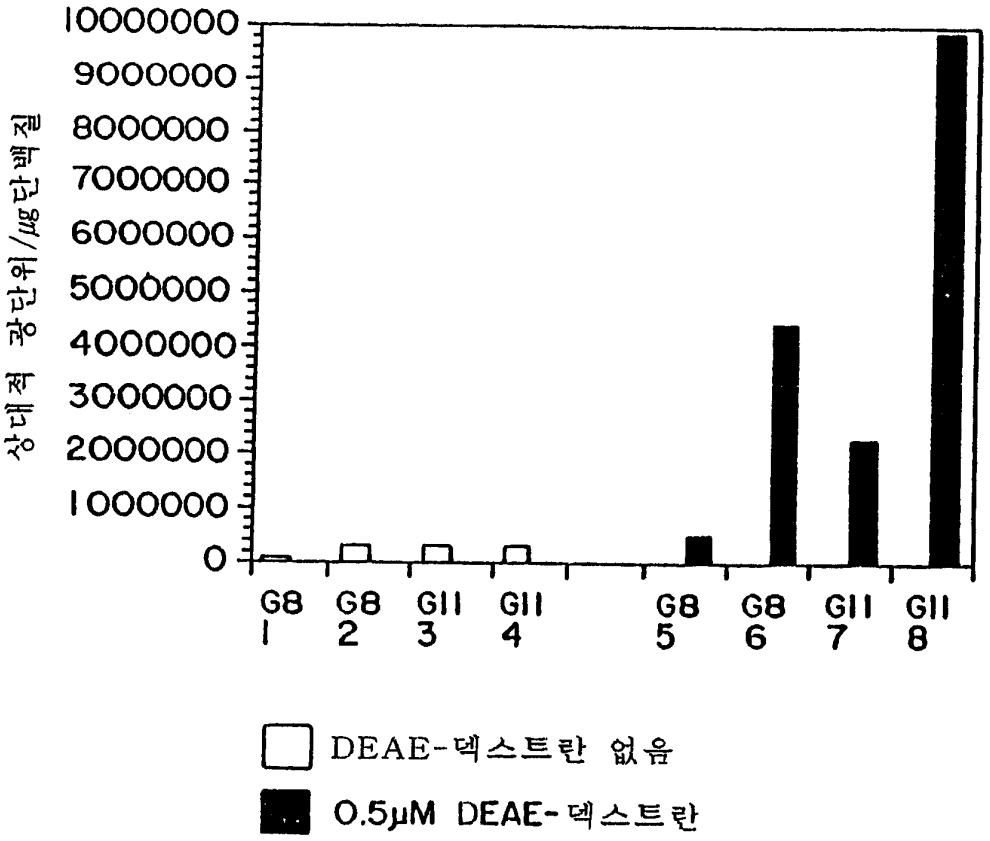
도면20


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

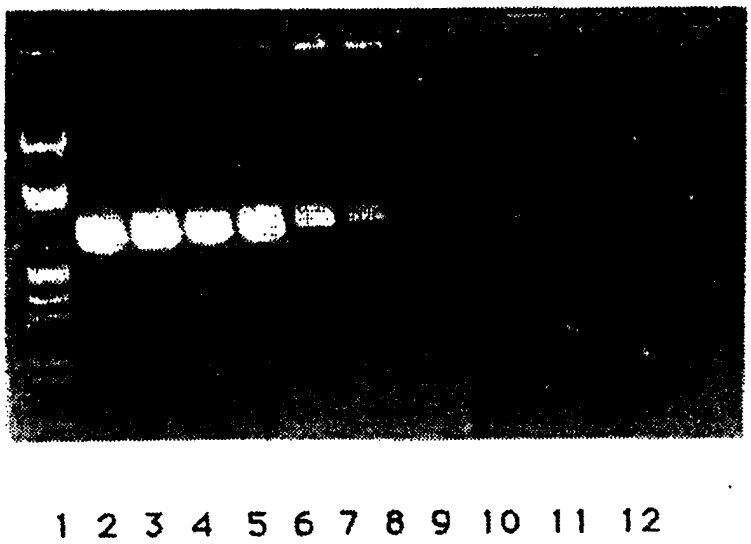
도면21


900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
10^2 cpm / 10^4 세포
0 1 2 3 4 5 6
시 간
23 bp ss DNA
DNA/G8 NH_3 덴드리머
DNA/G8 NH_3 덴드리머 + NaN_3

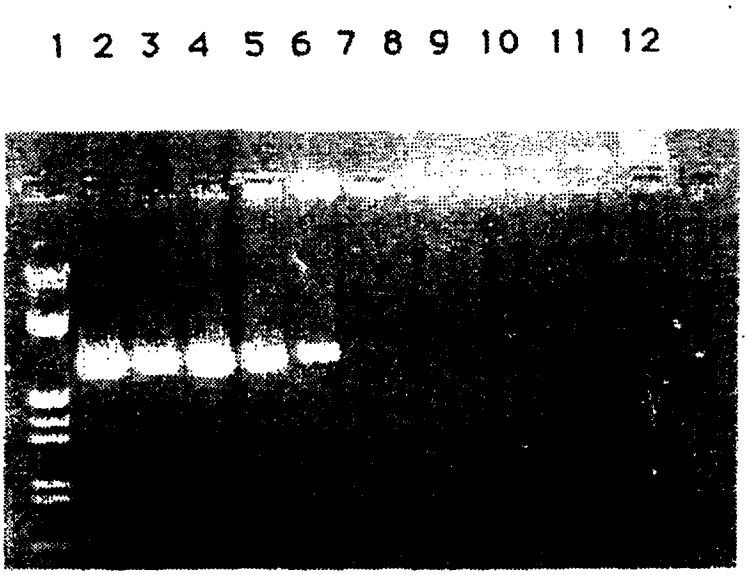
도면22


10000000
9000000
8000000
7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
상대적 광단위/㎍단백질
G8 1
G8 2
G11 3
G11 4
G8 5
G8 6
G11 7
G11 8
DEAE-덱스트란 없음
0.5μM DEAE-덱스트란

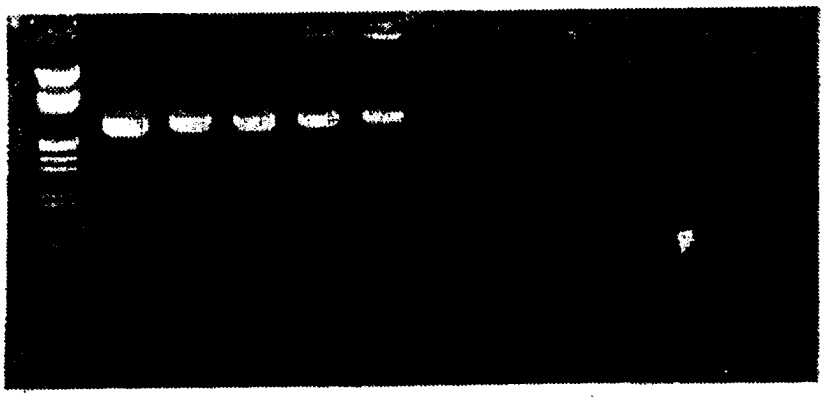
도면23a


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

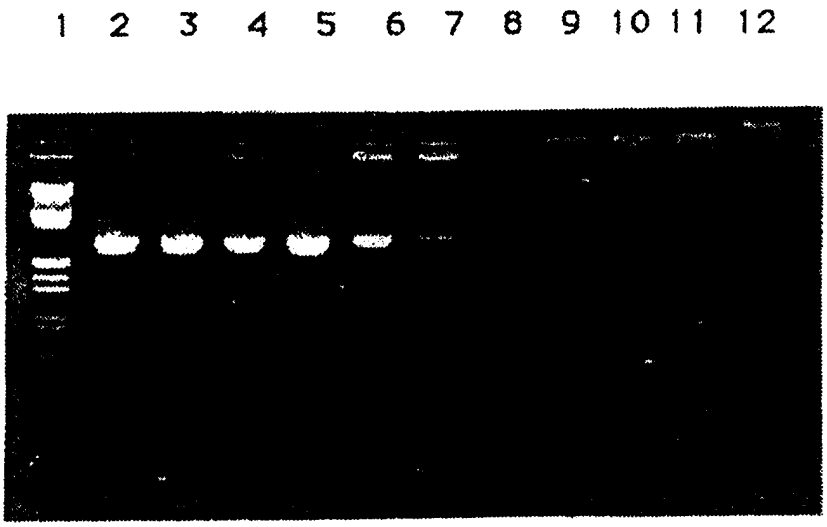
도면23b



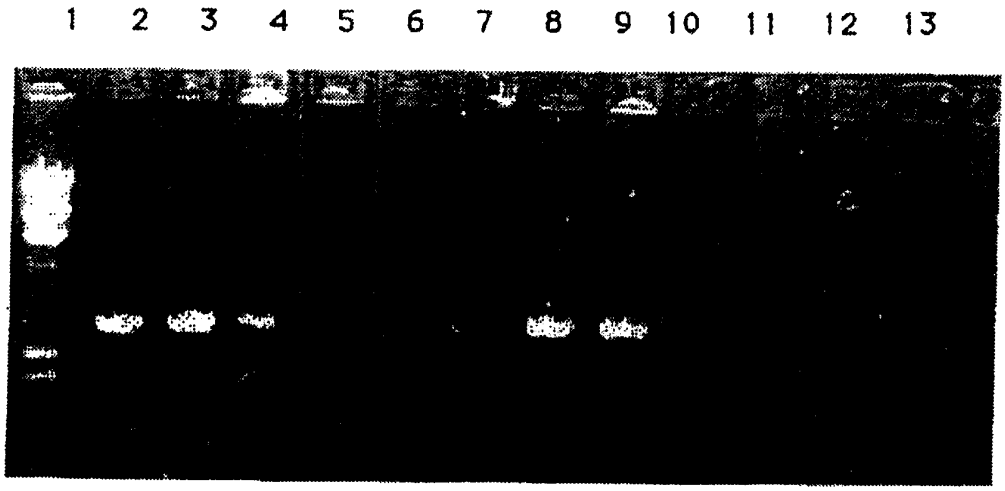
도면23c



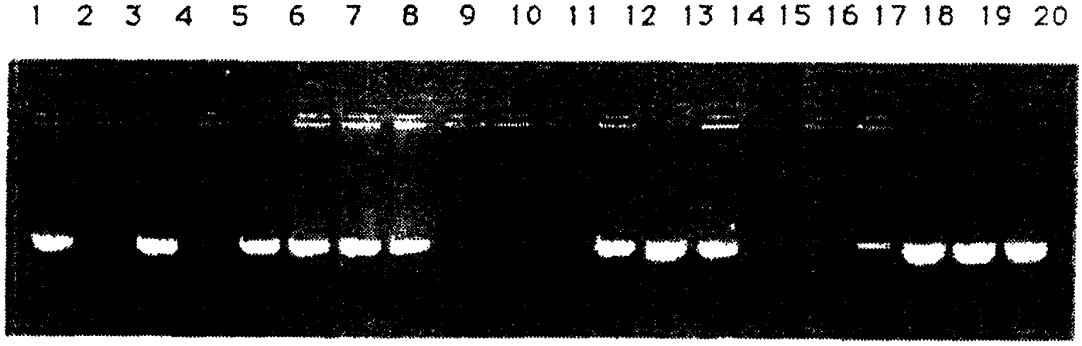
도면23d



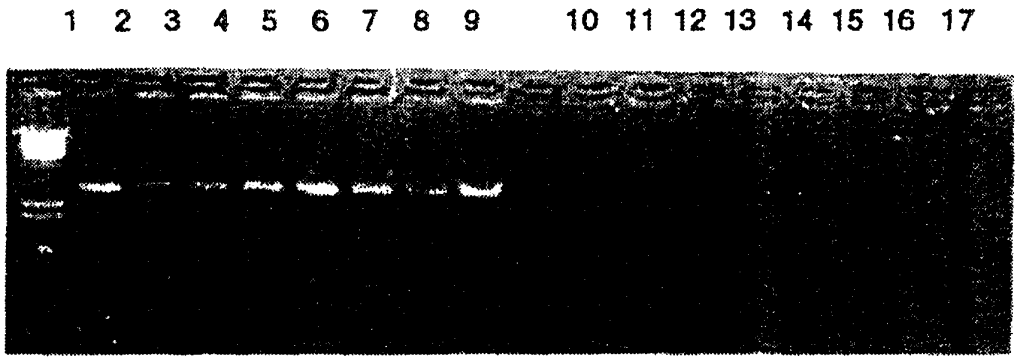
도면24



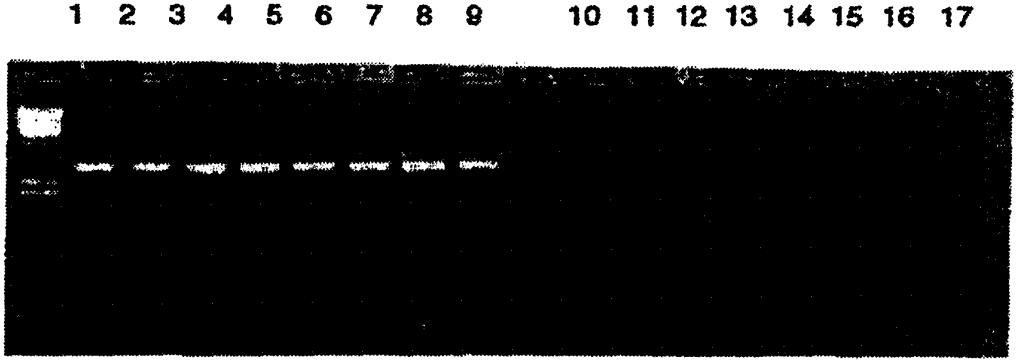
도면25



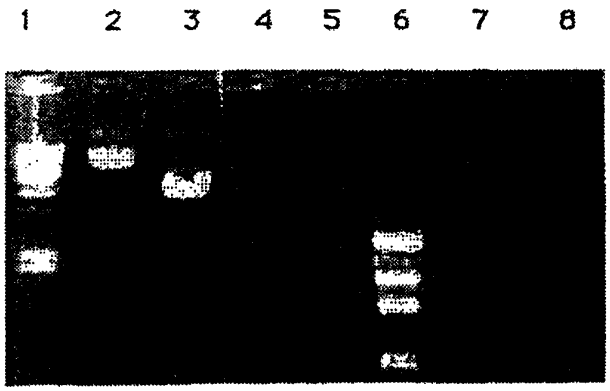
도면26a



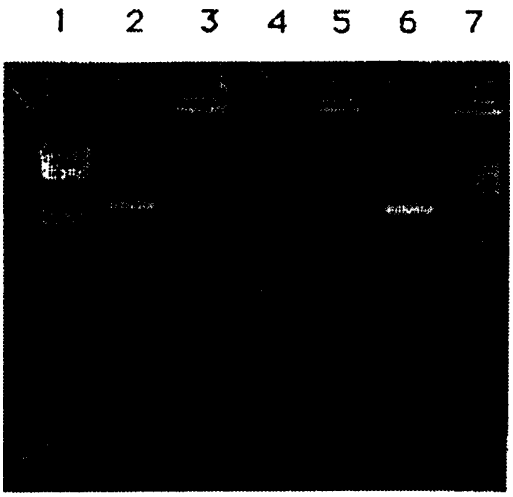
도면26b



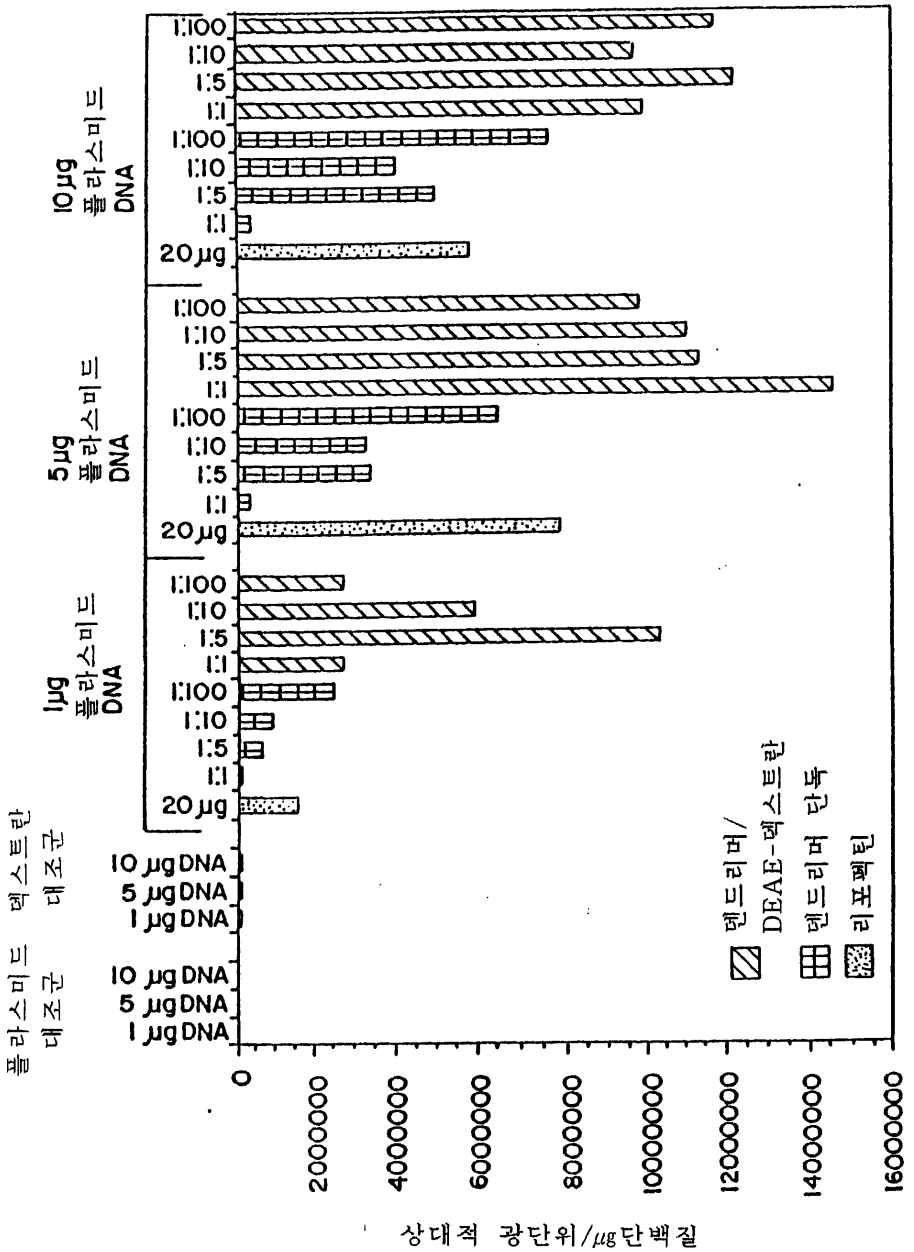
도면27



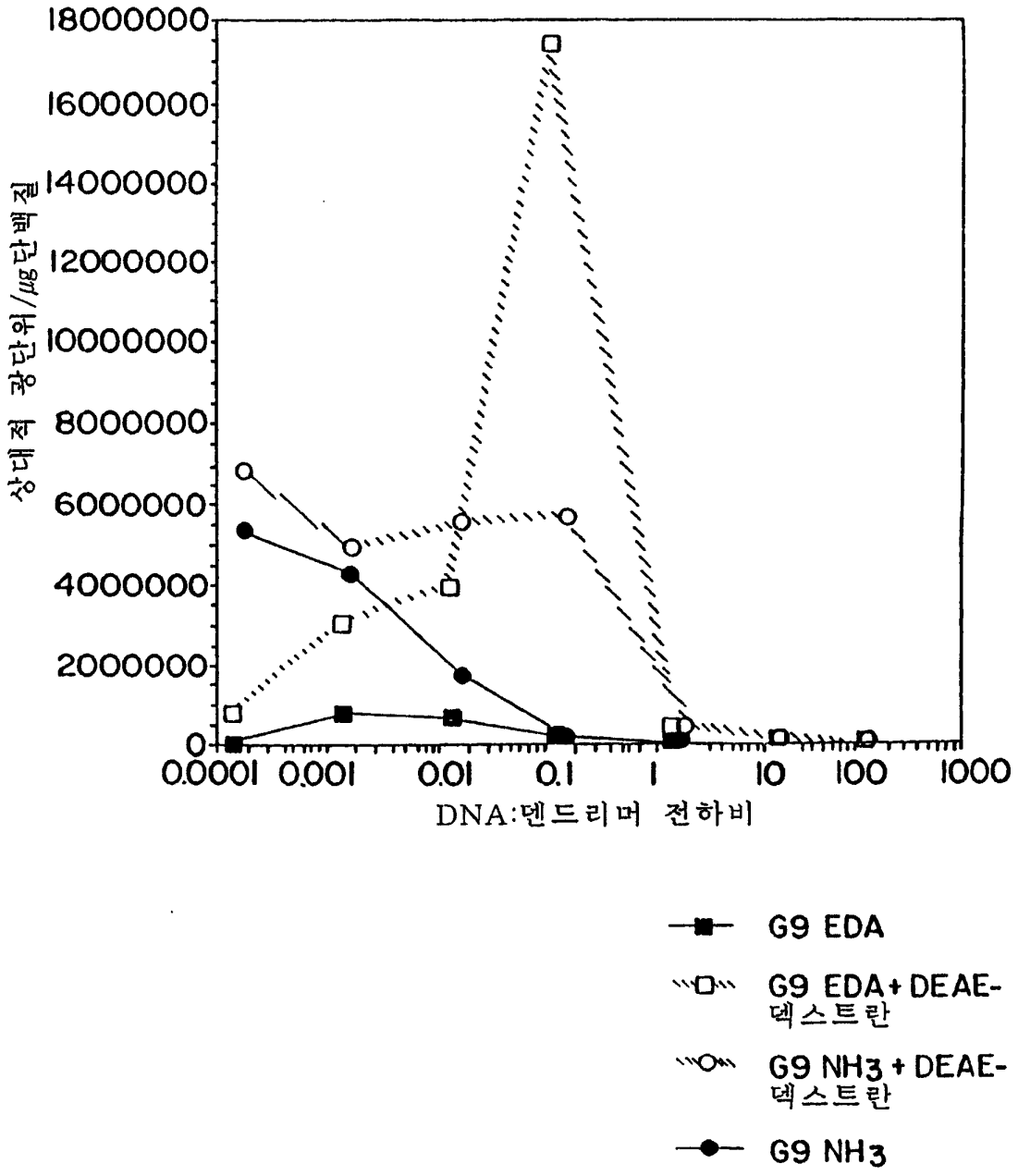
도면28


1 2 3 4 5 6 7

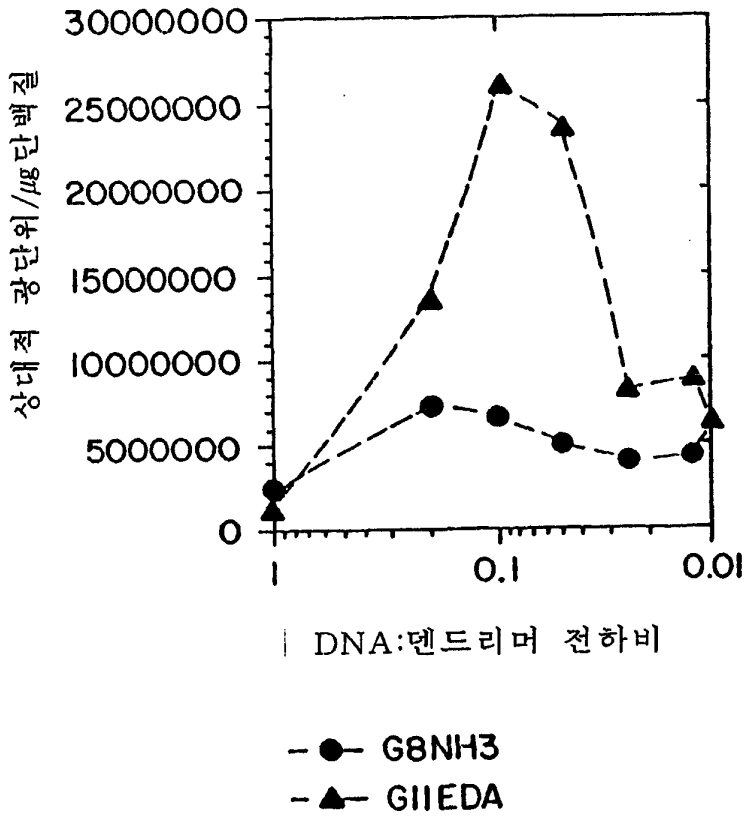
도면29


10μg 플라스미드 DNA
5μg 플라스미드 DNA
1μg 플라스미드 DNA
1:100
1:10
1:5
1:1
20μg
플라스미드 대조군
덱스트란 대조군
10 μg DNA
5 μg DNA
1 μg DNA
덴드리머/DEAE-덱스트란
덴드리머 단독
리포펙틴
0
2000000
4000000
6000000
8000000
10000000
12000000
14000000
16000000
상대적 광단위/μg단백질

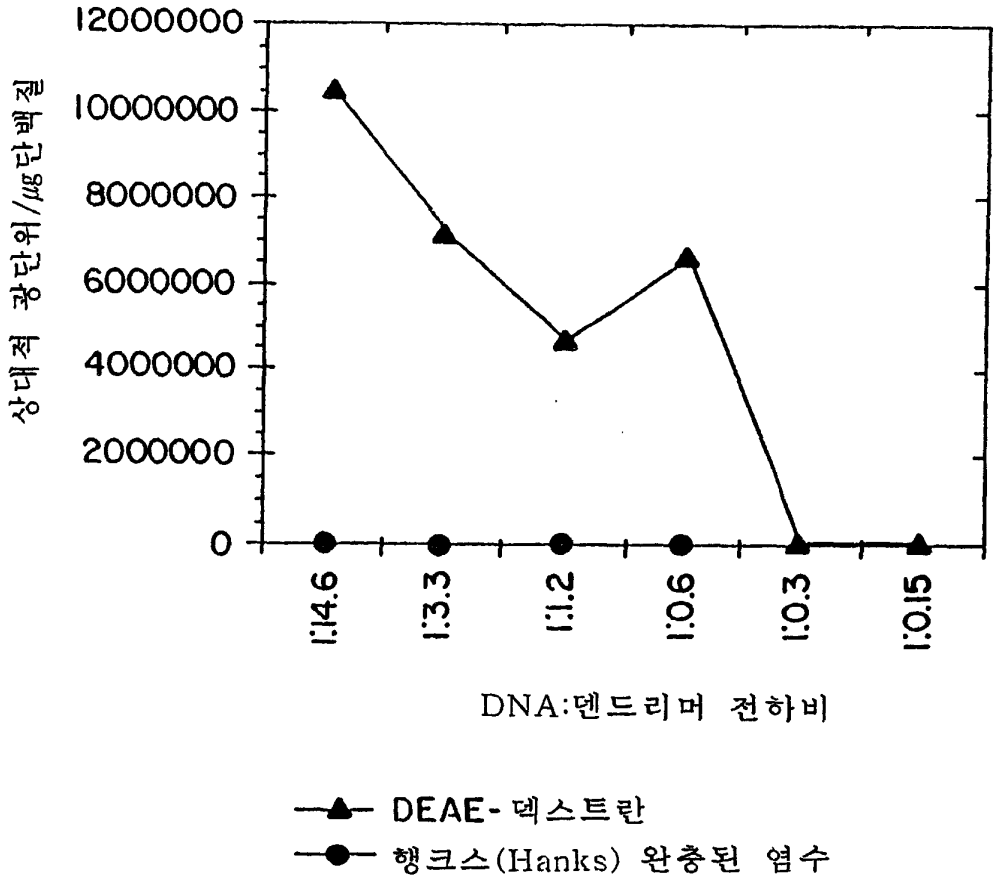
도면30


18000000
16000000
14000000
12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
상대적 광단위/μg단백질
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
DNA:덴드리머 전하비
G9 EDA
G9 EDA+DEAE-덱스트란
G9 NH3+DEAE-덱스트란
G9 NH3

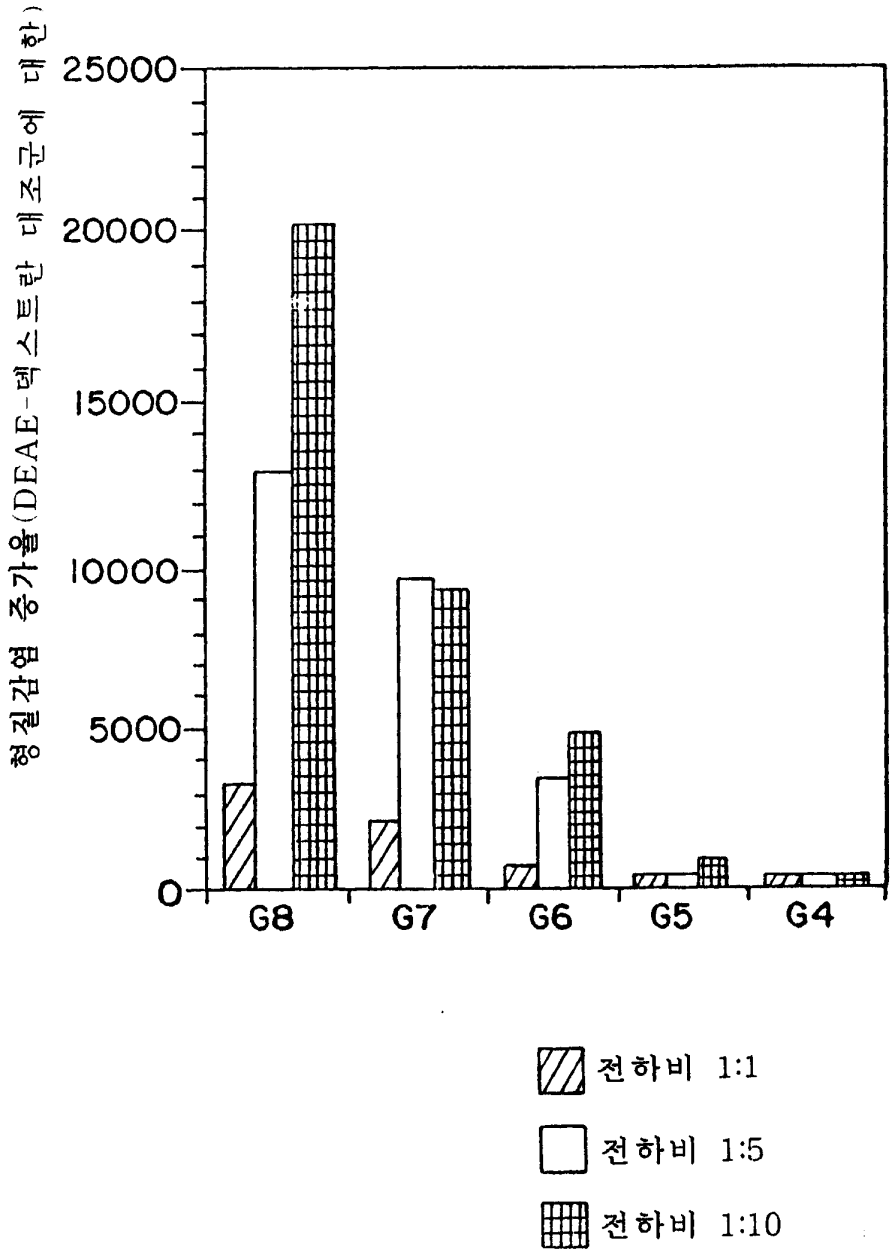
도면31


30000000
25000000
20000000
15000000
10000000
5000000
0
상대적 광단위/㎍단백질
1
0.1
0.01
DNA:덴드리머 전하비
G8NH3
G11EDA

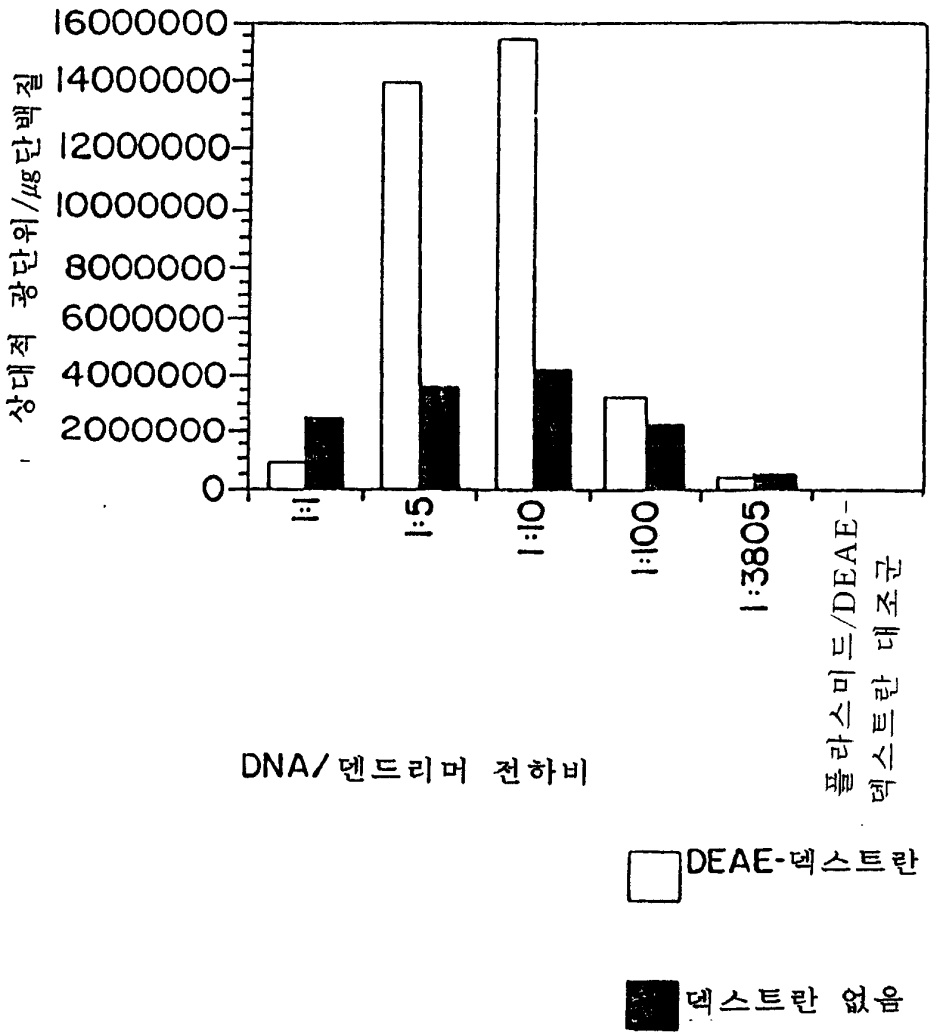
도면32


12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
상대적 광단위/㎍단백질
1:14.6
1:3.3
1:1.2
1:0.6
1:0.3
1:0.15
DNA:덴드리머 전하비
DEAE-덱스트란
행크스(Hanks) 완충된 염수

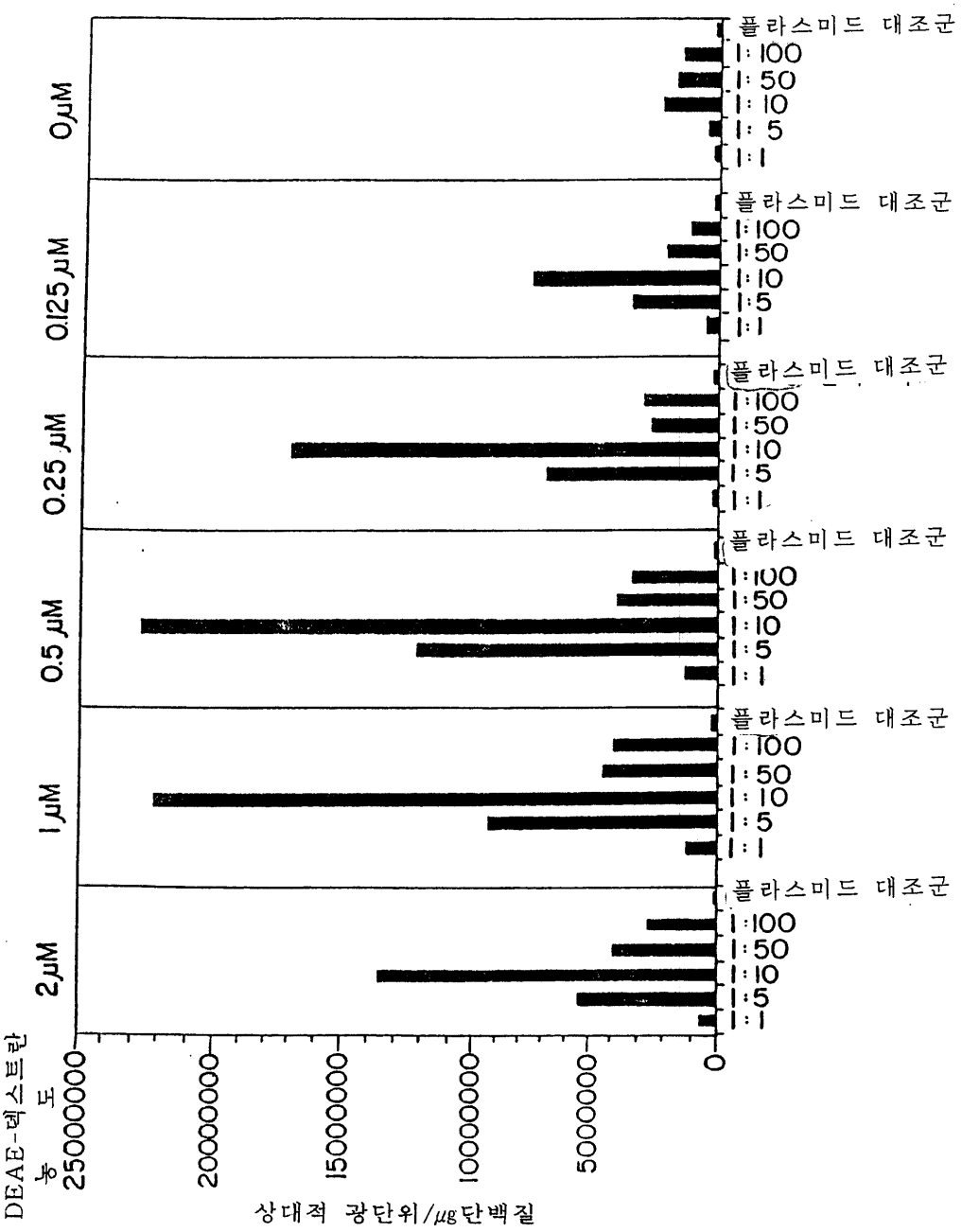
도면33


형질감염 증가율(DEAE-덱스트란 대조군에 대한)
25000
20000
15000
10000
5000
0
G8
G7
G6
G5
G4
전하비 1:1
전하비 1:5
전하비 1:10

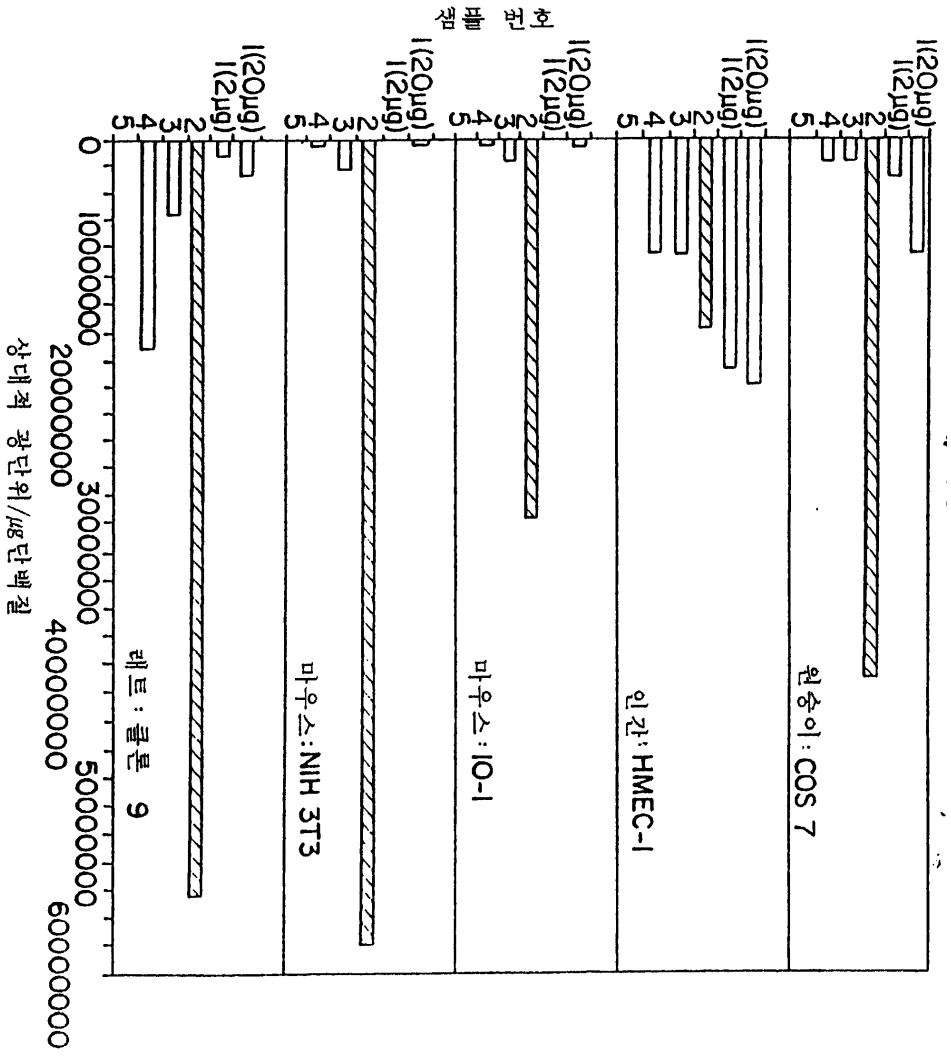
도면34


16000000
14000000
12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
상대적 광단위/㎍단백질
1:1
1:5
1:10
1:100
1:3805
플라스미드/DEAE-덱스트란 대조군
DNA/덴드리머 전하비
DEAE-덱스트란
덱스트란 없음

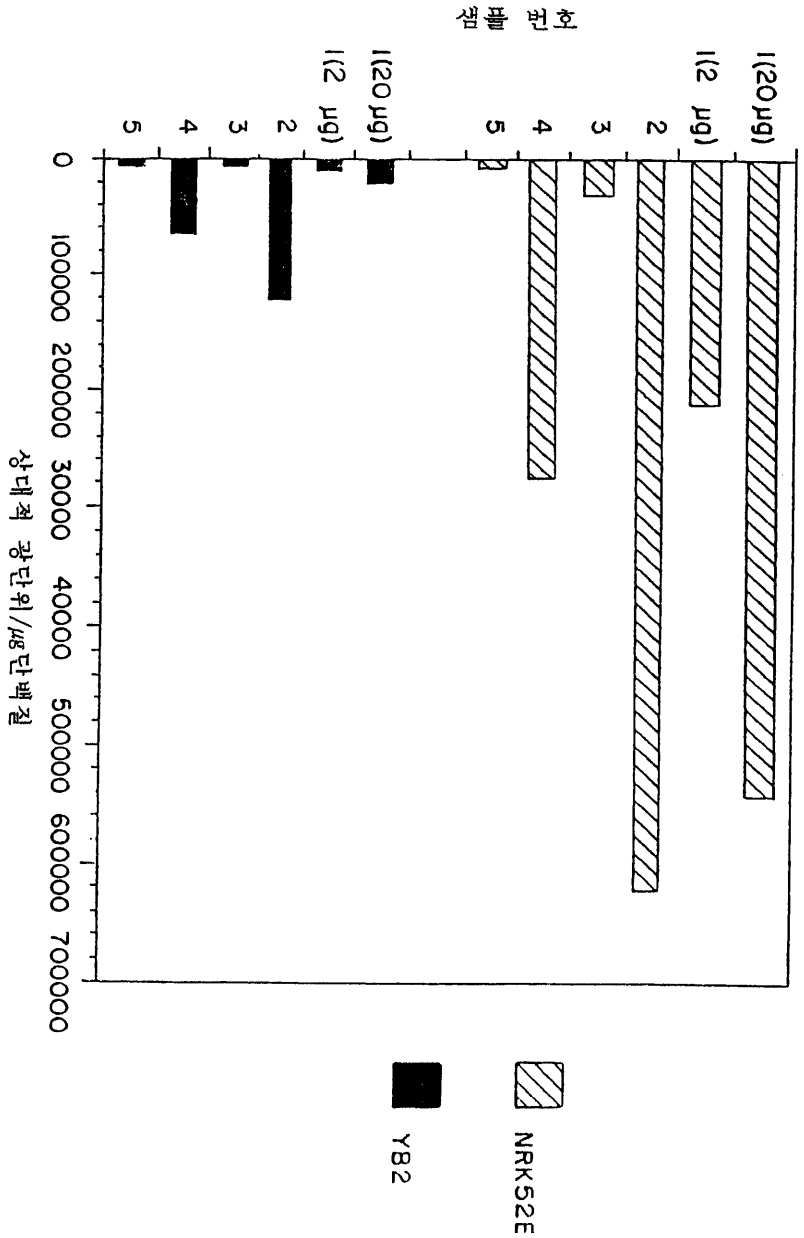
도면35


0μM
0.125μM
0.25μM
0.5μM
1μM
2μM
플라스미드 대조군
1:100
1:50
1:10
1:5
1:1
DEAE-덱스트란 농도
25000000
20000000
15000000
10000000
5000000
0
상대적 광단위/μg단백질

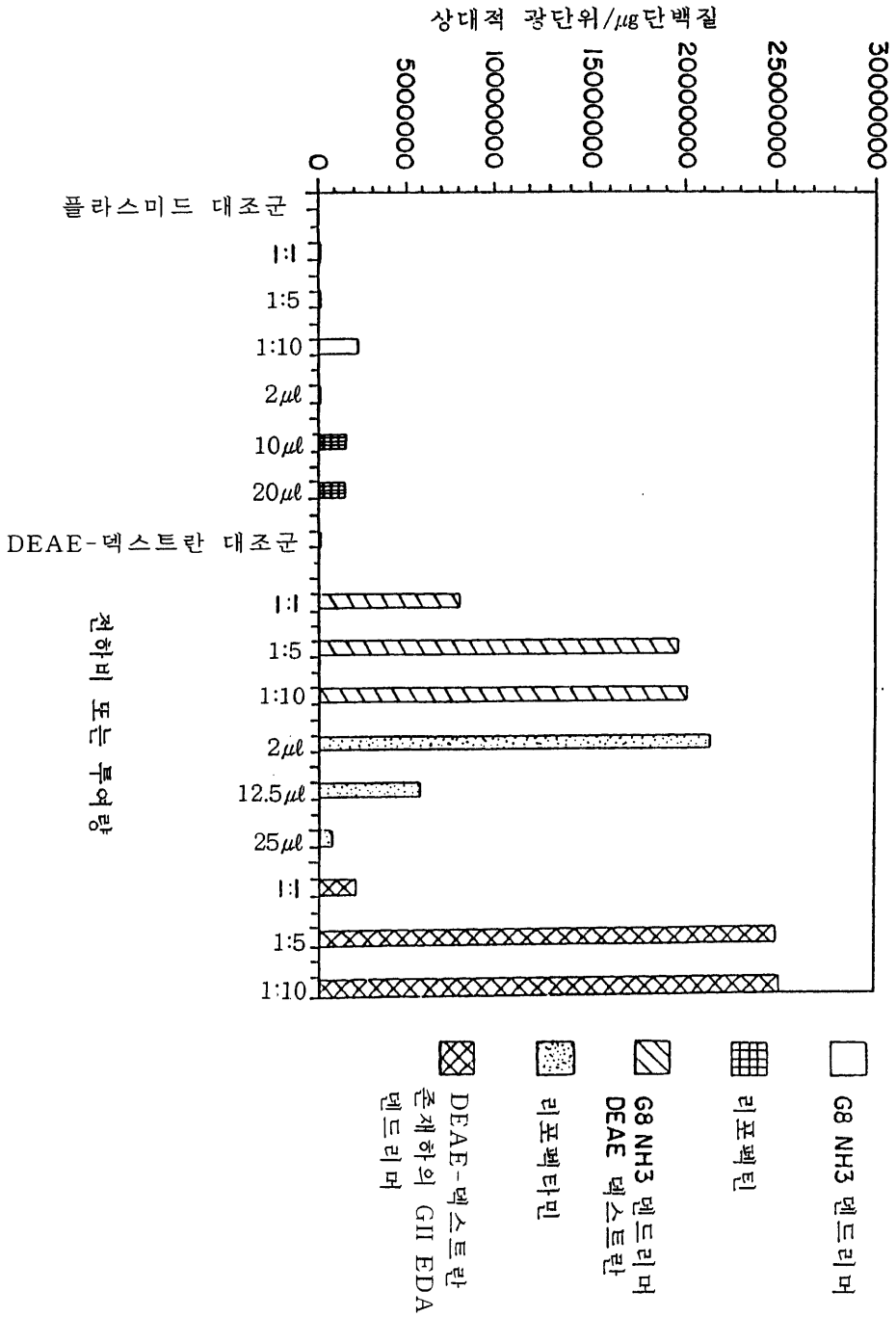
도면36


샘플 번호
I(20μg)
I(2μg)
2
3
4
5
원숭이 : COS 7
인간 : HMEC-1
마우스 : IO-1
마우스 : NIH 3T3
래트 : 클론 9
0
10000000
20000000
30000000
40000000
50000000
60000000
상대적 광단위/μg단백질

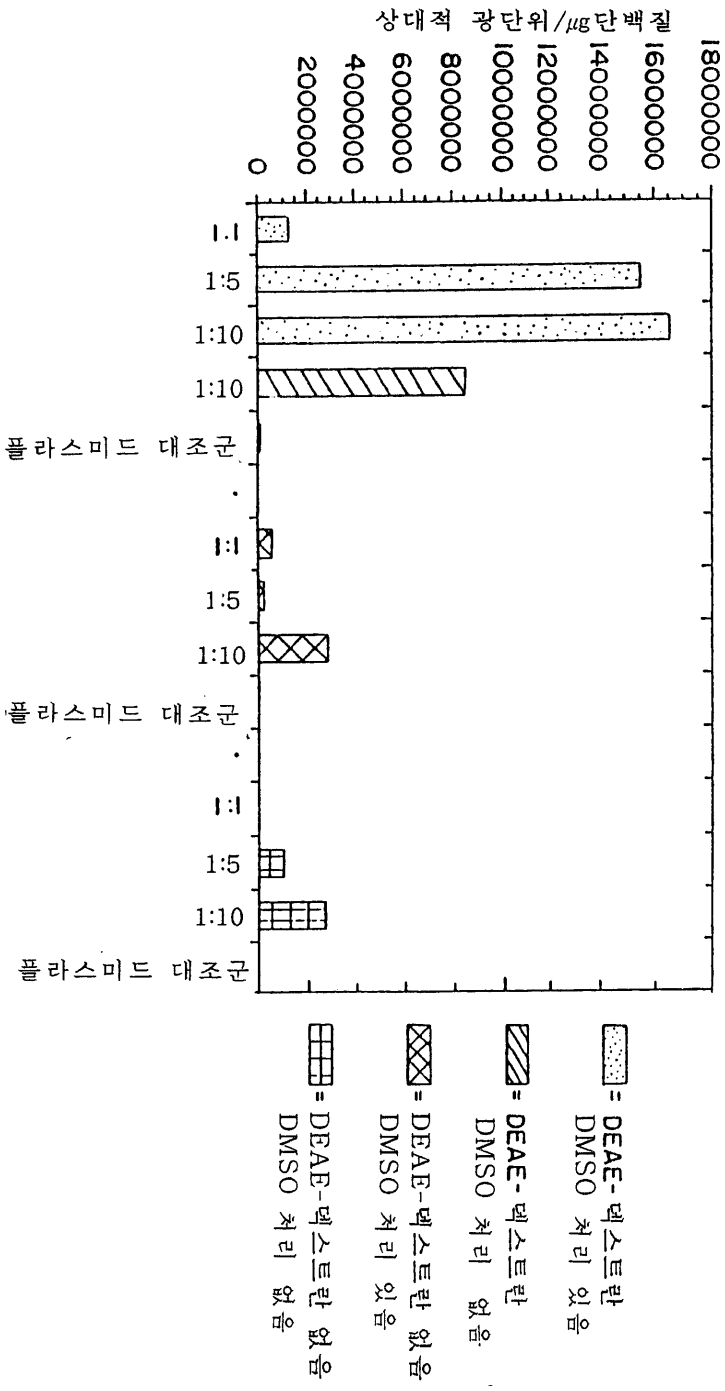
도면37


샘플 번호
I(20 μg)
I(2 μg)
I(20 μg)
I(2 μg)
5
4
3
2
5
4
3
2
0
100000
200000
300000
400000
500000
600000
700000
상대적 광단위/μg단백질
YB2
NRK52E

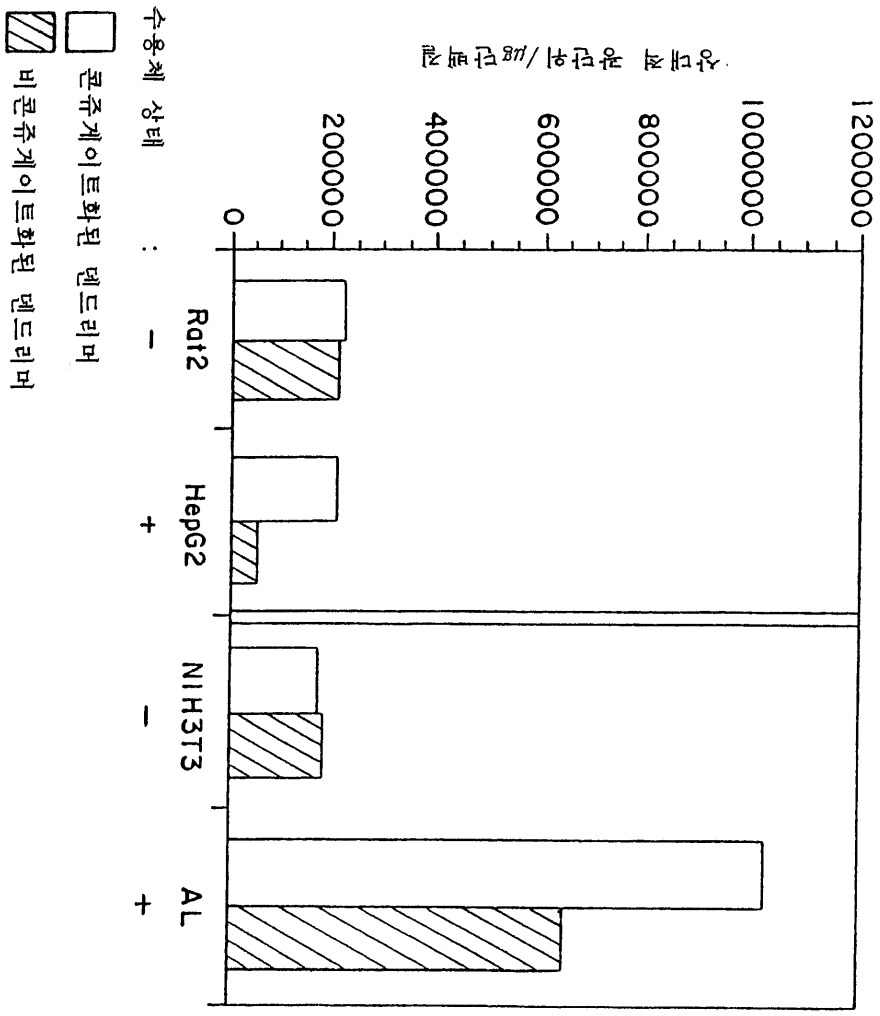
도면38


상대적 광단위/μg단백질
0
5000000
10000000
15000000
20000000
25000000
30000000
플라스미드 대조군
1:1
1:5
1:10
2μl
10μl
20μl
DEAE-덱스트란 대조군
1:1
1:5
1:10
2μl
12.5μl
25μl
1:1
1:5
1:10
희석비 또는 부피량
DEAE-덱스트란 존재하의 GII EDA 덴드리머
리포펙타민
G8 NH3 덴드리머 DEAE 덱스트란
리포펙틴
G8 NH3 덴드리머

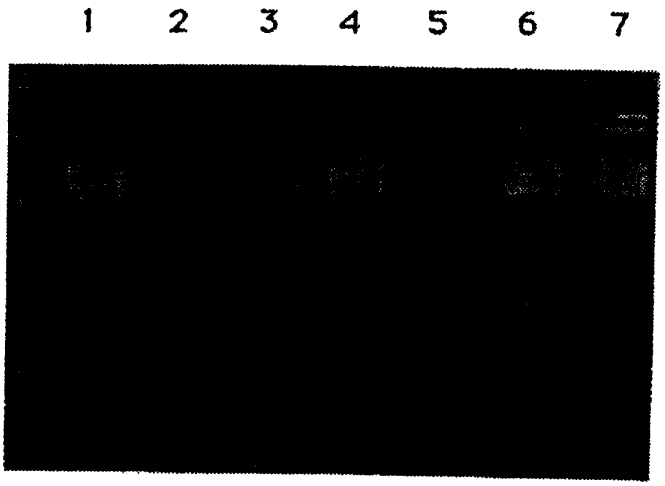
도면39


상대적 광단위/μg단백질
0
2000000
4000000
6000000
8000000
10000000
12000000
14000000
16000000
18000000
1:1
1:5
1:10
1:10
플라스미드 대조군
1:1
1:5
1:10
플라스미드 대조군
1:1
1:5
1:10
플라스미드 대조군
= DEAE-덱스트란 DMSO 처리 있음
= DEAE-덱스트란 DMSO 처리 없음
= DEAE-덱스트란 없음 DMSO 처리 있음
= DEAE-덱스트란 없음 DMSO 처리 없음

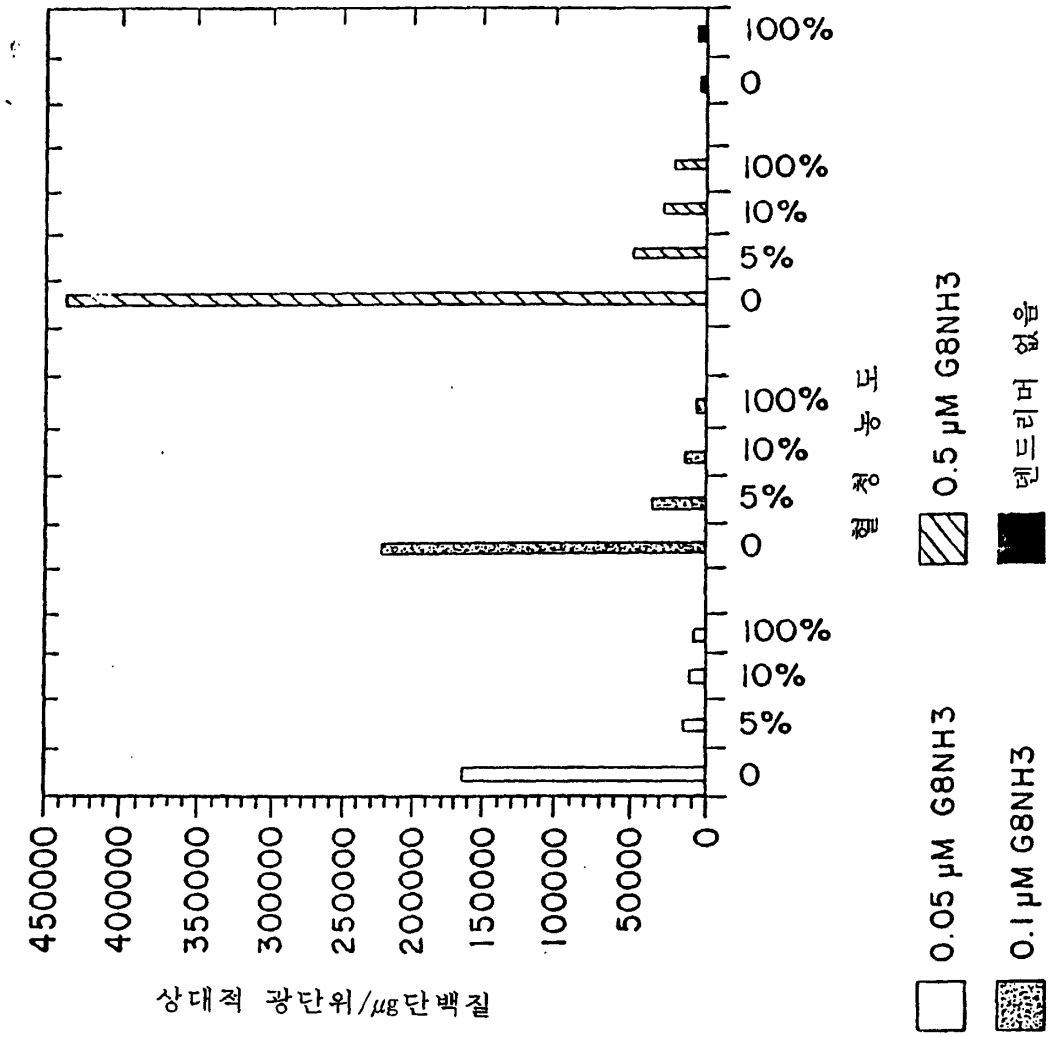
도면40


콘쥬게이트화된 덴드리머
비콘쥬게이트화된 덴드리머
수용체 상태
Rat2
HepG2
NIH3T3
AL
0
200000
400000
600000
800000
1000000
1200000

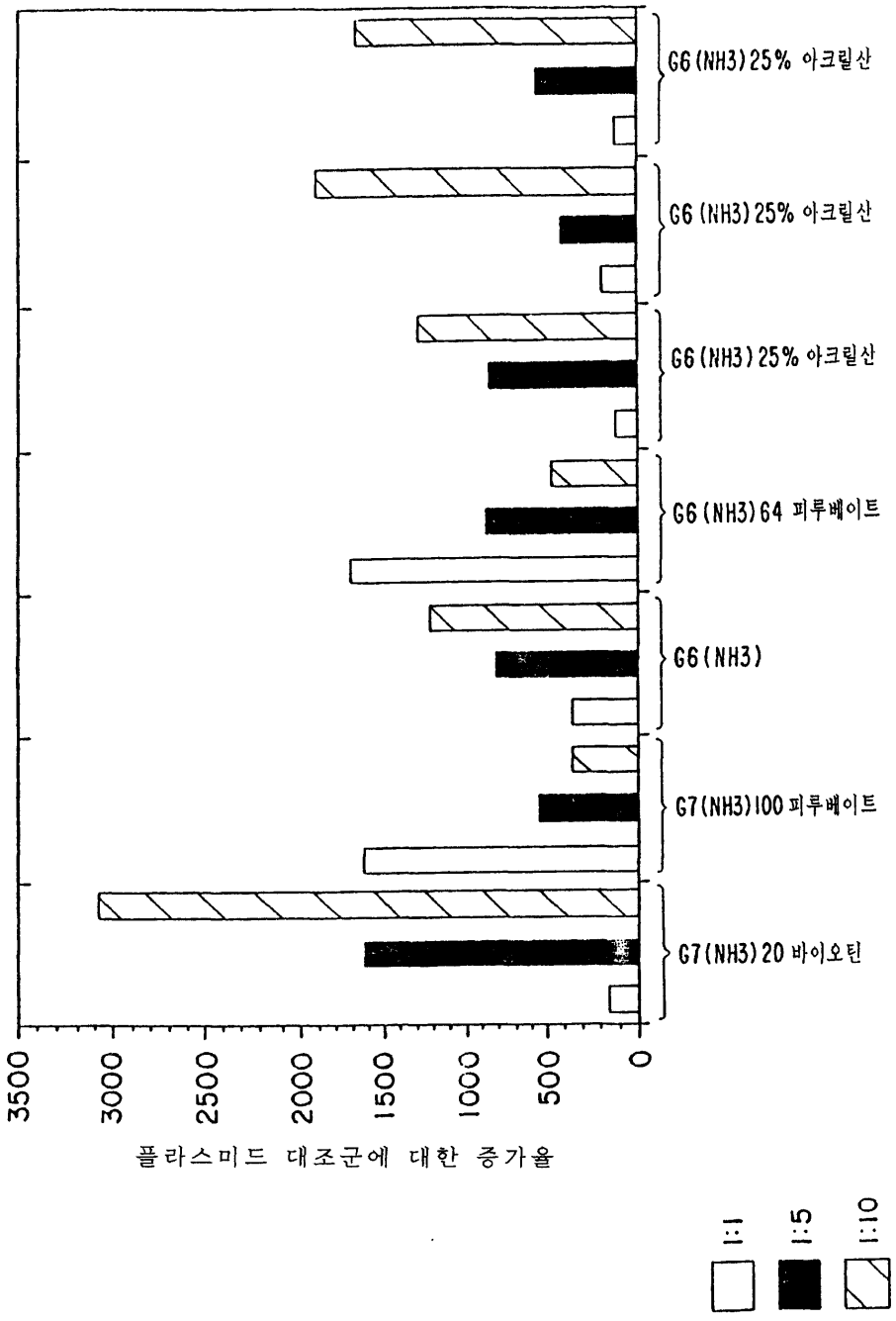
도면41


1
2
3
4
5
6
7

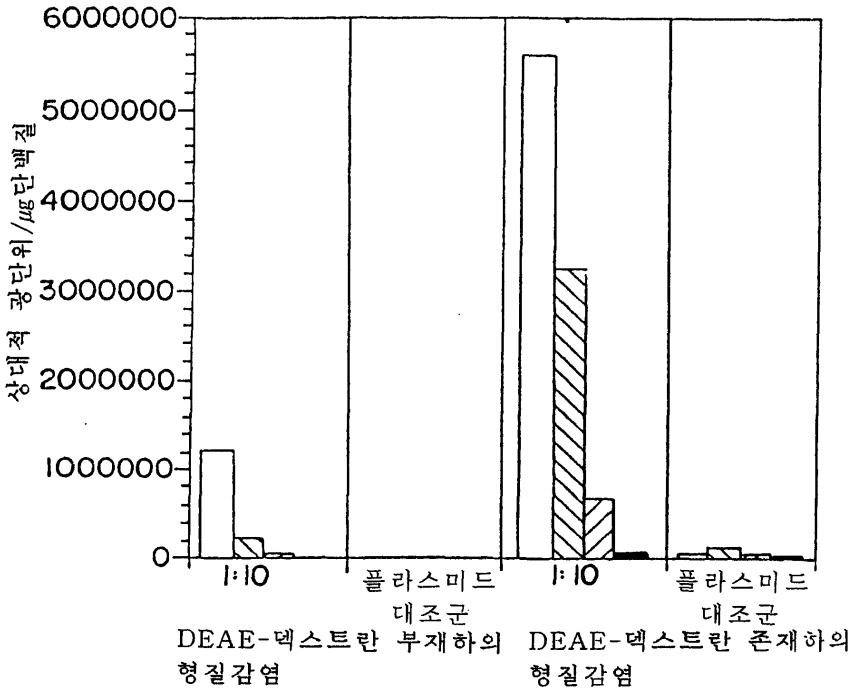
도면42


100%
0
100%
10%
5%
0
100%
10%
5%
0
100%
10%
5%
0
450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
상대적 광단위/μg단백질
세포농도
0.5 μM G8NH3
덴드리머 없음
0.05 μM G8NH3
0.1 μM G8NH3

도면43


G6(NH3)25% 아크릴산
G6(NH3)25% 아크릴산
G6(NH3)25% 아크릴산
G6(NH3)64 피루베이트
G6(NH3)
G7(NH3)100 피루베이트
G7(NH3)20 바이오틴
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
플라스미드 대조군에 대한 증가율
1:1
1:5
1:10

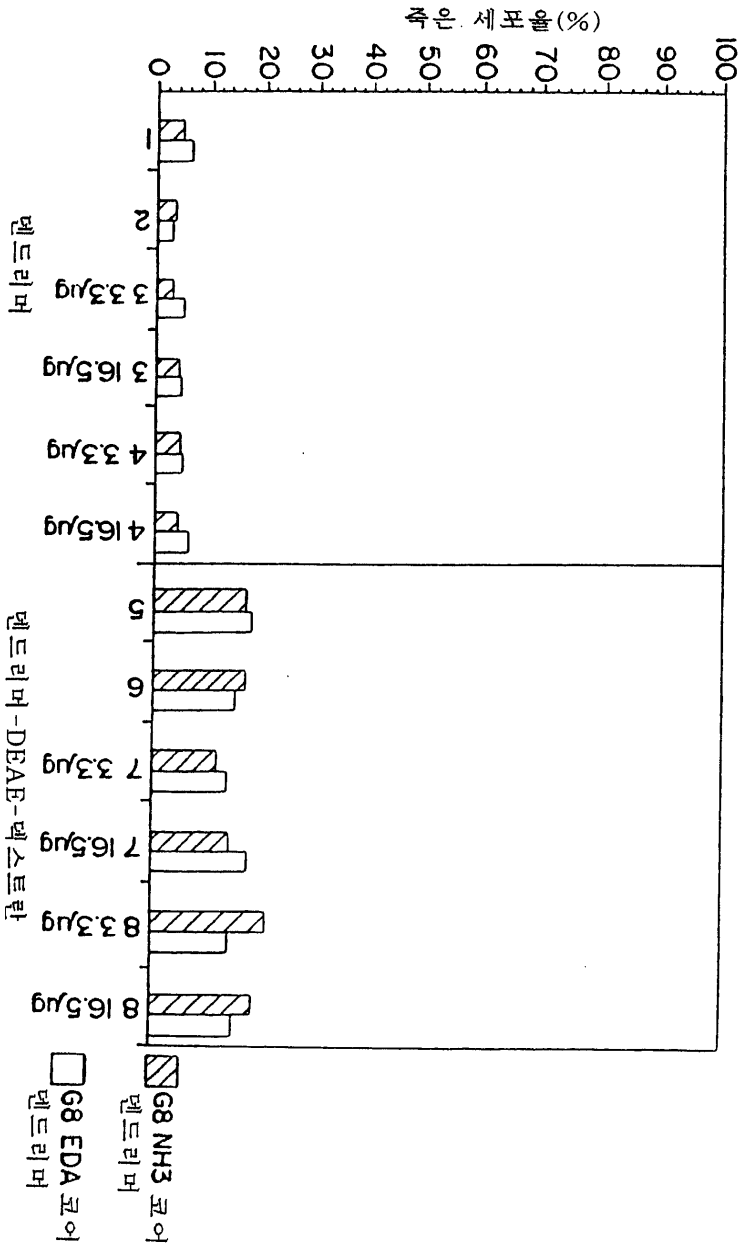
도면44



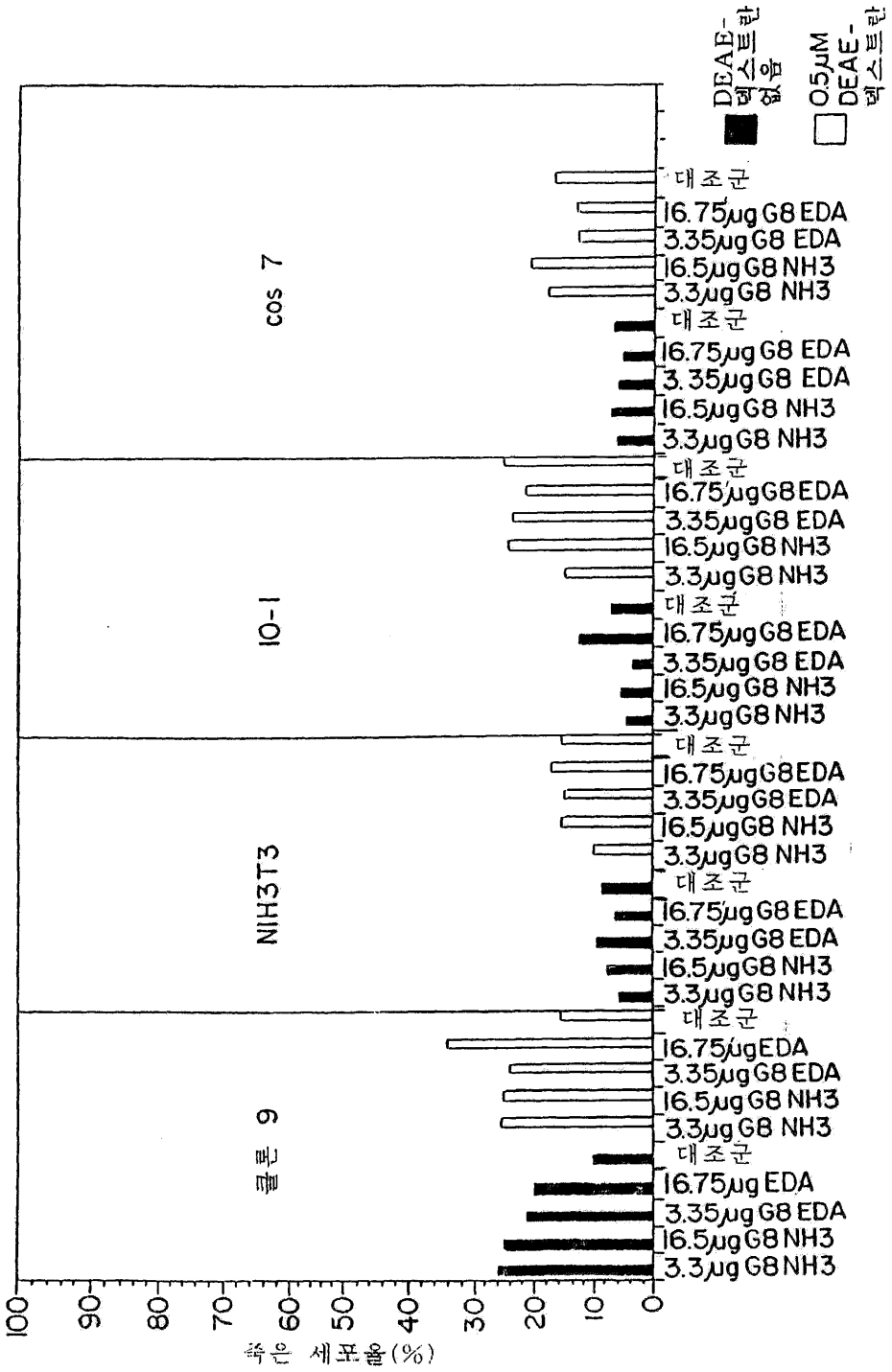
형질감염과
수확사이의 시간

- 21 시간
- 45 시간
- 69 시간
- 141 시간

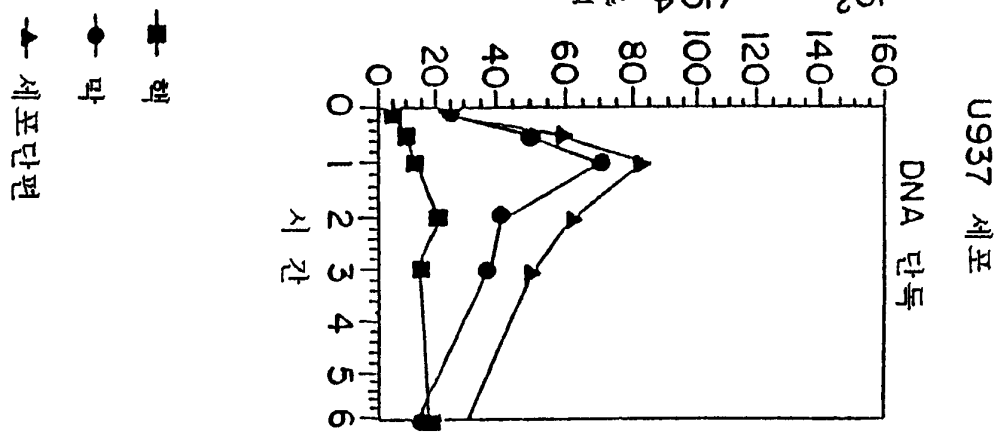
도면45


죽은 세포율(%)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
덴드리머
1
2
3 3.3μg
3 16.5μg
4 3.3μg
4 16.5μg
덴드리머-DEAE-덱스트란
5
6
7 3.3μg
7 16.5μg
8 3.3μg
8 16.5μg
G8 NH3 코어 덴드리머
G8 EDA 코어 덴드리머

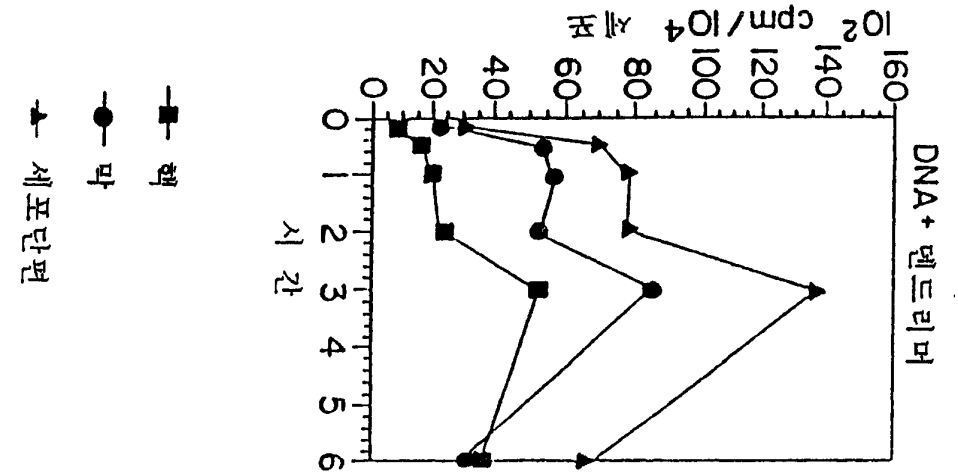
도면46


DEAE-덱스트란 없음
0.5μM DEAE-덱스트란
대조군
16.75μg G8 EDA
3.35μg G8 EDA
16.5μg G8 NH3
3.3μg G8 NH3
cos 7
10-1
NIH3T3
콜론 9
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
죽은 세포율(%)

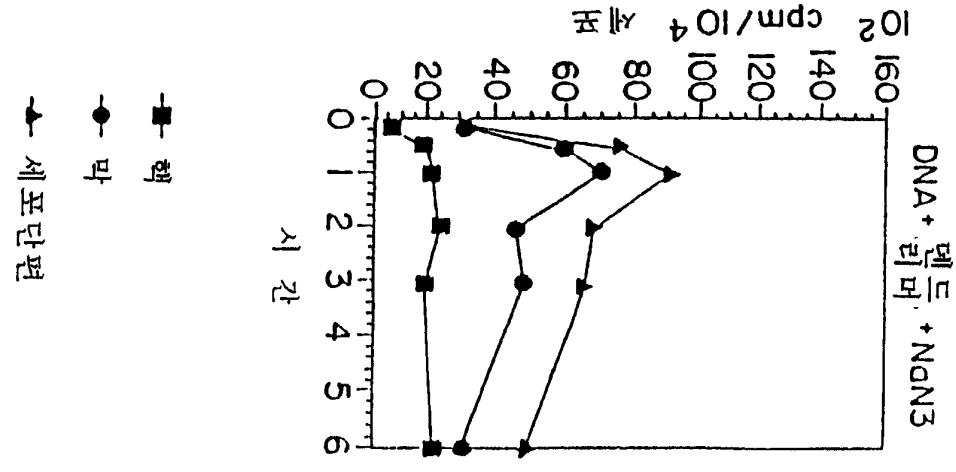
도면47a



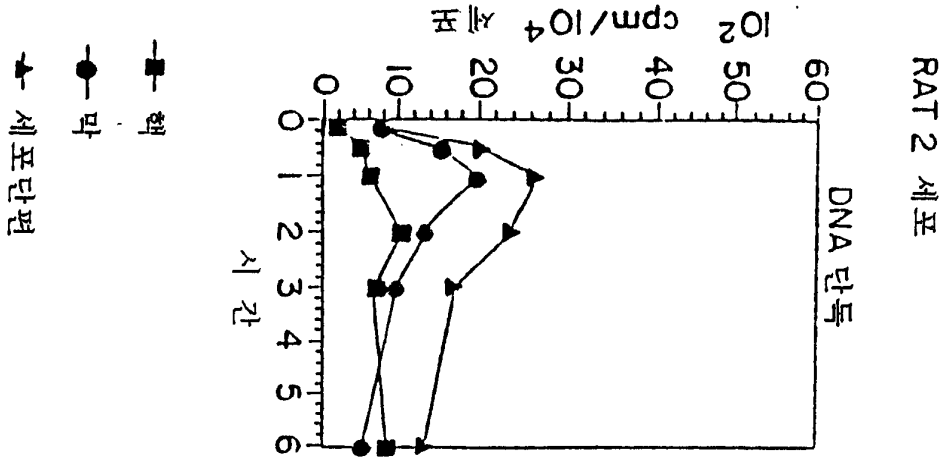
도면47b



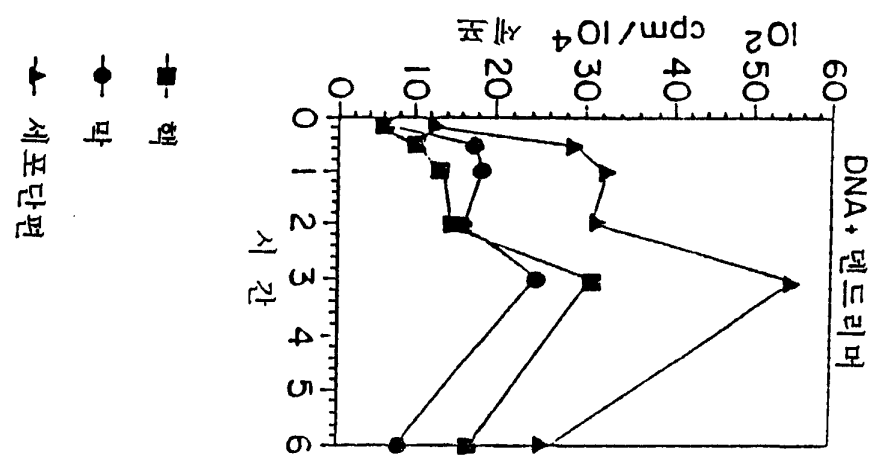
도면47c



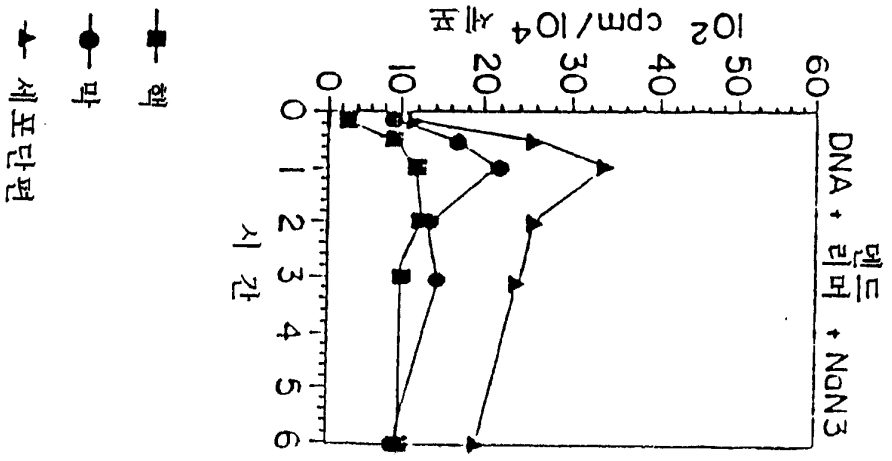
도면47d



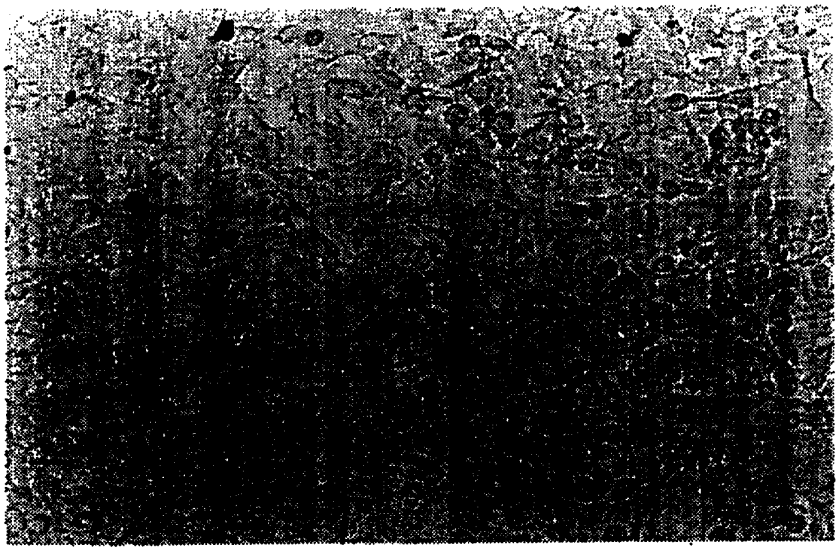
도면47e



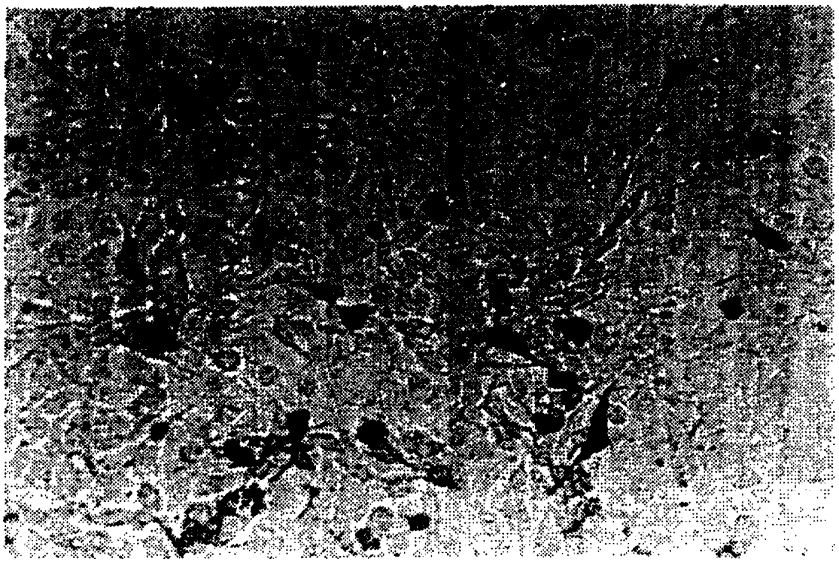
도면47f



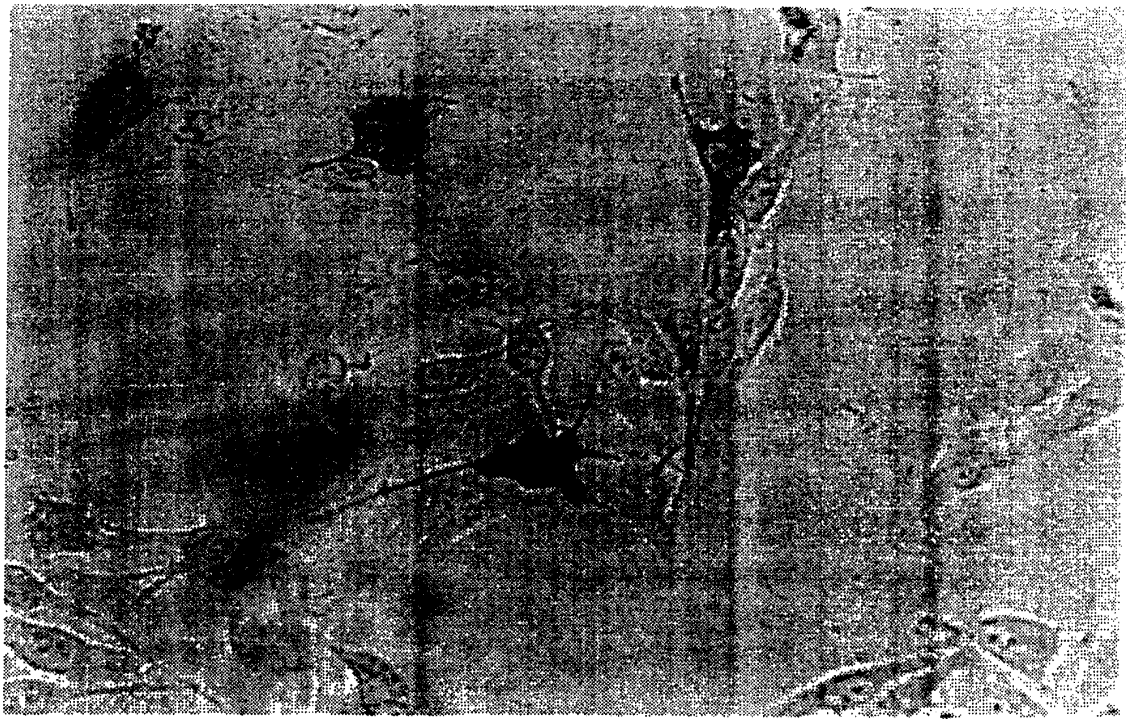
도면48a



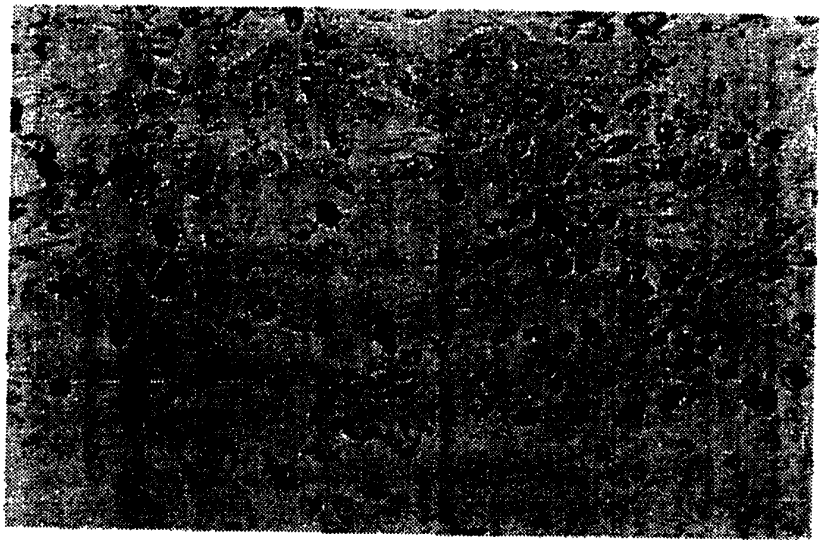
도면48b



도면49



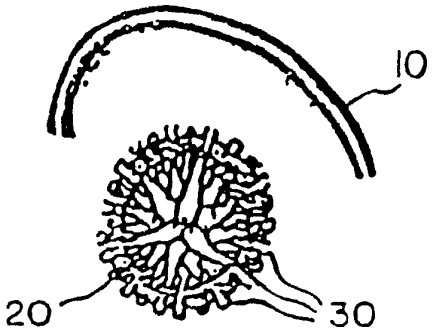
도면50a



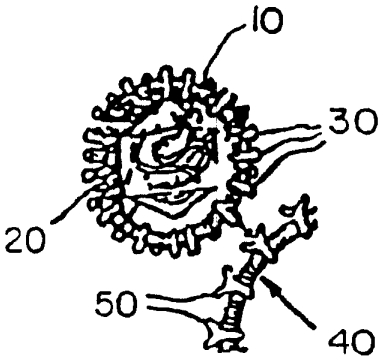
도면50b



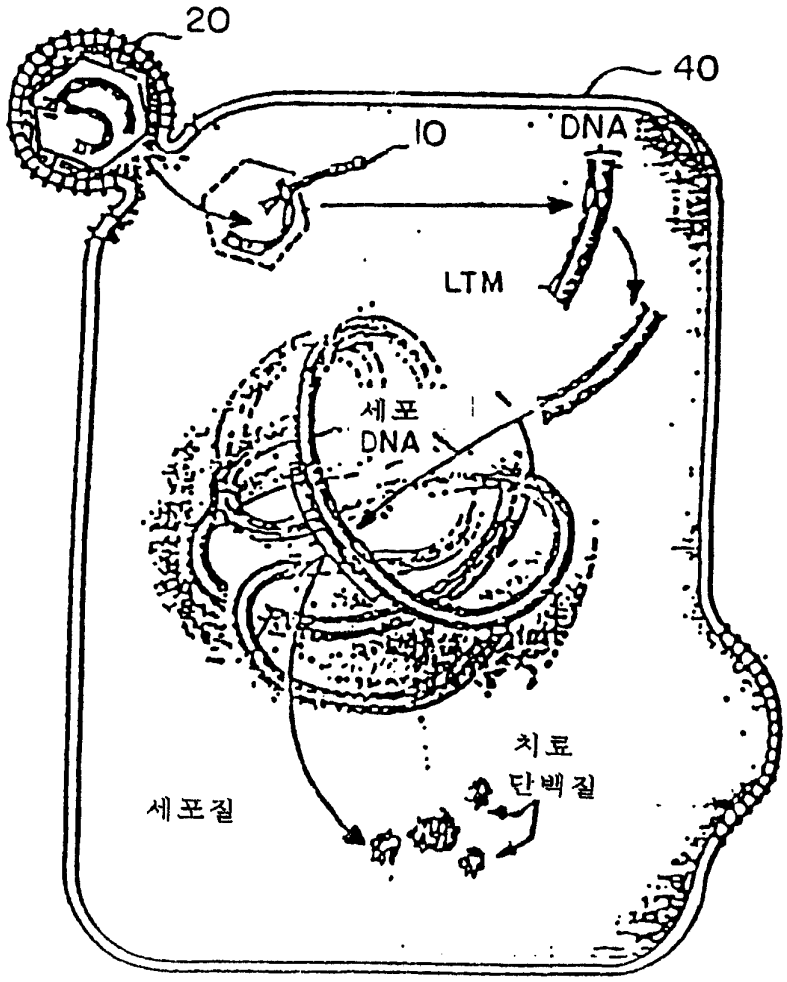
도면51a



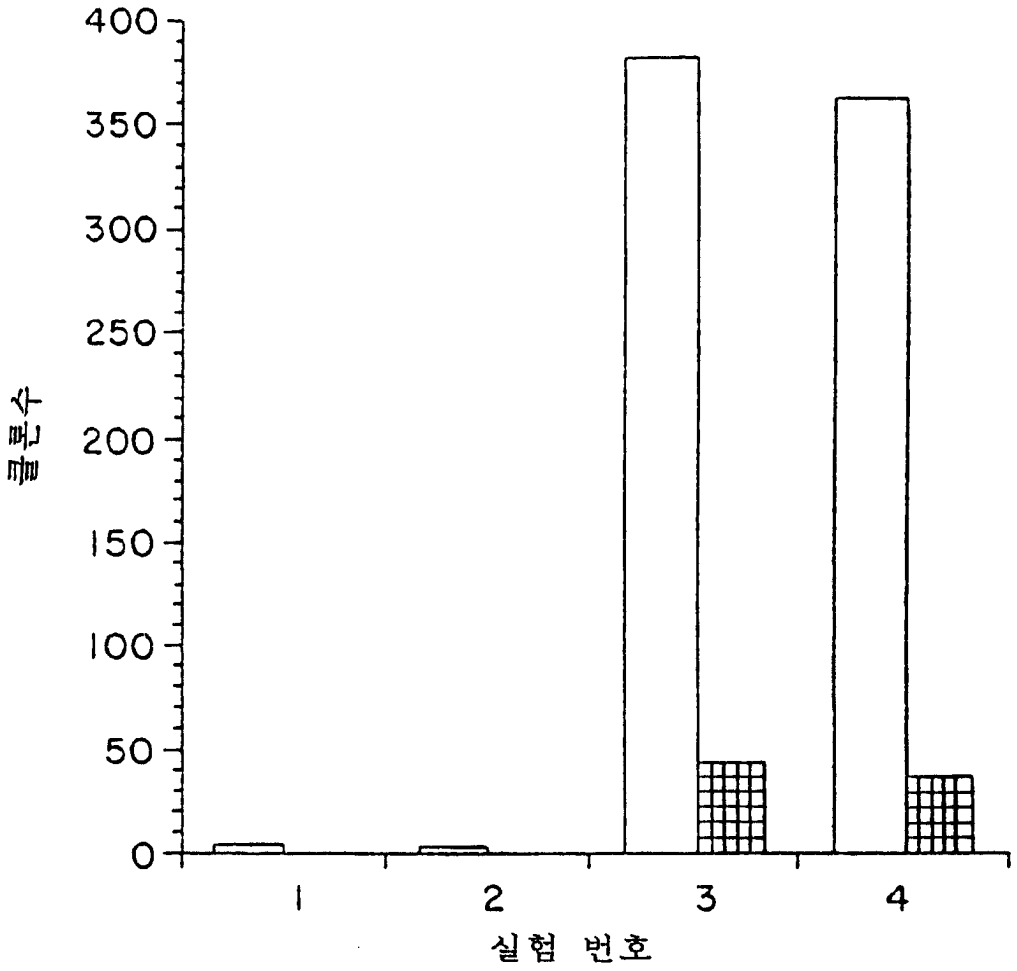
도면51b



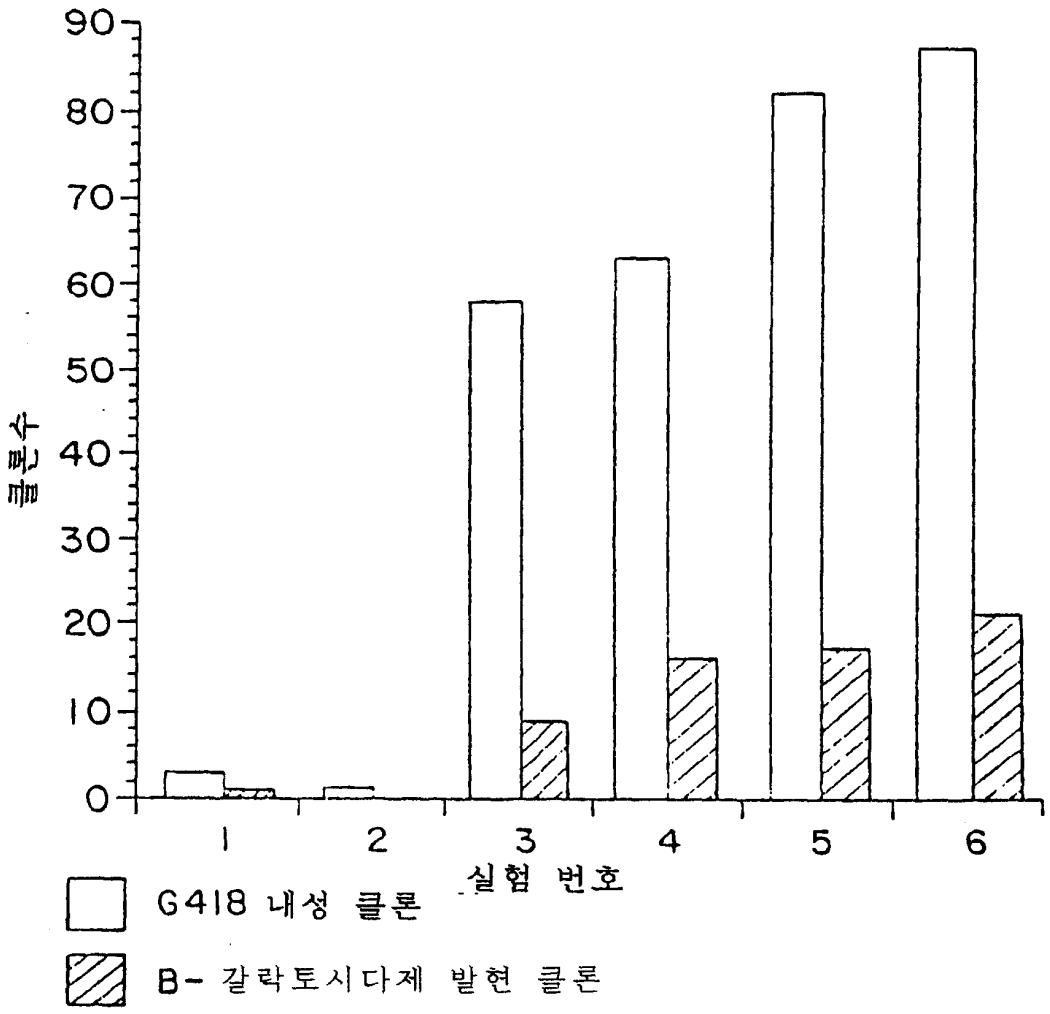
도면51c



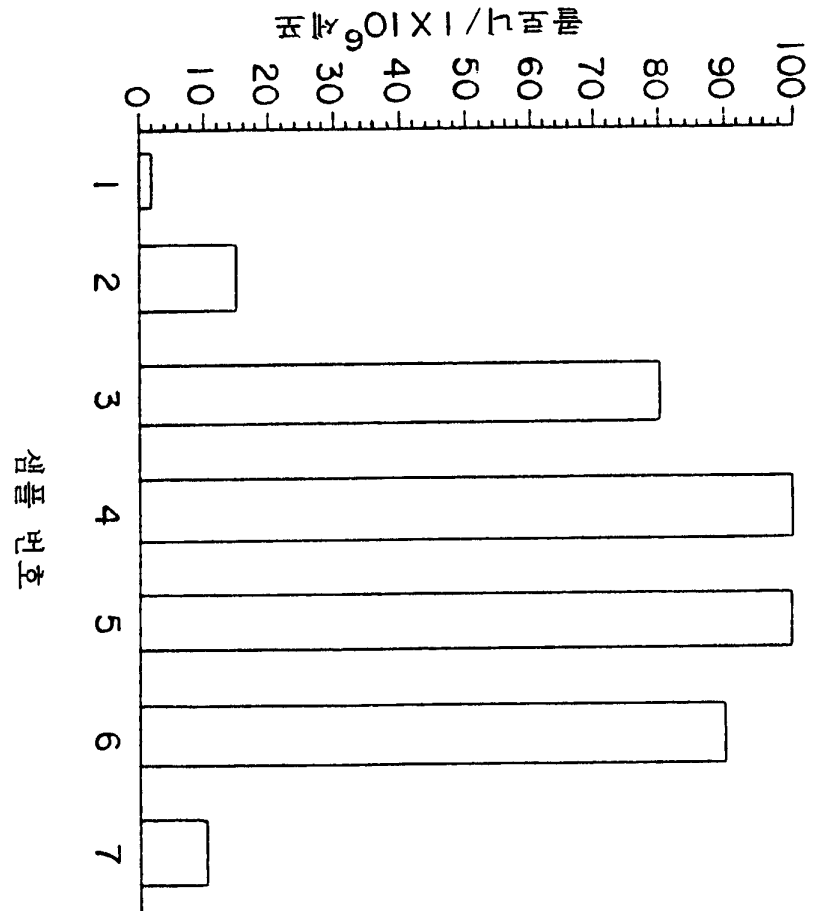
도면52


400
350
300
250
200
150
100
50
0
클론수
1
2
3
4
실험 번호
g418 내성 클론
베타-갈락토시다제 생성시키는 클론

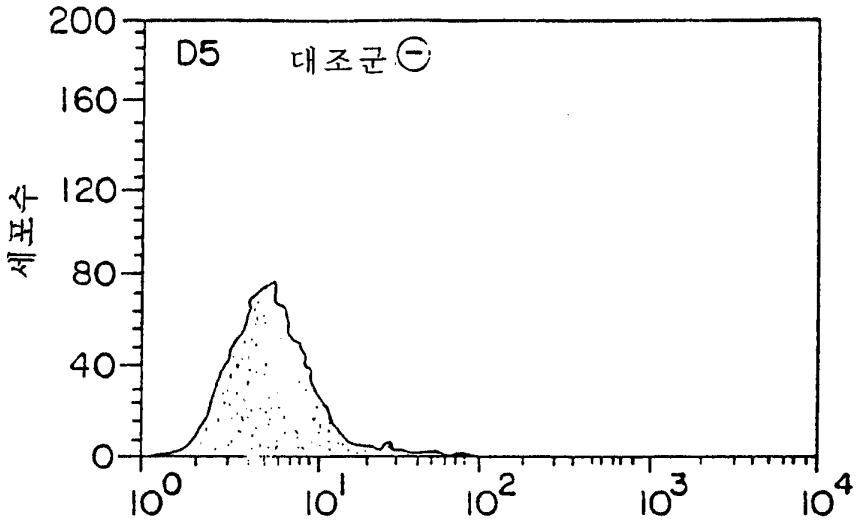
도면53


90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
클론수
1
2
3
4
5
6
실험 번호
G418 내성 클론
B- 갈락토시다제 발현 클론

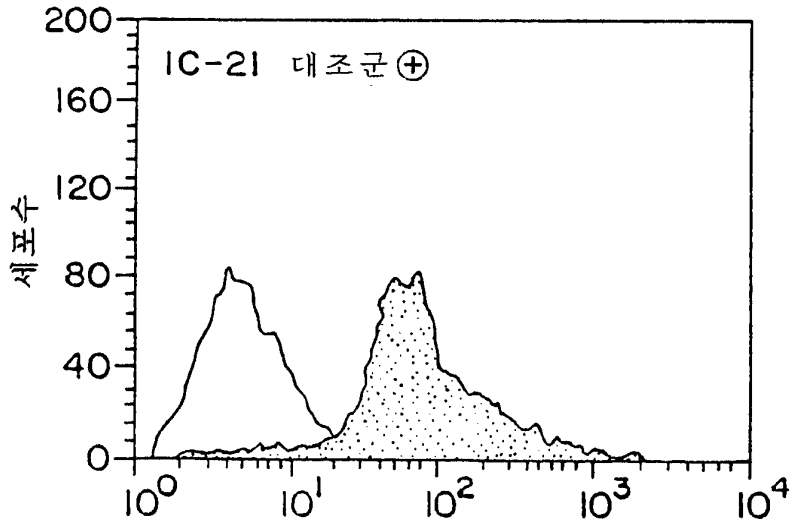
도면54


콜로니/1X10⁶세포
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
1
2
3
4
5
6
7
종양 클람

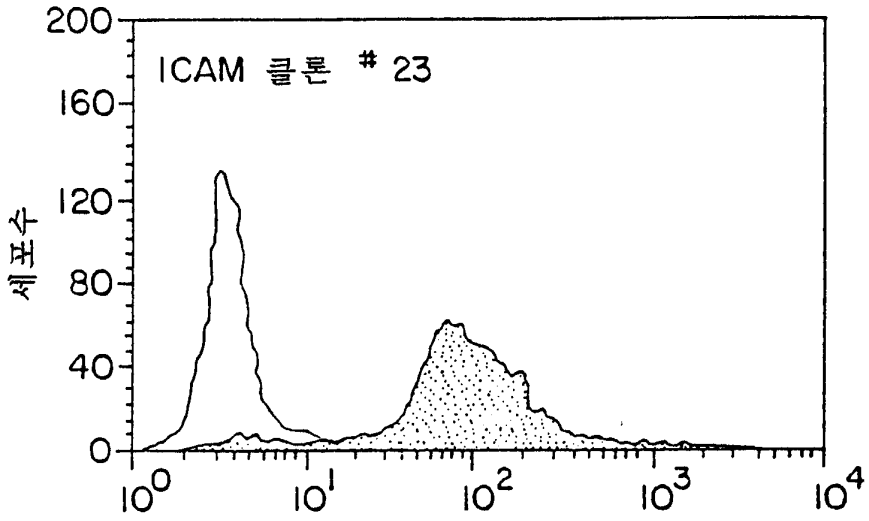
도면55a


200
160
120
80
40
0
세포수
D5
대조군 ⊖
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴

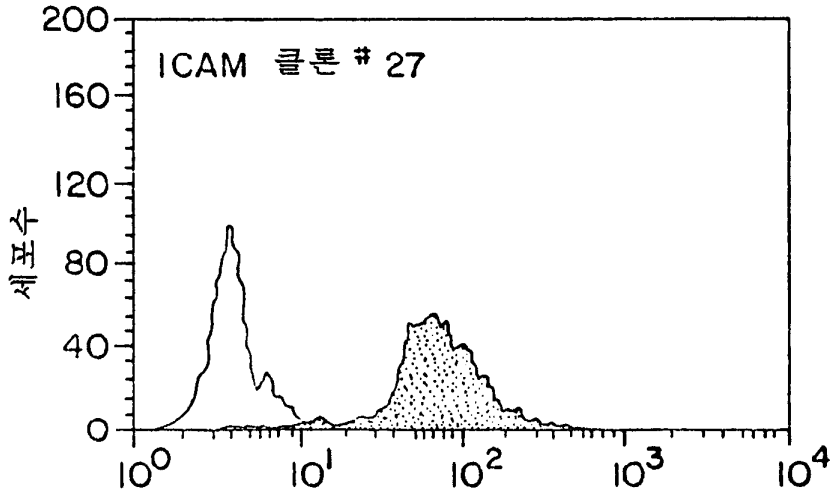
도면55b



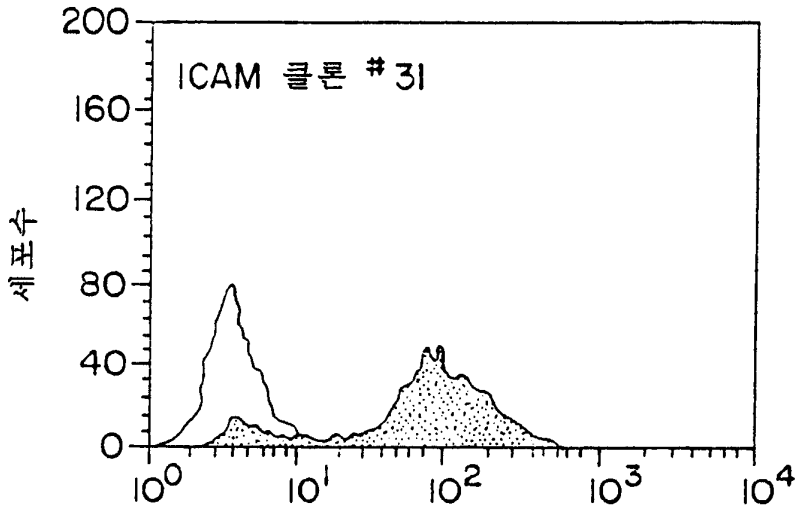
도면55c



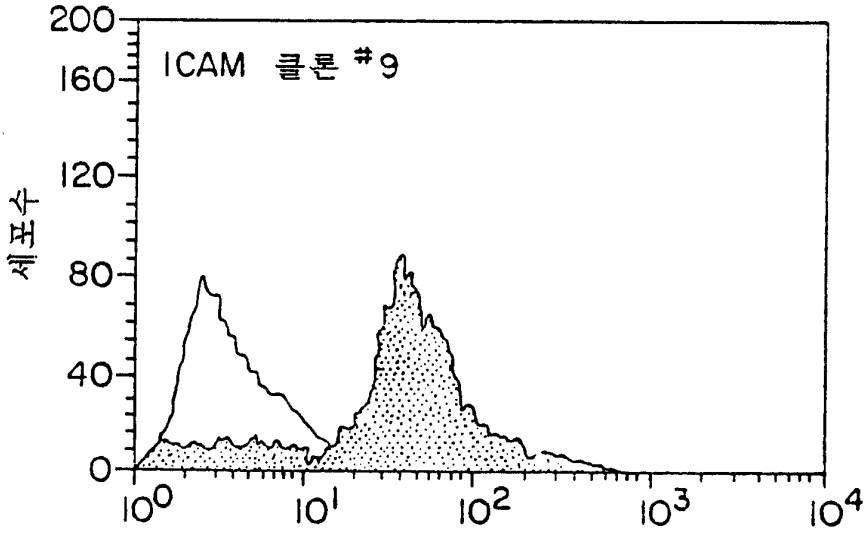
도면55d



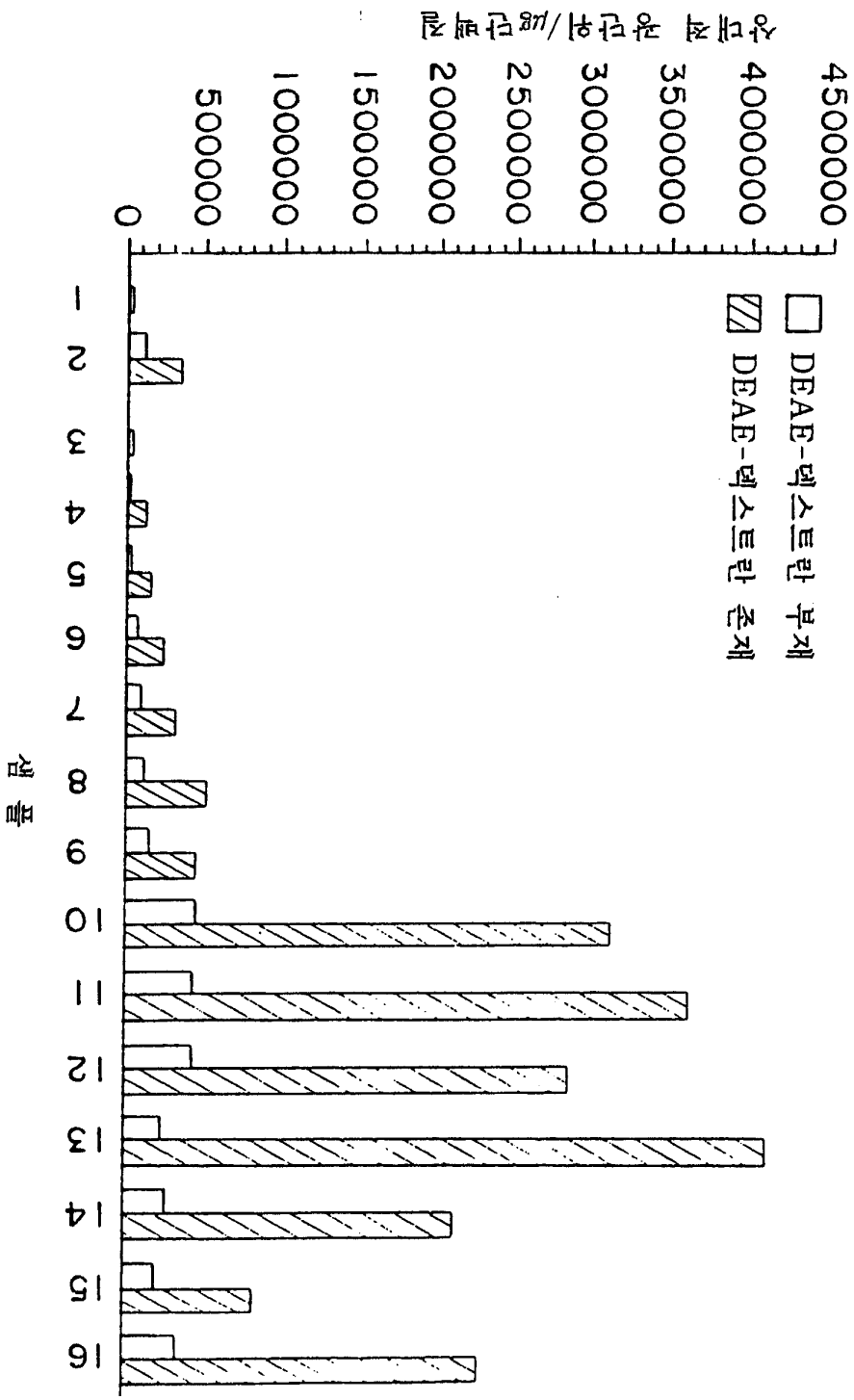
도면55e


ICAM 클론 #31
세포수
200
160
120
80
40
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

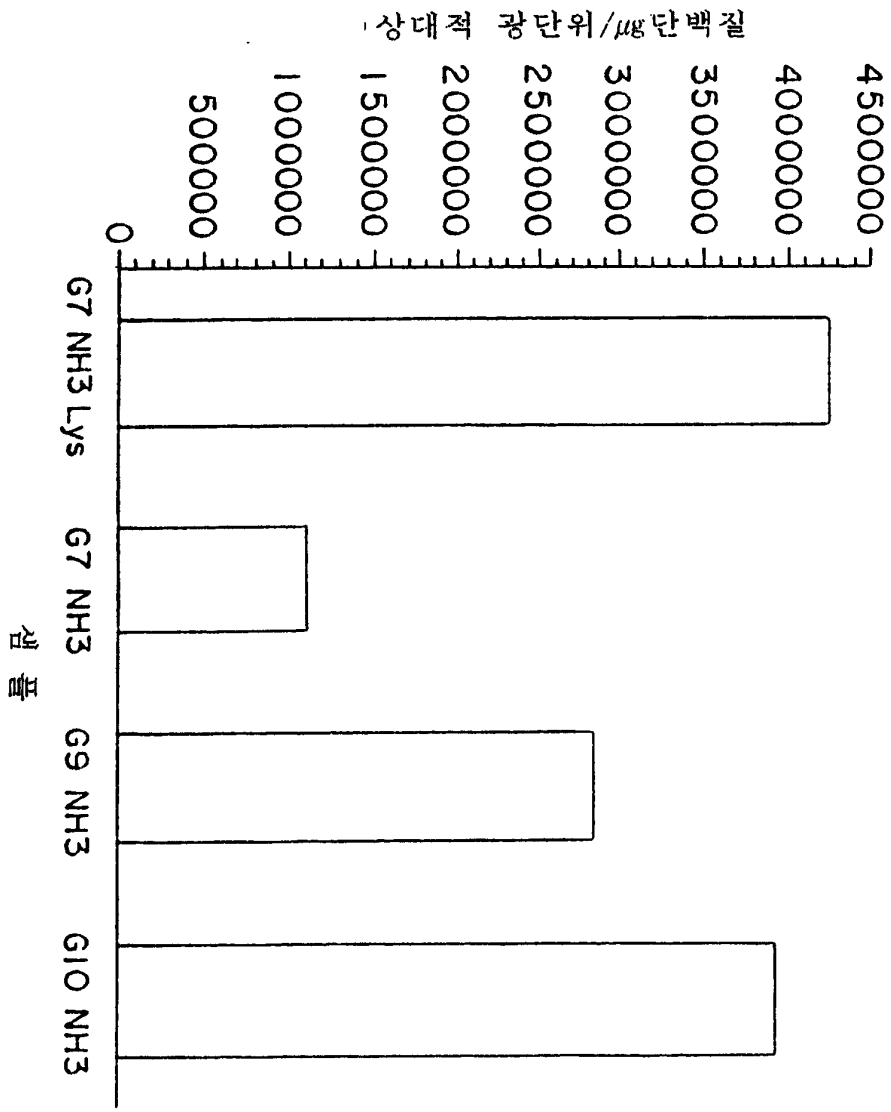
도면55f


ICAM 클론 #9
세포수
200
160
120
80
40
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

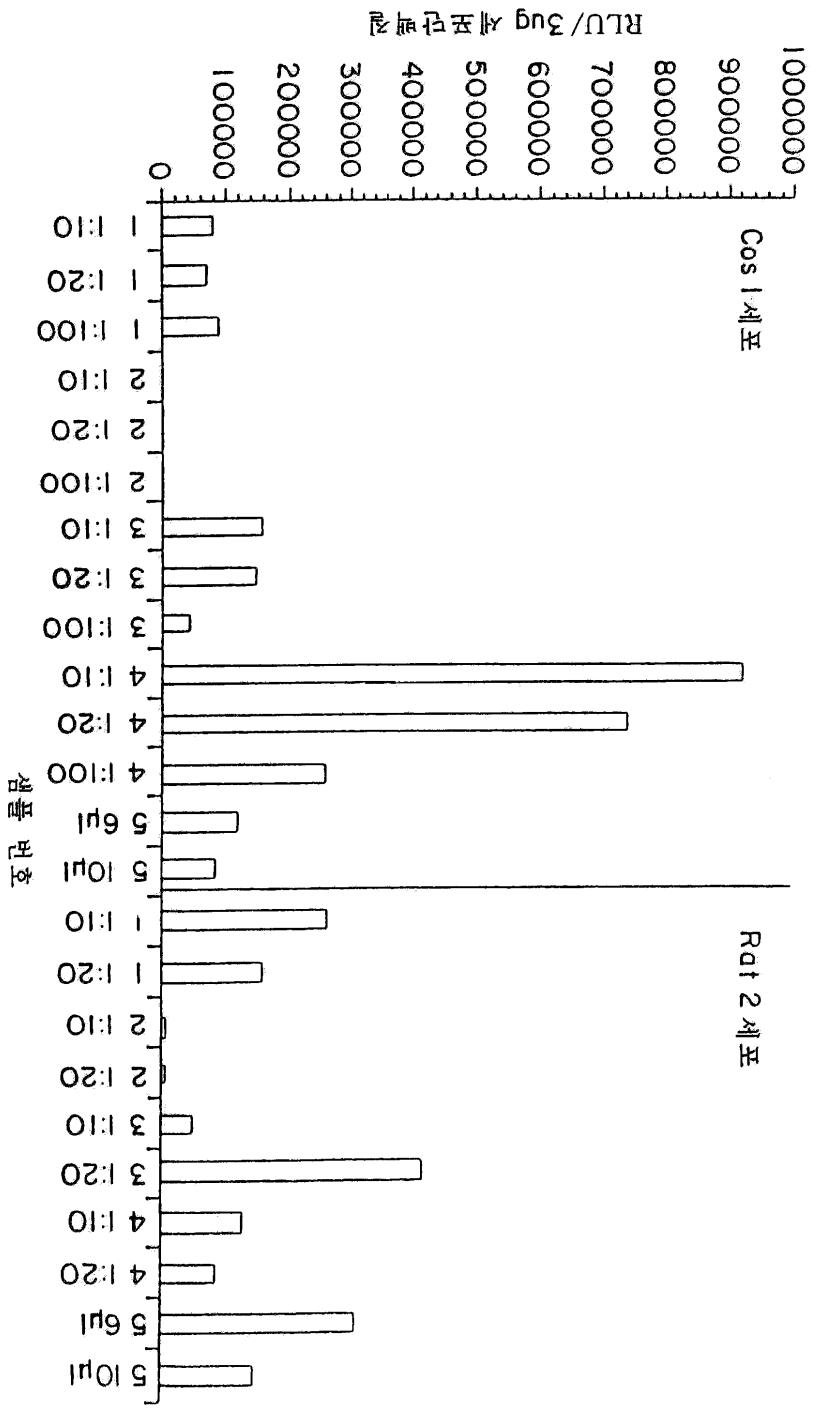
도면56


상대적 광단위/μg단백질
0
500000
1000000
1500000
2000000
2500000
3000000
3500000
4000000
4500000
DEAE-덱스트란 부재
DEAE-덱스트란 존재
샘플
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

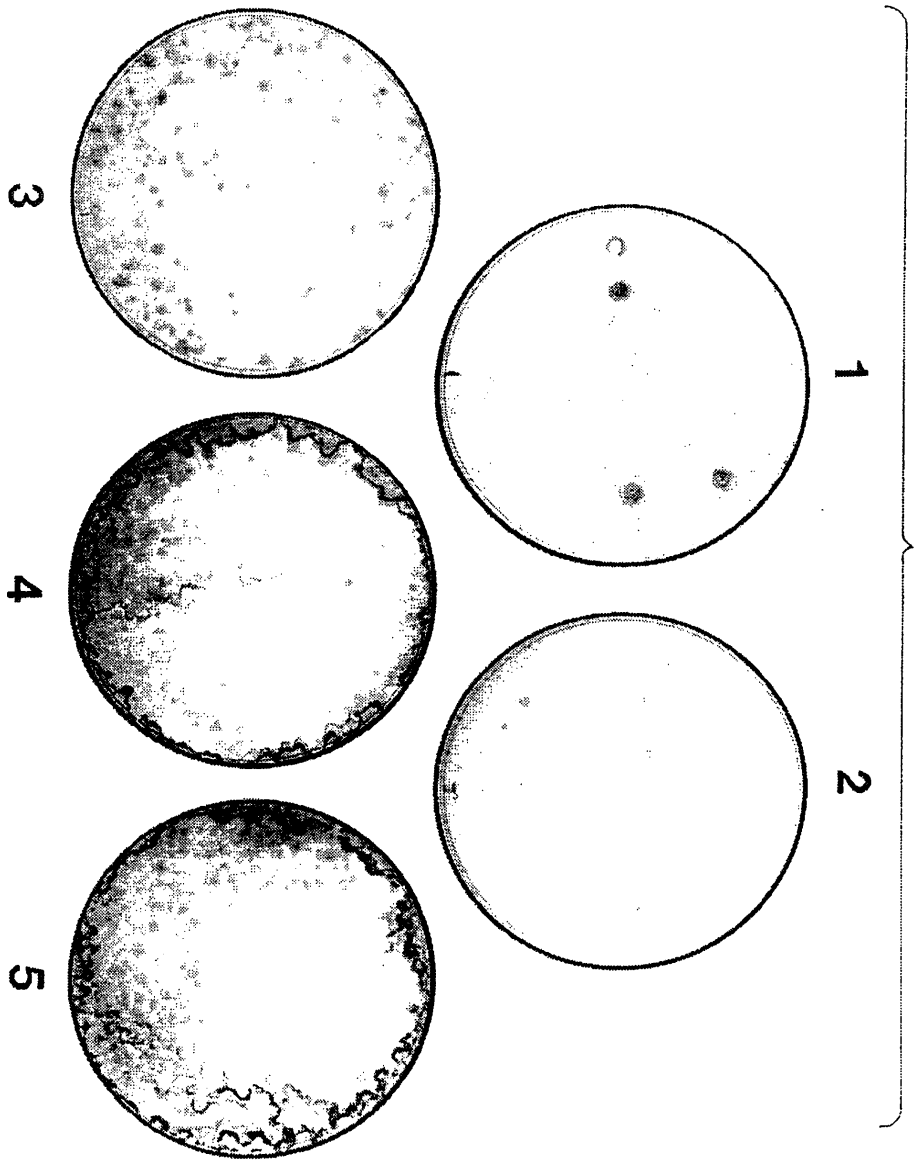
도면57


상대적 광단위/μg단백질
0
500000
1000000
1500000
2000000
2500000
3000000
3500000
4000000
4500000
G7 NH3 Lys
G7 NH3
G9 NH3
G10 NH3
물질

도면58

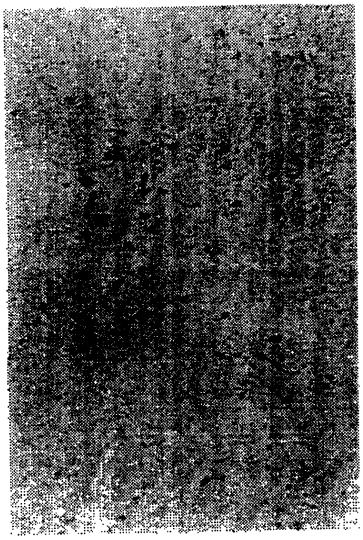

RLU/ 3ug 세포단백질
0
100000
200000
300000
400000
500000
600000
700000
800000
900000
1000000
Cos 1 세포
Rat 2 세포
혈청 희석
5 10ul
5 6ul
4 1:100
4 1:20
4 1:10
3 1:100
3 1:20
3 1:10
2 1:100
2 1:20
2 1:10
1 1:100
1 1:20
1 1:10

도면59

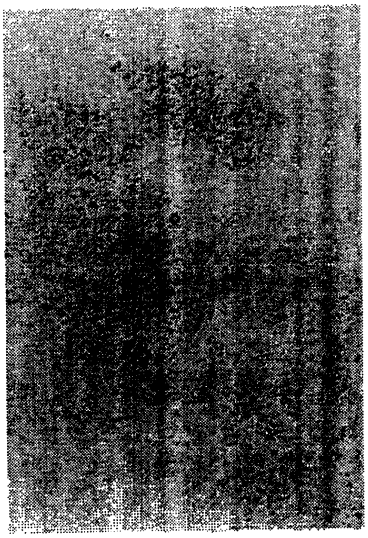


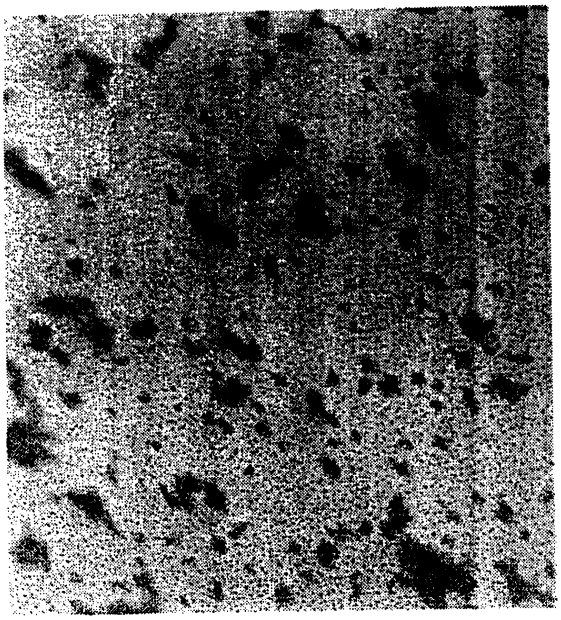
도면60a

1



2

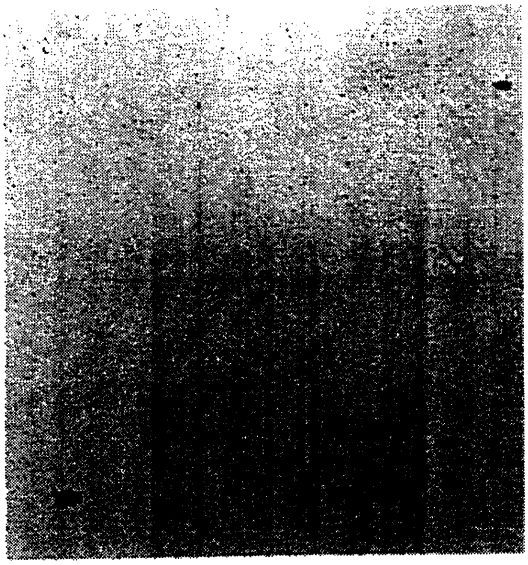


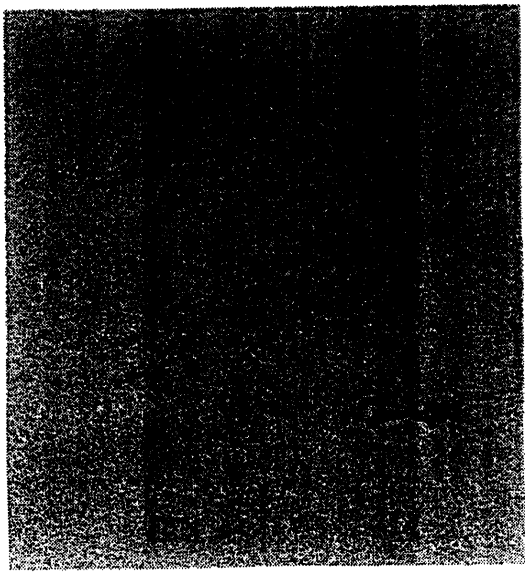


3

도면60b

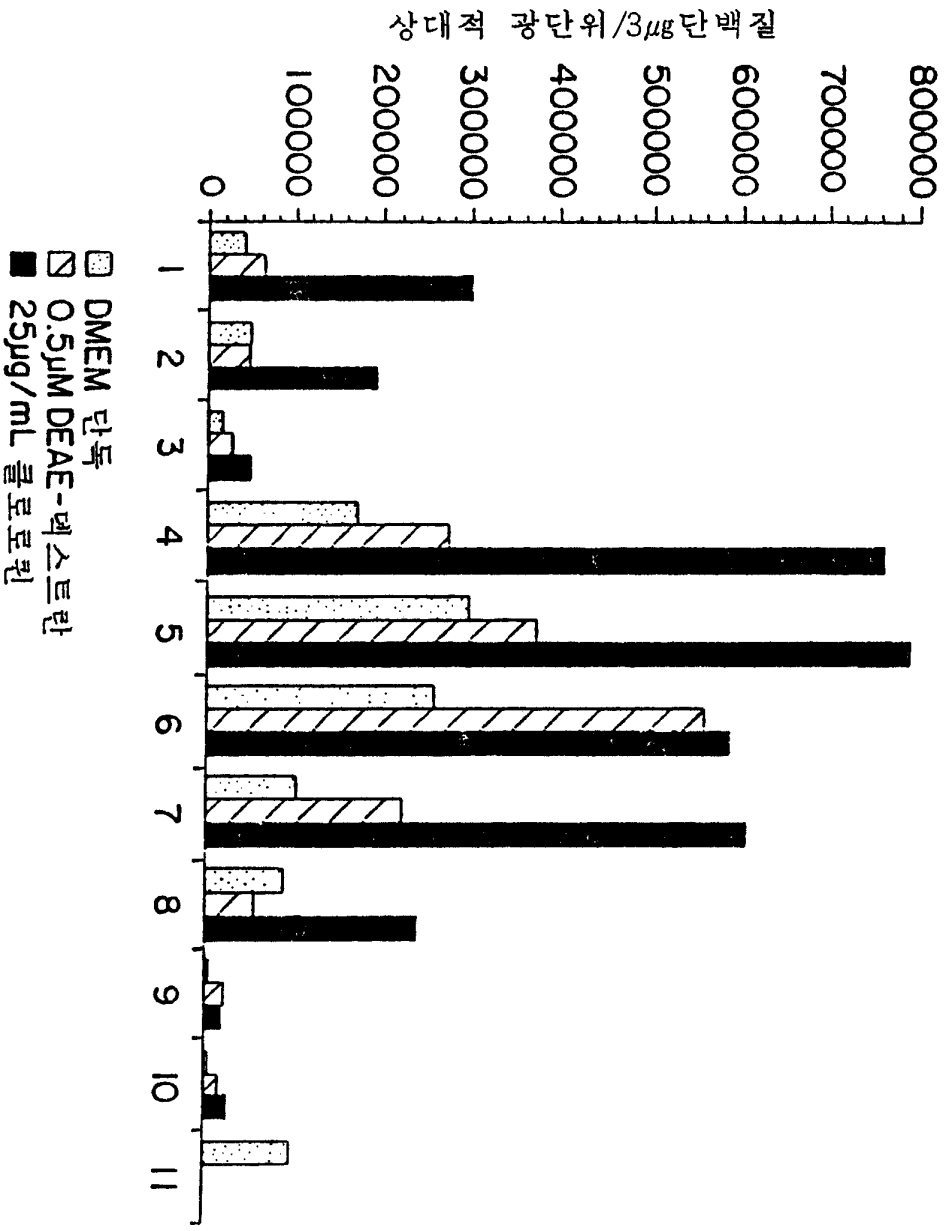
4



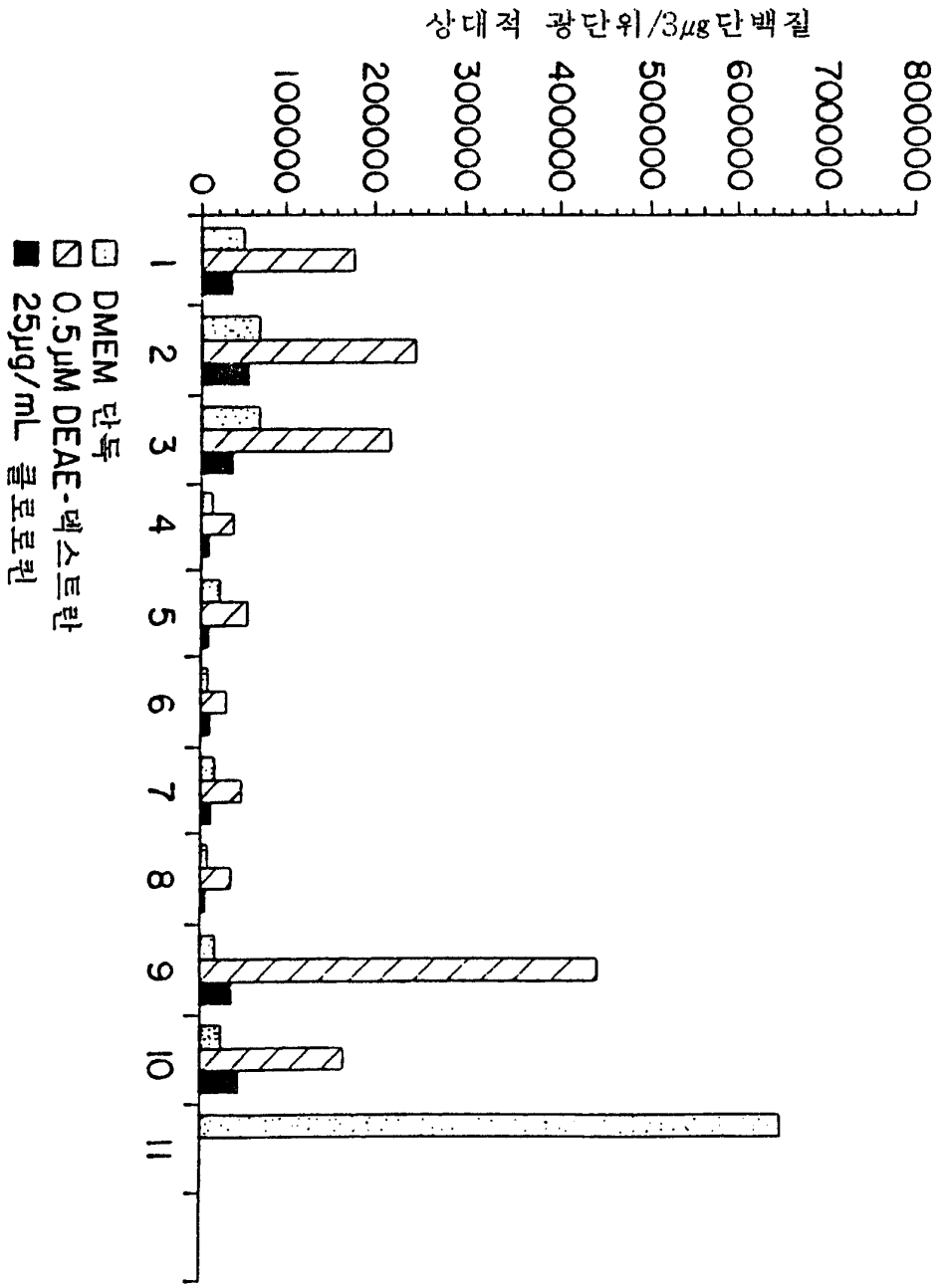


5

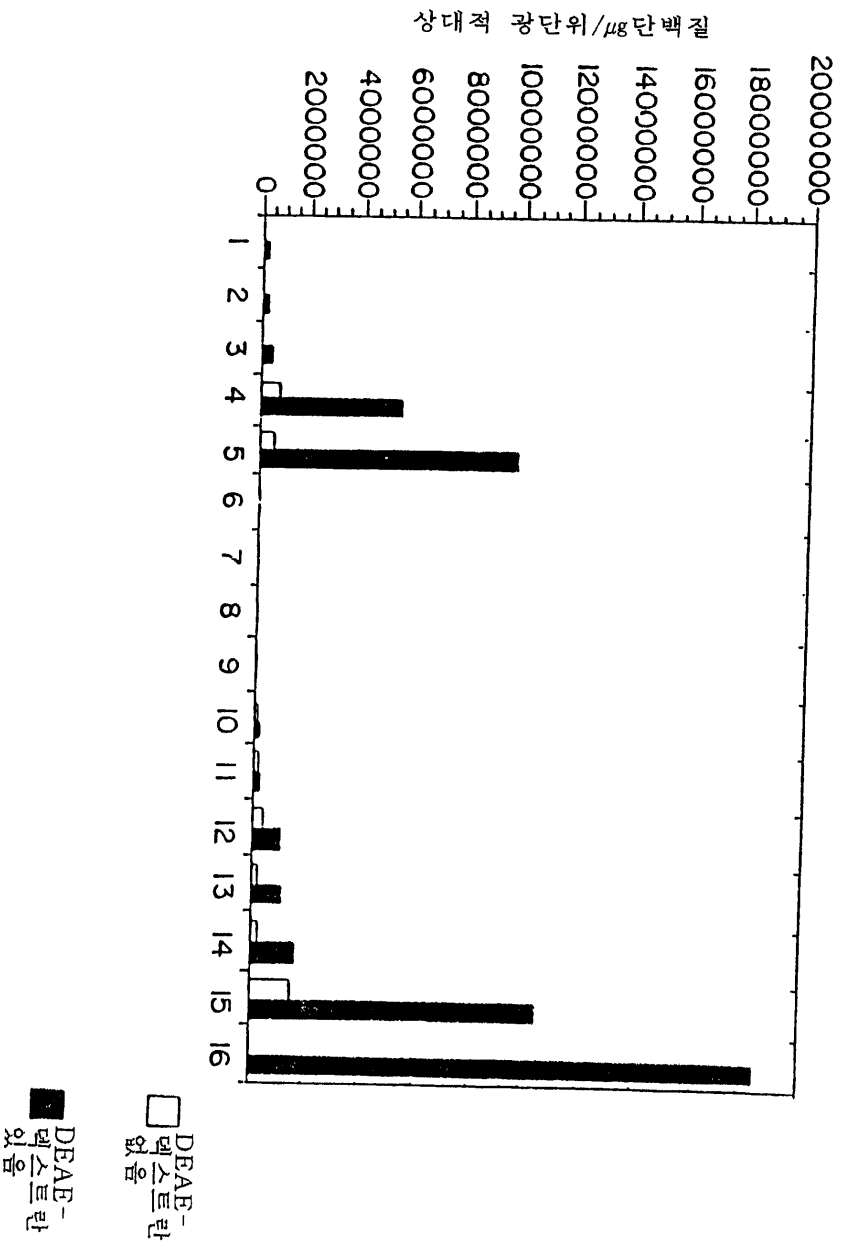
도면61a


상대적 광단위/3μg단백질
0
100000
200000
300000
400000
500000
600000
700000
800000
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
DMEM 단독
0.5μM DEAE-덱스트란
25μg/mL 클로로퀸

도면61b


상대적 광단위/3μg단백질
0
100000
200000
300000
400000
500000
600000
700000
800000
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
DMEM 단독
0.5μM DEAE-덱스트란
25μg/mL 클로로퀸

도면62


상대적 광단위/μg단백질
0
2000000
4000000
6000000
8000000
10000000
12000000
14000000
16000000
18000000
20000000
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
DEAE-덱스트란 없음
DEAE-덱스트란 있음