



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: **A 61 K 47/48** **A 61 K 47/34**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1988 02053**

(22) Indleveringsdag: **1988-04-14**

(24) Løbedag: **1987-08-18**

(41) Alm. tilgængelig: **1988-06-14**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2002-05-13**

(86) International ansøgning nr: **PCT/US87/02074**

(86) International indleveringsdag: **1987-08-18**

(85) Videreførelsesdag: **1988-04-14**

(30) Prioritet: **1986-08-18 US 897455**

(73) Patenthaver: **The Dow Chemical Company, 2030 Dow Center, Abbott Road, Midland, Michigan 48640, USA**

(72) Opfinder: **Donald A. Tomalia, 463 West Chippewa River Road, Midland, Michigan 48640, USA**

Donald A. Kaplan, 919 East Park Drive, Midland, Michigan 48640, USA

William J. Kruper, 230 Barden Road, Sanford, Michigan 48657, USA

Roberta C. Cheng, 3873 Old Pine Trail, Midland, Michigan 48640, USA

Ian A. Tomlinson, 3316 Birchfield Drive, Midland, Michigan 48640, USA

Michael J. Fazio, 4617 Forestview Drive, Midland, Michigan 48640, USA

David M. Hedstrand, Midland, Michigan 48640, 506 West Chippewa River Road, USA

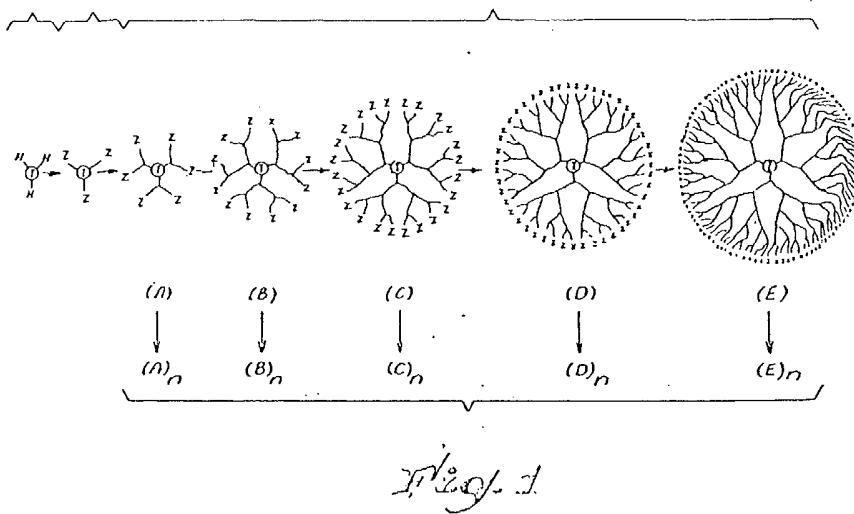
(74) Fuldmægtig: **Chas. Hude A/S, H.C. Andersens Boulevard 33, 1780 København V, Danmark**

(54) Benævnelse: **Stjerneeksplosionskonjugater, fremgangsmåder til fremstilling deraf, fremgangsmåde til fremstilling af en stjerneeksplosionspolyethylenimin og fremgangsmåde til rensning af en stjerneeksplosionsdendrimer**

(56) Fremdragne publikationer:
Ingen

(57) Sammendrag:

Stjerneeksplosionskonjugater, som er sammensat af mindst én stjerneeksplosionspolymer i forbindelse med mindst én enhed af et båret farmaceutisk materiale, er blevet fremstillet. Disse konjugater har særlig fordelagtige egenskaber som følge af stjerneeksplosionspolymerens enestående karakteristika.



Den foreliggende opfindelse angår anvendelsen af tætte stjernepolymerer som bærere for farmaceutiske materialer. I de senere år er polymerer, der omtales som tætte stjernepolymerer eller stjerneeksplosionspolymerer, blevet udviklet. Det har vist sig, at størrelsen, faconen og egenskaberne hos disse tætte stjernepolymerer eller stjerneeksplosionspolymerer molekylært kan skræddersys til at kunne benyttes til specialiserede slutanvendelser. Stjerneeksplosionspolymerer har signifikante fordele, som kan tilvejebringe et middel til tilførsel af høje koncentrationer af båret materiale pr. polymerenhed, styret afgivelse, målrettet afgivelse og/eller flere arter af afgivelse eller anvendelse.

I sit bredeste aspekt angår den foreliggende opfindelse polymerkonjugatmaterialer omfattende tætte stjernepolymerer eller stjerneeksplosionspolymerer i forbindelse med ønskede materialer (i det følgende vil disse polymerkonjugater hyppigt blive omtalt som "stjerneeksplosionskonjugater" eller "konjugater"), fremgangsmåder til fremstilling af disse konjugater, en fremgangsmåde til fremstilling af en stjerneeksplosionspolyethylenimin og en fremgangsmåde til rensning af en stjerneeksplosionsdendrimer.

Konjugaterne ifølge opfindelsen er egnede til brug inden for en række forskellige anvendelser, hvor specifik afgivelse ønskes, og de er særlig egnede til afgivelse af biologisk aktive stoffer. I en foretrukken udførelsesform for den foreliggende opfindelse består stjerneeksplosionskonjugaterne af en eller flere stjerneeksplosionspolymerer i forbindelse med et eller flere bioaktive stoffer.

Stjerneeksplosionskonjugaterne frembyder signifikante fordele i forhold til andre hidtil kendte bærere som følge af stjerneeksplosionspolymerernes fordelagtige egenskaber. Stjerneeksplosionspolymerer udviser en molekylær opbygning, der er karakteriseret ved regelmæssig dendritisk forgrening med radial symmetri. Disse radialt symmetriske molekyler omtales som havende "stjerneeksplosionstopologi". Disse polymerer fremstilles på en måde, som kan tilvejebringe koncentriske dendritiske

lag eller rækker rundt om en initiatorkerne. Stjerneeksplosionsstopologien opnås ved hjælp af den ordnede samling af organiske gentagelsesenheder i koncentriske, dendritiske lag eller rækker rundt om en initiatorkerne. Dette opnås ved indfø-
5 føring af mangfoldighed og selvgentagelse (inden for hvert lag eller række) på en geometrisk gradvis måde gennem et antal molekylære generationer. De resulterende højfunktionaliserede molekyler har været kaldt "dendrimerer" med henvisning til deres forgrenede (træ-lignende) struktur samt deres oligomere
10 natur. Udtrykkene stjerneeksplosionsoligomer og stjerneeksplosionsdendrimer er således indeholdt i udtrykket stjerneeksplosionspolymer. Topologiske polymerer, med størrelses- og faconstyrede områder, er dendrimerer, som er covalent broforbundet
15 viaderes reaktive terminale grupper, der omtales som stjerneeksplosions-"broforbundne dendrimerer". Udtrykket broforbundet dendrimer er også indeholdt i udtrykket "stjerneeksplosionspolymer".

20 Den følgende beskrivelse af tegningens figurer hjælper til forståelse af den foreliggende opfindelse.

Fig. 1 viser forskellige generationer af stjerneeksplosionsdendrimerer.

25 Fig. 2A viser en dendrimer med usymmetriske (uens) grenforbindelser.

Fig. 2B viser en dendrimer med symmetriske (ens) grenforbindelser.

30 Fig. 3 viser dendrimerstørrelser i forhold til antistofdimensioner.

35 Fig. 4 viser carbon-13-rotationsgitter-relaksationstider (T_1) for aspirin, der er inkorporeret i forskellige dendrimergenerationer (eksempel 1).

Fig. 5 viser resultaterne af den dynamiske analyse af eksempel 2.

Fig. 6 viser indflydelsen af generation 6,5 dendrimer på dialysehastigheden af pseudoephedrin ved pH 9,5 fra eksempel 2.

Fig. 7 viser virkningen af dendrimerhydrolyse på permeabiliteten af pseudoephedrin ifølge eksempel 3.

Eksempel 8 viser sammenligning af procent salicylsyre, der er frigjort i receptorummet i nærværelse af stjerneeksplosionspolymer (generation = 4,0) ved pH 5,0 og 6,65, med salicylsyrekontrol, eksempel 4.

Fig. 9 viser sammenligning af procent salicylsyre, der er mistet fra donorummet, med stjerneeksplosionspolymer (generation = 4,0) i receptorummet ved pH 8,0, med salicylsyreindhold, eksempel 4.

Fig. 10 viser sammenligning af procent salicylsyre, der er mistet fra donorummet i nærværelse af stjerneeksplosionspolymer (generation = 4,5), med salicylsyrekontrol, eksempel 4.

Stjerneeksplosionspolymererne er illustreret i fig. 1, hvori I betegner en initiatorkerne (i denne fig. er en trifunktionel initiatorkerne vist ved hjælp af tegningen længst til venstre), Z betegner en terminalgruppe, der første gang er vist ved hjælp af den anden tegning fra venstre, omtalt som en stjerneforgrenet oligomer, A, B, C, D og E betegner særlige molekulære generationer af stjerneeksplosionsdendrimerer, og $(A)_n$, $(B)_n$, $(C)_n$, $(D)_n$ og $(E)_n$ betegner broforbundne stjerneeksplosionsdendrimerer.

Stjerneeksplosionsdendrimererne er enkeltmolekulære aggregater, der har tre fremtrædende arkitektoniske træk, nemlig (a) en initiatorkerne, (b) indre lag (generationer, G) sammensat af gentagelsesenheder, der radialt er knyttet til initiatorkernelen, og (c) en ydre overflade af terminal funktionalitet (dvs. terminale funktionelle grupper), der er knyttet til den yderste generation. Størrelsen og faconen af stjerneeksplosionsdendrimermolekylet og de funktionelle grupper, der findes i

dendrimermolekylet, kan styres ved valg af initiatorkernen, antallet af generationer (dvs. lag eller rækker), der benyttes til frembringelse af dendrimeren, og valget af de gentagelsesenheder, der benyttes til hver generation. Eftersom dendrimerne let kan isoleres ved enhver særlig generation, tilvebringes et middel til opnåelse af dendrimerer med ønskede egenskaber.

Valget af stjerneeksplosionsdendrimerkomponenterne påvirker dendrimerernes egenskaber. Typen af initiatorkerne kan påvirke dendrimerfaconen, idet der f.eks. frembringes (afhængigt af valget af initiatorkerne) sfæroidformede dendrimerer, cylindriske eller stangformede dendrimerer, ellipsoidformede dendrimerer eller svampeformede dendrimerer. Rækkevis opbygning af generationer (dvs. generationsantal og størrelsen og naturen af gentagelsesegenhederne) bestemmer dendrimerernes dimensioner og naturen af deres indre.

Som følge af at stjerneeksplosionsdendrimerer er forgrenede polymerer indeholdende dendritiske grene med funktionelle grupper fordelt på grenenes periferi, kan de fremstilles med en række forskellige egenskaber. F.eks. kan de i fig. 2A afbildede makromolekyler og stjerneeksplosionsdendrimererne, såsom de i fig. 2B afbildede, have bestemte egenskaber som følge af grenlængden. Den i fig. 2A viste dendrimertype (såsom Denkwalter, US patentskrift nr. 4.289.872) har usymmetriske (uens segment) grenforbindelser, ydre (dvs. overflade-) grupper (repræsenteret ved Z'), indre molekyldele (repræsenteret ved Z), men meget mindre indre hulrum. Den i fig. 2B viste fortrukne dendrimertype har symmetriske (ens segment) grenforbindelser med overfladegrupper (repræsenteret ved Z'), to forskellige indre molekyldele (repræsenteret ved henholdsvis X og Z) med indre hulrum, som varierer som funktion af generationen (G). Dendrimererne, såsom de i fig. 2B afbildede, kan gennem tilstrækkeligt mange generationer nå frem til fuldstændig at omslutte og indeholde hulrum til opnåelse af en enhed med et overvejende hult indre og en meget stor overfladetæthed. Når stjerneeksplosionsdendrimerer er kommet gennem tilstrækkelig

mange generationer, udviser de også "stjerneeksplosionstæt pakning", hvor dendrimeroverfladen indeholder tilstrækkelig mange terminale molekyldele, så at dendrimeroverfladen bliver tæt og omslutter hulrum inden i dendrimerens indre. Denne tæt-

5 hed kan frembringe en molekyllær niveaubarriere, som kan anvendes til styring af diffusion af materialer ind i eller ud af dendrimerens indre.

Dendrimerernes overfladekemi kan styres på en forudbestemt

10 måde ved udvælgelse af en gentagelsesenhed, som indeholder den ønskede kemiske funktionalitet, eller ved kemisk modifikation af alle eller en del af overfladefunktionaliteterne til frembringelse af nye overfladefunktionaliteter. Disse overflader kan enten være målrettet mod specifikke steder eller bragt til

15 at modstå optagelse af bestemte organer eller celler, f.eks. ved hjælp af reticuloendotheliale celler.

I en alternativ anvendelse af stjerneeksplosionsdendrimererne kan dendrimererne sammenknyttes med sig selv til frembringelse af polydendritiske molekyldele (stjerneeksplosions-"brofor-

20 bundne dendrimerer"), som også er egnede som bærere.

Endvidere kan dendrimererne fremstilles således, at de får afvigelser fra ensartet forgrening i særlige generationer, hvorved der således tilvejebringes et middel til at tilføre dendrimeren diskontinuiteter (dvs. afvigelser fra ensartet forgrening på bestemte steder inden i dendrimeren) samt forskellige egenskaber.

25

De i stjerneeksplosionskonjugaterne ifølge den foreliggende opfindelse benyttede stjerneeksplosionspolymerer kan fremstilles i overensstemmelse med i og for sig kendte metoder, f.eks. som omhandlet i US patentskrift nr. 4.587.329.

30

Dendrimerer kan fremstilles med meget ensartet størrelse og facon og mest vigtigt muliggøre et stort antal funktionelle grupper pr. overfladearealenhed på dendrimeren, og de kan have et stort antal funktionelle grupper pr. molekyllær volumen-

35

sammenlignet med andre polymerer, der har den samme molekylvægt, samme kerne og monomerkomponenter og samme antal kerneforgreninger som stjerneeksplosionspolymererne. De tætte stjerneeksplosionspolymerers forøgede tæthed af funktionelle grupper kan muliggøre, at en større mængde kan bæres pr. dendrimer. Eftersom antallet af funktionelle grupper på dendrimererne kan styres på overfladen og inden i det indre, tilvejebringes der også et middel til styring af mængden af bioaktivt stof, der kan afgives pr. dendrimer. I en særlig foretrukken udførelsesform for den foreliggende opfindelse er stjerneeksplosionspolymererne, især stjerneeksplosionsdendrimererne, målrettede bærere for bioaktive stoffer, der er i stand til at afgive de bioaktive stoffer til en bestemt målorganisme eller til en bestemt determinant eller et bestemt sted i en målorganisme.

Der kan anlægges en analogi mellem stjerneeksplosionsdendrimerer af tidlig generation (dvs. generation = 1-7) og klassiske sfæriske miceller. Analogien dendrimer - miceller blev udledt ved sammenligning af træk, som de havde til fælles, såsom facon, størrelse og overflade.

Tabel I

Parameter	Regulære klassiske miceller	Stjerneeksplosionsdendrimerer
facon	sfærisk	sfærisk
størrelse (diameter)	20-50Å	17-67Å
overfladeaggregationstal	4-202	Z=6-192 (Z er antallet af overfladergrupper)(generation = 2-7)
areal/overfladergruppe (Å ²)	130-80Å ²	127-75Å ²
(1Å = 10 ⁻¹ nm; 1Å ² = 10 ⁻² nm ²)		

I tabel I blev faconen verificeret ved hjælp af scanning transmission electron micrographs (STEM)-mikroskopi og målinger af egenviskositet (η). Størrelsen blev verificeret ved må-

linger af egenviskositet (η) og størrelsesudelukkelseskromatografi (SEC). Overfladeaggregationstallene blev verificeret ved hjælp af titrimetri og højfelt-NMR. Areal/overfladegruppe blev beregnet ud fra SEC-hydrodynamiske målinger.

5

De første fem generationer af stjerneeksplosionspolyamidoamin (PAMAM)-dendrimerer er mikroområder, som meget tæt efterligner klassiske sfæriske miceller i næsten enhver henseende (dvs. facon, størrelse, antal overfladegrupper samt areal/overflade-grupper). En stor forskel består imidlertid i, at de er covalent fastgjort og robuste sammenlignet med den dynamiske ækvilibrerende natur af miceller. Denne forskel er en signifikant fordel ved anvendelse af disse mikroområder som indkapslingsinstrumenter.

10

15

Efterhånden som yderligere koncentriske generationer tilføjes udover fem, finder en sammentrængning af overfladen sted. Denne sammentrængning kan føre til forøgede barriereegenskaber ved overfladen og manifesterer sig som et mindre overfladeareal pr. hoved (overflade)-gruppe som vist i tabel II.

20

25

30

35

Tabel II

PAMAM-dendrimertræk versus generation

Generationer antal overflade- grupper, Z	1	2	3	4	5	6	7	8	9
molekylvægt	3	6	12	24	48	96	192	384	768
diameter* målt, SEC	275	875	2411	5147	10.619	21.563	43.541	87.227	174.779
	10,4 Å	15,8 Å	22 Å	31 Å	40 Å	53 Å	67 Å	76 Å	88 Å
overfladeareal pr. dendrimer	366 Å ²	783 Å ²	1519 Å ²	3018 Å ²	5024 Å ²	8.820 Å ²	14.096 Å ²	18.136 Å ²	36.083 Å ²
overfladeareal pr. Z-gruppe	122 Å ²	131 Å ²	127 Å ²	126 Å ²	104 Å ²	92 Å ²	73 Å ²	47 Å ²	32 Å ²
afstand mellem Z-grupper	12,4 Å	12,8 Å	12,7 Å	12,6 Å	11,5 Å	10,8 Å	9,8 Å	7,75 Å	6,28 Å
hulrum	311,6 Å ³	1.470,2 Å ³	4.737,9 Å ³	11.427,0 Å ³	---	---	---	---	---

* Hydrodynamiske diameter bestemt ved hjælp af størrelsesudelukkelseskromatografiske målinger kalibreret mod monodisperse ($\frac{M_w}{M_n} = 1,02$) polyethylenoxidstandarder.

1 Å = 10⁻¹ nm; 1 Å² = 10⁻² nm²; 1 Å³ = 10⁻³ nm³.

For eksempel har aminterminerede generationer 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 og 9,0 formindskede overfladearealer på henholdsvis 104, 92, 73, 47 og $32\text{\AA}^2$ pr. Z-gruppe. Denne egenskab svarer til en overgang fra en mindre sammentrængt micellelignende overflade til en mere sammentrængt bi-lag/monolag-barrierelignende overflade, der normalt er forbundet med vesikler (liposomer) eller membraner af Langmuir-Blodgett-typen.

Hvis denne overfladesammentrængning finder sted, skulle ændringen i fysiske egenskaber og morfologi blive iagttaget, efterhånden som generationerne steg fra mellemgenerationen (6-8) til de mere fremrykkede generationer (9 eller 10). Scanning transmission electron mikrograferne (STEM) for generationerne = 7,0, 8,0 og 9,0 blev opnået efter fjernelse af methanolopløsningsmidlet fra hver af prøverne til opnåelse af farveløse, lysegule faste film samt farvning med osmiumtetraoxid. Den forudsagte morfologiske ændring fandt sted på trinnet generation 6 = 9,0. Mikroområderne ved generation = 9,0 måler ca. $33\text{\AA}$ i diameter og er omgivet af en farveløs rand, der er ca. $25\text{\AA}$ tyk. Tilsyneladende er methanolisk opløsningsmiddel blevet indesluttet indenfor den $25\text{\AA}$ ydre membranlignende barriere til opnåelse af det mørkt farvede indre. Ved generation = 9,0 opfører stjerneeksplosions-PAMAM'en sig således topologisk som en vesikel (liposom). Denne stjerneeksplosionspolymer er imidlertid af en mindre størrelsesorden og meget monodispers sammenlignet med en liposom. De omhandlede dendrimerer kan følgelig anvendes til molekylær indkapsling af opløsningsmiddelfyldte hulrum på så meget som ca. $33\text{\AA}$ i diameter (volumen ca. $18.000\text{\AA}^3$) eller mere. Disse prototyper af micellestørrelse viser sig at opføre sig ligesom en covalent fastgjort liposom på dette fremrykkede generationstrin. Denne opførelse gør disse prototyper i stand til at fungere som lægemiddelfrigivende stoffer eller som bærere for ikke-chelaterende radionuklider i stjerneeksplosions-antistofkonjugater til behandling af forskellige pattedyrsygdomme.

Dendrimerer, der er egnede til anvendelse i konjugaterne ifølge den foreliggende opfindelse, indbefatter de tætte stjerne-

polymerer eller stjerneeksplosionspolymerer, der er beskrevet i US patentskrifterne nr. 4.507.466, nr. 4.558.120, nr. 4.568.737 og nr. 4.587.329.

- 5 Den foreliggende opfindelse angår især et stjerneeksplosionskonjugat, som omfatter mindst én stjerneeksplosionspolymer knyttet til mindst ét båret farmaceutisk materiale. Stjerneeksplosionskonjugater liggende inden for den foreliggende opfindelses rammer indbefatter sådanne repræsenteret ved form-
- 10 len:



- 15 hvori hvert P betegner en dendrimer, x betegner et helt tal, der er 1 eller større end 1, hvert M betegner en enhed (f.eks. et molekyle, atom, ion og/eller en anden grundenhed) af et båret farmaceutisk materiale, idet nævnte bærede farmaceutiske materiale kan være det samme bærede materiale eller et forskelligt båret farmaceutisk materiale, idet det bærede farmaceutiske materiale fortrinsvis er et bioaktivt stof, y repræsenterer et helt tal, der er 1 eller større end 1, og * angiver, at det bærede farmaceutiske materiale er forbundet med dendrimeren.

- 25 Foretrukne stjerneeksplosionskonjugater med formlen (I) er sådanne, hvori M er et lædemiddel, et radionuklid, en chelatdanner, et chelateret metal, et toxin, et antistof, et antistoffragment, et antigen, en signaldanner, en signalreflektor eller en signalabsorber, idet sådanne foretrækkes, hvori x = 1, og y = 2 eller mere.

- 30 Indbefattet er endvidere stjerneeksplosionskonjugater med formlen (I), hvori stjerneeksplosionsdendrimererne er covalent sammenknyttede, stjerneeksplosionsbroforbundne dendrimerer, eventuelt via forbindelsesgrupper, så at der dannes polydendritiske aggregater (dvs., hvor x > 1). Anvendelser af disse stjerneeksplosionsbroforbundne dendrimerer indbefatter topisk styrede frigørelsesmidler, strålingssynovektomi og andre.
- 35

Som heri benyttet betyder "forbundet med", at det eller de bærede materialer kan indkapsles eller indesluttet i dendrimerens kerne, dispergeres helt eller delvis gennem dendrimeren eller knyttes eller bindes til dendrimeren, eller enhver kombination deraf. Forbindelsen mellem det eller de bærede materialer og dendrimeren eller dendrimererne kan eventuelt benytte forbindelsesled og/eller afstandsstykker til at lette fremstillingen eller anvendelsen af stjerneeksplosionskonjugater. Egnede forbindelsesgrupper er grupper, der knytter en målretter (dvs. T) til dendrimeren (dvs. P) uden signifikant at forringe målretterens effektivitet eller effektiviteten af noget andet bæret materiale eller nogle andre bærede materialer (dvs. M), der findes i stjerneeksplosionskonjugatet. Disse forbindelsesgrupper kan være fraspaltelige eller ikke-fraspaltelige og anvendes typisk til at undgå sterisk hindring mellem målretteren og dendrimeren, idet forbindelsesgrupperne fortrinsvis er stabile (dvs. ikke-fraspaltelige). Eftersom stjerneeksplosionsdendrimerernes størrelse, facon og funktionelle gruppetæthed kan styres strengt, er der mange måder, hvorpå det bærede materiale kan knyttes til dendrimeren. F.eks. (a) kan der være forbindelser af covalent, coulombisk, hydrofob eller chelateringstype mellem det eller de bærede materialer og enheder eller entiteter, typisk funktionelle grupper, der befinder sig ved eller nær ved dendrimerens overflade, (b) kan der være forbindelse af covalent, coulombisk, hydrofob eller chelateringstype mellem det eller de bærede materialer og molekyldele, der befinder sig inden i dendrimerens indre, (c) kan dendrimeren være fremstillet til at have et indre, der er overvejende hult og således muliggør fysisk indeslutning af de bærede materialer inden i det indre (hulrum), hvorved frigørelsen af det bærede materiale eventuelt kan styres ved sammentrængning af dendrimerens overflade med diffusionsstyrende molekyldele, eller (d) kan forskellige kombinationer af de ovenfor nævnte fænomener anvendes.

Dendrimerer, her repræsenteret ved "P", indbefatter de tætte stjernepolymerer, der er beskrevet i US patentskrifterne nr. 4.507.466, nr. 4.558.120, nr. 4.568.737 eller nr. 4.587.329.

Bårede farmaceutiske materialer, heri betegnet ved "M", som er egnede til anvendelse i stjerneeksplosionskonjugaterne, indbefatter hvilke som helst materialer til in vivo eller in vitro anvendelse til diagnostisk eller terapeutisk behandling, der kan forbindes med den tætte stjernedendrimer uden i mærkbar grad at forstyrre dendrimerens fysiske integritet, f.eks. lægemidler som antibiotika, analgetika, hypertensive midler, cardiotoniske midler og lignende, såsom acetaminaphen, acyclovir, alkeran, amikacin, ampicillin, aspirin, bisantren, bleomycin, neocardiohistatin, chloroambucil, chloramphenicol, cytarabin, daunomycin, doxorubicin, fluorouracil, gentamycin, ibuprofen, kanamycin, meprobumat, methotrexat, novantron, nystatin, oncovin, phenobarbital, polymyxin, probucol, procarbazine, rifampin, streptomycin, spectinomycin, symmetrel, thioguanin, tobramycin, trimethoprim og valban; samt toxiner, såsom difteritistoxin, gelonin, exotoxin A, abrin, modeccin, ricin eller toksiske fragmenter deraf; metalioner, såsom alkali- og jordalkalimetallerne; radionuklider, såsom de der er dannet ud fra actinider eller lanthanider eller andre lignende overgangsgrundstoffer eller ud fra andre grundstoffer, såsom ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{111}In , ^{131}I , ^{186}Re , ^{105}Rh , $^{99\text{m}}\text{Te}$, ^{67}Ga , ^{153}Sm , ^{159}Gd , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{88}Y , ^{166}Ho , $^{115\text{m}}\text{In}$, ^{109}Pd , ^{82}Rb , ^{194}Ir , ^{140}Ba , ^{149}Pm , ^{199}Au , ^{140}La og ^{188}Re ; signaldannere, såsom fluorescerende enheder; signalreflektorer, såsom paramagnetiske enheder, f.eks. Fe, Gd og Mn; chelateret metal, såsom ethvert af de anførte metaller, uanset om de er radioaktive, når de er forbundet med en chelatdanner, eller ikke; signalabsorbere, såsom elektronstråleopaliserende midler; antistoffer inklusive monoklonale antistoffer og anti-idiotyp-antistoffer; antistoffragmenter; hormoner; biologiske reaktionsmodifikatorer, såsom interleukiner, interferoner, vira og virale fragmenter; diagnostiske opaliserende midler samt fluorescerende molekyldele. Bårede farmaceutiske materialer indbefatter uddrivningsmidler, såsom chelatdannere, antigener, antistoffer eller hvilke som helst molekyldele, der selektivt er i stand til at uddrive terapeutiske eller diagnostiske stoffer.

De bårde farmaceutiske materialer er fortrinsvis bioaktive stoffer. Som heri benyttet betegner "bioaktiv" en aktiv enhed,

såsom et molekyle, et atom, en ion og/eller en anden enhed, der er i stand til at påvise, identificere, inhibere, behandle, katalysere, bekæmpe, dræbe, forbedre eller modificere en målenhed, såsom et protein, et glycoprotein, et lipoprotein, et lipid, en målcelle, et målorgan, en målorganisme [f.eks. en mikroorganisme eller et dyr (inklusive pattedyr, såsom mennesker)] eller en anden måldel.

Stjerneeksplosionskonjugaterne med formlen (I) fremstilles ved omsætning af P med M, sædvanligvis i et egnet opløsningsmiddel og ved en temperatur, der letter foreningen af det bærede materiale (M) med stjerneeksplosionsdendrimeren (P).

Egnede opløsningsmidler er opløsningsmidler, hvori P og M er i det mindste delvis blandbare, og som er indifferente over for dannelsen af konjugat. Hvis P og M er i det mindste delvis indbyrdes blandbare, behøves intet opløsningsmiddel. Om ønsket kan blandinger af egnede opløsningsmidler anvendes. Eksempler på sådanne egnede opløsningsmidler er vand, methanol, ethanol, chloroform, acetonitril, toluen, dimethylsulfoxid og dimethylformamid.

Reaktionbetingelserne for dannelsen af stjerneeksplosionskonjugatet med formlen (I) afhænger af den pågældende dendrimer (P), det bærede farmaceutiske materiale (M) og naturen af den dannede binding (*). Hvis f.eks. P er PEI (polyethylenimin)-stjerneeksplosionsdendrimeren med en methylencarboxylatoverflade, og M er et radionuklid, f.eks. yttrium, udføres reaktionen ved stuetemperatur i vand. Hvis imidlertid P er estertermineret polyamid (PMAM)-stjerneeksplosionsdendrimer, og M er aspirin, så udføres reaktionen ved stuetemperatur i chloroform. Temperaturen kan typisk ligge i intervallet fra stuetemperatur til tilbagesvalingstemperatur. Valget af det pågældende opløsningsmiddel og temperaturen vil umiddelbart fremgå for fagmanden på området.

Forholdet M:P vil afhænge af størrelsen af dendrimeren og mængden af båret materiale. F.eks. er det molære forhold (mol-

forhold) mellem ethvert ionisk M og P sædvanligvis 0,1-1.000:1, fortrinsvis 1-50:1, og mere foretrukket 2-6:1. Vægtforholdet mellem ethvert lægemiddel eller toxin M og P er sædvanligvis 0,1-5:1 og fortrinsvis 0,5-3:1.

5

Når M er et radionuklid, er der tre måder at fremstille stjerneeksplosionskonjugatet på, nemlig: (1) P kan anvendes som en chelatdanner. F.eks. vil en methylen-carboxylatoverflade-PEI eller -PAMAM chelaterer et metal som yttrium eller indium. (2)

10

Et chelat kan covalent bindes til P. En amintermineret PEI-stjerneeksplosionsdendrimer kan f.eks. omsættes med 1-(p-isothiocyantobenzyl)diethylentriaminpentaeddikesyre og derpå chelateres, eller et kompleks, såsom rhodiumchlorid, der er chelateret med isothiocyantobenzyl-2,3,2-tet, kan bringes til omsætning. (3) Et forchelateret radionuklid kan associeres med

15

P ved hjælp af hydrofob eller ionisk reaktion.

Særlig foretrukne stjerneeksplosionskonjugater er de konjugater, der indeholder en målretter (her betegnet "T"), og som er repræsenteret ved formlen:

20

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

hvor i hvert T repræsenterer en målretter, e betegner et helt tal, der er 1 eller større end 1, og P, x, *, M og y er som defineret i det foregående.

25

Foretrukne blandt stjerneeksplosionskonjugaterne med formlen (II) er de, hvor i M er et lægemiddel, et radionuklid, en chelatdanner, et chelateret metal, toxin, en signaldanner, en signalreflektor eller en signalabsorber. Foretrukne konjugater er også de konjugater, hvor i e=1 eller 2, og de, hvor i x=1 og y=2 eller mere. Særlig foretrukne konjugater er de, hvor i x=1, e=2, y=2 eller mere, og M og T er forbundet med polymeren via de samme eller forskellige forbindelsesled.

35

Stjerneeksplosionskonjugaterne med formlen (II) fremstilles enten ved at danne T * P og derpå tilføje M eller ved dannel-

se af $P * M$ og derpå tilføje T. Hver af reaktionerne udføres ved temperaturer, der ikke er skadelige for den pågældende konjugatkomponent og i nærværelse af et egnet opløsningsmiddel, når det er påkrævet. Til styring af pH anvendes puffer eller tilsætning af egnet syre eller base. Reaktionsbetingelserne afhænger af typen af dannet forbindelse (*), den benyttede stjerneeksplosionsdendrimer (P), det bærede farmaceutiske materiale (M) og målretteren (T). Når f.eks. T er et monoklonalt antistof, og M er et radionuklid, frembringes T*P-forbindelsen ved hjælp af en funktionel gruppe, såsom et isothiocyanat i vand eller i vand indeholdende en organisk modifikator, såsom acetonitril eller dimethylformamid. Konjugeringen foretages sædvanligvis i en puffer ved pH 7-10, fortrinsvis pH 8,5-9,5. Det dannede konjugat chelateres derpå med et radionuklid, såsom yttriumacetat, fortrinsvis ved stuetemperatur. Alternativt kan P og M chelateres, sædvanligvis i vand, før konjugering til T. Konjugeringen med T udføres i en egnet puffer.

Forholdet T:P er fortrinsvis 1:1, især når T er et antistof eller fragment. Forholdet M:P vil være som før.

Målrettere, der er i stand til at målrette stjerneeksplosionskonjugaterne, er enheder, der ved anvendelse i stjerneeksplosionskonjugaterne ifølge opfindelsen resulterer i at i det mindste en del af stjerneeksplosionskonjugaterne afgives til et ønsket mål (f.eks. et protein, glycoprotein, lipoprotein, lipid, en målcelle, et målorgan, en målorganisme eller en anden måldel), og som indbefatter antistoffer, fortrinsvis monoklonale antistoffer, antistoffragmenter, såsom Fab, Fab', F(ab')₂-fragmenter eller hvilke som helst andre antistoffragmenter med den nødvendige målspecificitet, hormoner, biologiske reaktionsmodifikatorer, epitoper, kemiske funktionaliteter, der udviser målspecificitet, og lignende.

Antistofferne eller antistoffragmenterne, der kan anvendes i foretrukne heri beskrevne stjerneeksplosionskonjugater, kan fremstilles ved hjælp af velkendte metoder. Højspecifikke mo-

noklonale antistoffer kan fremstilles ved hjælp af velkendt hybridiseringsteknik, se f.eks. Kohler og Milstein (1975, Nature 256:495-497, og 1976, Eur. J. Immunol. 6:511-519). Sådanne antistoffer har normalt en meget specifik reaktivitet.

5

I de målrettede antistof-stjerneeksplosionskonjugater kan anvendes antistoffer rettet mod ethvert antigen eller haptent. Selv om konventionelle polyklonale antistoffer kan anvendes, frembyder monoclonale antistoffer flere fordele. Hvert monoklonalt antistof er meget specifikt for en enkelt epitop. Endvidere kan store mængder af hvert monoklonalt antistof fremstilles. De ifølge den foreliggende opfindelse benyttede antistoffer kan rettes mod f.eks. tumorer, bakterier, svampe, vira, parasitter, mycoplasma, differentierings- og andre cellemembranantigener, patogene overfladeantigener, toxiner, enzymer, allergener, lægemidler og hvilke som helst biologiske aktive molekyler. For en mere fuldstændig liste over antigener henvises til US patentskrift nr. 4.193.983.

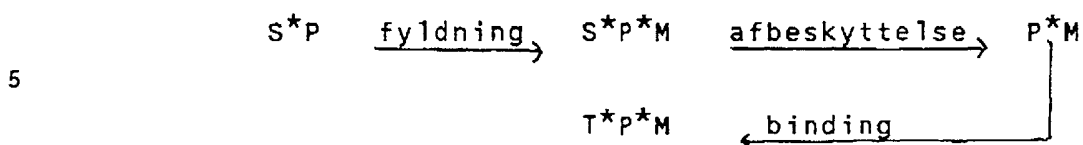
20 Det kan være ønskeligt at knytte flere antistoffer eller fragmenter til dendrimeren og i bestemte tilfælde at tilknytte antistoffer af forskellige specificiteter. F.eks. kan der udformes et bifunktionelt konjugat, som har evnen til at lokalisere og binde til en tumor og derpå uddrive cirkulerende cytotoxiske, diagnostiske eller biostatistiske forbindelser.

I tilfælde af fravær af en målretter (eller om ønsket i nærværelse af en målretter) kan som følge af antallet af funktionelle grupper, der kan lokaliseres ved eller nær ved overfladen af dendrimeren, alle eller en væsentlig del af sådanne funktionelle grupper gøres anioniske, kationiske, hydrofobe eller hydrofile med henblik på effektivt at hjælpe afgivelsen af stjerneeksplosionskonjugatet til et ønsket mål med den modsatte ladning eller til et hydrofobt eller hydrofilt kompatibelt mål.

35

Fremstilling af konjugaterne med formlen (II) under anvendelse af P sammen med et beskyttet greb (handle) (S) tilsigtes også

som fremgangsmåde til fremstilling af konjugaterne med formelen (II). Reaktionsskemaet er vist nedenfor:



hvor S^*P betegner den beskyttede dendrimer,

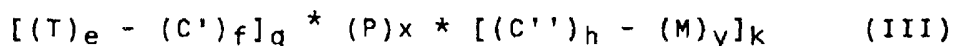
S^*P^*M betegner den beskyttede dendrimer, konjugeret med M,

10 P^*M betegner dendrimeren konjugeret med M (stjerneeksplosionskonjugat), og

T^*P^*M betegner stjerneeksplosionskonjugatet bundet til en målretter.

15 Egnede opløsningsmidler kan benyttes, som ikke påvirker P^*M . Når f.eks. S er t-butyloxycarbonyl, kan S fjernes ved hjælp af vandig syre.

Foretrukne er også stjerneeksplosionskonjugater, hvori polymeren er tilknyttet direkte eller via forbindelsesled. Disse stjerneeksplosionskonjugater er repræsenteret ved formelen II:



25 hvori hvert C' repræsenterer den samme eller forskellige forbindelsesgrupper,

hvert C'' betegner den samme eller forskellige forbindelsesgrupper,

30 g og k hver især betegner et helt tal, der er 1 eller større end 1,

f og h hver især betegner et helt tal, der er 0 eller større end 0,

- angiver en covalent binding i tilfælde, hvor en forbindelsesgruppe er til stede, og

35 P, x, *, M, y, T og e er som defineret i det foregående.

Foretrukne blandt stjerneeksplosionskonjugaterne med formelen (III) er de, hvori M er et radionuklid, lægemiddel, toxin, en

signaldanner, en signalreflektor eller en signalabsorber. Foretrukne er også de konjugater, hvori $x=1$. Særlig foretrukne konjugater er de, hvori x , e , f , h og y hver er 1, og g er en eller mere, og hvert k individuelt er 2 eller mere. Mest fore-

5 trukne er de konjugater, hvori x , e , f , h , y og g hver er 1, og k er 2 eller mere. Særlig foretrukne er også de stjerneeksplosionskonjugater, hvori M betegner et bioaktivt stof, såsom et radionuklid, et lægemiddel eller toxin.

10 Egnede forbindelsesgrupper, som er repræsenteret ved C'' , er grupper, som knytter det bærede farmaceutiske materiale til dendrimeren uden på signifikant måde at forringe effektiviteten af det bærede farmaceutiske materiale eller effektiviteten af den eller de målrettere, der er til stede i stjerneeksplosionskonjugatet. Disse forbindelsesgrupper skal være stabile

15 (dvs. ikke-fraspaltelige) eller kunne fraspaltes afhængigt af det bærede farmaceutiske materiales aktivitetsmåde, og de anvendes typisk med henblik på at undgå sterisk hindring mellem det bærede farmaceutiske materiale og polymeren.

20 Mest foretrukne er konjugater, hvori dendrimeren direkte eller via en forbindelsesgruppe eller forbindelsesgrupper er knyttet til et antistof eller antistoffragment. Polymeren i disse foretrukne konjugater kan endvidere om ønsket enten direkte eller via en eller flere forbindelsesgrupper knyttes til et eller flere andre bærede materialer, fortrinsvis en radioisotop. Sådanne stjerneeksplosionskonjugater er repræsenteret ved formlen:

30
$$[(\text{antistof})_e - (C')_f]_g * (P)_x * [(C'')_h - (M)_y]_k \quad (IV)$$

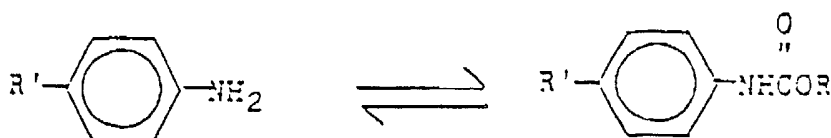
hvor hvert antistof betegner et antistof eller antistoffragment, der er i stand til at reagere med en ønsket epitop, - angiver en covalent eller coulombisk binding i tilfælde, hvor en forbindelsesgruppe er til stede, og

35 P , x , $*$, M , T , e , y , C' , C'' , g , k , f og h er som defineret i det foregående.

Til den ovennævnte syntese af stjerneeksplosionsdendrimerer (P), som har en funktionel gruppe, der står til rådighed for binding (C' eller C'') til en målretter (T), kræver den foretrukne fremgangsmåde, at den reaktive funktionalitet beskyttes
5 som en syntetisk forløber. Denne beskyttelse foretrækkes, fordi den muliggør syntese af dendrimerer eller konjugater af meget høj kvalitet. Denne fremgangsmåde muliggør kemisk binding af en enhed af båret farmaceutisk materiale (M) til stjerneeksplosionsdendrimerens (P) terminale funktionelle grupper på
10 måder, som ellers også ville resultere i reaktion med en tilknyttende funktionelt gruppe og således gøre det umuligt at tilknytte til målretteren (T). Efterfølgende afbeskyttelse eller syntetisk omdannelse til den ønskede tilknyttende funktionelle gruppe gør det således muligt for stjerneeksplosionskonjugatet at blive knyttet til målretteren.
15

En af de foretrukne "funktionelle grupper til tilknytning" (i det følgende omtalt som et "greb") er en anilinmolekyldel. Denne gruppe foretrækkes, fordi den kan anvendes direkte til
20 binding til målretteren, eller også kan den let modificeres til andre funktionelle grupper, der er egnede til omsætning med målretteren, f.eks. isothiocyant, isocyant, semithiocarbazid, semicarbazid, bromacetamid, jodacetamid og maleimid. Anilinmolekyldelen foretrækkes også som et greb til tilknytning til målretterne, fordi den let kan beskyttes til anvendelse i stjerneeksplosionsdendrimersyntese, eller nitrogruppen kan anvendes som en forløber, der kan omdannes til den ønskede aminofunktion ved slutningen af syntesen.

30 Der findes et antal beskyttelsesgrupper, som er egnede til beskyttelse af anilino-aminofunktionaliteten under stjerneeksplosionsdendrimersyntese. (Se Theodora W. Green, Protective Groups In Organic Synthesis, pub. John Wiley & Son, New York, 1981). En foretrukken klasse af beskyttelsesgrupper er de nedenfor viste carbamater.
35

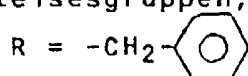


5

Mange carbamater har været benyttet til beskyttelse af aminer. De mest foretrukne carbamater til stjerneeksplosionsdendrimer-syntese er t-butoxycarbat, $R = -C(CH_3)_3$. Afbeskyttelse opnås ved hjælp af mild syrehydrolyse. Foretrukket er også benzyl-

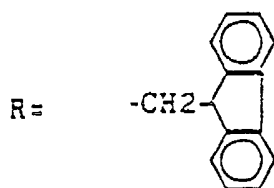
10

carbatbeskyttelsesgruppen,



som foretrækkes, når dendrimeren er følsom over for syrehydrolyse. Afbeskyttelse opnås ved hjælp af katalytisk hydrogenering. Foretrukket er også 9-fluorenylmethylcarbat

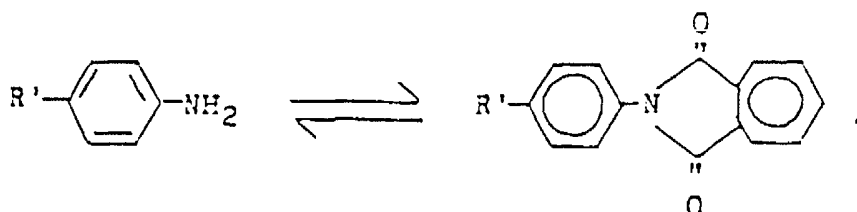
15



20

Phthalimidbeskyttelsesgruppen er også et foretrukket eksempel

25



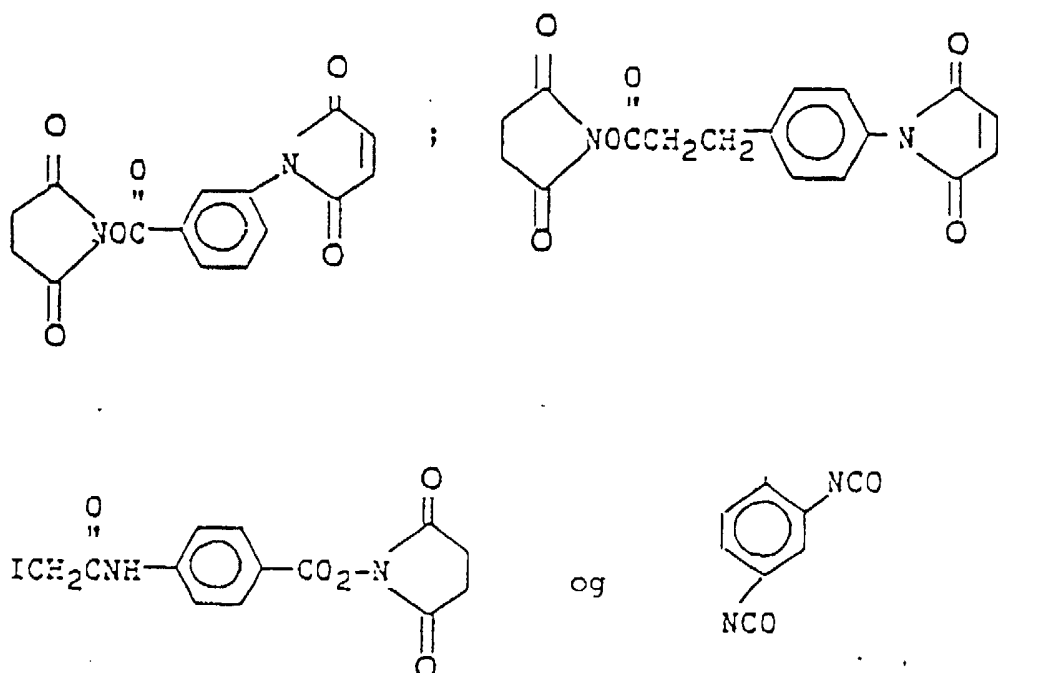
30

Andre til aminer benyttede beskyttelsesgrupper, som er velkendte fra litteraturen, kunne også anvendes i dette syntese-skema. De ovennævnte præferencer anføres kun som illustrative eksempler, men er ikke de eneste beskyttelsesgrupper, som kan anvendes. Enhver beskyttelsesgruppe, som er stabil under reaktionsbetingelserne og kan fjernes uden at ændre stjerneeksplosionsdendrimerens integritet, kan anvendes.

35

En alternativ fremgangsmåde indebærer omsætning af et aktivret arylhalogenid, f.eks. 4-nitrofluorbenzen, med en amino-

funktion på det til konjugering bestemte middel, f.eks. stjerneeksplosionspolyethyleniminer (PEI), og efterfølgende katalytisk hydrogenering af nitrogruppen til anilinfunktionaliteten med henblik på efterfølgende konjugering. Den er særlig anvendelig til midler, f.eks. polyaminer, der kræver yderligere modifikation før anvendelse, som følge af nitrophenylfunktionalitetens relative kemiske indifferenthed over for alle ikke-reducerende reaktionsbetingelser. De mere almindelige bifunktionelle bindingsmidler, f.eks. aktive estere eller diisocyanater, som er reaktive under et stort antal reaktionsbetingelser, og som ville gøre dem uanvendelige til konjugering, indbefatter:



Opfindelsen indbefatter også anvendelsen af nitrosubstituerede arylsulfonylhalogenider til opnåelse af sulfonamider, f.eks.



5

Fordelen ved denne fremgangsmåde i forhold til kendte fremgangsmåder til indføring af en aminophenylgruppe til konjugering er, at den finder sted på et sent trin i syntesen. Gansow et al., US patentskrift nr. 4.472.509, indførte i sin fremgangsmåde nitrophenylgruppen på det første trin i en lang synteseprocedure, der derved har begrænsninger med hensyn til den kemi, der står til rådighed. Denne fremgangsmåde indfører også et greb, der er tydeligt forskelligt fra resten af molekylet. Manabe et al. nævnede, at ringåbningen af ravsyreanhydrid ved hjælp af tilbageværende aminer resulterede i en koblingsgruppe, ved hjælp af hvilken konjugering til et antistof var mulig. Denne fremgangsmåde frembragte imidlertid ingen midler til differentiering mellem eventuelle ikke-chelaterede steder på polymeren, eftersom de chelatdannende grupper var de samme som tilknytningsgruppen.

20

Den ovenfor nævnte fremgangsmåde kan indføre en aminophenylfunktionalitet i ethvert stof indeholdende en aminogruppe, som derpå konjugeres med et bioaktivt stof, f.eks. et monoklonalt antistof eller et enzym. Stoffet kan konjugeres ved hjælp af oxidativ kobling til kulhydrater på det bioaktive stof, f.eks. antistof. Aminophenylgruppen kan også omdannes til et isothiocyanat eller isocyanat til efterfølgende omsætning med de vedhængende aminogrunder tilhørende lysinrester på det bioaktive stof.

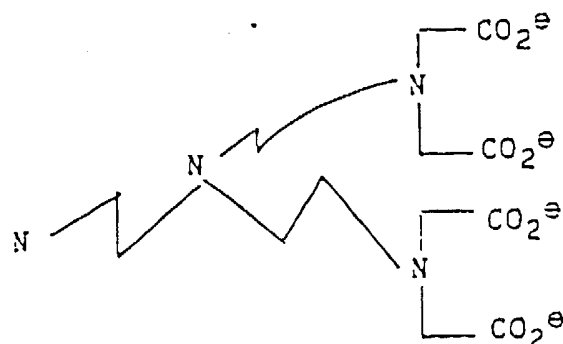
25

30

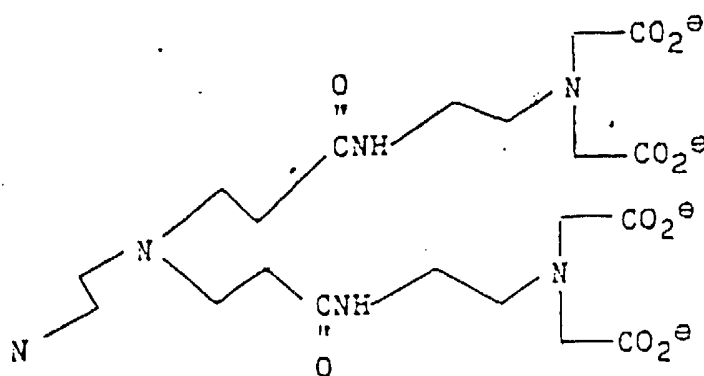
Den her omhandlede fremgangsmåde tilvejebringer også direkte chelatering af lanthanider med stjerneeksplosionsdendrimerer, fortrinsvis ved hjælp af PEI-acetatdendrimer. I modsætning hertil anfører Denkwalter, US patentskrift nr. 4.289.872, at blot anbringelse af acetater på overfladen fungerer. Den her omhandlede reaktion viser imidlertid, at PEI-acetat fungerer meget bedre end PAMAM, dvs. at overfladen af iminodiacetater

35

kun er en del af historien, idet grundskelletets natur samt forgrening også er meget vigtig. PEI-acetatet har bedre chelateringsegenskaber end PAMAM-acetatet.



PEI



PAMAM

Foretrukne blandt stjerneeksplosionskonjugaterne med formlen (IV) er de, hvori M er et radionuklid, lægemiddel, toxin, signalgenerator, signalreflektor eller signalabsorber. Foretrukne er også de konjugater, hvori $x=1$. Særlig foretrukne er de konjugater, hvori x, e, f, h og y hver er 1, og g er en eller mere, og hvert k individuelt er 2 eller mere. Mest foretrukne er de konjugater, hvori x, e, f, h, y og g hver er 1, og k er 2 eller mere. Også særlig foretrukne er de stjerneeksplosionskonjugater, hvori "antistof" repræsenterer et monoklonalt antistof eller et epitopbindenden fragment deraf, og især foretrækkes de, hvori M betegner et bioaktivt stof, såsom et radionuklid, lægemiddel eller toxin.

Stjerneeksplosionskonjugaterne kan benyttes til en række forskellige diagnostiske anvendelser in vitro eller in vivo, så-

som radioimmunanalyse, elektronmikroskopi, enzytbundne immuno-
sorbentanalyser, kernemagnetisk resonansspektroskopi, kon-
trastbilleddannelse og immunoscintografi, til analytiske an-
vendelser, til terapeutiske anvendelser som bærer af antibiotika,
5 radionuklider, lægemidler eller andre stoffer, der er egnede til anvendelse ved behandling af sygdomstilstande, såsom cancer, autoimmunsygdomme, forstyrrelser i centralnervesystemet, infektiøse sygdomme og hjerteforstyrrelser, eller de kan anvendes som udgangsmaterialer til fremstilling af andre
10 anvendelige stoffer.

Den foreliggende opfindelse angår også stjerneeksplosionskonjugatsammensætninger, hvori stjerneeksplosionskonjugaterne er bragt til at indgå sammen med andre egnede bærere. Stjerneeksplosionskonjugatsammensætningerne kan eventuelt indeholde an-
15 dre aktive bestanddele, additiver og/eller fortyndingsmidler.

Den foretrukne stjerneeksplosionspolymer til anvendelse i stjerneeksplosionskonjugaterne ifølge den foreliggende opfindelse er en polymer, der kan beskrives som en stjerneeksplosionspolymer, der har mindst en gren (i det følgende betegnet en kernegren), fortrinsvis to eller flere grene, der udgår fra en kerne, hvilken gren har mindst en terminalgruppe, forudsat at (1) forholdet mellem terminalgrupper og kernegrene er større end 1, fortrinsvis 2 eller mere, (2) tætheden af terminalgrupper pr. volumenenhed i polymeren er mindst 1,5 gange tætheden af en udvidet konventionel stjernepolymer med lignende kerne og monomere molekyldele og en molekylvægt samt et antal kernegrene, der kan sidestilles dermed, idet hver af sådanne grene i den udvidede konventionelle stjernepolymer bærer kun en terminalgruppe, og (3) et molekulært volumen, der ikke er mere end ca. 80% af nævnte udvidede konventionelle stjernepolymeres molekulære volumen bestemt ved dimensionsundersøgelser under anvendelse af graduerede Corey-Pauling mole-
20 25 30 35 kylære modeller. Som heri benyttet betyder udtrykket "tæt", når det modificerer "stjernepolymer" eller "dendrimer", at den har et mindre molekulært volumen end en udvidet konventionel stjernepolymer, der har den samme molekylvægt. Den udvidede

konventionelle stjernepolymer, som anvendes som grundlag for sammenligning med den tætte stjernepolymer, er en, som har den samme molekylvægt, samme kerne og monomere komponenter og samme antal kernegrene som den tætte stjernepolymer. Med "udvidet" menes, at den konventionelle stjernepolymeres individuelle grene er forlænget eller strakt til deres maksimale længde, f.eks., da sådanne grene eksisterer, når stjernepolymeren er fuldstændig solvateret i et ideelt opløsningsmiddel for stjernepolymeren. Selv om antallet af terminale gruppe er større for det tætte stjernepolymermolekyle end i det konventionelle stjernemolekyle, er endvidere terminalgruppernes kemiske struktur den samme.

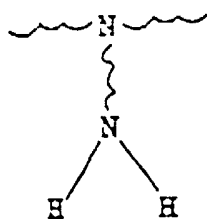
Dendrimerer, der anvendes i konjugaterne ifølge den foreliggende opfindelse, kan fremstilles ved hjælp af i og for sig kendte fremgangsmåder. De ovennævnte dendrimerer, de forskellige coreaktanter og kerneforbindelser samt en fremgangsmåde til fremstilling deraf kan være som defineret i US patentskrift nr. 4.587.329.

Dendrimererne til anvendelse i konjugaterne ifølge den foreliggende opfindelse kan have terminalgrupper, som er tilstrækkelig reaktive til at undergå additions- eller substitutionsreaktioner. Eksempler på sådanne terminalgrupper indbefatter amino, hydroxy, mercapto, carboxy, alkenyl, allyl, vinyl, amido, halogen, urinstof, oxiranyl, aziridinyl, oxazolinyl, imidazolinyl, sulfonat, phosphonat, isocyanat og isothiocyant. Terminalgrupperne kan modificeres for at gøre dem biologisk indifferente, f.eks. for at gøre dem ikke-immunogene, eller for at undgå uspecifik optagelse i leveren, milten eller et andet organ. Dendrimererne afviger fra konventionelle stjerne- eller stjerneforgrenede polymerer i den henseende, at dendrimererne har en større koncentration af terminalgrupper pr. enhed af molekylært volumen end tilfældet er for konventionelle udvidede stjernepolymerer, der har et tilsvarende antal kernegrene og en tilsvarende kernegrenslængde. Tætheden af terminalgrupper pr. enhedsvolumen i dendrimeren er således sædvanligvis mindst 1,5 gange tætheden af terminalgrupper i den kon-

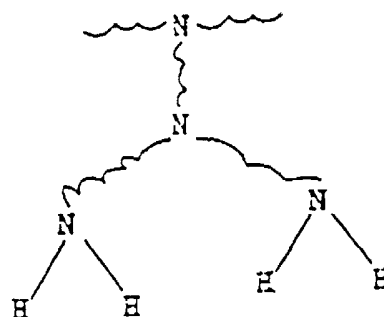
ventionelle udvidede stjernepolymer, fortrinsvis mindst 5 gange og mere foretrukket mindst 10 gange samt mest foretrukket fra 15 til 50 gange. Forholdet mellem terminalgrupper pr. kernegren i den tætte polymer er fortrinsvis mindst 2, mere foretrukket mindst 3 og mest foretrukket fra 4 til 1024. Ved en given polymermolekylvægt er den tætte stjernepolymeres molekylære volumen fortrinsvis mindre end 70 volumen%, mere foretrukket fra 16 til 60 og mest foretrukket fra 7 til 70 volumen% af den konventionelle udvidede stjernepolymeres molekylære volumen.

Foretrukne dendrimerer til anvendelse i konjugaterne ifølge den foreliggende opfindelse er karakteriseret som havende en monovalent eller polyvalent kerne, der er covalent bundet til dendritiske grene. En sådan ordnet forgrening kan illustreres ved hjælp af følgende rækkefølge, hvori G angiver antallet af generationer:

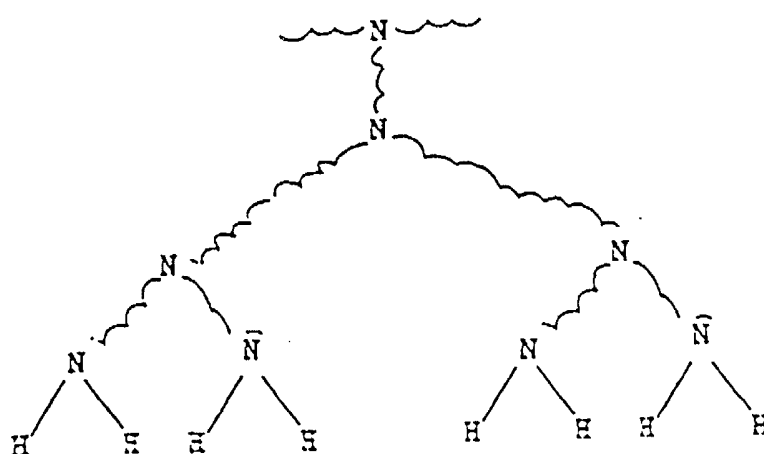
G = 1



G = 2



G = 3



Matematisk kan forholdet mellem antallet (#) af terminale grupper på en dendritisk gren og antallet af generationer af grenen angives som følger:

$$\# \text{ af terminale grupper pr. dendritisk gren} = \frac{N_r G}{2}$$

hvor G er antallet af generationer, og N_r er gentagelsesenhedmultipliciteten, der er mindst 2 som i tilfælde af aminer. Det samlede antal terminalgrupper i dendrimeren bestemmes af følgende:

$$\# \text{ af terminale grupper pr. dendrimer} = \frac{N_c N_r G}{2}$$

hvor G og N_r er som ovenfor defineret, og N_c repræsenterer kerneforbindelsens valens (ofte betegnet kernefunktionalitet).

Følgelig kan dendrimererne ifølge den foreliggende opfindelse angives i sin komponentdele som følger:

$$(kerne) \left((gentagelsesenhed)_{\frac{N_r G - 1}{N_r - 1}} \text{ terminaldel } N_r G \right)_{N_c}$$

hvor i kernerne, den terminale del, G og N_c er som ovenfor defineret, og gentagelsesenheden har en valens eller funktionalitet på $N_r + 1$, hvor N_r er som ovenfor defineret.

En copolymer dendrimer, som er en foretrukken dendrimer til opfindelsens formål, er en særlig forbindelse, der er opbygget af polyfunktionelle monomerenheder i en meget forgrenet (dendritisk) orden. Dendrimermolekylet fremstilles ud fra en polyfunktionel initiatorenhed (kerneforbindelse), polyfunktionelle gentagelsesenheder og terminale enheder, der kan være de samme som eller forskellige fra gentagelsesenhederne. Kerneforbindelsen angives ved formlen $\textcircled{I} (Z^c)_{N_c}$, hvor $\textcircled{I}$ betegner kernen, Z^c betegner de funktionelle grupper, som er bundet til $\textcircled{I}$, og N_c betegner kernefunktionaliteten, som fortrinsvis er 2 eller mere, mest foretrukket 3 eller mere. Dendrimermolekylet omfatter således en polyfunktionel kerne, $\textcircled{I}$, der er bundet til et antal (N_c) funktionelle grupper, Z^c , som hver er knyttet til den monofunktionelle hale af en gentagelsesenhed, $X^1 Y^1 (Z^1)_{N^1}$, af den første generation, og hver af Z -grupperne i gentagelsesenheden tilhørende én generation er bundet til en monofunktionel hale af en gentagelsesenhed tilhørende den næste generation, indtil den terminale generation er nået.

I dendrimermolekylet er gentagelsesenhederne de samme inden for en enkelt generation, men kan variere fra generation til generation. I gentagelsesenheden, $X^1 Y^1 (Z^1)_{N^1}$, repræsenterer X^1 den monofunktionelle hale af den første generation gentagelsesenhed, Y^1 repræsenterer den del, der udgør den første generation, Z^1 betegner den funktionelle gruppe i det polyfunktionelle hoved af gentagelsesenheden tilhørende den første generation og kan være det samme som eller forskellig fra de funktionelle grupper i kerneforbindelsen, $\textcircled{I} (Z^c)_{N_c}$, eller andre generationer; og N^1 er et tal på 2 eller mere, mest foretruk-

ket 2, 3 eller 4, som repræsenterer multipliciteten af det polyfunktionelle hoved tilhørende gentagelsesenheden i den første generation. Generisk angives gentagelsesenheden ved hjælp af formlen $X^i Y^i (Z^i)_{N^i}$, hvori "i" betegner den pågældende generation fra den første til generationen t-1. I det foretrukne dendrimermolekyle er således hver Z^1 tilhørende den første generation gentagelsesenhed forbundet med en X^2 i en gentagelsesenhed tilhørende den anden generation osv. gennem generationerne, så at hver Z^i -gruppe i en gentagelsesenhed $X^i Y^i (Z^i)_{N^i}$ i generation nr. "i" er forbundet med halen (X^{i+1}) af gentagelsesenheden tilhørende generationen nr. "i+1". Den sidste eller terminale i et foretrukket dendrimermolekyle omfatter terminale enheder, $X^t Y^t (Z^t)_{N^t}$, hvori t repræsenterer den terminale generation, og X^t , Y^t , Z^t og N^t kan være de samme som eller forskellige fra X^i , Y^i , Z^i og N^i , med den undtagelse, at der ikke er nogen efterfølgende generation bundet til Z^t -grupperne, og N^t kan være mindre end 2, f.eks. 0 eller 1. Den foretrukne dendrimer har derfor en molekylær formel angivet ved

$$\left(\textcircled{I} (Z^c)_{N^c} \right) \left\{ \left(X^1 Y^1 (Z^1)_{N^1} \right)_{N^c \prod_{n=1}^{i-1} N^n} \right\} \left(X^t Y^t (Z^t)_{N^t} \right)_{N^c \prod_{n=1}^{t-1} N^n}$$

hvor i er 1 til t-1

hvori symbolerne er som defineret i det foregående. n-funktionen er produktet af alle værdierne mellem dens fastsatte grænser.

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

som er antallet af gentagelsesenheder, $X^i Y^i (Z^i)_{N^i}$, omfatter således den i'ende generation af én dendritisk gren, og når i er 1, da er

$$n^0 = 1$$

$$n = 1$$

I copolymere dendrimerer varierer gentagelsesenheden i én generation fra gentagelsesenheden i mindst én anden generation. De foretrukne dendrimerer er meget symmetriske som illustreret i de i det følgende beskrevne strukturformler. Foretrukne dendrimerer kan omdannes til funktionaliserede dendrimerer ved kontakt med et andet reagens. Omdannelse af hydroxyl i den terminale generation til ester ved omsætning med et syrechlorid fører f.eks. til en terminalt funktionaliseret esterenddimer. Denne funktionalisering behøver ikke at blive udført til det teoretiske maksimum som defineret af antallet af til rådighed stående funktionelle grupper, og en funktionaliseret dendrimer har således ikke nødvendigvis høj symmetri eller en nøjagtigt defineret molekylær formel som tilfældet er for den foretrukne dendrimer.

I en homopolymer dendrimer er alle gentagelsesenhederne, $X^i Y^i (Z^i)_{N_i}$, identiske. Eftersom værdierne af alle N_i er ens (defineret som N_r), formindskes produktfunktionen angivende antallet af gentagelsesenheder til en simpel eksponentiel form. Den molekylære formel kan derfor angives i enklere form som:

$$\left(\textcircled{I} (Z^0)_{N_c} \right) \left\{ \left(X^i Y^i (Z^i)_{N_i} \right)_{N_c N_r^{i-1}} \right\} \left(X^t Y^t (Z^t)_{N_t} \right)_{N_c N_r^{(t-1)}}$$

hvor $i = 1$ til $t-1$.

Denne form viser stadig forskellen mellem de forskellige generationer i , som hver består af $N_c N_r^{(i-1)}$ gentagelsesenheder $X^i Y^i (Z^i)_{N_i}$. Ved at kombinere generationerne til ét udtryk opnås:

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

5

eller

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

10

kerne

gentagelsesenhed

terminal enhed

15

hvor $X^r Y^r (Z^r)_{N_r}$ er den gentagelsesenhed, som anvendes i alle generationer i .

20

Hvis en polymerforbindelse vil passe ind i disse ovenfor anførte formler, da er polymeren følgelig en stjerneeksplosionspolymer. Omvendt, hvis en polymerforbindelse ikke vil passe ind i disse ovenfor anførte formler, da er polymeren ikke en stjerneeksplosionspolymer. Til bestemmelse af, hvorvidt en polymer er en stjerneeksplosionspolymer, er det altså ikke nødvendigt at kende den fremgangsmåde, ved hjælp af hvilken den blev fremstillet, men kun hvorvidt den passer til formlerne. Formlerne viser også dendrimerers generationer (G) eller rækkevis opbygning.

25

30

Der findes tydeligvis flere måder til bestemmelse af forholdet mellem materiale (M) og dendrimer (P), som afhænger af hvorledes og hvor associeringen af P^*M finder sted. Når der sker indre indkapsling, er vægtforholdet $M:P$ sædvanligvis 10:1, fortrinsvis 8:1, mere foretrukket 5:1 og mest foretrukket 3:1.

35

Forholdet kan være så lavt som 0,5:1 til 0,1:1. Når indre støkiometri anvendes, er vægtforholdet $M:P$ det samme som ved indre indkapsling. Når ydre støkiometri bestemmes, mol/mol-forholdet $M:P$ givet ved hjælp af følgende formler:

M	:	P
(A) 5 $N_C N_t N_r G^{-1}$		1
(B) 3 $N_C N_t N_r G^{-1}$		1
(C) 1 $N_C N_t N_r G^{-1}$		1

5

hvor N_C betyder kernemultipliciteten, N_t betyder terminalgrup-
pemultipliciteten, og N_r betyder grenforbindelsesmultiplici-
tet. Udtrykket $N_C N_t N_r G^{-1}$ vil resultere i antallet af Z-grup-
per. Således kan f.eks. (A) blive resultatet, når proteiner,
10 enzymer eller højt ladede molekyler findes på overfladen: (B)
ovenfor, når den er aspirin eller capronsyre, og (C) ovenfor,
når overfladeestergrupper omdannes til carboxylationer eller
-grupper.

15

Andre strukturer af forskellige dimensioner kan selvsagt let
fremstilles af fagmanden på området ved passende variering af
de benyttede dendrimerkomponenter og antallet af generationer.
En groft gradueret sammenligning mellem tre forskellige den-
drimerrækker og et IgG-antistof ses i fig. 3. I rækken af teg-
ninger angivet ved hjælp af fig. 3(B) viser I stjerneeksplo-
20 sionspolyamidoaminerne (PAMAM), II viser stjerneeksplosions-
polyetherne (PE), og III viser stjerneeksplosionspolyethylen-
iminernerne (PEI). På en måde svarende til den i fig. 1 viste har
alle tre rækker (I, II og III) initiatorkernen vist som af-
25 bildningen længst til venstre, medens den næste afbildning fra
venstre viser stjerneforgreningsoligomeren, og de resterende
afbildninger viser stjerneeksplosionsoligomererne og de re-
spektive broforbundne stjerneeksplosionsdendrimerer. Det kan
ses, at i disse rækker af graduerede afbildninger er dendri-
30 merdimensionerne tættere ved og i virkeligheden mindre end de
dimensioner, der er angivet for IgG-antistoffet i fig. 3(A).
IgG-antistoffet er vist længst til venstre i fig. 3. Måle-
stoksforholdet er 1 mm = 2,3Å. I fig. 3(A) er det variable
område vist ved (A), det konstante område ved (B), og kul-
35 hydrattilknytningsstederne ved (C). Tilnærmelsesvis mål vist
i fig. 3 er (1) er 35-40Å, (2) er 70Å, og (3) er 60Å. Disse
dimensionsmæssige egenskaber foretrækkes i tilfælde, hvor mål-
retning indebærer afgang fra det vaskulære system. Dendrimer-

diametre på 125 Ångstrøm-enheder eller mindre er derfor særlig foretrukne, da de kan muliggøre afgang fra det vaskulære system til målorganer, der betjenes af kontinuerede eller fenestrerede kapillarer. Disse dimensioner er betydningsfulde, eftersom de er små sammenlignet med størrelsen af en potentiel målkomponent, såsom et antistof (se fig. 3). En lineær polymer af tilsvarende molekylvægt ville have en rotationsradius (i sin fuldt udstrakte form), som ville være meget større end dendrimeren med samme molekylvægt. En lineær polymer af denne type ville forventes på uheldig måde at påvirke de molekylære genkendelsesegenskaber hos mange accepterede målkomponenter. Det er også ønskeligt, at konjugaterne har minimalt molekylært volumen med henblik på ikke at modvirke f.eks. blodudtrædning ved kobling af Fab, Fab' eller et andet passende antistoffragment til dendrimerer med lille molekylært volumen.

Dendrimerer er ønskelige til afgivelse af radionuklider eller stærkt paramagnetiske metalioner til tumorsteder som følge af deres evne til at chelatere et antal metalioner i et lille rumvolumen. Kobling til antistoffer eller antistoffragmenter, der er specifikke for tumorer, kan afgive et antal metaller pr. antistof i forbindelse med kun en enkelt modifikation af antistoffet.

Binding af målrettere til dendrimerer er et andet aspekt ved den foreliggende opfindelse. I foretrukne udførelsesformer for opfindelsen, især når der ønskes anvendt et antistof som en målretter, kan en reaktiv funktionel gruppe, såsom en carboxylgruppe, en sulfhydrylgruppe, en reaktiv aldehydgruppe, et reaktivt olefinisk derivat, en isothiocyantgruppe, en isocyanatgruppe, en aminogruppe, et reaktivt arylhalogenid eller et reaktivt alkylhalogenid, hensigtsmæssigt anvendes på dendrimeren. De reaktive funktionelle grupper kan frembringes på dendrimeren ved anvendelse af kendte metoder, f.eks.:

(1) Anvendelse af en heterofunktionel initiator (som udgangsmateriale til syntetisering af dendrimeren), som i sig har inkorporeret funktionelle grupper af forskellig reaktivitet. I

en sådan heterofunktionel initiator vil mindst en af de funktionelle grupper fungere som et initiatorsted for dendrimerdannelse, og mindst en af de andre funktionelle grupper vil stå til rådighed for binding til en målretter, men vil være ude af stand til at initiere dendrimersyntese. F.eks. muliggør anvendelse af beskyttet anilin yderligere modifikation af NH_2 -grupper i molekylet uden omsætning af anilinet NH_2 .

Den funktionelle gruppe, som vil stå til rådighed for binding til en målretter, kan være en del af initiatormolekylet i en hvilken som helst af tre former, nemlig:

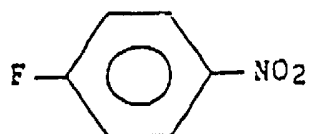
(a) I den form, hvori den vil blive benyttet til binding med målretteren. Dette er muligt, når intet af de involverede syntesetrin i dendrimersyntesen kan resultere i omsætning ved dette center.

(b) Når den funktionelle gruppe, der anvendes til binding til målretteren, er reaktiv i de i dendrimersyntesen involverede syntesetrin, kan den beskyttes ved anvendelse af en beskyttelsesgruppe, som gør gruppen ureaktiv over for de involverede syntese procedurer, men kan selv let fjernes på en måde, der ikke ændrer integriteten af resten af makromolekylet.

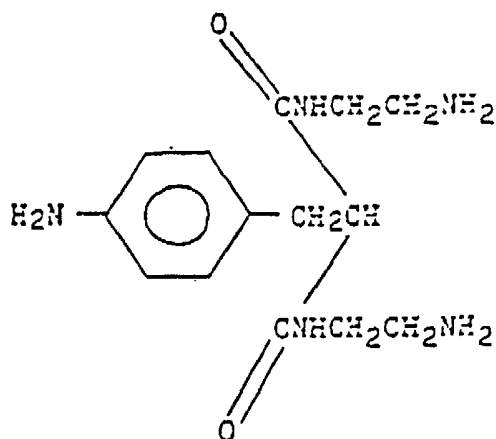
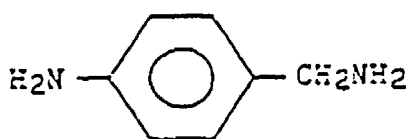
(c) I det tilfælde, at ingen simpel beskyttelsesgruppe kan dannes for den reaktive funktionalitet, der skal anvendes til binding med målretteren, kan en syntetisk forløber anvendes, som er ureaktiv ved alle de i dendrimersyntesen benyttede syntese procedurer. Efter afslutning af syntesen skal denne funktionelle gruppe være let at omdanne til den ønskede bindingsgruppe på en måde, der ikke ændrer integriteten af resten af molekylet.

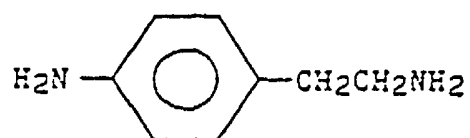
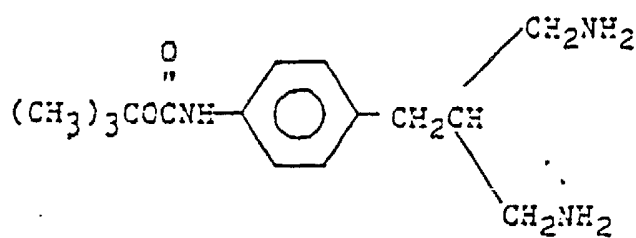
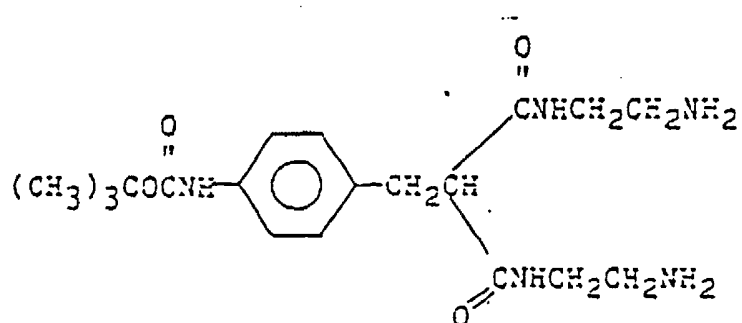
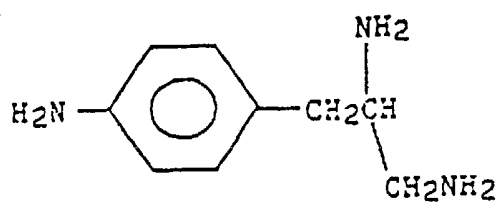
(2) Ved kobling (covalent) af den ønskede reaktive funktionelle gruppe på en forinden dannet dendrimer, skal det benyttede reagens indeholde en funktionalitet, som er let at omsætte med dendrimerens terminale funktionelle grupper. Den funktionelle gruppe, der til sidst skal anvendes til binding med det mål-

rettende middel, kan foreligge i sin endelige form, som en beskyttet funktionalitet eller som en syntetisk forløber. Formen, hvori denne bindende funktionalitet anvendes, afhænger af dens integritet under synteseproceduren, der skal anvendes, og det endelige makromolekyles evne til at modstå hvilke som helst betingelser, der er nødvendige til at gøre denne gruppe i stand til binding. F.eks. anvender den foretrukne vej til PEI

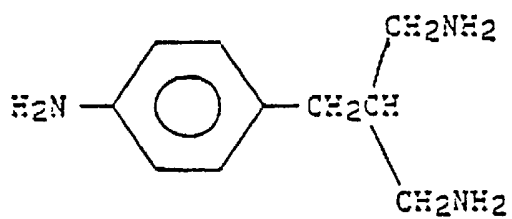


Eksempler på heterofunktionelle initiatorer til anvendelse under (1) ovenfor indbefatter følgende illustrative eksempler:

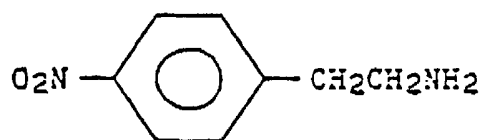




5

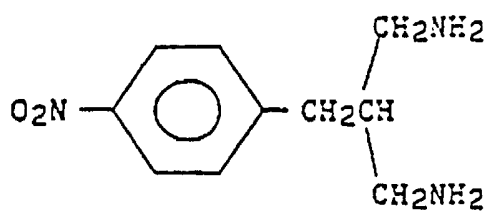


10



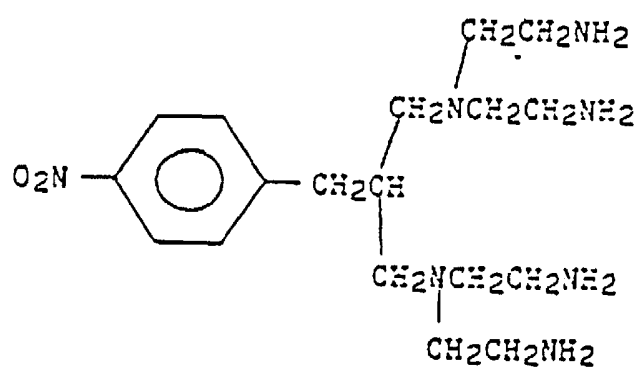
15

20



25

30



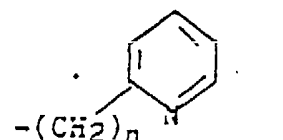
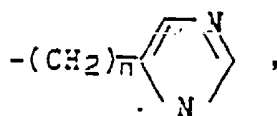
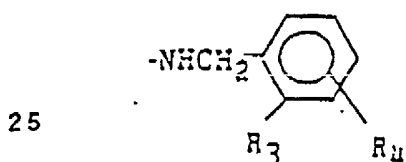
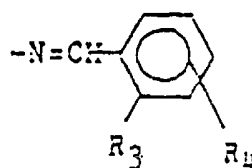
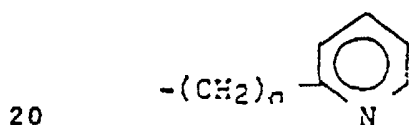
35

Der findes flere kemi'er af særlig vigtighed:

- 1) Stjerneeksplosionspolyamidoamiders ("PAMAM") kemi;
- 2) Stjerneeksplosionspolyethyleniminers ("PEI") kemi;
- 5 3) PEI-stjerneeksplosionsforbindelse med en overflade af PAMAM; og
- 4) Stjerneeksplosionspolyetheres ("PE") kemi.

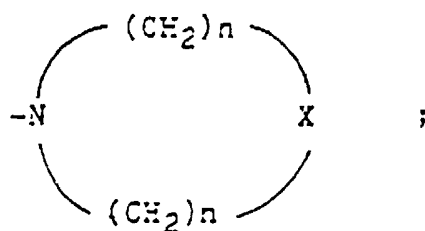
10 Modifikationer af dendrimeroverfladefunktionaliteterne kan tilvejebringe andre anvendelige funktionelle grupper, såsom følgende:

15 $-OPO_3H_2$, $-PO_3H_2$, $-PO_3H(-1)$, $-PO_3(-2)$, $-CO_2(-1)$, $-SO_2H$,
 $-SO_2(-1)$, $-SO_3H$, $-SO_3(-1)$, $-NR^1R^2$, $-R^5$, $-OH$, $-OR^1$, $-NH_2$, per-
fluoreret alkyl, $-CNHR^1$, $-COH$,



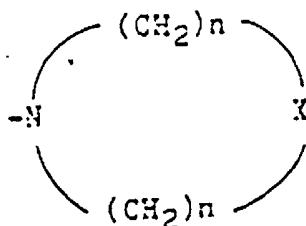
hvor R betegner alkyl, aryl eller hydrogen,
 R^1 betegner alkyl, aryl, hydrogen eller

30



35

R^2 betegner alkyl, aryl eller



R³ betegner -OH, -SH, -CO₂H, -SO₂H eller -SO₃H,

R⁴ betegner alkyl, aryl, alkoxy, hydroxyl, mercapto, carboxyl, nitro, hydrogen, brom, chlor, jod eller fluor,

R⁵ betegner alkyl,

10 X betegner NR, O eller S, og

n betegner det hele tal 1, 2 eller 3,

polyethere, eller andre immuno-ufølsomme molekyldele.

Valget af funktionel gruppe afhænger af den pågældende slut-
 15 anvendelse, hvortil dendrimeren er bestemt.

Binding af antistoffer til dendrimerer er et andet aspekt ved den foreliggende opfindelse. Antistofferne eller antistoffragmenterne bindes typisk til dendrimeren ved hjælp af velkendte
 20 metoder, såsom tilknytning mellem en funktionel gruppe på dendrimeren og molekyldele, såsom kulhydrat-, amino-, carboxyl- eller sulfhydrylfunktionaliteter, der findes i antistoffet eller antistoffragmentet. I nogle tilfælde kan forbindelsesgrupper anvendes som forbindelsesled eller afstandsstykker
 25 mellem dendrimeren og antistof eller antistoffragment. Dendrimerens tilknytning til antistoffet eller antistoffragmentet bør foretages på en måde, der ikke på signifikant måde generer antistoffets eller antistoffragmentets immunoreaktivitet, dvs. ved binding af antistoffet eller antistoffragmentet via
 30 en funktionalitet i antistoffet eller antistoffragmentet, som ikke er en del af antigen-genkendelsesstedet og -bindingsstedet.

De følgende eksempler illustrerer opfindelsen yderligere, men
 35 må ikke opfattes som en begrænsning af opfindelsens rammer. De med bogstav betegnede eksempler vedrører fremstilling af udgangsmaterialer, medens de nummererede eksempler angår fremstilling af produkter.

Eksempel A: Fremstilling af 2-carboxamido-3-(4'-nitrophenyl)-propanamid.

p-nitrobenzylmalonat-diethylester (2,4 g, 8,13 mmol) blev opløst i 35 ml methanol. Opløsningen opvarmedes til 50-55°C under omrøring, og en strøm af vandfri ammoniak blev boblet gennem opløsningen i 64 timer. Opløsningen blev afkølet, og det hvide, flokkulerende produkt blev filtreret fra og rekrystalliseret fra 225 ml kogende methanol til opnåelse af 1,85 g (7,80 mmol) bisamid i 96% udbytte (smeltepunkt = 235,6°C (d)).

Formlen blev bekræftet ved hjælp af MS, ^1H og ^{13}C NMR-spektroskopi.

Analyse: Beregnet for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}_3$

	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
Teoretisk:	50,63	4,69	17,72
Fundet:	50,75	4,81	17,94

Eksempel B: Fremstilling af 1-amino-2-(aminomethyl)-3-(4'-nitrophenyl)propan.

2-carboxamido-3-(4'-nitrophenyl)propanamid (2,0 g, 8,43 mmol) blev opslået i 35 ml tør tetrahydrofuran under en nitrogenatmosfære og under omrøring. Til denne blanding sættes boran/tetrahydrofuran-kompleks (106 ml, 106 mmol) ved hjælp af en sprøjte. Reaktionsblandingen blev derpå opvarmet til tilbagesvaling i 48 timer, i løbet af hvilken tid det suspenderede amid opløstes. Opløsningen afkøledes, og tetrahydrofuranen blev fjernet under vakuum under anvendelse af en rotationsfordamper. Det rå produkt og boranresten blev opløst i 50 ml ethanol, og denne opløsning blev rensat med vandfri hydrogenchloridgas. Opløsningen opvarmedes under tilbagesvaling i 1 time, og opløsningsmidlet blev fjernet under vakuum. Det rå hydrochloridsalt blev opløst i 15 ml deioniseret vand og ekstraheret med to 50 ml portioner methylenchlorid. Det vandige lag afkøledes i et isbad under et argonlag, og 50% natriumhy-

droxid blev langsomt tilsat indtil basisk pH = 11,7. Det basiske vandige lag blev ekstraheret med fire 25 ml portioner methylenchlorid, og disse kombinerede ekstrakter blev inddampet (rotationsfordamper) til opnåelse af 1,45 g gulfarvet olie. Denne olie findeltes med diethylether (50 ml) og filtreredes under tryk gennem en kort silikagelsøjle (kvalitet 62 Aldrich). Søjlen blev vasket med 100 ml ether, og de kombinerede filtratet vakuuminddampes til opnåelse af 1,05 g (5,02 mmol) af titeldiaminen som en klar olie (smeltepunkt = 275-278°C(d) bis-HCl-salt).

Formlen blev bekræftet ved hjælp af MS-, ^1H - og ^{13}C -NMR spektroskopi.

Analyse: Beregnet for $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2\text{Cl}_2$

	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
Teoretisk:	42,57	6,07	14,89
Fundet:	43,00	6,14	15,31

Eksempel C: Fremstilling af 1-amino-2-(aminomethyl)-3-(4'-aminophenyl)propan.

Boran/tetrahydrofuran-opløsning (70 ml, 70 mmol) blev under nitrogen ved hjælp af en kanylenål sat til en kolbe indeholdende 4-amino-benzylmalonamid (1,5 g, 7,24 mmol) under omrøring. Opløsningen blev bragt til tilbagesvaling i 40 timer. Den farveløse opløsning blev afkølet, og overskud af tetrahydrofuran blev fjernet ved hjælp af rotationsfordampning under efterladelse af en klar gelatinøs olie. Methanol (50 ml) blev forsigtigt sat til olien under mærkbar gasudvikling. Tørt hydrogenchlorid blev boblet gennem suspensionen til frembringelse af opløsning, og opløsningen blev derpå opvarmet under tilbagesvaling i 1 minut. Methanol/HCl blev rotationsfordampet, og det resulterende hydrochloridsalt blev atter ført gennem den samme opløsnings/tilbagesvalingsprocedure. Det opnåede hydrochloridsalt blev opløst i 10 ml vand og afkølet i et isbad under argon. Koncentreret natriumhydroxid (50%) blev langsomt

tilsat under omrøring indtil pH = 11. Den vandige portion blev derpå ekstraheret med 2 x 100 ml portioner chloroform, som blev kombineret og filtreret gennem en kort silikagelprop uden tørring. Opløsningsmidlet fjernedes under vakuum (rotationsfordamper) til opnåelse af titelforbindelsen (0,90 g, 5,02 mmol) i 70% udbytte (R_f = 0,65 - $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ konc. - 2/2/1). Formlen blev bekræftet ved hjælp af ^1H og ^{13}C -NMR og benyttet uden yderligere rensning.

10 Eksempel D: Fremstilling af 6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetra-
aza-5,7-dioxoundecan.

4-aminobenzylmalonat-dimethylester (2,03 g, 8,43 mmol) blev opløst i 10 ml methanol. Denne opløsning blev dråbevis sat til en omrørt opløsning af frisk destilleret ethylendiamin (6,00 g, 103,4 mmol) i 10 ml methanol under nitrogen i løbet af 2 timer. Den klare opløsning omrørtes i 4 dage, og tyndtlagskromatografisk (TLC) analyse viste fuldstændig omdannelse af diester (R_f = 0,91) til bisamidet (R_f = 0,42 - 20% konc. $\text{NH}_4\text{OH}/$ 80% ethanol). Dette materiale var stærkt ninhydrinpositivt. Methanolen og overskud af diamin blev fjernet på en rotationsfordamper, og det resulterende hvide, faste stof blev vakuumtørret (10^{-1} mm, 50°C) natten over til opnåelse af et råt produkt (2,45 g, 8,36 mmol) i 99% udbytte. En analytisk prøve blev rekrySTALLiseret fra chloroform/hexan, smeltepunkt = $160-161^\circ\text{C}$. De massespektrale data, ^1H - og ^{13}C -NMR-data stemte overens med den foreslåede formel.

30 Eksempel E: Omsætning af mesylaziridin med 1-amino-2-(aminomethyl)-3-(4-nitrophenyl)propan.

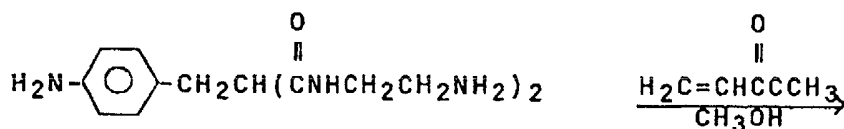
1-amino-2-(aminomethyl)-3-(4-nitrophenyl)propan (400 mg, 1,91 mmol, > 96% ren) blev opløst i 10,5 ml absolut ethanol under nitrogen. Mesylaziridin (950 mg, 7,85 mmol) blev sat til den omrørte diaminopløsning som et fast stof. Reaktionsblandingen omrørtes ved 25°C i 14 timer under anvendelse af en magnetisk omrører, og i løbet af dette tidsrum dannedes en hvid, gummiagtig rest på kolbens sider. Ethanolen dekanteredes fra, og

resten blev findelt med en anden 15 ml portion methanol til fjernelse af eventuelt uomsat aziridin. Det gummiagtige produkt blev vakuumtørret (101 mm, 25°C) til opnåelse af tetra-kismethylsulfonamidet (1,0 g, 1,44 mmol) i 75% udbytte ($R_f = 0,74$ - NH_4OH /ethanol 20/80). Formlen blev bekræftet ved hjælp af ^1H -spektroskopi og ^{13}C -kernemagnetisk resonansspektroskopi (NMR).

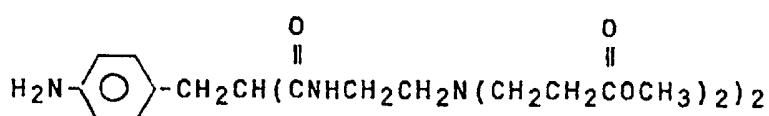
Eksempel F: Fremstilling af 2-(4-nitrobenzyl)-1,3-(bis-N,N-2-aminoethyl)diaminopropan.

Det rå methylsulfonamid (650 mg, 0,94 mmol) blev opløst i 5 ml nitrogenrenset, koncentreret svovlsyre (98%). Denne opløsning blev holdt under nitrogen og opvarmet til 143-146°C i 27 minutter under kraftig omrøring. En ringe mørkning iagttoges, og den afkølede opløsning blev udhældt i en omrørt etheropløsning (60 ml). Den udfældede hvide saltkage blev filtreret fra og øjeblikkelig opløst i 10 ml deioniseret vand. Opløsningens pH-værdi blev indstillet til pH = 11 med 50% NaOH under argon og under afkøling. Den resulterende opløsning blev blandet med 90 ml ethanol, og de udfældede uorganiske salte blev filtreret fra. Opløsningsmidlet blev fjernet den rå amin under formindsket tryk, og til den resulterende lysebrune olie sattes 190 ml toluen under nitrogen. Blandingen omrørtes kraftigt, og vand blev fjernet ved hjælp af azeotropisk destillation (Dean-Strak-udskiller), indtil den tilbageværende toluen fik en lysegul farve (30-40 ml tilbage i beholderen). Toluenen afkøledes og dekanteredes fra de mørke, vanskeligt behandlelige rester og salt. Denne opløsning blev befriet for opløsningsmiddel i vakuum, og den resulterende lysegule olie blev vakuumtørret (0,2 mm, 35°C) natten over til opnåelse af 210 mg af produktet (60%), som blev karakteriseret ved hjælp af MS, ^1H og ^{13}C NMR.

Eksempel G: Fremstilling af en stjerneeksplosionspolymer (indeholdende et anilinderivat) på en halv generation repræsenteret ved hjælp af følgende skema:



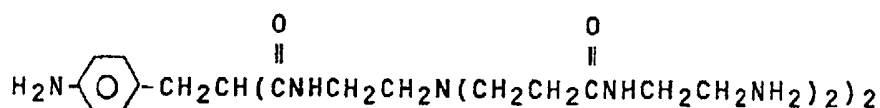
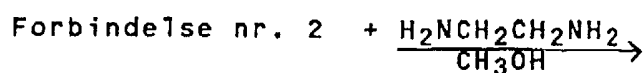
Forbindelse nr. 1



Forbindelse nr. 2

Methylacrylat (2,09 g, 24 mmol) blev opløst i methanol (15 ml). Forbindelsen 6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioxoundecan (1,1 g, 3,8 mmol) (dvs. forbindelse nr. 1, fremstillet som beskrevet i eksempel D) blev opløst i methanol (10 ml) og blev langsomt i løbet af 2 timer og under kraftig omrøring sat til methylacrylatopløsningen. Reaktionsblandingen omrørtes i 48 timer ved omgivelsernes temperatur. Opløsningsmidlet fjernedes på rotationsfordamperen under bibeholdelse af temperaturen under 40°C. Esteren (forbindelse nr. 2) opnåedes som en gul olie (2,6 g). Ingen carboxylethylering af anilinfunktionen iagttoges.

Eksempel H: Fremstilling af en stjerneeksplosionspolymer (indeholdende en anilindel) af første generation angivet ved hjælp af følgende skema:

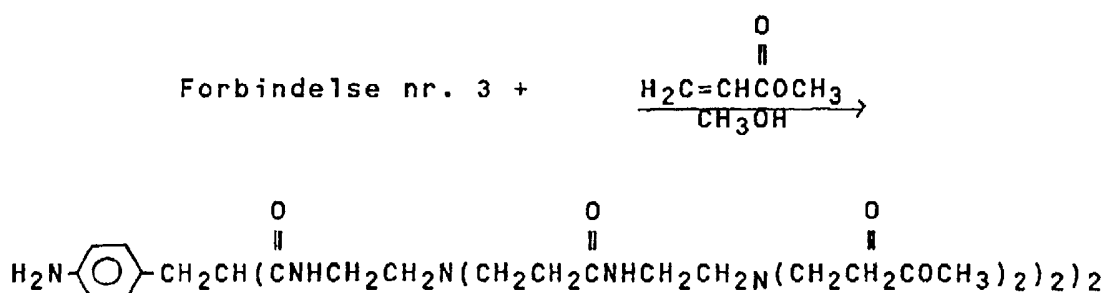


Forbindelse nr. 3

Esteren (forbindelse nr. 2) (2,6 g, 3,7 mmol) blev opløst i methanol (100 ml). Denne blev forsigtigt sat til en kraftigt

omrørt opløsning af ethylendiamin (250 g, 4,18 mol) og methanol (100 ml) med en sådan hastighed, at temperaturen ikke steg til over 40°C. Efter fuldstændig tilsætning omrørtes reaktionsblandingen i 28 timer ved 35-40°C (varmekappe). Efter 28 timer kunne ingen estergrupper påvises ved hjælp af infrarød spektroskopi. Opløsningsmidlet fjernedes på en rotationsfordamper ved 60°C. Overskuddet af ethylendiamin blev fjernet under anvendelse af en ternær azeotrop af toluen-methanol-ethylendiamin. Til slut blev alt tilbageværende toluen fjernet azeotropisk sammen med methanol. Fjernelse af al methanolen resulterede i 3,01 g af produktet (forbindelse nr. 3) som et orange glasagtigt fast stof.

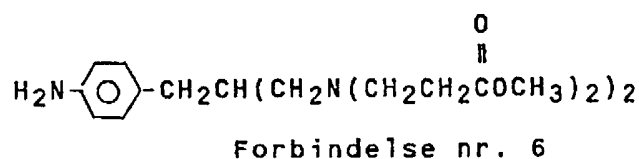
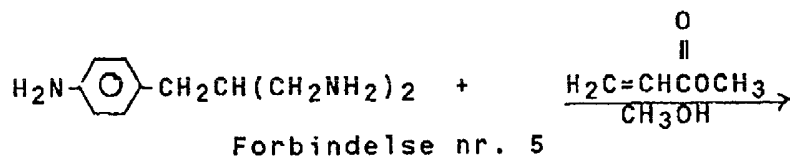
Eksempel I: Fremstilling af en stjerneeksplosionspolymer (indeholdende en anilindel) af halvanden generation angivet ved hjælp af følgende skema:



Forbindelse nr. 4

Aminen (forbindelse nr. 3) (2,7 g, 3,6 mmol) opløstes i methanol (7 ml) og blev langsomt i løbet af 1 time sat til en omrørt opløsning af methylacrylat (3,8 g, 44 mmol) i methanol (15 ml) ved omgivelsernes temperatur. En svag opvarmning af opløsningen iagttoges under tilsætningen. Man lod opløsningen omrøre ved omgivelsernes temperatur i 16 timer. Opløsningsmidlet blev fjernet på rotationsfordamperen ved 40°C. Efter fjernelse af alt opløsningsmidlet og overskuddet af methylacrylat opnåedes esteren (forbindelse nr. 4) i 4,7 g udbytte som en orange olie.

Eksempel J: Fremstilling af en stjerneeksplosionspolymer (indeholdende en anilindel) på en halv generation angivet ved hjælp af følgende skema:



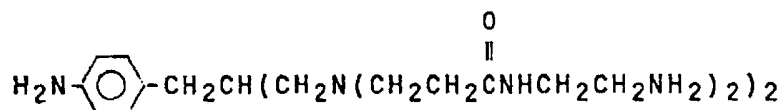
15 Triaminen (forbindelse nr. 5, denne forbindelses fremstilling er vist i eksempel C) (0,42 g, 2,3 mmol) opløstes i methanol (10 ml) og blev dråbevis i løbet af 1 time sat til methylacrylat (1,98 g, 23 mmol) i methanol (10 ml). Man lod blandingen omrøre ved omgivelsernes temperatur i 48 timer. Opløsningsmid-

20 let blev fjernet på rotationsfordamperen, idet temperaturen blev holdt på højst 40°C. Overskuddet af methylacrylat blev fjernet ved hjælp af gentagne azeotropiske destillationer sammen med methanol. Esteren (forbindelse nr. 6) blev isoleret som en orange olie (1,24 g).

25 Eksempel K: Fremstilling af en stjerneeksplosionspolymer (indeholdende en anilindel) på en generation angivet ved hjælp af følgende skema:

30

35

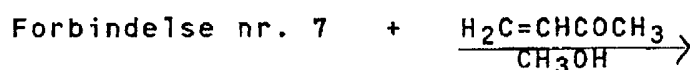


5

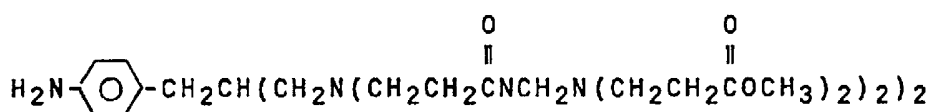
Forbindelse nr. 7

Esteren (forbindelse nr. 6) (1,24 g, 2,3 mmol) blev opløst i methanol (50 ml) og blev dråbevis i løbet af 2 timer sat til ethylendiamin (73,4 g, 1,22 mol) i methanol (100 ml). En ringe eksoterm iagttoges, og kraftig omrøring blev opretholdt. Opløsningen henstilledes til omrøring ved omgivelsernes temperatur i 72 timer. Opløsningsmidlet blev fjernet på rotationsfordamperen ved 60°C. Overskuddet af ethylendiamin fjernedes ved anvendelse af en ternær azeotrop af toluen-methanol-ethylendiamin. Til slut fjernedes alt tilbageværende toluen sammen med methanol, og nedpumpning derefter med en vakuumpumpe i 48 timer resulterede i aminen (forbindelse nr. 7) (1,86 g) som en gul/orange olie.

Eksempel L: Fremstilling af en stjerneeksplosionspolymer (indeholdende en anilindel) på halvanden generation angivet ved hjælp af følgende skema:



25



Forbindelse nr. 8

Aminen (forbindelse nr. 7) (1,45 g, tilbageværende spor af methanol) blev opløst i methanol (100 ml) og blev langsomt i løbet af 1½ time sat til en omrørt opløsning af methylacrylat (5,80 g) i methanol (20 ml). Man lod opløsningen omrøre i 24 timer ved stuetemperatur. Fjernelse af opløsningsmidlet efterfulgt af gentagne azeotropiske destillationer sammen med methanol muliggjorde fjernelse af hele overskuddet af methylacrylat. Efter nedpumpning med en vakuumpumpe i 48 timer isoleredes estereren (forbindelse nr. 8) som en orange olie (2,50 g, 1,8 mmol).

Eksempel M: Hydrolyse af 4,5 generation dendrimer og fremstilling af calciumsalt.

5 4,5 generation PAMAM (estertermineret, initieret fra NH_3) (2,11 g, 10,92 mækv.) blev opløst i 25 ml methanol, og dertil
sattes 10% NaOH (4,37 ml, 10,92 mækv.) ($\text{pH} = 11,5-12$). Efter
24 timer ved stuetemperatur var pH -værdien ca. 9,5. Efter
yderligere 20 timer blev opløsningen indampet på rotations-
fordamper, 20 ml toluen blev tilsat, og der blev atter indam-
10 pet på rotationsfordamper.

Den resulterende olie blev opløst i 25 ml methanol og udfældet
som en hvid gummi efter tilsætning af 75 ml diethylether. Væ-
sken blev dekanteret fra, og gummien blev indampet på rota-
15 tionsfordamper til opnåelse af et meget fint off-white pulver,
som efter yderligere tørring resulterede i 2,16 g produkt (98%
udbytte). Ingen estergrupper fandtes ved NMR og infrarød ana-
lyse.

20 Natriumsaltet af 4,5 generation PAMAM (estertermineret, initi-
eret fra NH_3) blev erstattet med calciumsaltet via dialyse.
Natriumsaltet (1,03 g) blev opløst i 100 ml vand og ført gen-
nem hule fiberdialyserør (afskæringsværdi = 5.000) med 3 ml/
minut. Det ydre af røret blev holdt nedsænket i 5% CaCl_2 -op-
25 løsnings. Denne procedure blev derpå gentaget.

Den resulterende opløsning blev atter dialyseret, denne gang
mod vand, hvilket blev gentaget to yderligere gange.

30 Inddampning resulterede i 0,6 g vådt fast stof, som blev op-
taget i methanol (ikke fuldstændig opløseligt) og derpå tør-
ret til opnåelse af 0,45 g off-white krystaller.

35 $\text{C}_{369}\text{H}_{592}\text{O}_{141}\text{N}_{91}\text{Ca}_{24}$, beregnet - 10,10% Ca^{++}

Molekylvægt = 9.526,3, beregnet = C-4432,1, H-601,8, O-2255,9,
N-1274,6, Ca-961,9)

Teoretisk: C-46,5, H-6,32, N-13,38, Ca-10,10

Fundet: C-47,34, H-7,00, N-13,55, Ca-8,83

Eksempel N: Fremstilling af dendrimerer med terminale carboxylatgrupper.

Halvgenerations-stjerneeksplosionspolyamidoaminer blev hydrolyseret til omdannelse af deres terminale methylestergrupper til carboxylater. Dette frembragte sfæroide molekyler med negative ladninger spredt på periferien. De hydrolyserede dendrimerer lå i intervallet fra 0,5 generation (3 carboxylater) til 6,5 generation (192 carboxylater).

Produkterne kunne dannes som Na⁺-, K⁺-, Cs⁺- eller Rb⁺-salte.

Eksempel O: N-t-butoxycarbonyl-4-aminobenzylmalonat-dimethylester.

4-aminobenzylmalonat-dimethylester (11,62 g, 49 mmol) blev opløst i 50 ml t-butanol:vand (60:40) under omrøring. Di-t-butoxydicarbonat (19,70 g, 90 mmol) blev tilsat, og reaktionsblandingen blev omrørt natten over. Butanolen blev fjernet på rotationsfordamperen, hvilket resulterede i en gul suspension af produktet i vand. Ekstraktion i methylenchlorid, tørring (MgSO₄) og inddampning resulterede i en gul olie (21,05 g, forurenset med di-t-butoxydicarbonat). Rekrystallisation fra 2-propanol:vand (75:25) resulterede i bleggule krystaller (11,1 g, 33 mmol, 67%). Formlen blev bekræftet ved hjælp af ¹³C-NMR, og renhed blev kontrolleret ved hjælp af HPLC-analyse ("Spherisorb" ODS-1, 0,05M H₃PO₄ pH 3: CH₃CN 55:45). Materialet blev benyttet uden yderligere rensning.

Eksempel P: N-t-butoxycarbonyl-6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioxoundecan.

N-t-butoxycarbonyl-4-aminobenzylmalonat-dimethylester (88,82 g, 26 mmol), der var fremstillet ifølge eksempel O, blev opløst i 50 ml methanol. Denne opløsning blev dråbevis (2 timer) sat

til en opløsning af frisk destilleret ethylendiamin (188 g, 3,13 mol) og 20 ml methanol under en nitrogenatmosfære. Man lod opløsningen omrøre i 24 timer. Ethylendiamin/methanolopløsningen fjernedes på rotationsfordamperen. Produktet opløstes i methanol, og toluen blev tilsat. Opløsningsmiddelfjernelse på rotationsfordamperen resulterede i det rå produkt som et hvidt, fast stof (10,70 g forurenet med ethylendiamin). Prøven blev delt i to prøver til rensning. Azeotropisk fjernelse af ethylendiamin sammen med toluen under anvendelse af en soxhlet-ekstraktør med sulfonerede ionbytterperler i det poseagtigt lukkede rør til opfangning af ethylendiaminen resulterede i delvis dekomponering af produktet under dannelse af en brun olie. Det resterende produkt blev isoleret som et hvidt, fast stof fra toluenen ved afkøling (2,3 g, ca. 50%).

Analyse af en 10% opløsning i methanol ved hjælp af gaskromatografi (søjle, "Tenax" 60/80) viste ingen påviselig ethylendiamin i prøven (<0,1%). Den anden fraktion blev opløst i methanol til opnåelse af en 10% opløsning (efter vægt) og renses for ethylendiaminen ved hjælp af omvendt osmose under anvendelse af methanol som opløsningsmiddel. (Den benyttede membran var en "Filmtec" FT-30 i en tynd "Amicon" TC1R-kanalseparator, idet ethylendiaminen går gennem membranen). Produktet blev isoleret som et hvidt, fast stof (2,7 g), hvori ingen påviselige mængder ethylendiamin kunne findes ved gaskromatografi.

¹³C NMR-dataene og HPLC-analyse ("Spherisorb" ODS-1, 0,05 M H₃PO₄ pH 3:CH₃CN 55:45) stemte overens med den foreslåede formel. Produktet blev benyttet uden yderligere rensning.

Eksempel Q: Fremstilling af en stjerneeksplosionsdendrimer på en halv generation ud fra N-t-butoxycarbonyl-6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioxoundecan.

N-t-butoxycarbonyl-6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioxoundecan (5,0 g, 13 mmol), der var fremstillet ifølge eksempel P, blev opløst i 100 ml methanol. Methylacrylat (6,12 g, 68 mmol) blev tilsat, og opløsningen blev omrørt ved omgivelsens temperatur i 72 timer. Reaktionen målt ved hjælp af HPLC ("Spherisorb" ODS1, acetonitril: 0,04 ammoniumacetat

40:60) til optimering af omdannelsen til det ønskede produkt. Opløsningen inddampedes til 30% faststofindhold, og methylacrylat (3,0 g, 32 mmol) blev tilsat. Reaktionsblandingen blev omrørt ved omgivelsernes temperatur, indtil ingen delvis alkylerede produkter kunne påvises ved hjælp af HPLC (24 timer). Fjernelse af opløsningsmidlet ved 30°C ved hjælp af rotationsfordampning og nedpumpning til 1 mm Hg i 24 timer resulterede i produktet som en gul, viskos olie i et udbytte på 7,81 g. ¹³C NMR-dataene stemte overens med den foreslåede formel. Produktet blev benyttet uden yderligere rensning.

Eksempel R: Fremstilling af en stjerneeksplosionsdendrimer på en hel generation ud fra N-t-butoxycarbonyl-6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraza-5,7-dioxoundecan.

Halvgenerationsproduktet (eksempel Q) (7,70 g, 10,45 mmol) blev opløst i 75 ml methanol og dråbevis i løbet af 2 timer sat til en omrørt opløsning af ethylendiamin (400 ml, 7,41 mol) og methanol (50 ml). Reaktionsblandingen blev omrørt ved omgivelsernes temperatur i 48 timer. Ethylendiaminen og methanolen blev fjernet ved rotationsfordampning til opnåelse af en gul olie (11,8 g forurenset med ethylendiamin). Produktet blev opløst i 90 ml methanol og renses for ethylendiaminen ved hjælp af omvendt osmose ("Filmtec" FT-30 membran og tynd "Amicon" TC1R-kanalseparator, methanol som opløsningsmiddel). Efter 48 timer kunne ingen ethylendiamin påvises ved hjælp af gaskromatografi (søjle, "Tenax" 60/80). Fjernelse af opløsningsmidlet på rotationsfordamperen efterfulgt af nedpumpning på en vakuumledning i 24 timer resulterede i produktet som et gult, glasagtigt fast stof (6,72 g). Analyse ved hjælp af HPLC, PLRP-S-søjle, acetonitril:0,015M NaOH, 10-20% gradient i 20 minutter) og ¹³C NMR-analyse stemte overens med den foreslåede formel.

Eksempel S: Fremstilling af en stjerneeksplosionspolymer på halvanden generation ud fra N-t-butoxycarbonyl-6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioxoundecan.

- 5 Etgenerationsproduktet (eksempel R) (2,14 g, 25 mmol) blev opløst i 12,5 ml methanol, og methylacrylat (3,5 g, 39 mmol) i 5 ml methanol blev tilsat. Opløsningen omrørtes ved omgivelsernes temperatur i 48 timer, idet reaktionens forløb blev målt ved hjælp af HPLC ("Spherisorb" ODS-1, acetonitril:0,04M ammoniumacetat, 60:40). En ringe aliquot mængde af methylacrylat blev tilsat (3,5 g, 39 mmol), og reaktionsblandingen blev omrørt ved omgivelsernes temperatur i yderligere 72 timer. Fjernelse af opløsningsmidlet på rotationsfordamperen resulterede i produktet som en gul olie (3,9 g) efter nedpumpning natten over med en vakuumpumpe. Produktet blev benyttet uden yderligere rensning.
- 10
- 15

- Eksempel T: Fremstilling af en stjerneeksplosionspolymer på to fulde generationer ud fra N-t-butoxycarbonyl-6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioxoundecan.
- 20

- Halvandengenerationsproduktet (eksempel S) (3,9 g, 2,5 mmol) blev opløst i 50 ml methanol og blev dråbevis i løbet af 2 timer sat til en omrørt opløsning af ethylendiamin (600 g, 10 mol) og methanol (50 ml). Opløsningen blev omrørt ved omgivelsernes temperatur under en nitrogenatmosfære i 96 timer. Ethylendiaminen/methanolen blev fjernet på rotationsfordamperen til opnåelse af et gult, glasagtigt fast stof (4,4 g, forurenet med ethylendiamin). En 10% opløsning af produktet blev fremstillet i methanol og rensset for ethylendiamin ved hjælp af omvendt osmose (som membran benyttedes en "Filmtec" FT-30 i en tynd "Amicon" TC1R-kanalseparator), indtil ingen ethylendiamin kunne påvises ved hjælp af gaskromatografi (søjle, "Tenax" 60/80). Fjernelse af opløsningsmidlet resulterede i produktet som et gult, glasagtigt fast stof (3,52 g). ¹³C NMR-data og HPLC-analyse (PLRP-S-søjle, acetonitril:0,015M NaOH, 10 til 20% gradient på 20 minutter) stemte overens med den foreslåede formel.
- 25
- 30
- 35

Eksempel U: Omsætning af togenerationsstjerneeksplosionspolymeren med bromeddikesyre til opnåelse af en methylen-carboxylat-termineret stjerneeksplosionsdendrimer.

5 Andengenerationsproduktet (eksempel T) (0,22 g, 0,13 mmol) blev opløst i 15 ml deioniseret vand, og temperaturen blev indstillet til 40,5°C. Bromeddikesyre (0,48 g, 3,5 mmol) og lithiumhydroxid (0,13 g, 3,3 mmol) blev opløst i 5 ml deioniseret vand og sat til reaktionsblandingen. Reaktionsblandin-
10 gens pH-værdi blev omhyggeligt holdt ved 9 under anvendelse af en pH-stat (titrering med 0,1N NaOH) ved 40,5°C natten over. Måling ved hjælp af omvendt fase HPLC ("Spherisorb" ODS-1-søjle, elueringsmiddel 0,25M H₃PO₄, pH 3 [NaOH]: acetonitril 85:15) bekræftede syntesen af overvejende en enkelt komponent.

15

Eksempel V: Fremstilling af en isothiocyantatfunktionaliseret methylen-carboxylattermineret andengenerations-stjerneeksplosionsdendrimer.

20 5 ml af en 2,8 mM opløsning af den methylen-carboxylatterminerede andengenerations-stjerneeksplosionsdendrimer (eksempel U) blev fortyndet med 20 ml vand, og pH-værdien blev indstillet til 0,5 med koncentreret saltsyre. Efter en time ved stuetemperatur blev blandingen analyseret ved hjælp af HPLC til verifi-
25 cering af fjernelsen af butoxycarbonylgruppen og derpå behandlet med 50% natriumhydroxid til at indstille pH-værdien til 7. En pH-stat (titrering med 0,1N NaOH) blev benyttet til at holde pH-værdien ved 7, og 225 µl thiophosgen blev tilsat. Efter 15 minutter ved stuetemperatur blev blandingens pH-vær-
30 di indstillet til 5 med 1N HCl. Blandingen blev vasket med chloroform (20 ml x 2) og derpå koncentreret på en rotationsfordamper ved formindsket tryk. Den udvundne rest på 0,91 g er en blanding af isothiocyantatet og salte.

35

Eksempel W: Fremstilling af andengenerations-stjerneeksplosionspolyethylenimin-methansulfonamid.

5 Til en opløsning af 125 g N-methansulfonylaziridin i 50 ml ethanol sættes 25,0 g tris(2-aminoethyl)amin. Opløsningen blev omrørt ved stuetemperatur i 4 dage. Vand blev sat til reaktionsblandingen efter behov til opretholdelse af opløsningens homogenitet. Opløsningsmidlet blev fjernet ved destillation under vakuum til opnåelse af andengenerations-stjerneeksplosions-PEI-methansulfonamidet som et gult glas (161 g).

Eksempel X: Fraspaltning af methansulfonamider til dannelse af andengenerations-stjerneeksplosionspolyethylenimin.

15 En opløsning af 5,0 g andengenerations-stjerneeksplosions-PEI-methansulfonamid fra eksempel W i 20 ml 38% HCl blev lukket inde i en glasampul. Ampullen blev opvarmet til 160°C i 16 timer og derpå afkølet i et isbad og åbnet. Opløsningsmidlet fjernedes ved destillation under vakuum, og resten blev opløst i vand. Efter indstilling af opløsningens pH-værdi til mere end eller lig med 10 med 50% NaOH blev opløsningsmidlet fjernet ved destillation under vakuum. Toluen (150 ml) blev sat til resten, og blandingen opvarmedes til tilbagesvaling under en Dean-Stark-udskiller, indtil intet yderligere vand kunne fjernes. Opløsningen blev filtreret til fjernelse af salte, og filtratet inddampedes under vakuum til opnåelse af 1,9 g andengenerations-stjerneeksplosions-PEI som en gul olie.

30 Eksempel Y: Fremstilling af tredjegenerations-stjerneeksplosionspolyethylenimin-methansulfonamid.

35 Til en opløsning af 10,1 g andengenerations-stjerneeksplosions-PEI fra eksempel X i 100 ml ethanol sættes 36,6 g N-methansulfonylaziridin. Opløsningen blev omrørt ved stuetemperatur i 1 uge. Vand blev tilsat efter behov til opretholdelse af opløsningens homogenitet. Opløsningsmidlet blev fjernet ved destillation under vakuum til opnåelse af tredjegenerations-stjerneeksplosions-PEI-methansulfonamid som et gult glas (45,3 g).

Eksempel Z: Fraspaltning af methansulfonamider til dannelse af tredjegenerations-stjerneeksplosionspolyethylenimin.

5 Methansulfonamidgrupperne tilhørende tredjegenerations-stjerneeksplosions-PEI-methansulfonamid (5,0 g) fra eksempel Y blev fjernet ved hjælp af den samme procedure som beskrevet for andegenerationsmaterialet i eksempel X til opnåelse af 2,3 g tredjegenerations-stjerneeksplosions-PEI som en gul olie.

10 Eksempel AA: Omsætning af en tredjegenerations-stjerneeksplosionspolyethylenimin med 4-fluor-nitrobenzen.

15 Tredjegenerations-stjerneeksplosionspolyethylenimin (eksempel Z) (1,06 g, 1,2 mmol) blev opløst i 12 ml absolut ethanol. (4-fluor)-nitrobenzen (120 µl, 1,2 mmol) blev tilsat, og reaktionsblandingen blev opvarmet under tilbagesvaling natten over. Opløsningsmidlet blev fjernet på rotationsfordamperen, og den lysegule olie opløstes i vand. Den vandige opløsning blev vasket med chloroform til fjernelse af al uomsat (4-fluor)-nitrobenzen. Fjernelse af vandet resulterede i produktet som en dybgul olie (0,80 g). ¹³C NMR-spektret stemte overens med den foreslåede formel. (Intet forsøg blev gjort på at bestemme naturen af den statistiske fordeling). Produktet blev benyttet uden yderligere rensning.

25

Eksempel BB: Omsætning af nitrophenylderivatet af tredjegenerations-stjerneeksplosionspolyethylenimin med glycolonitril.

30 Nitrophenylderivatet af tredjegenerations-stjerneeksplosionspolyethylenimin (eksempel AA) (0,80 g) blev opløst i 20 ml deioniseret vand. Natriumhydroxid (2,80 g, 50% vægt/vægt) blev sat til den omrørte opløsning, og opløsningen blev rensset med nitrogen, idet luftning fandt sted gennem en natriumhydroxid-gasvasker. Glycolonitril (2,85 ml af en 70% vandig opløsning) blev tilsat ved omgivelsernes temperatur. Dannelse af et gult præcipitat blev iagttaget efter nogle få minutter. Efter 2 timer blev temperaturen langsomt forøget til tilbagesvalingstemperatur, og opløsningen blev holdt ved tilbagesvaling under

nitrogenrensning i 24 timer. Fjernelse af vandet resulterede i produktet som et gult, fast stof, der var forurenset med glycolsyre og natriumhydroxid. ^{13}C NMR-spektret stemte overens med den foreslåede formel. Produktet blev benyttet uden yderligere rensning.

Eksempel CC: Hydrogenering af nitrophenylderivatet til den aminophenylmethylen-carboxylatterminerede tredjegenerations-stjerneeksplosionspolyethylenimin.

Det gule fast stof fra eksempel BB (1,70 g) blev opløst i 10 ml deioniseret vand, idet opløsningens resulterende pH-værdi var ca. 11. Palladium på trækul (200 mg 5% Pd/C) blev sat til reaktionsblandingen i en Parr-glasrysteflaske. Reaktionsblandingen blev bragt under et hydrogentryk på 275 kPa og rystet ved omgivelsernes temperatur i et Parr-hydrogeneringsapparat i 6 timer. Reaktionsblandingen blev filtreret gennem et 0,5M Milliporefilter til fjernelse af Pd/C, opløsningsmidlet fjernes under vakuum, og der blev gelfiltreret gennem en "Bio-gel" P2 harpiks (25 g kvældet med vand). Syrning med HCl resulterede i en orangebrun opløsning, som blev rensset med nitrogen natten over. Fjernelse af opløsningsmidlet under vakuum resulterede i produktet som hydrochloridsaltet, der var et blegbrunt fast stof (3,98 g, forurenset med NaCl og glycolsyre, maksimal teoretisk produktmængde 1,15 g). Produktet blev benyttet uden yderligere rensning.

Eksempel DD: Fremstilling af 4-isothiocyanatophenyl-methylen-carboxylattermineret tredjegenerations-stjerneeksplosionspolyethylenimin.

Produktet fra eksempel CC (3,98 g) blev opløst i 15 ml deioniseret vand, og en aliquot mængde (2,5 ml) af denne opløsning blev fortyndet med 10 ml vand. Opløsningens pH-værdi blev indstillet til 7 med natriumhydroxid. En pH-stat (titrering med 1N NaOH) blev benyttet til at holde pH-værdien, og 200 μl thiophosgen blev tilsat. Efter 10 minutter blev blandingens pH-værdi indstillet til 4 med saltsyre. Vand blev fjernet på

en rotationsfordamper ved formindsket tryk (en ringe mængde n-butanol blev tilsat til hindring af skumning). Resten blev vasket med methylenchlorid og derpå tørret. Det rå produkt (0,95 g), en blanding af isothiocyant (0,14 g) og salte, blev benyttet uden yderligere rensning.

Eksempel EE: Fremstilling af en methylen-carboxylat-termineret andengenerations-stjerneeksplosionspolyamidoamin (initieret fra ammoniak).

Andengenerations-stjerneeksplosionspolyamidoaminen (2,71 g, 2,6 mmol) og bromeddikesyre (4,39 g, 31,6 mmol) blev opløst i 30 ml deioniseret vand, og pH-værdien indstilledes til 9,7 med 5N NaOH under anvendelse af en pH-stat. Reaktionsblandingen blev holdt ved denne pH-værdi i en halv time, og temperaturen blev langsomt forøget til 60°C og blev holdt ved 60°C i 3 timer ved konstant pH. pH-værdien blev hævet til 10,3, og reaktionsblandingen forblev under styring i pH-staten ved omgivelsernes temperatur natten over. Reaktionsblandingen blev opvarmet under tilbagesvaling i yderligere 4 timer inden oparbejdning. Fjernelse af opløsningsmidlet og fjernelse af de sidste spor af vand med methanol ved azeotrop destillation resulterede i produktet som et bleggult pulver (8,7 g, forurenset med natriumbromid). ¹³C NMR-spektret stemte overens med den foreslåede formel (med nogen forurening som følge af en ringe mængde fejlmateriale som resultat af nogen monoalkylering).

Eksempel FF: Fremstilling af en methylen-carboxylat-termineret andengenerations-stjerneeksplosionspolyethylenimin (initieret fra ammoniak).

Andengenerations-stjerneeksplosionspolyethylenimin (2,73 g, 6,7 mmol) fra eksempel X og bromeddikesyre (11,29 g, 81 mmol) blev opløst i 30 ml deioniseret vand. pH-værdien blev langsomt forøget til pH 9,5 under bibeholdelse af temperaturen under 30°C. Temperaturen blev langsomt hævet til 55°C, og reaktionsblandings pH-værdi blev holdt ved 9,5 i 6 timer ved hjælp af en pH-stat (titrering med 5N NaOH). pH-værdien blev hævet til

10,2 og holdt ved denne pH-værdi natten over. Fjernelse af opløsningsmidlet på rotationsfordamperen og azeotropisk fjernelse af de sidste spor af vand under anvendelse af methanol resulterede i produktet som et gult pulver (17,9 g, forurenede med natriumbromid). ^{13}C NMR-spektret stemte overens med den foreslåede formel (med nogen forurening som følge af en ringe mængde fejlmateriale som resultat af nogen monoalkylering).

Eksempel GG: Fremstilling af en 3,5-, 4,5-, 5,5- og 6,5-generations-stjerneeksplosions-PAMAM.

Til en 10 vægt% methanolisk opløsning af 2,46 g tredjegenerations-stjerneeksplosions-PAMAM sættes 2,32 g methylacrylat. Denne blanding lod man henstille ved stuetemperatur i 64 timer. Efter fjernelse af opløsningsmiddel og overskud af methylacrylat udvandedes 4,82 g produkt (105% af det teoretiske).

Fremstilling af højere $\frac{1}{2}$ -generations-stjerneeksplosions-PAMAM'er:

4,5-, 5,5- og 6,5-generationer blev fremstillet som ovenfor beskrevet uden nogen signifikante forskelle i reaktantkoncentrationer, reaktant-molforhold eller reaktionstider.

Eksempel HH: Fremstilling af en 4-, 5- og 6-generations-stjerneeksplosions-PAMAM.

Til 2000 g forinden destilleret ethylendiamin sættes 5,4 g 4 $\frac{1}{2}$ -generations-stjerneeksplosions-PAMAM som en 15 vægt% opløsning i methanol. Denne lod man henstille ved stuetemperatur i 48 timer. Methanolen og det meste af den overskydende ethylendiamin lod man fjerne ved hjælp af rotationsfordampning under vandsugervakuum ved en temperatur under 60°C. Den samlede vægt af udvundet produkt var 8,07 g. Gaskromatografi viste, at produktet stadig indeholdt 34 vægt% ethylendiamin på dette tidspunkt. En 5,94 g portion af dette produkt blev opløst i 100 ml methanol og ultrafiltreret til fjernelse af den tilbageværende ethylendiamin. Filtreringen blev foretaget under anvendelse

af en "Amicon" TC1R tyndkanalrecirkulationsseparator, der var udstyret med en "Amicon" YM2-membran. En in-line trykreduktionsventil blev benyttet til at holde et tryk på 380 kPa på tværs af membranen. De 100 ml blev først koncentreret til 15 ml ved at presse udelukkende en opløsningsmiddelstrøm gennem membranen. Efter denne indledningsvise koncentration blev strømmen omdannet til en retentatrecirkulationsarbejds måde med konstant volumen i 18 timer. Efter denne tid blev 60 ml methanol ført gennem membranen til udvinding af produkt, der stadig fandtes i modulet og dermed forbundne rørdele. Produktet blev befriet for opløsningsmiddel, og 2,53 g femtegenerationsstjerneeksplosions-PAMAM blev udvundet. Analyse ved hjælp af gaskromatografi viste, at 0,3% restethylendiamin forblev i produktet.

Fremstilling af generation 4 og 6 foregik som ovenfor anført, idet den eneste forskel er vægtforholdet mellem ethylendiamin og udgangsmateriale. Til fremstilling af fjerde generation var dette forhold 200:1, og til sjette generation var dette forhold 730:1.

Eksempel 1: Inkorporering af 2-(acetyloxy)benzoesyre (aspirin) i stjerneeksplosionsdendrimerer.

En i vid udstrækning accepteret metode til at fastslå, hvorvidt et "sondemolekyle" er indeholdt i det indre af en micelle, består i at sammenligne dens carbon-13-rotationsgitterrelaksationstider (T_1) i et ikke-micelliseret medium i forhold til i et micelliseret medium. En væsentlig formindskelse i T_1 for det micelliserede medium er tegn på "sondemolekyle"-inkorporering i micellen. Eftersom stjerneeksplosionsdendrimerer er "covalent fikserede" micelleanaloger, blev denne T_1 -relaksationstidsmetode benyttet til at fastslå den grad/det omfang, hvori forskellige molekyler af farmaceutisk type var tilknyttet stjerneeksplosionspolyamidoaminer. I det følgende eksempler blev T_1 -værdier for (acetyloxy)benzoesyre (I) (aspirin) bestemt i opløsningsmiddel (CDCl_3) og derpå sammenlignet med T_1 -værdier i CDCl_3 ved forskellige [I:dendrimer]-molforhold.

Inkorporering af aspirin (I) i forskellige stjerneeksplosionspolyamidodendrimerer som funktion af generation.

Forskellige halvgenerations (esterterminerede, initieret fra NH_3)-stjerneeksplosionspolyamidoamindendrimerer ($G = 0,5 \rightarrow 5,5$) blev kombineret med 2-(acetyloxy)benzoesyre i CDCl_3 til opnåelse af syre:tertiær amin-forhold = 1,0. En afsætning af T_1 -værdier for 2-(acetyloxy)benzoesyre mod generation af tilsat stjerneeksplosionsdendrimer (se fig. 4, hvor $\bullet$ repræsenterer C-4, Π betegner C-6, og $\circ$ betegner C-5, viser, at T_1 når et minimum i løbet af generationsintervallet $2,5 \rightarrow 5,5$ for carbonatomerne 4, 5 og 6 i 2-(acetyloxy)benzoesyre. Dette viser tilknytning af 2-(acetyloxy)benzoesyre i dendrimererne ($G = 2,5 \rightarrow 5,5$) og bekræfter yderligere, at polyamidoamindendrimerer ($\text{Gen} = 2,5$ eller større) kan fungere som bærermolekyler.

Eksempel 2: Frigørelse af pseudoephedrin fra stjerneeksplosionsdendrimer - PAMAM.

Pseudoephedrin (0,83 mg/ml) og PAMAM-stjerneeksplosionsdendrimer [1,0 mg/ml; $G = 6,5$; terminalgruppe (Z) = 192 (methyl-ester)] blev opløst i deioniseret destilleret vand, og donorfasens pH-værdi blev indstillet til 9,5 med natriumhydroxidopløsning og opbevaret ved stuetemperatur i ca. 12 timer. Opløsning af pseudoephedrin alene blev behandlet på den samme måde (kontrol). Lægemiddeldendrimeropløsningen blev opbevaret ved 40°C i 8 timer efter det første forsøg, og dynamisk dialyse blev udført. Den benyttede dialysemembran var en "Spectra/Por" 7, MWCO 1.000, der var 28,6 mm i diameter, i spektrum-separationsceller (halvcellelumen 5 og 10 ml, celledimensioner: 38 mm diameter for begge cellerne, og celledybden på 10 og 20 mm for henholdsvis 5 og 10 ml celler).

Prøver blev analyseret ved hjælp af en HPLC-procedure, der var udviklet til pseudoephedrinbetingelser, der er som følger:

Søjle: "uBondapak" C-18

Mobil fase: pH 3,2-phosphatpuffer plus acetonitril (80:20)

Strømningshastighed: 0,3 ml/minut

Påvisning: UV ved 210 nm

Retentionstid: 13,3 minutter.

5 Dialysemembranen blev vasket med deioniseret vand og blev holdt neddykket i receptorfase i mindst 12 timer før anvendelse. Dialysemembranen blev placeret mellem donorummet og receptorummet, og receptorummet blev omrørt med lille magnetisk rotationsstang. Kendte volumener af donor- og receptor-

10 opløsninger blev indført i de respektive rum, og overførsel af pseudoephedrin til receptorummet blev fulgt som funktion af tid. For at opretholde synkebetingelser blev hele receptorfase periodisk fjernet (hvert 30. minut) og erstattet med frisk receptorfase. Mængden af pseudoephedrin blev analyseret i prø-

15 ver af receptorfase. Forsøg blev udført ved stuetemperatur (22°C). Receptorfase var almindeligt deioniseret destilleret vand.

Resultaterne af dynamisk analyse er vist i fig. 5. I fig. 5

20 betegner • kun pseudoephedrin (kontrol), ① betegner pseudoephedrin plus dendrimeren, og ⊙ betegner pseudoephedrin plus dendrimeren ved 40°C, 8 timer før dialyse. Det vil fremgå, at i nærværelse af G = 6,5-dendrimer i donorummet er pseudoephedrins dialysehastighed formindsket. Lagring af donoropløs-

25 ningen ved 40°C viser sig yderligere at formindske dialysehastigheden.

Forsøget blev gentaget med lavere koncentrationer (forholdet mellem antal lægemiddelmolekyler og antallet af terminale

30 grupper blev holdt på det samme). G = 6,5-dendrimer 120 µ/ml, pseudoephedrin 100 µ/ml (122 µ/ml salt).

Dynamisk dialyse af pseudoephedrin (alene) ved denne lavere koncentration var næsten identisk med dialysen ved højere kon-

35 centration. Fig. 6 sammenfatter resultaterne af dette forsøg, hvor • betegner kun pseudoephedrin (kontrol), og o betegner pseudoephedrin plus dendrimer.

Eksempel 3

Proceduren ifølge eksempel 2 blev gentaget under anvendelse af de nedenfor anførte modifikationer.

5

Receptorfase: pH 7,4 phosphatpuffer

Donorfase: pH 7,4 phosphatpuffer plus lægemiddel og dendrimer i følgende forhold:

- | | | | |
|----|----|-----------------------|-------|
| 10 | 1. | G 6,5 : lægemiddel :: | 1:192 |
| | 2. | G 5,5 : lægemiddel :: | 1: 96 |
| | 3. | G 4,5 : lægemiddel :: | 1: 48 |
| | 4. | G 6,5H: lægemiddel :: | 1:192 |
| | 5. | G 5,5H: lægemiddel :: | 1: 96 |
| 15 | 6. | G 4,5H: lægemiddel :: | 1: 48 |

De ovennævnte donorfasesammensætninger plus pseudoephedrin alene blev underkastet dynamisk dialyse. Bogstavet "H" efter dendrimergenerationstallet står for hydrolyseret dendrimer. Hydrolyse blev gennemført ved hjælp af den i eksemplerne M og N beskrevne procedure.

Resultaterne af disse forsøg er sammenfattet i fig. 7, hvor donor- og receptorummet indeholdt pH 7,4 phosphatpuffer. For pseudoephedrin alene (P) er tre forsøgs middelkurve afsat (vist ved den fuldt optrukne linie), og et typisk forløb fra de andre forsøg er vist. I fig. 7 betegner de følgende symboler dendrimeren tilhørende den angivne generation.

30

35

Tabel III

Symbol	Dendrimergeneration
	5,5
	6,5
	4,5
	5,5H
	6,5H
	4,5H

Pseudoephedrin viser sig ikke at associere med dendrimeren (uhydrolyseret) ved pH 7,4. Hydrolyse af de terminale funktionelle grupper til carboxylatform har en dramatisk virkning på dialysehastigheden (formindskelse). Generationstallet viser sig ikke at påvirke dialysehastigheden.

Eksempel 4: Indvirkningsundersøgelser af salicylsyre sammen med PAMAM-stjerneeksplosionsdendrimerer.

Dette eksempel vurderede salicylsyres indvirkningsegenskaber sammen med PAMAM-stjerneeksplosionsdendrimerer. Disse dendrimerer bestod af en ammoniakinitieret kerne med gentagelsesenheder afledt af N-(2-aminoethyl)acrylamid. Begge fulde (amin-terminerede funktioner) og halv-(esterterminalgrupper)generationspolymerer blev medtaget ved undersøgelserne. Forholdet mellem salicylsyre og stjerneeksplosionsdendrimerer, der blev benyttet ved forsøgene, resulterede i tilnærmelsesvis ét salicylsyremolekyle til én terminal amin-funktionel gruppe for helgenerationspolymerer. Ved halvgenerationspolymerundersøgelsen blev det samme forhold benyttet med indstillinger foretaget for polymeren med højere molekylvægt.

Forsøgene blev udført ved stuetemperatur under anvendelse af en statisk ligevægtscelledialysemetodik. Statiske "spektrum"-dialyseceller (halvt celle volumen, 10 ml), der var separeret ved hjælp af "SpectraPor" 6-membraner (molekylvægt-afskæringsværdi = 1.000), blev benyttet til alle forsøg. Transport af salicylsyre blev målt som funktion af tid ved fjernelse af

aliquot mængder fra de pågældende cellerum og analyseret ved hjælp af HPLC-analyse under anvendelse af en U.V.-detektor ved 296 nm ("Bondupak" C-18 søjle, eluering af mobil fase af acetonitril/0,1M phosphatpuffer (pH 3,2) med et forhold på 20:80 (V/V), indstillet til en strømningshastighed på 30 ml/time).

10 ml af en opløsning indeholdende 1 mg/ml salicylsyre og 2,5 mg/ml stjerneeksplosionspolymer (Gen 4,0), der var indstillet til pH 6,65 og 5,0 med HCl-opløsning, blev placeret i dialysecellens donorum, og et tilsvarende volumen rensat vand, der var indstillet til de samme pH-værdier, blev anbragt i receptorummet. Transport af salicylsyre til receptorummet blev målt. Resultaterne er anført i fig. 8. I fig. 8 er den frie syre angivet ved •, syren plus generation 4,0 dendrimer, pH 6,65 er vist ved ○, og syren plus generation 4,0 dendrimer, pH 5,00, er vist ved hjælp af □.

Som følge af den lavere procentiske ionisering af amingrupperne på polymeren ved pH 6 kan et større omfang af indvirkning med salicylsyre forventes ved pH 5, hvilket ville resultere i en mindre mængde transporteret forbindelse ved den lavere pH-værdi. Resultaterne anført i fig. 8 viser en meget mindre procentdel salicylsyre transporteret i nærværelse af polymer ved begge undersøgte pH-værdier sammenlignet med salicylsyrekontrolundersøgelsen. Det iagttages også, at mere salicylsyre transporteres ved pH 6,65 end ved pH 5,0 som forudsagt. Dataene viser en omsætning af stjerneeksplosionspolymeren med salicylsyre, der kan styres ved hjælp af pH. Forsinkede frigørelsesegenskaber medføres også af dataene, eftersom salicylsyremængderne i nærværelse af polymer fortsætter med at stige efter det tilnærmelsesvis 12-timers ligevægtspunkt, der blev iagttaget ved kontrolundersøgelsen.

For yderligere at undersøge vekselvirkningsegenskaberne for salicylsyre sammen med stjerneeksplosionspolymerer (Gen = 4,0) udførtes et forsøg ved pH 8,0. Undersøgelsens udformning afveg fra den tidligere beskrevne ved, at kun salicylsyreopløsningen (1 mg/ml), indstillet til pH 8,0, blev anbragt i donorum-

met, og at polymeropløsningen (2,5 mg/ml) blev placeret i receptorummet. Tab af salicylsyre fra donorummet blev målt som tidligere beskrevet. Resultaterne af forsøget er angivet i fig. 9. I fig. 9 er den frie syre betegnet ved $-\bullet-$, og syren plus generation 4,0 dendrimer ved pH 8,0 er angivet ved $-\Delta---$.

Som vist i fig. 9 afviger ligevægtsegenskaberne for salicylsyre i donorummet med stjerneeksplosionspolymerer i receptorummet fra salicylsyre-kontrolundersøgelsen. Baseret på molekylernes ioniseringsegenskaber ved pH 8,0 forventes en omsætning på tilnærmelsesvis 6-7%. Det iagttagne reaktionsomfang er angivet som værende af størrelsen 4-5%. Den mindre iagttagne associering kan skyldes forsøgsvariationer eller en ioniseringskonstant på mindre end 1.

Dette forsøg viser en optagelse eller fjernelse af fri salicylsyre fra systemets kontinuerede fase ved hjælp af polymeren. Denne virkningstype kunne resultere i undertrykkelse af molekylers reaktivitet, hvilket antyder, at en mulig egenskab af chelaterende type er forbundet med polymererne.

Salicylsyres indvirkningsegenskaber ved pH 6,65 på en halvgenerationsstjerneeksplosionspolymer (Gen = 4,5) med esterterminerede funktionelle grupper blev bedømt. Salicylsyre (1 mg/ml) blev kombineret med stjerneeksplosionspolymer (Gen = 4,5) i en mængde på 3,6 mg/ml ved pH 6,65. 10 ml af opløsningen blev anbragt i donorummet, og transport fra donorummet blev målt som tidligere beskrevet. Resultaterne er anført i fig. 10. I fig. 10 er den frie syre angivet ved hjælp af $-\bullet-$, og syren plus polymeren er angivet ved hjælp af $---o---$.

Under disse forsøgsbetingelser forudsiges ingen ladningsindvirkning at finde sted, eftersom de tertiære amingrupper er ikke-ioniserede ved pH 6,65. Som vist i fig. 10 er tabet af salicylsyre i nærværelse af polymer (Gen = 4,5) i løbet af de første 10 dialysetimer praktisk taget identisk med tabet ved salicylsyre-kontrolundersøgelsen.

De følgende iagttagelser er foretaget ud fra dataene vist i dette eksempel:

(1) Hel generation PAMAM-stjerneeksplosionspolymerer fungerer
5 som en bærer for salicylsyre.

(2) Hel generation PAMAM-stjerneeksplosionspolymerer har forsinket frigørelsesfunktionalitet for salicylsyre.

10 (3) Hel generation PAMAM-stjerneeksplosionspolymerers bærer-egenskaber for salicylsyre kan styres ved hjælp af pH.

Eksempel 5: Påvisning af multipel chelatering af jern ved
hjælp af en natriumpropionattermineret sjettegenerations-
15 stjerneeksplosionspolyamidoamin.

Den natriumpropionatterminerede sjettegenerationspolyamidoamin (initieret fra ammoniak) (97,1 mg, 2,45 mol) blev opløst i 2,5 ml deioniseret vand. Tilsætning af 0,5 ml 0,5N HCl formindske-
20 de pH-værdien til 6,3. Ferrichlorid blev tilsat (0,5 ml, 0,1 2M opløsning, 0,051 mmol), hvilket producerede et lysebrunt gelatinøst præcipitat. Ved opvarmning til 60°C i ½ time blev det gelatinøse præcipitat opløseligt, hvilket resulterede i en homogen orange opløsning. Opløsningen blev filtreret gennem
25 "Biogel" P2-acrylamidgel (10 g, 2 gange), idet der isoleredes et orange bånd (fri for halogenidforurening). Fjernelse af opløsningsmidlet under vakuum resulterede i produktet som en orange film (30 mg). Analyse stemte overens med chelatering af ca. 20 mol ferriioner pr. mol stjerneeksplosionsdendrimer.

30

35

Tabel IV

Fundet	Teoretisk		
	$\text{Na}_4\text{Fe}_{20}\text{H}_{128}\text{SB}$	$\text{Na}_5\text{Fe}_{20}\text{H}_{127}\text{SB}$	$\text{Na}_6\text{Fe}_{20}\text{H}_{126}\text{SB}$
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
Molekylvægt	36632,23	36654,21	36375,18

SB = $\text{C}_{1521}\text{H}_{2467}\text{N}_{379}\text{O}_{573}$.

Disse resultater bekræfter chelatering af 20 ± 2 mol ferriioner pr. mol stjerneeksplosionsdendrimer.

Eksempel 6: Fremstilling af et produkt indeholdende mere end et rhodiumatom pr. stjerneeksplosionspolymer.

2,5 Gen PAMAM (estertermineret, initieret fra NH_3) (0,18 g, 0,087 mmol) og $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,09 g, 0,3 mmol) blev blandet i dimethylformamid (DMF) (15 ml) og opvarmet til 70°C i 4 timer. Opløsningen blev højrrød, og det meste af rhodiumet blev optaget. Det uomsatte rhodium blev fjernet ved filtrering, og opløsningsmidlet fjernedes på rotationsfordamperen. Den dannede olie var chlorformopløselig. Den blev vasket med vand og tørret (MgSO_4) før fjernelse af opløsningsmiddel til opnåelse af en rød olie (0,18 g). NMR-spektret blev registreret i CDCl_3 , og kun mindre forskelle blev iagttaget mellem den chelaterede og uchelaterede stjerneeksplosionspolymer. Fortynding af noget af denne CDCl_3 -opløsning med ethanol efterfulgt af NaBH_4 -tilsætning resulterede i rhodiumudfældning. $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ er uopløselig i chlorform og i chlorform-stjerneeksplosionspolymeropløsning, hvilket således bekræfter chelatering.

Eksempel 7: Fremstilling af et produkt indeholdende Pd, der er chelateret til en stjerneeksplosionspolymer.

3,5 Gen PAMAM (estertermineret, initieret fra NH_3) (1,1 g, 0,24 mmol) blev opløst under omrøring i acetonitril (50 ml). Palladiumchlorid (0,24 g, 1,4 mmol) blev tilsat, og opløsningen opvarmedes til 70-75°C (vandbad) natten over. PdCl_2 blev optaget i stjerneeksplosionspolymeren. Efter fjernelse af opløsningsmidlet bekræftede NMR i CDCl_3 , at chelatering havde fundet sted. Fortynding af CDCl_3 -opløsningen med methanol og tilsætning af NaBH_4 resulterede i udfældning af palladiumet. Det chelaterede produkt (1,23 g) blev isoleret som en brun olie.

Eksempel 8: Påvisning af multipel chelatering af yttrium ved hjælp af en methylen-carboxylat-termineret andengenerations-stjerneeksplosionspolyethylenamin ved transchelatering af yttriumacetat.

Det methylen-carboxylat-terminerede stjerneeksplosionspolyethyleniminmateriale (0,46 g, 52,5% aktivt, tilbageværende natriumbromid, 0,18 mmol aktiv stjerneeksplosionsdendrimer) fra eksempel FF blev opløst i 4,5 ml deuteriumoxid. Den resulterende pH-værdi var 11,5-12. En opløsning af yttriumacetat blev fremstillet ved opløsning af yttriumchlorid (0,15 g, 0,5 mmol) og natriumacetat (0,41 g, 0,5 mmol) i 1,5 ml deuteriumoxid (2,9 mol yttrium pr. mol dendrimer). Aliquot mængder på 0,5 ml af yttriumacetatopløsningen blev sat til dendrimeropløsningen, og ^{13}C NMR-spektrene registreredes ved 75,5 MHz.

^{13}C NMR spektret for yttriumacetat viser to resonanser, 184,7 ppm for carboxylcarbonatomet og 23,7 ppm for methylcarbonatomet, sammenlignet med 182,1 og 14,1 ppm for natriumacetat, og 177,7 og 20,7 ppm for eddikesyre (Sadtlér ^{13}C NMR-standard-spektre). Måling af positionerne for disse bånd viser chelateringsgraden med stjerneeksplosionsdendrimeren. Det mest informative signal for stjerneeksplosionsdendrimeren, som er tegn på chelatering, er $\alpha\text{-CH}_2$ (tilhørende den i chelatering

involverede methylenecarboxylatgruppe), som forekommer ved 58,4 ppm i den uchelaterede dendrimer, og 63,8 ppm i den chelaterede dendrimer. Efter chelatering med yttrium forkortes rotationsgitterrelaksationstiderne for α -CH₂ som forventet fra 5 0,42 $\pm$ 0,01s til 0,14 $\pm$ 0,01s, hvilket er tegn på chelatering.

Efter tilsætning af 0,5 ml af yttriumacetatopløsningen til stjerneeksplosionsdendrimeren viste alt yttrium sig at blive chelateret af dendrimeren, hvilket blev bekræftet af signaler- 10 ne for acetatet, som er signalet for natriumacetat. Den samme iagttagelse blev gjort ved tilsætning af en anden 0,5 ml aliquot mængde af yttriumacetatopløsningen. Efter tilsætning af en tredje aliquot mængde yttriumacetat viste ikke alt yttriumet sig at blive optaget som stjerneeksplosionschelatat, og acetat-carboxylresonansen viste sig at skifte til 183,8 ppm, 15 hvilket viser, at noget af yttriumet var blevet forbundet med acetatet. Det integrerede areal af de chelaterede-CH₂-grupper på dendrimeren steg, hvilket viser, at noget af det tredje molækvivalent tilsat yttrium i virkeligheden var blevet chelateret med dendrimeren. Disse resultater viser, at dendrimeren 20 kan chelatere fra 2-3 yttriumioner pr. dendrimermolekyle.

Eksempel 9: Påvisning af multipel chelatering af yttrium ved hjælp af en methylenecarboxylattertermineret andengenerations- 25 stjerneeksplosionspolyamidoamin ved hjælp af tranchelatering fra yttriumacetat.

De samme eksperimentelle metoder blev benyttet ved denne undersøgelse som blev benyttet til eksempel 8. Det methylen-carboxylatterterminerede stjerneeksplosionspolyamidaminmateriale 30 (0,40 g, 62,5% aktivt, tilbageværende natriumbromid, 0,12 mmol) blev opløst i 4-5 ml deuteriumoxid. Den resulterende pH-værdi var 11,5-12, som blev sænket til 9,4 med 6N HCl før forsøget. En opløsning af yttriumacetat blev fremstillet ved opløsning af yttriumchlorid (0,1125 g, 0,37 mmol) og natriumacetat (0,0915 g, 1,1 mmol) i 1,5 ml deuteriumoxid, således at 35 hver 0,5 ml af opløsningen indeholder 1 molækvivalent metal.

De første to molækvivalenter tilsat yttriumacetat blev fuldt ud chelateret af stjerneeksplosionspolyamidoaminen. Ved tilsætning af et tredje molækvivalent yttrium fandt udfældning af produktet sted, og ingen NMR-data kunne derfor opnås. Signalerne, som gav det meste information om chelatering ved hjælp af stjerneeksplosionsdendrimeren, var signaler fra de to carbonatomer stødende op til det chelaterende nitrogen. De kemiske skift af disse carbonatomer i den ikke-chelaterede dendrimer forekom ved 59,1 ppm for α -CH₂-gruppen og ved 53,7 ppm for det første methylenecarbonatom i grundskelettet. Efter chelatering blev disse to resonanser iagttaget at skifte nedefter til henholdsvis 60,8 og 55,1 ppm. Trans-chelateringen viser, at to metalioner let kan chelateres pr. dendrimermolekyle, men at produktet fælder ud af opløsning efter chelatering af en vis ukendt brøkdel af et tredje molækvivalent.

Eksempel 10: Påvisning af multipel chelatering af ⁹⁰Y ved hjælp af en methylenecarboxylattermineret andengenerations-stjerneeksplosionspolyethylenimin.

Standardopløsning af yttriumchlorid (3×10^{-2} M tilsat ikke-bærertiltsat ⁹⁰Y) og methylenecarboxylattermineret andengenerations-stjerneeksplosionspolyethylenimin (6×10^{-2} M) blev fremstillet. Disse blev omsat sammen ved forskellige metal: stjerneeksplosionspolymerforhold i HEPES-puffer. Kompleksudbyttet blev bestemt ved hjælp af ionbytningskromatografi under anvendelse af "Sephadex" G50-ionbytterperler, idet der blev elueret med 10% NaCl:NH₄OH, 4:1, ved pH 10. Ikke-kompleksdannet metal fjernes på søjlen, idet kompleksdannet metal elueres. Udbytter opnåedes ved sammenligning af den eluerede radioaktivitet med radioaktiviteten på søjlen under anvendelse af en tæller med prøvekanal.

Tabel V

Chelatering af 2,5 Gen. PEI-acetat med ^{90}Y

	Vol. Y+3	Vol. PEI	Vol. HEPES	M:L teore- tisk	% kom- pleks	M:L, fundet
5	5	30	370	0,1	110	0,1
	10	30	360	0,2	101	0,2
	20	30	350	0,4	95	0,4
10	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
	180	30	180	3,0	94	2,8
15	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

20 Alle volumener i tabel V er anført i mikroliter.

Indenfor forsøgenes nøjagtighed viser disse resultater, at det 2,5 Gen. stjerneeksplosions-PEI-acetat kan chelatere mellem 2 og 3 metaller pr. polymer under opnåelse af et opløseligt kom-
 25 plexs.

Eksempel 11: Konjugering af 4-isothiocyanatophenyl-methylen-carboxylattermineret tredjegerations-stjerneeksplosionspoly-ethylenimin med IgG monoklonalt antistof.

30

Isothiocyanatet, 10 mg (50 μmol), fra eksempel DD blev opløst i 500 μl 3 mM indiumchlorid, som var blevet tilsat radioaktivt indium-111-chlorid, og pH-værdien blev indstillet til 9 med 660 μl 1N NaOH. Aliquot mængder af helt monoklonalt antistof
 35 IgG CC-46 blev derpå blandet med aliquot mængder af den chelaterede stjerneeksplosionspolymer. Blandingen blev rystet og derpå henstillet i 18 timer. Blandingerne blev derpå analyseret ved hjælp af HPLC (søjle DuPont "Zorbax Biosphere" GF-250;

elueringsmiddel 0,25M natriumacetat, pH 6) og en UV-detektor ved 254 nm samt en radioaktivitetsdetektor. Resultaterne er vist i tabel VI.

5

Tabel VI

Stjerneeksplosions-IgG-konjugater

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
10 IgG-opløsning (μl)	20	20	20	20
Opløsning af chelateret	5	20	50	100
stjerneeksplosionspolymer (μl)				
% radioaktivitet på IgG	6	5	5	3
% konjugeret IgG	2	7	17	22

15

Eksempel 12: Konjugering af 4-isothiocyanatophenyl-methylen-carboxylattermineret tredjegenerations-stjerneeksplosionspolyethylenimin med IgG monoklonalt antistof.

20 Isothiocyanatet fra eksempel DD, 4 mg (20 μmol) blev blandet med 200 μl 3 mM indiumchlorid (60 μmol). En 20 μl aliquot mængde af opløsningen blev derpå tilsat radioaktivt indium-111-chlorid, og pH-værdien blev indstillet til 9 ved tilsætning af 30 μl 1N NaOH og 10 μl 0,1N HCl. Indiumchelatatet blev blandet

25 med 150 μl CC-49 helt antistof IgG, 10 mg/ml i 50 mM HEPES-puffer ved pH 9,5. Efter 18 timer ved stuetemperatur blev antistoffet udvundet ved hjælp af præparativ HPLC (søjle DuPont "Zorbax Biosphere" GF 250; elueringsmiddel 0,25 M natriumacetat, pH 6) og en UV-detektor ved 254 nm samt en radioaktivitetdetektor. Det udvundne antistof blev koncentreret på en

30 "Amicon"-membran og udvekslet i PBS-puffer (phosphatpufferet saltopløsning, pH 7,4, som indeholder 0,12 M NaCl, 2,7 mM KCl og 10,0 mM phosphat). Det udvundne antistof havde en specifik aktivitet på ca. 0,5 μci/100μg.

35

Eksempel 13: Lokalisering in vivo af ^{111}In -mærket stjerneeksplosions-antistofkonjugat.

Anvendeligheden af det ifølge eksempel 12 fremstillede mærkede stjerneeksplosions-antistofkonjugat blev demonstreret ved måling af materialets optagelse i et humant tumor-fremmedtransplantat i en athymisk mus. Athymiske hunmus blev subkuttant podet med den humane colon-carcinomacellelinie LS-174T (ca. 4×10^6 celler/dyr). Ca. to uger efter podning blev hvert dyr injiceret via halevenen. Musene blev dræbt efter 17 og 48 timer (5 dyr på hvert tidspunkt), tumoren og udvalgt væv blev fjernet og vejjet, og radioaktivitet blev målt i en gammatæller. Efter 17 timer havde 13,5% af den injicerede dosis pr. gram væv samlet sig ved tumoren. Efter 48 timer havde 21,6% af den injicerede dosis pr. gram væv samlet sig ved tumoren.

P a t e n t k r a v .

- 5 1. Stjerneeksplosionskonjugat, k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter mindst en stjerneeksplosionspolymer i forbindelse med mindst en enhed af mindst et båret farmaceutisk materiale.
- 10 2. Konjugat ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at stjerneeksplosionspolymeren er en stjerneeksplosionsdendrimer.
- 15 3. Konjugat ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at mindst et af de bærede farmaceutiske materialer er et lægemiddel, et radionuklid, et chelateringsmiddel, et chelateret metal, et toxin, et antistof, et antistoffragment, et antigen, en signalfrembringer, en signalreflektor eller en signalabsorber.
- 20 4. Konjugat ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at der findes mindst to forskellige bærede materialer, hvoraf mindst det ene er en målretter, og mindst et af dem er et bioaktivt stof.
- 25 5. Konjugat ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at målretteren er en entitet, der er specifik for en eller flere målreceptorer, og at det bioaktive stof er et radionuklid, et lægemiddel eller et toxin.
- 30 6. Konjugat ifølge krav 4 eller 5, k e n d e t e g n e t ved, at målretteren er et polyklonalt antistof eller et fragment deraf.
- 35 7. Konjugat ifølge krav 4 eller 5, k e n d e t e g n e t ved, at målretteren er et monoklonalt antistof eller et fragment deraf.
8. Konjugat ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at dendrimeren indeholder diskontinuiteter.

9. Stjerneeksplosionskonjugat ifølge krav 1 med formlen:

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

5 k e n d e t e g n e t ved, at hvert P betegner en dendrimer, X betegner et helt tal, der er 1 eller mere end 1, hvert M betegner en enhed af et båret farmaceutisk materiale, hvilket bærede farmaceutiske materiale kan være det samme bærede farmaceutiske materiale eller et forskelligt båret farmaceutisk
10 materiale, y betegner et helt tal, der er 1 eller mere end 1, og * angiver, at det bærede farmaceutiske materiale er forbundet med dendrimeren.

10. Konjugat ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at M
15 er et lægemiddel, et radionuklid, et chelate-ringsmiddel, et chelateret metal, et toxin, et antistof, et antistoffragment, et antigen, en signalfrembringer, en signal-reflektor eller en signalabsorber.

20 11. Konjugat ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at $x=1$, og at $y=2$ eller mere.

12. Stjerneeksplosionskonjugat ifølge krav 9, k e n d e -
t e g n e t ved, at det molære forhold mellem ethvert ionisk
25 M og P er 0,1-1.000:1.

13. Stjerneeksplosionskonjugat ifølge krav 9, k e n d e -
t e g n e t ved, at vægtforholdet mellem ethvert lægemiddel
30 eller toxin M og P er 0,1-5:1.

14. Fremgangsmåde til fremstilling af et stjerneeksplosionskonjugat ifølge krav 9 med formlen

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

35 hvori hvert P betegner en dendrimer, x betegner et helt tal, der er 1 eller mere end 1, hvert M betegner en enhed af et båret farmaceutisk materiale, idet nævnte bærede farmaceutiske materiale kan være det samme bærede farmaceutiske materiale

eller et forskelligt bæret farmaceutisk materiale, y betegner et helt tal, der er 1 eller større end 1, og * angiver, at det bærede farmaceutiske materiale er forbundet med dendrimeren, k e n d e t e g n e t ved, at P omsættes med M, sædvanligvis i et egnet opløsningsmiddel, ved en temperatur, der letter as-
5 socieringen af det bærede materiale (M) med stjerneeksplosionsdendrimeren (P).

15. Fremgangsmåde ifølge krav 14, k e n d e t e g n e t ved, at det egnede opløsningsmiddel er vand, methanol, ethanol, chloroform, acetonitril, toluen, dimethylsulfoxid eller dime-
10 thylformamid.

16. Stjerneeksplosionskonjugat ifølge ethvert af kravene 1-11, k e n d e t e g n e t ved, at også mindst et farmaceutisk acceptabelt fortyndingsmiddel eller mindst en farmaceutisk acceptabel bærer er til stede deri.

15 17. Stjerneeksplosionskonjugat ifølge krav 16, k e n d e t e g n e t ved, at også andre aktive bestanddele er til stede deri.

18. Stjerneeksplosionskonjugat ifølge ethvert af kravene 1-11, 16 og 17 til anvendelse som et diagnostisk middel.

19. Stjerneeksplosionskonjugat ifølge ethvert af kravene 1-11, 16 og 17 til anvendelse som en farmaceutisk bærer.

20. Fremgangsmåde til fremstilling af et stjerneeksplosions-konjugat med formlen

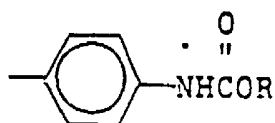
$$[(T)_e - (C')_f]_g * (P)_x * [(C'')_h - (M)_y]_k \quad (III)$$

- 5 hvori hver C' betegner den samme eller forskellige forbindelsesgrupper,
 C'' betegner den samme eller forskellige forbindelsesgrupper,
 g og k hver individuelt betegner et helt tal, der er 1 eller større end 1,
 f og h hver individuelt betegner et helt tal, der 0 eller større end 0,
 10 - angiver en covalent binding i tilfælde, hvor en forbindelsesgruppe er til stede,
 hvert P betegner en dendrimer,
 x betegner et helt tal, der er 1 eller større end 1,
 T betegner en målretter,
 hvert M betegner en enhed (f.eks. et molekyle, et atom, en ion
 15 og/eller en anden grundenhed) af et båret farmaceutisk materiale, hvilket bærede farmaceutiske materiale kan være det samme bærede farmaceutiske materiale eller et forskelligt båret materiale, idet det bærede farmaceutiske materiale fortrinsvis er et bioaktivt stof,
 y betegner et helt tal, der er 1 eller større end 1 og
 * angiver, at det bærede farmaceutiske materiale er forbundet med dendrimeren, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter omsætning af P, som har reaktive molekyldele, med en forbindelsesgruppe, såsom en anilindel, der kan have NH₂-gruppen beskyttet.

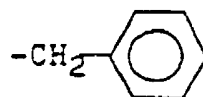
21. Fremgangsmåde til fremstilling af et stjerneeksplosions-
konjugat som defineret i krav 1, k e n d e t e g n e t ved,
at den omfatter omsætning af P, der har reaktive molekyldele,
med en forbindelsesgruppe, såsom en anilindel, der kan have
5 NH₂-gruppen beskyttet.

22. Fremgangsmåde ifølge krav 21, k e n d e t e g n e t ved,
at beskyttelsesgruppen har formen

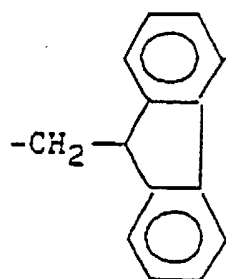
10



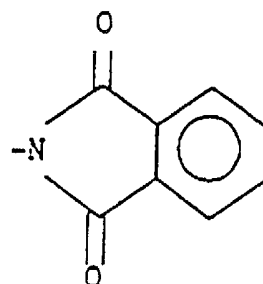
hvor i R er -C(CH₃)₃,



15



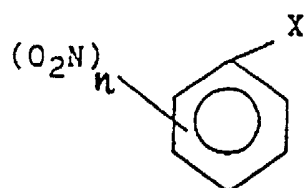
eller



20

23. Fremgangsmåde ifølge krav 21 k e n d e t e g n e t ved,
at P også har en forbindelsesgruppe (greb) tilknyttet med
formlen

25



30

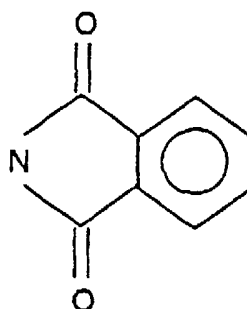
hvor i n er 1 eller 2, og X er F, Cl, Br, I, SO₂Cl, og når n er
1, NO₂-gruppen findes i para-stillingen.

35

24. Fremgangsmåde ifølge krav 23, k e n d e t e g n e t ved,
at forbindelsesgruppen er 4-fluornitrobenzen.

25. Fremgangsmåde til fremstilling af et stjerneeksplosions-
konjugat som defineret i krav 1, k e n d e t e g n e t ved,

at den omfatter omsætning af P, der har reaktive dele, med en anilindel, som kan have NH₂-gruppen beskyttet ved hjælp af et N-phthalimid med formlen

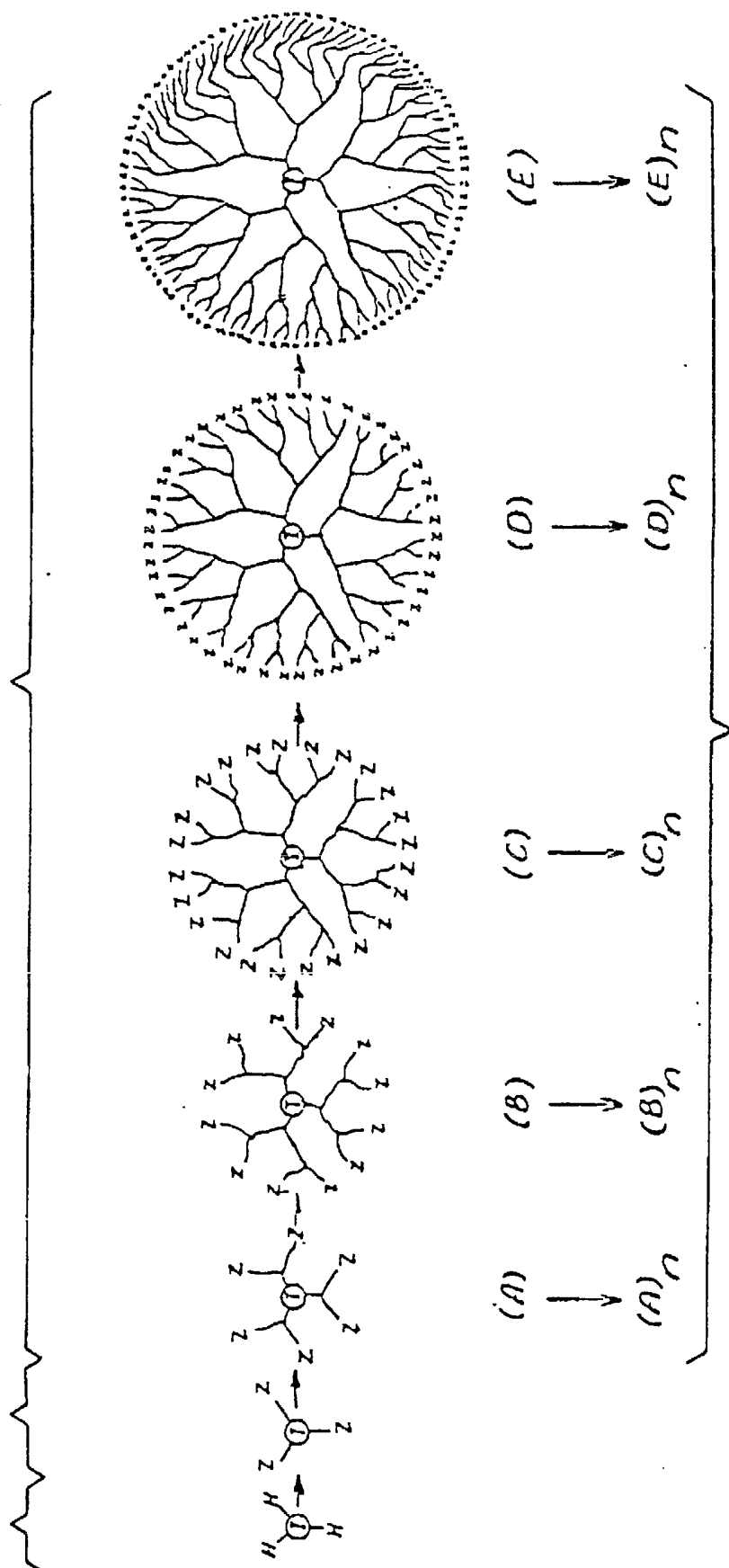


26. Fremgangsmåde til fremstilling af et stjerneeksplosionskonjugat som defineret i krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter omsætning af P, som har reaktive dele, med en anilindel, som kan have NH₂-gruppen beskyttet ved hjælp af en hvilken som helst til aminer benyttet beskyttelsesgruppe, der er indifferent under de til stjerneeksplosionssyntese benyttede betingelser.

27. Fremgangsmåde til fremstilling af en stjerneeksplosionspolyethylenimin, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter omsætning af et stjerneeksplosionspolyethyleniminmethansulfonamid med saltsyre.

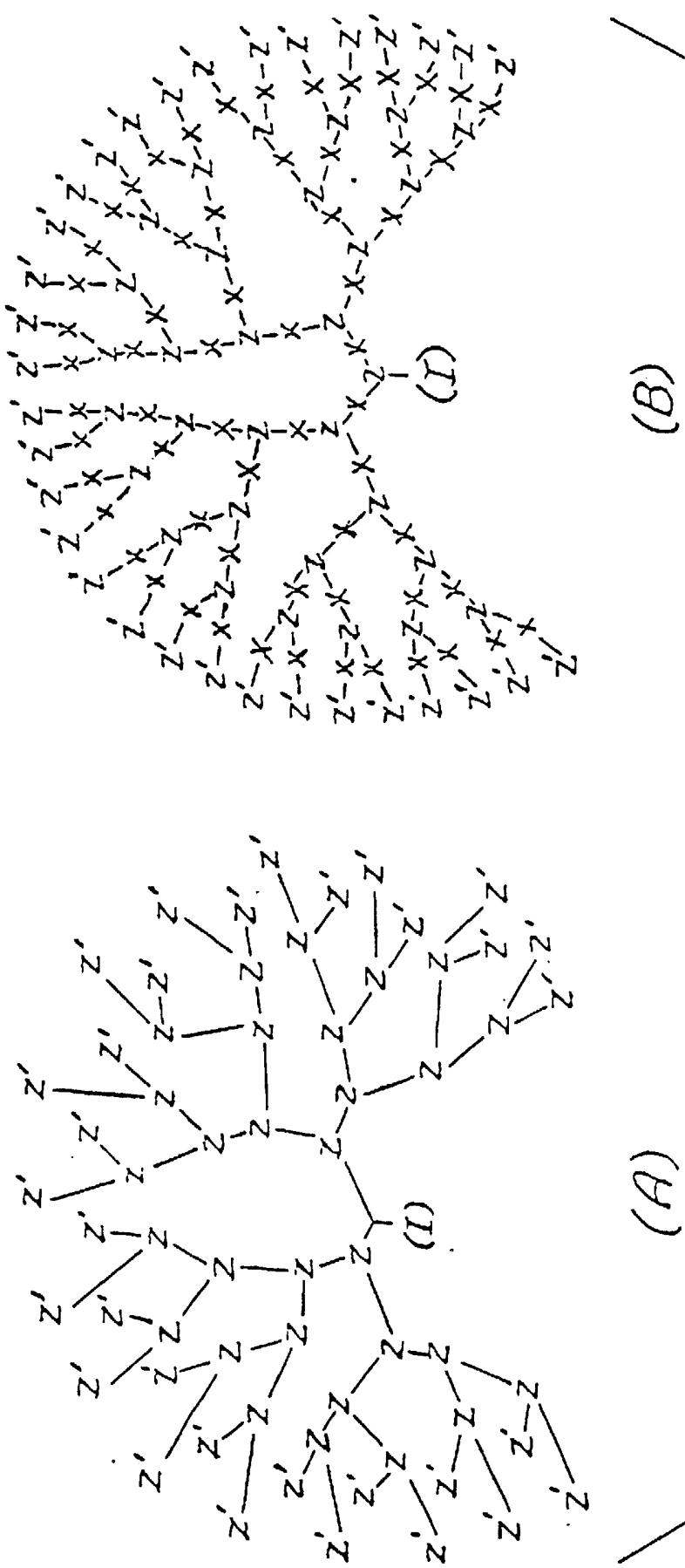
28. Fremgangsmåde til rensning af en stjerneeksplosionsdendrimer, hvori et opløsningsmiddel er til stede, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter fjernelse af opløsningsmidlet ved hjælp af ultrafiltrering under anvendelse af en membran.

29. . Fremgangsmåde til fremstilling af et stjerneeksplosionskonjugat ifølge krav 1, ved hvilken stjerneeksplosionspolymeren er en stjerneeksplosionsdendrimer, og det bærede materiale er et lanthanid, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter chelatering af lanthanidet med et stjerneeksplosionspolyethyleniminacetat.



F. S. 1/11

2/5/84



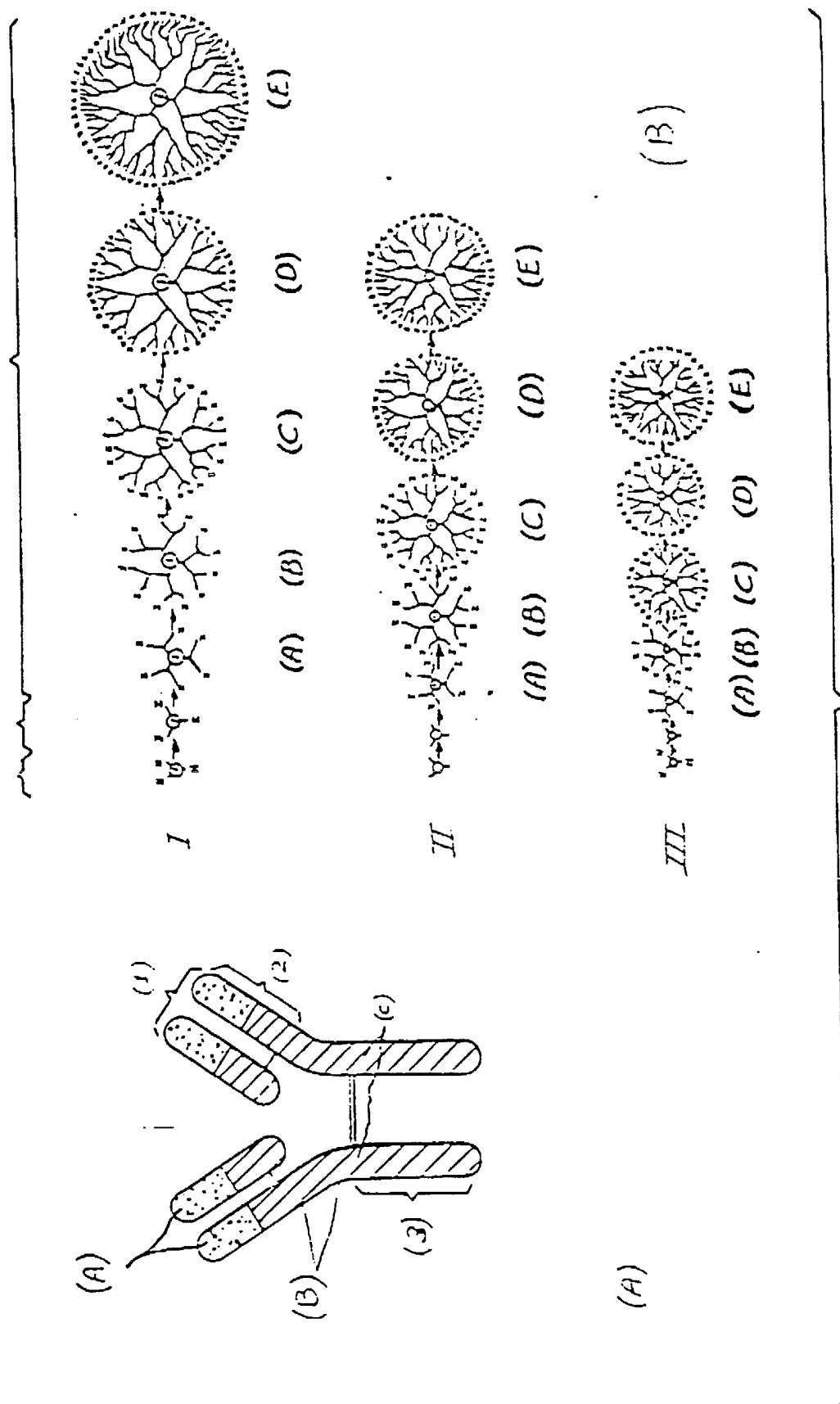


FIG. 3

FIG. 4

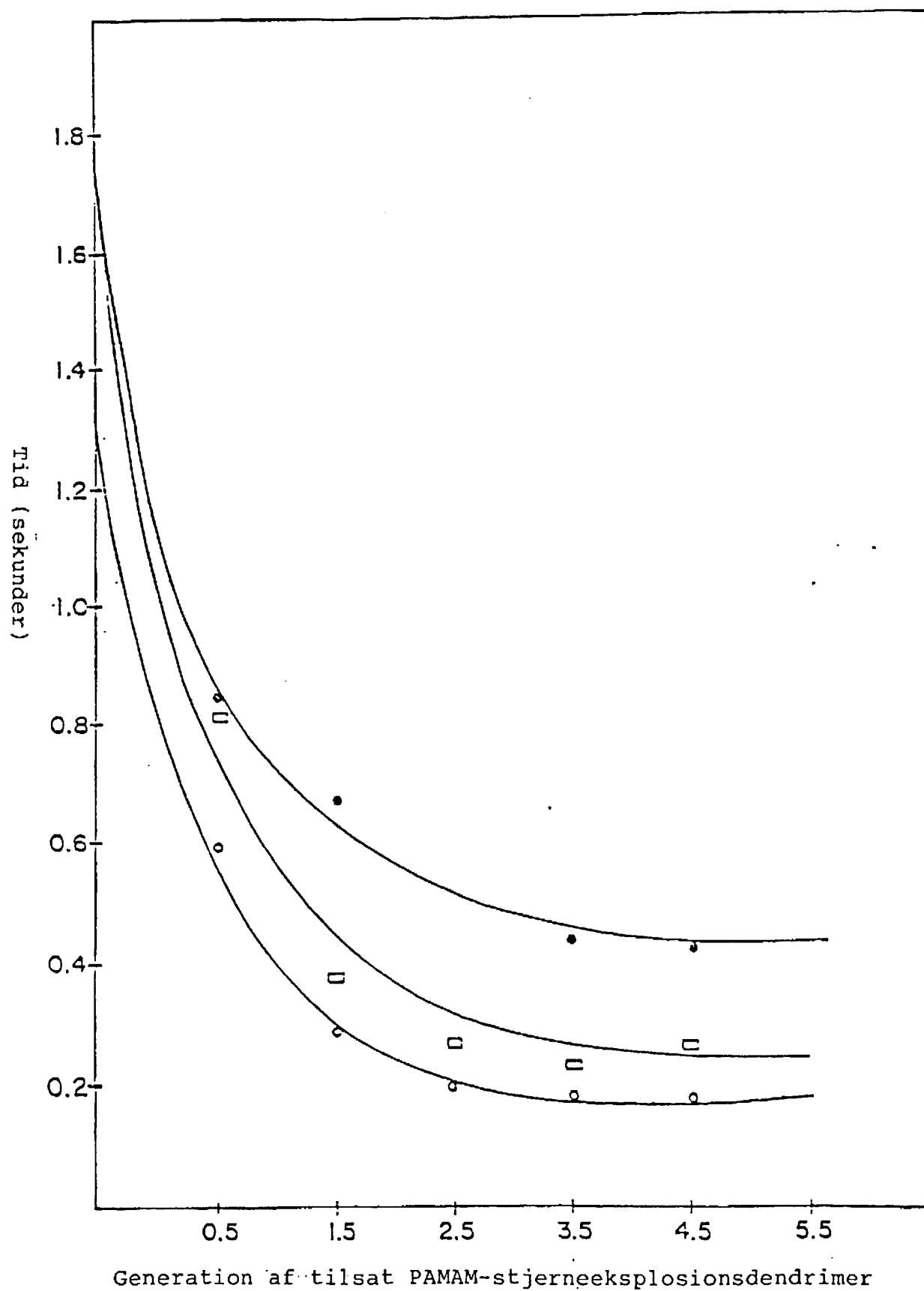


FIG. 5

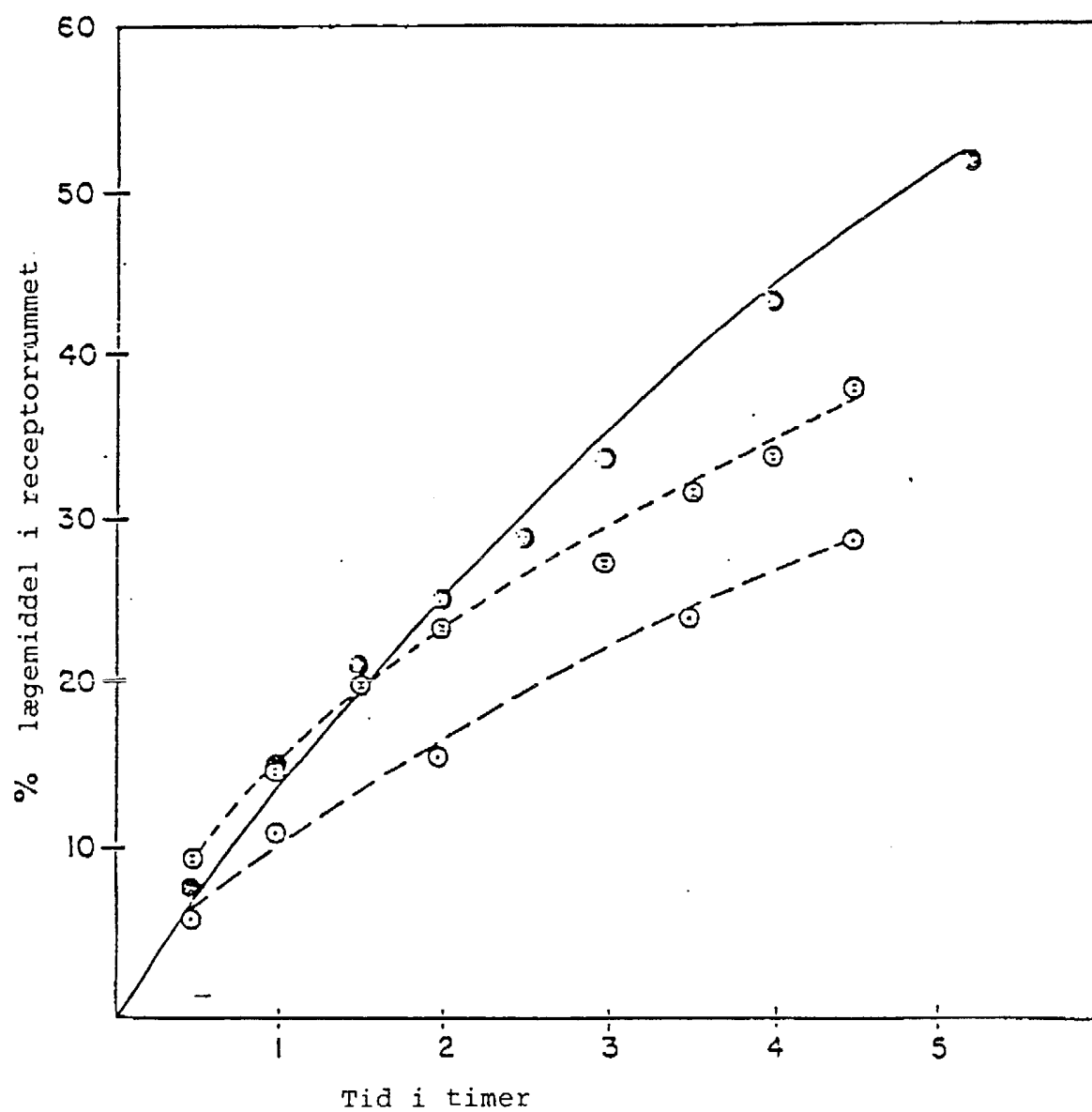


FIG. 6

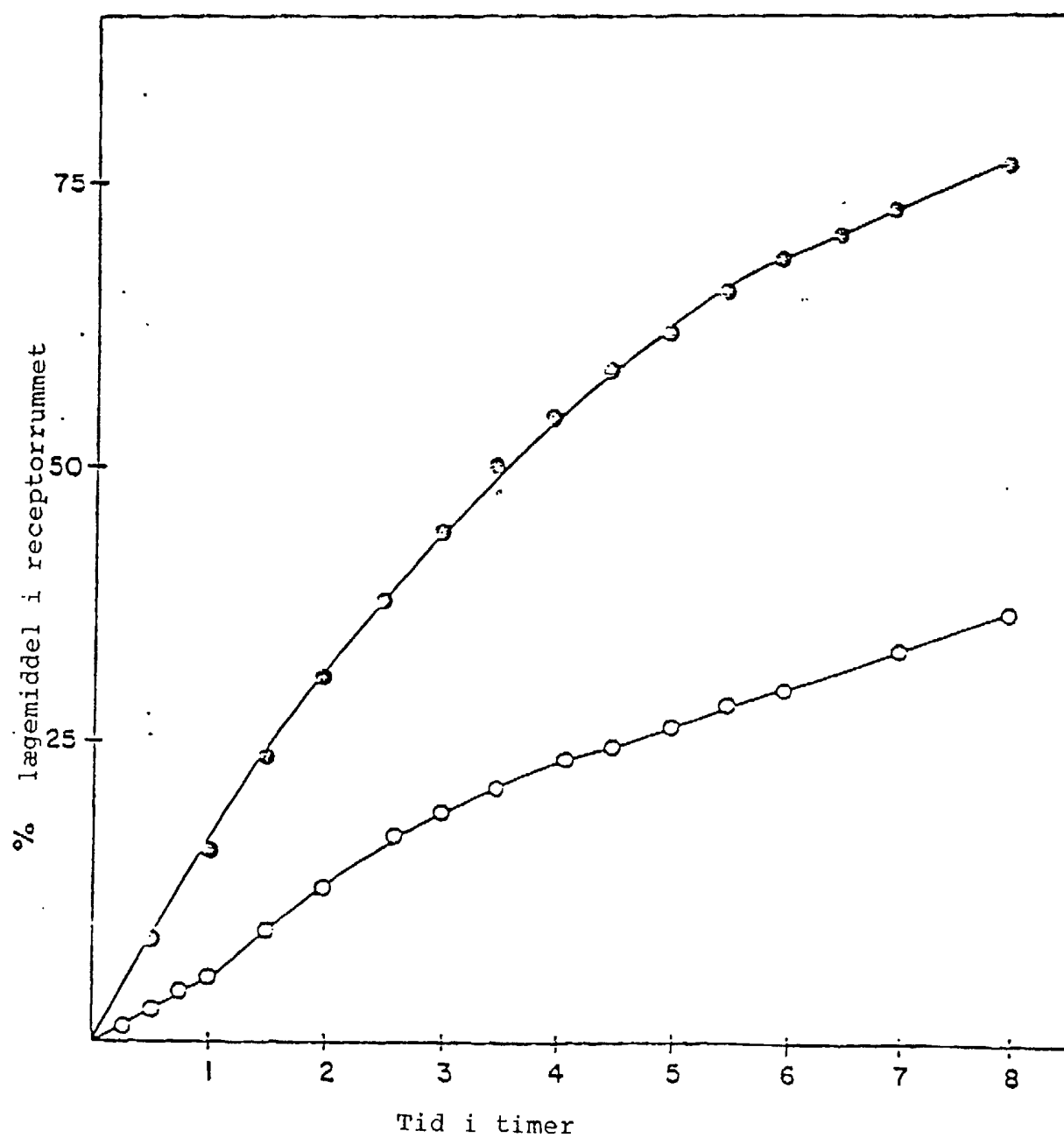


FIG. 7

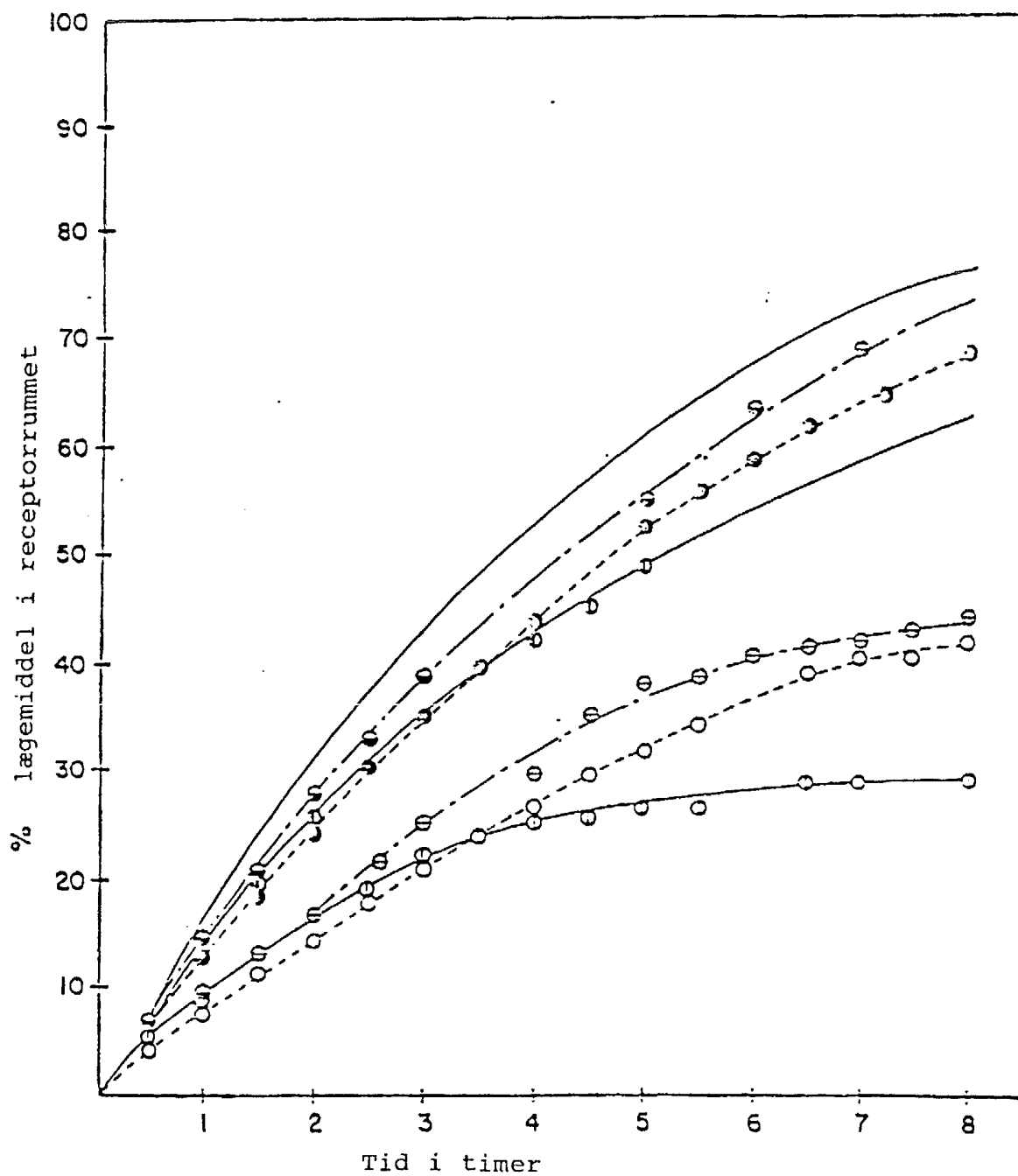


FIG. 8

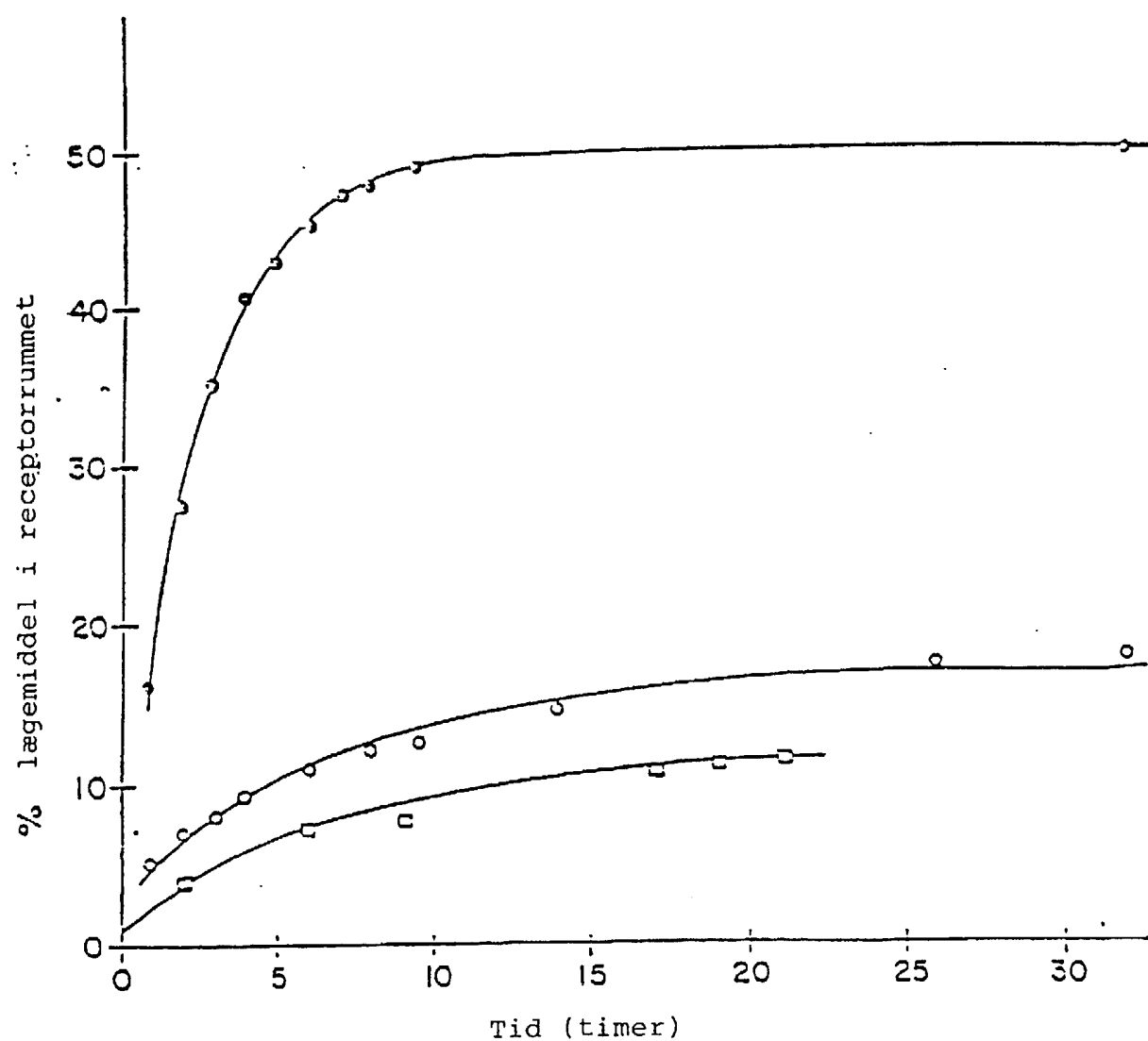


FIG. 9

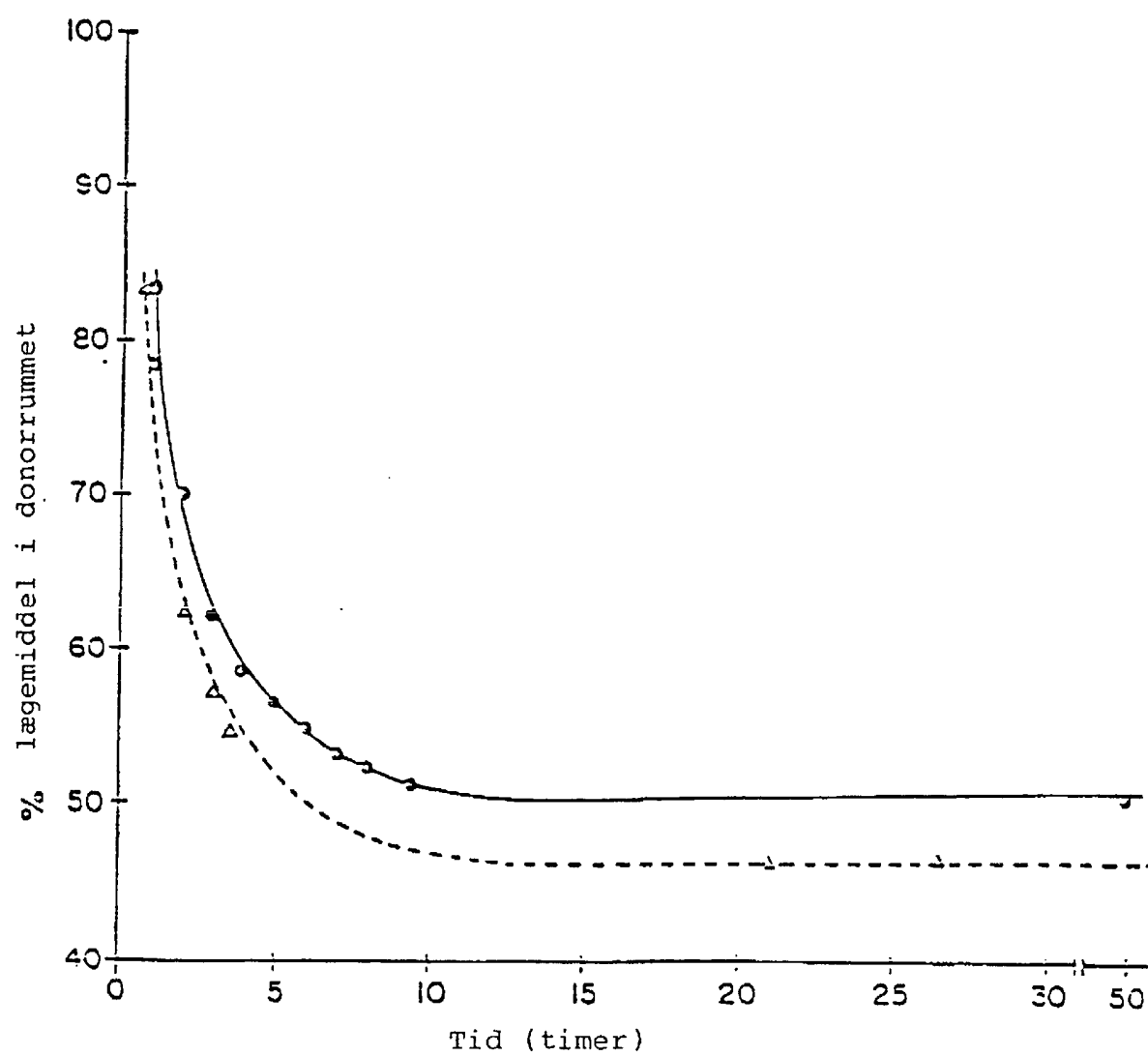


FIG. 10

