(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 33 569 T2** 2006.01.05

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 699 079 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 33 569.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/03045**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 914 006.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/024221**
(86) PCT-Anmeldetag: **07.03.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **14.09.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.03.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **29.09.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.01.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 47/48*** (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

207494	**07.03.1994**	**US**
316536	**30.09.1994**	**US**

(73) Patentinhaber:
Dendritic Nanotechnologies, Inc., Mt. Pleasant, Mich., US; The Regents of the University of Michigan, Ann Arbor, Mich., US

(74) Vertreter:
Weickmann & Weickmann, 81679 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:
TOMALIA, Donald A., Midland, US; BAKER, James R., Ann Arbor, US; BIELINSKA, Anna U., Ypsilanti, US; BROTHERS, II, Herbert M., Midland, US; CHENG, Roberta C., Midland, US; FAZIO, Michael J., Midland, US; HEDSTRAND, David M., Midland, US; JOHNSON, Jennifer A., Livonia, US; KAPLAN, Donald A., Marina Del Rey, US; KLAKAMP, Scott L., Russell, US; KRUPER, Jr, William J., Sanford, US; KUKOWSKA-LATALLO, Jolanta, Ann Arbor, US; MAXON, Bartley D., Saint Louis, US; PIEHLER, Lars T., Midland, US; TOMLINSON, Ian A., Midland, US; WILSON, Larry R., Beaverton, US; YIN, Rui, Mount Pleasant, US

(54) Bezeichnung: **BIOAKTIVE UND/ODER GEZIELTE DENDRIMERE-KONJUGATE ENTHALTEND GENETISCHES MATERIAL**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von dichten Sternpolymeren als Träger für landwirtschaftliche, pharmazeutische und andere Materialien, insbesondere für solche Materialien, die bioaktiv und/oder zielsteuernd sind. Ebenfalls umfasst sind dendritische Polymere als Träger für biologische Response Modifier, die ebenfalls zielsteuernd sein können.

Hintergrund der Erfindung

[0002] In den letzten Jahren wurden Polymere entwickelt, die als dichte Sternpolymere oder STARBURST-™-Polymere (eine Handelsmarke von Dendritech Inc.) bezeichnet werden. Es wurde gefunden, dass die Größe, Form und Eigenschaften dieser dichten Sternpolymere für spezialisierte Endverbraucher molekular maßgeschneidert werden können. Dichte Sternpolymere weisen entscheidende Vorteile auf, wodurch eine Möglichkeit bereitgestellt werden kann für die Zufuhr hoher Konzentrationen an getragenem Material pro Polymereinheit, für eine kontrollierte Zufuhr, eine zielgerichtete Zufuhr und/oder eine Zufuhr oder Verwendung multipler Spezies.

[0003] WO 88/01178 offenbart sternförmige Konjugate, welche mindestens ein sternförmiges Polymer umfassen, das mit mindestens einer Einheit mindestens eines getragenen pharmazeutischen Materials assoziiert ist. Das getragene pharmazeutische Material ist zum Beispiel ausgewählt aus Antikörpern und Antikörperfragmenten.

[0004] WO 88/01180 offenbart ein sternförmiges Konjugat, das mindestens ein sternförmiges Polymer umfasst, welches mit mindestens einer Einheit mindestens eines getragenen Materials assoziiert ist, bei welchem es sich zum Beispiel um einen Signalgenerator, Signalreflektor oder Signalabsorber handelt.

[0005] WO 88/01179 betrifft sternförmige Konjugate, die mindestens ein sternförmiges Polymer umfassen, das mit mindestens einer Einheit mindestens eines getragenen landwirtschaftlichen Materials, wie beispielsweise eines Pestizids, Radionukleotids oder Toxins assoziiert ist.

[0006] Wiener, E. C. et al. offenbaren in Magn. Reson. Met. (1994) 31 (1–8) Metallchelate auf Dendrimerbasis als Kontrastmittel für Magnetresonanz-Tomographie. Die dort offenbarten Reagenzien sind aus der Polyamidoamin-Form sternförmiger Dendrimere, einem Metallchelatierungsmittel (DTPA) und Gd (III) gebildet.

[0007] Hensler, J. et al. offenbaren in Bioconjugate Chem., 4, 1993, Seiten 372–379 ein Verfahren zur Transfektion von Zellen unter Verwendung eines Polyamidoamin-Kaskadenpolymers, das mit einer Plasmid-DNA konjugiert ist. Das Polyamidoamin-Kaskadenpolymer ist bevorzugt kovalent an GALA, ein wasserlösliches Membrandestabilisierendes Peptid, gekoppelt.

[0008] In Bioconjugate Chem. 5, (1), 1994, Seiten 58–66 offenbaren Barth, R. F. et al. borylierte sternförmige Immunokonjugate aus Dendrimer und monoklonalem Antikörper und deren Bewertung als potenzielles Abgabesystem für die Neutroneneinfang-Therapie.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] In einem Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein dichtes Sternpolymer-Konjugat, wie in Anspruch 1 beansprucht.

[0010] In einem besonderen Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein dichtes Sternpolymer-Konjugat der Formel (II)

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

wie in Anspruch 7 definiert.

[0011] In einem spezielleren Aspekt ist die vorliegende Erfindung auf ein dichtes Sternpolymer-Konjugat der Formel (III) gerichtet,

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

wie in Anspruch 8 definiert.

[0012] In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung, die ein dendritisches Polymer umfasst, das mit mindestens einer Einheit von genetischem Material komplexiert ist, wie in Anspruch 12 definiert.

[0013] In einem weiteren Aspekt umfasst die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung eines Komplexes aus dendritischem Polymer und genetischem Material, wie in Anspruch 51 angegeben.

[0014] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist das Verfahren wie in Anspruch 54 beansprucht.

[0015] In einem noch weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Bildung eines Komplexes aus genetischem Material und dendritischem Polymer, wie in Anspruch 57 definiert, insbesondere wie in Anspruch 73 definiert.

[0016] In einem noch weiteren Aspekt umfasst die vorliegende Erfindung ein Verfahren, um Zelltransfektion und Bioverfügbarkeit von genetischem Material zu bewerkstelligen, gemäß Anspruch 84.

[0017] In einem noch weiteren Aspekt umfasst die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur effektiven Zelltransfektion und Bioverfügbarkeit von genetischem Material gemäß Anspruch 86.

[0018] In einem Aspekt ist die vorliegende Erfindung somit auf Polymerkonjugat-Materialien, die dichte Sternpolymere umfassen, welche mit gewünschten genetischen Materialien (im Folgenden werden diese Polymerkonjugate hierin häufig als „dichte Sternpolymer-Konjugate" oder „dichte Sternkonjugate" oder „Konjugate" bezeichnet), auf ein Verfahren zur Herstellung dieser Konjugate, Zusammensetzungen, welche die Konjugate enthalten, und auf Verfahren zur Verwendung der Konjugate und Zusammensetzungen gerichtet, wie in den Ansprüchen 1–87 definiert. Das dichte Sternpolymer ist mit mindestens einem Zielsteuerungsmittel und mindestens einer Einheit eines getragenen Materials, bei dem es sich um ein genetisches Material handelt, assoziiert. Solche Konjugate können für die angedachte Verwendung, z.B. eine pharmazeutische oder landwirtschaftliche Verwendung, mit annehmbaren Trägern, Verdünnungsmitteln oder Hilfsstoffen, formuliert werden.

[0019] Die Konjugate der vorliegenden Erfindung sind für die Verwendung in zahlreichen Anwendungen geeignet, bei denen eine spezifische Abgabe benötigt wird, und sie sind insbesondere für die Abgabe biologischer Wirkstoffe, bei denen es sich um genetische Materialien handelt, geeignet. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die dichten Sternkonjugate aus einem oder mehreren dichten Sternpolymeren zusammengesetzt, die mit einem oder mehreren bioaktiven Mitteln assoziiert sind.

[0020] In einem Aspekt der Erfindung wird ein dichtes Sternpolymer-Konjugat zur Abgabe eines getragenen bioaktiven Mittels, bei dem es sich um ein genetisches Material handelt, verwendet, wobei es mindestens ein dichtes Sternpolymer aufweist, das mit mindestens einer Einheit mindestens eines getragenen bioaktiven Mittels assoziiert ist, wobei das Polymer (a) einen Initiatorkern, (b) mindestens zwei konzentrische dendritische Schichten („Generationen") mit symmetrischen Verzweigungsstellen aufweist, wobei sich die Schichten radial in geometrisch fortschreitender Weise von einer Kernverzweigung aus erstrecken, wobei das Verhältnis von terminalen Gruppen zu Kernverzweigungen) mindestens 4:1 ist und (c) eine äußere Oberfläche mit terminaler Funktionalität. Eine weitere Möglichkeit, um diese dichten Sternpolymere zu definieren, ist als ein dendritisches Polymerkonjugat, das die folgenden Komponenten aufweist:

(i) ein dendritisches Polymer mit

(a) einem Ausgangskern,

(b) einer inneren Schicht von mindestens drei (3) Generationen, die aus radialsymmetrischen, sich wiederholenden Einheiten besteht, die mit dem Ausgangskern verbunden sind und

(c) einer äußeren Oberfläche, die aus terminalen funktionellen Atomen oder Gruppen von Atomen (terminalen funktionellen Gruppen) besteht, die mit der äußersten Generation verbunden sind, und

(ii) mindestens ein getragenes bioaktives Material, bei dem es sich um ein genetisches Material handelt, welches eng mit dem dendritischen Polymer verbunden ist.

[0021] Noch eine weitere Möglichkeit, um diese dichten Sternpolymere zu definieren, ist als eine Sorte von dendritischem Polymer, wobei das dendritische Polymer folgendes aufweist:

(i) eine regelmäßig verzweigte Struktur, die im Wesentlichen durch die folgende Formel (1) widergegeben

wird, die einen Kern (C) mit einer Anzahl (s) von Valenzen oder Funktionalitäten mit eins oder mehr besitzt, wobei mindestens eine der Valenzen des Kerns (C) mit einer Gruppe (B) über eine Gruppe (A) verbunden ist, wobei die Gruppe (B) mindestens zwei Funktionalitäten (r_1, r_2 ...) aufweist, nachdem sie an die Gruppe (A) gebunden ist, wobei die Einheit (AB) gebildet wird durch Binden der Gruppe (A) mit der Gruppe (B) unter Bildung einer Verzweigung, wobei die Verzweigungen (AB) sich über eine gewünschte Anzahl von Generationen (G) von mindestens drei wiederholen und die Funktionalität der Gruppe (B) jeder der letzten Verzweigungen (AB) durch mindestens zwei (r_G) Atome oder Gruppen von Atomen (X) blockiert ist:

Formel (1):

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

worin
jede Indexzahl von 1, 2 ... G-1 und G von r_1, r_2 ... r_{G-1} und r_G für die Nummer jeder Generation des wachsenden Asts (AB) steht, wobei der erste Ast oder Äste (AB) gezählt werden, welche an den Kern (C) als erste Generation gebunden sind, nämlich G = 1, wobei jedes von r_1, r_2 ... r_{G-1} und r_G die Anzahl der Funktionalitäten der Gruppe (B) des Asts (AB) der entsprechenden Generation bedeutet, wobei die Funktionalität geeignet ist zur Bindung mit einer Gruppe (A) eines anderen Asts (AB) der nächsten Generation,
s für eine ganze Zahl von mindestens 1 aber nicht größer als die Anzahl der Valenzen der Funktionalität des Kerns (C) steht,
jede der Gruppen (A) und (B) für jede Generation gleich oder unterschiedlich sein können, und X die Atome oder Gruppen von Atomen bedeutet, um die Funktionalität der funktionellen Gruppen (B) der letzten Äste (AB) zu blockieren, welche gleich oder unterschiedlich sein können.

[0022] Die Konjugate der vorliegenden Erfindung sind solche, bei denen ein dichtes Sternpolymer-Konjugat mindestens ein dichtes Sternpolymer umfasst, das mit mindestens einer Einheit mindestens eines biologischen Response Modifiers assoziiert ist. Diese biologischen Response Modifier sind genetische Materialien. Die Bezeichnung „genetisches Material", wie hierin verwendet, bedeutet Materialien auf Nukleotidbasis einschließlich ohne Begrenzung Plasmide, Phagen, Cosmide, Gene und Genfragmente (d.h. Exons, Introns), Desoxyribonukleinsäure (DNA) sowohl einzel- als auch doppelsträngig, Ribonukleinsäure (RNA), ribosomale RNA (rRNA), katalytische RNA (cRNA), small nuclear RNA (snRNA), messenger RNA (mRNA), transfer RNA (tRNA), DNA- und RNA-Oligonukleotide (sowohl einzel- als auch doppelsträngig) oder Oligomere und (antisense) Oligonukleotide, Proteinnukleinsäuren (PNA) und substituierte Nukleinsäureoligonukleotide. Genetisches Material kann komplexiert oder mit Protein gekoppelt sein. Die Bezeichnung genetisches Material soll auch „modifizierte Nukleotide" umfassen, wie im Folgenden ausführlicher beschrieben wird.

[0023] Das dichte Sternkonjugat bietet aufgrund der vorteilhaften Eigenschaften der dichten Sternpolymere entscheidende Vorteile gegenüber anderen Trägern, die im Stand der Technik bekannt sind. Dichte Sternpolymere sind eine bestimmte Art von dendritischem Polymer.

[0024] Ein „dendritisches Polymer" ist ein Polymer, das regelmäßige dendritische Verzweigungen aufweist, welches durch die aufeinanderfolgende oder generationsartige Addition von verzweigten Schichten auf oder von einem Kern gebildet ist. Die Bezeichnung dendritisches Polymer umfasst „Dendrimere", die durch einen Kern, mindestens eine innere verzweigte Schicht und eine oberflächliche verzweigte Schicht gekennzeichnet sind (siehe Petar R. Dvornic und Donald A. Tomalia in Chem. In Britain, 641–645, August 1994). Ein „Dendron" ist eine Dendrimerspezies mit Verzweigungen, die von einem zentralen Punkt ausgehen, der mit einem Kern entweder direkt oder über ein Verzweigungsmittel verbunden ist oder verbunden sein kann, um ein Dendrimer zu bilden. Viele Dendrimere umfassen zwei oder mehr Dendrone, die mit einem gemeinsamen Kern verbunden sind. Die Bezeichnung Dendrimer wird jedoch weithin verwendet, um ein einzelnes Dendron zu bezeichnen.

[0025] Dendritische Polymere beinhalten, sind jedoch nicht begrenzt auf symmetrisch und unsymmetrisch verzweigte Dendrimere, Kaskadenmoleküle, Arborole und dergleichen, obwohl die am meisten bevorzugten dendritischen Polymere dichte Sternpolymere sind. Die PAMAM-dichten Sterndendrimere, die hierin offenbart werden, sind insofern symmetrisch, als die Verzweigungsarme die gleiche Länge aufweisen. Die Verzweigung erfolgt an den Wasserstoffatomen einer terminalen NH_2-Gruppe an einem vorstehenden Generationsast. Die Dendrimere auf Lysinbasis sind insofern unsymmetrisch, als die Verzweigungsarme eine unterschiedliche Länge aufweisen. Eine Verzweigung tritt am Epsilon-Stickstoff des Lysinmoleküls auf, während eine weitere Verzweigung am Alpha-Stickstoffatom, das zu der reaktiven Carboxy-Gruppe benachbart ist, auftritt, die die Verzweigung an eine vorhergehende Generationsverzweigung bindet.

[0026] Obwohl sie nicht durch regelmäßige aufeinanderfolgende Addition verzweigter Schichten gebildet werden, können hyperverzweigte Polymere, z.B. hyperverzweigte Polyole, zu einem dendritischen Polymer äquivalent sein, wenn das Verzweigungsmuster einen Regelmäßigkeitsgrad aufweist, der dem eines Dendrimers nahekommt.

[0027] Dichte Sternpolymere weisen eine molekulare Architektur auf, die durch regelmäßige dendritische Verzweigung mit radialer Symmetrie, d.h. bezüglich des Verzweigungspunkts, gekennzeichnet sind. Diesen radialsymmetrischen Moleküle wird eine „dichte Sterntopologie" zugeschrieben. Diese Polymere werden auf eine Weise gebildet, durch die konzentrische dendritische Schichten rings um einen Initiatorkern bereitgestellt werden. Die dichte Sterntopologie wird durch die geordnete Anordnung von sich wiederholenden organischen Einheiten von konzentrischen, dendritischen Schichten rings um einen Initiatorkern erreicht; dies wird bewerkstelligt, indem auf eine geometrisch fortschreitende Weise über mehrere molekulare Generationen Multiplizität und Selbstreplikation (in jeder Schicht) eingesetzt wird. Die resultierenden hochfunktionalisierten Moleküle wurden aufgrund ihrer verzweigten (baumartigen) Struktur und auch ihrer oligomeren Natur als „Dendrimere" bezeichnet. Somit sind in der Bezeichnung dichtes Sternpolymer oder STARBURST™-Polymer die Bezeichnungen dichtes Sternoligomer und dichtes Sterndendrimer und STARBURST™-Dendrimer umfasst.

[0028] Topologische Polymere mit größen- und formkontrollierten Bereichen sind Dendrimere, die durch ihre reaktiven terminalen Gruppen miteinander assoziiert sind (wie zum Beispiel kovalent verbrückt oder durch andere Assoziierung wie hierin defininiert), die als dichte stern-"verbrückte" Dendrimere bezeichnet werden. Die Bezeichnung verbrücktes Dendrimer ist ebenfalls in der Bezeichnung „dichtes Sternpolymer" oder STARBURST™-Polymer enthalten. Wenn mehr als zwei dichte Sterndendrimere miteinander assoziiert sind, werden sie als „dichte Sternaggregate" oder „STARBURST™-Aggregate" bezeichnet und sind ebenfalls in der Bezeichnung „dichtes Sternpolymer" oder STARBURST™-Polymer umfasst.

[0029] Daher beinhalten dendritische Polymere verbrückte Dendrimere und Dendrimeraggregate. Dendritische Polymere umfassen sowohl bezüglich ihrer Generation monodisperse und polydisperse Lösungen von Dendrimeren. Die Dendrimere in einer monodispersen Lösung sind im Wesentlichen alle von derselben Generation und daher von einheitlicher Größe und Form. Die Dendrimere in einer polydispersen Lösung umfassen eine Verteilung von Dendrimeren verschiedener Generationen.

[0030] Dendritische Polymere umfassen auch oberflächenmodifizierte Dendrimere. Beispielsweise kann die Oberfläche eines PAMAM-Dendrimers durch Zugabe einer Aminosäure, z.B. Lysin oder Arginin, modifiziert werden.

[0031] Es sollte verstanden werden, dass die Referenz auf eine bestimmte Art von dendritischem Polymer als ein „Polymer", z.B. ein „dichtes Sternpolymer", ein „unsymmetrisches dendritisches Polymer", ein „Kaskadenpolymer" so gedacht ist, dass auch verbrückte Dendrimere dieser Art, Dendrimeraggregate dieser Art, polydisperse Dendrimere dieser Art und oberflächenmodifizierte Dendrimere dieser Art umfasst sind.

[0032] Dendritische Polymerkonjugate von biologischen Response Modifiern, bei denen es sich um genetisches Material handelt, sind in einer großen Vielfalt von therapeutischen und diagnostischen Anwendungen nützlich. Beispielsweise besitzen dendritische Polymerkonjugate von biologischen Response Modifiern, welche genetisches Material umfassen, eine breite Anwendbarkeit in den Gebieten der Gentherapie, Analyse, Modifikation, Aktivierung, Antisense Applikationen und dergleichen.

[0033] Somit sind umfasst: eine Zusammensetzung, welche einen Komplex von dendritischem Polymer mit genetischem Material, gegebenenfalls in Lösung mit DEAE-Dextran umfasst; und eine Zusammensetzung, welche einen Komplex eines ersten dendritischen Polymers und eines genetischen Materials umfasst, das in eine Lösung gegeben wurde, die ein zweites dendritisches Polymer enthält, wobei das zweite dendritische Polymer größer als das erste dendritische Polymer ist.

[0034] Ebenfalls in der vorliegenden Erfindung umfasst ist ein Verfahren, um diese Konjugate herzustellen. Ein Verfahren zur Herstellung eines Konjugats aus einem dendritischen Polymer und genetischem Material ist zum Beispiel: (1) das Umsetzen des dendritischen Polymers mit dem genetischen Material in einem geeigneten Lösungsmittel bei einer Temperatur, welche die Komplexierung des genetischen Materials mit dem dendritischen Polymer unterstützt, wobei das Verfahren gegebenenfalls das Einbringen des Komplexes in eine Lösung mit DEAE-Dextran einschließt; oder (2) das Komplexieren von genetischem Material mit einem ersten dendritischen Polymer durch Umsetzen des Polymers mit dem genetischen Material in einem geeigneten Lösungsmittel bei einer Temperatur, die eine Assoziierung des genetischen Materials mit dem Polymer unter-

stützt, anschließendes Einbringen des Komplexes in eine Lösung, welche ein zweites dendritisches Polymer enthält, wobei das zweite dendritische Polymer größer ist als das erste dendritische Polymer. Genauer werden bei den obigen Verfahren (1) je nach gewünschter Konzentration 1 bis 10 µg genetisches Material pro ml oder pro 20 µl bei einem pH-Wert von ungefähr 5 bis 10 und bei einer Temperatur von ungefähr 20 bis 40°C mit ausreichendem dendritischem Polymer umgesetzt, um einen Komplex aus genetischem Material und dendritischem Polymer in einem Ladungsverhältnis von etwa 3:1 bis etwa 1:10 000 zu ergeben. Es folgt eine vollständigere Erläuterung der Verfahren.

[0035] Verfahren zur Verwendung dieser Konjugate umfassen das Bewirken von Zelltransfektion und Bioverfügbarkeit von genetischem Material, umfassend Bereitstellen eines Komplexes eines dendritischen Polymers und genetischen Materials und das Verfügbarmachen des Komplexes für Zellen, die transfiziert werden sollen. Das Komplexieren stabilisiert und bindet das genetische Material, schützt das genetische Material vor Verdau während des Transports zu und der Transfizierung in eine Zelle und vereinfacht den Transport von genetischem Material durch eine Zellmembran und in eine Zelle einschließlich in einen Zellkern.

[0036] Als Verfahren der vorliegenden Erfindung sind auch umfasst: das Transportieren von genetischem Material durch eine Zellmembran und in einen Zellkern, umfassend Komplexieren von genetischem Material mit dendritischem Polymer, und anschließendes Verfügbarmachen des Komplexes für die Zellen, die transfiziert werden sollen; und das Schützen von genetischem Material vor Verdau während des Transports zu und der Transfizierung in eine Zelle umfassend Komplexieren des genetischen Materials mit dendritischem Polymer bevor das genetische Material Diggestionsenzymen ausgesetzt wird und Stabilisieren und Binden von genetischem Material, welches das Komplexieren des genetischen Materials mit einem dendritischen Polymer umfasst.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0037] Die folgende Beschreibung der Figuren hilft, die vorliegende Erfindung zu verstehen.

[0038] Fig. 1 zeigt verschiedene Generationen von dichten Sterndendrimeren.

[0039] **Fig.** 2(A) zeigt ein Dendrimer mit unsymmetrischen (ungleichen) Verzweigungsverknüpfungen.

[0040] **Fig.** 2(B) zeigt ein Dendrimer mit symmetrischen (gleichen) Verzweigungsverknüpfungen.

[0041] Fig. 3 zeigt verschiedene Größen von Dendrimerfamilien [I, II, III von (B)] im Verhältnis zu Antikörperabmessungen (A).

[0042] Fig. 4 zeigt Kohlenstoff-13-Spingitterrelaxationszeiten (T1) für Aspirin, das in verschiedene Generationen von Dendrimeren eingebaut ist, Beispiel 1. Die vertikale Achse ist die Zeit (Sekunden) und die horizontale Achse ist die Generation von zugegebenem PAMAM dichtem Sterndendrimer.

[0043] Fig. 5 zeigt die Ergebnisse der dynamischen Analyse von Beispiel 2. Die vertikale Achse ist der Wirkstoff in Prozent (%) in der Rezeptorphase und die horizontale Achse ist die Zeit (Stunden).

[0044] Fig. 6 zeigt den Einfluss von Generation 6,5-Dendrimer auf die Dialyserate von Pseudoephedrin bei pH = 9,5 aus Beispiel 2. Die vertikale Achse ist der Wirkstoff in Prozent (%) in dem Rezeptorabteil und die horizontale Achse ist die Zeit (Stunden).

[0045] Fig. 7 zeigt die Wirkung von Dendrimer-Hydrolyse auf die Durchlässigkeit von Pseudoephedrin aus Beispiel 3. Die vertikale Achse ist der Wirkstoff in Prozent (%) in dem Rezeptorabteil und die horizontale Achse ist die Zeit (Stunden).

[0046] Fig. 8 zeigt den Vergleich von Salicylsäure, welche in dem Rezeptorabteil freigesetzt wird in Gegenwart von dichtem Sternpolymer (Gen = 4,0) bei pH = 5,0 und 6,65 mit Salicylsäurekontrolle, Beispiel 4. Die vertikale Achse ist Wirkstoff in Prozent (%) in dem Rezeptorabteil und die horizontale Achse ist die Zeit (Stunden).

[0047] Fig. 9 zeigt den Vergleich von Salicylsäure in Prozent, die bei pH = 8,0 aus dem Donorabteil mit dichtem Sternpolymer (Gen = 4,0) in den Rezeptorabteil gelangt mit Salicylsäuregehalt, Beispiel 4. Die vertikale Achse ist der Wirkstoff in Prozent (%) in dem Donorabteil und die horizontale Achse ist die Zeit (Stunden).

[0048] Fig. 10 zeigt den Vergleich von Salicylsäure in Prozent, welche aus dem Donorabteil in Gegenwart von dichtem Sternpolymer (Gen = 4,5) verlorengeht mit Salicylsäurekontrolle, Beispiel 4. Die vertikale Achse ist der Wirkstoff in Prozent (%) in dem Donorabteil und die horizontale Achse ist die Zeit (Stunden).

[0049] Fig. 11 zeigt Kohlenstoff-13-Spingitterrelaxationszeiten (T_1) für 2,4-D, welches in verschiedene Generationen von Dendrimeren eingebaut ist, Beispiel 15. Die vertikale Achse ist die Zeit (Sekunden) und die horizontale Achse ist die Generation von zugegebenem PAMAM dichtem Sterndendrimer.

[0050] Fig. 12 ist eine Balkengraphik, in welcher die DNA-Transfektionsfähigkeit von Dendrimeren bei verschiedenen DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnissen verglichen wird, indem die Luciferaseaktivität nach der Transfektion untersucht wird, Beispiel 44. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg des Proteins und die Zahlen auf der horizontalen Achse sind die Probennummern (erläutert in Beispiel 44) für Kontrolle und verschiedene Dendrimere und DNA-Komplexe bei verschiedenen DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnissen, wie in Tabelle XV aufgelistet.

[0051] Fig. 13 ist ein Elektrophoresegel, welches die DNA-Bindungsfähigkeit von Dendrimeren bei verschiedenen DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnissen unter Verwendung derselben DNA:Dendrimer-Komplexe, die in Fig. 12, Beispiel 44 verwendet wurden vergleicht.

[0052] Fig. 14 ist eine graphische Darstellung, die die prozentuale Steigerung der Transfektion gegenüber einer Kontrolle gegen die Generation des in dem DNA:Dendrimer-Komplex verwendeten Dendrimers aufzeigt, Beispiel 45. Die vertikale Achse ist die prozentuale Steigerung der Transfektion gegenüber Dextrankontrolle und die horizontale Achse ist die Dendrimergeneration. Die ausgefüllten Kreise sind Ammoniak (NH_3)-Kern-Dendrimere und die ausgefüllten Quadrate sind Ethylendiamin (EDA)-Kern-Dendrimere.

[0053] Fig. 15 ist eine Balkengraphik, die den Einfluss der Zugabereihenfolge verschiedener Dendrimere zu einem DNA-Dendrimer-Komplex auf die Transfektionseffizienz in RAT2-Zellen für Ethylendiamin (EDA)-Kern-Dendrimere vergleicht, Beispiel 46. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg an Protein und die horizontale Achse ist die Konzentration (µmol) des zweiten Dendrimers. Die leeren Balken sind die Ergebnisse für DNA, die mit G 9-Dendrimer komplexiert ist, gefolgt von der Zugabe von G 5-Dendrimer. Die diagonal schraffierten Balken sind die Ergebnisse für DNA, die mit G 5-Dendrimer komplexiert ist, gefolgt von der Zugabe von G 9-Dendrimer.

[0054] Fig. 16 veranschaulicht dieselbe Information wie Fig. 15, jedoch für Ammoniak (NH_3)-Kern-Dendrimere, Beispiel 46. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg an Protein und die horizontale Achse ist die Konzentration (µmol) des zweiten Dendrimers. Die leeren Balken sind die Ergebnisse für DNA, die mit G 9-Dendrimer komplexiert wurde, gefolgt von der Zugabe von G 5-Dendrimer. Die diagonal schraffierten Balken sind die Ergebnisse für DNA, die mit G 5-Dendrimer komplexiert wurde, gefolgt von der Zugabe von G 9-Dendrimer.

[0055] Fig. 17 veranschaulicht die Lichteinheiten/µg an Protein nach Transfektionen, die mit verschiedenen DNA-Dendrimer-Konjugaten durchgeführt wurden und Kontrollen unter verschiedenen Bedingungen, Beispiel 42. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg an Protein und die Zahlen auf der horizontalen Achse sind die Probennummern für die Kontrollen und verschiedenen DNA:Dendrimer-Komplexe mit unterschiedlichen DNA:Dendrimer-Verhältnissen wie in Tabelle XIII aufgelistet.

[0056] Fig. 18 ist Fig. 17 ähnlich, veranschaulicht jedoch Daten für eine breitere Variation der Dendrimer:DNA-Verhältnisse, Beispiel 42. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg an Protein und die Zahlen auf der horizontalen Achse sind die Probennummern für Kontrollen und unterschiedliche DNA:Dendrimer-Komplexe bei variirenden DNA:Dendrimer-Verhältnissen, wie in Tabelle XIV aufgelistet.

[0057] Fig. 19 ist eine Balkengraphik der relativen Lichteinheiten pro µg an Protein für die Transfektion von Dendrimer:DNA-Konjugat für die Dendrimere A–S, Beispiel 42. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg an Protein und die horizontale Achse ist das verwendete Dendrimer und das DNA:Dendrimer-Verhältnis in jedem Abschnitt der Achse von 1:2, 1:2, 1:10, 1:10, 1:20 und 1:20.

[0058] Fig. 20 ist ein Elektrophoresegel, welches die Komplexierungseigenschaften von verschiedenen Ammoniak (NH_3)-Kern-Dendrimeren mit synthetischer einzelsträngiger DNA mit einer Länge von 15 Nukleotiden vergleicht, Beispiel 47.

[0059] Fig. 21 zeigt die Aufnahme eines radiomarkierten synthetischen doppelsträngigen Oligomers mit einer Länge von 23 Nukleotiden in einer monocytischen Zelllinie über die Zeit, wobei die Transfektion der DNA allein, die Transfektion der DNA, die mit einem Generation 8 (G 8) Ammoniak (NH_3)-Kern-Dendrimer [d.h. G 8 (NH_3)-Dendrimer] komplexiert wurde und die Transfektion der DNA-Dendrimer-Komplexe in Gegenwart von Natriumazid verglichen werden, Beispiel 47. Die vertikale Achse ist die Aufnahme in 10^2 cpm/10^4 Zellen und die horizontale Achse ist die Zeit (Stunden). Die ausgefüllten Quadrate stellen das synthetische einzelsträngige Oligomer mit einer Länge von 23 Nukleotiden dar; die ausgefüllten Kreise stellen DNA/G 8 (NH_3)-Dendrimer dar; und die ausgefüllten Dreiecke bedeuten DNA/G 8 (NH_3)-Dendrimer plus Natriumazid.

[0060] Fig. 22 ist eine Balkengraphik in der die Transfektion aufgetragen ist gegen Dendrimer-DNA-Komplex, wobei manche DNA linear ist und mache zirkulär oder stark geknäuelt, Beispiel 48. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg an Protein und die horizontale Achse ist der Dendrimer-DNA-Komplex. Die leeren Balken sind die Ergebnisse, wenn kein DEAE-Dextran vorhanden ist. Die ausgefüllten Balken sind die Ergebnisse für 0,5 µM DEAE-Dextran.

[0061] **Fig.** 23(A)–(D) umfasst vier Elektrophoresegels, welche die DNA-Komplexierungsfähigkeit von einem G 8 (NH_3)-Dendrimer und einem G 8 (EDA)-Dendrimer bei verschiedenen Ladungsverhältnissen und verschiedenen Bedingungen zeigt, Beispiel 49.

[0062] Fig. 24 ist ein Elektrophoresegel, welches die DNA-Bindungseigenschaften von G 8 (NH_3)-Dendrimeren und G 11 (EDA)-Dendrimeren bei verschiedenen Molverhältnissen vergleicht, Beispiel 50.

[0063] Fig. 25 ist ein Elektrophoresegel, welches die DNA-Bindungseigenschaften von G 8 (NH_3)-Dendrimeren und G 8 (EDA)-Dendrimeren über einen breiten pH-Wert-Bereich zeigt, Beispiel 51.

[0064] **Fig.** 26(A) und (B) sind Elektrophoresegels, welche die DNA-Dendrimer-Bindungsstabilität in Salzlösungen mit steigender Natriumchlorid-Konzentration zeigen, Beispiel 52.

[0065] Fig. 27 ist ein Elektrophoresegel, welches die Stabilität und den Schutz von DNA zeigt, die mit G 8 (NH_3)-Dendrimeren und G 11 (EDA)-Dendrimeren komplexiert ist, in Gegenwart verschiedener Restriktionsenzyme, Beispiel 53.

[0066] Fig. 28 ist ein Elektrophoresegel, welches die Stablität und den Schutz von DNA, welche mit G 8 (EDA)-Dendrimeren komplexiert ist, in Gegenwart von zellulären Nukleasen veranschaulicht, Beispiel 54.

[0067] Fig. 29 vergleicht das Ausmaß der Transfektion von DNA, die mit Dendrimeren komplexiert ist, bei verschiedenen DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnissen und verschiedenen DNA-Konzentrationen mit den selben Kombinationen in Gegenwart eines Diethylaminoethylethers von Dextran (DEAE-Dextran). Es gibt Transfektionsbeispiele mit Lipiden, d.h. bei denen LIPOFECTIN™ anstelle des Dendrimers verwendet wird, und in Abwesenheit von DEAE-Dextran, Beispiel 55. Die vertikale Achse ist die Plasmidkontrolle, die Dextrankontrolle und die verschiedenen Plasmid-DNA-Komplexe von 1 µg, 5 µg und 10 µg und die horizontale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg Protein. Die diagonal schraffierten Balken sind die Ergebnisse für Dendrimer/DEAE-Dextran. Die kreuzschraffierten Balken sind die Ergebnisse für das Dendrimer allein. Die gefleckten Balken sind die Ergebnisse für LIPOFECTIN™.

[0068] Fig. 30 zeigt den Transfektionsgrad für (NH_3)-Dendrimere und (EDA)-Dendrimere bei verschiedenen DNA:Dendrimer Ladungsverhältnissen, in manchen Fällen in Gegenwart von DEAE-Dextran und in anderen Fällen hone DEAE-Dextran, Beispiel 56. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg an Protein und die horizontale Achse ist das Ladungsverhältnis von DNA:Dendrimer. Die ausgefüllten Quadrate mit durchgezogenen Linien bedeuten G 9 (EDA)-Dendrimer; die leeren Quadrate mit schraffierten Linien stellen G 9 (EDA)-Dendrimer plus DEAE-Dextran dar; die ausgefüllten Kreise mit durchgezogenen Linien bedeuten G 9 (NH_3)-Dendrimer; und die leeren Kreise mit schraffierten Linien bedeuten G 9 (NH_3)-Dendrimer plus DEAE-Dextran.

[0069] Fig. 31 ist ähnlich wie Fig. 30, aber für G 8 (NH_3)-Dendrimere und G 11 (EDA)-Dendrimere und jeweils in Gegenwart von DEAE-Dextran, Beispiel 56. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg an Protein und die horizontale Achse ist das Ladungsverhältnis von DNA:Dendrimer. Die ausgefüllten Kreise bedeuten G 8 (NH_3)-Dendrimer; und die ausgefüllten Dreiecke bedeuten G 11 (EDA)-Dendrimer.

[0070] Fig. 32 ist eine graphische Darstellung der Transfektionseffektivität von DNA:G 7 (NH_3)-Dendri-

mer-Komplexen in Gegenwart von entweder DEAE-Dextran oder Hanks gepufferter Saline (HBS), Beispiel 57. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg an Protein; und die horizontale Achse ist das Ladungsverhältnis von DNA:Dendrimer. Die ausgefüllten Kreise bedeuten Hanks gepufferte Saline; und die ausgefüllten Dreiecke bedeuten DEAE-Dextran.

[0071] Fig. 33 ist eine graphische Darstellung der prozentualen Steigerung der Transfektion für (NH_3)-Dendrimer-DNA-Komplexe in DEAE-Dextran bei verschiedenen Ladungsverhältnissen von DNA zu Dendrimer, Beispiel 58. Die vertikale Achse ist die prozentuale Steigerung der Transfektion (gegenüber DEAE-Dextran-Kontrolle), und die horizontale Achse ist die Dendrimergeneration. Die diagonal schraffierten Balken bedeuten ein Ladungsverhältnis von 1:1, die leeren Balken bedeuten ein Ladungsverhältnis von 1:5 und die querschraffierten Balken bedeuten ein Ladungsverhältnis von 1:10.

[0072] Fig. 34 ist eine graphische Darstellung der Transfektionseffektivität für DNA-Dendrimer-Komplexe bei verschiedenen Ladungsverhältnissen in Gegenwart von DEAE-Dextran und ohne DEAE-Dextran, Beispiel 59. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg an Protein und die horizontale Achse ist das Ladungsverhältnis von DNA:Dendrimer (der ganz rechte Eintrag ist mit Plasmid/DEAE-Dextrankontrolle). Die leeren Balken bedeuten DEAE-Dextran; und die ausgefüllten Balken bedeuten kein DEAE-Dextran.

[0073] Fig. 35 ist eine Balkengraphik der Transfektionseffektivität für DNA-Dendrimer-Komplexe bei verschiedenen Ladungsverhältnissen und bei verschiedenen Konzentrationen an DEAE-Dextran, Beispiel 60. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg an Protein; und die obere horizontale Achse ist die DEAE-Dextrankonzentration in µM; und die untere horizontale Achse sind verschiedene Ladungsverhältnisse von DNA:Dendrimer für jedes Segment einschließlich Plasmidkontrolle.

[0074] Fig. 36 ist eine Balkengraphik der Transfektionseffektivität für DNA:Dendrimer-Komplexe bei einem Ladungsverhältnis von 1:5 im Vergleich zu LIPOFECTIN™-vermittelter Transfektionen in verschiedenen Zelllinien, Beispiel 61. Die Zahlen auf der vertikalen Achse sind die Probennummern, welche die verwendeten Transfektionsmittel identifizieren (wie in Beispiel 61 aufgeführt); und die horizontale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg an Protein. Die verschiedenen Segmente (in der Graphik von oben nach unten) für die getesteten Zelllinien sind Affe:COS7; Mensch:HMEC-1; Maus:10-1; Maus:NIH3T3; und Ratte:Clon9.

[0075] Fig. 37 ist eine graphische Darstellung der Transfektionseffektivität für DNA-Dendrimer-Komplexe mit einem 1:5 Ladungsverhältnis in zwei schwierig zu transfizierenden Zelllinien im Vergleich zu LIPOFECTIN™-vermittelter Transfektionen in solchen Zelllinien, Beispiel 62. Die vertikale Achse sind die Probennummern und die horizontale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg an Protein. Die verwendeten Zelllinien sind durch die schräg schraffierten Balk für NRK52E und durch die ausgefüllten Balken für YB2 dargestellt.

[0076] Fig. 38 ist eine graphische Darstellung der Transfektionseffektivität für verschiedene DNA-Dendrimer-Komplexe mit und ohne DEAE-Dextran im Vergleich zu LIPOFECTIN™ und LIPOFECTAMIN™ vermittelten Transfektionen, Beispiel 63. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg an Protein; und die horizontale Achse ist das Ladungsverhältnis oder die Dosis einschließlich Kontrollen. Die leeren Balken bedeuten G 8 (NH_3)-Dendrimer; die vertikal kreuzschraffierten Balken bedeuten LIPOFECTIN™; die diagonal schraffierten Balken bedeuten G 8 (NH_3)-Dendrimer mit DEAE-Dextran; die gefleckten Balken bedeuten LIPOFECTAMIN™; und die schräg querschraffierten Balken bedeuten G 11 (EDA)-Dendrimer mit DEAE-Dextran.

[0077] Fig. 39 ist eine graphische Darstellung der Transfektionseffektivität für DNA:Dendrimer-Komplexe bei verschiedenen Ladungsverhältnissen und in Gegenwart von entweder DEAE-Dextran, Dimethylsulfoxid (DMSO), Mischungen der vorhergehenden oder keines der vorhergehenden, Beispiel 64. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg an Protein; und die horizontale Achse ist das Ladungsverhältnis einschließlich Plasmidkontrollen. Die gefleckten Balken bedeuten DEAE-Dextran mit DMSO-Schritt; die diagonal schraffierten Balken bedeuten DEAE-Dextran ohne DMSO-Schritt; die schräg kreuzschraffierten Balken bedeuten kein DEAE-Dextran mit DMSO-Schritt; und die schräg kreuzschraffierten Balken bedeuten kein DEAE-Dextran und kein DMSO-Schritt.

[0078] Fig. 40 ist eine graphische Darstellung der Transfektionseffektivität für ASGPR-gerichtete DNA, die mit Galactosetrisaccharid konjugiertem Dendrimer komplexiert ist, Beispiel 65. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg an Protein; und die horizontale Achse sind die Zelllinien und der Rezeptorstatus. Die leeren Balken bedeuten konjugierte Dendrimere; und die diagonal schraffierten Balken bedeuten nicht-konjugierte Dendrimere.

[0079] Fig. 41 ist ein Elektrophoresegel, welches die DNA-Bindungsfähigkeit von einem G 11 (EDA)-Dendrimer mit und ohne damit konjugiertem Galactosetrisaccharid veranschaulicht, Beispiel 65.

[0080] Fig. 42 ist eine graphische Darstellung der Transfektionseffektivität für DNA, die mit einem G 8 (NH_3)-Dendrimer komplexiert ist bei verschiedenen Dendrimer-Konzentrationen und bei unterschiedlichen Serum-Konzentrationen, Beispiel 66. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg an Protein; und die horizontale Achse ist die Serumkonzentrationen. Die leeren Balken bedeuten 0,05 µM G 8 (NH_3)-Dendrimere; die gefleckten Balken bedeuten 0,1 µM G 8 (NH_3)-Dendrimere; die diagonal schraffierten Balken bedeuten 0,5 µM G 8 (NH_3)-Dendrimere; und die ausgefüllten Balken bedeuten kein Dendrimer.

[0081] Fig. 43 ist eine graphische Darstellung der Transfektionseffektivität für DNA, die mit verschiedenen gerichteten, nicht gerichteten und oberflächenmodifizierten Dendrimeren komplexiert ist, Beispiel 67. Die vertikale Achse ist die prozentuale Steigerung gegenüber Plasmidkontrolle; und die horizontale Achse sind die verschiedenen DNA-Dendrimer-Komplexe. Die leeren Balken sind ein DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:1; die ausgefüllten Balken sind ein DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:5; und die diagonal schraffierten Balken sind ein DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:10.

[0082] Fig. 44 ist eine graphische Darstellung der Transfektionseffektivität für DNA, die mit Dendrimeren komplexiert ist, wobei die Expression der transfizierten DNA gemessen wird, Beispiel 68. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten/µg an Protein; und die horizontale Achse sind die verschiedenen DNA-Dendrimer-Komplexe. Die Balken bedeuten die Zeit (Stunden) zwischen Transfektion und Ernte. Die leeren Balken bedeuten 21 Stunden; die von links oben nach rechts unten diagonal schraffierten Balken bedeuten 45 Stunden; die von oben rechts nach unten links schraffierten Balken bedeuten 69 Stunden; und die ausgefüllten Balken bedeuten 141 Stunden.

[0083] Fig. 45 ist eine graphische Darstellung der Cytotoxizität von G 8 (NH_3)-Dendrimeren und G 8 (EDA)-Dendrimeren mit und ohne DNA und mit und ohne Anwesenheit von DEAE-Dextran in einer RAT2 Zelllinie, Beispiel 69. Die vertikale Achse ist der Prozentsatz an toten Zellen; und die horizontale Achse ist die Konzentration des Dendrimers im linken Segment und die Konzentration des Dendrimer-DEAE-Dextran im rechten Segment. Die leeren Balken bedeuten G 8 (EDA)-Dendrimer; und die diagonal schraffierten Balken bedeuten G 8 (NH_3)-Dendrimer.

[0084] Fig. 46 ist eine ähnliche graphische Darstellung der Cytotoxizität von G 8 (NH_3)-Dendrimeren und G 8 (EDA)-Dendrimeren in verschiedenen Zelllinien, Beispiel 69. Die vertikale Achse ist der Prozentsatz an toten Zellen; und die horizontale Achse ist die Konzentration der verschiedenen getesteten Dendrimere. Die leeren Balken bedeuten kein DEAE-Dextran; und die ausgefüllten Balken 0,5 µM DEAE-Dextran. Die verwendeten Zelllinien (die von links nach rechts betrachteten Segmente) waren Klon9, NIH3T3, 10-1 und COS7.

[0085] **Fig.** 47(a)–(f) stellen die zelluläre Aufnahme und Lokalisierung von DNA in zwei verschiedenen Zelllinien dar, von denen einige ohne Dendrimer transfiziert wurden, einige mit Dendrimer und einige mit Dendrimer in Gegenwart von Natriumazid, Beispiel 70. In allen Figuren ist die vertikale Achse die zelluläre Aufnahme in 10^2 cpm/10^4-Zellen; und die untere horizontale Achse ist die Zeit (Stunden). Bei den **Fig.** (A)–(C) wurden U937-Zellen verwendet; und in den **Fig.** (D)–(F) wurden Rat2-Zellen verwendet. Die obere horizontale Achse der **Fig.** (A) und (D) ist nur DNA, in den **Fig.** (B) und (E) DNA plus Dendrimer und in den **Fig.** (C) und (F) DNA plus Dendrimer plus Natriumazid. In allen Figuren bedeuten die ausgefüllten Quadrate Kern, die ausgefüllten Quadrate bedeuten Membran und die ausgefüllten Dreiecke bedeuten zelluläre Fraktionen.

[0086] **Fig.** 48(a) und (b) sind Fotografien von Zellen, von denen einige erfolgreich mit RSV-lacZ-DNA transfiziert wurden, welche β-Galactosidaseenzym exprimieren, Beispiel 71.

[0087] Fig. 49 ist wie **Fig.** 48, außer dass es eine vergrößerte Fotografie ist, und das RSV-lacZ-Plasmid mit 3 Mikrogramm pro Test Well verwendet wurde, Beispiel 71.

[0088] **Fig.** 50(a) und (b) sind wie **Fig.** 48, außer dass Rat2-Rattenfibroblastzellen beteiligt sind, und bei (A) mit transfizierten Zellen und bei (B) mit nicht transfizierten Zellen verglichen werden, Beispiel 71.

[0089] **Fig.** 51(a)–(c) ist eine Illustration des Transfektionsverfahrens von genetischem Material.

[0090] Fig. 52 ist eine graphische Darstellung der Anzahl der Klone, die aus D5-Zellen erhalten wurden, die mit RSV-β-gal-NEO-Plasmid transfiziert wurden. Resistente Zellklone wurden ausgewählt mit Geneticin (G

418), Antibiotikum (Gibco/BRL), nachdem Transfektion in die Elternzellen unter Verwendung mehrerer verschiedener Techniken durchgeführt wurde, einschließlich der beanspruchten Erfindung, Beispiel 72. Die vertikale Achse ist die Anzahl der Klone; und die Zahlen auf der horizontalen Achse sind die Nummern von Beispiel 72, welche die DNA-Mengen und Transfektionsbedingungen für solche Proben identifizieren. Die leeren Balken bedeuten G 418 resistente Klone und die vertikal schraffierten Balken bedeuten Klone, welche β-Galactosidaseenzym produzieren.

[0091] Fig. 53 ist eine graphische Darstellung, welche die Anzahl der aus Rat2-Zellen, die mit RSV-β-gal-NEO-Plasmid unter Verwendung verschiedener Techniken erhaltenen Klone vergleicht, einschließlich der beanspruchten Erfindung, Beispiel 72. Die Klone wurden mit Genecitin (G 418) auf Neomycinresistenz selektiert und anschließend auf β-Galactosidaseaktivität bewertet. Die vertikale Achse ist die Anzahl der Klone; und die Nummern auf der horizontalen Achse sind die Probennummern von Beispiel 72 für die DNA-Mengen und Transfektionsbedingungen für solche Proben. Die leeren Balken bedeuten G 418 resistente Klone und die diagonal schraffierten Balken bedeuten Klone, welche β-Galactosidase exprimieren.

[0092] Fig. 54 ist eine graphische Darstellung, welche die Produktion von permanent transfizierten MSU 1.2-Zellen mit EBV-A-DNA-Plasmid zeigen. Die vertikale Achse zeigt Hygromycin B resistente Kolonien pro 1 × 10^6 Zellen und die horizontale Achse sind die Probennummern (wie in Beispiel 72 aufgelistet).

[0093] **Fig.** 55 zeigt eine Ablaufverfolgung einer FACS-Analyse (Fluoreszenz) in verschiedenen Zellklonen, die mit einem ICAM-Expressionsplasmid transfiziert wurden. In allen Figuren zeigt die vertikale Achse die Anzahl der Zellen und die horizontale Achse ist die Menge an exprimiertem ICAM (Fluoreszenz), Beispiel 72.

[0094] Fig. 56 zeigt die LUCIFERASE™-Aktivität in Rat2-Zellen nach Transfektion mit pH kontrolliertem Dendrimeraggregat mit einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:10. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten pro µg Protein. Die horizontale Achse ist die in dem Test verwendete Probennummer, Beispiel 74.

[0095] Fig. 57 zeigt die LUCIFERASE™-Aktivität in Rat2-Zellen nach Transfektion unter Verwendung von mit Lysin modifizierten Dendrimeren und nicht-modifizierten Dendrimeren jeweils in Gegenwart von DEAE-Dextran bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:10. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten pro µg Protein und die horizontale Achse sind die in dem Test verwendeten Proben, Beispiel 75.

[0096] Fig. 58 zeigt die Transfektionsergebnisse für zwei Zelllinien (COS1 und RAT2), die jeweils mit verschiedenen Dendrimeren, polydispersen Dendrimeren und anderen Transfektionsmitteln transfiziert wurden. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten pro 3 µg zellulärem Protein; und die horizontale Achse ist die Probennummer und das Ladungsverhältnis für die verschiedenen verwendeten Transfektionsmittel, Beispiel 76.

[0097] Fig. 59 umfasst Fotografien von gefärbten Zellkulturen von Mausmelanom-D5-Zellen, deren Elternzellen mit RSV-β-gal-Plasmid-DNA transfiziert wurden. Stabile Transformate (Kolonien) werden mit G 418 selektiert (Beispiel 72). Die in den Elternzellen verwendeten Transfektionsvehikel in jeder der nummerierten Kulturen sind:

1. 10 µg DNA mit Calciumphosphat
2. 10 µg DNA mit DEAE-Dextran
3. 5 µg DNA mit 0,5 µM G 8 (NH_3)
4. 10 µg DNA mit 0,5 µM G 8 (NH_3)
5. 5 µg DNA mit 0,2 µM G 8 (NH_3)

[0098] **Fig.** 60 ist in Form verschiedener nummerierter Felder dargestellt.

[0099] Feld 1 ist eine Fotomikrografie von Gewebesektionen von D5-Mausmelanomtumor in den in vivo 10 µg an RSV-β-gal-Plasmid-DNA, welche mit G 11 (EDA)-Dendrimer in einem 1:10 DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis komplexiert ist, injiziert wurden. Die erfolgreiche Transfektion der Tumorzellen wird durch die Anwesenheit von D5-Zellen, welche β-gal exprimieren, bestätigt, was durch den dunklen (blauen) Fleck dokumentiert ist, der in Feld 1 sichtbar ist, Beispiel 77.

[0100] Feld 2 ist eine Fotomikrografie der Kontrolle für das Gewebe aus Feld 1, wobei in den D5-Mausmelanomtumor nur G 11 (EDA)-Dendrimer injiziert wurde, Beispiel 77.

[0101] Die Felder 3, 4 und 5 sind Elektronenmikrografien der folgenden DNA:Dendrimer-Komplexe, Beispiel 43:
Feld 3 – DNA mit G 11(EDA)-Dendrimer bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:10;
Feld 4 – ebenso wie Feld 3, aber mit anschließender Zugabe von DEAE-Dextran; und
Feld 5 – DNA mit einer polydispersen Größenmischung von Dendrimeren in einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:10.

[0102] Fig. 61A und Fig. 61B sind graphische Darstellungen, welche die Transfektion vergleichen unter Verwendung verschiedener dichter Sterndendrimere oder Kombinationen davon bei verschiedenen Ladungsverhältnissen und unter drei verschiedenen Bedingungen. Transfektionen unter Verwendung von einem genetisches Material:Dendrimer-Komplex allein (gefleckte Balken); dieselben genetisches Material:Dendrimer-Komplexe in Gegenwart von DEAE-Dextran (diagonal schraffierte Balken); und dieselben genetisches Material:Dendrimer-Komplexe in Gegenwart von Chloroquine (ausgefüllte Balken). Die resultierenden Daten, wie in Fig. 61A graphisch dargestellt, zeigen, dass COS1-Zellen transfiziert wurden und in Fig. 61B die RAT2-Zellen transfiziert wurden. Die vertikale Achse zeigt die relativen Lichteinheiten pro 3 µg an Protein. Die Nummern auf der horizontalen Achse sind die Probennummern dergenetisches Material:Dendrimer-Komplexe aus Beispiel 73.

[0103] Fig. 62 ist eine graphische Darstellung, welche die Transfektion vergleicht bei Verwendung Lysin-basierter unsymmetrisch verzweigter Dendrimere mit der Transfektion unter Verwendung dichter Sterndendrimere, Beispiel 78. Die vertikale Achse sind die relativen Lichteinheiten pro µg an Protein und die horizontale Achse ist das verwendete Dendrimer. Die leeren Balken bedeuten kein DEAE-Dextran; und die ausgefüllten Balken bedeuten mit DEAE-Dextran.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0104] Die dichten Sternpolymere werden durch Fig. 1 veranschaulicht, worin die kreisförmigen I [hierin „Kern (I)"] einen Initiatorkern darstellen (in dieser Figur einen trifunktionalen Initiatorkern, der durch die ganz linke Zeichnung gezeigt ist); Z bedeutet eine terminate Gruppe, die zunächst durch die zweite Zeichnung von links gezeigt ist, welche als ein sternverzweigtes Oligomer bezeichnet wird; A, B, C, D und E bedeuten bestimmte molekulare Generationen von dichten Sterndendrimeren; und $(A)_n$, $(B)_n$, $(C)_n$, $(D)_n$ und $(E)_n$ bedeuten verbrückte dichte Sterndendrimere.

[0105] Die dichten Sterndendrimere sind unimolekulare Assemblierungen, welche drei bestimmende architektonische Merkmale aufweisen, nämlich (a) einen Initiatorkern, (b) innere Schichten (Generationen, G oder Gen), die aus sich wiederholenden Einheiten zusammengesetzt sind, welche radial an den Initiatorkern gebunden sind, und (c) eine äußere Oberfläche mit terminaler Funktionalität (d.h. terminale funktionelle Gruppen), die an die äußerste Generation gebunden sind. Die Größe und Form der dichten Sterndendrimer-Moleküle und die funktionellen Gruppen, die in dem Dendrimermolekül vorliegen, können durch die Wahl des Initiatorkerns, die Anzahl an Generationen (d.h. die Schichten-Struktur, die durch jede Generation gebildet wird, beim Übergang zur nächsten Generation), die für die Bildung des Dendrimers verwendet werden und die Wahl der sich wiederholenden Einheiten, die in jeder Generation verwendet werden, kontrolliert werden. Da die Dendrimere in jeder beliebigen bestimmten Generation isoliert werden können, wird ein Mittel bereitgestellt, um Dendrimere zu erhalten, welche gewünschte Eigenschaften aufweisen. Um die Eigenschaften eines dichten Sterndendrimers aufzuweisen, müssen all die drei obigen architektonischen Merkmale vorhanden sein. Diese Merkmale wurden weiter durch Petar R., Dvornic und Donald A. Tomalia in Chem. In Britain, 641–645, August 1994 diskutiert. Wie in dieser Anmeldung verwendet, können die Dendrimere durch ihre Generationsanzahl und den verwendeten Initiatorkern, z.B. G 7 (EDA)-Dendrimer bezeichnet werden.

[0106] Die Auswahl der Komponenten der dichten Sterndendrimere beeinflussen die Eigenschaften der Dendrimere. Die Art des Initiatorkerns kann die Form des Dendrimers beeinflussen und (abhängig von der Auswahl des Initiatorkerns) zum Beispiel sphärische Dendrimere, zylindrische oder stäbchenförmige Dendrimere, ellipsoide Dendrimere oder pilzförmige Dendrimere bilden. Die aufeinanderfolgende Bildung von Generationen (d.h. die Generationsanzahl und die Größe und Art der sich wiederholenden Einheiten) bestimmt die Abmessungen der Dendrimere und die Art ihres Inneren.

[0107] Da dichte Sterndendrimere verzweigte Polymere sind, welche dendritische Verzweigungen mit funktionellen Gruppen, die auf der Peripherie der Verzweigungen verteilt sind, aufweisen, können sie mit zahlreichen Eigenschaften hergestellt werden. Zum Beispiel weisen die in **Fig.** 2A gezeigten Makromoleküle (wie Denkewalter, US-Patent 4,289,872) und die vorliegenden dichten Sterndendrimere, wie solche, die in **Fig.** 2B gezeigt

sind, entscheidend unterschiedliche Eigenschaften auf, aufgrund der Verzweigungslänge. Der in **Fig.** 2A gezeigte Dendrimertyp weist unsymmetrische (ungleiches Segment) Verzweigungsverknüpfungen, äußere (d.h. oberflächliche) Gruppen (dargestellt durch Z') und innere Einheiten (dargestellt durch Z), aber wesentlich weniger inneren Hohlraum auf. Der in **Fig.** 2B gezeigte bevorzugte Dendrimertyp besitzt symmetrische (gleiche Segmente) Verzweigungsverknüpfungen mit Oberflächengruppen (dargestellt durch Z'), zwei unterschiedlichen inneren Gruppen (dargestellt durch X und Z) mit einem inneren Hohlraum, der als Funktion der Generation (G) varriiert. Die Dendrimere, wie beispielsweise solche die in **Fig.** 2B abgebildet sind, können sich über genügend Generationen erstrecken, um Hohlraum vollständig einzuschließen und zu enthalten, um so eine Einheit mit einem überwiegend hohlen Inneren und einer dichtgedrängten Oberfläche zu ergeben.

[0108] Die schichtartige Struktur ist eher das Wesentliche der dichten Sterndendrimere als die Zusammensetzung der Elemente. Daher können die sich wiederholenden Einheiten aus einer Kombination beliebiger Elemente zusammengesetzt sein, solange diese Einheiten die multiplen Eigenschaften besitzten und wie hierin beschrieben zu der schichtförmigen Struktur assembliert sind. Diese sich wiederholenden Einheiten können vollständig aus Elementen zusammengesetzt sein, die üblicherweise in polymeren Strukturen beobachtet werden, wie beispielsweise Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff und Silicium, oder sie können aus weniger üblichen Elementen zusammengesetzt sein, vorausgesetzt, dass diese sich wiederholenden Einheiten es ermöglichen, dass eine stabile verzweigte Struktur gebildet wird. Es ist z.B. im Stand der Technik bekannt, dass Metalloide und Übergangsmetalle stabile kovalente Verbindungen und Komplexe mit organischen Gruppen bilden. Diese stabilen kovalenten Verbindungen und Komplexe mit organischen Gruppen können als verzweigte Materialien vorliegen, wie beispielsweise Borane, Borate, Germane, Stannane und Plumbane, oder als nicht verzweigte Verknüpfung, wie z.B. Dialkylzink oder Quecksilbergruppen. Die Verwendung entsprechender Liganden kann dazu führen, dass ein Übergangsmetall, wie z.B. Kobalt, als eine Verzweigungseinheit fungiert (durch Verbindung dreier einzelner Liganden) oder als nicht-verzweigte Verknüpfung (durch Verbindung zweier einzelner Liganden). Daher sind verzweigte Strukturen, welche den hierin beschriebenen Merkmalen entsprechen und ein beliebiges Element enthalten, innerhalb des Rahmens der vorliegenden Erfindung.

[0109] Dichte Sterndendrimere weisen auch „dichte sterndichte Packungen" auf, wenn sie sich über genügend Generationen erstrecken, damit die Oberfläche der Dendrimere genügend terminale Gruppen enthält, so dass die Dendrimeroberfläche gedrängt wird und Hohlräume im Inneren des Dendrimers einschließt. Diese Drängung kann eine Barriere auf Molekülebene bereitstellen, die verwendet werden kann, um die Diffusion von Materialien in das Innere des Dendrimers hinein oder aus dem Inneren des Dendrimers heraus zu kontrollieren.

[0110] Die Oberflächenchemie der Dendrimere kann auf eine vorbestimmte Weise kontrolliert werden, indem eine sich wiederholende Einheit ausgewählt wird, die die gewünschte chemische Funktionalität aufweist, oder indem alle oder ein Teil der Oberflächenfunktionalitäten modifiziert werden, um neue Oberflächenfunktionalitäten zu bilden. Zum Beispiel können diese Oberflächen entweder zielsteuernd gegenüber speziellen Stellen sein oder gegenüber der Aufnahme durch bestimmte Organe oder Zellen, z.B. retikuloendotheliale Zellen, resistent gemacht werden.

[0111] Bei einer alternativen Verwendung der dichten Sterndendrimere können Dendrimere selbst miteinander auf mehrere Weisen verknüpft werden (enthalten in der Bezeichnung „assoziiert mit"), um polydendritische Gruppen (verbrückte dichte Sterndendrimere oder Dendrimeraggregate) oder dichte Sterndendrimeraggregate, die auch als Träger in den Konjugaten geeignet sind, zu bilden.

[0112] Außerdem können die Dendrimere so hergestellt werden, um Abweichungen von einheitlichen Verzweigungen in bestimmten Generationen aufzuweisen, wodurch ein Mittel bereitgestellt wird, um dem Dendrimer Diskontinuitäten (d.h. Abweichungen von einheitlichen Verzweigungen an bestimmten Stellen des Dendrimers) und unterschiedliche Eigenschaften zu verleihen.

[0113] Die in den dichten Sternkonjugaten der vorliegenden Erfindung verwendeten dichten Sternpolymere können entsprechend Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, z.B. US-Patent 4,587,329, hergestellt werden. Polyamin-Dendrimere können hergestellt werden, indem Ammoniak oder ein Amin mit mehreren primären Aminogruppen oder sekundären Aminogruppen mit N-substituiertem Aziridin, wie beispielsweise N-Tosyl- oder N-Mesylaziridin, umgesetzt werden, um ein geschütztes Polysulfonamid der ersten Generation zu bilden. Das Polysulfonamid der ersten Generation wird anschließend mit Säure, wie beispielsweise Schwefelsäure, Salzsäure, Trifluoressigsäure, Fluorsulfonsäure oder Chlorsulfonsäure, aktiviert, um das Polyaminsalz der ersten Generation zu bilden. Bevorzugt wird die Desulfonylierung unter Verwendung einer starken Säure

durchgeführt, die flüchtig genug ist, um durch Destillation entfernt werden zu können, wie beispielsweise Salzsäure. Das Polyaminsalz der ersten Generation kann anschließend weiter mit N-geschütztem Aziridin umgesetzt werden, um das geschützte Polysulfonamid der zweiten Generation zu bilden. Die Sequenz kann wiederholt werden, um Polyamine höherer Generationen zu bilden.

[0114] Polyamidoamine können hergestellt werden, indem zunächst Ammoniak (oder ein Amin mit mehreren primären und/oder sekundären Amingruppen) mit Methylacrylat unter Bedingungen umgesetzt wird, die ausreichend sind, um die Michael-Addition eines Ammoniakmoleküls an drei Moleküle des Ethylacrylats hervorzurufen, um das Kernaddukt zu bilden. Im Anschluss an die Entfernung von nicht umgesetztem Methylacrylat wird diese Verbindung mit einem Überschuss an Ethylendiamin unter solchen Bedingungen umgesetzt, dass eine Aminogruppe des Ethylendiaminmoleküls mit der Methylcarboxylatgruppe des Kernaddukts reagiert, um ein Addukt der ersten Generation zu bilden, welches drei Amidoamingruppen aufweist. Im Anschluss an die Entfernung von nicht umgesetztem Ethylendiamin wird dieses Addukt der ersten Generation dann mit einem Überschuss an Methylacrylat unter den Bedingungen der Michaeladdition umgesetzt, um ein Addukt der zweiten Generation zu bilden mit terminalen Methylestergruppen. Das Addukt der zweiten Generation wird anschließend mit einem Überschuss an Ethylendiamin unter Amidbildungsbedingungen umgesetzt, um das gewünschte Polyamidoamin-Dendrimer zu bilden, das geordnete dendritische Verzweigungen der zweiten Generation mit terminalen Amingruppen aufweist. Entsprechende Dendrimere mit Amidoamingruppen können hergestellt werden, indem organische Amine als die Kernverbindung verwendet werden, z.B. Ethylendiamin, welches ein tetraverzweigtes Dendrimer bildet, oder Diethylentriamin, welches ein pentaverzweigtes Dendrimer bildet.

[0115] Um wasserfreie dichte Sternpolyethylenimine herzustellen, kann nach der Säurespaltung der Sulfonamidbindungen ein Lösungsmittel, das mit Wasser ein Azeotrop bildet, wie beispielsweise Benzol, Toluol, Xylol oder Mesitylen, bevorzugt Toluol, zugegeben werden und das resultierende Wasser/Lösungsmittel-Azeotrop kann durch azeotrope Destillation, wie beispielsweise durch Erwärmen der Mischung, unter Rückfluss entfernt werden, wobei die Wasserentfernung mit einer Dean-Stark-Falle durchgeführt wird. Alternativ kann ein chloriertes Lösungsmittel, in welchem wasserfreies Polyethylenimin löslich ist, beispielsweise Chloroform, im Trocknungsschritt verwendet werden. Die Zugabe eines chlorierten Lösungsmittels oder eines Lösungsmittels, das mit Wasser ein Azeotrop bildet, vermeidet die Notwendigkeit, das Polymer auf Temperaturen zu erwärmen, die das Polymer verkohlen oder zersetzen. Wasserfreie Polyethylenimine sind besonders nützlich als Träger für antigene Materialien (z.B. Antikörper oder Antikörperfragmente).

[0116] Dendrimere können mit sehr einheitlicher Größe und Form hergestellt werden und es ist am Wichtigsten, dass ermöglicht wird, dass eine höhere Anzahl an funktionellen Gruppen pro Einheit der Oberfläche des Dendrimers ermöglicht wird, und sie können eine höhere Anzahl an funktionellen Gruppen pro Einheit an Molekülvolumen aufweisen im Vergleich zu anderen Polymeren, die dasselbe Molekulargewicht, denselben Kern und dieselben monomeren Komponenten und dieselbe Anzahl an Kernverzweigungen wie die dichten Sternpolymere aufweisen. Die erhöhte Dichte an funktionellen Gruppen der dichten Sternpolymere kann es ermöglichen, dass eine höhere Menge an Material pro Dendrimer getragen wird. Da die Anzahl an funktionellen Gruppen auf den Dendrimeren auf der Oberfläche und im Inneren kontrolliert werden kann, wird auch ein Mittel für die Kontrolle beispielsweise der Menge an bioaktivem Mittel, das pro Dendrimer zugeführt werden soll, bereitgestellt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die dichten Sternpolymere, insbesondere die dichten Sterndendrimere zielsteuernde Träger für bioaktive Mittel, die geeignet sind, um die bioaktiven Mittel zu einem bestimmten Zielorgan oder zu einer Determinante oder einem bestimmten Bestimmungsort in einem Zielorganismus zu transportieren.

[0117] Zwischen dichten Sterndendrimeren früher Generationen (d.h. Generation = 1–7) und klassischen sphärischen Mizellen kann eine Analogie aufgestellt werden. Die Dendrimer-Mizell-Analogie wurde abgeleitet, indem Merkmale verglichen wurden, die sie gemeinsam hatten, wie z.B. Form, Größe und Oberflächencharakteristika.

Tabelle I

Parameter	**Regelmäßige klassische Mizellen**	**Dichte Sterndendrimere**
Form	Spärisch	Sphärisch
Größe (Durchmesser)	20-60 Å	17-67 Å
Oberflächenaggregationsanzahl	4-202	Z = 6-192 (Z ist die Anzahl an Oberflächengruppen) (Generation = 2-7)
Fläche/Oberflächengruppe (Å²)	130-80 Å²	127-75 Å²

(Å² = 10^{-1} nm; 10^{-1} = 10^{-1} nm²

[0118] In Tabelle 1 wurde die Form durch Scanning-Transmissionselektronenmikroskopie (STEM) bestätigt. Die Größe wurde durch Messungen der intrinsischen Viskosität (η) und durch Größenausschlusschromatographie (SEC) bestätigt. Die Oberflächenaggregationsanzahlen wurden durch Titrimetrie und Hochfeld-NMR überprüft. Die Fläche/Oberflächengruppe wurde aus SEC hydrodymanischen Messungen berechnet.

[0119] Die ersten fünf Generationen an dichten Sternpolyamidoamin (PAMAM)-Dendrimeren sind Mikrodomänen, die sehr genau klassische sphärische Mizellen in fast jeglicher Hinsicht (d.h. in Form, Größe, Anzahl an Oberflächengruppen und Fläche/Oberflächengruppen) nachahmen. Ein Hauptunterschied ist jedoch, dass sie im Vergleich zu der dynamisch äquillibrierenden Natur der Mizelle kovalent gebunden und robust sind. Dieser Unterschied ist ein entscheidender Vorteil bei der Verwendung dieser Mikrodomänen als Einkapselungsvorrichtungen.

[0120] Wenn mehr konzentrische Generationen als fünf zugegeben werden, tritt eine Zusammendrängung der Oberfläche auf. Diese Zusammendrängung kann zu erhöhten Barrieren-Eigenschaften auf der Oberfläche führen und bestätigt sich als ein kleineres Oberflächengebiet pro Kopf (Oberflächen)-Gruppe wie in Tabelle II gezeigt.

Tabelle 2
PAMAM Dendrimermerkmale vs. Generation

Generationen	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anzahl an Oberflächengruppen, Z	3	6	12	24	48	96	192	384	768
Molekulargewicht	275	875	2411	5147	10619	21563	43541	87227	174779
Durchmesser* gemessen durch SEC	10,4 Å	15,8 Å	22 Å	31 Å	40 Å	53 Å	67 Å	76 Å	88 Å
Oberfläche pro Dendrimer	366 Å²	783 Å²	1519 Å²	3018 Å²	5024 Å²	8820Å²	14096 Å²	18136 Å²	24328Å²
Oberfläche pro Z-Gruppe	122 Å²	131 Å²	127 Å²	126 Å²	104 Å²	92 Å²	73 Å²	47 Å²	32 Å²
Abstand zwischen Z-Gruppen	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
Hohlraumvolumen	311,6 Å³	1470,2 Å³	4737,9 Å³	11427,0 Å³					

* Hydrodynamische Durchmesser, bestimmt durch Größenausschlusschromatographie-Messungen, die gegen monodisperse (Mw/Mn = 1,02) Polyethylenoxid-Standards kalibriert wurden.

1Å 10^{-1} nm
$Å^2$ 10^{-2} nm^2
$1Å^3$ 10^{-3} nm^3

[0121] Beispielsweise weisen Amino-terminierte Generationen 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 und 9,0 verringerte Oberflächen von 104, 92, 73, 47 bzw. 32 $Å^2$ pro Z-Gruppe auf. Diese Merkmale entsprechen einer Umwandlung von einer weniger gedrängten Oberfläche zu einer stärker gedrängten mizellartigen Oberfläche mit einer barrierenartigen Bischicht/Monoschicht Oberfläche, die normalerweise mit Vesikeln (Liposomen) oder Langmuir-Blodgett-artigen Membranen zusammenhängt.

[0122] Wenn diese Oberflächenzusammendrängung auftritt, sollte mit zunehmenden Generationen von den innersten Generationen (G 6–G 8) zu den weiter äußeren Generationen (G 9 oder G 10) eine Veränderung der physikalischen Merkmale und der Morphologie beobachtet werden. Die Scanning-Transmissions-Elektronen-Mikroskopieaufnahmen (STEM) für die Generationen (G) = 7,0, 8,0 und 9,0 wurden von jeder der Proben nach Entfernung des Methanol-Lösungsmittels erhalten, um farblose, leicht gelbliche feste Filme zu bilden, woraufhin mit Osmiumtetroxid angefärbt wurde. Die vorhergesagte Änderung der Morphologie trat im Stadium von Generation (G) = 9,0 auf. Das hohle Innere bei G = 9,0 misst ungefähr 63 Å im Durchmesser und ist umgeben von einem dunklen Rand, der etwa 22 Å dick ist. Offenbar wurde Methanol-Lösungsmittel in der äußeren membranartigen 22 Å Barriere eingefangen, um das farblose Innere zu bilden. Somit verhält sich bei G = 9,0 das dichte Stern-PAMAM topologisch wie ein Vesikel (Liposom). Dieser dichte Stern ist jedoch im Vergleich zu einem Liposom um eine Größenordnung kleiner und sehr monodispers und er ist physikalisch stabiler als ein Liposom. Folglich weisen die vorliegenden Dendrimere einen inneren Hohlraum auf, der groß genug ist, um mit Lösungsmittel gefüllte Hohlräume mit einem Durchmesser von etwa 63 Å oder mehr einzukapseln (Volumen etwa 131000 $Å^3$). Diese mizellgroßen Prototypen scheinen sich in diesem fortgeschrittenen Generationsstadium wie ein kovalent fixiertes Liposom zu verhalten. Dieses Verhalten ermöglicht, dass diese Prototypen eine zusätzliche Fähigkeit besitzen, als Träger für beispielsweise nicht-chelatierende Radionuklide in dichten Stern-Antikörper-Konjugaten zur Behandlung verschiedener Säugererkrankungen zu fungieren.

[0123] Da die Anzahl an funktionellen Gruppen auf den Dendrimeren sowohl auf der Oberfläche als auch im Inneren kontrolliert werden kann, wird auch ein Mittel zur Kontrolle der Menge an getragenem Material, das pro Dendrimer transportiert werden soll, bereitgestellt. In einer Ausführungsform sind die Dendrimere zielsteuern-

de Träger für Mittel, die zur Abgabe des getragenen Materials in der Lage sind, beispielsweise zu einer bestimmten Determinanten oder an einen bestimmten Ort in einem Zielorganismus.

[0124] Zur Verwendung in den Konjugaten der vorliegenden Erfindung geeignete Dendrimere enthalten die dichten Sternpolymere oder die in den US-Patenten 4,507,466, 4,558,120, 4,568,737 und 4,587,329 beschriebenen dichten Sternpolymere.

[0125] Wie hierin verwendet, bedeutet „assoziiert mit", dass das getragene Material/die getragenen Materialien im Kern des Dendrimers physikalisch eingekapselt oder eingefangen werden können, teilweise oder vollständig in dem Dendrimer dispergiert oder an das Dendrimer gebunden oder mit dem Dendrimer verknüpft werden können, oder eine beliebige Kombination davon, wobei die Bindung oder Verknüpfung durch kovalente Bindung, Wasserstoffbindung, Adsorption, Absorption, metallische Bindung, van der Waals Kräfte oder ionische Bindung oder eine beliebige Kombination davon erfolgt. Die Assoziierung des getragenen Materials/der getragenen Materialien und des Dendrimers/der Dendrimere kann gegebenenfalls unter Verwendung von Verbindungsmitteln und/oder Spacern erfolgen, um die Herstellung oder Verwendung der dichten Sternkonjugate zu vereinfachen. Geeignete Verbindungsgruppen sind solche Gruppen, die ein Zielsteuerungsmittel (d.h. T) mit dem Dendrimer (d.h. P) verknüpfen, ohne die Wirksamkeit des Zielsteuerungsmittels oder die Wirksamkeit irgendeines getragenen Materials/getragener Materialien (d.h. M), die in dem dichten Sternkonjugat vorliegen, nachteilig zu beeinflussen. Diese Verbindungsgruppen können spaltbar oder nicht spaltbar sein und sie werden üblicherweise verwendet, um eine sterische Hinderung zwischen dem Zielsteuerungsmittel und dem Dendrimer zu vermeiden, bevorzugt sind die Verbindungsgruppen stabil (d.h. nicht spaltbar). Da die Größe, Form und Dichte an funktionellen Gruppen der dichten Sterndendrimere ganz genau kontrolliert werden kann, gibt es viele Arten, auf welche das getragene Material mit dem Dendrimer assoziiert sein kann. Zum Beispiel kann (a) eine kovalente, coulombartige, hydrophobe oder chelatartige Assoziierung zwischen dem getragenen Material/den getragenen Materialien und Einheiten, typischerweise funktionellen Gruppen, die sich an oder in der Nähe der Oberfläche des Dendrimers befinden, vorliegen; (b) es kann eine kovalente, coulombartige, hydrophobe oder chelatartige Assoziierung zwischen dem getragenen Material/den getragenen Materialien und Gruppen, die sich im Inneren des Dendrimers befinden, vorliegen; (c) das Dendrimer kann so hergestellt werden, dass es ein Inneres aufweist, das überwiegend hohl ist, um das Einfangen (z.B. physikalisch im Inneren oder durch Assoziierung mit den inneren Gruppen des dichten Sterndendrimers) der getragenen Materialien im Inneren (Hohlraumvolumen), (z.B. magnetische oder paramagnetische Kerne oder Bereiche, die durch Chelatierung und Reduktion von Metallionen zum Oxidationszustand 0 in dem Dendrimer gebildet werden) zu ermöglichen, wobei diese Dendrimere, die ein magnetisches Inneres beinhalten, verwendet werden können, um verschiedene bioaktive Einheiten, die mit verschiedenen Dendrimeroberflächen komplexiert sein können, durch Verwendung von Magneten und dergleichen zu erhalten, wobei die Freisetzung des getragenen Materials gegebenenfalls durch Zusammendrängung der Oberfläche des Dendrimers mit diffusionskontrollierenden Gruppen kontrolliert werden kann; oder es können (d) verschiedene Kombinationen der vorhergehend erwähnten Phänomene verwendet werden.

[0126] Hierin durch „P" dargestellte Dendrimere beinhalten die in den US-Patenten Nr. 4,507,466, 4,558,120, 4,568,737 oder 4,587,329 beschriebenen Sternpolymere.

[0127] Durch die Verwendung von dichten Sternkonjugaten als Träger für immunpotenzierende Mittel werden die Nachteile der Unklarheit in Kapazität und Struktur, die mit herkömmlichen bekannten oder synthetischen Polymerkonjugaten verbunden sind, die verwendet werden, um dem Antigenträger eine makromolekulare Struktur zu verleihen, vermieden. Die Verwendung der dichten Sterndendrimere als Träger für immunpotenzierende Mittel ermöglicht die Kontrolle der Größe, Form und Oberflächenzusammensetzung des Konjugats. Diese Möglichkeiten ermöglichen eine Optimierung der Antigen-Abgabe an einen Organismus, was zu Antikörpern führt, die eine größere Selektivität und eine höhere Affinität aufweisen als die Verwendung herkömmlicher Hilfsstoffe. Es kann auch wünschenswert sein, multipel antigene Peptide oder Gruppen mit dem dichten Sterndendrimer zu verbinden, wie z.B. das Anbinden von sowohl T- als auch B-Zell-Epitopen. Ein solches Design würde zu verbesserten Vakzinen führen.

[0128] Die getragenen Materialien sind bioaktive Mittel, bei denen es sich um genetisches Material handelt.

[0129] Geeignete Lösungsmittel für die Herstellung der Konjugate der Erfindung sind Lösungsmittel, in welchen P und M zumindest teilweise mischbar sind und die Lösungsmittel sind inert gegenüber der Bildung des Konjugats. Wenn P und M zumindest teilweise miteinander mischbar sind, ist möglicherweise kein Lösungsmittel erforderlich (z.B. ist die Reaktion pur). Wenn gewünscht, können Mischungen geeigneter Lösungsmittel verwendet werden. Beispiele für solche geeigneten Lösungsmittel sind Wasser, Methanol, Ethanol, Chloro-

form, Azetonitril, Toluol, Dimethylsulfoxid und Dimethylformamid.

[0130] Die Reaktionsbedingungen für die Bildung des dichten Sternkonjugats der Formel (I) hängt von dem bestimmten Dendrimer (P), dem getragenen Material (M) und der Art der gebildeten Bindung (*) ab.

[0131] Typischerweise kann die Temperatur zwischen Raumtemperatur und Rückflusstemperatur liegen. Die Auswahl des bestimmten Lösungsmittels und der bestimmten Temperatur ist für einen Fachmann naheliegend.

[0132] Das Verhältnis von M:P hängt von der Größe des Dendrimers und der Menge an getragenem Material ab.

[0133] Weitere dichte Sternkonjugate sind solche Konjugate, die ein Zielsteuerungsmittel (hierin als „T" bezeichnet) enthalten, und welche durch die Formel wiedergegeben werden:

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

worin:
jedes T ein Zielsteuerungsmittel bedeutet;
e eine ganze Zahl von 1 oder größer bedeutet; und
P, *, x, M und y wie in Anspruch 7 definiert sind, und
unter der Maßgabe, dass M seine Wirksamkeit beibehält.

[0134] Ebenfalls bevorzugte Konjugate sind solche Konjugate, in denen e = 1 oder 2 ist; und solche, in denen x = 1 und y = 2 oder größer ist. Besonders bevorzugte Konjugate sind solche, in denen x = 1, e = 1, y = 2 oder größer ist und in denen M und T mit dem Polymer über dieselben oder unterschiedliche Verbindungsmittel assoziiert sind.

[0135] Außerdem können T und/oder M in Formel (II) beschichtet oder abgeschirmt sein, um Immunogenität oder eine RES-Antwort durch beispielsweise die Leber zu verhindern. Mittel, die für diesen Zweck verwendet werden können, beinhalten Polyethylenglycol (PEG) und andere im Stand der Technik bekannte Mittel.

[0136] Die dichten Sternkonjugate der Formel (II) werden entweder durch Bildung von T*P und anschließende Zugabe von M oder durch Bildung von P*M und anschließende Zugabe von T hergestellt. Das jeweilige Reaktionsschema wird unter solchen Bedingungen durchgeführt, die für die bestimmte Konjugatkomponente nicht schädlich sind (wie beispielsweise bei einem bestimmten pH-Wert, bei bestimmten Temperaturen oder bei bestimmten Salzkonzentrationen) und wenn erforderlich in Gegenwart eines geeigneten Lösungsmittels. Um den pH-Wert zu kontrollieren, werden Puffer verwendet oder es wird eine geeignete Säure oder Base zugegeben. Die Reaktionsbedingungen sind abhängig von der Art der gebildeten Assoziierung (*) dem verwendeten dichten Sterndendrimer (P), dem getragenen Material (M) und dem Zielsteuerungsmittel (T).

[0137] Alternativ können P und M vor der Konjugation an T chelatiert werden, üblicherweise in Wasser. Die Konjugation mit T wird in einem geeigneten Puffer durchgeführt.

[0138] Das molare Verhältnis von T:P ist bevorzugt 1:1, insbesondere wenn T ein Antikörper oder ein Antikörperfragment ist. Das Molverhältnis von M:P wird wie oben sein.

[0139] Zielsteuerungsmittel, die in der Lage sind, die dichten Sternkonjugate zu dirigieren, sind Einheiten, die bei Verwendung in den dichten Sternkonjugaten der vorliegenden Erfindung dazu führen, dass mindestens ein Teil der dichten Sternkonjugate zu einem gewünschten Ziel transportiert wird (z.B. einem Protein, einem Gen, Glycoprotein, Lipoprotein, Lipid, einer Zielzelle, einem Zielorgan, einem Zielorganismus oder einer anderen Zielgruppe) und sie beinhalten Antikörper, bevorzugt monoklonale Antikörper, Antikörperfragmente, wie beispielsweise Fab, Fab', $F(ab')_2$-Fragmente oder beliebige andere Antikörperfragmente, die die erforderliche Zielspezifität aufweisen, Hormone, biologische Response Modifier; Epitope; chemische Funktionalitäten, die Zielspezifitäten aufweisen; und dergleichen.

[0140] Die Antikörper oder Antikörperfragmente, welche in bevorzugten hierin beschriebenen dichten Sternkonjugaten verwendet werden können, können durch im Stand der Technik gut bekannte Verfahren hergestellt werden. Ein Beispiel für geeignete Antikörper sind Immunoglobuline, wie beispielsweise IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. Hoch spezifische monoklonale Antikörper können durch im Stand der Technik gut bekannte Hybridisierungsverfahren hergestellt werden, siehe z.B. Kohler und Milstein (1975, Nature 256: 495–497; und 1976, Eur.

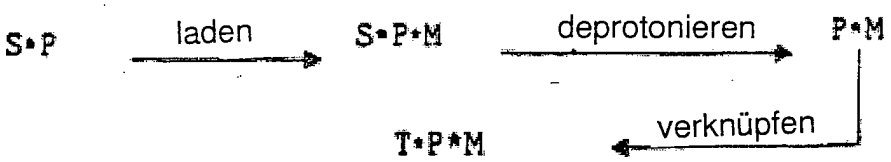
J. Immunol. 6: 511–519). Solche Antikörper besitzen normalerweise eine sehr spezifische Reaktivität.

[0141] In den Antikörper-dirigierenden dichten Sternkonjugaten können Antikörper verwendet werden, die gegen ein beliebiges Antigen oder Hapten gerichtet sind. Obwohl herkömmliche polyklonale Antikörper verwendet werden können, bieten monoklonale Antikörper verschiedene Vorteile. Ausgewählte monoklonale Antikörper sind für ein einzelnes Epitop hoch spezifisch. Außerdem können durch Gewebekultivierung (z.B. eine Hybridomazelllinie) große Mengen jedes monoklonalen Antikörpers hergestellt werden. In der vorliegenden Erfindung verwendete Antikörper können z.B. gegen Tumore, Bakterien, Pilze, Viren, Parasiten, Mykoplasma, Differenzierungs- und andere Zellmembran-Antigene, Polynukleinsäuren, wie beispielsweise DNA oder RNA, pathogene Oberflächen-Antigene, Toxine, Enzyme, Allergene, Arzneistoffe und jegliche biologisch aktive Moleküle gerichtet sein. Für eine vollständigere Liste von Antigenen siehe US-Patent 4,193,983.

[0142] Es kann wünschenswert sein, mehrere Antikörper oder Fragmente an das Dendrimer zu konjugieren; und unter bestimmten Umständen kann es wünschenswert sein, Antikörper mit verschiedenen Spezifitäten zu verwenden. Zum Beispiel kann ein bifunktionales Konjugat, das in der Lage ist, einen Tumor zu lokalisieren und an diesen zu binden und anschließend zirkulierende cytotoxische, diagnostische oder biostatische Verbindungen aufzustöbern, entworfen werden.

[0143] In Abwesenheit eines Zielsteuerungsmittels (oder falls gewünscht in Gegenwart eines Zielsteuerungsmittels) können alle (oder ein wesentlicher Teil) solche funktionellen Gruppen aufgrund der Anzahl an funktionellen Gruppen, die sich an oder in der Nähe der Oberfläche des Dendrimers befinden können, anionisch, kationisch, hydrophob oder hydrophil gemacht werden, um effektiv dabei mitzuhelfen, die dichten Sternkonjugate an ein gewünschtes Ziel mit entgegengesetzter Ladung oder an ein hydrophobes oder hydrophiles kompatibles Ziel zu liefern.

[0144] Die Herstellung der Konjugate der Formel (II) unter Verwendung eines P mit einem gestützen Henkel (S) ist auch als ein Verfahren vorgesehen, um die Konjugate der Formel (II) herzustellen. Das Reaktionsschema ist unten gezeigt:



worin
S*P das geschützte Dendrimer bedeutet;
S*P*M das geschütze Dendrimer bedeutet, welches mit M konjugiert ist;
P*M das entschützte Dendrimer bedeutet, welches mit M (dichtes Sternkonjugat) konjugiert ist;
T*P*M das dichte Sternkonjugat bedeutet, welches an die Zielsteuerungseinheit geknüpft ist.

[0145] Es können geeignete Lösungsmittel verwendet werden, die P*M nicht nachteilig beeinflussen. Wenn beispielsweise S t-Butoxycarbonyl ist und P*M in einem wässrigen Lösungsmittel stabil ist, so kann S mit wässriger Säure entfernt werden.

[0146] Außerdem sind, wenn die getragenen Materialien pharmazeutische Materialien sind, dichte Sternkonjugate bevorzugt, in welchen das Polymer direkt oder über Verbindungsstücke assoziiert ist; diese dichten Sternkonjugate werden durch die Formel dargestellt:

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

worin:
jedes C' dieselbe oder eine unterschiedliche Verbindungsgruppe bedeutet;
jedes C'' dieselbe oder eine unterschiedliche Verbindungsgruppe bedeutet; g und k jeweils unabhängig eine ganze Zahl von 1 oder größer bedeuten;
f und h jeweils unabhängig eine ganze Zahl von 0 oder größer bedeuten;
- in solchen Fällen, in denen eine Verbindungsgruppe vorhanden ist, eine kovalente Bindung bedeutet; und
P, x, *, M, y, T und e wie in Anspruch 8 definiert sind; und
unter der Maßgabe, dass M seine Wirksamkeit beibehält.

[0147] Ebenfalls bevorzugt sind solche Konjugate, in welchen x = 1 ist. Besonderes bevorzugte Konjugate

sind solche, in welchen x, e, f, h und y jeweils 1 sind und g 1 oder größer ist und k 2 oder größer ist. Am meisten bevorzugt sind solche Konjugate, in welchen x, e, f, h, y und g jeweils 1 sind und k 2 oder größer ist.

[0148] Geeignete Verbindungsgruppen, die durch C'' dargestellt sind, sind Gruppen, die das getragene Material mit dem Dendrimer verknüpfen, ohne die Wirksamkeit des getragenen Materials oder die Wirksamkeit des/der in dem dichten Sternkonjugat vorhandenen Zielsteuerungsmittel(s) zu beeinträchtigen. Diese Verbindungsgruppen müssen abhängig von der Art der Aktivität des getragenen Materials stabil (d.h. nicht spaltbar) oder spaltbar sein, und sie werden typischerweise verwendet, um eine sterische Hinderung zwischen dem getragenen Material und dem Polymer zu vermeiden.

[0149] Am meisten bevorzugt sind Konjugate, in welchen das Dendrimer direkt oder über Verbindungsgruppe(n) mit einem Antikörper oder Antikörperfragment assoziiert ist. Das Polymer in diesen bevorzugten Konjugaten kann außerdem gegebenenfalls entweder direkt oder über Verbindungsgruppe(n) mit einem oder mehreren anderen getragenen Materialien, bevorzugt einem Radioisotop, assoziiert sein. Solche dichten Sternkonjugate werden durch die Formel dargestellt:

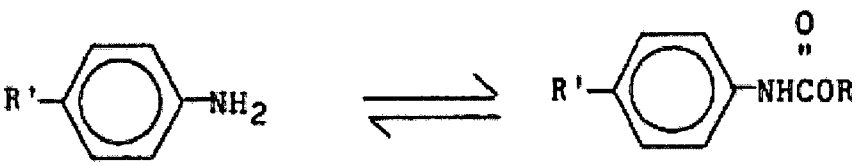
$$[(\text{Antikörper})_e\text{-}C')_f]_g\text{*}(P)_x\text{*}[(C'')_n\text{-}(M)_y]_k \qquad \text{(IV)}$$

worin
jeder Antikörper einen Antikörper oder ein Antikörperfragment bedeutet, das im Stande ist, mit einem gewünschten Epitop zu wechselwirken;
- in solchen Fällen, in denen eine Verbindungsgruppe vorliegt, eine kovalente oder coulombartige Bindung bedeutet; und P, x, *, M, T, e, y, C', C'', g, k, f und h wie vorgehend hierin definiert sind; und
unter der Maßgabe, dass M seine Wirksamkeit beibehält.

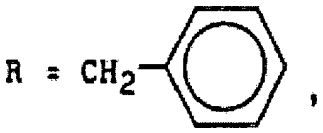
[0150] Für die obige Synthese von dichten Sterndendrimeren (P), die eine funktionelle Gruppe aufweisen, die für eine Verknüpfung (C' oder C'') mit einem Zielsteuerungsmittel (T) verfügbar ist, erfordert das bevorzugte Verfahren, dass die reaktive Funktionalität als ein synthetischer Vorläufer geschützt ist. Ein solcher Schutz ist bevorzugt, da er die Synthese eines Dendrimers oder von Konjugaten mit sehr hoher Qualität ermöglicht. Dieses Verfahren ermöglicht die chemische Bindung einer Einheit von getragenem pharmazeutischem Material (M) an die terminalen funktionellen Gruppen des dichten Sterndendrimers (P) auf Weisen, die andernfalls auch zu einer Reaktion mit einer verknüpfenden funktionellen Gruppe führen würden, sodass es unmöglich wäre, an die Zielsteuerungseinheit (T) zu binden. Eine anschließende Entschützung oder synthetische Umwandlung in die gewünschte verknüpfende funktionelle Gruppe ermöglicht es somit, dass das dichte Sternkonjugat mit dem Zielsteuerungsmittel verknüpft wird.

[0151] Eine der bevorzugten „funktionellen Gruppen für die Verknüpfung" (im Folgenden hierin als „Henkel" bezeichnet) ist eine Anilingruppe. Diese Gruppe wird bevorzugt, da sie direkt für die Verknüpfung mit dem Zielsteuerungsmittel verwendet werden kann oder sie leicht zu anderen funktionellen Gruppen modifiziert werden kann, die für eine Umsetzung mit dem Zielsteuerungsmittel, z.B. Isothiocyanat, Isocyanat, Semithiocarbazid, Semicarbazid, Bromacetamid, Jodacetamid und Maleimid geeignet sind. Die Anilingruppe ist auch deshalb als Henkel zur Verknüpfung mit den Zielsteuerungseinheiten bevorzugt, da sie für die Verwendung in der Synthese von dichten Sterndendrimeren leicht geschützt werden kann, oder die Nitrogruppe kann als ein Vorläufer verwendet werden, der am Ende der Synthese in die gewünschte Aminofunktion umgewandelt werden kann.

[0152] Es gibt mehrere Schutzgruppen, die zum Schützen der Anilin-Aminofunktionalität während der Synthese von dichten Sterndendrimeren geeignet sind (siehe Theodora W. Green, Protective Groups in Organic Synthesis, Pub. John Wiley & Son, New York, 1981). Eine bevorzugte Klasse von Schutzgruppen sind die unten gezeigten Carbamate, worin R' ein Dendrimer bedeutet.

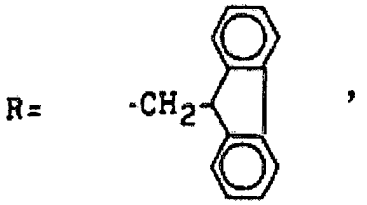


[0153] Zum Schutz von Aminen wurden viele Carbamate verwendet. Das am meisten bevorzugte Carbamat für die STARBURST™-Dendrimersynthese ist das t-Butoxycarbamat, R = $-C(CH_3)_3$. Das Entschützen wird durch milde saure Hydrolyse erzielt. Ebenfalls bevorzugt ist die Benzylcarbamat-Schutzgruppe,

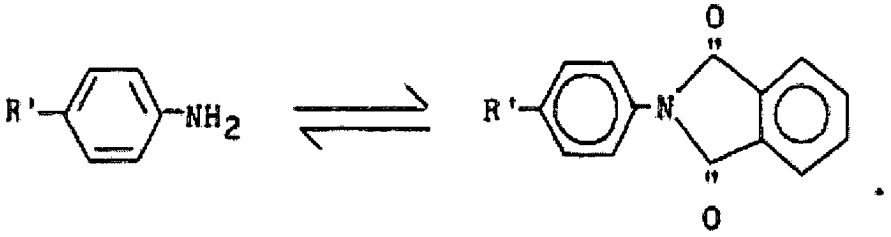


die dann bevorzugt wird, wenn das Dendrimer gegenüber saurer Hydrolyse empfindlich ist. Das Entschützen wird durch katalytische Hydrierung erreicht.

[0154] Andere Schutzgruppen, die zum Schützen der reaktiven Gruppen in dem gewünschten Generationslevel verwendet werden können, beinhalten 9-Fluorenylmethylcarbamat

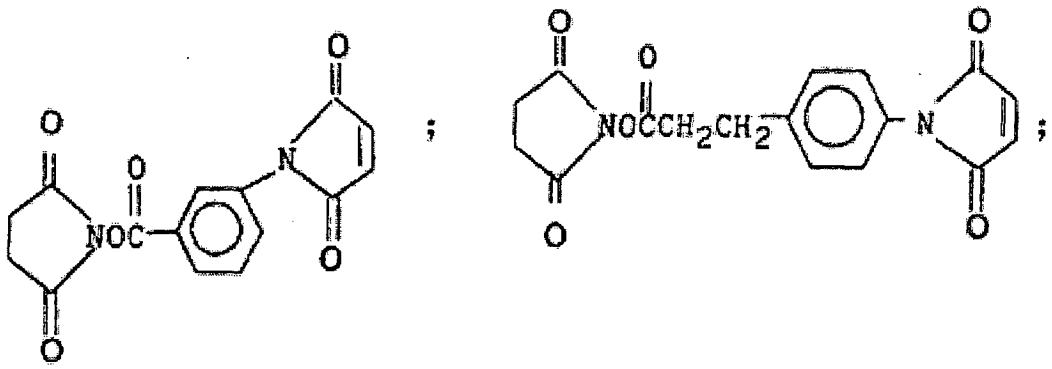


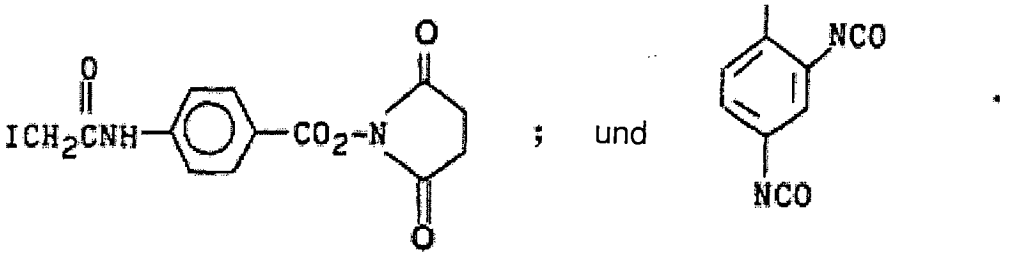
und die Phtalimid-Schutzgruppe,



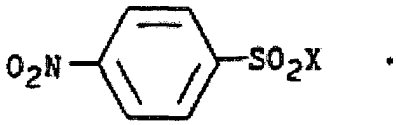
[0155] Andere für Amine verwendete Schutzgruppen, die in der Literatur gut bekannt sind, könnten ebenfalls in diesem Syntheseschema verwendet werden. Die obigen Präferenzen sind nur als veranschaulichende Beispiele angegeben, sie sind aber nicht die einzigen Schutzgruppen, die verwendet werden können. Eine beliebige Schutzgruppe, die unter den Reaktionsbedingungen stabil ist und die ohne Veränderung der Integrität des dichten Sterndendrimers entfernt werden kann, kann verwendet werden.

[0156] Ein alternatives Verfahren beinhaltet die Reaktion eines aktivierten Arylhalogenids, z.B. 4-Nitrofluorbenzol, 2,4-Dinitrofluorbenzol, mit einer Aminofunktion an dem Mittel zur Konjugation, z.B. dichten Sternpolyethyleniminen (PEI), und anschließende katalytische Hydrierung der Nitrogruppe zu der Anillin-Funktionalität für eine anschließende Konjugation. Es ist besonders nützlich für Mittel, z.B. Polyamine, bei denen vor der Verwendung eine weitere Modifikation erforderlich ist, aufgrund der relativen chemischen Inertheit der Nitrophenyl-Funktionalität gegenüber allen nicht-reduzierenden Reaktionsbedingungen. Verschiedene Kopplungsreagenzien, die für die Konjugationsreaktion geeignet sind, sind im Stand der Technik gut bekannt, wie z.B. solche, die in der veröffentlichten europäischen Anmeldung 0430863, veröffentlicht am 5. Juni 1991, diskutiert werden. Die gebräuchlicheren bifunktionalen Verknüpfungsmittel, z.B. aktive Ester oder Diisocyanate, die unter zahlreichen Reaktionsbedingungen reaktiv sind, wodurch sie für eine Konjugation nützlich sind, beinhalten:





[0157] Die Erfindung beinhaltet auch die Verwendung von Nitro-substituierten Arylsulfonylhalogeniden, um Sulfonamide zu ergeben, z.B.

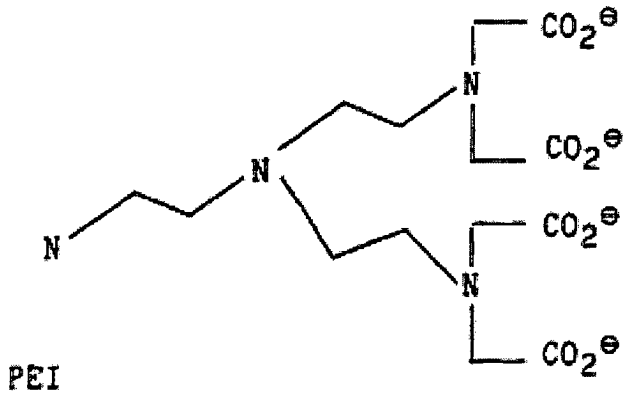


[0158] Der Vorteil dieses Verfahrens gegenüber bekannten Verfahren zur Einführung einer Aminophenylgruppe für die Konjugation ist, dass es zu einem späten Stadium der Synthese erfolgt. Gansow et al., US-Patent 4,472,509 führten in ihrem Verfahren die Nitrophenylgruppe im ersten Schritt eines langen Syntheseverfahrens ein, wodurch Einschränkungen in der verfügbaren Chemie vorliegen.

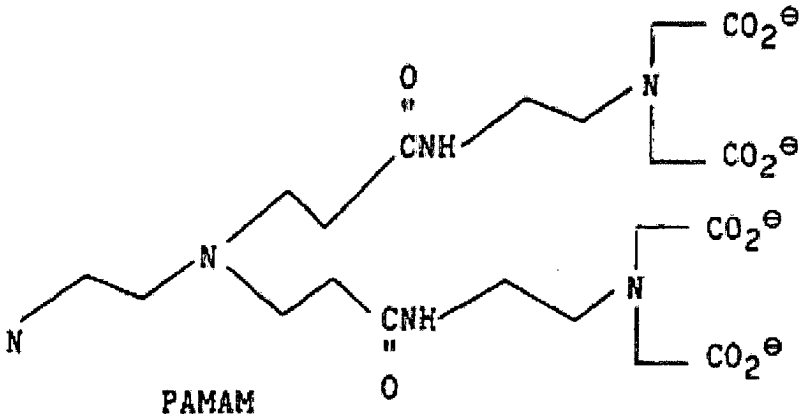
[0159] Dieses Verfahren führt ebenfalls einen Henkel ein, der von dem Rest des Moleküls klar unterscheidbar ist. Manabe et al. offenbarten, dass die Ringöffnung von Succinsäureanhydrid durch Aminreste eine Kopplungsgruppe ergab, durch welche eine Konjugation an einen Antikörper möglich war. Dieses Verfahren bot jedoch kein Mittel, um zwischen irgendwelchen nicht chelatierten Stellen an dem Polymer zu unterscheiden, da die Chelatierungsgruppen dieselben waren wie die Verknüpfungsgruppe.

[0160] Durch das obige Verfahren kann Aminophenyl-Funktionalität in ein beliebiges Mittel, das eine Aminogruppe enthält, eingebracht werden, das anschließend mit einem bioaktiven Mittel, z.B. einem monoklonalen Antikörper oder Enzym, konjugiert wird. Das Mittel kann durch oxidative Kopplung an Kohlenwasserstoffe an dem bioaktiven Mittel, z.B. einem Antikörper, konjugiert werden. Die Aminophenyl-Gruppe kann für eine anschließende Umsetzung mit den anhängenden Aminogruppen von Lysinresten an dem bioaktiven Mittel auch in ein Isothiocyanat oder Isocyanat umgewandelt werden.

[0161] Das vorliegende Verfahren ermöglicht auch die direkte Chelatierung von Lanthaniden mit STARBURST™-Dendrimeren, bevorzugt durch PEI-Acetat-Dendrimer. Im Gegensatz dazu bemerkt Denkewalter, US-Patent 4,289,872, dass nur das Zugeben von Acetaten auf die Oberfläche seines Polymers funktioniert. Die vorliegende Reaktion zeigt jedoch, dass PEI-Acetat viel besser funktioniert als PAMAM, d.h. die Oberfläche von Iminodiacetaten ist nur ein Teil der Geschichte, die Art des Rückgrats und der Verzweigung ist ebenfalls sehr wichtig. Das PEI-Acetat weist bessere Chelatierungseigenschaften auf als das PAMAM-Acetat.



PEI



PAMAM

[0162] Von diesen dichten Sternkonjugaten der Formel (IV) sind solche Konjugate bevorzugt, in welchen x = 1. Besonders bevorzugt sind solche Konjugate, in welchen x, e, f, h und y jeweils 1 sind und g 1 oder größer ist und k jeweils unabhängig 2 oder größer ist. Am meisten bevorzugt sind solche Konjugate, in welchen x, e, f, h, y und g jeweils 1 sind und k 2 oder größer ist. Ebenfalls besonders bevorzugt sind solche dichten Sternkonjugate, in welchen T einen monoklonalen Antikörper oder ein Epitop-Bindungsfragment davon bedeutet; und besonders bevorzugt sind solche, in welchen T ein Zielsteuerungsmittel, wie beispielsweise ein Antikörper, monoklonaler Antikörper oder Antikörperfragment, virales Fragment, einzelsträngige DNA, eine Polynukleinsäure oder ein Genfragment ist, oder T nicht vorhanden ist.

[0163] Die dichten Sternkonjugate können für zahlreiche diagnostische Anwendungen in vitro oder in vivo verwendet werden, wie beispielsweise für Radioimmunoassays, Elektronenmikroskopie, enzymverknüpfte Immunoadsorptionsassays, kernmagnetische Resonanzspektroskopie, Kontrastimaging und Immunoszintographie, in analytischen Anwendungen, in therapeutischen Anwendungen, zur Verwendung bei der Behandlung von Erkrankungen wie beispielsweise Krebs, Autoimmunerkrankungen, Gendefekten, Erkrankungen des zentralen Nervensystems, infektiösen Erkrankungen und Herzerkrankungen.

[0164] Die vorliegende Erfindung ist auch auf dichte Sternkonjugat-Zusammensetzungen gerichtet, in welchen die dichten Sternkonjugate mit anderen geeigneten Vehikeln formuliert sind. Die dichten Sternkonjugat-Zusammensetzungen können gegebenenfalls andere Wirkstoffe, Additive und/oder Verdünnungsmittel enthalten. Injizierbare Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können entweder in Form einer Suspension oder in Form einer Lösung vorliegen. In Form einer Lösung ist der Komplex in einem physiologisch annehmbaren Träger gelöst. Solche Träger umfassen ein geeignetes Lösungsmittel, wenn benötigt Konservierungsstoffe wie beispielsweise Benzylalkohol, und Puffer. Geeignete Lösungsmittel beinhalten z.B. Wasser, wässrige Alkohole, Glycole und Phosphonat- oder Carbonatester. Das Dendrimer-Arzneistoffkonjugat könnte auch in Vehikeln oder Liposomen inbegriffen sein. Das Konjugat könnte auch in polymere Wirtssysteme eingekapselt sein, die entweder abbaubar sein könnten (d.h. Milchsäure-Glycolsäure-Copolymere oder ein Polyanhydrid-Polymer) oder sie können nicht abbaubar sein (Ethylen-Vinylacetat-Copolymer). Das Konjugat könnte auch in einer Hydrogelmatrix eingebaut sein, die entweder Poly(hydroxyethylmethacrylat) oder Poly(vinylalkohol) umfasst. Zahlreiche enterische Beschichtungssysteme könnten verwendet werden, um dabei mitzuhelfen, dass das Dendrimer-Arzneistoffkonjugat den Magen passiert.

[0165] Das Dendrimer-Arzneistoffkonjugat könnte unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Bindemitteln in eine Tablette formuliert werden. Solche Dosierungsformen sind in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. Edition, 1990, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, beschrieben. Geeignete Tabletten beinhalten komprimierte Tabletten, zuckerbeschichtete Tabletten, filmbeschichtete Tabletten, enterisch beschichtete Tabletten, multipel komprimierte Tabletten, Tabletten zur kontrollierten Freisetzung und dergleichen.

[0166] Enterisch beschichtete Tabletten sind in der Praxis der vorliegenden Erfindung von besonderem Vorteil. Enterische Beschichtungen sind solche, die im Magen intakt bleiben, sich jedoch auflösen und die Inhaltsstoffe der Dosierungsform freisetzen, sobald sie das kleine Interstinum erreichen. Der Zweck einer enterischen Beschichtung ist es, die Freisetzung von Arzneistoffen zu verzögern, die durch Mageninhalte inaktiviert werden oder die durch Irritation der gastrischen Mucosa Nausea oder Blutungen verursachen. Außerdem können solche Beschichtungen verwendet werden, um einfach wiederholte Wirkung zu ergeben, wenn zusätzlicher Wirkstoff, der über der enterischen Beschichtung appliziert wurde, im Magen freigesetzt wird, während der Rest, der durch die Beschichtung geschützt ist, weiter unten im Gastrointestinaltrakt freigesetzt wird.

[0167] Die Wirkung von enterischen Beschichtungen rührt von einem Unterschied der Zusammensetzung der entsprechenden gastrischen und Intestinalumgebungen im Hinblick auf pH-Wert und enzymatische Eigenschaften her. Obwohl es wiederholte Versuche gab, Beschichtungen herzustellen, die einer intestinalen Enzymzersetzung unterliegen, ist dieser Ansatz nicht gängig, da eine enzymatische Zersetzung des Films eher langsam ist. Daher sind die am meisten verwendeten enterischen Beschichtungen solche, die in einer Umgebung des Magens mit niedrigem pH-Wert undissoziiert bleiben, die jedoch leicht ionisiert werden, wenn der pH-Wert auf etwa 4 oder 5 ansteigt. Die wirkungsvollsten enterischen Polymere sind Polysäuren mit einem pK-Wert von 3 bis 5.

[0168] Nützliche Polymere für die Herstellung von enterisch beschichteten Tabletten beinhalten Celluloseacetatphthalat, Polyvinylacetatphthalat, Hydroxypropylmethylcellulosephthalat, Methacrylsäureester-Copolymere und dergleichen.

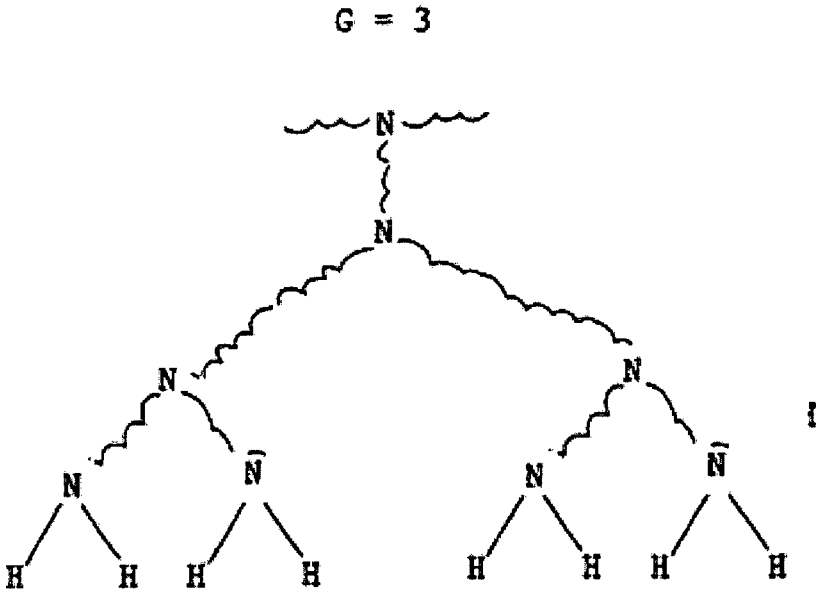
[0169] Das bevorzugte dichte Sternpolymer zur Verwendung in den dichten Sternkonjugaten der vorliegenden Erfindung ist ein Polymer, das als ein dichtes Sternpolymer mit mindestens einer Verzweigung (im Folgenden hierin als Kernverzweigung bezeichnet), bevorzugt zwei oder mehr Verzweigungen, die von einem Kern ausgehen beschrieben werden kann, wobei diese Verzweigung mindestens eine terminale Gruppe aufweist, mit der Maßgabe, dass (1) das Verhältnis von terminalen Gruppen zu den Kernverzweigungen größer als eins, bevorzugt zwei oder größer ist, (2) die Dichte an terminalen Gruppen pro Volumeneinheit im Polymer mindestens das 1,5fache desjenigen eines ausgedehnten herkömmlichen Sternpolymers mit gleichem Kern und monomeren Gruppen und einem vergleichbaren Molekulargewicht und einer vergleichbaren Anzahl an Kernverzweigungen ist, wobei jede solcher Verzweigungen des ausgedehnten herkömmlichen Sternpolymers nur eine terminale Gruppe trägt und (3) ein molekulares Volumen vorliegt, das nicht größer als etwa 80% des molekularen Volumens des ausgedehnten herkömmlichen Sternpolymers ist, wie durch Größenuntersuchungen unter Verwendung skalierter Corey-Pauling-Koltun (CPK) Molekularmodelle bestimmt. Wie hierin verwendet, bedeutet die Bezeichnung „dicht" für die Modifizierung von „Sternpolymer" oder „Dendrimer", dass es ein kleineres molekulares Volumen als ein ausgedehntes herkömmliches Sternpolymer mit demselben Molekulargewicht aufweist. Das ausgedehnte herkömmliche Sternpolymer, das als Grundlage für den Vergleich mit dem dichten Sternpolymer verwendet wird, ist eines, das dasselbe Molekulargewicht, denselben Kern und dieselben monomeren Komponenten und dieselbe Anzahl an Kernverzweigungen aufweist wie das dichte Sternpolymer. Mit „ausgedehnt" ist gemeint, dass die einzelnen Verzweigungen des herkömmlichen Sternpolymers auf ihre maximale Länge ausgedehnt oder gestreckt sind. Zudem ist die chemische Struktur der terminalen Gruppen dieselbe, während die Anzahl an terminalen Gruppen für dichte Sternpolymer-Moleküle größer ist als in dem herkömmlichen Sternpolymer-Molekül.

[0170] In den Konjugaten der vorliegenden Erfindung verwendete Dendrimere können durch im Stand der Technik bekannte Verfahren hergestellt werden. Die obigen Dendrimere, die verschiedenen Co-Reagenzien und Kernkomponenten und Verfahren für deren Herstellung können wie im US-Patent 4,587,329 definiert sein. Beispielsweise können Kernkomponenten irgendetwas sein, an das weitere Gruppen gebunden werden können [siehe **Fig. 1** und 2(B)].

[0171] Die Dendrimere zur Verwendung in den Konjugaten der vorliegenden Erfindung können terminate Gruppen aufweisen, die ausreichend reaktiv sind, um Additions- oder Substitutionsreaktionen zu durchlaufen. Beispiele für solche terminalen Gruppen beinhalten Amino-, Hydroxy-, Mercapto-, Carboxy-, Alkenyl-, Nitril-,

Allyl-, Vinyl-, Amid-, Halogen-, Harnstoff-, Oxiranyl-, Aziridinyl-, Oxazolinyl-, Imidazolinyl-, Sulfonat-, Silanyl-, Phosphonat-, Kronenether-, Bipyridin-, Chlormethylphenyl-, Isocyanat, Isothiocyanat-Gruppen. Die terminalen Gruppen können modifiziert werden, um sie biologisch inert zu machen, beispielsweise um sie nicht-immunogen zu machen oder um eine nicht spezifische Aufnahme in der Leber, Milz oder einem anderen Organ zu vermeiden, z.B. durch Verwendung von Polyethylenglycol (PEG) oder Polyacylpolyalkylenimin (d.h. Polyacylpolyethylenimin)-Gruppen mit verschiedenen Längen, die an die Dendrimeroberfläche gebunden sind. Die Dendrimere unterscheiden sich von herkömmlichen Sternpolymeren oder sternförmig verzweigten Polymeren insofern, als die Dendrimere eine größere Konzentration an terminalen Gruppen pro Einheit an Molekülvolumen aufweisen als herkömmliche ausgedehnte Sternpolymere mit einer äquivalenten Anzahl von Kernverzweigungen und einer äquivalenten Kernverzweigungslänge. Daher ist die Dichte an terminalen Gruppen pro Volumeneinheit in dem Dendrimer üblicherweise mindestens das 1,5fache der Dichte an terminalen Gruppen in dem herkömmlichen ausgedehnten Sternpolymer, bevorzugt mindestens das 5fache, weiter bevorzugt das mindestens 10fache, am meisten bevorzugt das 15–50fache. Das Verhältnis an terminalen Gruppen pro Kernverzweigung in dem dichten Polymer ist bevorzugt mindestens 2, weiter bevorzugt mindestens 3, am meisten bevorzugt 4 bis 1024. Bevorzugt beträgt für ein bestimmtes Polymermolekülgewicht das Molekülvolumen des dichten Sternpolymers weniger als 70 Vol.-%, weiter bevorzugt von 16 bis 60, am meisten bevorzugt von 7 bis 50 Vol.-% des Molekülvolumens des herkömmlichen ausgedehnten Sternpolymers.

[0172] Bevorzugte Dendrimere zur Verwendung in den Konjugaten der vorliegenden Erfindung sind dadurch gekennzeichnet, dass sie einen einwertigen oder mehrwertigen Kern aufweisen, der kovalent an dendritische Verzweigungen gebunden ist. Eine solche geordnete Verzweigung kann durch die folgende Sequenz veranschaulicht werden, worin G die Anzahl an Generationen bedeutet:



[0173] Mathematisch führt die in der Herstellung der Dendrimere verwendete präzise Abfolge zu präzisen, vorhersagbaren Stöchiometrien in jedem Dendrimermolekül. Zum Beispiel hängt die Anzahl an wiederholten Einheiten innerhalb eines Dendrimers von der Anzahl an Generationen (G), der Multiplizität der wiederholten Einheit (N_r), und der Multiplizität des Kernmoleküls oder Kernatoms (N_c) ab. In einem homopolymeren Dendrimer, in dem dieselbe wiederholte Einheit über das gesamte Molekül verwendet wird, ist die Gesamtanzahl an wiederholten Einheiten innerhalb eines Dendrimers, dessen Grad an Polymerisation (DP) gegeben durch

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

[0174] Die Gesamtvalenz oder Anzahl an terminalen Einheiten an dem Dendrimer (Y) ist gegeben durch

$Y = N_c N r^G$.

[0175] Es ist oft günstiger oder leichter ersichtlich, die Anzahl an terminalen Gruppen an dem Dendrimer (Z) zu betrachten, da jede Gruppe verschiedene Valenzen oder mehrere Valenzen enthalten kann, die in anschlie-

ßenden chemischen Modifikationen variiert. Daher ist die Anzahl an terminalen Gruppen definiert durch:

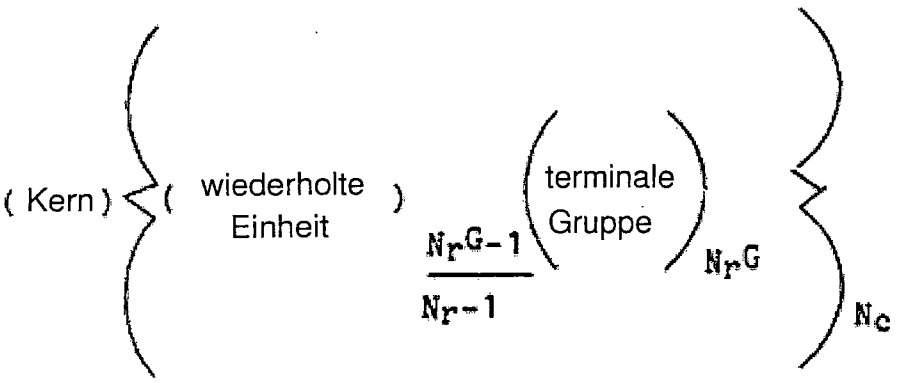
$$\#\text{ an terminalen Gruppen pro Dendrimer (Z)} = \frac{N_c N_r^G}{\text{Wertigkeit der terminalen Gruppe}}.$$

[0176] Dies kann durch die terminale Amino-Gruppe veranschaulicht werden, die bei der Polyaminsynthese eine Wertigkeitkeit von 2 besitzt. In diesem Fall ist die

$$\#\text{ an terminalen Gruppen pro Dendrimer (Z)} = \frac{N_c N_r^G}{2}.$$

[0177] Für anschließende Modifikationen von Dendrimeren ist die Anzahl günstiger, da die Valenz der Amino-Gruppe von der verwendeten Chemie abhängt. Beispielsweise wird eine primäre Amino-Endgruppe leicht mit nur einem Estermolekül reagieren, um ein Amid zu bilden mit zwei Molekülen Alkylierungsmittel (unter milden Bedingungen, z.B. Eschweiler-Clarke-Bedingungen), um ein tertiäres Amin zu bilden oder mit drei Molekülen Alkylierungsmittel (unter drastischeren Bedingungen, z.B. Reaktion mit Alkylsulfonaten), um ein quartäres Ammoniumsalz zu bilden.

[0178] Dementsprechend können die Dendrimere dieser Erfindung wie folgt durch ihre Bestandteile dargestellt werden:

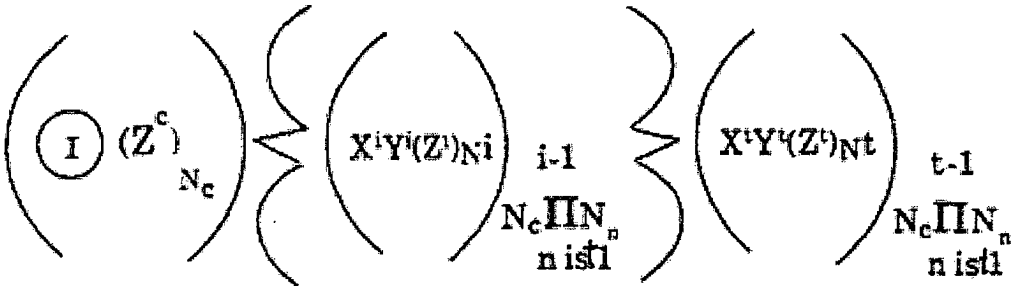


worin der Kern (I) ein Initiatormolekül oder -Atom ist; terminate Gruppe das Atom, Molekül oder eine funktionelle Gruppe ist, die die Bindungsstellen der wiederholten Einheit besetzt, z.B. Wasserstoff oder eine Methoxygruppe oder ein Ester; G und N_c wie vorher definiert sind; und die wiederholte Einheit eine Valenz oder Funktionalität von $N_r + 1$ besitzt, worin N_r wie oben definiert ist.

[0179] Ein copolymeres Dendrimer, das ein bevorzugtes Dendrimer für die Zwecke der Erfindung ist, ist eine einzigartige Verbindung, die aus polyfunktionellen Monomereinheiten in einer hoch verzweigten (dendritischen) Anordnung konstruiert ist. Das Dendrimermolekül wird aus einer polyfunktionellen Inititatoreinheit [Kernkomponente, Kern (I)], polyfunktionellen, sich wiederholenden Einheiten und terminalen Einheiten, die gleich oder unterschiedlich von den sich wiederholenden Einheiten sein können, hergestellt. Die Kernkomponente wird durch die Formel (I) $(Z^c)_{Nc}$ dargestellt, worin Kern (I) den Kern bedeutet, Z^c die an dem Kern (I) verfügbaren Bindungsstellen darstellt und N_c die Kernfunktionalität oder Anzahl von Bindungsstellen bedeutet, die bevorzugt 2 oder mehr, am meisten bevorzugt 3 oder mehr ist. Somit umfasst das Dendrimermolekül einen polyfunktionellen Kern (I), der an mehrere (N_c) funktionelle Gruppen Z^c gebunden ist, von denen jede an den monofunktionellen Schwanz einer sich wiederholenden Einheit $X^1Y^1(Z^1)_N1$ der ersten Generation gebunden ist und jede der Z-Gruppen der sich wiederholenden Einheit einer Generation an einen monofunktionellen Schwanz einer sich wiederholenden Einheit der nächsten Generation gebunden ist, bis die letzte Reihe oder Schicht erreicht ist.

[0180] In dem Dendrimermolekül sind die sich wiederholenden Einheiten innerhalb einer einzigen Generation i dieselben, sie können sich jedoch von Generation zu Generation unterscheiden. In der sich wiederholenden

Einheit $X^1Y^1(Z^1)_N1$ bedeutet X^1 den monofunktionellen Schwanz der sich wiederholenden Einheit der ersten Generation, Y^1 bedeutet die Einheit, welche die erste Generation bildet, Z^1 bedeutet eine Bindungsstelle des polyfunktionellen Kopfs der sich wiederholenden Einheit der ersten Generation und kann gleich oder unterschiedlich von den Bindungsstellen der Kernkomponente (I) $(Z^c)_{Nc}$ oder anderen Generationen sein; und N^1 ist eine Zahl von 2 oder mehr, am meisten bevorzugt 2, 3 oder 4, welche die Multiplizität des polyfunktionellen Kopfs der sich wiederholenden Einheit in der ersten Generation bedeutet. Die sich wiederholende Einheit wird generisch durch die Formel $X^iY^i(Z^i)_Ni$ widergegeben, worin „i" die bestimmte Generation von der ersten bis zu der t – 1 ten Generation bedeutet. Somit ist in dem bevorzugten Dendrimermolekül jedes Z^1 der sich wiederholenden Einheit der ersten Generation an ein X^2 einer sich wiederholenden Einheit der zweiten Generation gebunden und so weiter über die Generationen, so dass jede Z^i-Gruppe für eine sich wiederholende Einheit $X^iY^i(Z^i)_Ni$ in der Generation der Nummer „i" an den Schwanz (X^{i-1}) der sich wiederholenden Einheit der Generation „i + 1" gebunden ist. Die letzte oder terminate Reihe eines bevorzugten Dendrimermoleküls umfasst terminale Einheiten $X^tY^t(Z^t)_{Nt}$, worin t eine terminale Einheit bedeutet und X^t, Y^t, Z^t und N^t gleich oder unterschiedlich von X^i, Y^i, Z^i und N^i sein können, außer es ist keine darauf folgende Generation an die Z^t-Gruppen gebunden, und N^t kann kleiner als zwei, z.B. null oder eins sein, und alle diese terminalen Einheiten $X^tY^t(Z^t)_Nt$, brauchen nicht identisch zueinander sein. Daher weist das bevorzugte Dendrimer eine molekulare Formel auf, die dargestellt ist durch



worin i 1 bis t – 1 ist und die Symbole wie vorhergehend definiert sind. Die Π-Funktion ist das Produkt aller Werte zwischen ihren definierten Grenzen. Somit ist

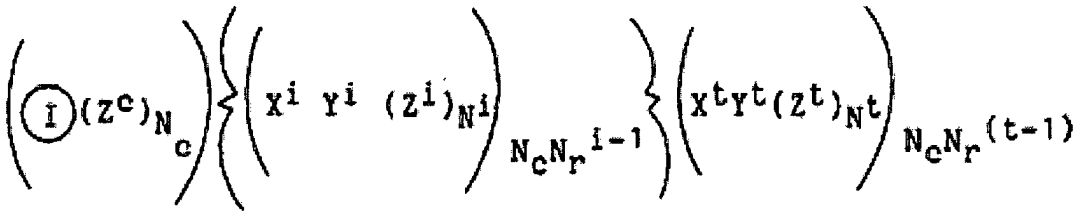
$$\prod_{n=1}^{i-1} N^n = (N^1)(N^2)(N^3)\cdots(N^{i-2})(N^{i-1})$$

welches die Anzahl an sich wiederholenden Einheiten $X^iY^i(Z^i)_Ni$ ist, umfassend die i-te Generation einer dendritischen Verzweigung, und wenn i 1 ist, dann:

$$\prod_{n=1}^{0} N^n = 1 \quad ,$$

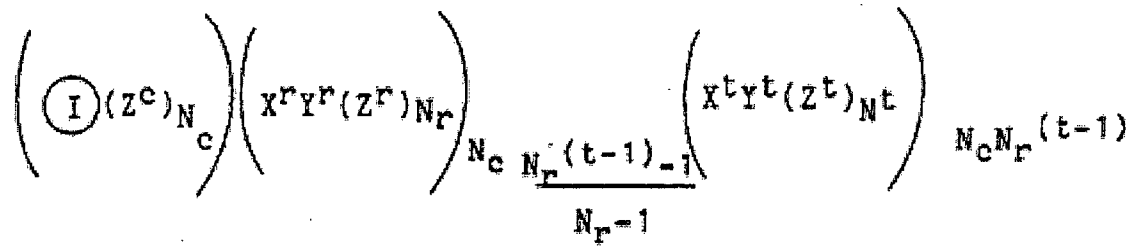
[0181] In copolymeren Dendrimeren unterscheidet sich die wiederholte Einheit einer Generation von der wiederholten Einheit mindestens einer anderen Generation. Die bevorzugten Dendrimere sind hoch symmetrisch, wie in den hierin im Folgenden beschriebenen Strukturformeln veranschaulicht. Bevorzugte Dendrimere können durch Kontakt mit einem weiteren Reagenz in funktionalisierte Dendrimere umgewandelt werden. Zum Beispiel ergibt die Umwandlung von Hydroxyl in der äußersten Schicht oder Reihe in eine Estergruppe durch Umsetzung mit einem Säurechlorid ein Dendrimer, das terminal Ester-funktionalisiert ist. Diese Funktionalisierung muss nicht bis zu dem theoretischen Maximum, das durch die Anzahl an verfügbaren funktionellen Gruppen definiert ist, durchgeführt werden und somit ist es möglich, dass ein funktionalisiertes Dendrimer keine hohe Symmetrie oder eine genau definierte molekulare Formel aufweist, wie es bei dem bevorzugten Dendrimer der Fall ist.

[0182] In einem homopolymeren Dendrimer sind alle der wiederholten Einheiten $X^iY^i(Z^i)_Ni$ identisch. Da die Werte aller N^i gleich sind (als N_r definiert), vereinfacht sich die Produktfunktion, welche die Anzahl an sich wiederholenden Einheiten darstellt, auf eine einfache exponentielle Formel. Daher kann die Molekülformel auf einfachere Weise ausgedrückt werden als:

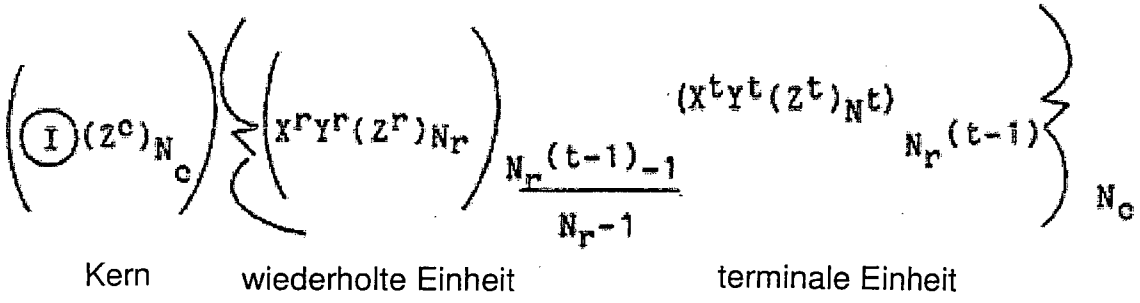


worin i = 1 bis t – 1.

[0183] Diese Formel zeigt noch die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Generationen i, die jeweils aus $N_cN_r^{i-1}$ sich wiederholenden Einheiten $X^iY^i(Z^i)_Ni$ bestehen. Eine Verbindung der Generationen zu einem Term ergibt:



oder



worin ein $X^rY^r(Z^r)_{Nr}$ die sich wiederholende Einheit, die in allen Generationen i verwendet wird, bedeutet. Diese Formel ist im wesentlichen dieselbe, wie die mit (*) gekennzeichnete mit G = t – 1.

[0184] Wenn eine Polymerverbindung in diese obigen Formeln passt, dann ist das Polymer folglich ein dichtes Sternpolymer. Umgekehrt ist das Polymer kein dichtes Sternpolymer, wenn eine Polymerverbindung nicht in diese obigen Formeln passt. Um zu ermitteln, ob ein Polymer ein dichtes Sternpolymer ist, ist es auch nicht notwendig, das Verfahren zu kennen, mit dem es hergestellt wurde, sondern nur, ob es in die Formeln passt. Die Formeln zeigen auch die Generationen (G) oder Reihen von Dendrimeren.

[0185] Die vorhergehenden mathematischen Formeln basieren auf dem Bezug zu der ersten Iteration von Reaktionen um den Kernreaktanten als Generation 1. Somit würde bei einem Polyamidoamin-dichten-Sterndendrimer das Reaktionsprodukt von Methylacrylat mit dem Ammoniakkern als Generation 0,5 bezeichnet werden und das darauffolgende Reaktionsprodukt von EDA mit Methylacrylat würde als Generation 1,0 bezeichnet werden.

[0186] In einer Variation dieser Nomenklatur wird die erste Iteration als Generation 0 anstelle von Generation 1 bezeichnet. Das Reaktionsprodukt von Methylacrylat mit dem Ammoniakkern wäre Generation –0,5 und das darauffolgende Reaktionsprodukt von EDA mit dem Methylacrylat wäre Generation 0. Bei dieser alternativen Nomenklatur würden sich alle Nummern der Generationen dieser Anmeldung jeweils um 1 verringern.

[0187] Unter dieser bearbeiteten Nomenklatur wird die Formel für den Polymerisationsgrad

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

[0188] Die Formel für die Anzahl an terminalen Gruppen an Dendrimer (Y) ist:

$Y = N_c N_r^G$

worin Y in Z (Anzahl an terminalen Gruppen/Dendrimer) umgewandelt werden kann, indem durch die Multiplizität der terminalen Gruppe, wie hierin oben beschrieben, dividiert wird.

[0189] Die Anzahl an Dendrimerverzweigungszellen (N_{BC}) wird wie folgt ausgedrückt:

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

[0190] Die theoretische Molmasse (M) kann ausgedrückt werden:

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

oder

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

wobei M_c die molare Masse des Initiatorkerns ist, M_{RU} die molare Masse der sich wiederholenden Einheiten ist, M_{BC} die molare Masse der Verzweigungszellen ist und M_t die molare Masse der terminalen Einheiten ist.

[0191] Es gibt natürlich mehrere Wege, um das Verhältnis von Mittel (M) zu Dendrimer (P) zu bestimmen, die davon abhängen, wie und wo die Assoziation von P*M auftritt. Wenn es eine interne Einkapselung gibt, so ist das Gewichtsverhältnis von M:P üblicherweise 10:1, bevorzugt 8:1, weiter bevorzugt 5:1, am meisten bevorzugt 3:1. Das Verhältnis kann auch so klein wie 0,5:1 bis 0,1:1 sein. Wenn interne Stöchiometrie verwendet wird, ist das Gewichtsverhältnis von M:P dasselbe wie für interne Einkapselung. Wenn die äußere Stöchiometrie bestimmt wird, ist das Mol/Mol-Verhältnis von M:P durch die folgenden Formeln gegeben:

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

worin N_c die Kernmultiplizität bedeutet, N_t die durchschnittliche Multiplizität der terminalen Gruppe bedeutet und N_r die Verzweigungsknüpfungsmultiplizität bedeutet. Der Term $N_c N_t N_r^{t-1}$ ergibt die Anzahl an terminalen Einheiten. Somit kann sich z.B. oben (A) ergeben, wenn sich Proteine, Enzyme oder hoch geladene Moleküle auf der Oberfläche befinden; es kann oben (B) resultieren, wenn Aspirin, 2,4-D oder Oktansäure vorliegt; es kann oben (c) resultieren, wenn Oberflächen-Estergruppen in Carboxylat-Ionen oder Gruppen umgewandelt

werden.

[0192] Selbstverständlich können andere Strukturen verschiedener Dimensionen durch einen Fachmann leicht hergestellt werden, bei entsprechender Variation der Dendrimerkomponenten und der Anzahl an verwendeten Generationen. Ein grob skalierter Vergleich von drei unterschiedlichen Dendrimerserien im Verhältnis zu einem IgG-Antikörper ist in Fig. 3 zu sehen. Die in **Fig.** 3(B) I angegebene Reihe von Zeichnungen zeigt die dichten Sternpolyamidoamine (PAMAM); II zeigt die dichten Sternpolyether (PE) und III zeigt die dichten Sternpolyethylenimine (PEI). Auf entsprechende Weise wie Fig. 1 zeigen alle drei Serien (I), (II) und (III) jeweils in der ganz linken Zeichnung den Initiatorkern, die nächste Zeichnung von links zeigt das Sternverzweigungsoligomer und die übrigen Zeichnungen zeigen die dichten Sternoligomere bzw. verbrückte dichte Sternpolymere. Es ist in diesen Serien von Maßstabszeichnungen ersichtlich, dass die Dendrimergrößenordnungen denen für den gesamten IgG-Antikörper nahe kommen und tatsächlich kleiner sind, **Fig.** 3(A). Der IgG-Antikörper ist ganz links in Fig. 3 gezeigt. Der Maßstab ist 1 mm = 3,5 Å. In **Fig.** 3(A) ist der variable Bereich durch (A) gezeigt; der konstante Bereich ist durch (B) und die Kohlenwasserstoff-Verbindungsstellen sind durch (C) gezeigt. Entsprechende in Fig. 3 gezeigte Messungen zeigen folgendes: (1) ist 35–40 Å; (2) ist 70 Å und (3) ist 60 Å. Diese Größen-Eigenschaften sind beispielsweise dann bevorzugt, wenn an einer Zielsteuerung ein Austritt aus dem vaskulären System beteiligt ist. Daher sind Dendrimerdurchmesser von 125 Angström-Einheiten oder weniger insofern besonders bevorzugt, als sie es ermöglichen können, aus dem vaskulären System zu den Zielorganen, die durch kontinuierliche oder befensterte Kapillaren versorgt werden, auszutreten. Diese Größenordnungen sind insofern entscheidend, als sie im Vergleich zu der Größe einer potenziellen zielsteuernden Komponente, wie beispielsweise einem Antikörper (siehe Fig. 3), klein sind. Ein lineares Polymer mit vergleichbarem Molekulargewicht hätte einen Gyrationsradius (in seiner voll ausgedehnten Form), der viel größer wäre als ein Dendrimer mit demselben Molekulargewicht. Man würde von einem linearen Polymer dieser Art annehmen, dass es die molekularen Erkennungseigenschaften vieler akzeptierter Zielsteuerungskomponenten nachteilig beeinflusst. Es ist auch wünschenswert, dass die Konjugate ein minimales Molekülvolumen aufweisen, so dass sie Extravaskularisation nicht abhalten, z.B. durch Kopplung von Fab, Fab', Fab'_2 oder einzelnen Ketten oder Teilen davon oder eines entsprechenden Antikörperfragments an Dendrimere mit niedrigem Molekülvolumen.

[0193] Dendrimere sind aufgrund ihrer Fähigkeit, zahlreiche Metallionen in einem kleinen Raumvolumen zu chelatieren für die Zufuhr von Radionukliden oder stark paramagnetischen Metallionen an Tumorstellen erwünscht. Die Kopplung von Antikörpern oder Antikörperfragmenten, welche für Tumore spezifisch sind, kann mit nur einer einzigen Modifikation des Antikörpers mehrere Metalle pro Antikörper transportieren.

[0194] Die Verknüpfung von Zielsteuerungseinheiten an Dendrimere ist ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung. In bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, insbesondere dann, wenn es wünschenswert ist, einen Antikörper als ein Zielsteuerungsmittel zu verwenden, kann günstigerweise eine reaktive funktionelle Gruppe, wie beispielsweise ein Carboxyl, Sulfhydryl, reaktives Aldehyd, reaktives olefinisches Derivat, Isothiocyanat, Isocyanat, Amino, reaktives Arylhalogenid oder reaktives Alkylhalogenid an dem Dendrimer verwendet werden. Die reaktiven funktionellen Gruppen können unter Verwendung bekannter Verfahren in das Dendrimer eingebracht werden, z.B.:

(1) Verwendung eines heterofunktionellen Inititators (als Ausgangsmaterial für die Synthese des Dendrimers), in den funktionelle Gruppen mit unterschiedlicher Reaktivität eingebaut sind. In einem solchen heterofunktionellen Inititator wird mindestens eine der funktionellen Gruppen als Ausgangsstelle für die Dendrimerbildung dienen und mindestens eine der anderen funktionellen Gruppen wird für die Verknüpfung an ein Zielsteuerungsmittel verfügbar sein, jedoch nicht in der Lage sein, eine Dendrimersynthese zu initiieren. Beispielsweise ermöglicht die Verwendung von geschütztem Anilin eine weitere Modifikation von NH_2-Gruppen innerhalb des Moleküls ohne Reaktion des Anilin-NH_2.

Die funktionelle Gruppe, welche für die Verknüpfung an ein Zielsteuerungsmittel verfügbar ist, kann ein Teil des Initiatormoleküls in einer beliebigen von drei Formen sein; nämlich:

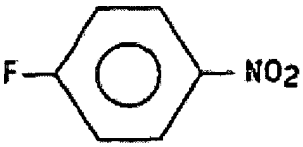
(a) In der Form, in welcher sie für die Verknüpfung mit dem Zielsteuerungsmittel verwendet wird. Dies ist dann möglich, wenn keiner der an der Dendrimersynthese beteiligten Syntheseschritte zu einer Reaktion an diesem Zentrum führen kann.

(b) Wenn die für die Verknüpfung mit dem Zielsteuerungsmittel verwendete funktionelle Gruppe in den an der Dendrimersynthese beteiligten Syntheseschritten reaktiv ist, kann sie durch Verwendung einer Schutzgruppe geschützt werden, welche die Gruppe gegenüber den beteiligten Syntheseverfahren unreaktiv macht, die jedoch selbst leicht auf eine Weise entfernt werden kann, die die Integrität des Rests des Makromoleküls nicht beeinträchtigt.

(c) Wenn keine einfache Schutzgruppe für die reaktive Funktionalität gebildet werden kann, die für die Verknüpfung mit dem Zielsteuerungsmittel verwendet werden soll, so kann ein Synthesevorläufer verwendet

werden, der in allen bei der Dendrimersynthese verwendeten Synthesevorgängen unreaktiv ist. Nach Beendigung der Synthese muss diese funktionelle Gruppe leicht in die gewünschte Verknüpfungsgruppe umgewandelt werden können, auf eine Weise, die die Integrität des Rests des Makromoleküls nicht beeinträchtigt.

(2) Bei der kovalenten Kopplung der gewünschten reaktiven funktionellen Gruppe an ein vorgeformtes Dendrimer muss das verwendete Reagenz eine Funktionalität enthalten, die leicht mit den terminalen funktionellen Gruppen am Dendrimer umgesetzt werden kann. Die funktionelle Gruppe, die letztlich für die Verknüpfung mit der Zielsteuerungseinheit verwendet werden soll, kann in ihrer endgültigen Form als eine geschützte Funktionalität oder als ein Synthesevorläufer vorliegen. Die Form, in welcher diese Verknüpfungsfunktionalität verwendet wird, hängt von ihrer Integrität während des Syntheseverfahrens, das verwendet werden soll, und der Fähigkeit des letztendlichen Makromoleküls, jeglichen Bedingungen zu widerstehen, die notwendig sind, um diese Gruppe für die Verknüpfung verfügbar zu machen ab. Beispiele für geeignete Verknüpfungsmittel können im Stand der Technik, beispielsweise in der veröffentlichten europäischen Anmeldung 0430863, veröffentlicht am 5. Juni 1991, gefunden werden. Zum Beispiel wird bei der bevorzugten Route für PEI

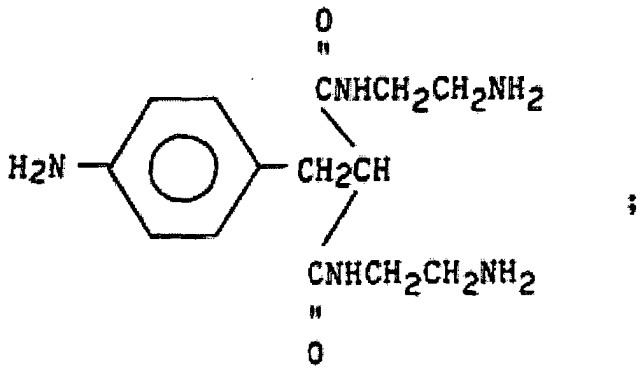


verwendet.

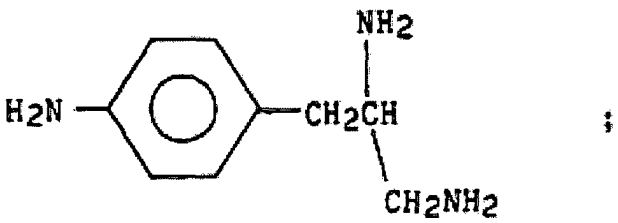
[0195] Beispiele für heterofunktionale Initiatoren zur Verwendung in (1) oben beinhalten die folgenden veranschaulichenden Beispiele:



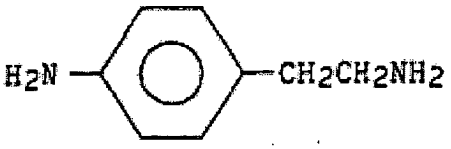
;



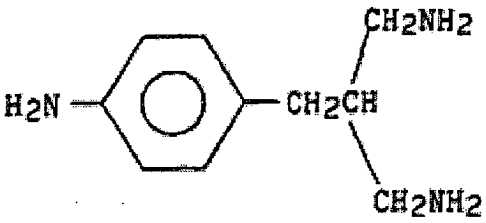
;



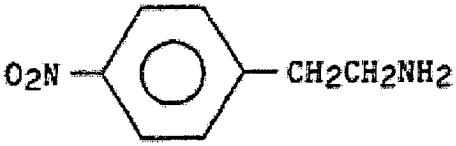
;



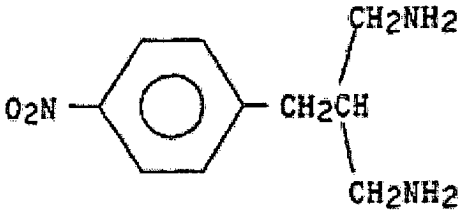
;



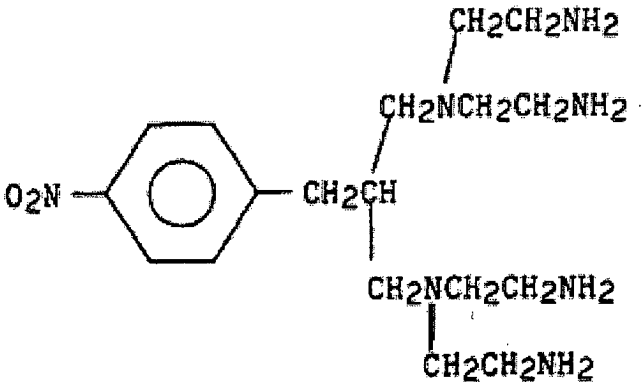
;



;



; und



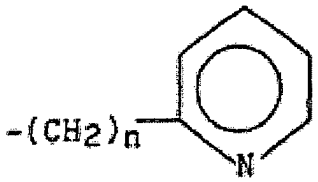
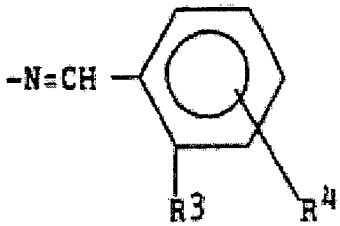
.

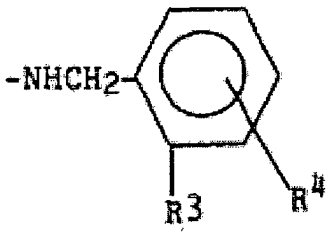
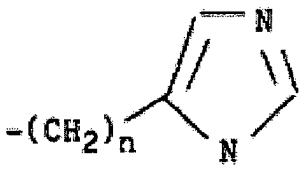
[0196] Es gibt mehrere Arten von chemischen Zusammensetzungen, die von besonderer Wichtigkeit sind:
1) Chemie dichter Stern- oder STARBUST™-Polyamidoamine („PAMAM");
2) Chemie dichter Stern- oder STARBUST™-Polyethylenimine („PEI");
3) Dichte Stern- oder STARBUST™-PEI-Verbindung mit einer Oberfläche aus PAMAM;
4) Chemie von dichtem Stern- oder STARBUST™-Polyether („PE").

[0197] Durch Modifikationen der Dendrimeroberflächenfunktionalitäten können wettere nützliche funktionelle Gruppen bereitgestellt werden, beispielsweise die folgenden:
$-OPO_3H_2$, $-PO_3H_2$, $-PO_3H^{(-1)}$, $-PO_3^{(-2)}$, $-CO_2^{(-1)}$, $-SO_2H$, $-SO_2^{(-1)}$, $-SO_3H$, $-SO_3^{(-1)}$, $-NR^1R^2$, $-R^5$, -OH, $-OR^1$, $-NH_2$, Polyether, perfluoriertes Alkyl,

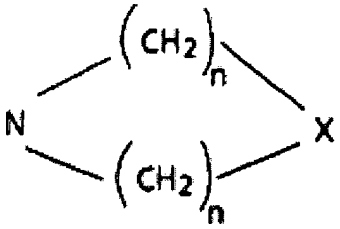
$-\underset{\underset{O}{\|}}{C}NHR^1$, $-\underset{\underset{O}{\|}}{C}OH$,

Acetat $(-O\underset{\underset{O}{\|}}{C}CH_3)$,

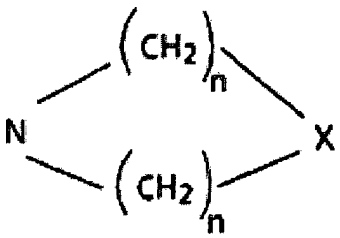

,

,


,

,

worin:
R Alkyl, Aryl oder Wasserstoff bedeutet;
R^1 Alkyl, Aryl, Wasserstoff oder


;

bedeutet;
R^2 Alkyl, Aryl oder


;

bedeutet;
R^3 -OH, -SH, CO_2H, $-SO_2H$ oder $-SO_3H$ bedeutet;
R^4 Alkyl, Aryl, Alkoxy, Hydroxyl, Mercapto, Carboxyl, Nitro, Wasserstoff, Brom, Chlor, Jod oder Fluor bedeutet;
R^5 Alkyl bedeutet;
X NR, O oder S bedeutet; und
n die ganze Zahl 1, 2 oder 3 bedeutet;
Polyether; oder andere immun-unsensitive Mittel

worin für alle obigen Alkyl ein linearer oder verzweigter C_1-C_{18}-Kohlenwasserstoff ist und Aryl eine Benzyl- oder Naphthylgruppe ist, die mit einer oder mehreren C_1-C_4-Alkyl-, Brom-, Chlor-, Jod-, Fluor- oder Trifluormethyl-Gruppen substituiert sein kann.

[0198] Die Auswahl der funktionellen Gruppe hängt von der bestimmten Endverwendung, für die das Dendrimer bestimmt ist, ab. Ein Dendrimer mit 1,4,7,10-Tetraazacyclodekan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) oder 1,4,7-tris-(Carbomethoxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododekan (DO3A Methylester) als funktionelle Gruppe kann beispielsweise als Träger für magnetisches Resonanzimaging oder als kernmagnetische Resonanzreagenzien verwendet werden.

[0199] Diese funktionalisierten Dendrimere werden beispielsweise durch Umsetzen der funktionalisierenden Gruppe, wie beispielsweise einem DO3A Methylester, mit einem Epoxid oder einem mit einer C_1-C_{18}-Alkylgruppe substituierten Epoxid hergestellt, um ein hydroxyethyliertes Produkt zu bilden. Das hydroxyethylierte Produkt wird mit einem Kopplungsmittel wie beispielsweise Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) umgesetzt und anschließend wird es mit einem PAMAM dichten Sternpolymer umgesetzt. Ein Dendrimer mit DOTA als funktionelle Gruppe kann hergestellt werden, indem ein Isothiocyanat-derivatisiertes DOTA, wie beispielsweise 1-[1-Carboxy-3-(4'-isothiocyanatophenyl)propyl]-4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododekan, mit einem PAMAM dichten Sternpolymer verwendet wird. Weitere geeignete Chelate können durch bekannte Syntheseverfahren hinzugefügt werden. Wenn gewünscht, kann ein Lanthanidion oder ein Pseudolanthanidion durch herkömmliche Verfahren eingebaut werden.

[0200] Die Verknüpfung von Antikörpern an Dendrimere ist ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung. Üblicherweise werden die Antikörper oder Antikörperfragmente durch im Stand der Technik gut bekannte Verfahren mit dem Dendrimer verknüpft, wie beispielsweise durch Anbindung zwischen einer funktionellen Gruppe an dem Dendrimer und Gruppen, wie beispielsweise Kohlenwasserstoff-, Amino-, Carboxyl- oder Sulfhydryl-Funktionalitäten, die in dem Antikörper oder Antikörperfragment vorliegen. Unter gewissen Umständen können Verbindungsgruppen als Verbinder oder Spacer zwischen dem Dendrimer und dem Antikörper oder Antikörperfragment verwendet werden. Die Anbindung des Dendrimers an den Antikörper oder das Antikörperfragment sollte auf eine Weise durchgeführt werden, die die Immunoreaktivität des Antikörpers oder Antikörperfragments nicht entscheidend beeinflusst, d.h durch Bindung des Antikörpers oder Antikörperfragments über eine Funktionalität an dem Antikörper oder Antikörperfragment, welche kein Teil der Antigenerkennungs- und Bindungsstelle ist.

TRAGEN VON GENETISCHEM MATERIAL UND TRANSFEKTION

A Einführung

[0201] Der Transfer von genetischem Material in Zellen besitzt viele mögliche Verwendungen als therapeutische und/oder diagnostische Mittel für humane Erkrankungen.

[0202] Genetisches Material kann transfiziert und anschließend transkribiert und exprimiert werden, um neue Proteine in Zellen zu bilden, um entweder aberrente oder abwesende Proteine, hervorgerufen durch genetische Fehler, zu ersetzen. Außerdem können kleinere Teile von genetischem Material, einschließlich entweder DNA oder RNA, in Zellen transfiziert werden, um als Enzyme zu wirken, die die Zellfunktion verändern können, oder um spezifische Messenger RNAs zu editieren, um andere Arten von Gendefekten zu korrigieren. Synthetisches genetisches Material, wie beispielsweise modifizierte Formen von Antisense Oligonukleotiden, kann in Zellen transferiert werden, um die Produktion spezieller Proteine zu blockieren. Dies kann für die Suppression von Zellen, die abnormal wachsen, wie beispielsweise Krebszellen, oder für die Veränderung normaler Zellfunktionen, wie beispielsweise eine Immunsuppression bei Organtransplantationen, nützlich sein. Kleine Stücke von genetischem Material, wie beispielsweise Aptimere, können auch als Wirkstoff fungieren und der Transfer dieser Formen von Nukleinsäuren kann auf eine ähnliche Weise wie ein Arzneimittel Zellfunktionen spezifisch verändern.

[0203] Der wichtigste Teil von Gentransfertherapeutika ist der Träger oder die Modalität, mit dem das genetische Material in Zellen transferiert wird. Der Transfer ist ein komplizierter Vorgang, an dem mehrere verschiedene Schritte beteiligt sind. Die erste Funktion des Trägers ist, die DNA zu binden und sie vor Hydrolyse oder Enzymverdau zu schützen. Anschließend muss der Träger den Transfer des genetischen Materials in die Zelle ermöglichen. Sobald er einmal in der Zelle ist, sollte der Träger die DNA vor dem Abbau in Endosome schützen und das Material zu spezifischen Bereichen innerhalb der Zelle leiten. Diese Bereiche könnten den Kern einschließen, entweder zum Einbau des genetischen Materials in Chromosome oder für die transiente Expression

des transferierten genetischen Materials durch Transkription und Translation. Im Gegensatz dazu kann für Funktionen wie beispielsweise Editieren des Ribosoms oder Unterbrechung der Proteinbildung durch Antisense Inhibierung ein Transport zu dem cytoplasmatischen endoplasmatischen Retikulum erforderlich sein. Sobald sich das genetische Material einmal in dem entsprechenden Bereich befindet, muss es auch von dem Träger freigesetzt werden, damit es wirken kann. Somit sind die Fähigkeit zu schützen, zu transferieren und die Wirkung des genetischen Materials zu ermöglichen, alles entscheidende Merkmale eines geeigneten Trägers für die Gentherapie.

[0204] Abgesehen von den zahlreichen Wirkungen, die der Träger des genetischen Materials erfüllen muss, gibt es bestimmte Dinge, bei denen es wichtig ist, dass sie in einem Träger vermieden werden. Der Träger darf nicht immunogen sein und sollte keine Immunantwort der getragenen DNA hervorrufen, wenn diese in vivo verabreicht wird. Außerdem sollte er mit der DNA keine unlöslichen Komplexe bilden, die deren Verabreichung oder die Möglichkeit, ihr zelluläres Ziel wirksam zu erreichen, sei es in einer Gewebekultur oder in einem Individuum verhindert. Es ist wichtig, dass der Träger für Zellen in vitro oder Organismen in vivo nicht toxisch ist, da dadurch die Menge des Materials, das verabreicht werden kann, verringert wird und es möglicherweise gefährlich sein könnte.

[0205] Es gibt zwei allgemeine Formen des Transfer von genetischem Material. Für beide ist eine Bindung und der Schutz von genetischem Material, der Transfer von genetischem Material in die Zelle und die Freisetzung des Materials für ihre funktionelle Wirksamkeit erforderlich. Es besteht jedoch ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Arten des Transfers. Bei einem wird ein Träger verwendet, der durch Ladungs- oder andere Wechselwirkung nicht spezifisch an Zellen bindet, und die DNA zu im wesentlichen allen Zellen transferiert, mit denen er in Kontakt kommt. Dies könnte in vitro oder in vivo in einem geschlossenen Raum, wie beispielsweise einem Gelenk, erfolgen. Ein Träger von diesem Typ ist besonders wichtig bei Therapien, in denen Zellen in Gewebekultur transfiziert werden und einem Individuum wieder zugeführt werden. Diese „ex vivo"-Therapie ist in zahlreichen verschiedenen Krankheitszuständen sehr nützlich und es ist hierfür erforderlich, dass der Träger sehr effizient bindet und das genetische Material in fast alle Zellen, mit denen er wechselwirkt, transferiert. Die andere Art von Träger zielt speziell nur auf bestimmte Zelltypen. Ein Zielsteuerungsmittel, das an diesen Träger gekoppelt ist, unterstützt die spezifische Wechselwirkung zwischen einem Ziel an einer Zelle und dem DNA-Trägerkomplex, der die Aufnahme in Zielzellen ermöglicht. Bei Verwendung dieses Trägers ist eine nicht spezifische Transfektion von Zellen nicht wünschenswert, da eine Expression oder Wirkung des transfizierten genetischen Materials in Nicht-Zielzellen von Nachteil sein kann. Zielsteuerungsmittel können durch verbesserte Bindung und Transfer in Zellen auch die Transfektion in Zellen in vitro für ex vivo therapeutische oder diagnostische Anwendungen erhöhen. In diesem Fall sind die Begleiterscheinungen nicht spezifischer Transfektion unwesentlich, da alle Zellen in der Kultur Zielzellen sind.

[0206] Die Technik der Gentherapie schreitet mit einer raschen Geschwindigkeit voran. Zahlreiche Artikel und Bücher wurden geschrieben, in denen Verfahren zur Gentherapie beschrieben werden. Recombinant DNA, 2. Edition von James D. Watson et al., 1992, verlegt von W. H. Freeman and Company, New York, ist ein solches Buch.

[0207] Die dichten Sternpolymere der vorliegenden Erfindung sind mit genetischem Material komplexiert und können für die Gentherapie in Säugerorganismen, z.B. Menschen, verwendet werden. Ein Verfahren zur Vorbeugung oder Behandlung einer Erkrankung umfasst die Transfektion einer Säugerzelle mit einem dichten Sternpolymer, das mit genetischem Material komplexiert ist. Wie oben erläutert, kann genetisches Material aus zahlreichen Gründen in Zellen transfiziert werden, einschließlich der Produktion von Proteinen innerhalb der Zellen, Veränderung von Zellfunktionen, Korrektur genetischer Funktionsdefekte, als Wirkstoffe und dergleichen. Genetischen Erkrankungen oder Zuständen kann somit insbesondere dadurch vorgebeugt werden oder sie können behandelt werden, indem der erfindungsgemäße Komplex des dichten Sternpolymers und genetischen Materials verwendet wird.

[0208] Die Menge an genetischem Material, das in der Lösung des Komplexes aus genetischem Material und Dendrimer verwendet wird, ist ausreichend, um die gewünschte prophylaktische, therapeutische oder diagnostische Wirkung zu erzielen. Diese Menge wird als eine Funktion des beabsichtigten Effekts, der Leichtigkeit, mit der die Zielzellen erfolgreich transfiziert werden, der Effizienz eines an das Dendrimer gebundenen Zielsteuerungsmittels und dem Verabreichungsmodus des Komplexes, d.h. in vitro, ex vivo, in vivo und, falls in vivo, intravenös, topisch oder durch direkte Injektion in einen bestimmten Tumor, Organ, Drüse oder anderes Gewebe, variieren.

[0209] Sobald die Menge an genetischem Material und ihre Ladung bestimmt wurde, wird anschließend die

Menge des verwendeten Dendrimers als Funktion des gewählten Ladungsverhältnisses genetisches Material:Dendrimer ermittelt. Es wird in der Lösung ausreichend Dendrimer verwendet, um das gewünschte Ladungsverhältnis zu erhalten. Das gewählte Ladungsverhältnis wird als Funktion derselben Variablen, welche die Lösungskonzentration von genetischem Material beeinflussen, variieren, ebenso wie als Funktion davon, ob es mit oder ohne DEAE-Dextran oder Glycerin verwendet wird, um die Transfektion synergistisch zu steigern. Im Allgemeinen kann das Ladungsverhältnis genetisches Material:Dendrimer als eine Funktion der obigen Variablen zwischen ungefähr 10:1 und ungefähr 1:10000 (möglicherweise sogar darunter) liegen, aber mehr bevorzugt beträgt es von ungefähr 3:1 bis 1:1000, 1:1 bis 1:100, 1:1 bis 1:15 oder 1:5 bis 1:10.

[0210] Ein Verfahren um menschliche Gene in Säugerzellen einzubringen um im wesentlichen Genumordnungen oder andere Veränderungen, die die Genexpression beeinträchtigten könnten zu vermeiden kann durchgeführt werden, indem eine Säugerzelle mit einem dendritischen Polymer/dendritischen Polymeren, bevorzugt einem dichten Sterndendrimer, das mit genetischem Material komplexiert ist, transfiziert wird.

[0211] Der Gentransfer kann bewirkt werden, indem zahlreiche Zelltypen, wie beispielsweise hämatopoetische Zellen, Hautfibroblasten, Hepatocyten und dergleichen, transfiziert werden. Somit kann ein Verfahren zur Vorbeugung oder Behandlung von genetischer Erkrankung das Transfizieren eines dichten Sternpolymers, das mit genetischem Material komplexiert ist, in eine hämatopoetische Stammzelle, Hautfibroblastzelle, Hepatocyten oder dergleichen, Verabreichung der transfizierten Zelle in einen Säugerorganismus und Expression der Zelle umfassen, um eine prophylaktische oder therapeutische Wirkung zu erhalten.

[0212] Wie in der vorliegenden Erfindung diskutiert, kann die Transfektion für zahlreiche Zwecke verwendet werden, einschließlich in vitro-, in vivo- und ex vivo-Verwendungen. Weiter kann die in vitro-Verwendung des Komplexes von dichten Sternpolymeren und genetischem Material in der vorliegenden Erfindung bei der Detektion oder Diagnostik verschiedener Erkrankungen nützlich sein. Ein Verfahren zur Diagnose einer Erkrankung oder eines Zustands in einem Säugerorganismus kann unter Verwendung des Komplexes von dichtem Sternpolymer und genetischem Material der vorliegenden Erfindung detektiert oder diagnostiziert werden.

[0213] Der wie hierin beschriebene Komplex aus Dendrimer und genetischem Material kann auch als ein „Konjugat" der vorliegenden Erfindung betrachtet werden, wie diese Bezeichnung hierin weithin verwendet wird. Das Dendrimer (oder dichtes Sternpolymer, P) ist mit einem getragenen biologischen Response Modifier M assoziiert, bei dem es sich um ein bioaktives Material handelt, und er ist in diesem Fall ein genetisches Material, um ein Konjugat der vorliegenden Erfindung zu bilden. Ein Zielsteuerungsmittel, T, kann ebenfalls vorhanden sein. Dies ermöglicht die gerichtete Zufuhr des genetischem Materials zu speziellen Zellen und diese einzigartigen Merkmale werden im Folgenden hierin weiter diskutiert.

[0214] Die Funktion von Dendrimeren als Träger für den Transfer von genetischem Material wird im Folgenden diskutiert. Außerdem werden Beispiele bereitgestellt, sowohl für eine nicht spezifische Transfektion von Zellen als auch für eine spezifische zielgesteuerte Transfektion. Bei den jeweiligen Anwendungen wird eine geringe Toxizität oder Immunogenität beobachtet. Somit können die Dendrimerträger alle Arten von notwendigen Trägern, die für eine Gentransfertherapie benötigt werden, umfassen.

[0215] Wie bereits angedeutet, können die dichten Sternpolymere der vorliegenden Erfindung als Träger für landwirtschaftliche Materialien, einschließlich Gentransfer, verwendet werden.

[0216] Es gibt zahlreiche Verfahren des Standes der Technik, um genetisches Material in Pflanzenzellen zu transfizieren. Ein Verfahren beinhaltet die Verwendung von Agrobacterium sp. In einem typischen Verfahren wird das Gen in Pflanzenzellen eingebracht, indem es zunächst in die Klonierungsstelle eines Plasmids eingebracht wird, das in E. coli replizieren kann und ein Segment von T-DNA enthält (eine DNA, die in natürlich in Agrobakterien auftretenden Ti-Plasmiden auftritt). Der resultierende intermediäre Shuttle-Vektor wird anschließend in E. coli-Zellen eingebracht und es werden Transformate ausgewählt durch Resistenz gegen Ampicillin, die in pBR 322-Sequenzen kodiert werden. Als nächstes wird das Plasmid von der E. coli-Zelle in eine Agrobacterium-Zelle transferiert durch Paarung. Sobald das Plasmid einmal in dem Agrobacterium ist, wird es mittels homologer Rekombination der T-DNA-Sequenzen auf den beiden Plasmiden in das Ti-Plasmid integriert. Durch diesen Vorgang wird das gesamte integrative Plasmid (das in das Ti-Plasmid integrierte Plasmid) zwischen die linken und rechten Grenzen der T-DNA platziert. Plasmide die nicht integriert werden, akkumulieren nicht, da ihnen ein Replikationsursprung für Agrobacterium fehlt. Agrobakterien, die das rekombinante Ti-Plasmid enthalten, werden ausgewählt und verwendet, um Pflanzenzellen zu infizieren. Pflanzenzellen, die die T-DNA aufgenommen haben, werden durch den pflanzenselektierbaren Marker NPTII identifiziert, was Resistenz gegenüber Kanamycin bedeutet. Diese Zellen enthalten auch das klonierte Gen von Interesse.

[0217] Außerdem wird genetisches Material durch virale Vektoren in Pflanzenzellen transfiziert. Vitale Vektoren sind Viren, die evolutionär daran angepasst sind, Gene durch eine infizierte Pflanze zu verteilen. Wenn das virale Genom ein Fremdgen enthält, dann wird auch dieses systemisch über die Pflanze verteilt. Virale Vektoren können die Probleme umgehen, Gene zu Monocotyedonen zu transportieren, die gegenüber Agrobakterien weniger empfänglich sind. Genetisches Material kann die beschichtende proteinkodierende Region in der A-Komponente eines Geminivirus (z.B. Tomato-Golden-Mosaic-Virus TGMV) Genoms ersetzen. Es gibt DNA-Viren mit Genomen, die aus zwei einzelsträngigen DNA-Molekülen aufgebaut sind, die jeweils eine doppelsträngige replikative Form durchlaufen. Das A-Molekül allein kann in Pflanzenzellen replizieren, für eine Infektivität ist jedoch das B-Molekül erforderlich. Sowohl A- als auch B-Gene müssen für eine produktive virale Infektion in einer Zelle vorhanden sein.

[0218] Andere Verfahren, um genetisches Material in Pflanzenzellen zu transfizieren, beinhalten die Einführung des genetischen Materials direkt in die Zellen unter Verwendung physikalischer Mittel. Bei einem physikalischen Verfahren, um genetisches Material in eine Pflanzenzelle einzubringen, wird Elektroporation verwendet. Typischerweise wird eine hohe Konzentration an Plasmid-DNA, die das genetische Material enthält, zu einer Suspension von Protoplasten zugegeben und die Mischung wird mit einem elektrischen Feld von 200 bis 600 V/cm geschockt. Nach Elektroporation werden die Protoplasten in Gewebekultur für ein bis zwei Wochen kultiviert, bevor man mit der Selektion nach Zellen beginnt, die die DNA aufgenommen haben. Normalerweise erzielt dieser Vorgang eine Effizienz von zwischen 0,1 und 1%.

[0219] Ein weiteres Verfahren, um genetisches Material physikalisch in Pflanzenzellen einzubringen, beinhaltet die Verwendung von winzigen Metall (wie beispielsweise Wolfram)-Beads, die mit der relevanten DNA beschichtet sind. Diese Beads, d.h. Kügelchen mit einem Durchmesser von 1 μm, werden direkt in die Zellen geschossen. Die DNA wird einfach auf der Oberfläche der Beads, die aus dem „Gewehr" mit Geschwindigkeiten von etwa 430 m/s geschossen werden präzipitiert. Die Ziele können Suspensionskulturen von embryonalen Zellen beinhalten, die auf Filtern angebracht sind, sowie intakte Blätter und Samen. Zellen in der direkten Schusslinie werden getötet, aber es gibt eine konzentrische Zone von Zellen, wo die Projektile in die Zellen eindringen, ohne sie zu töten. Eine morphologische Analyse von Blättern, die mit einem β-Glucoronidase (GUS) Reportergenvektor beschossen wurden, zeigt, dass die Wolframpartikel mindestens eine Gewebeschicht, die Blattepidermis, durchdringen können, um das Mesophyll zu erreichen. DNA-beschichtete Kügelchen sind auch verwendet worden, um genetisches Material in Chloroplasten einzubringen.

[0220] Die dendritischen Polymere und insbesondere die dichten Sternpolymere der vorliegenden Erfindung bieten entscheidende Vorteile, wenn sie bei der Transfektion von genetischem Material in Pflanzenzellen verwendet werden. Die Verfahren des Standes der Technik können beispielsweise modifiziert werden, um zu ermöglichen, dass das dichte Sternpolymer (z.B. dichte Sterndendrimer) zusammen mit dem genetischen Material die Zelle transfiziert, um so die oben erläuterten Vorteile bereitzustellen. Insbesondere können Elektroporation oder winzige Metallbeads verwendet werden, um eine Transfektion des dichten Sternpolymers und genetischen Materials in Pflanzenzellen zu ermöglichen.

B Das Dendrimer

[0221] Die vorliegende Erfindung betrifft in einem Aspekt das Konzept, genetisches Material auf dendritischen Polymeren zu tragen und/oder eine Transfektion mit solchen Komplexen zu bewirken. Im weiteren Sinn soll die Bezeichnung „dendritisches Polymer", wie hierin verwendet, nicht auf dichte Sternpolymere begrenzt sein, obwohl sie dichte Sternpolymere beinhaltet. Ein „dendritisches Polymer" ist ein Polymer, das eine regelmäßige dendritische Verzweigung aufweist, die durch die aufeinanderfolgende oder generationsweise Zugabe verzweigter Schichten zu oder von einem Kern gebildet wird. Die Bezeichnung „dendritisches Polymer" umfasst „Dendrimere", die durch einen Kern, mindestens eine innere verzweigte Schicht und eine oberflächliche verzweigte Schicht gekennzeichnet sind (siehe Petar R. Dvornic und Donald A. Tomalia in Chem. In Britain, 641–645, August 1994). Ein „Dendron" ist eine Dendrimerspezies mit Verzweigungen, die von einem zentralen Punkt ausgehen, der mit einem Kern verbunden ist oder mit einem Kern verbunden sein kann, entweder direkt oder durch eine Verknüpfungsgruppe, um ein Dendrimer zu bilden. Viele Dendrimere umfassen zwei oder mehr Dendrone, die zu einem gemeinsamen Kern verbunden sind. Die Bezeichnung Dendrimer wird jedoch weithin verwendet, um ein einzelnes Dendron zu bezeichnen.

[0222] Dendritisches Polymer beinhaltet ist jedoch nicht begrenzt auf symmetisch und unsymmetrisch verzweigte Dendrimere, Kaskadenmoleküle, Bäume und dergleichen, obwohl die am meisten bevorzugten dendritischen Polymere dichte Sternpolymere sind. Die hierin offenbarten PAMAM dichten Sterndendrimere sind insofern symmetisch, als die Verzweigungsarme dieselbe Länge aufweisen. Die Verzweigung tritt an den Was-

serstoffatomen einer terminalen NH_2-Gruppe auf einer vorhergehenden Generationsverzweigung auf. Die Lysin-verzweigten Dendrimere von Beispiel 78 sind insofern unsymmetrisch, als die Verzweigungsarme eine unterschiedliche Länge aufweisen. Eine Verzweigung tritt an dem Epsilon-Stickstoff des Lysinmoleküls auf, während eine andere Verzweigung an dem Alpha-Stickstoff, der zu der reaktiven Carboxygruppe, welche die Verzweigung mit einer vorhergehenden Generationsverzweigung verbindet benachbart ist, auftritt.

[0223] Obwohl sie nicht durch regelmäßige aufeinanderfolgende Zugabe von verzweigten Schichten gebildet werden, können hyperverzweigte Polymere, z.B. hyperverzweigte Polyole, zu einem dendritischen Polymer äquivalent sein, wenn das Verzweigungsmuster einen Grad an Regelmäßigkeit aufweist, der dem eines Dendrimers gleich kommt.

[0224] Dendritische Polymere beinhalten verbrückte Dendrimere und Dendrimeraggregate. Dendritische Polymere umfassen sowohl generationsartig monodisperse als auch generationsartig polydisperse Lösungen von Dendrimeren. Die Dendrimere in einer monodispersen Lösung sind im wesentlichen alle von derselben Generation und daher von einheitlicher Größe und Form. Die Dendrimere in einer polydispersen Lösung umfassen eine Verteilung von Dendrimeren verschiedener Generationen. In der bevorzugten Ausführungsform umfassen die polydispersen dendritischen Polymere Dendrimere mit mindestens drei unterschiedlichen Generationen, deren Größe von etwa 22 bis etwa 110 Å reicht. Die Proben P und Q von Beispiel 42 sind Beispiele solcher polydisperser dendritischer Polymere.

[0225] Dendritische Polymere umfassen auch oberflächenmodifizierte Dendrimere. Beispielsweise kann die Oberfläche eines PAMAM-Dendrimers durch die Zugabe einer Aminosäure, z.B. Lysin, modifiziert werden.

[0226] Es sollte verstanden werden, dass der Bezug auf irgendeine bestimmte Art von dendritischem Polymer als ein „Polymer", z.B. ein „dichtes Sternpolymer" und „unsymmetrisches dendritisches Polymer" ein „Kaskadenpolymer" so gemeint ist, dass auch verbrückte Dendrimere dieser Art, Dendrimeraggregate dieser Art, polydisperse Dendrimere dieser Art und oberflächenmodifizierte Dendrimere dieser Art umfasst sind.

[0227] Wenn das getragene Material genetisches Material ist, ist die Oberfläche des Dendrimers bevorzugt aus positiv geladenen funktionellen Gruppen zusammengesetzt. Weiter bevorzugt wird eine solche positive Funktionalität erzielt, indem auf den Dendrimeroberflächen aminoterminale Gruppen bereitgestellt werden. Positiv geladene funktionelle Gruppen können auch chemisch auf der Oberfläche eingeführt werden (z.B. quartäre Amine). Solche Aminofunktionalität wird durch die oben beschriebenen Polyamin-, Polyamidoamin- und Polyalkylenimin- (z.B: Polyethylenimin und Polypropylenimin) -Dendrimere bereitgestellt, obwohl sie auch auf andere Weise erzielt werden kann.

[0228] Dendrimere, die weithin verwendet werden, um genetisches Material zu tragen, weisen eine sphärische, ellipsoide oder stäbchenartige Konfiguration auf. Ihr engster/ihre engsten Querschnittsdurchmesser beträgt/betragen bevorzugt mindestens 50 Angström (Å). Diese Größe entspricht in etwa dem Durchmesser eines Generation 6 Ammoniakkern [G 6 (NH_3)]-PAMAM-Dendrimers oder eines Generation 6 Ethylendiaminkern [G 6 (EDA)]-Dendrimers (welches etwas größer ist als die Größenordnung des Ammoniakkerns). (siehe Beispiel 44, **Fig. 12** und **Fig. 13**; Beispiel 45, **Fig. 14** und Beispiel 42, **Fig. 19**). Die obere Grenze dieser Größenordnung wurde nicht getestet, obwohl bekannt ist, dass G 11 (EDA) PAMAM-Dendrimere mit einem Durchmesser von ca. 110 Å eine hervorragende Transfektion zeigen. Basierend auf Daten die zeigen, dass Aggregate von Dendrimeren mit einem Durchmesser von bis zu ca. 1000 Å zufriedenstellend transfizieren, während dies bei Aggregaten mit 2000–5000 Å nicht der Fall ist, wird angenommen, dass die Dendrimerpartikel Durchmesser in einer Größe von etwa 1000 Å aufweisen können oder dass kleinere agglomerierte Partikel Durchmesser mit einer Größe von ca. 1000 Å, bevorzugt von 50 bis 110 Å aufweisen könnten. Diese Durchmesser werden üblicherweise als makromolekulare Größenordnungen betrachtet und daher werden diese Dendrimere als dendritische Makromoleküle bezeichnet.

[0229] Dendrimere mit kleineren Durchmessern können ebenfalls eingesetzt werden, um Zellen mit genetischem Material zu transfizieren, die besten Ergebnisse werden jedoch erhalten, wenn der kleinere DNA:Dendrimer-Komplex anschließend mit größeren Dendrimeren assoziiert wird, die einen Durchmesser von etwa 50 Å an ihrer engsten Durchmesserabmessung aufweisen. (Siehe Beispiel 46, **Fig. 15** und **Fig. 16**). In Beispiel 46 (**Fig. 15** und **Fig. 16**) wurde eine hervorragende Transfektion erzielt, indem DNA mit einem G 5 (EDA)-Dendrimer oder einem G 5 (NH_3)-Dendrimer (Durchmesser ca. 40 Å) komplexiert wurde, woraufhin ein G 9 (EDA)-Dendrimer oder ein G 9 (NH_3)-Dendrimer (Durchmesser ca. 90 Å) zu dem Komplex zugegeben wurde. Interessanterweise scheint die umgekehrte Reihenfolge nicht so effektiv zu sein.

[0230] Man nimmt an, dass die kleineren Dendrimere, wenn sie in dieser aufeinander folgenden Weise eingesetzt werden, als engste Durchmesser kleine Durchmesser von ca. 22 Å aufweisen können, d.h. entsprechend einem G 3 (NH_3)-PAMAM-Dendrimer. Die Dendrimere unterhalb etwa Generation 3 (G 3) scheinen die DNA nicht unabhängig zu komplexieren. Das größere Dendrimer kann als kleinsten Durchmesser Durchmesser aufweisen, die bei etwa 50 Å bis etwa 1000 Å liegen.

[0231] Kombinationen von zwei Dendrimeren mit unterschiedlicher Größe, die mit DNA komplexiert sind, können ebenfalls die Transfektion steigern. Dies trifft insbesondere dann zu, wenn die Mischung von Dendrimeren in der Größe polydispers ist, d.h. solche, die Partikelgrößen im Bereich von ca. 22 bis ca. 110 Å aufweisen. Die Proben P und Q aus Beispiel 42 sind Beispiele für solche polydispersen Zusammensetzungen.

[0232] Ein sphärisches Dendrimer kann hergestellt werden, indem die generationsweise Reaktionssequenz mit einem im Wesentlichen sphärischen Initiator oder Kernmaterial begonnen wird, das am meisten bevorzugt drei reaktive Stellen aufweist, die von dem Kern abstehen und im allgemeinen gleichen Abstand voneinander haben, z.B. Ammoniak. (Siehe z.B. europäische Patentanmeldung 0 115 771 und die US-Patente 4,507,466; 4,558,120; 4,568,737; 4,631,337; 4,587,329 und 4,737,550). Den Dendrimeren kann eine gestreckte ellipsoide oder stäbchenartige Konfiguration verliehen werden, indem von einem gestreckten polymeren Kern ausgegangen wird, der zahlreiche reaktive Stellen aufweist, die an verschiedenen Punkten entlang seiner Länge radial von dem Kern wegstehen, z.B. Polyethylenimin. (Siehe z.B. europäische Patentanmeldung 0 234 408 und US-Patent 4,694,064). Ein ellipsoides Dendrimer beginnt mit einem kleineren Kernmaterial als dem Kern, der für das Stäbchen-Dendrimer verwendet wird, z.B. Ethylendiamin (EDA).

[0233] In einem sphärischen Dendrimer fällt der Durchmesser der Kugel bevorzugt in die oben beschriebenen bevorzugten Durchmesserbereiche. In einem ellipsoiden Dendrimer oder einem stäbchenförmigen Dendrimer wäre der Durchmesser der rechten Querschnittsfläche des Ellipsoids oder Stäbchens bevorzugt der/die bevorzugte(n) Durchmesser, die oben angegeben wurden. Die rechte Querschnittsfläche muss kein perfekter Kreis sein und kann daher Durchmesser variierender Länge aufweisen, abhängig davon, wo an der Durchschnittsfläche der Durchmesser genommen wird. Längen von bis zu 1000 Å werden in Erwägung gezogen.

[0234] Die verbrückten Dendrimere können auch nützlich sein, um genetisches Material zu tragen. Diese Strukturen können beachtlich in ihrer Form variieren, werden jedoch grundsätzlich durch Assoziieren benachbarter dichter Sterndendrimere miteinander gebildet, insbesondere durch eine kovalente Bindung, es sind jedoch auch nicht kovalente Wechselwirkungen möglich. Vier oder fünf kleinere, ellipsoide oder stäbchenförmige Dendrimere könnten miteinander verbrückt sein, um ein Agggregat mit unimolekularer Struktur zu bilden, das die Transfektionseffizienz eines Dendrimers einer höheren Generation aufweist.

[0235] Eine interessante Variation an einem verbrückten Dendrimerkonzept beinhaltet die Bildung von makromolekularer Clustern, bei denen ein DNA- oder RNA-Material als das nicht kovalente Gitter zwischen getrennten Dendrimeren dient, wobei das Gitter z.B. auf Basis elektrostatischer Wechselwirkungen gebildet wird. Dieses Modell scheint dem oben diskutierten Komplex von Beispiel 46 nahe zu kommen, in dem DNA zunächst mit einem kleineren Dendrimer (z.B. G 5) komplexiert wird, wobei die DNA:Dendrimer-Komplexe anschließend mit einem Dendrimer mit größerem Durchmesser (z.B. G 9) gemischt werden, wie in den **Fig. 15** und **Fig. 16**.

[0236] Aggregate von Dendrimeren mit größerem Durchmesser werden gebildet, indem Dendrimere mit Amino-Endgruppen um einen Kern von Dendrimeren mit Carboxylat-Endgruppen gezogen werden. Abhängig von dem Ladungsverhältnis der beiden Klassen von Dendrimeren, die bei der Formulierung verwendet werden, und auch von der Konzentration, mit der sie hergestellt werden, werden verschiedene Typen von Dendrimeraggregaten gebildet. Die Transfektionseffizienz scheint am größten zu sein, wenn das Amino-terminierte Dendrimer und das Carboxylat-terminierte Dendrimer in einem Dendrimer:Dendrimer postive Ladung zu negative Ladung-Verhältnis von bevorzugt ca. 25:1 bis 100:1 vorliegen, was zur Bildung von Agggregaten führt, die eine insgesamt positive Ladung aufweisen (Beispiel 74). Wenn die entsprechenden Verhältnisse verwendet werden, kann die Transfektionseffizienz größer sein als die, welche bei dem Amino-terminierten Eltern-Dendrimer beobachtet wird, das in demselben DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis und in Gegenwart von DEAE-Dextran (welches ebenfalls Transfektionseffizienz-verbessernd wirkt) verwendet wird.

[0237] (Amino-terminierte) ganze-Generation- und Carboxylat-terminierte halbe-Generation-Dendrimere bilden Dendrimeraggregate bei etwa pH = 6–9, abhängig von dem Verhältnis von Amino-terminierten und Carboxylat-terminierten Dendrimeren und ebenso von den Probenkonzentrationen. Bei pH > 9 beginnen die protonierten primären Amine der ganze-Generation Dendrimere zu deprotonieren, wodurch Aggregate auseinander brechen. Bei ph < 6 werden die Carboxylate und inneren tertiären Amine der halbe-Generation Dendrimere

protoniert, was zur Bildung von Zwitterionen in den halbe-Generation Dendrimeren führt und somit die Agggregate ebenfalls dissoziiert. Nach unserer Kenntnis ist das PAMAM-Dendrimer-Aggregat das einzige Material, das diese einzigartige Eigenschaft aufweist.

[0238] Es ist bekannt, dass der pH-Wert außerhalb der Zelle 7,2 beträgt und innerhalb der Zelle ca. 5,0 beträgt. Es ist daher sinnvoll, aus den Dendrimeren niedrigerer Generation bei pH = 7,4 Dendrimeraggregate mit höherem Molekulargewicht zu entwerfen und herzustellen, so dass die Größen der Dendrimeraggregate groß genug sind, um die DNA-Moleküle wirksam zu komplexieren. Um DNA zu binden, müssen diese Dendrimeraggregate jedoch postive Netto-Ladungen tragen, was bedeutet, dass die ganze-Generation Dendrimere in großem Überschuss gegenüber den halbe-Generation Dendrimeren vorliegen müssen. Eines der interessanten Merkmale dieses Abgabesystems ist, dass, nachdem der Komplex in die Zelle eintritt, die Dendrimeraggregate aufgrund des niedrigeren pH-Werts im Inneren der Zelle auseinander gebrochen werden. Diese Dissoziation könnte die Transfektionseffizienz ebenfalls steigern.

[0239] Die kovalente Modifikation der Oberflächenaminogruppen eines PAMAM-Dendrimers mit einer Aminosäure, Lysin, zeigte eine überraschende und einzigartige Steigerung der Transfektionseffizienz (Beispiel 75, Fig. 57). Die Verwendung eines Lysin-modifizierten G 7 (NH_3)-Dendrimers, das mit dem Plasmid komplexiert ist, führt zu einer stark verbesserten Expression des Luziferasegens im Vergleich zu einem nicht modifizierten G 7 (NH_3)-Dendrimer und außerdem zeigen die mit dem Lysin-modifizierten G 7 (NH_3)-Dendrimer gebildeten Komplexe eine äquivalente Transfektion zu der eines G 10 (NH_3)-Dendrimers (alle Experimente wurden mit einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:10 und in Gegenwart von DEAE-Dextran durchgeführt). Dieses Experiment zeigt, dass eine Erhöhung der Ladungsdichte der Dendrimere den Transfektionsvorgang beeinflusst, da der pKa-Wert der Epsilon-Aminogruppe 10,53 ist, während der pKa-Wert für die terminalen Aminogruppen eines PAMAM-Dendrimers bei ungefähr 9 liegt. Auch bei anderen Oberflächenmodifikationen könnte erwartet werden, dass sie die Transfektion ähnlich oder noch stärker steigern.

C Beschreibung von nicht-spezifischen Transfektionswirkungen von Dendrimeren

[0240] Der genaue Mechanismus von nicht-spezifischer (d.h. nicht-zielgesteuerter) Transfektion von Zellen durch DNA:Dendrimer-Komplexe ist nicht bekannt, verschiedene Dinge sind jedoch offensichtlich. Obwohl wir nicht durch irgendeine Theorie festgelegt sein wollen, nehmen wir an, dass die DNA auf Basis von Ladungswechselwirkung an das Dendrimer bindet und dass die wirkungsvollste Transfektion auftritt, wenn der Komplex mit positivem Ladungsüberschuss gebildet wird. Die Wechselwirkung zwischen dem DNA:Dendrimer-Komplex und der Zelle erfolgt wohl deshalb, da der positiv geladene Komplex an negativ geladene Phospholipide auf der Oberfläche der Zellen bindet. Die Transfektion in Gegenwart von Serum oder wenn es nicht gelingt, das Serum von der Oberfläche der Zellen abzuwaschen, scheint die Transfektion zu verhindern, indem Zelloberflächenladungen neutralisiert werden und somit die Haftung der Komplexe an Zellen verhindert wird. Es ist interessant, dass bestimmte Typen von DNA:Dendrimer-Komplexen für die nicht-spezifische Transfektion von bestimmten Zellen besser geeignet sind. Dieser Befund lässt vermuten, dass Unterschiede in der Oberfläche von Zellen bestehen, die Wechselwirkungen mit bestimmten Arten von DNA:Dendrimer-Komplexen erleichtern. Möglicherweise kann es für die wirkungsvollste Transfektion unterschiedlicher Arten von Zellen erforderlich sein, unterschiedliche Dendrimere zu verwenden oder zu entwickeln.

[0241] Es ist auch möglich, dass in Anbetracht der wesentlichen Größenunterschiede der Formen von genetischem Material, das in der Gentransfer-Therapie verwendet wird, unterschiedliche Größen und Ladungsdichten von Dendrimeren für eine effiziente, nicht spezifische Transfektion der verschiedenen Arten von genetischem Material erforderlich sein können. Theoretisch kann ein genetisches Material:Dendrimer-Komplex, der auf Basis von Ladungswechselwirkung wirksam an Zellen bindet, für kleine Stücke von genetischem Material, wie beispielsweise Oligonukleotide mit einer Länge von nur wenigen Basen, und größere Stücken von genetischem Material, wie beispielsweise großen DNA-Plasmiden, sehr unterschiedlich sein. Es wäre für eine Transfektion auf Basis von Ladungswechselwirkung generell erforderlich, dass das genetische Material einen kleinen Komplex bildet, der eine hohe Dichte an positiver Ladung auf einer Oberfläche aufweist. In diesem Bereich kann es wichtig sein, kleinere Dendrimere und anschließend größere Dendrimere zu verwenden oder polydisperse Dendrimere zu verwenden, um einzelne Komplexe zu bilden, die für den DNA-Transfer am wirkungsvollsten sind. Auch die Zugabe von DEAE-Dextran oder Glycerin zu dem Transfektionspuffer nach der Bildung des DNA:Dendrimer-Komplexes zeigt eine überraschende und unerwartete Steigerung der Zelltransfektion. Die Zugabe anderer Mittel in die Transfektionspuffer, wie z.B. Chloroquine, die jeweils bei der Freisetzung der DNA aus Endosomen hilfreich sein können oder deren Abbau in Endosome verhindern können, können bei der Steigerung der Transfektion mit Dendrimer-Komplexen ebenfalls wertvoll sein. Diese Befunde können jedoch für nicht-spezifische Transfektion in vitro einzigartig sein, wobei verschiedene Bedingungen oder Kombi-

nationen von Materialien, wie beispielsweise fusogene Peptide, bei der Förderung der Transfektion in vivo oder mit zielsteuernden Dendrimerträgern wirkungsvoller sind.

D Genetisches Material und dessen Komplexierung mit Dendrimer unter Bildung eines Konjugats

[0242] Genetische Materialien sind Materialien auf Basis von Nucleotiden, einschließlich ohne Einschränkung Plasmide, Phagen, Kosmide, Gene und Genfragmente (d.h. Exons, Introns), Desoxyribonukleinsäure (DNA) sowohl einzel- als auch doppelsträngig, Ribonukleinsäure (RNA), ribosomale RNA (rRNA), katalytische RNA (cRNA), small nuclear RNA (snRNA), messenger-RNA (mRNA), Transfer-RNA (tRNA), DNA und RNA Oligonukleotide (sowohl einzel- als auch doppelsträngig) oder Oligomere und (Anti-Sense) Oligonukleotide, Proteinnukleinsäuren (PNA), und substituierte Nukleinsäureoligonukleotide. Genetisches Material kann mit Protein komplexiert oder gekoppelt sein. Die Bezeichnung „genetisches Material" soll auch „modifizierte Nukleotide", wie im Folgenden ausführlicher beschrieben, beinhalten. Die Nukleotide können modifiziert sein, um sie resistenter gegen Enzymverdau zu machen, die zelluläre Aufnahme zu fördern oder für andere Zwecke. Um die Aufnahme durch Zellen und/oder die Widerstandsfähigkeit gegenüber Enzymverdau zu verbessern, haben Forscher den negativen Sauerstoff an dem Phosphodiester-Rückgrad unter Bildung von Methylphosphonaten oder Phosphorylthioaten durch Methyl oder Schwefel ersetzt. Dies wird zu einem enzymresistenten synthetischen Oligonukleotid-Derivat-Strang führen, der dauerhafte Integrität besitzt, wenn er mit einem zellulären biologischen Material zusammengemischt wird. Nuklease-resistente Stränge können auch gebildet werden, indem 2'-O-Allyl-Gruppen in die synthetischen Oligostränge eingebaut werden. Phosphoryldithioate wurden ebenfalls gebildet. Die Modifikation durch Bildung von Phosphatestern und Phosphorylamidaten wurde bewerkstelligt.

[0243] Eine weitere Art der Modifikation, die untersucht wurde, ist das Ersetzen der Phosphodiesterbrücke zwischen Nukleotiden durch eine gänzlich andere Gruppe wie beispielsweise eine Siloxanbrücke, Carbonatbrücke, Carboxymethylesterbrücke, Acetamidbrücke, Carbamatbrücke, Thioetherbrücke und Peptidbrücke. Abgesehen von dem Ersetzen der Phospatbrücke kann man auch die Zucker- und Phospatreste durch eine synthetisches Polymer ersetzen und somit eine plastische DNA erhalten. Die Nukleosideinheiten selbst können modifiziert werden.

[0244] Die Bezeichnung „genetisches Material" wie in diesem gesamten Text verwendet, soll Nukleotidsegmente umfassen, die auf irgendeine der oben vorgeschlagenen Weisen und auf andere Weisen modifiziert sind. Im Allgemeinen wird in der folgenden Beschreibung der Erfindung die Bezeichnung „Oligonukleotid" für alle kurzen Formen von genetischem Material verwendet werden.

[0245] Genetische Materialien (d.h. Nukleinsäuren) können in der Länge stark variieren, von 3 Basen (ca. 10 Å) für ein Codon bis 10 Millarden Å oder ein Meter für menschliche DNA. Viele unterschiedliche Formen von genetischen Materialien besitzen ein Potential zur Verwendung in Gentherapien. [Beispiele für solche Bereiche: ein typisches humanes Gen ist ungefähr 34 Mikrons (μ) (340 000 Å) lang; die durchschnittliche Länge einer E. coli mRNA ist ungefähr die Hälfte eines Mikrons (μ); und tRNA, von der man annimmt, dass sie das kleinste der RNA-Moleküle ist, ist typischerweise ungefähr 0,003 Mikrons (μ) lang]. Potentiell kann ein beliebiges genetisches Material in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0246] Die Konjugate aus genetischem Material und Dendrimer werden als Komplexe bezeichnet. Ein „Komplex", wie diese Bezeichnung hierin verwendet wird, betrifft einen Typ von Konjugat aus Dendrimer und getragenem Material, in dem eine Assoziierung zwischen dem getragenem Material und dem Dendrimer durch ionische Bindung, van der Waals-Kräfte, Wasserstoffbindung, metallische Bindung oder eine beliebige Kombination davon bewirkt wird. In einem Komplex ist das getragene Material nicht durch kovalente Bindung mit dem Dendrimer assoziiert.

[0247] Die Aufnahme der DNA:Dendrimer-Komplexe durch Zellen wurde für einzelstängige DNA-Nukleotide mit relativ geringem Molekulargewicht (Beispiel 47, Fig. 20 und Fig. 21) ebenso gezeigt, wie für DNA mit hohem Molekulargewicht. Gentransfer und Expression wurde auch in Fig. 22 gezeigt, für zirkuläre oder stark geknäuelte DNA und lineare DNA (Beispiel 48, Fig. 22) und in anderen Experimenten und Figuren für vollständige Gene und längere DNA-Segmente (z.B. 6,5 kb). Diese Aufnahme, die bei DNA:Dendrimer beobachtet wird, wird über den Zelleintritt der mit DNA allein auftritt, ermöglicht und ist ein aktiver, energieabhängiger Prozess der Zielzelle (Beispiel 47).

[0248] Um das genetische Material an das Dendrimer zu binden, wird das Dendrimer, das bevorzugt für in vivo-Verwendung auf die oben beschriebene Weise bereits zielgerichtet ist, mit dem genetischen Material in

einer wässrigen Lösung bei Raumtemperatur (20–40°C) bei einem pH-Wert von ca. 5 bis ca. 10 gemischt. Die negativ geladenen Nukleinsäurekomplexe mit den positiv geladenen Oberflächen von Dendrimermakromolekülen bilden eine Gitterstruktur.

[0249] Genetisches Material wie beispielsweise DNA bildet stabile Komplexe mit Dendrimeren bei Ladungsverhältnissen von genetisches Material:Dendrimer von ungefähr 10:1, wobei bei Ladungsverhältnissen von ungefähr 2:1 und darunter mehr Komplexierung auftritt. (In Beispiel 42 wird für Probe 4 bei einem Ladungsverhältnis von 1:0,6 effiziente Transfektion beobachtet; siehe Tabelle XIV, Fig. 18 und Fig. 32. Dieses Ladungsverhältnis erlaubt auch vollständige DNA-Komplexierung, wenn es in einem Agrarosegel untersucht wird.) Bei niedrigeren Ladungsverhältnissen, z.B. 1:10 oder 1:100 bleiben die Komplexe weiter sehr stabil (siehe Beispiel 49, **Fig.** 23) und selbst in Abwesenheit von DEAE-Dextran wird Transfektion beobachtet (Beispiel 56 und Fig. 30). Die Komplexierung ist minimal bei Ladungsverhältnissen von DNA:Dendrimer oberhalb ungefähr 40:1 wie in Beispiel 49, **Fig.** 23(A)–(D) angedeutet. Am anderen Ende des Ladungsverhältnisbereichs werden für manche Dendrimere gute Transfektionsergebnisse beobachtet bei DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnissen von ungefähr 1:1000 und für manche bei niedrigen wie ungefähr 1:10 000 (Beispiel 56, Fig. 30). Es ist möglich, dass bei anderen Dendrimersystemen niedrige Ladungsverhältnisse wie etwa 1:1 000 000 bei der Vermittlung von Transfektion effektiv sein können.

[0250] Das Ladungsverhältnis scheint der entscheidende Faktor bei der Bildung der DNA:Dendrimer-Komplexe zu sein, wie in Beispiel 50 (Fig. 24) angedeutet ist, wo bei demselben molaren Verhältnis von 1:16 ein G 11 (EDA)-Dendrimer, das eine größere Oberflächenladung aufweist als ein G 8 (NH_3)-Dendrimer einen stabilen Komplex mit DNA bildet, während dies bei einem G 8 (NH_3)-Dendrimer, das mit DNA in demselben molaren Verhältnis gemischt ist, nicht erfolgt. Dies deutet darauf hin, dass die Komplexbildung stärker von dem Ladungsverhältnis als von dem molaren Verhältnis abhängt.

[0251] DNA:Dendrimer-Komplexe sind bemerkenswert stabil und über einen ziemlich weiten pH-Bereich, d.h. 5,2–9,8 (Beispiel 51, Fig. 25) und in einem weiten Bereich von Salzkonzentrationen, d.h. 0–1,5 M (Beispiel 52, **Fig.** 26) wasserlöslich. Die Komplexierung des genetischen Materials mit Dendrimer schützt dieses vor Verdau in Gegenwart von entweder Restriktionsendonukleaseenzymen oder zellulären Nukleasen (Beispiel 53, Fig. 27 und Beispiel 54, Fig. 28). Dadurch werden diese Komplexe für die Transfektion von Zellen in vivo geeignet.

[0252] Die Menge an genetischem Material pro Zelle, das unter Verwendung von DNA:Dendrimer-Komplexen transfiziert werden kann, kann variieren und zu einem Punkt führt eine Erhöhung der Konzentration an genetischem Material leicht zu einer Steigerung des Transfektionsausmaßes (Beispiel 55, Fig. 29). Bei einem gegebenen Ladungsverhältnis scheint die Transfektion bei 5 Mikrogramm (µg) an Plasmid-DNA pro Kulturwell (ungefähr 200 000 Zellen) größer zu sein als bei 1 µg Plasmid-DNA, obwohl dieser Effekt scheinbar bei 10 µg an Plasmid-DNA pro Well ein Plateau erreicht.

[0253] Es wird angenommen, dass Lösungen von genetischem Material:Dendrimer, in denen die Konzentration an genetischem Material zwischen ungefähr 1,0 und ungefähr 10 µg/ml liegt in vitro und in vivo nützlich sind. Die verwendete in vivo-Konzentration wird selbstverständlich als Funktion des Verabreichungsmodus variieren. Im Hinblick auf die Verdünnung, die im Blutkreislauf auftritt, wird für intravenöse Injektion eine stärker konzentrierte Lösung verwendet werden. Eine stärker verdünnte Lösung könnte für eine ortsspezifische Verabreichung, z.B. für direkte Injektion in einen Tumor oder ein Organ verwendet werden.

[0254] Es wird somit ausreichend genetisches Material, um eine Endkonzentration in Wasser von ungefähr 1,0 bis ungefähr 10,0 µg/ml zu erreichen, mit ausreichend dendritischem Polymer gemischt, das eine im Wesentlichen positive Oberflächenfunktionalität aufweist, um ein genetisches Material, dendritisches Polymer Ladungsverhältnis von ungefähr 10:1 bis ungefähr 1:10 000, weiter bevorzugt von ungefähr 3:1 bis ungefähr 1:1 000 oder weiter bevorzugt von ungefähr 1,5:1 bis ungefähr 1:100 oder von ungefähr 1:1 bis ungefähr 1:15 oder von ungefähr 1:5 bis ungefähr 1:10 aufzuweisen, als Funktion der oben diskutierten Variablen. Das Mischen wird bei einem pH-Wert von ungefähr 5 bis ungefähr 10 und einer Temperatur von ungefähr 20 bis ungefähr 40°C durchgeführt.

[0255] Allgemein ausgedrückt kann das Ladungsverhältnis von genetischem Material:Dendrimer von ungefähr 10:1 bis ungefähr 1:10 000, möglicherweise sogar weniger betragen, weiter bevorzugt liegt es jedoch bei ungefähr 5:1 oder sogar 3:1 und 1:10 000. Das innerhalb dieses Bereichs ausgewählte Verhältnis kann in Abhängigkeit davon variieren, ob ein verstärkendes Mittel, wie beispielsweise DEAE-Dextran, Glycerin oder Chloroquine verwendet wird oder nicht, oder ob ein Zielsteuerungsmittel verwendet wird. Obwohl die vorhergehen-

den breiten Bereiche noch anwendbar sind, beträgt der bevorzugte Bereich des Ladungsverhältnisses wenn kein Fördermittel verwendet wird von ungefähr 1:5 bis ungefähr 1:10 000, weiter bevorzugt 1:10 bis ungefähr 1:10 000. Entsprechend beträgt, wenn ein Fördermittel verwendet wird, der bevorzugte Bereich des Ladungsverhältnisses von ungefähr 5:1 bis ungefähr 1:10 000, bevorzugt von ungefähr 1:1 bis ungefähr 1:100, weiter bevorzugt von ungefähr 1:1 bis ungefähr 1:15 und am meisten bevorzugt von ungefähr 1:5 bis ungefähr 1:10. Wenn schließlich ein Zielsteuerungsmittel verwendet wird, so nimmt man an, dass höhere Ladungsverhältnisse mit besserer Wirkung verwendet werden können als bei nicht-gerichteter Transfektion. Es wird somit angenommen, dass der bevorzugte Bereich von ungefähr 10:1 bis ungefähr 1:10, weiter bevorzugt von ungefähr 3:1 bis ungefähr 1:10, weiter bevorzugt von ungefähr 1:1 bis ungefähr 1:10 und unter gewissen Umständen am meisten bevorzugt ungefähr 1:1 beträgt. Diese Bereiche werden im Folgenden ausführlicher diskutiert.

[0256] Typischerweise werden die Komplexe anfänglich bei Konzentrationen von genetischem Material von ca. 1,0 bis ca. 10,0 µg pro 20 µl gemischt und anschließend 50-fach verdünnt auf die Endkonzentration von 1,0 bis 10,0 µg an genetischem Material pro ml. Sowohl die ursprünglich höher konzentrierten als auch letztendlichen (genetisches Material:dendritisches Polymer)-Lösungen könnten als geeignete diagnostische oder pharmazeutische Zusammensetzungen abgepackt werden.

E Steigerung der Transfektion

[0257] Die Transfektion einer Zelle mit genetischem Material kann unter Verwendung von dendritischen Polymeren allein bewirkt werden, vorrrangig jedoch mit größeren (> G 8) Dendrimeren bei niedrigerem genetisches Material:Dendrimer-Ladungsverhältnis, z.B. ungefähr 1:5 und niedriger, bevorzugt niedriger als ungefähr 1:10, (Beispiel 56, **Fig. 30** und **Fig. 31**). Die Transfektion unter Verwendung von Dendrimer und genetischem Material allein kann gesteigert werden, indem zunächst das genetische Material mit einem Dendrimer einer niedrigeren Generation, z.B. G 5, komplexiert wird, und anschließend Zugabe eines größeren Dendrimers, z.B. G 9 wie oben diskutiert (siehe Beispiel 46, **Fig. 15** und **Fig. 16**) erfolgt. Diese funktioniert am besten, wenn das zweite Dendrimer in einer Konzentration von ungefähr 0,1 bis ungefähr 10 µmolar verwendet wird, obwohl die spezifische Konzentration abhängig vom Dendrimertyp (vergleiche **Fig. 15** und **Fig. 16**) variieren kann. Das erste Dendrimer und sein komplexiertes genetisches Material werden in Konzentrationen verwendet, die ausreichend sind, um ungefähr 1 µg genetisches Material pro Testwell zu komplexieren.

[0258] Komplexe, die Zellen nicht-spezifisch transfizieren, sollten zwei widersprüchliche Ziele erreichen; das Erste ist, DNA so dicht wie möglich zu komprimieren und gleichzeitig eine große positive Ladungsdichte auf der Oberfläche des Komplexes aufzuweisen, um Bindung an negativ geladene Phospholipide an Zellmembranen zu vermitteln. Dieses Erfordernis einer doppelten Wirkung lässt vermuten, dass eine polydisperse Größenmischung von Dendrimeren bei nicht-spezifischer Transfektion wertvoll sein könnte, wobei die kleineren Dendrimere helfen, DNA zu komprimieren, während die größeren Bindung an Zellen vermitteln. Dies kann auch dabei helfen, kleinere DNA:Dendrimer-Komplexe zu bilden, da die Dendrimere niedrigerer Generation das regelmäßige Gitter, das von den größeren Dendrimeren und DNA gebildet wird, unterbrechen. Konzepte wie diese werden durch Daten unterstützt, die in Elektronenmikroskopieaufnahmen dargestellt sind (d.h. **Fig.** 60, Felder 3, 4 und 5), die kleine, komprimierte DNA-Komplexe zeigen, wenn Dendrimere mit polydisperser Größe verwendet werden, während mit großen Dendrimeren allein massive DNA:Dendrimer-Komplexe gebildet werden.

[0259] Die Transfekton kann auch durch die Zugabe einer Vielfalt von Mitteln zu dem Transfektionspuffer gesteigert werden. Unerwarteterweise werden synergistische Transfektionsergebnisse erhalten, wenn DEAE-Dextran im Transfektionspuffer mit dem Komplex aus genetischem Material und Dendrimer vorhanden ist. Das genetisches Material:Dendrimer-Ladungsverhältnis beträgt von ungefähr 5:1 bis ungefähr 1:10 000, bevorzugt ungefähr 1:1 bis ungefähr 1:100, weiter bevorzugt von ungefähr 1:1 bis ungefähr 1:15 und am meisten bevorzugt von ungefähr 1:5 bis ungefähr 1:10. (Beispiel 56, **Fig. 30**; Beispiel 57, **Fig. 32**; Beispiel 58, **Fig. 33**; Beispiel 59, **Fig. 34**; Beispiel 42, **Fig. 17**). Die DEAE-Dextran-Konzentration sollte bevorzugt innerhalb eines relativ engen Bereichs von ungefähr 0,125 bis 2 µmolar und weiter bevorzugt von ungefähr 0,25 bis ungefähr 1 µmolar liegen, (Beispiel 60, **Fig. 35**). Das genetische Material muss außerdem mit dem Dendrimer komplexiert werden, bevor es in die DEAE-Dextran-Lösung gegeben wird, damit die Steigerung der Transfektion auftritt. Wenn dies erfolgt ist, ist die Transfektion durch DNA:Dendrimer-Komplexe bei Ladungsverhältnissen von ungefähr 1:1 bis ungefähr 1:100, weiter bevorzugt von ungefähr 1:5 bis ungefähr 1:10 in Gegenwart von DEAE-Dextran bei einer breiten Vielfalt von verschiedenen Typen von Zellen um Größenordnungen effektiver, als die Transfektion mit DNA:Dendrimer-Komplexen allein, (Beispiel 61, **Fig. 36**). Dies ist selbst bei schwer zu transfizierenden Zelllinien der Fall (Beispiel 62, **Fig. 37**). Es ist auch effektiver als die Transfektion unter Verwendung anderer Mittel, wie beispielsweise LIPOFECTIN™ und LIPOFECTAMINE™ (Beispiele 61

bis 63, Fig. 36 bis Fig. 38).

[0260] Typischerweise wird der Komplex aus genetischem Material und Dendrimer nach seiner Bildung 3–5 Minuten stehen gelassen, bevor er mit DEAE-Dextran zusammengebracht wird. Obwohl das DEAE-Dextran entweder zu der höher konzentrierten Komplexlösung (d.h. der 1–10 µg genetisches Material/20 µl Lösung) oder zu dem Transfektionspuffer zugegeben werden kann, ist es bevorzugt, es zu letzterem zuzugeben, mit dem die höher konzentrierte genetisches Material:Dendrimer-Komplex-Lösung anschließend verdünnt wird.

[0261] Es war bekannt, dass in vitro-Transfektion durch die Verwendung eines herkömmlichen Zellstörungsstoffes gesteigert werden kann. In der vorliegenden Erfindung scheint DEAE-Dextran als mehr als nur ein Zellstörungsmittel zu wirken wie aus Beispiel 64, Fig. 39 ersichtlich ist, worin die Wirkungen von DEAE-Dextran und dem Zellstörungsmittel DMSO verglichen werden. DMSO allein scheint im Vergleich zur Wirkung von DEAE-Dextran eine geringe Auswirkung auf die Transfektion mit DNA:Dendrimer-Komplexen aufzuweisen. Interessanterweise scheint DMSO nicht-synergistisch die Wirkung von DEAE-Dextran zu steigern, wenn die beiden gemeinsam verwendet werden, was nahelegt, dass die Wirkung von DEAE-Dextran andere Wirkungen als die Zellstörung einschließt.

[0262] Da die Zugabe von DEAE-Dextran oder anderen Mitteln zu dem DNA:Dendrimer-Komplex (nachdem dieser gebildet worden ist), sich bei der Förderung der Transfektion auf eine einzigartige Weise als wirksam erwiesen hat, wurde eine andere Art von Experiment durchgeführt, um die Rolle dieses Mittels bei der Steigerung nicht-spezifischer Transfektion besser zu verstehen. Es wurden Elektronenmikroskopie-Aufnahmen von DNA:Dendrimer-Komplexen mit und ohne Zugabe von DEAE-Dextran aufgenommen. Die Zugabe von DEAE-Dextran oder die Verwendung von polydispersen Mischungen von Dendrimeren verringerte die Größe der DNA:Dendrimer-Komplexe drastisch (d.h. **Fig.** 60, Felder 3, 4 und 5). Dies liefert eine Begründung dafür, warum diese Mittel eine Transfektion fördern könnten, da es naheliegt, dass die kleinere Größe der Komplexe, die mit diesen Mitteln erzielt werden, es ihnen erleichtert, Zutritt in die Zellen zu erhalten und Transfektion zu erzielen.

[0263] Die DNA:Dendrimer-Komplexe müssen ein elektronisch dichtes positiv geladenes Material enthalten, um als Fokus für die Bindung an negativ geladene Phospholipide auf der Zelloberfläche zu wirken. Dies wird am besten durch Verwendung von Dendrimeren höherer Generationen erzielt, die eine größere Oberflächenladungsdichte aufweisen. Unglücklicherweise neigen diese Dendrimere dazu, DNA in großen Aggregaten oder Makrogittern von ungefähr 2000 bis 5000 Å zu komplexieren, die von einer Zelle schwer durch Pinozytose aufgenommen werden.

[0264] DEAE-Dextran wirkt als Dispergiermittel, das die größeren Aggregate zu kleineren Komplexen reduziert, die auf ihrer Oberfläche noch immer das dicht geladene Dendrimer zur Bindung an die Zellen aufweisen. Polydisperse dendritische Polymere, d.h. Mischungen von Partikeln variierender Größenordnungen von ungefähr 22 bis ungefähr 110 Å (siehe z.B. Proben C und Q von Beispiel 42) neigen nicht dazu, die 2000 bis 5000 Å Aggregate zu bilden. Stattdessen scheinen sie keine größeren Aggregate als ungefähr bis zu 1000 Å zu bilden, was eine effiziente Transfektion von genetischem Material ohne Verwendung von DEAE-Dextran ermöglicht. Ein Vergleich von Elektronenmikroskopie-Aufnahmen für Komplexe aus genetischem Material mit einem G 10 (EDA)-Dendrimer einheitlicher Größe mit (**Fig.** 60, Feld 4) und ohne (**Fig.** 60, Feld 3) DEAE-Dextran-Zugabe zeigt den wesentlichen Unterschied in der Aggregatgröße. Eine Elektronenmikroskopie-Aufnahme mit einem genetischen Material, das mit einem polydispersen Dendrimer komplexiert ist (**Fig.** 60, Feld 5), zeigt Aggregate, die mit den in **Fig.** 60, Feld 4 gezeigten besser vergleichbar sind.

[0265] Überraschenderweise scheint auch Glycerin wie DEAE-Dextran synergistisch die Transfektion von genetischem Material in Komplexen aus genetischem Material und dendritischem Polymer zu fördern. Die Konzentration an Glycerin in der Transfektionslösung liegt bevorzugt im Bereich von ungefähr 2 bis 10 Gew.-%, weiter bevorzugt von ungefähr 2 bis ungefähr 5%. Es scheint eine dispergierende Wirkung, die mit der von DEAE-Dextran vergleichbar ist, aufzuweisen.

[0266] Chloroquine fördert ebenfalls die Transfektion und zwar mit überraschender Synergie, ob es alleine oder in Verbindung mit DEAE-Dextran als Förderer verwendet wird. Obwohl eine Bindung an irgendeine spezielle Theorie nicht gewünscht ist, wird angenommen, dass Chloroquine auf eine völlig andere Weise als DEAE-Dextran wirkt. Es wird angenommen, dass Chloroquine Endosome neutralisiert, somit die Sequestration und den schnellen Abbau von Komplexen aus genetischem Material und Dendrimer verhindert. Dies ermöglicht dass das genetische Material in größerem Ausmaß transkribiert und translatiert wird, als wenn es entweder allein oder nur in Gegenwart von DEAE-Dextran ohne Zugabe von Chloroquine transfiziert worden wäre

(siehe Fig. 61A und Fig. 61B, und Beispiel 73). Da es zwischen den Zellen in ihrer Fähigkeit, Komplexe in Endosomen zu fangen Unterschiede gibt, varriiert die steigernde Wirkung von Chloroquine entscheidend zwischen verschiedenen Zelllinien wie durch den Unterschied der Ergebnisse für die Transfektion von COS1-Zellen (Fig. 61A) und RAT2-Zellen (Fig. 61B) veranschaulicht ist.

[0267] Das Einführen zufälliger negativer Funktionalität auf der Oberfläche von dichtem Sternpolymer wird ebenfalls die Transfektion beeinflussen (Beispiel 67, Fig. 43). Solche negative Funktionalität wird durch zufälliges Einfügen von Carboxygruppen auf einer überwiegend positiv geladenen Oberfläche (z.B. mit Aminooberflächenfunktionalität) erreicht. Dendrimere mit sowohl positiver (kationischer) als auch negativer (anionischer) Funktionalität werden manchmal hierin als Dendrimere mit zwitterionischen Oberflächen bezeichnet. Eine Verringerung der gesamten positiven Oberflächenladung scheint im Allgemeinen die Transfektionseffizienz zu verringern, außer vielleicht bei geringeren Ladungsverhältnissen, z.B. 1:10 im Vergleich zu 1:5 oder 1:1 (Fig. 43).

F Zielgerichtete Transfektion

[0268] Der Einbau von Zielsteuerungsmitteln in den Komplex aus Dendrimer und genetischem Material leitet den Komplex nicht nur zu einer gewünschten Zelle, sondern kann auch die Transfektion von Zellen mit der Zielgruppe steigern (Beispiel 65, Fig. 40). Es wird ausreichend Zielsteuerungsmittel an das Makromolekül gebunden, um es zu Rezeptorstellen auf dem zellulären Material, das transfiziert werden soll, zu ziehen und zu binden, aber nicht die Oberflächenladung bis zu dem Punkt zu verringern, dass keine DNA-Komplexierung auftritt. Als eine Folge davon wird die Bindung des Zielsteuerungsmittels so durchgeführt, oder in verhältnismäßig so kleinen Mengen, bezogen auf funktionelle Gruppen auf der Oberfläche des Makromoleküls, dass das Zielsteuerungsmittel nicht merklich mit dem kationischen Charakter der Oberfläche des dendritischen Polymers wechselwirkt. Somit wird die Fähigkeit des Dendrimers, mit DNA (in den vorhergehend erwähnten Ladungsverhältnissen) stabile Komplexe zu bilden, durch die Gegenwart von Zielsteuerungsmittel nicht beeinträchtigt (Beispiel 65, Fig. 41).

[0269] Die Verwendung von Zielsteuerungsmitteln in Verbindung mit dem Konjugat aus Dendrimer und genetischem Material ist einer der wichtigsten bevorzugten Aspekte der Erfindung. Die Tatsache, dass eine nicht-zielgerichtete Transfektion bei Ladungsverhältnissen von DNA:Dendrimer oberhalb ungefähr 1:10 oder 1:5 ohne Steigerung nicht so wirkungsvoll autritt kann daran liegen, dass diese Komplexe nicht genügend positive Ladung aufweisen, um negativ geladene Phospholipide auf der Oberfläche von Zellen zu binden. Es ist wichtig, dass der gebildete Komplex bei diesen hohen Ladungsverhältnissen von genetisches Material:Dendrimer (d.h. 1:10 bis 1:1 oder möglicherweise sogar 3:1 oder sogar 10:1) noch immer zielgerichtet sein können, um spezifische Zellen durch ein Zielsteuerungsmittel zu transfizieren. Eine nicht beabsichtigte Transfektion von zufällig angetroffenen Zellen (die unter vielen Umständen nicht wünschenswert sein kann) wird verhindert, wenn die DNA:Dendrimer-Komplexe auf diese Weise gebildet werden bei diesen höheren Ladungsverhältnissen oder wenn Serum zugegen ist (Beispiel 66, Fig. 42). Wenn ein Zielsteuerungsmittel verwendet wird, kann ein Ladungsverhältnis von 1:1 in vielen Anwendungen bevorzugt sein.

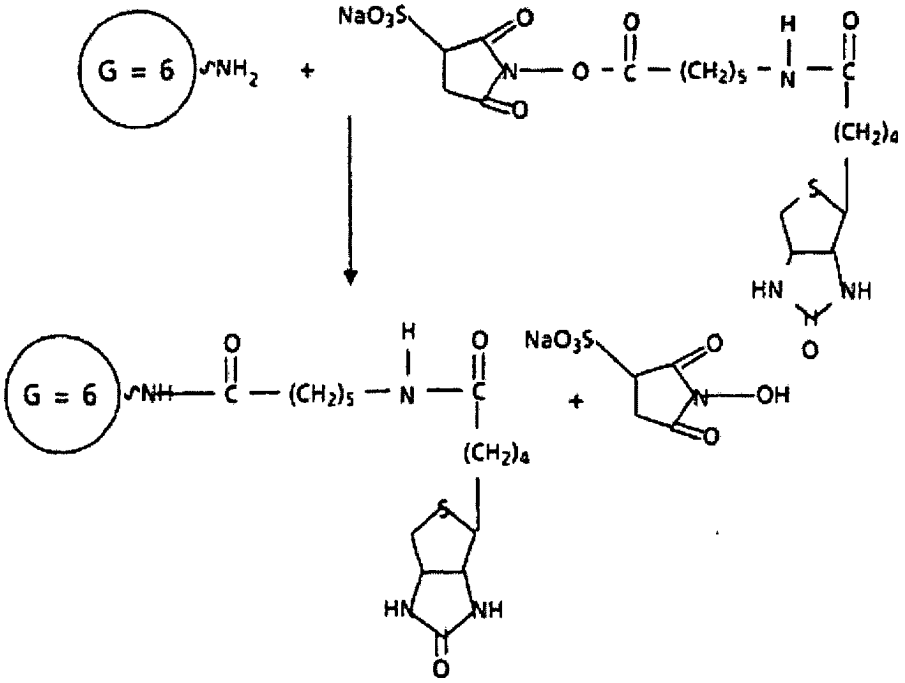
[0270] Die Verwendung eines Zielsteuerungsmittels ist sehr wichtig, um genetisches Material in vivo in Zellen zu transfizieren. Obwohl DEAE-Dextran für in vitro-Verwendungszwecke nicht toxisch ist, wäre es für eine Verwendung in vivo als Transfektionsverbesserungsmittel nicht geeignet. Komplexe aus Dendrimer und genetischem Material mit oder ohne Förderungsmittel transfizierten Zellen in Gegenwart von Serum nicht signifikant (Beispiel 66, Fig. 42). Ein Zielsteuerungsmittel, das die Bindung des Komplexes aus genetischem Material und Dendrimer an speziell angedachte Zellen steigert, ermöglicht selbst in Gegenwart von Serum die Transfektion des genetischen Materials in solche Zellen.

[0271] Zielsteuerungsmittel oder modifizierte Dendrimeroberflächen können ebenfalls mit dem Komplex aus Dendrimer und genetischem Material in Gegenwart von DEAE-Dextran in vitro verwendet werden, um die Transfektion zu steigern. Die Gegenwart von Zielsteuerungsmitteln wie beispielsweise dem Galaktosetrisaccharid auf den Dendrimeren scheint die Transfektion von genetischem Material in Zellen, die den Rezeptor für diesen Zucker exprimieren, entscheidend zu steigern. Dies wird mit der Transfektion, die unter Verwendung von nicht-konjugiertem G 11 (EDA) PAMAM-Dendrimer erreicht wird, verglichen (siehe Fig. 40).

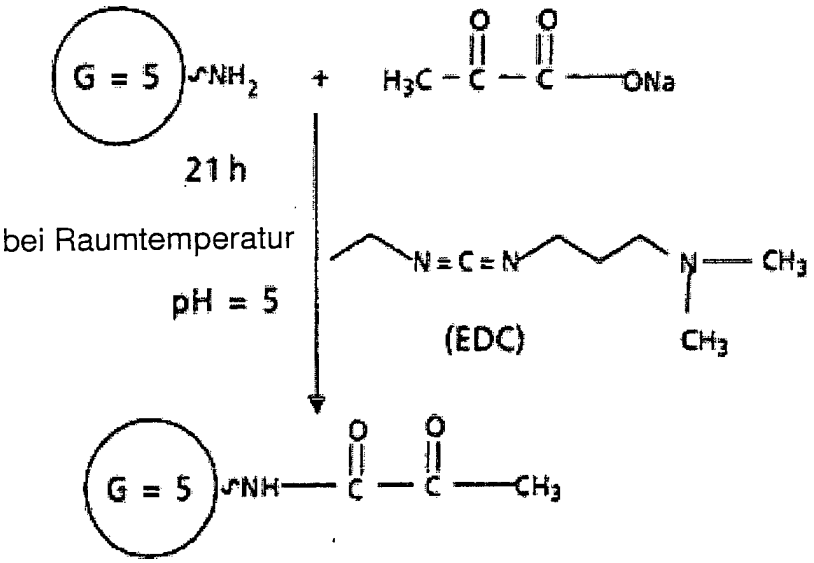
[0272] Geeignete Zielsteuerungsmittel beinhalten ein beliebiges Material, das mit Spezifität und hoher Affinität bindet wie beispielsweise Antikörper, Antikörpertragmente wie Fab, Fab', $F(ab')_2$-Fragmente, einzelsträngige Antikörper oder beliebige andere Antikörperfragmente mit Zielspezifität, Glykoproteine, Proteine, Glykolipide, Hormone, zusätzliche biologische Response-modifier, Epitope, Zellnährstoffe, chemische Funkionalitäten, die eine Zielzell-Spezifität aufweisen und dergleichen. Der Fachmann wird zahlreiche Wege, um ein Zielsteu-

erungsmittel an das Dendrimer zu knüpfen, erkennen.

[0273] Ein Verfahren für die Anbindung eines bevorzugten Zielsteuerungsmittels, Biotin, an ein Dendrimer mit einer aminofunktionalen Oberfläche wird im Folgenden schematisch veranschaulicht:



[0274] Anbindung von Brenztraubensäure, einem weiteren möglichen Zielsteuerungsmittel an ein Dendrimer mit einer aminofunktionalen Oberfläche erfolgt gemäß der folgenden Reaktion, die die Kopplung von 64 Pyruvaten an G 5-Dendrimere zeigt:



[0275] Das Ausmaß der Funkionalisierung des Dendrimers mit dem Zielsteuerungsmittel ist minimal, um die Interferenz des Zielsteuerungsmittels mit dem insgesamt kationischen Oberflächencharakter des Dendrimers zu minimieren. Somit liegt das stöchiometrische Verhältnis von Zielsteuerungsmittel zu Dendrimermakromolekül bei ungefähr 1:1 bis ungefähr $N_cN_b^{G-1}$:1. (Wobei N_c und G wie vorhergehend definiert sind und N_b die Verzweigungsmultiplizität ist). An einem Dendrimer, bei dem N_c = 3, N_D = 2, ist hierfür die Verwendung von nur einer bis $N_cN_b^{G-1}$-terminalen Gruppen erforderlich, wobei $N_cN_b^{G-1}$, bis 1 terminale Gruppen zur Verfügung bleiben, um Funktionalität positiven Charakters (z.B. Amino) und in manchen Fällen dazwischenliegende negative funktionelle Carboxyl-Gruppen bereitzustellen. Die konsistente Struktur des Dendrimers, insbesondere für dichte Sternpolymere und Dendrimere, ermöglicht die Konjugation mit extremer Genauigkeit, die mit anderen Arten von Materialien nicht erzielt wird. Diese Präzision ermöglicht die Bildung von zielsteuernden Dendrimeren, die die Fähigkeit genetisches Material zu binden und zu tragen beibehalten.

[0276] Ebenso wie einzelne Dendrimermoleküle durch Anbinden einer Zielsteuerungsgruppe, differenziert werden können, so können auch Aggregate differenziert werden. Man kann an alle Dendrimere in dem Aggregat oder nur an eine oder einen Teil von ihnen ein Zielsteuerungsmittel binden, welche dann mit anderen nicht-differenziierten Dendrimeren aggregiert werden. Nach Mischen der beiden Arten unter milden physiologischen Bedingungen (d.h. pH = 7,4) werden die beiden Arten miteinander auf Basis von elektrostatischen Wechselwirkungen assoziieren. Dieses neue Verfahren bietet nicht nur einen neuen Weg, um die differenziierten Dendrimeraggregate zu synthetisieren, sondern stellt auch ein System bereit, das die Zielsteuerungsgruppen unter physiologischen Bedingungen abgeben kann.

G Verwendung von Konjugaten aus genetischem Material und Dendrimer

[0277] Die genetisches Material:Dendrimer-Konjugate der vorliegenden Erfindung können für den DNA-Transfer entweder in vivo oder in vitro verwendet werden. Die in vivo-Verwendung beeinhaltet das Einbringen des Konjugats in den Blutkreislauf, um eine Zielzelle zu erreichen, so werden beispielsweise DNA:Dendrimer-Komplexe in die Portalvene injiziert werden, um Hepatocyten zu erreichen. Die Komplexe können auch in einen bestimmten lokal begrenzten Bereich der von Interesse ist injiziert werden, wie beispielsweise in einen Gelenkraum oder die peritoneale Kavität, um Zellen lokal zu transfizieren. Ein transdermales Einbringen des Konjugats in den Körper kann ebenfalls eingesetzt werden und es kann ebenso wie mit anderen Verfahren auf ähnliche Weise verwendet werden, wie das Einbringen von Pharmazeutika in den Körper.

[0278] Ein Zielsteuerungsmittel an dem Dendrimer ermöglicht die Steuerung und Bindung des Konjugats an einen Zelloberflächen-Rezeptor und dessen anschließende Transfektion durch Endozytose. **Fig.** 51 veranschaulicht den hypothetischen Vorgang eines zielgerichteten DNA:Dendrimer-Komplexes bei der Transfektion einer Zelle.

[0279] Bei „A" wird DNA (10) mit mehreren dichten Sterndendrimeren (20) mit gebundenem Zielsteuerungsmittel (30) komplexiert und komprimiert. Bei „B" hat sich das Konjugat (10–20–30) an eine Zelle (40) an Rezeptoren (50) über das Zielsteuerungsmittel (30) gebunden. Bei „C" erfolgt Transfektion, es ist die Dissoziierung von DNA (10) von dem Dendrimer (20) veranschaulicht, wodurch eine anschließende Transkription und Translation erleichtert wird.

[0280] Radionuklid-Studien zeigen, dass ein wesentlicher Teil des transfizierten genetischen Materials in den Kern von eukaryontischen Zellen eindringt (Beispiel 70, **Fig.** 47, A–F). Das Produkt von Dendrimer-transfiziertem Material zeigt eine hervorragende Substantivität (Beispiel 68, Fig. 44). Die LUCIFERASE™-Enzymaktivität ist 21 Stunden nach Transfektion ausgeprägt und nach 45 Stunden noch immer deutlich vorhanden und eine gewisse Aktivität dauert sogar 69 Stunden an. Die Expression von lacZ-Gen, das mit RSV-β-gal-Plasmid und Dendrimer in Zellen gebracht wurde, ist in den **Fig.** 48, Fig. 49 und 50 (siehe auch Beispiel 71) als Fotografie gezeigt. Die Zellen, die lacZ-Gen exprimieren, sind die Zellen, die in den Figuren geschwärzt wurden. Unter entsprechenden Bedingungen ist fast jede Zelle gefärbt, was dokumentiert, dass in fast jeder Zelle in der Kultur eine Transfektion stattgefunden hat.

[0281] Die DNA:Dendrimer-Komplexe per se weisen eine sehr niederige Cytotoxizität auf (Beispiel 69, Fig. 45 und Fig. 46). Der normale Zelltod in einer Kultur liegt bei etwa 5–10%. Durch die Zugabe von DNA:Dendrimer-Komplexen zu der Zellkultur wird die Attritionsrate nicht merklich erhöht. Durch die Zugabe von DEAE-Dextran zusammen mit dem DNA:Dendrimer-Komplex wird die Toxizität zwar erhöht aber nicht ausreichend, um dessen Verwendung in vitro zu verhindern (Fig. 45 und Fig. 46). Das Vorgehende ist für eine Vielfalt unterschiedlicher Zelltypen gezeigt worden (ibid).

[0282] Genetisches Material, das entsprechend der vorliegenden Erfindung transfiziert wurde, kann permanent in die chromosomale DNA der Zelle eingebaut werden und wird erfolgreich reproduziert und in Klone darauffolgender Generationen weiter getragen (Beispiel 72, Fig. 52 und Fig. 53). Gene, die G 418 (Neomycin)-Resistenz und β-Galactosidase exprimieren, wurden unter Verwendung der Techniken der vorliegenden Erfindung erfolgreich in D5 und RAT2-Zelllinien transfiziert. Beide Gene wurden auf einem einzelen RSV-β-gal-Neoplasmid transportiert. Diese Zelllinien replizieren alle 24 Stunden. Vier Wochen nach der Transfektion fuhren die neu gebildeten Klone fort, Neomycinresistenz und β-Galactosidase zu exprimieren. Die unter Verwendung der Techniken der vorliegenden Erfindung erhaltenen Ergebnisse sind im Vergleich zu Techniken des Standes der Technik, wie beispielsweise der Vermittlung von Transfektion mit Calciumphosphat oder DEAE-Dextran allein überragend. Ähnliche Ergebnisse werden erhalten, wenn Reportergene von verschiedenen Expressionsplasmiden co-transfiziert werden (z.B. Neomycin oder β-Galactosidase).

[0283] Die Transfektion von genetischem Material kann auch unter Verwendung anderer Typen von dendritischen Polymeren an Stelle von dichten Sternpolymeren, d.h. mit einem Lysin-basierten unsymmetrisch verzweigten Dendrimer erzielt werden, wie in Beispiel 73 (Fig. 54) demonstriert ist. Alle Bedingungen aus der vorhergehenden Diskussion zur Transfektion mit dichten Sternpolymeren treffen auch für die Transfektion unter Verwendung anderer Arten von dendritischen Polymeren zu. Zum Beispiel steigert auch DEAE-Dextran synergistisch solche Transfektion mit einem asymmetrischen Lysin-Dendrimer bei Ladungsverhältnissen von 1:5 bis 1:10 von DNA zu Dendrimer.

Beispiele

[0284] Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung weiter. Die mit Buchstaben bezeichneten Beispiele betreffen die Herstellung von Ausgangsmaterialien; die mit Nummern bezeichneten Beispiele betreffen die Herstellung von Produkten dieser Erfindung.

[0285] In den folgenden Beispielen wurden die folgenden Bezeichnungen und Bedingungen verwendet, wenn nicht anders angegeben.

Glossar:

Umgebungstemperatur bedeutet Raumtemperatur oder ungefähr 20 bis ungefähr 25°C.
ASGPR bedeutet Asialoglycoprotein-Rezeptor.
BHA bedeutet Benzhydrylamin.
β-gal bedeutet RSV-lacZ.
Bindungspuffer bedeutet eine spezifische Pufferlösung, wie im Folgenden unter Protokoll für Dendrimer-Dextrantransfektion, Tag 2, Schritt 1, Diskussion zur Herstellung der Lösung beschrieben
BOC bedeutet t-Butoxycarbonyl.
Konz. bedeutet konzentriert.
Cyt c bedeutet das Protein Cytochrom C.
DCC bedeutet Dicyclohexylcarbodiimid.
DEAE-Dextran bedeutet einen Diethylaminoethylether von Dextran, ein elektropositiv geladenes Polymer.
DMEM bedeutet Dulbecco's modifiziertes Eagles Medium
DMF bedeutet Dimethylformamid.
DMSO bedeutet Dimethylsulfoxid.
DO3A bedeutet 1,4,7,10-Tetraazacyclododekan-1,4,7-triessigsäure.
DOTA bedeutet 1,4,7,10-Tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraessigsäure.
DTAF bedeutet Dichlortriazinylfluorescein.
DTPA bedeutet Diethylentriaminopentaessigsäure.
DTPMP bedeutet Diethylentriaminpentamethylenphosphonsäure.
DTT bedeutet 1,4-Dithiothreitol.
EBV bedeutet Epstein-Barr-Virus.
EBV-A bedeutet Expressionsplasmid, das ein Hygromycin B-Phosphotransferase- Protein produziert, das HYGROMYCIN B™-Antibiotikum inaktiviert von einem
Kinesegen, das vom EBV-Promoter angetrieben wird.
EDA bedeutet Ethylendiamin.
EDAC bedeutet 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid.
EDC bedeutet 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-Ethylcarbodiimid.
EDTA bedeutet Ethylendiamintetraessigsäure.
FACS-Analyse bedeutet Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung.
FITC bedeutet Fluoresceinisothiocyanat.
G oder Gen bedeutet die Generation des Dendrimers.
GC bedeutet Gaschromatographie.
GGE bedeutet Gradienten-Gelelektrophorese.
HBS bedeutet Hanks gepufferte Saline.
HEPES = N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure.
HOBT bedeutet N-Hydroxybenzotriazol.
HPLC bedeutet Hochleistungsflüssigchromatographie.
HRP bedeutet Meerrettichperoxidase.
HYGROMYCIN B™ ist ein aminoglycosidisches Antibiotikum, das von Streptomyces hygroscopicus produziert wird.
ICAM bedeutet interzelluläres Zelladhäsionsmolekül.

Immunoglobulin bedeutet IgG, IgM, IgA, IgD und IgE, einschließlich Fab, $F(ab')_2$ und andere Fragmente.
LC bedeutet Flüssigchromatographie.
LUCIFERASE™ bedeutet ein Enzym, das von dem Glühwürmchen-Luziferasegen produziert wird, das Enzym ist erhältlich von Promega, Madison, WI, US.
LUCIFERIN™ bedeutet ein Substrat zur Messung von LUCIFERASE™-Enzymaktivität.
MB+ bedeutet eine kationische Form des Farbstoffs Methylenblau.
NHS-LC-Biotin bedeutet einen Standardspacer mit Linker, der mit Biotin verwendet wird.
NMP bedeutet N-Methylpyrrolidinon.
Über Nacht bedeutet ungefähr 9 bis 18 Stunden.
PAMAM bedeutet Polyamidoamin.
PBS bedeutet phosphatgepufferte Saline (erhältlich von Sigma Chemical), die 120 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, enthält.
PEI bedeutet Polyethylenimin.
P_i bedeutet anorganisches Phosphat (in Puffern verwendet)
PTFE bedeutet Polytetrafluorethylen.
RSV-β-gal-NEO bedeutet Expressionsplasmid das β-Galactosidase-Protein produziert aus dem lacZ-Gen und Aminoglycosidphosphotransferaseprotein aus dem APH-Gen (NEO), angetrieben von dem RSV-Promoter.
RSV-lac bedeutet Expressionsplasmid, welches β-Galactosidase-Protein aus dem lacZ-Gen, das von einem RSV-Promoter angetrieben ist, produziert.
RSV-luc bedeutet ein Reporterplasmid, das Glühwürmchen-Luziferasegen exprimiert, angetrieben von dem RSV-Promoter.
SDS bedeutet Natriumdodecylsulfat.
SP-Sephadex™ C-25-Harz ist ein Kationenaustauschharz mit Sulfonsäure-Funktionalität, vertrieben von Pharmacia, Inc.
TREN bedeutet tris-(2-Aminoethyl)amin.
THF bedeutet Tetrahydrofuran.
TLC bedeutet Dünnschichtchromatographie.
TMB bedeutet 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin.
TRIS-Glycin bedeutet N-[2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycin.
TRIS bedeutet Trisaminpuffer, d.h. Tris(hydroxymethyl)aminomethan.
Triton X-100 bedeutet Oktoxynol-9, ist das ethoxylierte Alkylphenol, das allgemein der Formel $C_8H_{17}C_6H_4(OCH_2CH_2)_nOH$ entspricht, wobei n einen mittleren Wert von 9 besitzt (erhältlich von Rohm und Haas), ein Tensid.
X-gal bedeutet 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid.

Allgemeiner experimenteller Teil

[0286] Massenspektren wurden entweder an einem Finnigan TSQ-Massenspektrometer (Q^1MS-Modus) oder einem VG ZAB-MS-Hochauflösungsmassenspektrometer erhalten (Fastatombombardment mit Xenon, unter Verwendung von 3:1 Dithiothreitol: Dithioerythritol).

[0287] ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren wurden unter Verwendung eines Varian VXR-300, Bruker APC 300, IBM/Bruker NR-80 oder eines Jeol FX400-Spektrometers erhalten. Alle Spektren wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 30°C erhalten. ^{1}H-NMR-Spektren wurden entsprechend der oben aufgelisteten Ausrüstung bei 300 MHz, 80 MHz oder 400 MHz durchgeführt; ^{13}C-NMR-Spektren wurden entsprechend der oben aufgelisteten Ausrüstung bei 75 MHz, 20 MHz oder 100 MHz durchgeführt. Die NMR-Werte sind δ-Werte bezogen auf TMS (Tetramethylsilan) oder wenn das Lösungsmittel D_2O war bezogen auf DSS (2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure, Natriumsalz).

[0288] Infrarotspektren (IR) wurden an einem Nicolet 5SX FT/IR-Instrument aufgenommen.

[0289] Für die Chromatographievorgänge waren die meisten Lösungsmittel Fisher HPLC-Grad-Materialien. Ammoniumacetat wurde von Aldrich bezogen. Wasser wurde unter Verwendung eines Barnstead NANOpure™-Wasserfiltrationssystems gereinigt. Präparative Chromatographie von organischen Verbindungen wurde entweder durch normale Gravitätschromatographie unter Verwendung von Standardtechniken oder durch Flash-Chromatographie, wie von C. W. Still et al., J. Org. Chem. 43, 2923–24 (1978) beschrieben, durchgeführt.

[0290] Die angegebenen TLC und R_f-Werte wurden unter Verwendung dieser Lösungsmittelsysteme und kommerziell erhältlicher, Normalphasen Silica-TLC-Platten [GHLF 250 Micron, Analtech Inc. oder Merck Sili-

cagel 60F_{254}] erhalten. Präparative Säulenchromatographie wurde unter Verwendung von Merck Grad 60, 60 Å Silicagel durchgeführt. Alle Prozentangaben sind pro Gewicht, wenn nicht anders angegeben.

[0291] Ein pH-Stat ist eine mechanische Vorrichtung, welche den pH-Wert einer Lösung misst und durch Zugabe der entsprechenden Menge einer vorausgewählten Säure und/oder Base auf einen vorbestimmten, gewünschten Wert anpasst.

[0292] Einige Feststoffe wurden unter Verwendung eines Rotationsverdampfers (Buchi 461) und/oder eines Vakuumofens bei einer Temperatur von ungefähr 55–60°C für mehrere Stunden getrocknet. Außerdem wurde für die Entfernung von Lösungsmittel ein automatischer Gefriertrockner Virtis-Modell 10–010 oder ein Speed Vac™-Konzentrierer verwendet.

[0293] Die verwendeten HPLC-Säulen waren: Handgepackte Q-Sepharose™ (Pharmacia), entweder 1,5 cm × 25 cm oder 2,5 cm × 25 cm; Zorbax™-BIO-Serie GF-250 (9,4 mm × 25 cm) von DuPont Instruments; Vydac™ (Handelsmarke der Separation Group Hesperia, CA) Protein C-4 (4,6 mm × 25 cm) von der Separation Group (Hesperia, CA); Mono-Q™ und SP-Sephadex™ (Handelsname von Pharmacia Biotechnology Products) von Pharmacia; Sep-Pak™ (Handelsname von Waters Associates) C-18-Kartusche wurde von Waters Associates (Milford, MA) bezogen; Sephadex™ G-25-Einwegsäulen (2,2 ml) von Isolab Inc. (Akron, OH); Centricon™-30 (Handelsname der Amicon Division, W. R. Grace & Co. Danvers, MA) Mikrokonzentrierer von Amicon; und Spherisorb™ ODS-1 (Handelsname von Phase Separations, Ltd.).

[0294] Für die Zentrifugation und Aufkonzentrierung wurde eine Sorvall RT 6000B (Gefrierzentrifuge von DuPont) verwendet. Ein Speed Vac-Konzentrierer (Savant Instruments Inc., Hicksville, N.Y.) wurde zur Entfernung flüchtiger Lösungsmittel verwendet.

Beispiel A: Herstellung von 2-Carboxamido-3-(4'-nitrophenyl)propanamid.

[0295] p-Nitrobenzylmalonatdiethylester (2,4 Gramm (g), 8,13 mmol) wurden in 35 ml Methanol gelöst. Die Lösung wurde unter Rühren auf 50–55°C erwärmt und ein Strom von wasserfreiem Ammoniak wurde für 64 Stunden durch die Lösung durchgeleitet. Die Lösung wurde gekühlt und weißes, flockiges Produkt wurde abfiltriert und aus 225 ml siedendem Methanol umkristallisiert, um 1,85 g (7,80 mmol) an bis-Amid in 96%iger Ausbeute zu ergeben [Smp = 235,6°C (d)]. Die Titelstruktur wurde durch MS, ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektroskopie bestätigt.
Analytik: Ber. für $C_{10}H_{11}O_4N_3$

	C	H	N
Theoretisch:	50,63	4,69	17,72
Gefunden:	50,75	4,81	17,94

Beispiel B: Herstellung von 1-Amino-2-(aminomethyl)-3-(4'-nitrophenyl)propan.

[0296] 2-Carboxamido-3-(4'-nitrophenyl)propanamid (2,0 g, 8,43 mmol) wurde unter Rühren in einer Stickstoffatmosphäre in 35 ml trockenem THF aufgeschlämmt. Zu dieser Mischung wurde ein Boran/THF-Komplex (106 ml, 106 mmol) über eine Spritze zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend für 48 Stunden unter Rückfluss erwärmt, wobei sich während dieser Zeit das suspendierte Amid auflöste. Die Lösung wurde gekühlt und THF wurde unter Verwendung eines Rotationsverdampfers im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt und Boran-Rückstand wurden in 50 ml Ethanol gelöst und diese Lösung wurde mit wasserfreiem Chlorwasserstoffgas gespült. Die Lösung wurde für 1 Stunde unter Rückfluss erhitzt und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das rohe Hydrochloridsalz wurde in 15 ml entionisiertem Wasser gelöst und mit zwei 50 ml Portionen Methylenchlorid extrahiert. Die wässrige Schicht wurde in einem Eisbad unter einer Argondecke gekühlt und es wurde langsam 50%ige Natriumhydroxid-Lösung zugegeben bis zum basischen pH-Wert = 11,7. Die basische wässrige Schicht wurde mit vier 25 ml Portionen Methylenchlorid extrahiert und diese vereinigten Extrakte wurden unter Verwendung eines Rotationsverdampfers verdampft, um 1,45 g bernsteinfarbenes Öl zu ergeben. Dieses Öl wurde mit Diethylether (50 ml) trituriert und unter Druck durch eine kurze Silicagelsäule (Grad 62 Aldrich) filtriert. Die Säule wurde mit 100 ml Ether gewaschen und die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum eingedampft, um 1,05 g (5,02 mmol) des genannten Diamins als klares Öl zu ergeben [Smp = 275–278°C (d) bis HCl-Salz].

[0297] Die Titelstruktur wurde durch MS, ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektroskopie bestätigt.
Analytik: Ber. für $C_{10}H_{17}N_3O_2Cl_2$

	C	H	N
Theoretisch:	42,57	6,07	14,89
Gefunden:	43,00	6,14	15,31

Beispiel C: Herstellung von 1-Amino-2-(aminomethyl)-3-(4'-aminophenyl)propan.

[0298] Boran/THF-Lösung (70 ml, 70 mmol) wurden unter Stickstoff über eine Kanülennadel unter Rühren zu einem Kolben mit 4-Aminobenzylmalonamid (1,5 g, 7,24 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde für 40 Stunden zum Rückfluss gebracht. Die farblose Lösung wurde gekühlt und überschüssiges THF wurde durch Rotationsverdampfen entfernt, wobei ein klares gelatineartiges Öl zurückblieb. Methanol (50 ml) wurde vorsichtig zu dem Öl zugegeben, wobei eine merkliche Gasentwicklung stattfand. Trockenes Chlorwasserstoffgas wurde durch die Suspension geleitet, um eine Auflösung zu bewirken und die Lösung wurde anschließend für 1 Minute unter Rückfluss erhitzt. Die Methanol/HCl-Lösung wurde durch Rotationsverdampfen entfernt und das restliche Hydrochloridsalz wurde erneut mit derselben Auflösungs/Rückfluss-Vorgehensweise behandelt. Das erhaltene Hydrochloridsalz wurde in 10 ml Wasser gelöst und in einem Eisbad unter Argon gekühlt. Konz. Natriumhydroxid (50%) wurde langsam unter Rühren bis zu einem pH-Wert von 11 zugegeben. Der wässrige Teil wurde anschließend mit 2 × 100 ml Portionen Chloroform extrahiert, die vereinigt wurden und ohne Trocknen durch einen kurzen Silicagelpfropf filtriert wurden. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt (Rotationsverdampfer), wodurch die Titelverbindung (0,90 g, 5,02 mmol) in 70%iger Ausbeute anfiel (R_f = 0,65 $CHCl_3$/MeOH/NH_4OH konzentriert – 2/2/1). Die Titelstruktur wurde durch ^1H- und ^{13}C-NMR-Spektroskopie bestätigt und ohne weitere Reinigung verwendet.

Beispiel D: Herstellung von 6-(4-Aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioxoundekan.

[0299] 4-Aminobenzylmalonatdimethylester (2,03 g, 8,43 mmol) wurden in 10 ml Methanol gelöst. Diese Lösung wurde tropfenweise zu einer gerührten Lösung von frisch destilliertem Ethylendiamin (6,00 g, 103,4 mmol) in 10 ml Methanol unter Stickstoff innerhalb eines Zeitraums von 2 Stunden zugegeben. Die klare Lösung wurde für 4 Tage gerührt und TLC-Analyse zeigte eine vollständige Umwandlung von Diester (R_f = 0,91) zu dem bis-Amid (R_f = 0,42–20% konzentriertes NH_4OH/80% Ethanol). Dieses Material war stark Ninhydrin-positiv. Das Methanol und überschüssiges Diamin wurden an einem Rotationsverdampfer entfernt und der resultierende weiße Feststoff wurde über Nacht im Vakuum getrocknet (10^{-1} mm, 50°C), um das Rohprodukt (2,45 g, 8,36 mmol) in 99%iger Ausbeute zu ergeben. Eine analytische Probe wurde aus Chloroform/Hexan umkristallisiert, Smp = 160–161°C. Die Massenspektrums-Daten, ^1H- und ^{13}C-NMR-Daten stimmten mit der Struktur der Titelverbindung überein.

Beispiel E: Reaktion von Mesylaziridin mit 1-Amino-2-(aminomethyl)-3-(4-nitrophenyl)propan.

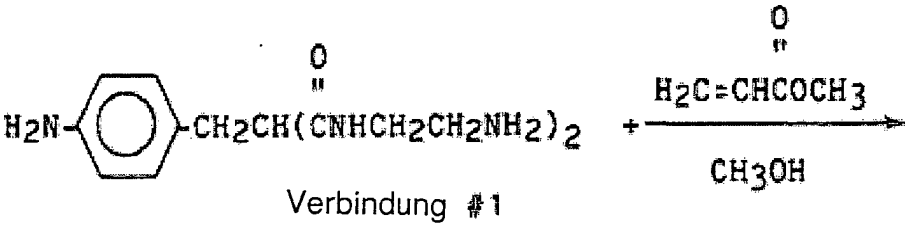
[0300] 1-Amino-2-(aminomethyl)-3-(4-nitrophenyl)propan (400 mg, 1,91 mmol, > 96% rein) wurde in 10,5 ml absolutem Ethanol unter Stickstoff gelöst. Mesylaziridin (950 mg, 7,85 mmol) wurde als Feststoff zu der gerührten Diaminlösung zugegeben. Die Reaktion wurde bei 25°C für 14 Stunden unter Verwendung eines Magnetrührers gerührt und während dieses Zeitraums bildete sich ein weißer, gummiartiger Rückstand an den Seiten des Kolbens. Das Ethanol wurde abdekantiert und der Rückstand wurde mit einer weiteren Portion von 15 ml Ethanol trituriert, um jegliches nicht umgesetztes Aziridin zu entfernen. Das gummiartige Produkt wurde im Vakuum getrocknet (10^1 mm, 25°C), um das Tetrakis-methylsulfonamid (1,0 g, 1,44 mmol) in 75%iger Ausbeute zu ergeben (R_f = 0,74 – NH_4OH/Ethanol – 20/80). Die Titelstruktur wurde durch ^1H- und ^{13}C-NMR-Spektroskopie bestätigt.

Beispiel F: Herstellung von 2-(4-Nitrobenzyl)-1,3-(bis-N,N-2-aminoethyl)-diaminopropan

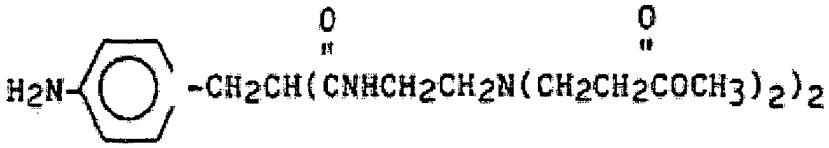
[0301] Das rohe Methylsulfonamid aus Beispiel E (650 mg, 0,94 mmol) wurde in 5 ml mit Stickstoff gespülter konz. Schwefelsäure (98%) gelöst. Diese Lösung wurde unter Stickstoff gehalten und für 27 Minuten unter heftigem Rühren auf 143–146°C erwärmt. Eine leichte Farbverdunkelung war erkennbar und die gekühlte Lösung wurde in eine gerührte Lösung von Ether (60 ml) geschüttet. Der präzipitierte weiße Salzkuchen wurde abfiltriert und sofort in 10 ml entionisiertem Wasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde unter Argon mit 50%iger NaOH auf pH = 11 angepasst wobei gekühlt wurde. Die resultierende Lösung wurden mit 90 ml Ethanol gemischt und die präzipitierten anorganischen Salze wurden abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck von dem rohen Amin entfernt und zu dem resultierenden hellbraunen Öl wurden 190 ml Toluol unter Stickstoff zugegeben. Die Mischung wurde heftig gerührt und Wasser wurde so lange durch azeotrope Destillation entfernt (Dean-Stark Falle), bis das verbleibende Toluol eine hellgelbe Farbe annahm (30–40 ml verblieben im Gefäß). Das Toluol wurde gekühlt und von den dunklen unlöslichen Rückständen und Salz ab-

dekantiert. Diese Lösung wurde im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und das resultierende hellgelbe Öl wurde im Vakuum über Nacht getrocknet (0,2 mm, 35°C), wobei 210 mg des Titelprodukts (60%) anfielen, das durch MS, ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektroskopie charakterisiert wurde.

Beispiel G: Herstellung eines STARBURST™-Polymers (mit einem Anilinderivat) mit einer halben Generation, dargestellt durch das folgende Schema:



Verbindung #1

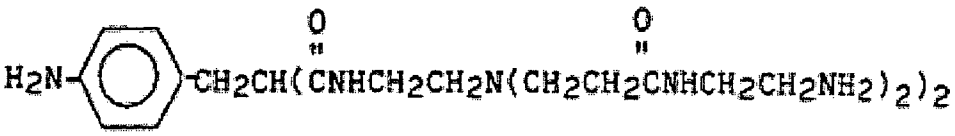


Verbindung #2

[0302] Methylacrylat (2,09 g, 24 mmol) wurde in Methanol (15 ml) gelöst. Die Verbindung 6-(4-Aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioxoundecan (1,1 g, 3,8 mmol) (d.h. Verbindung #1, die Herstellung dieser Verbindung ist in Beispiel D gezeigt) wurde in Methanol (10 ml) gelöst und sie wurde langsam innerhalb von 2 Stunden unter heftigem Rühren zu der Methylacrylat-Lösung zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 48 Stunden bei Umgebungstemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, wobei die Temperatur unter 40°C gehalten wurde. Der Ester (Verbindung #2) wurde als gelbes Öl (2,6 g) erhalten. Es wurde keine Carboxyethylierung der Anilinfunktion beobachtet.

Beispiel H: Herstellung eines STARBURST™-Polymers (mit einer Anilingruppe) mit einer Generation; dargestellt durch das folgende Schema:



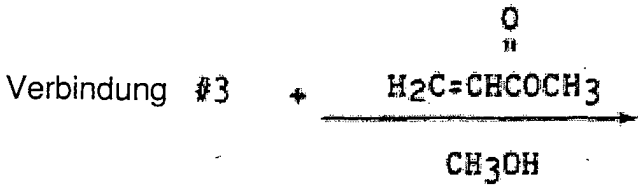


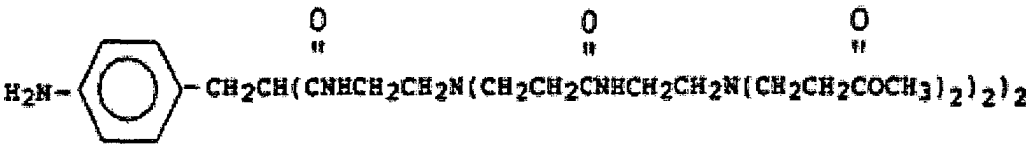
Verbindung #3

[0303] Der Ester (Verbindung #2) (2,6 g, 3,7 mmol) wurde in Methanol (100 ml) gelöst. Dies wurde vorsichtig zu einer heftig gerührten Lösung aus Ethylendiamin (250 g, 4,18 mol) und Methanol (100 ml) zugegeben und zwar mit einer solchen Geschwindigkeit, dass die Temperatur nicht über 40°C anstieg. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionsmischung für 28 Stunden bei 35–40°C gerührt (Heizmantel). Nach 28 Stunden waren durch Infrarotspektroskopie keine Estergruppen detektierbar. Das Lösungsmittel wurde bei 60°C am Rotationsverdampfer entfernt. Das überschüssige Ethylendiamin wurde unter Verwendung eines ternären Azeotrops aus Toluol-Methanol-Ethylendiamin entfernt. Schließlich wurde sämtliches verbleibendes Toluol mit Methanol azeotrop entfernt. Die vollständige Entfernung des Methanols ergab 3,01 g des Titelprodukts (Verbindung #3)

als orangefarbenen glasigen Feststoff.

Beispiel I: Herstellung eines STARBURST™-Polymers (mit einer Anilingruppe) mit eineinhalb Generationen; dargestellt durch das folgende Schema:

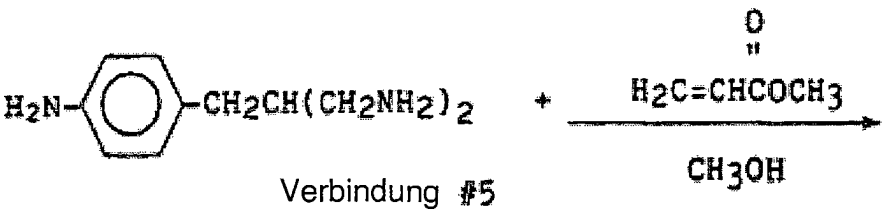




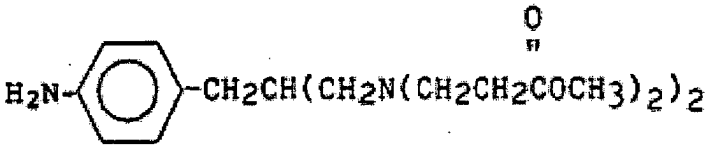
Verbindung #4

[0304] Das Amin (Verbindung #3) (2,7 g, 3,8 mmol) wurde in Methanol (7 ml) gelöst und langsam innerhalb einer Stunde zu einer gerührten Lösung von Methylacrylat (3,8 g, 44 mmol) in Methanol (15 ml) bei Umgebungstemperaturen zugegeben. Eine leichte Erwärmung der Lösung wurde während der Zugabe beobachtet. Die Lösung wurde bei Umgebungstemperatur für 16 Stunden rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde an einem Rotationsverdampfer bei 40°C entfernt. Nach Entfernung des gesamten Lösungsmittels und des überschüssigen Methylacrylats wurde der Ester (Verbindung #4) mit 4,7 g Ausbeute als ein orangefarbenes Öl erhalten.

Beispiel J: Herstellung eines STARBURST™-Polymers (mit einer Anilingruppe) mit einer halben Generationen; dargestellt durch das folgende Schema:



Verbindung #5

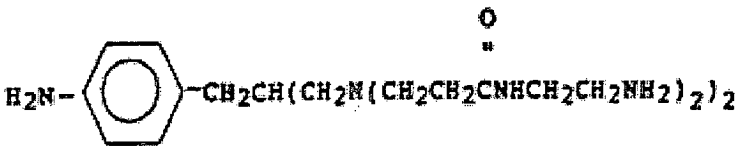


Verbindung #6

[0305] Das Triamin (Verbindung #5, die Herstellung dieser Verbindung ist in Beispiel C gezeigt) (0,42 g, 2,3 mmol) wurde in Methanol (10 ml) gelöst und innerhalb einer Stunde tropfenweise zu Methylacrylat (1,98 g, 23 mmol) in Methanol (10 ml) zugegeben. Diese Mischung wurde bei Umgebungstemperatur für 48 Stunden rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde an einem Rotationsverdampfer entfernt, wobei die Temperatur bei nicht mehr als 40°C gehalten wurde. Das überschüssige Methylacrylat wurde durch wiederholte azeotrope Destillation mit Methanol entfernt. Der Titel-Ester (Verbindung #6) wurde als ein orangefarbenes Öl isoliert (1,24 g).

Beispiel K: Herstellung eines STARBURST™-Polymers (mit einer Anilingruppe) mit einer Generation; dargestellt durch das folgende Schema:



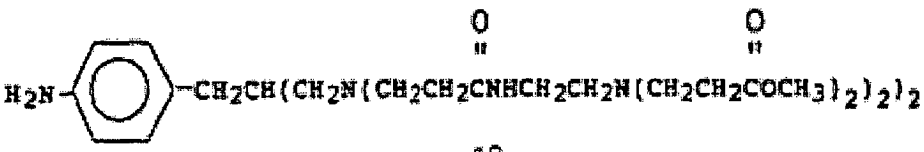


Verbindung #7

[0306] Der Ester (Verbindung #6) (1,24 g, 2,3 mmol) wurde in Methanol (50 ml) gelöst und tropfenweise innerhalb von zwei Stunden zu Ethylendiamin (73,4 g, 1,22 mol) in Methanol (100 ml) zugegeben. Eine geringe Erwärmung wurde beobachtet, heftiges Rühren wurde fortgesetzt. Die Lösung wurde bei Umgebungstemperatur für 72 Stunden rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde an einem Rotationsverdampfer bei 60°C entfernt. Das überschüssige Ethylendiamin wurde unter Verwendung eines ternären Azeotrops aus Toluol-Methanol-Ethylendiamin entfernt. Schließlich wurde das gesamte verbleibende Toluol mit Methanol entfernt und anschließend wurde mit einer Vakuumpumpe für 48 Stunden abgesaugt, wobei das Titel-Amin (Verbindung #7) (1,86 g) als ein gelb-orangefarbenes Öl erhalten wurde.

Beispiel L: Herstellung eines STARBURST™-Polymers (mit einer Anilingruppe) mit eineinhalb Generationen (G 1,5); dargestellt durch das folgende Schema:





Verbindung #8

[0307] Das Amin (Verbindung #7) (1,45 g, Spuren von verbliebenem Methanol) wurde in Methanol (100 ml) gelöst und langsam innerhalb von eineinhalb Stunden zu einer gerührten Lösung von Methylacrylat (5,80 g) in Methanol (20 ml) zugegeben. Die Lösung wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur rühren gelassen. Die Entfernung des Lösungsmittels, und anschließende wiederholte azeotrope Destillation mit Methanol ermöglichte die Entfernung des gesamten überschüssigen Methylacrylats. Nach Absaugen mit einer Vakuumpumpe für 48 Stunden wurde der Titel-Ester (Verbindung #8) als ein orangefarbenes Öl (2,50 g, 1,8 mmol) isoliert.

Beispiel M: Hydrolyse von einem (G 4,5) Dendrimer und Herstellung von Calciumsalz.

[0308] 4,5 Generation PAMAM (Ester-terminiert, ausgehend von NH_3) (2,11 g, 10,92 meq) wurde in 25 ml Methanol gelöst und dazu wurde 10%ige NaOH zugegeben (4,37 ml, 10,92 meq) (pH = 11,5–12). Nach 24 Stunden bei Raumtemperatur lag der pH-Wert bei ungefähr 9,5. Nach weiteren 20 Stunden wurde die Lösung unter Verwendung eines Rotationsverdampfers entfernt, es wurden 50 ml Toluol zugegeben und erneut verdampft.

[0309] Das resultierende Öl wurde in 25 ml Methanol gelöst und bei Zugabe von 75 ml Diethylether als weißer Gummi präzipitiert. Die Flüssigkeit wurde abdekantiert und der Gummi wurde rotationsverdampft, um ein sehr feines beigefarbenes Pulver zu ergeben, das nach weiterem Trocknen 2,16 g Produkt (98%ige Ausbeute) er-

gab. Es wurden bei NMR- und Infrarotanalyse keine Estergruppen gefunden.

[0310] Das Natriumsalz von 4,5 Generation PAMAM (Ester-terminiert, ausgehend von NH_3) wurde durch Dialyse durch das Calciumsalz ersetzt. Das Natriumsalz (1,03 g) wurde in 100 ml Wasser gelöst und mit 3 ml/Minute durch eine Hohlfaserdialyseröhre geleitet (cutoff = 5000). Das Äußere der Röhre wurde in 5%iger $CaCl_2$-Lösung gebadet. Diese Vorgehensweise wurde anschließend wiederholt.

[0311] Die resultierende Lösung wurde erneut dialysiert, dieses Mal gegen Wasser, anschließend zwei weitere Male wiederholt.

[0312] Verdampfen lieferte 0,6 g nassen Feststoff, der in Methanol aufgenommen wurde (nicht vollständig löslich) und getrocknet wurde, um 0,45 g des Titelprodukts als beigefarbene Kristalle zu ergeben.
$C_{369}H_{592}O_{141}N_{91}Ca_{24}$ MW = 9526,3.

	C	H	N	Ca
Theoretisch:	46,5	6,32	13,38	10,10
Gefunden:	47,34	7,00	13,55	8,83

Beispiel N: Herstellung von Dendrimeren mit terminalen Carboxylatgruppen.

[0313] Halbe Generation STARBURST™-Polyamidoamine wurden hydrolysiert, um ihre terminalen Methylestergruppen in Carboxylate umzuwandeln. Dadurch wurden sphärische Moleküle mit negativen Ladungen, die an der Peripherie verteilt waren, gebildet. Die hydrolysierten Dendrimere variierten von 0,5 Generationen (drei Carboxylate) bis 6,5 Generationen (192 Carboxylate).

[0314] Die Produkte konnten als Na^+-, K^+-, Cs^+- oder Rb^+-Salze gebildet werden.

Beispiel O: N-t-Butoxycarbonyl-4-aminobenzylmalonat-dimethylester.

[0315] 4-Aminobenzylmalonat-dimethylester (11,62 g, 49 mmol) wurde unter Rühren in 50 ml t-Butanol:Wasser (60:40 v:v) gelöst. Di-t-Butoxydicarbonat (19,79 g, 90 mmol) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt. Das Butanol wurde an einem Rotationsverdampfer entfernt, was zu einer gelben Suspension des Produkts in Wasser führte. Extraktion in Methylenchlorid, Trocknen ($MgSO_4$) und Verdampfen ergab ein gelbes Öl (21,05 g, verunreinigt mit di-t-Butoxydicarbonat). Umkristallisation aus 2-Propanol:Wasser (75:25) ergab blassgelbe Kristalle (11,1 g, 33 mmol, 67%) des Titelprodukts. Die Struktur wurde durch ^{13}C-NMR-Spektroskopie bestätigt und die Reinheit wurde durch HPLC-Analyse überprüft (Spherisorb™ ODS-1, 0,05 M H_3PO_4 pH = 3: CH_3CN 55:45). Das Material wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

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

[0316] N-t-Butoxycarbonyl-4-aminobenzylmalonat-dimethylester (8,82 g, 26 mmol), hergestellt in Beispiel O, wurde in 50 ml Methanol gelöst. Die Lösung wurde tropfenweise (2 Stunden) in einer Stickstoffatmosphäre zu einer Lösung von frisch destilliertem Ethylendiamin (188 g, 3,13 mol) und 20 ml Methanol zugegeben. Die Lösung wurde für 24 Stunden rühren gelassen. Die Ethylendiamin/Methanol-Lösung wurde an einem Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Methanol gelöst und Toluol wurde zugegeben. Lösungsmittelentfernung am Rotationsverdampfer ergab das Rohprodukt als weißen Feststoff (10,70 g, verunreinigt mit Ethylendiamin). Die Probe wurde zur Reinigung in zwei Proben geteilt. Die azeotrope Entfernung von Ethylendiamin mit Toluol unter Verwendung eines Soxleth-Extraktors mit sulfonierten Ionenaustauschbeads im Filter, um das Ethylendiamin zurückzuhalten, führte zu einer teilweisen Zersetzung des Produkts unter Bildung eines braunen Öls. Das verbleibende Produkt wurde unter Kühlen als weißer Feststoff aus dem Toluol isoliert (2,3 g, ungefähr 50%). Die Analyse einer 10%igen Lösung in Methanol durch GC (Säule, Tenax 60/80) zeigte kein nachweisbares Ethylendiamin in der Probe (< 0,1%). Die zweite Portion wurde in Methanol gelöst, um eine 10%ige Lösung (bezogen auf das Gewicht) zu ergeben und sie wurde durch reverse Osmose unter Verwendung von Methanol als Lösungsmittel von dem Ethylendiamin gereinigt. (Filmtec™ FT-30 Membran und ein Amicon™ TC1R-Dünnkanalseparator; das EDA durchquerte die Membran). Das Produkt wurde als weißer Feststoff (2,7 g) isoliert, in dem durch GC keine nachweisbaren Mengen an Ethylendiamin gefunden werden konnten. Die ^{13}C-NMR-Daten und HPLC-Analyse (Spherisorb™ ODS-1, 0,05 M H_3PO_4 pH = 3: CH_3CN 55:45) waren in Übereinstimmung mit der vorgeschlagenen Titelstruktur. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Beispiel Q: Herstellung eines STARBURST™-Dendrimers mit einer halben Generation (G 0,5) aus N-t-Butoxycarbonyl-6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioxoundecan.

[0317] N-t-Butoxycarbonyl-6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioxoundecan (5,0 g, 13 mmol), hergestellt in Beispiel P, wurde in 100 ml Methanol gelöst. Methylacrylat (6,12 g, 68 mmol) wurde zugegeben und die Lösung wurde bei Umgebungstemperatur für 72 Stunden gerührt. Die Reaktion wurde durch HPLC verfolgt (Spherisorb™ ODS-1, Acetonitril:0,04 M Ammoniumacetat 40:60), um die Umwandlung zu dem gewünschten Produkt zu optimieren. Die Lösung wurde auf einen Feststoffgehalt von 30 konzentriert und Methylacrylat (3,0 g, 32 mmol) wurde zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Umgebungstemperatur gerührt, bis keine partiell alkylierten Produkte mehr durch HPLC detektierbar waren (24 Stunden). Entfernung des Lösungsmittels bei 30°C unter Verwendung eines Rotationsverdampfers und Absaugen bei 1 mm Hg für 24 Stunden ergab das Produkt als gelbes viskoses Öl, Ausbeute 7,81 g. Die ^{13}C-NMR-Daten stimmten mit der Titelstruktur überein. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Beispiel R: Herstellung eines STARBURST™-Dendrimers mit einer ganzen Generation (G 1,0) aus N-t-Butoxycarbonyl-6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioxoundecan.

[0318] Das halbe Generation-Produkt (Beispiel Q) (7,70 g, 10,45 mmol) wurde in 75 ml Methanol gelöst und tropfenweise innerhalb von 2 Stunden zu einer gerührten Lösung von Ethylendiamin (400 ml, 7,41 mol) und Methanol (50 ml) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Umgebungstemperaturen für 48 Stunden gerührt. Das Ethylendiamin und Methanol wurden durch Rotationsverdampfen entfernt, um ein gelbes Öl (11,8 g, verunreinigt mit Ethylendiamin) zu ergeben. Das Produkt wurde in 90 ml Methanol gelöst und durch reverse Osmose von dem Ethylendiamin gereinigt (Filmtec™ FT-30-Membran und Amicon™ TC1R-Dünnkanalseparator, Methanol als Lösungsmittel). Nach 48 Stunden konnte kein Ethylendiamin durch GC detektiert werden (Säule, Tenax™ 60/80). Die Entfernung des Lösungsmittels an einem Rotationsverdampfer, und anschließendes Absaugen an einer Vakuumanlage für 24 Stunden ergab das Produkt als einen gelben glasigen Feststoff (6,72 g). Die Analyse durch HPLC, PLRP-S-Säule, Acetonitril:0,015 M NaOH, 10–20% Gradient in 20 Minuten) und ^{13}C-NMR-Analyse stimmten mit der Titelstruktur überein.

Beispiel S: Herstellung eines STARBURST™-Polymers mit eineinhalb Generationen (G 1,5) aus N-t-Butoxycarbonyl-6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioxoundecan.

[0319] Das eine Generation-Produkt (Beispiel R) (2,14 g, 25 mmol) wurde in 12,5 ml Methanol gelöst und es wurde Methylacrylat (3,5 g, 39 mmol) in 5 ml Methanol zugegeben. Die Lösung wurde bei Umgebungstemperatur für 48 Stunden gerührt, der Fortschritt der Reaktion wurde durch HPLC (Spherisorb™ ODS-1, Acetonitril:0,04 M Ammoniumacetat 60:40) verfolgt. Ein zweites Aliquot an Methylacrylat wurde zugegeben (3,5 g, 39 mmol) und die Reaktionsmischung wurde bei Umgebungstemperatur für weitere 72 Stunden gerührt. Die Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer ergab nach Absaugen über Nacht mit einer Vakuumpumpe das Titelprodukt als gelbes Öl (3,9 g). Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Beispiel T: Herstellung eines STARBURST™-Polymers mit zwei ganzen Generationen (G 2,0) aus N-t-Butoxycarbonyl-6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioxoundecan.

[0320] Das eineinhalb Generationen-Produkt (Beispiel S) (3,9 g, 2,5 mmol) wurde in 50 ml Methanol gelöst und tropfenweise innerhalb von 2 Stunden zu einer gerührten Lösung von Ethylendiamin (600 g, 10 mol) und Methanol (50 ml) zugegeben. Die Lösung wurde bei Umgebungstemperatur unter einer Stickstoffatmosphäre für 96 Stunden gerührt. Das Ethylendiamin/Methanol wurde am Rotationsverdampfer entfernt, um einen gelben glasigen Feststoff zu ergeben (4,4 g, verunreinigt mit Ethylendiamin). Eine 10%ige Lösung des Produkts in Methanol wurde hergestellt und durch reverse Osmose von dem Ethylendiamin gereinigt (Filmtec™ FT-30-Membran und ein Amicon™ TC1R-Dünnkanalseparator), bis kein Ethylendiamin durch GC detektiert werden konnte (Säule, Tenax 60/80). Die Entfernung des Lösungsmittels ergab das Produkt als einen gelben glasigen Feststoff (3,52 g). Die ^{13}C-NMR-Daten und HPLC-Analyse (PLRP-S-Säule, Acetonitril:0,015 M NaOH, 10–20% Gradient in 20 Minuten) stimmten mit der Titelstruktur überein.

Beispiel U: Reaktion des zwei Generationen (G 2,0) STARBURST™-Polymers mit Bromessigsäure, um ein Methylencarboxylat-terminiertrs STARBURST™-Dendrimer zu ergeben.

[0321] Das Produkt der zweiten Generation (Beispiel T) (0,22 g, 0,13 mmol) wurde in 15 ml entionisiertem Wasser gelöst und die Temperatur wurde auf 40,5°C eingestellt. Bromessigsäure (0,48 g, 3,5 mmol) und Lithiumhydrid (0,13 g, 3,3 mmol) wurden in 5 ml entionisiertem Wasser gelöst und zu der Reaktionsmischung zu-

gegeben. Der pH-Wert der Reaktion wurde unter Verwendung eines pH-Stat (titrieren mit 0,1 N NaOH) sorgfältig bei 9 gehalten über Nacht bei 40,5°C. Die Untersuchung durch Reversphasen HPLC (Spherisorb™ ODS-1-Säule, Eluent 0,25 M H_3PO_4 pH = 3 [NaOH]; Acetonitril 85:15) bestätigte die Synthese von überwiegend einer einzigen Verbindung.

Beispiel V: Herstellung von Isothiocyanat-funktionalisiertem zweite Generation (G 2,0) Methylencarboxylat-terminiertem STARBURST™-Dendrimer.

[0322] 5 ml einer 2,8 mM-Lösung des zweite Generation Methylencarboxylat-terminierten STARBURST™-Dendrimers (Beispiel U) wurden mit 20 ml Wasser verdünnt und der pH-Wert wurde mit konz. Salzsäure auf 0,5 eingestellt. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde die Mischung durch HPLC analysiert, um die Entfernung der Butoxycarbonylgruppe zu überprüfen, und anschließend wurde sie mit 50%iger Natriumhydroxid-Lösung behandelt, um den pH-Wert auf 7 zu bringen. Ein pH-Stat (titrieren mit 0,1 N NaOH) wurde verwendet, um den pH-Wert bei 7 halten und es wurden 225 µl Thiophosgen zugegeben. Nach 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde der pH-Wert der Mischung mit 1 N HCl auf 5 eingestellt. Die Mischung wurde mit Chloroform gewaschen (20 ml × 2), anschließend wurde sie an einem Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck konzentriert. Bei dem gewonnenen Rückstand, 0,91 g, handelt es sich um eine Mischung von Isothiocyanat und Salzen.

Beispiel W: Herstellung des zweite Generation (G 2,0)-STARBURST™-Polyethyleniminmethansulfonamids.

[0323] Zu einer Lösung von 125 g N-Methansulfonylaziridin in 50 ml Ethanol wurden 25,0 g tris-(2-Aminoethyl)amin zugegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 4 Tage gerührt. Zu der Reaktionsmischung wurde soviel Wasser zugegeben wie benötigt, um die Homogenität der Lösung zu erhalten. Das Lösungsmittel wurde durch Destillation im Vakuum entfernt, um das zweite Generation-STARBURST™-PEI-Methansulfonamid als ein gelbes Glas zu ergeben (161 g).

Beispiel X: Spaltung von Methansulfonamiden, um zweite Generation (G 2,0)-STARBURST™-Polyethylenimin zu bilden.

[0324] Eine Lösung von 5,0 g an zweite Generation-STARBURST™-PEI-Methansulfonamid aus Beispiel W in 20 ml 38%iger HCl wurde in einer Glasampulle verschlossen. Die Ampulle wurde für 16 Stunden auf 160°C erwärmt, anschließend in einem Eisbad gekühlt und geöffnet. Das Lösungsmittel wurde durch Destillation im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde in Wasser gelöst. Nach dem der pH-Wert der Lösung mit 50%iger NaOH auf größer als oder gleich 10 eingestellt wurde, wurde das Lösungsmittel durch Destillation im Vakuum entfernt. Toluol (150 ml) wurde zu dem Rückstand zugegeben und die Mischung wurde unter einer Dean-Stark-Falle unter Rückfluss erwärmt, bis kein Wasser mehr entfernt werden konnte. Die Lösung wurde filtriert, um Salze zu entfernen und das Filtrat wurde im Vakuum aufkonzentriert, um 1,9 g zweite Generation-STARBURST™-PEI als ein gelbes Öl zu ergeben.

Beispiel Y: Herstellung von dritte Generation (G 3,0)-STARBURST™-Polyethyleniminmethansulfonamid.

[0325] Zu einer Lösung von 10,1 g an zweite Generation-STARBURST™-PEI aus Beispiel X in einer 100 ml Ethanol wurden 36,6 g N-Methansulfonylaziridin zugegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 1 Woche gerührt. Es wurde soviel Wasser wie benötigt zugegeben, um die Homogenität der Lösung zu erhalten. Das Lösungsmittel wurde durch Destillation im Vakuum entfernt, um dritte Generation-STARBURST™-PEI-Methansulfonamid als ein gelbes Glas zu bilden (45,3 g).

Beispiel Z: Spaltung von Methansulfonamiden, um dritte Generation (G 3,0)-STARBURST™-Polyethylenimin zu bilden.

[0326] Die Methansulfonamid-Gruppen des dritte Generation-STARBURST™-PEI-Methansulfonamids (5,0 g) aus Beispiel Y wurden mit dem selben Verfahren, das für das zweite Generation-Material in Beispiel X beschrieben wurde entfernt, um 2,3 g an dritte Generation-STARBURST™-PEI als gelbes Öl zu bilden.

Beispiel AA: Reaktion eines dritte Generation (G 3,0)-STARBURST™-Polyethylenimins mit (4-Fluor)nitrobenzol.

[0327] Das dritte Generation-STARBURST™-Polyethylenimin (Beispiel Z) (1,06 g, 1,2 mmol) wurde in 12 ml absolutem Ethanol gelöst. (4-Fluor)nitrobenzol (120 µl, 1,2 mmol) wurde zugegeben und die Reaktionsmi-

schung wurde über Nacht unter Rückfluss gehalten. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das leuchtend gelbe Öl wurde in Wasser gelöst. Die wässrige Lösung wurde mit Chloroform gewaschen, um sämtliches nicht umgesetztes (4-Fluor)nitrobenzol zu entfernen. Die Entfernung des Wassers ergab das Produkt als tiefgelbes Öl (0,80 g). Das ^{13}C-NMR-Spektrum stimmte mit der Titelstruktur überein. (Es wurde kein Versuch unternommen, um die Art der statistischen Verteilung zu bestimmen). Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Beispiel BB: Reaktion des Nitrophenyl-Derivats des dritte Generation (G 3,0)-STARBURST™-Polyethylenimins mit Glycolnitril.

[0328] Das Nitrophenyl-Derivat des dritte Generation (G 3,0)-STARBURST™-Polyethylenimins (Beispiel AA) (0,80 g) wurde in 20 ml entionisiertem Wasser gelöst. Zu der gerührten Lösung wurde Natriumhydroxid (2,80 g, 50% w/w) zugegeben und die Lösung wurde mit Stickstoff gespült, wobei durch einen Natriumhydroxid-Wäscher entlüftet wurde. Glycolonitril (2,85 ml einer 70%igen wässrigen Lösung) wurde bei Umgebungstemperaturen zugegeben. Nach wenigen Minuten wurde die Bildung eines gelben Präzipitats beobachtet. Nach zwei Stunden wurde die Temperatur langsam auf Rückflusstemperatur erhöht und die Lösung wurde unter Stickstoffspülung für 24 Stunden am Rückfluss gehalten. Die Entfernung des Wassers ergab das Produkt als einen gelben Feststoff, der mit Glycolsäure und Natriumhydroxid verunreinigt war. Das ^{13}C-NMR-Spektrum war im Einklang mit der Titelstruktur. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Beispiel CC: Hydrierung des Nitrophenyl-Derivats zu dem Aminophenylmethylencarboxylat terminierten dritte Generation (G 3,0)-STARBURST™-Polyethylenimin.

[0329] Der gelbe Feststoff aus Beispiel BB (1,70 g) wurde in 10 ml entionisiertem Wasser gelöst, der resultierende pH-Wert der Lösung war ungefähr 11. Palladium auf Aktivkohle (200 mg an 5%igem Pd/C) wurde zu der Reaktionsmischung in eine Glas-Parr-Schüttelflasche zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde einem Wasserstoffdruck von 40 psi (275 kPa) ausgesetzt und für 6 Stunden bei Umgebungstemperatur in einer Parr-Hydrierungsapparatur geschüttelt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend durch einen 0,5 µm Millipore™-Filter filtriert, um das Pd/C zu entfernen und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und es wurde durch ein Biogel P2 Harz (25 g gequollen mit Wasser) Gel-filtriert. Ansäuern mit HCl führte zu einer orangebraunen Lösung, die über Nacht mit Stickstoff gespült wurde. Die Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum ergab das Titelprodukt als das Hydrochloridsalz, bei welchem es sich um einen blassbraunen Feststoff handelte (3,98 g, verunreinigt mit NaCl und Glycolsäure, maximale theoretische Produktausbeute 1,15 g). Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Beispiel DD: Herstellung von 4-Isothiocyanatophenylmethylencarboxylat-terminiertem dritte Generation (G 3,0)-STARBURST™-Polyethylenimin.

[0330] Das Produkt aus Beispiel CC (3,98 g) wurde in 15 ml entionisiertem Wasser gelöst und ein Aliquot (2,5 ml) dieser Lösung wurde mit 10 ml Wasser verdünnt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit Natriumhydroxid auf 7 eingestellt. Ein pH-Stat (titrieren mit 1 N NaOH) wurde verwendet, um den pH-Wert zu halten und es wurden 200 µl Thiophosgen zugegeben. Nach 10 Minuten wurde der pH-Wert der Mischung mit Salzsäure auf 4 eingestellt. Das Wasser wurde an einem Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck entfernt (um Schäumen zu vermeiden, wurde eine kleine Menge n-Butanol zugegeben). Der Rückstand wurde mit Methylenchlorid gewaschen und anschließend getrocknet. Das rohe Titelprodukt (0,95 g) einer Mischung von Isothiocyanat (0,14 g) und Salzen wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Beispiel EE: Herstellung eines Methylencarboxylat-terminierten zweite Generation (G 2,0)-STARBURST™-Polyamidoamins (ausgehend von Ammoniak)

[0331] Das zweite Generation-STARBURST™-Polyamidoamin (2,71 g, 2,6 mmol) und Bromessigsäure (4,39 g, 31,6 mmol) wurden in 30 ml entionisiertem Wasser gelöst und der pH-Wert wurde mit 5 N NaOH unter Verwendung eines pH-Stat auf 9,7 eingestellt. Die Reaktion wurde für eine halbe Stunde bei diesem pH-Wert gehalten und die Temperatur wurde langsam auf 60°C erhöht und bei 60°C für 3 Stunden bei konstantem pH-Wert gehalten. Der pH-Wert wurde auf 10,3 erhöht und die Reaktionsmischung wurde bei Umgebungstemperaturen über Nacht unter Kontrolle des pH-Stat gehalten. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 4 Stunden unter Rückfluss erhitzt, bevor sie aufgearbeitet wurde. Die Entfernung des Lösungsmittels und azeotrope Destillation der letzten Spuren von Wasser mit Methanol ergaben das Titelprodukt als ein blassgelbes Pulver (8,7 g, verunreinigt mit Natriumbromid). Das ^{13}C-NMR-Spektrum war im Einklang mit der Titelstruktur (mit etwas Verunreinigung aufgrund einer kleinen Menge an mangelhaftem Material als Ergebnis von etwas Monoalkylierung).

Beispiel FF: Herstellung eines Methylencarboxylat-terminierten zweite Generation (G 2,0)-STARBURST™-Polyethylenimins (ausgehend von Ammoniak).

[0332] Das zweite Generation (G 2,0)-STARBURST™-Polyethylenimin (2,73 g, 6,7 mmol) aus Beispiel X und Bromessigsäure (11,29 g, 81 mmol) wurden in 30 ml entionisiertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde langsam auf pH = 9,5 erhöht, wobei die Temperatur unter 30°C gehalten wurde. Die Temperatur wurde langsam auf 55°C erhöht und der Reaktions-pH-Wert wurde für 6 Stunden mit Hilfe eines pH-Stats (titrieren mit 5 N NaOH) bei 9,5 gehalten. Der pH-Wert wurde auf 10,2 erhöht und über Nacht bei diesem Wert gehalten. Die Entfernung des Lösungsmittels an einem Rotationsverdampfer und azeotrope Destillation der letzten Spuren von Wasser unter Verwendung von Methanol ergab das Titelprodukt als ein gelbes Pulver (17,9 g, verunreinigt mit Natriumbromid). Das ^{13}C-NMR-Spektrum war im Einklang mit der Titelstruktur (mit etwas Verunreinigung aufgrund einer kleinen Menge an mangelhaftem Material als Ergebnis von etwas Monoalkylierung).

Beispiel GG: Herstellung von 3,5, 4,5, 5,5 und 6,5 Generation-STARBURST™-PAMAM.

[0333] Zu einer 10 Gew.-%igen methanolischen Lösung von 2,46 g an dritte Generation-PAMAM STARBURST™ wurden 2,32 g Methylacrylat zugegeben. Diese Mischung wurde bei Raumtemperatur für 64 Stunden absitzen gelassen. Nach der Entfernung von Lösungsmittel und überschüssigem Methylacrylat wurden 4,82 g Titelprodukt (G 3,5) gewonnen (105% der Theorie).

Herstellung höherer halbe Generation-STARBURST™-PAMAMs:

[0334] Die Generationen 4,5, 5,5 und 6,5 wurden wie oben beschrieben ohne entscheidende Unterschiede in den Konzentrationen der Reaktanten, den Molverhältnissen der Reaktanten oder den Reaktionszeiten hergestellt.

Beispiel HH: Herstellung von 4, 5 und 6 Generation-STARBURST™-PAMAM.

[0335] Zu 2000 g an vordestilliertem Ethylendiamin wurden 5,4 g an 4,5 Generation-STARBURST™-PAMAM als eine 15 Gew.-%ige Lösung in Methanol zugegeben. Dies wurde bei Raumtemperatur für 48 Stunden absitzen gelassen. Das Methanol und der größte Teil des überschüssigen Ethylendiamins wurden durch Rotationsverdampfen im Wasserstrahlvakuum bei Temperaturen von weniger als 60°C entfernt. Das Gesamtgewicht an gewonnenem Produkt war 8,07 g. An diesem Punkt zeigte die GC-Analyse, dass das Produkt noch 34 Gew.-% Ethylendiamin enthielt. Eine Portion von 5,94 g dieses Produkts wurde in 100 ml Methanol gelöst und ultrafiltriert, um das restliche Ethylendiamin zu entfernen. Die Ultrafiltration wurde unter Verwendung eines Amicon™-TC1R-Dünnkanal-Kreislauf-Separators durchgeführt, der mit einer Amicon™-YM2-Membran ausgestattet war. Ein Inline-Druckentlastungsventil wurde verwendet, um einen Druck von 55 psig (380 kPa) durch die Membran zu halten. Die 100 ml wurden zunächst auf 15 ml konzentriert, indem ausschließlich das Lösungsmittel durch die Membran fließen gelassen wurde. Nach dieser anfänglichen Konzentrierung wurde der Fluss für 18 Stunden auf einen konstantes Volumen-Retentat-Zyklusmodus umgestellt. Nach dieser Zeit wurden 60 ml Methanol durch die Membran geleitet, um noch in dem Modul und damit verbundenen Röhren befindliches Produkt zu gewinnen. Das Produkt wurde vom Lösungsmittel befreit und es wurden 2,53 g an fünfte Generation (G 5,0)-STARBURST™-PAMAM gewonnen. Die GC-Analyse zeigte, dass 0,3% restliches Ethylendiamin in dem Produkt verblieben.

[0336] Die Herstellung der Generationen 4 und 6 erfolgte wie oben, wobei der einzige Unterschied in dem Gewichtsverhältnis von Ethylendiamin zu Ausgangsmaterial lag. Um die vierte Generation herzustellen, betrug dieses Verhältnis 200:1 und für die sechste Generation betrug dieses Verhältnis 730:1.

Beispiel II: Modifikation von Polyamidoamin-Dendrimeren durch Reaktion mit Epoxyoktan.

[0337] Zu einer Lösung von 0,50 g an sechste Generation PAMAM in 5 ml Methanol wurden 0,56 g Epoxyoktan zugegeben. Nach 6 Tagen bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum verdampft, um 0,80 g farbloses Öl zu ergeben. Das Material war in Chloroform, Toluol oder Methanol löslich, aber unlöslich in Wasser. Das ^{13}C-NMR-Spektrum war in Übereinstimmung mit einem Dendrimer, bei dem C-8-Alkylgruppen an dessen terminalen Amine gebunden sind.

Beispiel JJ: Modifikation von Polyamidoamin-Dendrimeren durch Reaktion mit t-Butylglycidylether.

[0338] Zu einer Lösung von 0,50 g sechste Generation (G 6,0)-PAMAM in 5 ml Methanol wurden 0,57 g t-Bu-

tylglycidylether zugegeben. Nach 6 Tagen bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum verdampft, um 1,0 g farbloses Öl zu ergeben. Das Material war in Chloroform, Toluol oder Methanol löslich, aber unlöslich in Wasser. Das ^{13}C-NMR-Spektrum entsprach einem Dendrimer, bei dem 3-(t-Butoxy)-1-propan-2-ol-Gruppen an dessen terminale Amine gebunden sind.

Beispiel KK: Modifikation von Polyamidoamin-Dendrimeren durch Reaktion mit Epoxyoktadekan.

[0339] Zu einer Lösung von 0,50 g an sechste Generation (G 6,0)-PAMAM in 25 ml Methanol wurden 1,1 g Epoxyoktadekan zugegeben. Die Lösung wurde für 5 Tage unter Rückfluss erhitzt. Während der Rückflusszeit präzipitierte ein farbloses Öl aus der Lösung. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum verdampft, um 1,6 g an weißem Schaum zu ergeben. Das Material war in Chloroform oder Toluol löslich, aber unlöslich in Wasser oder Methanol. Das ^{13}C-NMR-Spektrum war in Übereinstimmung mit einem Dendrimer, bei dem C-18-Alkylgruppen an dessen terminalen Amine gebunden sind.

Beispiel LL: Reaktion von STARBURST^{TM}-PEI mit hydrophobem Epoxid.

[0340] In einen Kolben, der mit einem Magnetrührer ausgestattet war, wurden 0,397 g (2×10^{-4} mol) an vierte Generation (G 4,0)-PEI (NH_3-Kern; MW 1955) und 2,1 g ($9,6 \times 10^{-3}$ mol) an Methyl10,11-oxoundecanoat (MW 214,3) in 5 ml Methanol zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für einen Tag gerührt und anschließend für 8 Stunden auf 80°C erwärmt, um einen braunen viskosen Sirup zu ergeben. Die vollständige Ringöffnungsreaktion unter Bildung des Carbomethoxy-terminierten, hydrophoben Dendrimers wurde durch NMR-Analyse und Vergleich mit Modellsystemen bestätigt.

[0341] Das obige hydrophobe Dendrimer wurde in eine wasserlösliche Form umgewandelt, indem einfach ein Gewichtsäquivalent dieses Produkts mit Natriumhydroxid in Wasser vereinigt wurde und man für 30 bis 60 Minuten erwärmte. Es wurde eine homogene Lösung, die keine nachweisbaren Carbomethoxy-Gruppen zeigte, erhalten. Die Zugabe von Überschüssen an NaOH oder NaCl bewirkte, dass das Natriumcarboxylat-Salz sich trübte und eine Ölphase bildete.

Beispiel MM: Modifikation von PAMAM-Dendrimeren mit Acrylsäure.

2:1 Acrylat:Amin (Reaktion A)

[0342] Eine Menge von 3,84 g Acrylsäure wurde mit 3,84 g Methanol vermischt und in einem Eisbad für 10 Minuten gekühlt. Anschließend wurden 18,72 g einer 26,7%igen (w/w) Lösung von G 6 (NH_3) PAMAM zugegeben, während die Acrylsäure-Lösung gerührt wurde. Die Reaktion wurde für 15 Minuten bei 4°C gehalten, mit Stickstoff bedeckt, verschlossen und bei Raumtemperatur für 5 Tage reagieren gelassen.

1:1 Acryat:Amin (Reaktion B)

[0343] Eine Menge von 1,6 g Acrylsäure wurde mit 1,6 g Methanol vermischt und in einem Eisbad für 10 Minuten gekühlt. Anschließend wurden 18,72 g einer 26,7%igen (w/w) Lösung von G 6 (NH_3) PAMAM zugegeben, während die Acrylsäure-Lösung gerührt wurde. Die Reaktion wurde für 15 Minuten bei 4°C gehalten, mit Stickstoff bedeckt, verschlossen und bei Raumtemperatur für 5 Tage reagieren gelassen.

0,5:1 Acrylat:Amin (Reaktion C)

[0344] Eine Menge von 0,80 g Acrylsäure wurde mit 0,8 g Methanol vermischt und in einem Eisbad für 10 Minuten gekühlt. Anschließend wurden 18,72 g einer 26,7%igen (w/w) Lösung von G 6 (NH_3) PAMAM zugegeben, während die Acrylsäure-Lösung gerührt wurde. Die Reaktion wurde für 15 Minuten bei 4°C gehalten, mit Stickstoff bedeckt, verschlossen und bei Raumtemperatur für 5 Tage reagieren gelassen.

0,25:1 Acrylat:Amin (Reaktion D)

[0345] Eine Menge von 0,40 g Acrylsäure wurde mit 0,4 g Methanol vermischt und in einem Eisbad für 10 Minuten gekühlt. Anschließend wurden 18,72 g einer 26,7%igen (w/w) Lösung von G 6 (NH_3) PAMAM zugegeben, während die Acrylsäure-Lösung gerührt wurde. Die Reaktion wurde für 15 Minuten bei 4°C gehalten, mit Stickstoff bedeckt, verschlossen und bei Raumtemperatur für 5 Tage reagieren gelassen.

Ultrafiltration und Trocknen

[0346] Das Lösungsmittel von den Reaktionen wurde an einem Rotationsverdampfer entfernt und der gewonnene Feststoff wurde in ungefähr 150 ml Wasser wieder aufgelöst. Die 150 ml Lösung wurde mit Wasser an einer YM3 (MW Cutoff = 3000) Flatstock-Membran ultrafiltriert, bis 4 l Permeat gesammelt waren. Das Retentat wurde an einem Rotationsverdampfer von Wasser befreit, bis ein Feststoff oder eine viskose Flüssigkeit zurückblieben. Die halbtrockenen Feststoffe wurden anschließend über Nacht einem Hochvakuum ausgesetzt, um restliches Wasser zu entfernen.

Ergebnis

[0347] Die Produkte der Reaktionen von G 6 (NH_3) PAMAM-Ammoniakkern-Dendrimer mit Acrylsäure in unterschiedlichen Verhältnissen führten zu den erwarteten Produkten. Die Produkte wiesen die Ladungsmerkmale auf, die mit der zugegebenen Menge an Acrylsäure übereinstimmen. Wenn ein Überschuss an Acrylsäure zugegeben wird, so nähert sich das Produkt demjenigen an, das bei der herkömmlichen Synthese von Halbgeneration-PAMAM-Carbocylatsalzen erhalten wird. Bei einer Verringerung der zugegebenen Menge an Acrylsäure stimmt die Analyse des Materials mit einem positiv geladenem Dendrimer mit einigen negativ geladenen Oberflächengruppen oder einer amphoteren Oberfläche überein.

Beispiel NN: Konjugieren von dichten Sterndendrimeren mit Zielsteuerungsmitteln, wie beispielsweise Biotin, Insulin und Avidin und auch Einschließen eines getragenen Materials (Fluorescein).

Materialien:

[0348] Es wurden G 4 (NH_3) PAMAM-STARBURST™-Dendrimer und Generation 6,0-STARBURST™-Dendrimer hergestellt. Fluorescein-5-isothiocyanat (Isomer 1) (FITC) wurde von Molecular Probes bezogen. Dansylchlorid wurde von Aldrich Chemical Co. bezogen. NHS-LC-Biotin und Avidin wurden von Pierce bezogen. Dichlortriazinylfluorescein (I) und Insulin wurden von Sigma Chemical bezogen. Alle Reagenzien wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

I. Biotin/Dendrimer-Konjugationskopplungen: (Vergleichsbeispiele)

A. Herstellung von Biotin-Dendrimer-Konjugaten

[0349] Eine Stammlösung von G 6 (NH_3) PAMAM-Dendrimer mit einer Konzentration von 1,8 mg/ml in 100 mM Phosphatpuffer mit pH = 7,0 wurde hergestellt. Eine weitere Stammlösung von G 6 (NH_3) wurde mit einer Konzentration von 1,9 mg/ml in Wasser hergestellt. Aus aus jeder Lösung wurde ein 1 ml Aliquot entnommen, und zu jeder Lösung wurden 5 mg an festem NHS-LC-Biotin zugegeben. Die Vials wurden für 5 Minuten heftig geschüttelt, um das Biotin aufzulösen. Die Inkubation wurde bei Raumtemperatur für 18 Stunden durchgeführt. Ähnliche Reaktionen wurden mit Lösungen mit G 4 (NH_3) sowohl in Phosphatpuffer als auch in Wasser durchgeführt. Die G 4 (NH_3)-Stammlösungen waren 2,0 mg/ml und zu jeweils einem 1 ml Aliquot wurden jeweils 5 mg an NHS/LC-Biotin zugegeben.

[0350] Andere Konjugationen wurden mit kleineren Verhältnissen von Ligand zu Amin durchgeführt. Beispielsweise wurde bei einem Versuch, 20 Biotine an ein G 7 (NH_3)-PAMAM zu konjugieren, ein 844 µl-Aliquot an 11,85%igem G 7-Dendrimer zu 0,0244 g an NHS-LC-Biotin in 5 ml Boratpuffer, pH = 9, zugegeben. Nach 3 Stunden wurde die Reaktionsmischung gegen entionisiertes Wasser dialysiert, um nicht umgesetztes Biotin zu entfernen.

Elektrophorese

[0351] Nach 18 Stunden wurden 100 µl jeder Reaktionsmischung und jeder Stammlösung der ganzen Generation für eine elektrophoretische Analyse entnommen. 10 µl an 0,1 MB+ mit 50% Sucrose wurden zu jeder Lösung zugegeben und mit den Proben wurden an einem 5–50% T-Gradient Hylinx™-Gel (erhalten von Gradipore) eine Elektrophorese durchgeführt. Der verwendete Puffer bestand aus 90 mM Tris, 80 mM Borsäure und 2,5 mM EDTA mit pH = 8,3. Zehn Mikroliter jeder Probe wurden auf das Gel appliziert. Das Gel wurde für 30 Minuten bei 200 V (konstant) betrieben. Die Aufgliederung der Linien war wie im Folgenden aufgelistet:

1 G 7 (NH_3)
2 G 6 in P_i, (NH_3)
3 G 6 (NH_3) mit Biotin in P_i

4 G 4 in P_i, (NH_3)
5 G 4 (NH_3) mit Biotin in P_i
6 G 6 in H_2O, (NH_3)
7 G 6 (NH_3) mit Biotin in H_2O
8 G 4 in H_2O, (NH_3)
9 G 4 (NH_3) mit Biotin in H_2O
10 G 4 (NH_3)
11 Cyt c/G 3,5 (NH_3)
12 G 5 (NH_3)

Ergebnisse und Diskussion

[0352] Die Elektrophorese zeigte deutlich eine verzögerte Mobilität der Dendrimere, die mit Biotin behandelt worden waren im Vergleich zu der Laufstrecke der nicht modifizierten Dendrimere. Das Molekulargewicht erhöhte sich aufgrund der kovalenten Bindung von Biotinmolekülen an die Dendrimeroberflächen. Dadurch wandert das Dendrimer aufgrund der Siebwirkung von GGE, welche Moleküle mit höherem Molekulargewicht verzögert, eine kürzere Distanz.

[0353] Die Anzahl an Biotinmolekülen, die pro Dendrimer gebunden sind, ist derzeit nicht bekannt. Die Verteilung von Biotinmolekülen auf dem Dendrimer ist statistisch und die untersuchte Probe ist keine einzelne Spezies.

[0354] Manche Reaktionen wurden so durchgeführt, dass theoretisch alle Oberflächengruppen auf dem Dendrimer (Z in **Fig. 1**; Z' in **Fig. 2**) biotinyliert wären. Während des Verlaufs dieser Reaktionen bildete sich kein sichtbarer unlöslicher Stoff.

B. Herstellung von Dendrimer-Fluorescein (FITC)-Konjugaten

[0355] Eine 5 ml methanolische Lösung von 12,7% (w/w) G 4 (NH_3)-Kern PAMAM-Dendrimer wurde an einem Rotationsverdampfer im Vakuum getrocknet. Ungefähr 40 mg (7,4 µmol) des getrockneten Dendrimers wurden entnommen und in 5 ml eines 0,1 M Phosphatpuffers mit pH = 9,0 gelöst.

[0356] Fluoresceinisothiocyanat (FITC I) (14,5 mg, 37 µmol) wurde im Dunklen in 2 ml DMSO gelöst. Die FITC I-Lösung wurde zu der gerührten Dendrimer-Lösung tropfenweise innerhalb von 1 bis 2 Minuten zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur für 15 bis 20 Stunden gerührt. Die Farbe der Lösung war kastanienbraun.

[0357] Nach dem Rühren wurde die Reaktionsmischung in zwei Centricon™-Mikrokonzentrator-Gefäße (Molekulargewicht Cutoff-Wert: 3000 Dalton) gegeben und ultrafiltriert, um jegliches nicht umgesetztes FITC I zu entfernen. Während der Ultrafiltration wurden dreimal 2 ml an 0,1 M Phosphatpuffer mit pH = 9,0 zugegeben. Das konjugierte vierte Generation (Ammoniakkern)-Dendrimer FITC I wurde nach der Ultrafiltration aus dem Retentat gewonnen.

C. Herstellung von biotinylierten/Dendrimer-FITC I-Konjugaten

[0358] Unter Verwendung der 20 mg/ml Stammlösung von G 4 (NH_3) PAMAM-STARBURST™-Dendrimer-FITC I (hergestellt im vorhergehenden Abschnitt) wurde 1 ml der Dendrimer-FITC I-Stammlösung entnommen und zu 3 ml an 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 9,0) zugegeben.

[0359] Eine Menge von 10,0 mg (18 mmol) an NHS-LC-Biotin wurde zu 0,5 ml an DMSO zugegeben und geschüttelt, um eine Auflösung zu bewirken.

[0360] Die NHS-LC-Biotin-Lösung wurde innerhalb von 30 Sekunden zu der Dendrimer-Lösung zugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur im Dunklen für 4 Stunden rühren gelassen. Anschließend wurde die Reaktionsmischung von der Rührplatte entfernt und in zwei Centricon™-Mikrokonzentrator-Gefäße transferiert (Molekulargewicht Cutoff-Wert: 3000 Dalton) und ultrafiltriert, um jegliches nicht gebundenes Biotin zu entfernen. Es wurden acht Mal 2 ml an 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 9,0) während der Ultrafiltration zugegeben, um die Reinigung zu erleichtern.

D. Bildung des biotinylierten G 4-Dendrimer-FITC I/Avidin-Komplexes

[0361] Eine Menge von 3,0 mg (45 µmol) an Avidin wurde in 1 ml an 10 mM Phosphatpuffer (pH = 7,1) gelöst.

[0362] Eine Menge von 300 µl (10 mg/ml, 450 µmol) des biotinylierten G 4 (NH_3)-Dendrimer-FITC I (zuvor hergestellt) wurde zu der Avidinlösung zugegeben und bei Raumtemperatur für 4 Stunden vorsichtig gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend in Centricon™-Mikrokonzentrator-Röhren gegeben (Molekulargewicht Cutoff-Wert: 30000 Dalton) und ultrafiltriert, um das überschüssige biotinylierte Dendrimer zu entfernen. Während des Ultrafiltrationsprozesses wurden acht Mal 2 ml an 10 mM Phosphatpuffer mit pH = 7,1 zugegeben, um die Reinigung zu ermöglichen. Der resultierende Biotin-Dendrimer/Avidin-Komplex wurde aus den Mikrokonzentrator-Gefäßen entnommen und bei –10°C gelagert.

E. Herstellung von Dendrimer/Dichlortriazinylfluorescein (I)

[0363] Ungefähr 300 µl an G 6 (EDA) PAMAM-STARBURST™-Dendrimer (21,5% Feststoffe) wurden zu 700 µl an entionisiertem Wasser zugegeben und dispergiert (64,5 mg, 2,24 µmol). Zusätzliche 4 ml an entionisiertem Wasser wurden zugegeben, um das Dendrimer auf eine Konzentration von 12,9 mg/ml zu verdünnen.

[0364] Dichlortriazinylfluorescein (Isomer I)-Hydrochlorid [DTAF (I)] (6,0 mg, 11,3 µmol) wurde in 0,5 ml an Methanol im Dunklen gelöst und zwei Tropfen Triethylamin wurden zugegeben. Die DTAF (I)-Lösung wurde innerhalb von 30 Sekunden tropfenweise zu der gerührten Dendrimer-Lösung zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur für 15 bis 20 Stunden gerührt. Die Lösung blieb während der Reaktion klar und orange.

[0365] Nach dem Rühren wurde die Reaktionsmischung in Centricon™-Mikrokonzentrator-Gefäßen gegeben (Molekulargewicht Cutoff-Wert: 10 000 Dalton) und sie wurde ultrafiltriert, um jegliches nicht umgesetztes DTAF (I) zu entfernen. Während der Ultrafiltration wurden fünfzehn Mal 2 ml an 0,1 M Phosphatpuffer mit pH = 9,0 zugegeben, um die Reinigung zu ermöglichen. Ungefähr 3 ml an konjugiertem G 6 (EDA-Kern)-Dendrimer-DTAF (I) wurden bei der Reinigung gewonnen.

F. Herstellung von multibiotinylierten/Dendrimer-DTAF (I)-Konjugaten.

[0366] Unter Verwendung der 20 mg/ml Stammlösung von G 6 (EDA) PAMAM-STARBURST™-Dendrimer-DTAF (I) (hergestellt in dem vorhergehenden Abschnitt) wurden 0,425 ml (8,5 mg, 0,0003 mmol) der Dendrimer-DTAF (I)-Stammlösung entnommen und zu 0,575 ml an 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 9,0) zugegeben.

[0367] Eine Menge von 8,1 g (0,029 mmol) an NHS-LC-Biotin wurde zu 0,3 ml an DMSO zugegeben und geschüttelt, um die Auflösung zu bewirken.

[0368] Die NHS-LC-Biotin-Lösung wurde innerhalb eines Zeitraums von 30 Sekunden zu der Dendrimer-Lösung zugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur im Dunklen für 4 Stunden mischen gelassen.

[0369] Nach 4 Stunden wurde die Reaktionsmischung von der Rührplatte entfernt und in zwei Centricon™-Mikrokonzentrator-Gefäße transferiert (Molekulargewicht Cutoff-Wert: 10000 Dalton) und ultrafiltriert, um jegliches nicht gebundenes Biotin zu entfernen. Es wurden während der Ultrafiltration acht Mal je 2 ml an 0,1 M Phosphatpuffer mit pH = 9,0 zugegeben, um die Reinigung zu ermöglichen.

II. Insulin/Dendrimer-Konjugationskopplung: (Vergleichsbeispiele)

A. Herstellung von dansyliertem Dendrimer-Konjugat

[0370] Eine 5 ml methanolische Lösung von 12,7% (w/w) G 4 (NH_3)-PAMAM-Dendrimer-Lösung wurde im Vakuum an einem Rotationsverdampfer getrocknet. Ungefähr 40 mg (7,4 µmol) des getrockneten Dendrimers wurden entnommen und in 5 ml eines 0,1 M Phosphatpuffers mit pH = 9,0 gelöst.

[0371] Eine Menge von 10 mg (0,037 mmol) an Dansylchlorid wurde zu 5 ml Aceton zugegeben und für 5 bis 10 Minuten geschüttelt. (Diese Lösung war tiefgelb und enthielt Spuren von Feststoff).

[0372] Die Dansylchlorid-Lösung wurde innerhalb eines Zeitraums von 30 Sekunden zu der Dendrimer-Lö-

sung zugegeben und der Reaktionskolben wurde für 90 Minuten in ein Wasserbad bei 40°C platziert. Während des Erwärmens wurde die Reaktionsmischung zeitweilig geschüttelt (die Farbe der Lösung verblasste von einem leuchtenden zu einem blassen Gelb).

[0373] Nach 90 Minuten wurde der Reaktionskolben aus der Wärme entnommen und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. (Die Reaktionsmischung wies eine leicht trübe Erscheinung auf). Das markierte Dendrimer wurde anschließend gereinigt, während es in Lösung gehalten wurde. Die Reaktion wurde in einen Rotationsverdampfer gegeben und das Aceton wurde im Vakuum bei 30–35°C entfernt. Dadurch schien sich die Lösung wesentlich aufzuklären. Die Reaktionsmischung wurde anschließend in zwei Zentrifugengefäße transferiert und mit 5000 Upm für 30 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war keine zusätzliche Präzipitation sichtbar.

[0374] Die dansylierte vierte Generation-Dendrimer-Lösung wurde anschließend in zwei Centricon™-Mikrokonzentrator-Gefäße gegeben (Molekulargewicht Cutoff-Wert: 3000 Dalton) und ultrafiltriert, um jegliches ungebundenes Dansylchlorid zu entfernen. Die Ultrafiltrationen wurden außerdem durch Dünnschichtchromatographie auf Reinheit untersucht, um die vollständige Entfernung jeglichen nicht umgesetzten Dansylchlorids sicherzustellen. Das Filtrat wurde gewonnen und wie folgt durch TLC untersucht: Silicagel 60 Platten (E. Merck) wurden mit einem Ethylacetat (100%) Lösungsmittelsystem verwendet (sichtbarmachen durch UV-Licht). Während das markierte Dendrimer am Ursprung zurückblieb, eluierte das verbleibende Dansylchlorid in der Nähe eines R_f-Wertes von 0,3. Ungefähr 1 bis 2 ml an vermutlich dansylierter Dendrimer-Lösung wurden gewonnen.

B. Herstellung von Insulin/dansyliertes Dendrimer-Konjugat

[0375] In einem 2 Dram-Vial wurde 0,5 ml an dansyliertem Dendrimer (zuvor hergestellt) zu 1,5 ml entionisiertem Wasser zugegeben für eine 10 mg/ml Lösung. 1 ml (10,0 mg, 0,0019 mmol) wurden entnommen und für die Insulinkopplung verwendet.

[0376] In einem zweiten Vial wurde eine Menge von 12,3 mg (0,0020 mmol) an Insulin (von Rinderpankreas) in 2 ml entionisiertem Wasser gelöst. Die resultierende Lösung wies eine trübe Erscheinung auf, daher wurde der pH-Wert auf 4 erniedrigt mit einem Tropfen an 1 N Salzsäure, um den Feststoff aufzulösen.

[0377] In einem dritten Vial wurde eine Menge von 88,7 mg (0,46 mmol) an EDAC in 1 ml entionisiertem Wasser gelöst.

[0378] Die Insulinlösung wurde zu der gerührten Dendrimer-Lösung innerhalb von 1–2 Minuten zugegeben und trübte sich sofort. Der pH-Wert wurde dann von pH = 7,0 auf 4,0 eingestellt unter Verwendung der 1 N Salzsäure. (In der Nähe von pH = 4,2 klärte sich die Lösung auf). Unter fortgesetztem Rühren wurde die EDAC-Lösung alle 10 bis 15 Minuten (über 1 Stunde) in 200–300 µl Einzelproben zugegeben. Der pH-Wert der Reaktionsmischung wurde zwischen 3,90 und 4,2 gehalten mit 1 N Salzsäure. Nach der letzten EDAC-Zugabe wurde die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen (15–20 Stunden).

[0379] Die Reaktionsmischung wurde anschließend in Centricon™-Mikrokonzentrator-Gefäße gegeben (Molekulargewicht Cutoff-Wert: 3000 Dalton) und mit entionisiertem Wasser ultrafiltriert (welches ein Präzipitat bildet), wurde dann aber resuspendiert durch Zugabe von einem Tropfen an 1 N Salzsäure. Dieser Vorgang wurde 2 bis 3 Mal wiederholt und das dansylierte Dendrimer/Insulinkonjugat wieder aufgelöst. Ungefähr 1 ml des dansylierten Dendrimer/Insulin-Konjugats wurde bei dem Ultrafiltrationsprozess gewonnen.

C. Herstellung von Insulin/Dichlortriazinylfluorescein (I)

[0380] Zu einem 2 Dram-Vial wurde eine Menge von 9,3 mg (0,002 mmol) Insulin (von Rinderpankreas) in 2 ml eines 0,1 M Phosphatpuffers (pH = 9,0) gelöst. Dichlortriazinylfluorescein (Isomer I)-Hydrochlorid [DTAF (I)] (4,1 mg, 0,008 mmol) wurde in Dunklen in 0,5 ml Methanol gelöst und 2 Tropfen Triethylamin wurden zugegeben.

[0381] Die DTAF (I)-Lösung wurde zu der gerührten Insulinlösung tropfenweise innerhalb von 2 Minuten zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur für 6 Stunden gerührt, anschließend über Nacht bei 2–8°C belassen. (Die Lösung blieb während der Reaktion klar und orange).

[0382] Am folgenden Morgen wurde die Reaktionsmischung in zwei Centricon™-Mikrokonzentrator-Gefäße

(Molekulargewicht Cutoff-Wert: 3000 Dalton) gegeben und ultrafiltriert, um jegliches nicht umgesetztes DTAF (I) zu entfernen. Es wurden während der Ultrafiltration zehn Mal 2 ml an 0,1 M Phosphatpuffer mit pH = 9,0 zugegeben, um die Reinigung zu ermöglichen. Ungefähr 2 ml an Insulin-DTAF (I) wurden bei der Reinigung gewonnen.

D. Herstellung von Insulin-DTAF (I)/Dendrimer-Konjugat

[0383] Zu einem 2 Dram-Vial wurde 1 ml (7,05 mg, 0,0014 mmol) an G 4 (NH_3)-Dendrimer zugegeben und der pH-Wert wurde unter Verwendung von 1 N Salzsäure auf 4,5 eingestellt. Eine Menge von 1 ml (10,1 mg, 0,0020 mmol) an Insulin-DTAF (I) (vorher hergestellt) wurde zu dem gerührten Dendrimer zugegeben und der pH-Wert wurde unter Verwendung von 1 N Salzsäure wieder auf 4,0 angepasst.

[0384] In einem zweiten Vial wurde eine Menge von 54,3 mg (0,28 mmol) an EDAC in 0,5 ml an entionisiertem Wasser gelöst.

[0385] Die EDAC-Lösung wurde in Einzelportionen von 100 µl alle 10 bis 15 Minuten (innerhalb 1 Stunde) zu der Reaktionsmischung zugegeben. Der pH-Wert der Reaktionsmischung wurde mit 1 N Salzsäure zwischen 3,90 und 4,20 gehalten. Nach der letzten EDAC-Zugabe wurde die Reaktion bei Raumtemperatur für 6 Stunden fortschreiten gelassen, anschließend über Nacht bei 2–8°C aufbewahrt.

[0386] Die Reaktionsmischung wurde anschließend in Centricon™-Mikrokonzentrator-Gefäße (Molekulargewicht Cutoff-Wert: 10000 Dalton) gegeben und mit entionisiertem Wasser ultrafiltriert, wobei mit 1 N Salzsäure ein pH-Wert zwischen 4 und 5 gehalten wurde.

[0387] Dieser Vorgang wurde 2–3 Mal wiederholt und das Insulin-DTAF (I)/Dendrimer-Konjugat wurde gesammelt, um eine klare orangene Flüssigkeit zu ergeben.

III. Dendrimer/Avidin-Konjugationskopplung: (Vergleichsbeispiel)

A. Herstellung von Dendrimer-Avidin-Konjugaten

[0388] In einem 2 Dram-Vial wurden 120 µl an G 7 (EDA)-Dendrimer (21,9% Feststoffe) zu 0,8 ml entionisiertem Wasser gegeben. Das verdünnte Dendrimer, 0,5 ml, wurde entnommen und für eine 2,6 mg/ml Lösung zu 4,5 ml an entionisiertem Wasser gegeben.

[0389] In einem zweiten Vial wurde eine Menge von 3,0 mg (0,045 mmol) an EDAC in 0,5 ml an entionisiertem Wasser gelöst.

[0390] Die Avidinlösung wurde innerhalb von 1–2 Minuten zu der gerührten Dendrimer-Lösung zugegeben und blieb klar. Der pH-Wert wurde anschließend unter Verwendung von 1 N Salzsäure auf 4,0 eingestellt. Unter fortgesetztem Rühren wurde die EDAC-Lösung in Einzelportionen von 100 µl alle 10–15 Minuten (über 1 Stunde) zugegeben. Der pH-Wert der Reaktionsmischung wurde mit 1 N Salzsäure zwischen 4,5 und 5,5 gehalten. Nach der letzten EDAC-Zugabe wurde die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen (15–20 Stunden).

[0391] Die Reaktionsmischung wurde anschließend in Centricon™-Mikrokonzentrator-Gefäße gegeben (Molekulargewicht Cutoff-Wert: 100000 Dalton) und mit 10 mM Phosphatpuffer ultrafiltriert, um jegliches ungebundenes Dendrimer oder Avidin zu entfernen. Es wurden während der Ultrafiltration acht Mal 2 ml an 10 mM Phosphatpuffer mit pH = 7,1 zugegeben, um die Reinigung zu erleichtern.

Beispiel OO: Zielsteuernde dichte Sterndendrimere mit Benztraubensäure-Natriumsalz.

[0392] Ein halbes Gramm an EDC wurde mit 0,0065 g Natriumsalz von Benztraubensäure in 2 ml H_2O vermischt. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 5,0 eingestellt (wie mit pH-Papier ermittelt) und die Lösung wurde für 5 Minuten gerührt. Anschließend wurden 62 µl (20 mg) an G 6 (NH_3)-Dendrimer (32,45% an Feststoffen) zu der Reaktionsmischung zugegeben und die Lösung wurde für 21 Stunden geschüttelt. Die Reinigung, um die Lösung von überschüssigem EDC zu befreien, wurde mit einem Amicon™-Microcon-10-Konzentrator durchgeführt. Der Verdünnungsfaktor betrug 57×10^6. Eine kleine ^{13}C-NMR-Resonanz wurde für die Methylgruppe des an das G 6-Dendrimer gebundenen Pyruvats beobachtet; außerdem wurde ein einzelner Kapillar-Elektrophorese-Peak für das Konjugat beobachtet.

[0393] Die Herstellung der Konjugate dieser Erfindung erfolgt unter Verwendung der oben beschriebenen Ausgangsmaterialien oder von Ausgangsmaterialien, die auf analoge Weise hergestellt werden oder von Ausgangsmaterialien, die im Stand der Technik beschrieben sind oder von Ausgangsmaterialien, die erhältlich sind.

Vergleichsbeispiele Nr. 1 bis 41

Beispiel 1: Einbau von 2-(Acetyloxy)benzoesäure (Aspirin) in STARBURST™-Dendrimere

[0394] Ein weithin akzeptiertes Verfahren, um sicherzustellen, ob sich ein „Sondenmolekül" im Inneren eines Micells befindet ist, dessen Kohlenstoff-13-Spin-Gitter-Relaxationszeiten (T_1) in einem nicht micellisierten Medium gegenüber einem micellisierten Medium zu vergleichen. Eine wesentliche Verringerung von T_1 für das micellisierte Medium deutet darauf hin, dass sich ein „Sondenmolekül" in dem Micell befindet. Da STARBURST™-Dendrimere „kovalent fixierte" Analoga von Micellen sind, wurde diese T_1-Relaxationszeittechnik verwendet, um den Grad/das Ausmaß zu ermitteln, zu dem verschiedene Arten von pharmazeutischen Molekülen mit STARBURST™-Polyamidoaminen assoziiert waren. In den folgenden Beispielen wurden die T_1-Werte für (Acetyloxy)benzoesäure (I) (Aspirin) in Lösungsmittel ($CDCl_3$) bestimmt und anschließend mit T_1-Werten in $CDCl_3$ bei verschiedenen molaren Verhältnissen von [I:Dendrimer] verglichen.

[0395] Inklusion von Aspirin (I) in verschiedene STARBURST™-Polyamidoamin-Dendrimere in Abhängigkeit von der Generation.

[0396] Verschiedene halbe Generation (Ester-terminiert, ausgehend von NH_3) STARBURST™-Polyamidoamin-Dendrimere (G = 0,5–5,5) wurden mit 2-(Acetyloxy)benzoesäure in $CDCl_3$ kombiniert, um Säure:tertiäres Amin-Verhältnisse von 1,0 zu ergeben. Eine grafische Darstellung von T_1-Werten für 2-(Acetyloxy)benzoesäure gegen die Generation des zugegebenen STARBURST™-Dendrimers (siehe **Fig. 4**, in der • C-4 bedeutet, □ C-6 bedeutet und o C-5 bedeutet) zeigt, dass T_1 über den Bereich der Generationen von 2,5 → 5,5 für die Kohlenstoffe 4, 5 und 6 in 2-(Acetyloxy)benzoesäure ein Minimum erreicht. Dies zeigt eine interne Assoziierung von 2-(Acetyloxy)benzoesäure in den Dendrimeren (G = 2,5 → 5,5) und bestätigt ferner, dass Polyamidoamin-Dendrimere (Gen = 2,5 oder größer) als Trägermoleküle fungieren können.

Beispiel 2: Freisetzung von Pseudoephidrin aus STARBURST™-Dendrimer- PAMAM

[0397] Pseudoephidrin (0,83 mg/ml) und STARBURST™-PAMAM-Dendrimer [1,0 mg/ml; G = 6,5; terminate Gruppe (Z) = 192 (Methylester)] wurden in entionisiertem destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert der Donorphase wurde mit Natriumhydroxid-Lösung auf 9,5 eingestellt und sie wurde bei Raumtemperatur für ungefähr 12 Stunden gelagert. Die Lösung von Pseudoephidrin allein wurde auf dieselbe Weise behandelt (Kontrolle). Die Wirkstoff-Dendrimer-Lösung wurde bei 40°C für 8 Stunden gelagert, nachdem das erste Experiment und eine dynamische Dialyse durchgeführt worden waren. Die verwendete Dialysemembran war eine SpectraPor™ 7, MW Cutoff 1000, 28,6 mm Durchmesser in Spektrum-Trennungszellen (halbes Zellvolumen 5 und 10 ml, Zellgrößenordnungen: 38 mm Durchmesser für beide Zellen und eine Zellentiefe von 10 und 20 mm für die 5 bzw. 10 ml Zellen).

[0398] Die Proben wurden durch HPLC-Verfahren, die für Pseudoephidrin-Bedingungen entwickelt wurden, analysiert, wobei die Bedingungen wie folgt waren:
Säule: μBondapak™ C-18
Mobile Phase: pH = 3,2 Phosphatpuffer plus Acetonitril (80:20)
Flussrate: 0,3 ml/min
Detektion: UV bei 210 nm
Retentionszeit: 13,3 min

[0399] Die Dialysemembran wurde mit entionisiertem Wasser gewaschen und vor der Verwendung für mindestens 12 Stunden in der Rezeptorphase getränkt. Die Dialysemembran wurde zwischen den Donor- und den Rezeptorbereich angebracht und der Donorbereich wurde mit einem kleinen Magnetrührstab gerührt. Bekannte Volumina von Donor- und Rezeptor-Lösungen wurden in die entsprechenden Bereiche gegeben und der Transfer von Pseudoephidrin zu dem Rezeptorbereich wurde als Funktion der Zeit verfolgt. Um die Sinkbedingungen zu erhalten, wurde die gesamte Rezeptorphase in periodischen Abständen entfernt (alle 30 Minuten) und durch frische Rezeptorphase ersetzt. Die Menge an Pseudoephidrin wurde in der Probenrezeptorphase untersucht. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur (22°C) durchgeführt. Bei der Rezeptorphase handelte es sich um reines entionisiertes destilliertes Wasser.

[0400] Die Ergebnisse der dynamischen Analyse sind in Fig. 5 gezeigt. In Fig. 5 bedeutet nur Pseudoephidrin (Kontrolle),



bedeutet Pseudoephidrin plus Dendrimer und



bedeutet Pseudoephidrin plus Dendrimer, das vor der Dialyse für 8 Stunden bei 40°C aufbewahrt wurde. Es ist ersichtlich, dass in Gegenwart von G 6,5-Dendrimer im Donorbereich die Dialyserate von Pseudoephidrin verringert ist. Eine Lagerung der Donorlösung bei 40°C scheint die Dialyserate weiter zu verringern.

[0401] Das Experiment wurde mit niedrigeren Konzentrationen wiederholt (das Verhältnis der Anzahl an Wirkstoffmolekülen zu der Anzahl an terminalen Gruppen wurde beibehalten). G 6,5-Dendrimer 120 µg/ml Pseudoephidrin 100 µg/ml (122 µg/ml Salz).

[0402] Die dynamische Dialyse von Pseudoephidrin (allein) war bei dieser geringeren Konzentration fast identisch zu der bei höherer Konzentration. Fig. 6 fasst die Ergebnisse dieses Experiments zusammen, wobei • Pseudoephidrin allein (Kontrolle) bedeutet und o Pseudoephidrin plus Dendrimer bedeutet.

Beispiel 3:

[0403] Die Vorgehensweise von Beispiel 2 wurde unter Verwendung der unten angegebenen Modifikationen wiederholt
Rezeptorphase: pH = 7,4 Phosphatpuffer
Donorphase: pH = 7,4 Phosphatpuffer plus Wirkstoff und Dendrimer in den folgenden Verhältnissen:

1.	G 6,5:	Wirkstoff	: :	1:192
2.	G 5,5:	Wirkstoff	: :	1: 96
3.	G 4,5:	Wirkstoff	: :	1: 48
4.	G 6,5H:	Wirkstoff	: :	1:192
5.	G 5,5H:	Wirkstoff	: :	1: 96
6.	G 4,5H:	Wirkstoff	: :	1: 48

[0404] Die obigen Donorphasen-Zusammensetzungen plus Pseudoephidrin allein wurden einer dynamischen Dialyse unterzogen. Der Buchstabe „H" nach der Dendrimergenerations-Nummer steht für hydrolysiertes Dendrimer. Die Hydrolyse wurde mit den in den Beispielen M und N beschriebenen Verfahren durchgeführt.

[0405] Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Fig. 7 zusammengefasst, wobei der Donor- und der Rezeptorbereich pH = 7,4 Phosphatpuffer enthielten. Für Pseudoephidrin allein (P) ist die Mittelwertkurve von drei Experimenten grafisch dargestellt (als durchgezogene Linie gezeigt) und es ist ein typischer Durchgang aus den anderen Experimenten gezeigt. In Fig. 7 bedeuten die folgenden Symbole das Dendrimer der angegebenen Generation.

Tabelle III

Symbol	Dendrimer Generation
◒	5.5
●	6.5
◐	4.5
⊖	5.5H
○	6.5H
◑	4.5H

[0406] Pseudoephidrin scheint bei pH = 7,4 nicht stark mit dem Dendrimer mit Esterendgruppen zu assoziieren. Eine Hydrolyse der terminalen funktionellen Gruppen zur Carboxylatform weist eine entscheidene Auswirkung auf die Dialyserate auf (Verringerung). Die Generationszahl scheint die Dialyserate nicht zu beeinflussen.

Beispiel 4: Wechselwirkungsstudien von Salicylsäure mit PAMAM-STARBURST™-Dendrimeren.

[0407] Dieses Beispiel evaluiert die Merkmale der Wechselwirkung von Salicylsäure mit PAMAM-STARBURST™-Dendrimeren. Diese Dendrimere bestanden aus einem von Ammoniak ausgehenden Kern mit sich wiederholenden Einheiten, die von N-(2-Aminoethyl)-acrylamid abgeleitet sind. Sowohl Polymere ganzer (terminate Amino-Funktionen) als auch halber (terminate Ester-Gruppen) Generationen waren in den Studien enthalten. Das in den Experimenten verwendete Verhältnis von Salicylsäure zu STARBURST™-Dendrimeren führte zu ungefähr einem Salicylsäuremolekül pro einer terminalen aminofunktionalen Gruppe für Polymere ganzer Generationen. Bei der Studie zu Polymeren halber Generationen wurde dasselbe Verhältnis eingesetzt, wobei für die Polymere mit höherem Molekulargewicht Anpassungen durchgeführt wurden.

[0408] Die Experimente wurden bei Raumtemperatur unter Verwendung einer Gleichgewichtsstatischen Zelldialysemethodik durchgeführt. Spektrum-statische Dialysezellen (halbes Zellvolumen, 10 ml), die durch SpectraPor™ 6 Membranen (Molekulargewicht Cutoff-Wert = 1000) getrennt wurden, wurden für alle Experimente verwendet. Der Transport von Salicylsäure wurde als eine Funktion der Zeit untersucht, indem Allquote aus entsprechenden Zellbereichen entnommen wurden und durch HPLC-Analyse unter Verwendung eines UV-Detektors bei 296 nm untersucht wurden (Bondapak C-18 Säule, eluierende mobile Phase aus Acetonitril/0,1 M Phosphatpuffer (pH = 3,2) mit einem Verhältnis von 20:80 (V/V), eingestellt auf eine Flussrate von 30 ml/h).

[0409] 10 ml einer Lösung, die 1 mg/ml Salicylsäure und 2,5 mg/ml STARBURST™-Polymer (Gen = 4,0) enthielt, wurde mit HCl-Lösung auf pH = 6,65 und 5,0 eingestellt, in den Donorbereich der Dialysezelle eingebracht und ein äquivalentes Volumen an gereinigtem Wasser wurde auf denselben pH-Wert eingestellt und in den Rezeptorbereich gegeben. Der Transport von Salicylsäure in den Rezeptorbereich wurde untersucht. Die Ergebnisse sind in Fig. 8 angegeben. In Fig. 8 ist die freie Säure durch • dargestellt, die Säure plus Generation 4,0 Dendrimer, pH = 6,65, ist durch o dargestellt und die Säure plus Generation 4,0 Dendrimer, pH = 5,00, ist durch □ dargestellt.

[0410] Aufgrund der geringeren prozentualen Ionisierung der Amingruppen an dem Polymer bei pH = 6 kann bei pH = 5 ein stärkeres Ausmaß an Wechselwirkung mit Salicylsäure erwartet werden, was dazu führt, dass bei dem niedrigeren pH-Wert weniger Verbindung transportiert wird. Die Ergebnisse, die in Fig. 8 angegeben sind, zeigen, dass in Gegenwart von Polymer bei beiden untersuchten pH-Werten ein viel geringerer Prozentsatz an Salicylsäure transportiert wird im Vergleich zu der Salicylsäure-Kontrollstudie. Es wird außerdem beobachtet, dass wie vorhergesagt bei pH = 6,65 mehr Salicylsäure transportiert wird als bei pH = 5,0. Die Daten demonstrieren eine Wechselwirkung des STARBURST™-Polymers mit Salicylsäure, die durch den pH-Wert kontrolliert werden kann. Durch diese Daten können auch Merkmale einer anhaltenden Freisetzung impliziert werden, da die Salicylsäurewerte in Gegenwart von Polymer nach dem Gleichgewichtspunkt, der bei der Kontrollstudie nach ungefähr 12 Stunden beobachtet wird, weiterhin ansteigen.

[0411] Um die Wechselwirkungsmerkmale von Salicylsäure mit STARBURST™-Polymeren (Gen = 4,0) weiter zu untersuchen, wurde ein Experiment bei pH = 8,0 entwickelt. Die Gestaltung der Studie unterschied sich von der vorhergehend beschriebenen insofern, als nur die Salicylsäure-Lösung (1 mg/ml) auf pH = 8,0 eingestellt und in den Donorbereich eingebracht wurde, und die Polymerlösung (2,5 mg/ml) in den Rezeptorbereich eingebracht wurde. Der Verlust an Salicylsäure aus dem Donorbereich wurde wie vorhergehend beschrieben untersucht. Die Ergebnisse des Experiments sind in Fig. 9 angegeben. In Fig. 9 ist die freie Säure durch -•- dargestellt, und die Säure plus Generation 4,0 Dendrimer bei pH = 8,0 ist durch ---Δ--- dargestellt.

[0412] Wie in Fig. 9 gezeigt, unterscheiden sich die Gleichgewichtseigenschaften von Salicylsäure im Donorbereich mit STARBURST™-Polymeren im Rezeptorbereich von der Salicylsäure-Kontrollstudie. Basierend auf den Ionisierungseigenschaften der Moleküle bei pH = 8 wird eine Wechselwirkung von ungefähr 6–7% erwartet. Das beobachtete Ausmaß an Wechselwirkung ist als in der Größenordnung von 4–5% gezeigt. Die beobachtete geringere Assoziierung kann auf experimentelle Schwankungen oder auf eine Ionisierungskonstante von weniger als eins zurückzuführen sein.

[0413] Diese Experiment zeigt eine Aufnahme oder Entfernung von freier Salicylsäure aus der kontinuierlichen Phase des Systems durch das Polymer. Diese Art der Wirkung könnte zu einer Unterdrückung der Reaktivität von Molekülen führen, was andeutet, dass mit den Polymeren eine möglicherweise chelatierende oder Molekül-assoziierende Eigenschaft assoziiert ist.

[0414] Die Wechselwirkungsmerkmale von Salicylsäure bei pH = 6,6 mit einem halbe Generation-STARBURST™-Polymer (Gen = 4,5), das terminate funktionelle Ester-Gruppen aufweist, wurden untersucht. Salicylsäure (1 mg/ml) wurde mit STARBURST™-Polymer (Gen = 4,5) 3,6 mg/ml bei pH = 6,6 kombiniert. 10 ml der Lösung wurden in den Donorbereich gegeben und der Transport aus dem Donorbereich wurde wir vorhergehend beschrieben untersucht. Die Ergebnisse sind in Fig. 10 angegeben. In Fig. 10 wird die freie Säure durch -•- dargestellt, und die Säure plus Polymer wird durch ---o--- dargestellt.

[0415] Unter diesen experimentellen Bedingungen wird vorhergesagt, dass keine Ladungswechselwirkung auftritt, da die tertiären Amingruppen bei pH = 6,6 nicht ionisiert sind. Wie in Fig. 10 angedeutet ist, ist der Verlust von Salicylsäure in Gegenwart von Polymer (Gen 4,5) während der ersten 10 Stunden der Dialyse nahezu identisch zu dem der Salicylsäure-Kontrollstudie.

[0416] Die folgenden Beobachtungen wurden anhand der in diesem Beispiel vorgelegten Daten gemacht:

(1) Ganze Generation PAMAM-STARBURST™-Polymere fungieren als Träger für Salicylsäure.

(2) Ganze Generation PAMAM-STARBURST™-Polymere besitzen eine anhaltende Freisetzungs-Funktionalität für Salicylsäure.

(3) Salicylsäureträgereigenschaften von ganze Generation PAMAM-STARBURST™-Polymeren können durch den pH-Wert kontrolliert werden.

Beispiel 5: Demonstration von multipler Chelatierung von Eisen durch ein Natriumpropionat-terminiertes sechste Generation STARBURST™-Polyamidoamin.

[0417] Das Natriumpropionat-terminierte sechste Generation Polyamidoamin (ausgehend von Ammoniak), hergestellt wie in Beispiel M und N (97,1 mg, 2,45 mol) wurde in 1,5 ml entionisiertem Wasser gelöst. Die Zugabe von 0,5 ml einer 0,5 N HCl verringerte den pH-Wert auf 6,3. Es wurde Eisenchlorid zugegeben (0,5 ml einer 0,12 M Lösung, 0,051 mmol), wodurch ein hellbraunes gelatineartiges Präzipitat gebildet wurde. Beim Erwärmen für 0,5 Stunden auf 60°C wurde das gelatineartige Präzipitat löslich, was zu einer homogenen orangefarbenen Lösung führte. Die Lösung wurde durch Biogel P2-Acrylamidgel (10 g, zweimal) filtriert, wobei die orangene Bande (ohne Halogenid-Verunreinigung) isoliert wurde. Die Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum ergab das Produkt als einen orangenen Film (30 mg). Die Analyse stimmte mit einer Chelatierung von ungefähr 20 mol an Eisenionen pro mol an STARBURST™-Dendrimer überein.

Tabelle IV

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

SB $C_{1521}H_{4267}N_{379}O_{573}$

[0418] Diese Ergebnisse bestätigen die Chelatierung von 20 ± 2 mol an Eisenionen pro mol an STARBURST-^{TM}-Dendrimer.

Beispiel 6: Herstellung eines Produkts, das mehr als ein Rhodiumatom pro STARBURST^{TM}-Polymer enthält.

[0419] 2,5 Gen PAMAM (Ester-terminiert, ausgehend von NH_3), hergestellt wie in Beispiel GG, (0,18 g, 0,087 mmol) und $RhCl_3 \cdot 3H_2O$ (0,09 g, 0,3 mmol) wurden in Dimethylformamid (DMF) (15 ml) vermischt und für 4 Stunden auf 70°C erwärmt. Die Lösung färbte sich purpurrot und das Rhodium wurde größtenteils aufgenommen. Das nicht umgesetzte Rhodium wurde durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Das gebildete Öl war in Chloroform löslich. Dieses wurde mit Wasser gewaschen und getrocknet ($MgSO_4$), bevor das Lösungsmittel entfernt wurde, um ein rotes Öl zu erhalten (0,18 g). Das NMR-Spektrum wurde in $CDCl_3$ aufgenommen und es wurden nur geringfügige Unterschiede zwischen dem chelatierten und dem nicht chelatierten STARBURST^{TM} bemerkt. Die Verdünnung von einem Teil dieser $CDCl_3$-Lösung mit Ethanol, und die anschließende Zugabe von $NaBH_4$ führte zur Präzipitation von Rhodium. $RhCl_3 \cdot 3H_2O$ ist unlöslich in Chloroform und in Chloroform-STARBURST^{TM}-Lösung, was die Chelatierung somit bestätigt.

Beispiel 7: Herstellung eines Produkts, das ein an STARBURST^{TM}-Polymer chelatiertes Pd enthält.

[0420] 3,5 Generation-PAMAM (Ester-terminiert, ausgehend von NH_3), hergestellt wie in Beispiel GG, (1,1 g, 0,24 mmol), wurde unter Rühren in Acetonitril (50 ml) gelöst. Es wurde Palladiumchlorid (0,24 g, 1,4 mmol) zugegeben und die Lösung wurde über Nacht auf 70–75°C erwärmt (Wasserbad). Das $PdCl_2$ wurde in dem STARBURST^{TM} aufgenommen. Nach der Entfernung des Lösungsmittels bestätigte das NMR in $CDCl_3$, dass eine Chelatierung stattgefunden hatte. Die Verdünnung der $CDCl_3$-Lösung mit Ethanol und Zugabe von $NaBH_4$ führte zur Präzipitation des Palladiums. Das chelatierte Produkt (1,23 g) wurde als ein braunes Öl isoliert.

Beispiel 8: Demonstration der multiplen Chelatierung von Yttrium durch ein Methylencarboxylat-terminiertes zweite Generation STARBURST^{TM}-Polyethylenimin durch Transchelatierung aus Yttriumacetat.

[0421] Das STARBURST^{TM}-Polyethylenimin Methylencarboxylat-terminierte Material (0,46 g, 52,5% aktiv, Rest Natriumbromid, 0,18 mmol aktives STARBURST^{TM}-Dendrimer) aus Beispiel FF wurde in 4,5 ml Deuteriumoxid gelöst. Der resultierende pH-Wert betrug 11,5–12. Eine Lösung von Yttriumacetat wurde hergestellt, indem Yttriumchlorid (0,15 g, 0,5 mmol) und Natriumacetat (0,41 g, 0,5 mmol) in 1,5 ml Deuteriumoxid (2,9 mol

an Yttrium pro mol Dendrimer) gelöst wurden. Allquote von 0,5 ml der Yttriumacetat-Lösung wurden zu der Dendrimer-Lösung zugegeben und die ^{13}C-NMR-Spektren wurden bei 75,5 MHz aufgenommen.

[0422] Das ^{13}C-NMR-Spektrum von Yttriumacetat zeigt zwei Resonanzen, 184,7 ppm für den Carboxylkohlenstoff und 23,7 ppm für den Methylkohlenstoff, verglichen mit 182,1 und 24,1 ppm für Natriumacetat und 177,7 und 20,7 ppm für Essigsäure (Sadtler ^{13}C-NMR-Standardspektren). Die Untersuchung der Positionen dieser Banden zeigt den Grad der Chelatierung mit dem STARBURST™-Dendrimer. Das informativste Signal für das STARBURST™-Dendrimer, das ein Hinweis auf die Chelatierung ist, ist das a-CH_2 (von der Methylencarboxylat-Gruppe, die an der Chelatierung beteiligt ist), welches im unchelatierten Dendrimer bei 58,4 ppm und im chelatierten Dendrimer bei 63,8 ppm auftritt. Bei der Chelatierung mit Yttrium verkürzt sich die Spingitterrelaxationszeit der a-CH_2 wie erwartet von 0,24 ± 0,01 s auf 0,14 ± 0,01 s, was auf die Chelatierung hinweist.

[0423] Nach der Zugabe von 0,5 ml der Yttriumacetatlösung zu dem STARBURST™-Dendrimer schien das Yttrium vollständig durch das Dendrimer chelatiert zu sein, was dadurch bestätigt wird, dass die Signale für das Acetat die von Natriumacetat sind. Dieselbe Beobachtung wurde für die Zugabe eines zweiten 0,5 ml Aliquotes der Yttriumacetat-Lösung gemacht. Bei Zugabe des dritten Aliquotes an Yttriumacetat wurde beobachtet, dass nicht alles Yttrium als STARBURST™-Chelat aufgenommen wurde, es wurde beobachtet, dass ein Shift der Acetatcarboxyl-Resonanz zu 183,8 ppm auftritt, was zeigt, dass ein Teil des Yttriums mit dem Acetat assoziiert war. Der integrierte Bereich der chelatierten CH_2-Gruppen an dem Dendrimer stieg an, was zeigte, dass ein Teil des dritten zugegebenen Moläquivalents an Yttrium tatsächlich mit dem Dendrimer chelatiert war. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Dendrimer von 2–3 Yttriumionen pro Dendrimermolekül chelatieren kann (Generation = 2,0).

Beispiel 9: Demonstration der Multiplen Chelatierung von Yttrium durch ein Methylencarboxylat-terminiertes zweite Generation STARBURST™-Polyamidoamin durch Transchelatierung aus Yttriumacetat.

[0424] Für diese Studie wurden dieselben experimentellen Methoden verwendet wie für Beispiel 8. Das STARBURST™-Polyamidoamin Methylencarboxylat-terminierte Material (0,40 g, 62,5% aktiv, Rest Natriumbromid, 0,12 mmol) wurde in 4–5 ml an Deuteriumoxid gelöst. Der resultierende pH-Wert war 11,5–12 und wurde vor dem Experiment mit 6 N HCl auf 9,4 verringert. Eine Lösung von Yttriumacetat wurde hergestellt, indem Yttriumchlorid (0,1125 g, 0,37 mmol) und Natriumacetat (0,0915 g, 1,1 mmol) in 1,5 ml Deuteriumoxid aufgelöst wurden, so dass jeweils 0,5 ml an Lösung ein Moläquivalent Metall enthalten.

[0425] Die ersten beiden Moläquivalente an Yttriumacetat, die zugegeben wurden, wurden durch das STARBURST™-Polyamidoamin vollständig chelatiert. Bei Zugabe eines dritten Moläquivalents an Yttrium trat Präzipitation des Produkts auf, so dass keine NMR-Daten erhalten werden konnten. Die Signale, die am meisten Information über die Chelatierung durch das STARBURST™-Dendrimer gaben, waren die der beiden Kohlenstoffe, die dem chelatierenden Stickstoff benachbart sind. Die chemischen Verschiebungen dieser Kohlenstoffe im unchelatierten Dendrimer traten für das a-CH_2 bei 59,1 ppm auf und für den ersten Methylenkohlenstoff des Rückgrats bei 53,7 ppm auf. Bei Chelatierung wurde beobachtet, dass diese beiden Resonanzen Tieffeldverschoben werden zu 60,8 bzw. 55,1 ppm. Die Transchelatierung zeigt, dass zwei Metallionen pro Dendrimermolekül leicht chelatiert werden können, dass jedoch bei Chelatierung eines gewissen unbekannten Teils eines dritten Moläquivalents das Produkt aus der Lösung präzipitiert.

Beispiel 10: Demonstration von Multipler Chelatierung von ^{90}Yttrium durch ein Methylencarboxylat-terminiertes zweite Generation STARBURST™-Polyethylenimin.

[0426] Es wurden Standardlösungen von Yttriumchlorid (3×10^{-2} M, beimpft mit nicht-trägeraddiertem ^{90}Y) und Methylencarboxylat-terminiertem zweite Generation STARBURST™-Polyethylenimin aus Beispiel FF (6×10^{-2} M) hergestellt. Diese wurden bei verschiedenen Metall:STARBURST™-Verhältnissen in HEPES-Puffer miteinander umgesetzt. Die Komplexausbeute wurde durch Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung von Sephadex G 50-Ionenaustauschbeads bestimmt, wobei mit 10%iger NaCl:NH_4OH, 4:1 bei pH = 10 eluiert wurde. Nicht komplexiertes Metall wird auf der Säule entfernt, komplexiertes Metall eluiert. Die Ausbeuten wurden durch Vergleich der eluierten Radioaktivität mit der auf der Säule unter Verwendung eines Wellzählers erhalten. Innerhalb der Genauigkeit der Experimente zeigen diese Ergebnisse, dass das 2,5 Gen. STARBURST™-PEI-Acetat zwischen zwei und drei Metallen pro Dendrimer chelatieren kann, wobei ein löslicher Komplex entsteht.

Tabelle V
Chelatierung von 2,5 Gen. PEI-Acetat mit ^{90}Y

Vol. Y+3	Vol. PEI	Vol HEPES	M:L Theor.	% Komplex	M:L Act.
5	30	370	0.1	110	0.1
10	30	360	0.2	101	0.2
20	30	350	0.4	95	0.4
30	35	340	0.5	97	0.5
30	30	340	0.5	102	0.5
60	30	310	1.0	99	1.0
120	30	250	2.0	100	2.0
180	30	180	3.0	94	2.8
250	30	120	4.1	80	3.3
300	20	80	7.5	44	3.3
300	20	70	5.0	40	2.0
300	20	70	5.0	41	2.0

[0427] Alle Volumina in Tabelle V sind Angaben in Mikroliter angegeben.

Beispiel 11: Konjugation von 4-Isothiocyanatophenyl Methylencarboxylat-terminiertem dritte Generation STARBURST™-Polyethylenimin mit monoklonalem IgG Antikörper.

[0428] Das Isothiocyanat, 10 mg (50 µmol) aus Beispiel DD wurde in 500 µl an 3 mM Indiumchlorid gelöst, das mit radioaktivem Indium-111-Chlorid dodiert worden war und der pH-Wert wurde mit 660 µl 1 N NaOH auf 9 eingestellt. Allquote des vollständigen monoklonalen Antikörpers IgG CC-46 wurden anschließend mit Allquoten des chelatierten STARBURST™ vermischt. Die Mischungen wurden geschüttelt und dann für 18 Stunden gelassen. Die Mischungen wurden anschließend durch HPLC analysiert (Säule Dupont Zorbax Biosphere GF-250; Eluent 0,25 M Natriumacetat, pH = 6) mit einem UV-Detektor bei 254 nm und einem Radioaktivitätsdetektor. Die Ergebnisse sind in Tabelle VI gezeigt.

Tabelle VI
Starburst-IgG-Konjugate

	1	2	3	4
IgG-Lösung (µl)	20	20	20	20
Chelatierte Starburst-Lösung (µl)	5	20	50	100
% Radioaktivität an IgG	6	5	5	3
% IgG konjugiert	2	7	17	22

Beispiel 12: Konjugation von 4-Isothiocyanatophenyl Methylencarboxylat-terminiertem dritte Generation STARBURST™-Polyethylenimin mit IgG monoklonalem Antikörper.

[0429] Das Isothiocyanat aus Beispiel DD, 4 mg (20 µmol) wurde mit 200 µl an 3 mM Indiumchlorid (60 µmol) vermischt. Ein 20 µl Aliquot der Lösung wurde anschließend mit radioaktivem Indium-111-Chlorid dodiert und der pH-Wert wurde durch die Zugabe von 30 µl an 1 N NaOH und 10 µl an 0,1 N HCl auf 9 angepasst. Das Indiumchelat wurde mit 150 µl an CC-49 vollständigem Antikörper IgG, 10 mg/ml in 50 mM HEPES-Puffer bei pH = 9,5 vermischt. Nach 18 Stunden bei Raumtemperatur wurde der Antikörper durch präparative HPLC gewonnen (Säule Dupont Zorbax Biosphere GF-250; Eluent 0,25 M Natriumacetat, pH = 6); mit einem UV-Detek-

tor bei 254 nm und einem Radioaktivitätsdetektor. Der gewonnene Antikörper wurde an einer Amicon-Membran konzentriert und in PBS-Puffer (Phosphat-gepufferte Saline pH = 7,4, die 0,12 M NaCl, 2,7 mM KCl und 10,0 mM Phosphat enthält) bei pH = 7,4 ausgetauscht. Der gewonnene Antikörper wies eine spezifische Aktivität von ungefähr 0,5 µCi/100 µg auf.

Beispiel 13: in vivo-Lokalisierung von ^{111}In-markiertem STARBURST™-Antikörper-Konjugat.

[0430] Die Verwendbarkeit des markierten STARBURST™-Antikörper-Konjugats, das in Beispiel 12 hergestellt wurde, wurde demonstriert, indem die in vivo Materialaufnahme durch ein humanes Tumortransplantat in einer athymischen Maus gemessen wurde. Weibliche athymische Mäuse wurden subkutan geimpft mit der humanen Dickdarmkarzinomzelllinie LS174T (ungefähr 4×10^6 Zellen/Tier). Ungefähr zwei Wochen nach Einimpfen wurde jedes Tier über die Schwanzvene injiziert. Die Mäuse wurden nach 17 und 48 Stunden getötet (5 Tiere zu jedem Zeitpunkt), der Tumor und ausgewählte Gewebe wurden operativ entfernt und gewogen und die Radioaktivität wurde in einem Gammazähler gemessen. Nach 17 Stunden hatten sich 13,5% der injizierten Dosis pro Gramm an Gewebe in dem Tumor lokalisiert. Nach 48 Stunden hatten sich 21,6% der injizierten Dosis pro Gramm an Gewebe in dem Tumor lokalisiert.

Beispiel 14: Anbindung von Herbicidmolekülen (2,4-D) an die Oberfläche von STARBURST™-Dendrimeren.

[0431] Dritte Generation PAMAM (Initiatorkern = NH_3) (2,0 g, 0,8 mmol) wurde in H_2O (10 ml) gelöst und mit Toluol (20 ml) kombiniert. Das Zweiphasensystem wurde anschließend gerührt und mit einem Eisbad gekühlt, wobei zu diesem Zeitpunkt das in Toluol (10 ml) gelöste Säurechlorid von 2,4-D [2,4-Dichlorphenoxy)-essigsäure] (2,4 g, 12 eq) über 30 Minuten tropfenweise zugegeben wurde. Als die Zugabe fast beendet war, wurde NaOH (0,5 g, 12,5 mmol, 50% w/w-Lösung) zugegeben und die Lösung wurde für weitere 2 Stunden gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend zur Trockene eingedampft und der resultierende feste Rückstand wurde wiederholt in $CHCl_3$/MeOH (1:1 v/v) aufgenommen und filtriert. Der braune Feststoff war in $CHCl_3$ nicht vollständig löslich und schien in Wasser unlöslich zu sein; die Zugabe von Aceton erleichterte jedoch die Auflösung. Der braune Feststoff wurde in $CHCl_3$ für 24 Stunden gerührt und die Lösung wurde filtriert (es wurde klebriger brauner Feststoff erhalten). Nach dem Trocknen über $MgSO_4$ wurde das Filtrat konzentriert, um ein viskoses orangefarbenes Öl zu ergeben, welches beim Stehen verfestigte. Das ^{13}C-NMR zeigte eine partielle Amidierung an der Oberfläche durch 2,4-D und ist im Einklang mit der Assoziierung des 2,4-D an STARBURST™-Polymer.

Beispiel 15: Einschluss von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) in STARBURST™-Dendrimeren.

[0432] Ein weithin akzeptiertes Verfahren, um sicherzustellen, ob ein „Sondenmolekül" im Inneren eines Micells eingeschlossen ist ist, dessen Kohlenstoff-13-Spingitterrelaxationszeiten (T_1) in einem nicht micellierten Medium gegenüber einem micellierten Medium zu vergleichen. Eine wesentliche Verringerung von T_1 für das micellierte Medium zeigt den Einschluss von „Sondenmolekül" in dem Micell an. Da STARBURST™-Dendrimere „kovalent fixierte" Analoga von Micellen sind, wurde diese T_1-Relaxationszeit-Technik verwendet, um den Grad/das Ausmaß, in dem verschiedene herbicidartige Moleküle mit STARBURST™-Polyamidoaminen assoziiert waren, zu ermitteln. In den folgenden Beispielen wurden T_1-Werte für 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (I) (2,4-D) in Lösungsmittel ($CDCl_3$) bestimmt und anschließend mit T_1-Werten in $CDCl_3$ bei verschiedenen molaren Verhältnissen [I:Dendrimer] verglichen.

[0433] Einschluss von 2,4-D in verschiedene STARBURST™-Polyamidoamin-Dendrimere als Funktion der Generation.

[0434] Verschiedene halbe Generation (Ester-terminiert, ausgehend von NH_3) STARBURST™-Polyamidoamin-Dendrimere (Generation (Gen) = 0,5, 1,5, 2,5, 3,5, 4,5 und 5,5) wurden mit 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (I) in $CDCl_3$ kombiniert, um ein Verhältnis Säure:tertiäres Amin von 1:3,5 und molare Verhältnisse von Säure:Dendrimer von 1:86 zu ergeben, wie in Tabelle VII gezeigt. Die Relaxationszeiten (T_1), die für die verschiedenen Kohlenstoffatome in 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und einem Generation = 3,5 STARBURST™-PAMAM-Dendrimer erhalten werden, sind in Tabelle VIII gezeigt, sowohl für 1:1 Säure/Amin-Verhältnisse als auch für gesättigte Lösungen von 2,4-D.

Tabelle VII

Gen	(A) Säure/Amin	(B) Säure/Amin	(C) Säure/Gesamtstickstoff	(D) Molares Verhältnis (Säure/Starburst)
0,5	1	--	1	1
1,5	1	1,33	0,57	6
2,5	1 (3,5)*	1,11 (3,8)*	0,53 (1,8)*	9 (34)*
3,5	1 (3,0)*	1,05 (3,2)*	0,51 (1,6)*	20 (67)*
4,5	1	1,02	0,51	42
5,5	1	1,01	0,50	86

* bedeutet Beispiele für 2,4-D-Einschluss im Inneren der Dendrimere in größeren Mengen als stöchiometrisch.

Tabelle VIII
T_1 für 2,4-D/G = 3,5 PAMAM-STARBURST™
Einschlusskomplex: Konzentrationseffekte

Kohlenstoff	(A) 1:1 Säure/Amin T_1 ^{13}C**	(B) Gesättigt mit 2,4-D T_1 ^{13}C**
1	3,19 ± 0,12 (152,73)	3,08 ± 0,09 (152,30)
3	0,34 ± 0,01 (128,64)	0,29 ± 0,01 (129,62)
5	0,38 ± 0,01 (127,41)	0,32 ± 0,01 (127,34)
2	3,28 ± 0,08 (125,79)	2,72 ± 0,68 (125,99)
4	4,58 ± 0,16 (123,27)	3,95 ± 0,07 (123,16)
6	0,31 ± 0,01 (114,66)	0,28 ± 0,01 (114,48)
CH_2	0,16 ± 0,01 (67,29)	0,146 ± 0,003 (66,79)
C = O	1,24 ± 0,07 (170,12)	- -

** bedeutet chemische Verschiebungen von ^{13}C, bezogen auf Chloroform bei 76,9 ppm.

[0435] Diese Daten zeigen, dass größere als stöchiometrische Mengen von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (d.h. [(I):Gen = 3,5 Dendrimer] = 67) verwendet werden können, ohne die T_1 zu erhöhen zumindest im gesättigten Zustand (siehe Spalten (A) und (B) in Tabelle VIII). Tatsächlich werden die Relaxationszeiten T_1 in Spalte (B) geringfügig verringert, was zeigt, dass größere als stöchiometrische Mengen an 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure im Inneren des Dendrimers eingeschlossen werden können.

[0436] Zum Beispiel ein Molverhältnis von [(I):Gen = 2,5 Dendrimer] = 34, wobei [(I):Gen = 3,5 Dendrimer] = 67, (siehe Spalte D in Tabelle 7).

[0437] Fig. 11 ist eine grafische Darstellung von T_1-Werten für die Kohlenstoffe 3, 5 und 6 in 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure als eine Funktion der Dendrimergeneration (d.h. 0,5 → 5,5). Die untere gestrichelte Linie (---) ist für die Kohlenstoffe 3 und 6 und die obere durchgezogene Linie ist für Kohlenstoff 5. In allen Fällen erreicht T_1 ein Minimum für Generation 2,5 → 5,5, was somit zeigt, dass in diesem Dendrimergenerationsbereich ein Einschluss erfolgt. Fig. 11 enthält auch T_1-Werte für 2,4-D in Gegenwart von Triethylamin [$N(Et)_3$] (Punkte B1 und B2) und $N(Et)_3$ + N-Methylacetamid (Punkte A1 und A2). Es ist ersichtlich, dass diese Werte viel größer sind als für Dendrimere mit G = 1,5 → 5,5, was den Moleküleinschluss in das Dendrimermolekül weiter stützt.

Beispiel 16: Herstellung eines Produkts das Fluorescein enthält, mit einem STARBURST™-Polymer.

[0438] Eine Probe von 5-Carboxyfluorescein (0,996 g) und STARBURST™-Polyethylenimin (Gen = 2,0; Amino-terminiert, ausgehend von NH_3) (0,202 g) wurde in 10 ml Methylenchlorid und 5 ml Methanol vermischt und für 10 Minuten am Rückfluss gehalten. Bei Filtration wurde ein unlösliches rotes Pulver (0,37 g) erhalten

(hauptsächlich nicht umgesetztes 5-Carboxyfluorescein). Aus dem Filtrat wurden 0,4 g eines leuchtend roten Feststoffs isoliert, der einen Erweichungspunkt von 98–103°C aufwies und bei 175–180°C zu einer leuchtend roten Schmelze schäumte; die NMR-Spektren (D_2O) dieses Produkts waren im Einklang mit Dendrimer, das an die Oberfläche gebundenes Fluorescein aufweist.

Beispiel 17:

[0439] In einem ähnlichen Verfahren zu dem in Beispiel 16 beschriebenen wurde STARBURST™-Polyethylenimin (Gen = 2,0; Amino-terminiert, ausgehend von NH_3) mit Fluoresceinisothiocyanat umgesetzt, um einen leuchtend roten schillernden Feststoff zu ergeben, der für die Verwendung als Fluoreszenzmarkierungsreagenz geeignet war.

Beispiel 18: Einkapselung von R(+)-Limonen in Polyamidoamin-STARBURST™-Dendrimeren.

[0440] Eine 5–50 Gew.-%ige Feststofflösung von STARBURST™-PAMAM-Dendrimer (MW ungefähr 175000; Generation = 9,0) in Methanol wird tropfenweise bis zur Sättigung zu R(+)-Limonen in Methanol zugegeben. Die Lösung wird bei Raumtemperatur (ungefähr 25°C) für mehrere Stunden gerührt und anschließend an einem Büchi Rotovap bei Raumtemperatur eingedampft, um ein festes Produkt zu ergeben. Erwärmung auf Temperaturen größer als 80°C ergibt Lösungsmittel unlösliche Produkte, die wesentliche Mengen von R(+)-Limonen in einer eingekapselten Form enthalten. Diese Produkte sind hervorragende Prototypen für eine langsame Freisetzung von R(+)-Limonen als Duftstoff und deodorierendes Produkt.

Beispiel 19: Einkapselung von Schwermetallsalzen in Polyamidoamin-STARBURST™-Dendrimeren.

[0441] Eine 5–50 Gew.-%ige Feststofflösung von STARBURST™-PAMAM-Dendrimer (MW ungefähr 350000; Generation = 10,0) in Wasser wird gerührt, während eine gesättigte Lösung von Bleiacetat [$Pb(C_2H_3O_2)_2$] tropfenweise zugegeben wird. Die Lösung wird bei Raumtemperatur (ungefähr 25°C) für mehrere Stunden gerührt und anschließend werden an einem Büchi Rotationsverdampfer flüchtige Bestandteile entfernt, um feste Produkte zu ergeben. Scanning-Transmissionselektronenmikrographien dieser Produkte zeigten, dass diese Schwermetall-Pb-Salze im Inneren der Dendrimere eingekapselt sind. Diese Filme, die Schwermetallsalze enthalten, sind als Schild nützlich, um elektromagnetische Strahlung zu absorbieren.

Beispiel 20: Einkapselung von Fluorescein (wasserlöslich) Farbstoff in Polyamidoamin-STARBURST™-Dendrimeren.

[0442] Eine 5–50 Gew.-%ige Feststofflösung (H_2O/CH_3OH) an STARBURST™-PAMAM-Dendrimer (MW ungefähr 175000; Generation = 9,0) wird gerührt, während Fluorescein Dinatriumsalz (Säure gelb 73, Cl. 45350; Uran; erhältlich von Aldrich (Chemical Co., Milwaukee, WI) bis zur Sättigung zugegeben wird. Die Lösung wird bei Raumtemperatur (ungefähr 25°C) für mehrere Stunden gerührt und anschließend werden bei Raumtemperatur flüchtige Bestandteile entfernt, um ein farbiges festes Produkt zu ergeben. Diese Dendrimere mit eingekapseltem Farbstoff sind hervorragende Referenzsonden, um Ultrafiltrationsmembranen zu kalibrieren.

Beispiel 21: Herstellung von Dendrimeren mit terminalen Fluoreszenz-Gruppen.

A. Reaktion von Amino-terminiertem Dendrimer mit N-Dansyl-Aziridin

[0443] Eine Probe (1,5 g, $1,6 \times 10^{-3}$ mol) an STARBURST™-Polyethylenimin (PEI), G = 3,0, terminale Gruppen (Z) = 12, MW = 920) wird in 20 ml Methanol gelöst. Diese Lösung wird gerührt und 0,884 g ($3,84 \times 10^{-2}$ mol) einer Lösung von N-Dansyl-Aziridin (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA) wird innerhalb eines Zeitraums von 20 Minuten tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur über Nacht rühren gelassen. Die Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum ergibt ein festes Produkt. NMR- und Infrarotanalyse zeigen, dass das Produkt kovalent gebundene Dansylgruppen auf der Oberfläche des Dendrimers aufwies.

B. Reaktion von Amino-terminierten Dendrimeren mit Dansylchlorid

[0444] Eine Lösung von STARBURST™-Polyamidoamin (1,0 g, $1,9 \times 10^{-4}$ mol) (ausgehend von Ammoniak, G = 4,0, terminale Gruppen (Z) = 24, MW = 5147) in 30 ml Wasser wird in einem Dreihalskolben mit 80 ml Toluol gerührt, während eine Lösung von Dansylchlorid (1,23 g, $4,5 \times 10^{-3}$ mol) (5-Dimethyl-amino-1-naphthalinsulfonylchlorid von Aldrich Chemical Co., Milwaukee WI) in 40 ml Toluol unter Eiskühlung tropfenweise zugegeben wird. Gleichzeitig wird eine 10%ige Lösung von NaOH (13,3 mol, 10% Überschuss) zu der Reakti-

onsmischung zugegeben, um eine ölige Kugel zu ergeben. Das Rohprodukt wird mit Wasser gewaschen, in Methanol gelöst und mit Diethylether präzipitiert, um ein festes Produkt zu ergeben. NMR- und Infrarotanalysen sind im Einklang mit kovalent gebundenen Dansyl-Gruppen auf der Dendrimeroberfläche.

Beispiel 22: Herstellung von Mangan-PAMAM dichtem Sternpolymer.

[0445] Im Anschluss an das in Beispiel 1 von US-Patent Nr. 4,587,329 erläuterte Verfahren, wird ein dritte Generation Ester-terminiertes Polyamidoamin dichtes Sternpolymer hergestellt. Die Estergruppen werden zur Natriumsalzform hydrolysiert, indem das dichte Sternpolymer in 0,1 N NaOH aufgelöst wird. Eine Portion von 131 mg (0,496 mmol) des resultierenden rohen Natriumsalzes des dichten Sternpolymers wird in Wasser gelöst (1 ml, pH = 11,4) und durch Zugabe von 0,5 M HCl auf einen pH-Wert von 7,0 neutralisiert. Eine Portion von 26 mg (2 eq) $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ wird zu der neutralisierten Lösung zugegeben und die Lösung wird für 2 Tage auf 55°C erwärmt. Die resultierende hellgelbe Lösung wird gereinigt unter Verwendung einer Bio-Gel I-P2-Säule (15,0 g, 150 mm Länge × 25 mm Durchmesser), wobei mit Wasser eluiert wird und die farbige Bande isoliert wird. Durch einen Silbernitrattest wurde bestätigt, dass das Produkt chloridfrei ist (z.B. NaCl, $MgCl_2$). Das Eluat wurde zur Trockene gereinigt, um ein klares Gel zu bilden, das im Hochvakuum getrocknet wurde, um 45 mg des gewünschten dichten Sternpolymer-Komplexes zu erhalten, für den die folgende Element-Zusammensetzung ermittelt wurde $[NaMn_2H_7][C_{69}H_{105}N_{19}O_{33}]$.

	Na	Mn	C	H	N
Berechnet	1,23	5,88	44,35	5,66	14,24
Gefunden	1,42	4,80	43,33	7,91	14,72

[0446] Unter Durchführung eines ähnlichen Verfahrens unter Verwendung eines siebte Generation Natriumcarboxylat-terminierten Polyamidoamin dichten Sternpolymers wurde ein weiterer Mangan dichtes Sternpolymer-Komplex hergestellt, für die folgende Element-Zusammensetzung ermittelt wurde $[Na_{30}H_{354}][Mn_{10}C_{3057}H_{4965}N_{763}O_{1149}]$

	Mn	C	H	N
Berechnet	0,759	50,72	7,41	14,76
Gefunden	0,72	46,34	7,91	14,72

[0447] Die Relaxivitäten für die vorhergenden Komplexe wurden in Wasser gemessen und die Ergebnisse sind in Tabelle IX wiedergegeben. Für einen Vergleich wurden die Relaxivitäten von Mangankomplexen mit zwei bekannten Komplexierungsmitteln aus den entsprechenden Relaxationszeiten, die durch kernmagnetische Resonanz gemessen wurden, berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle IX wiedergegeben.

Tabelle IX

Verbindung	Relaxivität*	
	R_1	R_2
$MnCl_2$	5,2	>20
MnEDTA	2,9	--
MnDTPA	1,3	--
Mn_2[PAMAM-A(2,5 G)]	3,63 ± 0,02	16,35 ± 0,78

* $(mM\ sec)^{-1}$, 37 °C, 90 Mhz. Werte pro Metallatom.

Beispiel 23:

[0448] Gemäß der Vorgehensweise für Beispiel 22 werden dichte Sternpolymer-Komplexe von Eisen hergestellt. In einer Ausführungsform wurde das Natriumsalz der Säureform eines sechste Generation Polyamidoamins hergestellt, indem die Esterform des Polyamidoamins, das entsprechend mit dem Reaktantenüberschussverfahren von US-Patent Nr. 4,587,329 hergestellt wurde, in 1 N NaOH gelöst wurde. Das Natriumsalz (97 mg, $2,4 \times 10^{-3}$ mmol) wird anschließend in 2 ml Wasser gelöst und die Lösung (pH = 11,3) wird mit 0,5 M HCl auf einen pH-Wert von 7 neutralisiert. Zu dieser neutralisierten Lösung wird eine wässrige Lösung von $FeCl_3$ (0,102 M, pH 1,4, 0,5 ml, 0,051 mmol, 21,6 eq) zugegeben. Die resultierende tieforangene Lösung (pH

= 4,9) wird für 23 Stunden auf 55°C erwärmt. Die Lösung wird auf Umgebungstemperatur gekühlt und durch Gelfiltrationschromatographie filtriert (Biogel P2 Säule, 175 × 25 mm). Das orangene Eluat wird im Vakuum bei 50°C getrocknet, um 45 mg eines orangenen Feststoffs mit der folgenden molekularen Formel zu ergeben: $[Na_5H_{127}]\{Fe_{20}[PAMAM\text{-}P\ (6,5\ G)]\}$, worin PAMAM-P das dichte Sternpolyamidoamin in der Propionat-terminierten Form bedeutet. Es wird ermittelt, dass es sich bei dieser orangenen Feststoff um einen Komplex aus Eisen und dem Polyamidoamin dichten Sternpolymer handelt, der durch die Formel $Na_5H_{127}Fe_{20}(C_{1521}H_{2469}N_{379}O_{573}]$ dargestellt ist,

	Na	Fe	C	H	N
Berechnet:	0,31	3,05	49,84	7,30	14,48
Gefunden:	0,31	3,12	47,11	7,33	14,81

[0449] Gemäß der obigen Vorgehensweise werden die gleichen Komplexe von Eisen und Acetat-terminierten Polyamidoamin dichten Sternpolymeren oder Acetat-terminierten Polyethylenimin dichten Sternpolymeren mit 2 bis 6 Generationen hergestellt. Die Relaxationszeiten für diese Komplexe werden unter Verwendung von kernmagnetischer Resonanz gemessen und die entsprechenden Relaxivitäten werden berechnet und in Tabelle X wiedergegeben.

Tabelle X

Verbindung	Relaxivität*	
	R_1	R_2
$FeCl_3$	8,4 ± 0,1	--
FeEDTA	1,7	--
FeDTPA	0,73	0,85
FeEHPG	0,95	1,1
Fe_2[PEI-A(2,5G)]	0,40 ± 0,02	0,88 ± 0,03
Fe_2[PAMAM-A(2,5 G)]	0,77 ± 0,01	--
Fe_2[PAMAM-P(2,5 G)]	0,135 ± 0,004	0,42 ± 0,02
Fe_4[PAMAM-P(4,5 G)]	0,038 ± 0,006	1,01 ± 0,05
Fe_{20}[PAMAM-P(6,5 G)]	0,047 ± 0,007	0,50 ± 0,07
$Fe_{50\text{-}60}$[PAMAM-P(7,5 G)]	ca. 0,3**	ca. 62**
{SPEI-[DTPA][Fe(DTPA)]$_2$}	1,094 ± 0,050	1,70 ± 0,02

* $(mM\ sec)^{-1}$, 37 °C, 90 MHz. Werte pro Metallatom.

** Werte pro Komplex

Beispiel 24:

[0450] Unter Verwendung des Verfahrens von Beispiel 22 werden Komplexe von Gadolinium und den in Beispiel 23 beschriebenen Polyamidoamin und Polyethylenimin dichten Sternpolymeren hergestellt. Ihre Relaxationszeiten werden gemessen und die Relaxivitäten berechnet, wobei das Ergebnis in Tabelle XI gezeigt ist. Zur Veranschaulichung der Herstellung des Gadoliniumkomplexes werden 0,40 g (0,16 mmol) der Natriumacetat-Form eines Polyethylenimin dichten Sternpolymers (zweite Generation), das wie in Beispiel 6 des US-Patents 4,587,329 hergestellt wird und anschließend durch Reaktion mit einem Überschuss an Bromessigsäure bei pH = 9 und 40°C umgesetzt wird, in 5 ml Wasser aufgelöst. Der pH-Wert der resultierenden Lösung wird mit 0,5 N HCl auf 9,2 verringert und es werden 3,2 ml einer wässrigen Lösung von $GdCl_3$ (0,31 mmol) zugegeben. Der pH-Wert der resultierenden Lösung wird mit 1 N NaOH von 4,1 auf 8,3 erhöht und die Lösung wird für 24 Stunden stehen gelassen. Die flüchtigen Bestandteile werden anschließend im Vakuum aus der Lösung entfernt und der Rückstand wird zweimal an Chelex-Harz chromatographiert. Für den gewonnenen hellgelben Feststoff wurde ein Atomverhältnis von Gd zu N von 2:1 ermittelt.
Gefunden (%): C, 14,5; H, 2,1; N, 3,6; Gd, 7,9; Br, 28,7.

[0451] Gemäß der obigen Vorgehensweise wurden ähnliche Komplexe von Gadolinium und Acetat-terminierten Polyamidoamin dichten Sternpolymeren oder Acetat-terminierten Polyethylenimin dichten Sternpolymeren mit 2 bis 6 Generationen hergestellt. Die Relaxationszeiten für diese Komplexe werden unter Verwendung von kernmagnetischer Resonanz gemessen und die entsprechenden Relaxivitäten werden berechnet und in Tabelle XI wiedergegeben.

Tabelle XI

Verbindung	Relaxivität
	R_1
$Gd(NO_3)_3$	8,6±0,3
$GdCl_3$	8,7±0,1
$GdCl_3$(0,15 M Saline)	10,43±0,36
GdEDTA	6,5
GdDTPA	3,9
GdDOTA	ca. 4
Gd (PAMAM-A)	9,90±0,43
Gd_2 (PAMAM-A)	13,00±0,33
Gd (PEI-A)	8,85±0,19
Gd_2 (PEI-A)	15,53±0,17
Gd_2 (PEI-A) + 3 PEI-A	8,0±0,19
Gd (DTPMP)	10,8±0,4
Gd_2 (PEI-A) + 2 EDTA	ca. 6

* $(mM\ sec)^{-1}$, 37 °C, 90 MHz. Werte pro Metallatom.

Beispiel 25:

Herstellung von Polyamidoamin STARBURST™-Konjugat mit Bradykinin C.

[0452] Bradykinin-Potentiator C, 4,7 mg (Sigma Chemical Company) wurde in 90 µl N-Methylpyrrolidinon (NMP) aufgenommen, welches 7,1 mg/ml N-Hydroxybenzotriazol (HONT) enthielt, und es wurde mit 33 µl einer frisch hergestellten Lösung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (28 mg/ml NMP) vermischt. Nach 4 Stunden bei Raumtemperatur wurden 60 µl eines fünfte Generation (G 5) PAMAM in NMP (13,4 mg/ml) zu der Bradykinin-Mischung zugegeben. Nach 72 Stunden bei Raumtemperatur wurden 1,5 ml an 17 nM Essigsäure zugegeben. Die Mischung wurde zentrifugiert, die Lösung wurde von dem Feststoff abdekantiert und der Feststoff wurde anschließend mit 1,5 ml verdünnter Essigsäure gewaschen. Die Lösung und die Waschungen wurden vereinigt und durch einen 25 mm PTFE 0,45 µ-Spritzenfilter filtriert. Nicht umgesetztes Peptid, HOBT und Lösungsmittel wurden von dem Konjugat durch Ultrafiltration unter Verwendung von zwei Centricon™-10 Mikrokonzentratoren abgetrennt. Das Konjugat wurde mit 2 ml an 17 mM Essigsäure und anschließend mit 2 ml PBS-Puffer gewaschen. Das Konjugat wurde in 450 µl Retentat gewonnen und mit frischem PBS-Puffer auf 750 µl verdünnt.

[0453] Vier Allquote des Konjugats wurden mit konzentrierter HCl bei 115°C für 20 Stunden hydrolysiert und auf Glutaminsäure untersucht. Die Glutaminsäure wurde als das o-Phthalaldehyd/2-Mercaptoethanol-Derivat quantifiziert, wobei Reversphasen-HPLC mit einem Fluoreszenzdetektor verwendet wurde (Säule: Whatman Partisil™ 5CCS/C8 (10 cm); Gilson Spectra™/Glo Detektor; Tyrosin als interner Standard; Eluent 50 mM Natriumacetat und Methanol; Gradient: 12% bis 30% Methanol in 5 min, für 1 min bei 30% gehalten, anschließend innerhalb von 14 min auf 80% Methanol erhöht und für 5 min bei 80% gehalten). Das o-Phthalaldehyd-Derivat wurde hergestellt, indem 25 µl der Aminosäure-Lösung mit 50 µl Fluoraldehyd™ o-Phthalaldehyd-Reagenz-Lösung (Pierce) gemischt wurden, Mischen für 1 min, und anschließend mit 0,05 ml an PBS-Puffer (phosphatgepufferte Kochsalz-Lösung; 120 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 10 mM Phosphatpuffersalze, pH =

7,4) verdünnt wurde. Für ein 25 µl Aliquot des Konjugats wurden 58 nmol an Glutaminsäuren gefunden. Dies entspricht 1,74 µmol Bradykinin C an dem Konjugat.

Beispiel 26: Herstellung von Polyamidoamin STARBURST™-Konjugat mit BOCPheLeuPheLeuPhe.

[0454] N-t-Butoxycarbonyl-L-Phenylalanyl-D-Leucyl-L-Phenylalanyl-D-Leucyl-L-Phenylalanin (BOCPheLeuPheLeuPhe), 4,1 mg (Sigma Chemical Company), wurde in 100 µl NMP, welches 7,1 mg/ml HOBT enthielt, aufgenommen und mit 30 µl einer frisch hergestellten Lösung von DCC (36 mg/ml) in NMP vermischt. Nach 90 min bei Raumtemperatur wurden 60 µl einer Lösung von 5 G PAMAM in NMP (13,4 mg/ml) zugegeben. Nach 72 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Konjugat entsprechend der Vorgehensweise in Beispiel 24 isoliert. Das Konjugat wurde in 750 µl Retentat gewonnen.

[0455] Vier Allquote des Konjugats wurden mit konzentrierter HCl bei 115°C für 20 Stunden hydrolysiert und auf Phenylalanin untersucht. Das Phenylalanin wurde als o-Phthalaldehyd/2-Mercaptoethanol-Derivat quantifiziert, unter Verwendung von Reversphasen-HPLC mit einem Fluoreszenzdetektor (HPLC-Bedingungen wie in Beispiel 24, außer dass der Elutionsgradient 12% bis 80% Methanol innerhalb 20 min betrug und anschließend für 5 min bei 80% gehalten wurde). Das o-Phthalaldehyd-Derivat wurde wie in Beispiel 24 angegeben hergestellt. Für ein 25 µl Aliquot des Konjugats wurden 26 nmol Phenylalanin gefunden. Dies entspricht 0,26 µmol BOCPheLeuPheLeuPhe an dem Konjugat.

Beispiel 27:

[0456] Zu einer methanolischen Lösung von 1,4,7-Tris-(carbomethoxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (DO3A Methylester) wird 1,0 Äquivalent an frisch hergestelltem wasserfreien Natriummethoxid zugegeben und die Lösung wird für mehrere Stunden rühren gelassen. Zu dieser Lösung wird ein Äquivalent an 10,11-Epoxyundecansäure zugegeben und die Lösung wird über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, um ein rohes hydroxyethyliertes Produkt, 1,4,7-Tris-(carbomethoxymethyl)-10-[2'-hydroxy-10'-carboxy(decyl)]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan zu ergeben. Zwei bis fünf Äquivalente dieses Produkts werden in Dimethylformamid (DMF) gelöst und entsprechende Äquivalente von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und N-Hydroxysuccinimid werden zugegeben, wobei über Nacht gerührt wird. Zu dieser Lösung wird ein Äquivalent an Generation 2 PAMAM zugegeben und es wird für weitere 24 Stunden gerührt. Das entsprechende DO3A-Methylester-Konjugat wird durch Behandlung mit wässrigem Natriumhydroxid in Methanol selektiv hydrolysiert. Eine Behandlung des DO3A-Konjugats mit überschüssigem Gadolinium (III)-acetat [$Gd(OAc)_3$, gepuffert auf pH = 6], und anschließende Inkubation mit einem Überschuss an Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) und Reinigung des Konjugats unter Verwendung von präparativer Reversphasen-HPLC, ergibt ein Hydroxyethyl DO3A PAMAM STARBURST™-Konjugatprodukt, welches zwei bis fünf Äquivalente an Gadolinium enthält, die durch weitere Versuche mit einem Überschuss an DTPA nicht entfernt werden können.

Beispiel 28:

[0457] Zu einer wässrigen Lösung von Generation 2 PAMAM, die auf einen pH-Wert von 9,0 gepuffert ist, werden zwei bis fünf Äquivalente an 1-[1-Carboxy-3(4'-isothiocyanatphenyl)propyl]-4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan zugegeben, hergestellt durch das Verfahren, welches in der veröffentlichten Europäischen Patentanmeldung 0 353 450, veröffentlicht am 7. Februar 1990, beschrieben ist. Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Eine Behandlung der Lösung mit einem Überschuss an $Gd(OAc)_3$ bei pH = 6,0 führt zur Bildung eines über Thioharnstoff verbundenen DOTA PAMAM STARBURST™-Konjugats, welches zwei bis fünf Äquivalente an inert gebundenem Gadolinium enthält, die mit einem DTPA-Challenge nicht entfernt werden können.

Beispiel 29: Herstellung von IgG/Dendrimer-FITC I-Konjugat.

A: Herstellung von PAMAM-Dendrimer, welches an Fluoresceinisothiocyanat konjugiert ist.

[0458] 2,2 ml einer methanolischen Lösung von G 9 (EDA) PAMAM-Dendrimer wurden im Vakuum an einem Rotationsverdampfer getrocknet. Ungefähr 300 mg (7,4 µmol) des getrockneten Dendrimers wurden rasch entfernt und in 1 ml entionisiertem Wasser gelöst, um die Dendrimer-Stammlösung zu bilden. Eine Lösung von 60 mg/ml wurde hergestellt, indem 200 µl der Dendrimer-Stammlösung gemischt wurden und zu 800 µl entionisiertem Wasser zugegeben wurden. Um eine endgültige Dendrimerkonzentration von 10 mg/ml (endgültige Dendrimerlösung) zu erhalten, wurden 5 ml an 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 9,0) zu der 60 mg/ml-Lösung zu-

gegeben. Die endgültige Dendrimerlösung, 3 ml, wurde zu einem 2 Dram-Vial (30 mg, 0,13 µmol) transferiert.

[0459] Fluoresceinisothiocyanat (FITC I, Molecular Probes), 5 mg, wurden im Dunkeln in 1 ml Dimethylsulfoxid gelöst. Die Fluoresceinisothiocyanatlösung (200 µl, 2,57 µmol) wurde zu der gerührten Dendrimerlösung zugegeben. Die resultierende Reaktionsmischung wurde vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur für 15 bis 20 Stunden gerührt. Die Lösung blieb klar und bernsteinfarben in ihrer Erscheinung.

[0460] Nach dem Rühren wurde die Reaktionsmischung in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 10 000 Dalton) gegeben und ultrafiltriert, um jegliches nicht umgesetztes FITC I zu entfernen. Während der Ultrafiltration wurden zehnmal 2 ml an 0,1 M Phosphatpuffer mit pH = 9,0 zugegeben, um die Reinigung zu erleichtern. Die Ultrafiltrationen wurden durch Dünnschichtchromatographie auf Reinheit untersucht, um die vollständige Entfernung von nicht umgesetztem FITC I sicherzustellen. Die Dünnschichtchromatographie wurde unter Verwendung von Silicagel 60-Platten (Merck) unter Verwendung eines Ethylacetat (100%)-Lösungsmittelsystems durchgeführt. Während das markierte Dendrimer am Ausgangspunkt zurückblieb, eluierte das verbleibende FITC I in der Nähe eines R_f-Wertes von 0,7. Ungefähr 2 ml an konjugiertem G 9 PAMAM-Dendrimer-FITC I wurden bei der Reinigung gewonnen.

B: Herstellung von PAMAM-Dendrimer, das an Fluoresceinisothiocyanat und IgG konjugiert ist.

[0461] Hasenimmunoglobulin (IgG, Sigma Chemical Co.), 9,8 mg, wurde in 1 ml an 30 mM Natriumacetat und 150 mM Natriumchlorid-Puffer (pH = 5,5) gelöst. Zu der IgG Lösung wurden 1,5 mg an Natriumperiodat unter vorsichtigem Rühren bis zur Auflösung zugegeben. Die Mischung wurde vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur vorsichtig für 15 bis 18 Stunden gerührt. Nach dem Rühren wurde die Reaktionsmischung in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 10 000 Dalton) gegeben und in 20 mM Phosphatpuffer mit pH = 6,0 (4 × 2 ml) ultrafiltriert. Ungefähr 1 bis 2 ml der IgG-Dialdehyd-Lösung wurden bei der Reinigung gewonnen.

[0462] Ein Aliquot der markierten Dendrimer-FITC I-Lösung aus Schritt A (0,88 ml, 17,6 mg, 0,075 µmol) wurden tropfenweise zu der IgG-Dialdehyd-Lösung zugegeben. (Dies entspricht ungefähr einem Verhältnis von 1,15:1 von markiertem Dendrimer zu Antikörper). Bei der Zugabe des ersten Tropfens der markierten Dendrimerlösung präzipitierte die Reaktionsmischung. Weitere 3 ml an 20 mM Phosphatpuffer (pH = 6,0) wurden zugegeben, wodurch die Feststoffe jedoch nicht aufgelöst wurden.

[0463] Das IgG/Dendrimer-FITC I-Konjugat wurde vor Licht geschützt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur rühren gelassen. Nach dieser Stunde wurden 1,7 mg an Natriumcyanoborhydrid zugegeben und die Reaktion wurde über Nacht (15 bis 20 Stunden) bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung war fluoreszierend orange und wies etwas Präzipitat auf. Das Reaktionsprodukt wurde einschließlich Präzipitat in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 100 000 Dalton) gegeben und ultrafiltriert. Während des Verfahrens wurden 6 mal weitere 2 ml Volumina des 20 mM Phosphatpuffers (pH = 6,0) zugegeben, um jegliches nicht gebundenes Dendrimer-FITC I zu entfernen. Das IgG/Dendrimer-FITC I-Konjugat wurde gewonnen und in ein Braunglas-Vial transferiert zur Lagerung bei –10°C.

Beispiel 30: Herstellung von IgG/Dendrimer-Dansyl-Konjugat.

A: Herstellung von G 9 PAMAM-Dendrimer-Dansyl-Konjugat.

[0464] Unter Verwendung von 200 µl der Dendrimer-Stammlösung, die in Beispiel 29A hergestellt wurde, und Zugabe von 800 µl an entionisiertem Wasser wurde die 60 mg/ml-Lösung hergestellt. Um die letztendliche Dendrimerkonzentration von 10 mg/ml zu erreichen, wurden 5 ml an 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 9,0) zu der 60 mg/ml-Lösung zugegeben.

[0465] Dansylchlorid (13,9 mg, 0,052 mmol, Aldrich Chemical Co.) wurde zu 5 ml Aceton zugegeben und für 5–10 min geschüttelt. (Diese Lösung wies eine tiefgelbe Farbe auf und es waren Spuren von Feststoff vorhanden.) Die Dansylchlorid-Lösung wurde innerhalb eines Zeitraums von 30 Sekunden zu der Dendrimer-Lösung zugegeben und der Reaktionskolben wurde für 90 min in ein Wasserbad bei 40°C gegeben. Während des Erwärmens wurde die Reaktionsmischung zeitweilig geschüttelt. Das Erscheinungsbild der Reaktionsmischung war leicht trüb und die Farbe verblasste von einem tiefen Gelb zu einem blassen Gelb. Nach 90 min wurde der Reaktionskolben aus der Wärme entnommen und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Die Reaktionsmischung wurde anschließend in einen Rotationsverdampfer gegeben, um im Vakuum bei 30–35°C das Aceton zu entfernen. Das Reaktionsprodukt wurde in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht

Cutoff: 100 000 Dalton) gegeben und ultrafiltriert, um jegliches nicht-gebundenes Dansylchlorid zu entfernen. Während der Ultrafiltration wurden zehnmal jeweils 2 ml an 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 9,0) zugegeben.

[0466] Die Ultrafiltrationen wurden durch Dünnschichtchromatographie auf Reinheit untersucht, um die vollständige Entfernung jeglichen nicht-umgesetzten Dansylchlorids zu gewährleisten. Die Dünnschichtchromatographie wurde unter Verwendung von Silicagel-60-Platten (Merck) unter Verwendung eines Ethylacetat (100%) Lösungsmittelsystems (Sichtbarmachen mit UV-Licht) durchgeführt. Während das markierte Dendrimer am Ausgangspunkt zurückblieb, eluierte das verbliebene Dansylchlorid in der Nähe eines R_f-Werts von 0,3. Ungefähr 1–2 ml an konjugiertem G 9 PAMAM-Dendrimer-Dansyl wurden bei der Reinigung gewonnen.

B: Herstellung von PAMAM-Dendrimer, welches an Dansyl und IgG konjugiert ist.

[0467] Hasenimmunoglobulin (IgG, Sigma Chemical Co.), 9,8 mg, wurde in 1 ml an 30 mM Natriumacetat und 150 mM Natriumchlorid-Puffer (pH = 5,5) gelöst. Zu der IgG-Lösung wurden 1,5 mg an Natriumperiodat unter vorsichtigem Rühren bis zur Auflösung zugegeben. Die Mischung wurde vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur vorsichtig für 15–18 Stunden gerührt. Nach dem Rühren wurde die Reaktionsmischung in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 100 000 Dalton) gegeben und in 20 mM Phosphatpuffer mit pH = 6,0 (4 × 2 ml) ultrafiltriert.

[0468] Ungefähr 1,9 ml der IgG-Dialdehyd-Lösung wurden bei der Reinigung gewonnen.

[0469] Ein Aliquot, 1,25 ml, der markierten Dendrimer-Dansyl-Lösung aus Schritt A (14,1 mg/ml) wurden tropfenweise zu der IgG-Dialdehyd-Lösung zugegeben. (Dies entspricht einem Verhältnis von 1,15:1 von markiertem Dendrimer zu Antikörper). Bei der Zugabe des ersten Tropfens der markierten Dendrimerlösung präzipitierte die Reaktionsmischung.

[0470] Das IgG/Dendrimer-Dansyl-Konjugat wurde vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur für 1 Stunde rühren gelassen. Nach dieser Stunde wurden 1,7 mg an Natriumcyanoborhydrid zugegeben und die Reaktion wurde über Nacht (15–20 Stunden) bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsprodukt, einschließlich des Präzipitats, wurde in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 100 000 Dalton) gegeben und ultrafiltriert. Während des Verfahrens wurden sechsmal weitere 2 ml-Volumina des 20 mM Phosphatpuffers (pH = 6,0) zugegeben, um jegliches nicht-gebundenes Dendrimer-Dansyl zu entfernen. Das IgG/Dendrimer-Dansyl-Konjugat wurde gewonnen und in ein Baunglasvial transferiert zur Lagerung bei –10°C.

Beispiel 31: Herstellung von PAMAM-Dendrimer, das an HRP und IgG konjugiert ist.

A: Herstellung von an IgG konjugiertem PAMAM-Dendrimer.

[0471] Hasenimmunoglobulin (IgG, Sigma Chemical Co.), 9,6 mg, wurde in 1 ml an 30 mM Natriumacetat und 150 mM Natriumchlorid-Puffer (pH = 5,5) gelöst. Zu der IgG-Lösung wurden 1,5 mg an Natriumperiodat gegeben, wobei bis zur Auflösung vorsichtig gerührt wurde. Die Mischung wurde vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur für 15–18 Stunden vorsichtig gerührt. Nach dem Rühren wurde die Reaktionsmischung in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 100 000 Dalton) gegeben und sie wurde in 20 mM Phosphatpuffer mit pH = 6,0 (4 × 2 ml) ultrafiltriert. Ungefähr 1,5 ml der IgG-Dialdehyd-Lösung wurden bei der Reinigung gewonnen.

[0472] Ein Aliquot, 100 µl, der Dendrimer-Stammlösung aus Schritt A von Beispiel 29 wurde zu 100 µl entionisiertem Wasser zugegeben, um eine 150 mg/ml Lösung zu ergeben.

[0473] Eine letztendliche Konzentration von 15 mg/ml wurde durch weitere Verdünnung von 100 µl der Dendrimerlösung mit 900 µl an entionisiertem Wasser erhalten. Die letztendliche Dendrimerlösung, 1 ml, wurde tropfenweise zu der IgG-Dialdehyd-Lösung zugegeben und die Mischung wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Es bildete sich ein Präzipitat. Nach dieser Stunde wurden 1,7 mg an Natriumcyanoborhydrid zugegeben und die Reaktion wurde über Nacht (15–20 Stunden) bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsprodukt, einschließlich des Präzipitats, wurde in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 100 000 Dalton) gegeben und ultrafiltriert. Während des Verfahrens wurden viermal weitere 2 ml Volumina des 20 mM Phosphatpuffers (pH = 6,0) zugegeben, um jegliches nicht-gebundenes Dendrimer-IgG zu entfernen. Das IgG-Dendrimer-Konjugat wurde gewonnen und in ein 2-Dram-Vial transferiert.

B: Herstellung von PAMAM-Dendrimer/IgG-HRP-Konjugat.

[0474] Merrettichperoxidase (HRP, 2,6 mg, Pierce) wurde in 0,5 ml entionisiertem Wasser gelöst, um die HRP-Lösung zu bilden. Natriumperiodat, 10,7 mg, wurde in 5 ml an 10 mM Natriumphosphat (pH = 7,0) gelöst. Ungefähr 1,6 ml der Periodatlösung wurde bei Raumtemperatur zu der HRP-Lösung zugegeben. Die Enzymreaktionsmischung wurde vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur für 30 min vorsichtig gerührt. Das oxidierte HRP-Produkt wurde in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 10 000 Dalton) gegeben und ultrafiltiert. Während des Verfahrens wurden viermal weitere 2 ml Volumina des Natriumacetat/150 mM Natriumchlorid-Puffers (pH = 5,5) zugegeben.

[0475] Die oxidierte Enzymlösung wurde unter Rühren zu der PAMAM-Dendrimer-IgG-Konjugatmischung zugegeben. Obwohl das Präzipitat in der Reaktion verblieb, wurde die Mischung für 2 Stunden bei Raumtemperatur rühren gelassen. Nach den 2 Stunden wurden 2,1 mg an Natriumborhydrid in 1 ml entionisiertem Wasser gelöst und 100 µl der Borhydrid-Lösung wurden zu der PAMAM-Dendrimer-IgG-HRP-Mischung zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht (15–20 Stunden) bei 2–8°C gerührt.

[0476] Das Reaktionsprodukt, einschließlich des Präzipitats, wurde in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 100 000 Dalton) gegeben und ultrafiltiert. Während des Verfahrens wurden viermal weitere 2 ml Volumina des 20 mM Phosphatpuffers (pH = 6,0) zugegeben. Das IgG/Dendrimer/HRP-Konjugat wurde gewonnen und in ein 2-Dram-Vial gegeben zur Lagerung bei –10°C.

Beispiel 32: Herstellung von IgG/dansyliertes PAMAM-Dendrimer/HRP-Konjugat.

A: Herstellung von HRP-Lösung.

[0477] Merrettichperoxidase (HRP, 2,6 mg, Pierce) wurde in 0,5 ml entionisiertem Wasser gelöst, um die HRP-Lösung zu bilden. Natriumperiodat, 10,7 mg, wurde in 5 ml an 10 mM Natriumphosphat (pH = 7,0) gelöst. Ungefähr 1,6 ml der Periodatlösung wurden bei Raumtemperatur zu der HRP-Lösung zugegeben. Die Enzymreaktionsmischung wurde vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur für 30 min vorsichtig gerührt. Das oxidierte HRP-Produkt wurde in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 10 000 Dalton) gegeben und ultrafiltiert. Während des Verfahrens wurden viermal weitere 2 ml-Volumina des 30 mM Natriumacetat/150 mM Natriumchlorid-Puffers (pH = 5,5) zugegeben. Die oxidierte Enzymlösung wurde gewonnen und in 2-Dramglasvials gegeben.

B: Herstellung von Dansyl G 4 PAMAM-Dendrimer-Lösung.

[0478] 5 ml einer methanolischen Lösung von 12,7% (w/w) an G 4 (NH_3) PAMAM-Dendrimer (NH_3-Kern)-Lösung wurden hergestellt und im Vakuum an einem Rotationsverdampfer getrocknet. Ungefähr 40 mg (7,4 µmol) des getrockneten Dendrimers wurden entnommen und in 5 ml an 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 9,0) gelöst.

[0479] Eine Menge von 10 mg (0,037 mmol) an Dansylchlorid wurde zu 5 ml Aceton zugegeben und für 5–10 min geschüttelt. Die Lösung war tiefgelb und wies Spuren von Feststoff auf. Die Dansylchlorid-Lösung wurde zu der Dendrimerlösung innerhalb eines Zeitraums von 30 Sekunden zugegeben und der Reaktionskolben wurde für 90 min in einer Wasserbad bei 40°C gegeben. Während des Erwärmens wurde die Reaktionsmischung zeitweise geschüttelt. Die Farbe der Lösung war ein blasses Gelb. Nach den 90 min wurde der Reaktionskolben aus der Wärme entnommen und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Die Reaktionsmischung wies eine leicht trübe Erscheinung auf.

[0480] Um das Aceton zu entfernen, wurde die Reaktionslösung unter Verwendung eines Rotationsverdampfers im Vakuum bei 30–35°C eingedampft. Die Lösung klärte sich durch dieses Verfahren auf. Die Reaktionsmischung wurde anschließend in zwei Zentrifugengefäße transferiert und bei 5000 Upm für 30 min zentrifugiert. Die Dendrimerlösung wurde anschließend in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 3000 Dalton) gegeben und viermal von einem Volumen von 2 ml ultrafiltiert, um jegliches nicht-gebundenes Dansylchlorid zu entfernen. Ungefähr 1–2 ml der Lösung des dansyliertem Dendrimerprodukts wurden gewonnen.

C: Herstellung von IgG/Dansyl G 4 PAMAM-Dendrimer-Lösung.

[0481] Eine Menge von 6,9 mg an Hasenimmunoglobulin (IgG) wurde in 1 ml an 50 mM Phosphatpuffer (pH = 7,2) gelöst. Eine Menge von 14,8 mg an Natriumperiodat wurde zugegeben und die Mischung wurde gerührt,

bis sich die Feststoffe aufgelöst hatten. Die Mischung wurde vor Licht geschützt und für weitere 30 min bei Raumtemperatur gesrührt. Die Lösung wurde anschließend in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 3000 Dalton) gegeben und viermal von einem Volumen von 2 ml ultrafiltiert, wobei jedesmal 50 mM Phosphatpuffer (pH = 7,2) verwendet wurden, um die Entfernung jeglichen nicht-umgesetzten Natriumperiodats zu gewährleisten. Ungefähr 1 ml der Dialdehyd-Lösung wurde gewonnen und zur Vorbereitung der Kopplung mit den dansylierten Dendrimer in ein Vial transferiert.

[0482] Ein Aliquot des markierten Dansyldendrimers aus Teil B wurde von der Stammlösung entnommen und auf eine endgültige Dendrimerkonzentration von 3,0 mg/ml verdünnt. Ein Volumen von 100 µl des verdünnten dansylierten Dendrimers wurde zu der IgG-Dialdehyd-Lösung zugegeben und dispergiert. Dies stellt ein Verhältnis von ungefähr 1,2:1 von markiertem Dendrimer zu IgG dar.

[0483] Das IgG/dansyliertes Dendrimer-Konjugat wurde vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur für 1 Stunde rühren gelassen. Nach dieser Zeit wurden 1,4 mg an Natriumcyanoborhydrid zugegeben und die Reaktion wurde über Nacht (15–20 Stunden) bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wies eine klare Erscheinung auf. Eine Elektrophoreseprobe, 200 µl, wurde entnommen und der Rest der Lösung wurde anschließend in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 100 000 Dalton) gegeben und ultrafiltiert. Während des Verfahrens wurden viermal weitere 2 ml Volumina des 50 mM Phosphatpuffers (pH = 7,2) zugegeben, um jegliches nicht-gebundenes Dansyldendrimer zu entfernen. Das gewünschte Konjugat wurde gewonnen.

D: Herstellung von G 4 PAMAM-Dendrimer/Dansyl/IgG-HRP-Konjugat.

[0484] Zu 650 µl (10,1 mg) der IgG/Dansyl G 4 PAMAM-Dendrimerlösung (hergestellt in Teil C) wurden 2,6 mg des oxidierten HRP zugegeben. Das IgG/Dansyl-Dendrimer/HRP-Konjugat wurde vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur für 2 Stunden rühren gelassen. Nach 1 Stunde wurden 2,1 mg an Natriumborhydrid in 1 ml entionisiertem Wasser gelöst und 100 µl der Borhydrid-Lösung wurden zu der PAMAM-Dendrimer-IgG-HRP-Mischung zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht (15–20 Stunden) bei 2–8°C gerührt. Die Mischung war eine klare bernsteinfarbene Flüssigkeit.

[0485] Das Reaktionsprodukt wurde in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 100 000 Dalton) gegeben und ultrafiltiert. Während des Verfahrens wurden viermal weitere 2 ml Volumina des 20 mM Phosphatpuffers (pH = 6,0) zugegeben. Das IgG/Dansyl/Dendrimer/HRP-Konjugat wurde gewonnen und in ein Braunglasvial transferiert zur Lagerung bei –10°C.

E: Charakterisierung von G 4 PAMAM-Dendrimer/Dansyl/IgG/HRP-Konjugat.

[0486] Aliquote der IgG/Dendrimer/HRP-Konjugate wurden unter Verwendung von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) auf die Gegenwart von HRP-Enzym untersucht. HRP katalysiert die Wasserstoffperoxidoxidation von Substraten wie beispielsweise TMB, indem Elektronen von dem TMB auf das Peroxid übertragen werden, um ein farbiges Produkt zu ergeben. Daher führt der Verlust eines Elektrons zu einer blauen Farbe und der Verlust von zwei Elektronen ergibt eine gelbe Farbe.

[0487] Die folgenden Dendrimer/Dansyl/IgG-HRP-Konjugate wurden hergestellt, um die Gegenwart von HRP-Enzym zu bestätigen:

(1) 0,1 mg/ml IgG/Dansyl G 4 PAMAM-Dendrimer
(2) 0,1 mg/ml IgG/Dansyl G 4 PAMAM-Dendrimer/HRP
(3) 0,1 mg/ml IgG/G 9 PAMAM-Dendrimer/HRP
(4) Ultrafiltrat von IgG/G 9 PAMAM-Dendrimer/HRP mit ungebundenem HRP

[0488] Die TMB-Substrat-Lösung wurde unter Verwendung von TMB-Dihydrochlorid hergestellt. Jede der obigen verdünnten Proben, 200 µl, wurde zu 200 µl an TMB-Substrat-Lösung zugegeben. Die beiden HRP-Konjugate (#2 und #3) verfärbten sich sofort grün, anschließend gelb. Das Ultrafiltrat (#4) wurde leuchtend gelb. Das IgG/Dendrimer (#1) blieb farblos. Alle vier Proben wurden bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert und anschließend mit 200 µl an 1 N Schwefelsäure gequencht. Die gelbe Farbe der Enzymkonjugate (#2 und #3) wurde intensiver. Das IgG/Dendrimer (#1) war leicht grün und zeigte unter UV-Licht Fluoreszenz.

[0489] Allquote von allen Konjugaten wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Probenkonzentrationen von ungefähr 1 mg/ml wurden für die Elektrophorese hergestellt, was ungefähr 10 µg an Elektrophoreseprobe entspricht. Ein Amicon Gradipore™ (Hylinx) 5–50% T Gradientgel wurde in Kombination mit 0,05

M Natriumacetatpuffer (0,025% in Natriumazid) mit pH = 4,0 verwendet. Das Gel wurde bei einer konstanten Spannung von 200 Volt für 2 Stunden betrieben. Konjugate, die Präzipitate enthielten, wurden vor der Elektrophoreseanalyse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetrennt und für die Elektrophorese verwendet. Die folgenden Proben wurden untersucht:

(1) G 9 PAMAM-Dendrimer
(2) dansyliertes G 9 PAMAM-Dendrimer
(3) G 9 PAMAM-Dendrimer-FITC I
(4) IgG (Kontrolle)
(5) IgG/Dansyl G 9 PAMAM-Dendrimer
(6) IgG/G 9 PAMAM-Dendrimer-FITC I
(7) IgG/G 9 PAMAM-Dendrimer/HRP
(8) HRP (Kontrolle)
(9) IgG/Dansyl G 4 (NH_3) PAMAM-Dendrimer/HRP
(10) offen
(11) Wiederholung von #7
(12) Wiederholung von #9

[0490] Vor dem Anfärben wurde das Gel unter UV-Licht gegeben, um Fluoreszenz zu identifizieren. Nur die Proben #2, #3 und #6 zeigten Fluoreszenz.

[0491] Das Sichtbarmachen auf dem Gel im Anschluss an TMB, jedoch vor Anfärben zeigte ein Vorliegen der Proben #7, #8, #9, #11 und #12 und bestätigte die Gegenwart von Enzym bei höheren Molekulargewichten auf dem Gel.

[0492] Das Gel wurde anschließend mit 0,025% Coomassie Blue Stain über Nacht in 5%iger Essigsäure und 7%igem Methanol angefärbt. Probe #10 war die einzige nicht gefärbte Linie auf dem Gel. Die Proben #4 und #8 waren bei den niedrigeren Molekulargewichten. Alle anderen Proben zeigten höhere Molekulargewichte, ohne dass irgendwelche niedrigeren Molekulargewichte vorlagen.

Beispiel 33: Herstellung von G 6 PAMAM-Dendrimer/Dichlortriazinylfluorescein.

[0493] G 6 (EDA) PAMAM-Dendrimer, 300 µl (21,5% Feststoffe) wurde zu 700 µl an entionisiertem Wasser zugegeben und dispergiert (64,5 mg, 2,24 µmol). Das Dendrimer wurde mit 4 ml entionisiertem Wasser weiter verdünnt auf eine Konzentration von 12,9 mg/ml.

[0494] Dichlortriazinylfluorescein-Hydrochlorid DTAF I (erhältlich von Sigma), 6,0 mg (11,3 µmol) wurde im Dunkeln in 0,5 ml Methanol aufgelöst und es wurden zwei Tropfen Triethylamin zugegeben. Die DTAF I-Lösung wurde innhalb von 30 Sekunden tropfenweise zu der gerührten Dendrimerlösung zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur für 15–20 Stunden gerührt. Die Lösung blieb während der Reaktion klar und orange. Nach dem Rühren wurde die Reaktionsmischung in zwei Centricon-™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 10 000 Dalton) gegeben und ultrafiltiert, um jegliches nicht umgesetztes DTAF I zu entfernen. Während des Verfahrens wurden fünfzehn mal 2 ml Volumina an 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 9,0) zugegeben. Ungefähr 3 ml an konjugiertem G 6 (EDA) PAMAM-Dendrimer/DTAF I wurden gewonnen.

Beispiel 34: Herstellung von G 5,5 PAMAM-Dendrimer/Aminomethylfluorescein.

[0495] G 5,5 (NH_3) PAMAM-Dendrimer, 1 ml Lösung (4,2% Feststoffe, 42 mg, 1,7 µmol) wurde zu einem 2-Dram-Vial zugegeben.

[0496] In einem separaten Vial wurden 6,6 mg (1,7 µmol) an 4-Aminomethylfluorescein (AMF) in 0,5 ml entionisiertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde auf 9 eingestellt, indem 2 Tropfen Triethylamin zugegeben wurden.

[0497] In einem dritten Vial wurden 63,8 mg an 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC) in 1 ml entionisiertem Wasser gelöst.

[0498] Die AMF-Lösung wurde innerhalb von 1–2 min bei Raumtemperatur zu der gerührten Dendrimerlösung zugegeben. Der pH-Wert der Dendrimer-AMF-Lösung wurde unter Verwendung von 1 N Salzsäure auf 4,5–5,5 eingestellt. Die Lösung blieb klar. Unter kontinuierlichem Rühren wurde die Mischung zu der EDAC-Lö-

sung in Portionen von 200–300 µl in 15–20 min-Intervallen innerhalb einer Stunde zugegeben. Der pH-Wert der Reaktionsmischung wurde unter Verwendung von 1 N Salzsäure zwischen 4,5 und 5,5 gehalten. Die Reaktionsmischung wurde vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur für 15–20 Stunden gerührt. Die Lösung war klar und orange.

[0499] Nach dem Rühren wurde die Reaktionsmischung in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 10 000 Dalton) gegeben und ultrafiltiert, um jegliches nicht umgesetztes AMF zu entfernen. Während des Verfahrens wurden fünfzehn mal Volumina von jeweils 2 ml an 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 9,0) zugegeben. Ungefähr 2 ml an konjugiertem G 5,5 PAMAM-Dendrimer/AMF wurden gewonnen.

Beispiel 35: Herstellung von 3,0 Generation PAMAM/Isatonsäureanhydrid-Konjugat.

[0500] Generation 3,0 PAMAM, 2 g, wurde in Methanol gelöst und in einem Eisbad gekühlt. Zu dieser Lösung wurden 0,01 g an Isatonsäureanhydrid zugegeben. Die Mischung wurde für 2 Stunden gerührt, das Bad wurde auf Raumtemperatur erwärmen gelassen und es wurde für mehrere Tage weiter gerührt. Das Methanol wurde anschließend durch Rotationsverdampfen entfernt und das Produkt wurde in Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde anschließend dialysiert unter Verwendung einer Spectrapor #1-Membran. Die Lösung wurde anschließend auf 38 ml konzentriert und ihr Fluoreszenzspektrum wurde unter Bestrahlung mit 340 nm und Detektion bei 420 nm aufgenommen. Die Fluoreszenz war nach einer 10 000fachen Verdünnung noch detektierbar und die Antwort war für Verdünnungen von 100 und 1000 linear.

Beispiel 36: Herstellung von 4,0 Generation PAMAM-Dendrimer/DTPA/Gd-Konjugat.

A: Herstellung eines 4,0 Generation PAMAM-Dendrimers mit Methylester-Endgruppen

[0501] Ein 3,5 Generation PAMAM-Dendrimer mit Methylesterendgruppen wurde hergestellt durch aufeinanderfolgende Reaktion mit Methylacrylat und Ethylendiamin. Anschließend wurden zu 1000 g an vordestilliertem Ethylendiamin ungefähr 5 g eines 3,0 Generation PAMAM-Dendrimers mit Methylesterendgruppen als eine 15 Gew.-%ige Lösung in Methanol zugegeben. Die Lösung wurde für 48 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Methanol und der größte Teil des überschüssigen Ethylendiamins wurden durch Rotationsverdampfen im Vakuum bei einer Temperatur von weniger als 60°C entfernt. Insgesamt wurden ungefähr 7,5 g Produkt gewonnen. Um eingefangenes Ethylendiamin zu entfernen, wurde das Produkt in 100 ml Methanol gelöst und in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 2000 Dalton) ultrafiltiert. Als die Lösung größtenteils durch die Membran gelangt war, wurden mehrere weitere Portionen an Methanol zugegeben und der Ultrafiltrationsprozess wurde wiederholt. Das Retentat wurde in einen Rundkolben transferiert und der Filterbehälter wurde wiederholt mit Methanol gespült und mit dem Retentat vereinigt. Flüchtige Lösungsmittel wurden durch Rotationsverdampfen im Vakuum aus der Retentatlösung entfernt. Ungefähr 6 g an 4,0 Generation PAMAM (MW 5147 Dalton, 24 terminale Aminogruppen) wurde gewonnen.

B: Herstellung von 4,0 Generation PAMAM-Dendrimer/DTPA-Anhydrid-Konjugat

[0502] Eine Lösung von PAMAM (4 g, $7{,}6 \times 10^{-4}$ mol) in 300 ml Wasser wurde in einem Dreihalskolben gerührt. Innerhalb der nächsten Stunde wurden portionsweise 29 g (72×10^{-3} mol) des Feststoffs N^3-(2,6-Dioxomorpholinethyl)-N^6-ethoxycarbonylmethyl-3,6-diazaoctandisäure (DTPA-Anhydrid) zugegeben. Während der Zugabe wurde der pH-Wert durch Zugabe von 1 N wässriger Natriumhydroxid-Lösung bei 8,8–9,2 gehalten. Nach Beendigung der Zugabe wurde die Lösung für weitere 30 min gerührt. Der pH-Wert der Lösung wurde durch die Zugabe eines Ionenaustauschharzes (H^+-Form) auf einen pH-Wert von 7 eingestellt, und die resultierende Aufschlämmung wurde unter Saugen abfiltriert, um das Ionenaustauschharz zu entfernen. Das Filtrat wurde in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 5000 Dalton) transferiert und ultrafiltiert. Das Filtrat wurde gesammelt und gefriergetrocknet. Die Ausbeute war ungefähr 12 g eines farblosen flockigen Pulvers. Das Produkt war ein Polyamidoamid (24 terminate Aminogruppen), bei dem jeder Terminus über eine Amidbindung an eine der Carboxylgruppen von DTPA gebunden ist.

C: Herstellung von 4,0 Generation PAMAM-Dendrimer/DTPA/Gd-Konjugat

[0503] Ungefähr 10 g des oben beschriebenen Chelatierungsmittels wurden in 600 ml Wasser gelöst und mit 2,8 g Gd_2O_3 gemischt. Die Aufschlämmung wurde für ungefähr 90 min bei 80°C gerührt. Nach Kühlen auf Raumtemperatur wurde der pH-Wert der Lösung durch die Zugabe eines Ionenaustauschharzes auf 7 eingestellt. Die resultierende Aufschlämmung wurden unter Saugen filtriert, um das Ionenaustauschharz zu entfernen. Das Filtrat wurde in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 5000 Dalton)

transferiert und ultrafiltiert. Das Filtrat wurde gesammelt und gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug ungefähr 12 g an farblosem flockigem Lyophilisat, das gemäß atomabsorptionsspektroskopischer Analyse Gd enthielt.

Beispiel 37: Herstellung eines 3,0 Generation, Amino-terminierten Dendrimer/DTPA/Gd-Konjugats.

A: Herstellung eines 3,0 Generation-Dendrimers mit Hydroxyendgruppen.

[0504] Ein 3,0 Generation Hydroxy-terminiertes Dendrimer wurde aus Pentaerythrityltetrabromid und 4-Hydroxymethyl-2,6,7-trioxabicyclo[2,2,2]octan wie von Tomalia et al. in US-Patent 4,587,329, Beispiel 11 beschrieben, hergestellt. Gemäß der Vorgehensweise von Schritt C von Beispiel 11 von US-Patent 4,587,329 wurde das zweite Generation Hydroxy-terminierte Polyether-Dendrimer in das entsprechende Perbromid umgewandelt. Anschließend wurde gemäß der Vorgehensweise der Schritte A und B dieses Beispiels das Bromid-Derivat von Schritt C zunächst mit einem 4-Hydroxymethyl-2,6,7-trioxabicyclo[2,2,2]octan zur Reaktion gebracht und anschließend mit Wasser demaskiert, um das gewünschte dritte Generation-Dendrimer zu bilden.

B: Herstellung eines 3,0 Generation-Dendrimers mit Chloridendgruppen

[0505] Ein 500 ml Dreihalskolben, ausgerüstet mit einem Rührer, Kondensierer und Zugabetrichter wird mit 0,1 mol des dritte Generation Dendrimers aus Teil A beladen und es werden 15 mol an frisch destilliertem Thionylchlorid mit einer solchen Rate zugegeben, um die Temperatur unter 45°C zu halten. Nach Beendigung der Zugabe wird die Lösung auf ungefähr 50°C erwärmt und für ungefähr 4 Stunden bei dieser Temperatur gehalten. Das überschüssige Thionylchlorid wird im Vakuum entfernt. Durch dieses Verfahren werden die Hydroxygruppen in Chloridgruppen umgewandelt.

C: Herstellung eines 3,0 Generation-Dendrimers mit Aminoendaruppen

[0506] Das Chlorid-terminierte Dendrimer aus Teil B wurde in eine große Polyolefinflasche transferiert und ein großer Überschuss einer Ammoniumhydroxid-Lösung wurde zugegeben. Die Flasche wurde versiegelt und die Inhaltsstoffe wurden bei ungefähr 55°C für mehrere Tage gelagert. Die Lösung bildete ein restliches Öl, welches in einem kleinen Volumen von Wasser wieder aufgelöst wurde, der pH-Wert wurde durch Zugabe von Natriumbicarbonat auf 8 eingestellt und das gewünschte Amin wurde mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformextrakte wurden über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und auf ein restliches Öl konzentriert. Durch dieses Verfahren wurde das Chlorid-terminierte Dendrimer in ein Amino-terminiertes Dendrimer umgewandelt.

D: Herstellung eines 3,0 Generation-Dendrimers mit Aminoendaruppen

[0507] Alternativ wurde das Hydroxy-terminierte Dendrimer aus Teil A in Dimethylformamid gelöst und mit einem Überschuss an Methansulfonylchlorid zur Reaktion gebracht. Der resultierende Tosylatester wurde durch Verdünnen des Dimethylformamids mit Wasser und Extraktion mit Chloroform isoliert. Die Chloroformextrakte wurden mit verdünnter Natriumbicarbonat-Lösung und mit Wasser gewaschen, und anschließend über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration, um jegliche Feststoffe zu entfernen, wurde das Filtrat zur Trockene konzentriert. Das restliche Öl, der gewünschte Polysulfonatester wurde ohne weitere Reinigung verwendet, es wurde in eine große Polyolefinflasche transferiert und ein großer Überschuss an Ammoniumhydroxid-Lösung wurde zugegeben. Die Flasche wurde verschlossen und die Inhalte wurden bei ungefähr 55°C für mehrere Tage gelagert. Das Amino-terminierte Dendrimer wurde, wie oben in Teil C beschrieben, isoliert.

E: Herstellung eines 3,0 Generation Amino-terminierten Dendrimer/DTPA-Konjugats

[0508] Ein gemischtes Anhydrid von DTPA wurde durch Umsetzung von Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) und Isobutylchlorformiat hergestellt. Das Anhydrid (1 mol) wurde in Dimethylformamid aufgelöst und die Lösung wurde zu einer Lösung von Amino-terminiertem Dendrimer (entweder aus Teil C oder D) in demselben Lösungsmittel zugegeben. Zu der Lösung wurde nach Bedarf 2,6-Lutidin zugegeben, um eine basische Umgebung beizubehalten. Auf diese Weise wurden kovalente Bindungen zwischen dem Aminoterminus des Dendrimers und der Carboxylgruppe von DTPA gebildet.

F: Herstellung eines 3,0 Generation Amino-terminierten Dendrimer/DTPA-Konjugats

[0509] Alternativ wurde 1 mmol eines Amino-terminierten Dendrimers (entweder aus Teil C oder D) in 300 ml

Wasser gelöst. Innerhalb von 2 Stunden wurden 150 mmol der festen Form von N^3-(2,6-Dioxomorpholinoethyl)-N^6-ethoxycarbonylmethyl-3,6-diazaoctandisäure portionsweise zu der Lösung zugegeben. Der pH-Wert wurde durch die Zugabe von 1 N Natriumhydroxid bei ungefähr 9,0 gehalten. Die Lösung wurde für weitere 30 min gerührt, der pH-Wert wurde mit einem Ionenaustauschharz (H^+) auf 7,0 eingestellt und anschließend wurde die Lösung filtriert, um das Ionenaustauschharz zu entfernen. Die Lösung wurde in zwei Centricon™-Mikrokonzentratorgefäße (Molekulargewicht Cutoff: 5000 Dalton) gegeben und ultrafiltiert. Das Filtrat wurde gesammelt und gefriergetrocknet. Das DTPA-konjugierte Dendrimer wurde als farbloses flockiges Pulver erhalten.

G: Herstellung eines 3,0 Generation Amino-terminierten Dendrimer/DTPA/Gd-Konjugats

[0510] Ungefähr 10 g des DTPA-konjugierten Dendrimers wurden in 600 ml Wasser zur Injektion gelöst und mit ungefähr 3 g an Gd_2O_3 gemischt. Die Aufschlämmung wurde für ungefähr 90 min bei 80°C gerührt. Nach Abkühlen wurde der pH-Wert der Lösung durch die Zugabe eines Ionenaustauschharzes auf 7 eingestellt. Die Lösung wurde filtriert, um das Harz zu entfernen und anschließend, wie oben beschrieben, ultrafiltiert. Das Filtrat wurde gesammelt und gefriergetrocknet. Das Gd/DTPA-konjugierte Dendrimer wurde als farbloses flockiges Lyophilisat erhalten, welches gemäß Atomabsorptionsspektroskopieanalyse Gd enthielt.

Beispiel 38: 0-valentes Nickel in Dendrimeren.

[0511] Zu 10 g an 1%igem $NiCl_2$ (wäsrig) wurden 177 mg Generation 0,5 Diethylentriamin (DETA) Kern STARBURST™-Dendrimer (Natriumsalzform) zugegeben. Die Lösung wurde blassblau. Zu dieser Lösung wurden 0,5 ml an 28%igem wässrigem Ammoniumhydroxid zugegeben, wodurch die Lösung dunkler blau wurde. Die Zugabe von 12 g an 2,78%igem wässrigem Natriumhypophosphit zu der Lösung und anschließendes Erwärmen zum Siedepunkt ergab ein Präzipitat von Nickelmetall mit einer überstehenden blauen Lösung. Der Überstand wurde im Vakuum konzentriert, um das metallisierte Dendrimer als eine Mischung mit überschüssigen Phosphiten (0,6 g) zu ergeben. Die Reinigung wurde durch Ultrafiltration an einer Hohlfaser-Filtrationseinheit (The Dow Chemical Company) durchgeführt.

[0512] (Eine Kontrollreaktion, die auf dieselbe Weise wie oben durchgeführt wurde, außer dass kein Dendrimer zugegeben wurde, ergab nach Sieden eine farblose Lösung mit vollständiger Präzipitation von Nickelmetall).

Beispiel 39: 0-valentes Nickel in Dendrimeren.

[0513] Zu 10 g an 1%igem wässrigem $NiCl_2$ wurden 270 mg an Generation 1,5 linearem Polyethylenimin (PEI) Kern STARBURST™-Dendrimer (Natriumcarboxylatform) zugegeben. Die Lösung wurde dunkler grün als die Kontrollmischung (kein STARBURST™ zugegeben). Nach Zugabe von 0,5 ml an konzentriertem Ammoniumhydroxid war die Kontrolle blau und die STARBURST™-haltige Lösung war noch immer grün. Zugabe von 12 g an 2,78%igem wässrigem Natriumhypophosphit und Erwärmen zum Siedepunkt bewirkte in der Kontrolle die Präzipitation von schwarzem Nickelmetall und ergab eine farblose Lösung. Die STARBURST™-haltige Lösung ergab unter denselben Bedingungen eine blassgrüne Suspension. Die blassgrüne Suspension wurde zentrifugiert, um eine kleine Menge an Feststoffen (50 mg) zu entfernen und sie wurde im Vakuum konzentiert, um 500 mg an blassgrünem Pulver zu ergeben. Ultrafiltration einer wässrigen Lösung dieser Mischung von metallisiertem Dendrimer und Phosphiten unter Verwendung einer Amicon™ YM2-Membran wurde solange fortgeführt, bis in dem Filtrat keine grüne Farbe mehr erkannt wurde. Das Konzentrieren der grünen Retentatlösung im Vakuum ergab ungefähr 100 mg eines dunkelgrünen Glases.

Beispiel 40: Herstellung von mit Epoxyoctan modifiziertem Generation 5,0 PAMAM-Dendrimer

[0514] Generation 5,0 PAMAM-Dendrimer, 0,30 g (2,7 meq) wurde in 10 ml Methanol gelöst. Epoxyethan, 0,5 g (Aldrich, 3,9 mmol) wurde zu der Lösung zugegeben. Die Lösung wurde anschließend in einem Ölbad für 3 Tage auf 40°C erwärmt. Das Lösungsmittel wurde durch Destillation im Vakuum entfernt, anschließend wurde der Rückstand bei Raumtemperatur im Hochvakuum von flüchtigen Stoffen befreit, um 0,60 g (93% der Theorie) des modifizierten Dendrimers als ein farbloses Öl zu ergeben. Die ^{13}C- und ^1H-NMR-Spektren zeigten eine Bindung durch Epoxyoctan an der Oberfläche in Übereinstimmung mit der Assoziierung des Epoxyethan-Dendrimers.

[0515] Wenn die obige Vorgehensweise unter Verwendung von Generation 2,0, 3,0, 4,0, 6,0 oder 7,0 PAMAM-Dendrimer wiederholt wurde, wurde das entsprechende Konjugat gebildet.

Beispiel 41: Herstellung eines mit Abscisinsäure modifizierten Generation 4,5 PAMAM-Dendrimers.

[0516] Eine wässrige Lösung eines Generation 4,5 PAMAM-Dendrimers wurde mit NaOH/MeOH (1 mmol, 10 ml) hydrolysiert und der pH-Wert wurde mit NaOH/HCl auf 11 eingestellt. Zu der Lösung wurde ein großer Überschuss an fester Abscisinsäure zugegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur heftig gerührt. Nach 1, 2, 6 und 24 Stunden wurden 500 µl der Lösung in ein Eppendorfgefäß (1,5 ml Mikrozentrifugengefäß) entnommen und jegliche nicht-aufgelöste Abscisinsäure wurde durch Zentrifugation bei 15 000 Upm für 1 min entfernt. Die Abscisinsäurekonzentration wurde aus der Absorption des Überstandes berechnet (λ = 260 nm, ε = 19 400).

[0517] Wenn die Vorgehensweise unter Verwendung verschiedener Generationen von PAMAM-Dendrimeren wiederholt wurde, so wurde, je höher die Generation war, umso mehr Abscisinsäure aufgelöst. Die Generation 5- und 6-Dendrimere lösten mehr der Säure als die Generation 4. Bei pH = 7 listen sich nur 0,004 M der Abscisinsäure in Wasser und β-CD-Lösung, während die Dendrimerlösungen 0,02–0,08 M auflösten. Die Dendrimere halber Generationen lösten dieselbe Menge an Säure wie die ganzer Generationen. Es wird daher angenommen, dass die Abscisinsäure im Inneren des Dendrimers aufgenommen wird.

[0518] Wenn die obige Vorgehensweise mit Nifedipin wiederholt wurde (ε = 8 300 in Chloroform), so dauerte es lange Zeit, bis sich das Nifedipin in Wasser auflöste, sobald es einmal gelöst war, wurde es jedoch sehr schnell in dem Dendrimer aufgenommen.

Protokoll für die Dendrimer-Dextran-Transfektion

[0519] Das Protokoll für die Transfektion ist grundsätzlich wie folgt:

Tag 1:

[0520] Bepflanzen von 6-Well-Platten mit ungefähr 200 000 Zellen pro Well (abhängig von den Wachstumsmerkmalen).

Tag 2:

Schritt 1: Herstellen der folgenden Lösungen:

A. Dendrimerverdünnungspuffer

20 mM HEPES pH = 7,9
100 mM KCl
0,2 mM EDTA
0,5 nM DTT
20% (v/v) Glycerin

B. 10 × Bindungspuffer

10 mM EDTA
40% (v/v) Glycerin
50 mM DTT
100 mM TRIS HCl pH = 7,5
1000 mM NaCl
Mischen und Filter sterilisieren

C. Lösung 1 (in manchen Beispielen verwendet)

25 mg DEAE-Dextran (Pharmacia oder Sigma Chemical)
5,0 ml 1 M TRIS pH = 7,4
95 ml serumfreies DMEM
Mischen bei 37°C im Schüttler für 30 min, Filter sterilisieren (1 ml Lösung 1 wird pro Well benötigt)

D. Lösung 2 (in manchen Beispielen verwendet)

10% DMSO in PBS pH = 7,4
Mischen und Filter sterilisieren (2 ml an Lösung 2 werden pro Well benötigt)

Schritt 2: Herstellen von DNA/Dendrimer-Komplexen: (20 µl an Komplex werden für jedes Well benötigt)

Einfüllen eines entsprechenden Volumens von 10 × Bindungspuffer und H_2O in ein steriles Eppendorf™-Gefäß
Zugeben von verdünntem Dendrimer und anschließend DNA (konzentrierte Stammlösungen von Dendrimeren sollten wenn möglich in Wasser ohne Methanol suspendiert werden)
Verdünnen der Dendrimere in Verdünnungspuffer auf eine Konzentration von ungefähr dem zehnfachen der endgültigen Konzentration vor Zugeben zu Bindungspuffer.
Obwohl sich der Komplex unmittelbar beim Mischen zu bilden scheint, sollte die Mischung für 3 bis 15 min stehen, um die Komplexbildung zu unterstützen.

DNA/Dendrimer-Komplexierungsbeispiel:

RSV-luc DNA und G 10 (EDA)-Dendrimer

[0521] Die 7,2 kb RSV-luc Plasmid-DNA weist $1{,}71 \times 10^{-5}$ (–) Ladungen pro µg auf. G 10 (EDA)-Dendrimer weist $2{,}64 \times 10^{-5}$ (+) Ladungen pro µg auf. Daher ist für ein Ladungsverhältnis von 1:10 ein Verhältnis von 1 µg DNA zu 6,5 µg Dendrimer erforderlich. Die Stammlösung G 10 (EDA) besitzt eine Konzentration von 236,4 µg/µl. Eine Verdünnung von 1:364 in Verdünnungspuffer ergibt 0,65 µg/µl. Um 20 µl an Komplexen herzustellen (ausreichend, um 1 µg an DNA in ein Well an Zellen in einer 6-Well-Platte zu transfizieren), werden 2 µl an 10 × Bindungspuffer, 7 µl an sterilem H_2O, 10 µl an verdünntem Dendrimer und 1 µl an DNA (mit 1 µg/µl) vereinigt. Wenn mehr als 1 Well transfiziert werden soll oder wenn größere Mengen an DNA verwendet werden sollen, wird einfach unter Verwendung derselben Proportionen von Bindungspuffer, Dendrimer und DNA ein größeres Volumen an Komplexen hergestellt.

[0522] Schritt 3: Waschen der Zellen 2 × mit 2 ml serumfreien Medium.

[0523] Schritt 4: Zugeben von 1 ml Lösung 1 zu jedem Well.

[0524] Schritt 5: Zugeben von 20 µl an DNA/Dendrimer-Komplexen zu jedem Well. Mischen durch vorsichtigen Schütteln der Platte.

[0525] Schritt 6: Inkubieren für 3 Stunden bei 37°C.

[0526] Schritt 7: Waschen 1 × mit 2 ml serumfreiem DMEM.

[0527] Schritt 8: Abschrecken der Zellen mit Lösung 2, 2 ml pro Well, für 2 min.

[0528] Schritt 9: Waschen der Zellen 2 × mit 2 ml serumfreiem DMEM.

[0529] Schritt 10: Ersetzen des Mediums mit DMEM mit 5% Serum. Inkubieren über Nacht bei 37°C.

Tag 3:

Herstellen der folgenden Lösungen:

Lösung 4 Zellkultur-Lyse 1 × Reagenz

25 mM TRIS-Phosphat pH = 7,8
2 ml DTT
2 mM 1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
10% Glycerin
1% Triton X-100

Lösung 5 Luciferase-Assay-Reagenz

2 mM TRIS-Glycin
1,07 mM $(MgCO_3)Mg(OH)_2 \cdot 5H_2O$
2,67 mM $MgSO_4$
0,1 mM EDTA
33,3 mM DTT
270 µM Coenzym A
40 µM Luciferin™
530 µM ATP, Einstellen auf einen endgültigen pH-Wert von 7,8

[0530] Schritt 1: Zellen 2 × mit 2 ml an 1 × PBS pH = 7,4 (Mg^{++}-, Ca^{++}-frei) spülen

[0531] Schritt 2: 200 µl an Lösung 4 zu jedem Well zugeben und für 15 min bei 27°C absitzen lassen

[0532] Schritt 3: Zellen zusammenkratzen und in Eppendorf™-Gefäßen sammeln

[0533] Schritt 4: Bestimmen der Proteinkonzentration jedes Zell-Lysats

[0534] Schritt 5: Nicht mehr als 20 µl Aliquot jedes Zell-Lysats in Eppendorf™-Gefäße

[0535] Schritt 6: 80 µl Lösung 5 zugeben und sofort die Chemilumineszenz messen

[0536] In den Beispielen wurden verschiedene Arten von genetischem Material verwendet. Wenn nicht anders angegeben, war die verwendete DNA ein bakterielles Expressionsplasmid (RSV-luc), welches das Gen für das Luciferaseenzym enthält, welches durch ein Promoter exprimiert wird, vom Respiratory-Syncytial-Virus (RSV). Die Konzentration an genetischem Material, bezogen auf Dendrimer, wurde entweder basierend auf dem benötigten Ladungsverhältnis von DNA:Dendrimer, oder dem Molverhältnis wie in einem bestimmten Beispiel angegeben, bestimmt. In den Transfektionsbeispielen wurde ausreichend DNA:Dendrimer-Komplex verwendet, so dass 1 µg (Mikrogramm) an DNA pro Testwell zugegeben wurde (ungefähr 200 000 Zellen), wenn nicht anders angegeben.

[0537] In den meisten Beispielen wurden dichte Stern PAMAM-Dendrimere verwendet. Die Generation und somit die Durchmesser der Dendrimere variieren ebenso wie die Kerne und in manchen Fällen auch die Oberflächenfunktionalitäten.

[0538] Verschiedene unterschiedliche Zellllinien wurden erfolgreich transfiziert. Wenn nicht in den Beispielen anders angegeben, wurden RAT2-Zellen transfiziert.

[0539] Wenn in den Beispielen DEAE-Dextran verwendet wird, beträgt die Konzentration 0,5 µM, wenn nicht anders angegeben. Ebenfalls beträgt, wenn nicht anders angegeben, die Menge an DNA in dem verwendeten DNA:Dendrimer-Komplex 1,0 µg pro Testwell.

Elektrophorese

[0540] Die für die Elektrophorese verwendeten Agarosegele werden so in einem elektrischen Feld angeordnet, dass die Kathode sich an der Oberseite des Gels (wie in den Figuren ersichtlich) befindet und die Anode sich am Boden des Gels befindet (wie in den Figuren ersichtlich). Die Gels werden mit Ethidiumbromid angefärbt, welches an die DNA bindet und fluoresziert, wodurch das Ausmaß angezeigt wird, mit welchem die DNA in dem Gel gewandert ist. In manchen Beispielen werden sowohl an der Oberseite der Gelplatte als auch in deren Mitte Linien gestartet, wobei die Wanderung in jedem Fall in Richtung zum Boden der Figur erfolgt. Eine Komplexierung und Ladungsneutralisierung der DNA tritt vermutlich auf, wenn die Wanderung in Richtung Anode verzögert ist.

[0541] Die Teile der experimentellen Techniken, die oben nicht beschrieben wurden und in den Beispielen verwendet werden, sind solche, die einem Fachmann mit üblicher Kenntnis des Stands der Technik bekannt sind und in der Literatur erhältlich sind, so dass weitere Beschreibung nicht erforderlich ist.

Beispiel 42: Herstellung von Dendrimer-Konjugaten mit genetischem Material und Experimente (Fig. 17 bis Fig. 19).

[0542] In dieser Reihe von Experimenten wurden verschiedene dendritische Polymere mit DNA komplexiert und unter verschiedenen Bedingungen transfiziert. Die an das Dendrimer-komplexierte DNA war ein doppelt Caesiumgradient-Säulengereinigtes RSV-luc Plasmid. Die Transfektion des DNA-Expressionsplasmids führt zur erfolgreichen Transkription und Translation des Luciferasegens. Dadurch wird Luciferaseprotein, ein Enzym, welches den Break-Down von LUCIFERIN™ katalysiert, gebildet, was zur Entstehung von messbarem Licht führt. Quantitative Bestimmung der Menge an Licht, welches entsteht, ist ein Maß für das Ausmaß der erfolgreichen Transfektion dieses Gens.

[0543] Die getesteten Dendrimere waren wie folgt:

A:	Ein G 8 (NH_3) dichtes Sterndendrimer mit einem Molekulargewicht (MW) von ungefähr 87 342 und einem Durchmesser von ungefähr 76 Å.
B:	Ein G 6 (NH_3) dichtes Sterndendrimer mit einem MW von ungefähr 21 591 und einem Durchmesser von ungefähr 53 Å.
C:	Ein G 5 (NH_3) dichtes Sterndendrimer mit einem MW von ungefähr 10 633 und einem Durchmesser von ungefähr 40 Å.

D:	Ein G 7 (NH_3) dichtes Sterndendrimer mit einem MW von ungefähr 43 508 und einem Durchmesser von ungefähr 67 Å.
E:	Ein G 3 (NH_3) dichtes Sterndendrimer mit einem MW von ungefähr 2 414 und einem Durchmesser von ungefähr 22 Å.
F:	Ein G 4 (NH_3) dichtes Sterndendrimer mit einem MW von ungefähr 5 154 und einem Durchmesser von ungefähr 31 Å.
G:	Ein G 2 (NH_3) dichtes Sterndendrimer mit einem MW von ungefähr 1044 und einem Durchmesser von ungefähr 15,8 Å.
H:	Ein G 1 (NH_3) dichtes Sterndendrimer mit einem MW von ungefähr 359 und einem Durchmesser von ungefähr 10,4 Å.
I:	Ein G 1 (EDA) dichtes Sterndendrimer mit einem MW von ungefähr 517 und einem Durchmesser von ungefähr 14 Å.
J:	Ein G 2 (EDA) dichtes Sterndendrimer mit einem MW von ungefähr 1 430 und einem Durchmesser von ungefähr 19 Å.
K:	Ein G 3 (EDA) dichtes Sterndendrimer mit einem MW von ungefähr 3 256 und einem Durchmesser von ungefähr 26 Å.
L:	Ein G 4 (EDA) dichtes Sterndendrimer mit einem MW von ungefähr 6 909 und einem Durchmesser von ungefähr 36 Å.
M:	Ein G 5 (EDA) dichtes Sterndendrimer mit einem MW von ungefähr 14 215 und einem Durchmesser von ungefähr 44 Å.
N:	Ein G 6 (EDA) dichtes Sterndendrimer mit einem MW von ungefähr 28 826 und einem Durchmesser von ungefähr 57 Å.
O:	Ein G 7 (EDA) dichtes Sterndendrimer mit einem MW von ungefähr 58 048 und einem Durchmesser von ungefähr 72 Å.
P:	Eine Mischung von dichten Sterndendrimeren in den folgenden prozentualen Anteilen: 1. G 6 (NH_3) 58,8% 2. G 5 (NH_3) 30,5% 3. G 2 (EDA) 1,86% 4. G 2 (NH_3) 1,10% 5. G 1 (EDA) 3,37% 6. G 1 (NH_3) 4,41%
Q.	Eine Mischung von dichten Sterndendrimeren in den folgenden prozentualen Anteilen: 1. G 6 (NH_3) 60,0% 2. G 5 (NH_3) 31,1% 3. G 2 (EDA) 1,90% 4. G 2 (NH_3) 1,12% 5. G 1 (EDA) 1,30% 6. G 1 (NH_3) 4,50%
R.	Ein G 6 (NH_3) teilweise abgebautes dichtes Sterndendrimer
S.	Ein G 7 (NH_3) teilweise abgebautes dichtes Sterndendrimer

[0544] Die wesentlichen Daten dieser Dendrimere sind unten in Tabelle XII aufgelistet:

Tabelle XII

Dendrimer	MW	Oberflächen NH_2-Gruppen	Minimale Dendrimermenge[a]	
			0,5 µg[c] DNA	1 µg[c] DNA
A	87 342	384	0,1 µg	ND
B	21 591	96	0,1 µg	ND
C	10 633	48	0,1 µg	ND
D	43 508	192	0,1 µg	ND
E	2 414	12	*	0,5 µg
F	5 154	24	*	0,1 µg
G	1 044	6	*	*
H	359	3	*	*
I	517	4	*	*
J	1 430	8	0,5 µg	ND
K	3 256	16	0,1 µg	ND
L	6 909	32	0,1 µg	ND
M	14 215	64	0,1 µg	ND
N	28 826	128	0,1 µg	ND
O	58 048	256	0,1 µg	ND
P	25 951	96	*	0,1 µg
Q	25 951b	96	*	0,1 µg
R	b	b	0,001 mg	ND
S	b	b	0,001 µg	ND

*keine Bindung beobachtet
[a]eine minimale Menge an Dendrimer benötigt, um DNA vollsöndig zu komplexieren (vollständige Verzögerung jeglicher GelßWanderung der DNA in Richtung Anode)
[b]Mischungen, unterschiedliche Größe; für die Definition siehe vorhergende Seiten in dem Beispiel
[c]minimale Menge an Dendrimer benötigt, um DNA vollständig zu komplexieren

ND nicht bestimmt

[0545] Tabelle XII zeigt, dass alle Dendrimere, die keinen NH_3-Kern aufweisen mit Generationen kleiner als G 4 (G, H, I) DNA binden und DNA komplexieren/ladungsneutralisieren können.

[0546] Um zu ermitteln, ob mit DNA komplexierte Dendrimere für die Transfektion nützlich wären, wurden Experimente unter vielfältigen Bedingungen durchgeführt.

[0547] Fig. 17 zeigt die Ergebnisse der Transfektion von Proben in RAT2-Zellen, wobei die pro Mikrogramm an zellulärem Protein für jede der unterschiedlichen Bedingungen gemessenen Lichteinheiten, bezeichnet mit den Nummern 1 bis 18, wie in der folgenden Tabelle XIII angegeben, sind:

Tabelle XIII

Proben-Nummer	Dendrimer oder Kontrolle	Ladungsverhältnis DNA:Dendrimer	Bedingung
1	D	1:0,7	a
2	S	1:0,7	a
3	Q	1:0,8	a
4	D	1:3,3	a
5	S	1:3,3	a
6*	RAT2 nicht-transfiziert	NA	a
7	D	1:0,7	b
8	S	1:0,7	b
9	Q	1:0,8	b
10	D	1:3,3	b
11	S	1:3,3	b
12*	nur Dex	NA	b
13	D	1:0,7	c
14	S	1:0,7	c
15	Q	1:0,8	c
16	D	1:3,3	c
17	S	1:3,3	c
18*	RSV+ hsDNA-Dex	NA	c

* Kontrollen
NA nicht anwendbar
a DNA und Dendrimer in Bindungspuffer komplexiert und in DMEM transfiziert
b DNA und Dendrimer in HBS komplexiert und in DMEM transfiziert
c DNA und Dendrimer in Bindungspuffer komplexiert und in DEAE-Dextran transfiziert

[0548] Die Proben 6, 12 und 18 sind die Kontrollen. Die Probe 6 sind nicht-transfizierte RAT2-Zellen. Die Probe 12 entspricht der Probe 6, jedoch mit DEAE-Dextranzugabe. In der Probe 18 wird die Transfektion erreicht unter Verwendung des Vektors und mit Heringssperma-DNA in Gegenwart von DEAE-Dextran. Die Daten in Tabelle XIII zeigen, dass Dendrimere niedrigerer Generation als G 8 keine Transfektion vermitteln, es sei denn, die DNA:Dendrimer-Komplexe werden in DEAE-Dextran gegeben.

[0549] Um diese Ergebnisse bei Verwendung eines größeren Bereichs von DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnissen zu bestätigen, wurden die in Fig. 18 veranschaulichten Untersuchungen durchgeführt. Die Testparameter sind in der folgenden Tabelle XIV gezeigt:

Tabelle XIV

Proben-Nummer	Dendrimer oder Kontrolle	Ladungsverhältnis DNA:Dendrimer	Bedingung
1	D	1:14,6	c
2	D	1:3,3	c
3	D	1:1,2	c
4	D	1:0,6	c
5	D	1:0,3	c
6	D	1:0,15	c
7	S	1:14,6	c
8	S	1:3,3	c
9	S	1:1,2	c
10	S	1:0,6	c
11	S	1:0,3	c
12	S	1:0,15	c
13	D	1:14,6	b
14	D	1:3,3	b
15	D	1:0,6	b
16	S	1:14,6	b
17	S	1:3,3	b
18	S	1:0,6	b
19	D	1:0,03	c
20	S	1:0,03	c
21	RSV Dex*	NA	NA
22	RSV + hsDNA Dex*	NA	NA
23	Dex allein*	NA	NA
24	HBS allein*	NA	NA

* Kontrollen
NA nicht anwendbar
b DNA und Dendrimer in HBS komplexiert und in DMEM transfiziert
c DNA und Dendrimer in Bindungspuffer komplexiert und in DEAE-Dextran transfiziert

[0550] Die Kontrollen 21 bis 24 umfassen jeweils den Vektor in DEAE-Dextran, den Vektor und Heringssperma-DNA in DEAE-Dextran, bzw. DEAE-Dextran und HBS.

[0551] Die Ergebnisse zeigen, dass die DNA-Dendrimer-Komplexe bei der Transfektion von Zellen in Gegenwart von DEAE-Dextran überraschenderweise effzienter sind. Sie zeigen auch, dass bei reinen Dendrimeren mit Amino-Oberflächenfunktionalität (positiv geladen) nur Komplexe mit überschüssigen positiven Dendrimerladungen zur effizienten Transfektion in der Lage sind (siehe Linie 4, Fig. 18).

[0552] Die Transfektionsfähigkeit für ein breites Spektrum verschiedener Dendrimere (A bis S) ist in Fig. 19 demonstriert. Eine Balkengrafik von relativen Lichteinheiten pro Mikrogramm an Protein von Zellen, die mit DNA, die mit verschiedenen Dendrimeren (A–S) komplexiert ist, in Gegenwart von DEAE-Dextran, ist dargestellt. Es wurden drei verschiedene Ladungsverhältnisse von DNA:Dendrimer je zweimal verwendet: 1:2, 1:10 und 1:20. Somit gibt es sechs Balken für jedes Dendrimer A–S in Fig. 19, wobei die ersten beiden die Transfektionen bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:2, das zweite Paar bei 1:10 und das dritte Paar bei 1:20 zeigen. Die Kontrolle (RSV_a) umfasst die Transfektion von Plasmid DNA, die in Gegenwart von DEAE-Dextran durchgeführt wird. Es ist ersichtlich, dass bei verschiedenen Verhältnissen von DNA:Dendrimer die erfolgreiche Transfektion, Trankription und Translation entsprechend der bestimmten Art von verwendetem Dendrimer variiert.

Beispiel 43: Elektronenmikroskopie von DNA:Dendrimer-Komplexen in Gegenwart und Abwesenheit von DEAE-Dextran (**Fig.** 60, Felder 3, 4 und 5).

[0553] Die Zugabe von DEAE-Dextran oder anderen Mitteln zu dem DNA:Dendrimer-Komplex nach dessen Bildung zeigte sich als wirksam zur Förderung der Transfektion auf eine einzigartige Weise. Um die Rolle dieser Mittel bei der Beeinflussung nicht-spezifischer Transfektion besser zu verstehen, wurden Elektronenmikrographien von DNA:Dendrimer-Komplexen mit und ohne Zugabe von DEAE-Dextran durchgeführt. In diesem Beispiel wurde DNA mit Dendrimeren wie im Folgenden in **Fig.** 60 gezeigt, komplexiert.
Feld 3-DNA:Dendrimer G 11 (EDA)-Dendrimer in einem Ladungsverhältnis im Verhältnis von 1:10
Feld 4 – DNA:Dendrimer G 11 (EDA)-Dendrimer in 0,5 µM DEAE-Dextran
Feld 5 – DNA komplexiert mit einer polydispersen Mischung von Dendrimeren (Verbindung B) in einem Ladungsverhältnis von 1:10

[0554] In **Fig.** 60 stellen die Felder 3, 4 und 5 Elektronenmikrographien von DNA:Dendrimer-Komplexen dar. Die DNA wurde mit G 11 (EDA)-Dendrimer bei einem DNA:Dendrimer Ladungsverhältnis von 1:10 in 1 mM TRIS, pH = 7,8, komplexiert. Unter diesen Bedingungen zeigte die Elektronenmikroskopie, dass DNA:Dendrimer-Komplexe große unregelmäßige Aggregate bilden, die mit Dendrimer allein nicht beobachtet werden (**Fig.** 60, Feld 3). Die Zugabe von DEAE-Dextran zu einer endgültigen Konzentration von 0,5 µM verringerte die Größe der DNA:Dendrimer-Komplexe drastisch (**Fig.** 60, Feld 4). Kleinere Komplexe (und völlige Abwesenheit großer Aggregate) wurde auch dann beobachtet, wenn DNA mit polydispersen Mischungen von Dendrimeren (z.B. als Verbindung B beschrieben) in einem Ladungsverhältnis von 1:10 komplexiert wurde. Das Ergebnis bietet eine Erklärung dafür, warum diese Mittel die Transfektion fördern können. Obwohl es nicht beabsichtigt ist, an eine Theorie gebunden zu werden, ist es wahrscheinlich, dass die geringere Komplexgröße, die mit diesen Mitteln erzielt wird, leichter Zugang zu den Zellen erhalten und Transfektion bewirken kann.

Beispiel 44: Vergleich der DNA-Bindungsfähigkeit und Transfektionsfähigkeit von Dendrimeren mit und ohne Oberflächensubstitutionen bei verschiedenen DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnissen (**Fig. 12** und **Fig. 13**).

[0555] Um die Auswirkung der Verringerung der Oberflächenladung des Dendrimers auf die Transfektionseffizienz zu ermitteln, wurde das folgende Experiment durchgeführt. DNA-Dendrimer-Komplexe wurden in den angegebenen Ladungsverhältnissen für die verschiedenen in der folgenden Tabelle XV aufgelisteten Dendrimere hergestellt. Wie zuvor bedeutet „G" die Generation des Dendrimers und die Bezeichnung „NH_3" oder „EDA" drückt den Dendrimerkern aus. Die substituierten Dendrimere sind als Proben 26 bis 31 in **Fig. 12** und Linie 26 bis 31 in **Fig. 13** wiedergegeben. Substituierte Dendrimere wiesen an der Oberfläche positiv geladene Amine auf, die durch Umsetzung mit Acrylsäure modifiziert wurden. Daher ist in diesen substituierten Dendrimeren die Anzahl an Oberflächen-Aminogruppen verringert. Somit waren bei einem zu 25% substituierten G 6 (NH_3)-Dendrimer theoretisch 25% von dessen Oberflächen-Aminogruppen mit Carboxylgruppen von Acrylsäure umgesetzt. In einem zu 100% substituierten G 6-Dendrimer hatte jede Oberflächen-Aminogruppe mit einer Carboxylgruppe reagiert. Daher ist die funktionelle positive Ladung, die auf diesen Dendrimeren für die Wechselwirkung mit negativ geladener DNA zur Verfügung steht, verringert. Die Punkte 1 und 32 in der folgenden Tabelle XV sind die „Plasmidkontrollen" oder anders ausgedrückt nur DNA.

Tabelle XV

Linie Nummer	Generation & Kern	DNA:Dendrimer Ladungverhältnis
1	nur Plasmid	Kontrolle
2	G 5 (NH_3)	1:1
3	G 5 (NH_3)	1:5
4	G 5 (NH_3)	1:10
5	G 5 (EDA)	1:1
6	G 5 (EDA)	1:5
7	G 5 (EDA)	1:10
8	G 6 (NH_3)	1:1
9	G 6 (NH_3)	1:5
10	G 6 (NH_3)	1:10
11	G 6 (EDA)	1:1
12	G 6 (EDA)	1:5
13	G 6 (EDA)	1:10
14	G 7 (NH_3)	1:1
15	G 7 (NH_3)	1:5
16	G 7 (NH_3)	1:10
17	G 7 (EDA)	1:1
18	G 7 (EDA)	1:5
19	G 7 (EDA)	1:10
20	G 4 (NH_3)	1:1
21	G 4 (NH_3)	1:5
22	G 4 (NH_3)	1:10
23	G 4 (EDA)	1:1
24	G 4 (EDA)	1:5
25	G 4 (EDA)	1:10
26	G 6 (NH_3)[a]	1:1
27	G 6 (NH_3)[a]	1:5
28	G 6 (NH_3)[a]	1:10
29	G 6 (NH_3)[b]	NA
30	G 6 (NH_3)[b]	NA
31	G 6 (NH_3)[b]	NA
32	nur Plasmid	Kontrolle

a = 25 % substituiert

b = 100 % substituiert

NA nicht anwendbar; 100% substituierte Dendrimere wurden in denselben Mengen wie die zu 25% substituierten Dendrimere gemischt

[0556] Proben der DNA:Dendrimer-Komplexe in Lösung wurden für die Transfektion entsprechend des Protokolls für die Dendrimertransfektion, das oben beschrieben wurde, in Gegenwart von DEAE-Dextran bei einer Konzentration von 0,5 µM, zu den Zellen zugegeben. Wie aus Fig. 12 ersichtlich ist, sind die G 6-Dendrimere effizienter (vergleiche Spalten 8–19 mit Spalten 2–7 und Spalten 20–25). Wenn die Oberfläche des Dendrimers zu 25% mit negativer Funktionalität substituiert wurde, ist es erforderlich, dass das Ladungsverhältnis von DNA zu Dendrimer verringert wird.

[0557] Dendritische Komplexe und Kontrollproben 1–32 wie in Tabelle XV aufgelistet, wurden für die Elektrophorese auf Agarosegels gegeben (siehe Fig. 13). Die Linien 1–32 zeigen das Ausmaß, in welchem die DNA

allein durch das Gel wanderte (Fig. 13). Die Linien 2–28 zeigen keine Wanderung, was darauf hindeutet, dass die DNA mit dem Dendrimer einen Komplex bildete und somit die Wanderung durch das Gel verzögert ist. Für die Linien 29–31 wurde jedoch eine Wanderung beobachtet, wobei die dendritischen Polymere eine verringerte positive Ladungsfunktionalität aufweisen. Eine gewisse restliche positive Ladungsaktivität ist selbst in den zu 100% substituierten Dendrimeren erkennbar, da bei niedrigeren DNA:Dendrimer-Verhältnissen eine Verzögerung ersichtlich ist (Linien 30–31). Die Ergebnisse aus den Fig. 12 und Fig. 13 zeigen, dass eine positive Oberflächenladungsdichte in dem Dendrimer bei der DNA-Bindung, -Komplexierung und -Transfektion wichtig war.

Beispiel 45: Steigerung der DNA-Transfektionseffizienz als Funktion der Dendrimergeneration im Vergleich zu einer DEAE-Dextran-Kontrolle (Fig. 14).

[0558] In diesem Beispiel wurden Komplexe von DNA und Dendrimer unter Verwendung von G 2 bis G 8 (NH_3)-Dendrimeren und G 3 bis G 11 (EDA)-Dendrimeren hergestellt. Ihre Fähigkeit, DNA in RAT2-Zellen in Gegenwart von DEAE-Dextran zu transfizieren wurde mit dem Ausmaß der bei Verwendung von nur DNA und DEAE-Dextran erzielten Transfektion verglichen. Die prozentuale Steigerung der Transfektion für jedes der Dendrimere im Vergleich zu der DNA/DEAE-Dextran-Kontrolle ist in Fig. 14 gezeigt. Diese Figur zeigt, dass die Transfektionseffizienz mit steigender Generation des Dendrimers von Generation 5 bis 10 exponentiell anwächst. Dies zeigt, dass eine Vergrößerung der Oberfläche und der Ladung der Dendrimere die Transfektionseffizienz steigert.

Beispiel 46: Bestimmung der Wirkung von aufeinanderfolgender Zugabe von G 9 und G 5-Dendrimeren auf die Transfektionseffizienz in RAT2-Zellen in Abwesenheit von DEAE-Dextran (Fig. 15 und Fig. 16).

[0559] In diesem Beispiel wurde entweder:

1. DNA zunächst mit einem G 9-Dendrimer komplexiert und anschließend eine Lösung, die ein G 5-Dendrimer enthielt, zugegeben oder
2. DNA zunächst mit einem G 5-Dendrimer komplexiert und anschließend eine Lösung, die ein G 9-Dendrimer enthielt, zugegeben.

[0560] Die Ergebnisse, die erhalten wurden, wenn EDA-Kern-Dendrimere verwendet wurden, sind in Fig. 15 gezeigt, während die Ergebnisse für Ammoniakkern-Dendrimere in Fig. 16 gezeigt sind. In beiden Fig. 15 und Fig. 16 ist die Konzentration des zweiten zu dem Komplex zugegebenen Dendrimers auf der Abszisse der Balkengrafik angegeben. In der ersten Spalte ist die Konzentration „0" eine Kontrolle, bei der kein zweites Dendrimer verwendet wurde.

[0561] In beiden Fällen wurden die anfänglichen Dendrimere der Generation G 9 und G 5 zugegeben, um eine Konzentration von 0,5 µM bzw. 20,0 µM zu erzielen. In jedem Fall hat das G 5-Dendrimer einen ungefähren Durchmesser von ungefähr 40 Å, während das G 9-Dendrimer einen Durchmesser von ungefähr 88 Å besitzt. In beiden Fällen wurden sphärische dichte Sterndendrimere verwendet. Wenn das G 9-Dendrimer zu dem G 5 DNA:Dendrimer-Komplex zugegeben wurde, werden typischerweise deutlich überlegene Transfektionsergebnisse erzielt im Vergleich zur Zugabe eines G 5-Dendrimers zu einem zuvor komplexierten G 9-Dendrimer. Dies zeigt, dass an der DNA:Dendrimer-Komplexbildung zwei Schritte beteiligt sein können, nämlich Komplexieren und Kontrahieren der DNA gefolgt von „Bedecken" des Komplexes mit einer positiven Ladung für die Haftung an Zellen. Der Letztere dieser beiden Schritte scheint ein Dendrimer mit größerem Durchmesser mit größerer Oberflächenladungsdichte zu bevorzugen.

Beispiel 47: Vergleich der Komplexierungseigenschaften und Transfektionsfähigkeit verschiedener (NH_3)-Dendrimere mit DNA-Fragmenten (Fig. 20 und Fig. 21).

[0562] In diesem Beispiel wurden relativ kleine Fragmente von DNA mit verschiedenen Dendrimeren komplexiert. Bei den in Fig. 20 gezeigten Daten wurde eine synthetische einzelsträngige DNA mit einer Länge von 15 Nukleotiden mit G 2 bis G 7 (NH_3)-Dendrimeren komplexiert, mit den in der folgenden Tabelle XVI angegebenen DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnissen.

Tabelle XVI

Linien	DNA:Dendrimer Ladungsverhältnis	Dendrimer
1	6:1	G 6 (NH_3)
2	1:1	G 6 (NH_3)
3	1:1,5	G 6 (NH_3)
4	6:1	G 7 (NH_3)
5	1:1	G 7 (NH_3)
6	1:1,5	G 7(NH_3)
7	6:1	G 3 (NH_3)
8	1:1	G 3 (NH_3)
9	1:1,5	G 3 (NH_3)
10	6:1	G 4 (NH_3)
11	1:1	G 4 (NH_3)
12	1:1,5	G 4 (NH_3)
13	5:1	G 2 (NH_3)
14	1:1	G 2 (NH_3)
15	1:2	G 2 (NH_3)
16	--	*

* DNA Größenmarker

[0563] Fig. 20 zeigt eine Agarosegelelektrophorese der verschiedenen Komplexe. Wie in den Spalten 1, 4, 7 und 10 ersichtlich ist, erfolgte eine deutliche Wanderung der Oligonukleotide. Dies zeigte, dass sich bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 6:1 keine stabilen Komplexe bildeten. Die fehlende Oligonukleotid-Wanderung in den Spalten 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11 und 12 zeigte jedoch, dass die synthetische Oligonukleotid-DNA mit G 3 bis G 7 (NH_3)-Dendrimeren bei Ladungsverhältnissen von 1:1 und 1:1,5 stabile Komplexe bildet. Die Spalten 13–15 zeigen, dass das Oligonukleotid bei überhaupt keinen Ladungsverhältnissen stabile Komplexe mit G 2 (NH_3)-Dendrimeren bildete.

[0564] Der erfolgreiche Transfer eines radiomarkierten 23 Basenpaar (bp) doppelsträngigen Oligonukleotids, das mit einem G 8 (NH_3)-Dendrimer (bei einem Ladungsverhältnis von 1:10) komplexiert ist, ist in Fig. 21 angegeben. Da das Oligomer kein funktionelles Reportergen war, wurde der erfolgreiche Transfer durch die Aufnahme der radiomarkierten DNA gemessen. Die Radioaktivität innerhalb der Zellen nach dem Transfer ist auf der Ordinate in Fig. 21 aufgetragen gegen die Zeit nach der Iniziierung des Transfers auf der Abszisse.

[0565] Der Befund, dass die DNA-Dendrimer-Aufnahme in die Zelle energieabhängig war, wurde durch die Daten angezeigt, die zeigen, dass die Zugabe von Natriumazid zu dem Komplex das Ausmaß des Transfers wesentlich verringerte, bis fast auf das mit dem Oligonukleotid allein erzielte Level. Dies deutete an, dass Dendrimere die Aufnahme von niedermolekulargewichtigen Nukleinsäuren durch Zellen erleichtern können.

Beispiel 48: Transfektion zirkulärer (stark verknäuelter) und linearisierter RSV-luc in RAT2-Zellen unter Verwendung von G 8 (NH_3)-Dendrimeren und G 11 (EDA)-Dendrimeren mit und ohne DEAE-Dextran (Fig. 22).

[0566] In diesem Beispiel wurde das RSV-luc Gen mit G 8 (NH_3)- und G 11 (EDA)-Dendrimeren entweder in seiner zirkulären (stark verknäuelten) Form oder in linearer Form komplexiert. Die Linearisierung wurde bei Verwendung einer einzelseitigen spezifischen Restriktionsendonuklease erzielt. In Fig. 22 auf der horizontalen Achse bedeuten die mit 1, 3, 5 und 7 nummerierten Balken Plasmide in linearer Form, während die Balken, die mit 2, 4, 6 und 8 nummeriert sind, Plasmide in zirkulärer Form der DNA bedeuten. Fig. 22 veranschaulicht die Tatsache, dass die Transfektion sowohl der linearen als auch der zirkulären Form der DNA bei Verwendung entweder eines G 8 (NH_3) oder eines G 11 (EDA)-Dendrimers erzielt wurde und dass die Transfektion in allen Fällen gesteigert ist, wenn DEAE-Dextran eingesetzt wird.

Beispiel 49: Einzigartige DNA-Bindungseigenschaften von Dendrimeren (**Fig.** 23)

[0567] In diesem Beispiel wurden die bevorzugten DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnisse und Bindungsbedingungen für eine effektive Bildung stabiler DNA-Dendrimer-Komplexe ermittelt. DNA-Dendrimer-Komplexe wurden in Ladungsverhältnissen von ungefähr 40:1 bis 1:50 gebildet (**Fig.** 23 und Tabelle XVII unten):

Tabelle XVII

Linien	DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis
1	a
2	b
3	40:1
4	20:1
5	10:1
6	2:1
7	1:1
8	1:5
9	1:10
10	1:20
11	1:25
12	1:50

a DNA-Größenmarker
b Kontroll-DNA ohne Dendrimer

[0568] Eine Elektrophorese wurde bei diesen Komplexen mit den in den **Fig.** 23(a–d) gezeigten Gels durchgeführt. Linie 1 in jedem der Elektrophoresegels ist der DNA-Größenmarker und Linie 2 ist die DNA-Kontrolle, d.h. ohne Dendrimer. In den Gels A und B in **Fig.** 23 wurde ein G 8 (NH_3)-Dendrimer verwendet, um die DNA zu komplexieren. In den Gels C und D in **Fig.** 23 wurde ein G 8 (EDA)-Dendrimer verwendet. In den oberen Feldern (23a und c) wurden die Komplexe in Gegenwart von Dithiotreitol (DTT) gebildet, welches jegliche Proteinverunreinigung eliminiert (durch Reduktion von Disulfidbindungen) und sie wurden mit EDTA behandelt, welche jegliche vorhandenen Kationen, die die DNA ausfällen könnten, komplexieren würde. Diese beiden Schritte entfernen Verunreinigungen, die fälschlicherweise DNA:Dendrimer-Komplexe anzeigen könnten. Die Ergebnisse zeigen ferner, dass eine Komplexbildung keine reduzierenden Bedingungen oder die Gegenwart von Metallionen erfordert.

[0569] Die Ergebnisse für die Felder A und C sind vergleichbar mit den in den Feldern B und D erhaltenen Ergebnissen. DNA, die mit Dendrimeren in Ladungsverhältnissen von 20:1 oder größer komplexiert wurde, bildete keine stabilen Komplexe (siehe Linien 2 bis 5 in den Platten A–D von **Fig.** 23). Die Verzögerung der DNA:Dendrimer-Komplexe beginnt bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 2:1 und dauert an über ein Ladungsverhältnis von 1:50 (siehe Linien 6–12 in jedem der Felder a–d von **Fig.** 23). Dies zeigt, dass die DNA selbst bei niedrigen DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnissen weiter komplexiert wird.

Beispiel 50: DNA-Bindungseigenschaften von Dendrimeren waren primär abhängig vom Ladungsverhältnis (Fig. 24).

[0570] In diesem Beispiel wurden 0,2 µg an Plasmid-DNA (2,9 kb) mit G 8 (NH_3)- und G 11 (EDA)-Dendrimeren in den in der folgenden Tabelle XVIII gezeigten molaren Verhältnissen komplexiert, wobei Linie 1 ein unkomplexierter DNA-Größenmarker ist:

Tabelle XVIII

Linie	DNA:Dendrimer Molverhältnis
1	a
2	1:0,32[b]
3	1:3,2[b]
4	1:16[b]
5	1:32[b]
6	1:64[b]
7	1:128[b]
8	1:0,32[c]
9	1:3,2[c]
10	1:16[c]
11	1:32[c]
12	1:64[c]
13	1:128[c]

a = DNA-Größenmarker

b = DNA:G 8 NH_3

c = DNA:G 11 EDA

[0571] Eine Elektrophorese wurde mit diesen Komplexen in Agarosegel durchgeführt, wobei die Ergebnisse in Fig. 24 gezeigt sind. Es ist ersichtlich, dass bei Molverhältnissen von 1:0,32, 1:3,2 und 1:16 (siehe Linien 2–4 in Fig. 24), die DNA nicht mit G 8 (NH_3)-Dendrimer komplexierte. Im Gegensatz dazu komplexierte die DNA nur bei Molverhältnissen von 1:0,32 und 1:3,2 (Linien 8 und 9) nicht mit G 11 (EDA)-Dendrimer. Dies zeigt, dass das größere G 11 (EDA)-Dendrimer, welches eine wesentlich höhere Oberflächenladungsdichte aufweist als das G 8 (NH_3)-Dendrimer, in der Lage ist, bei niedrigeren DNA:Dendrimer Molverhältnissen zu komplexieren, was darauf hindeutet, dass das Ladungsverhältnis der wichtigere Parameter der DNA-Komplexierung durch Dendrimer ist.

[0572] Die stabilen Komplexe, die in den Linien 5–7 und 11–13 in Fig. 24 gezeigt sind, weisen alle kleinere Ladungsverhältnisse als 5:1 von DNA:Dendrimer auf.

Beispiel 51: DNA-Dendrimer-Komplexstabilität in einem breiten Bereich von pH-Werten (Fig. 25)

[0573] In diesem Beispiel wurde komplexierte DNA mit G 8 (NH_3)- und G 8 (EDA)-Dendrimeren in DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnissen von 10:1 und 1:5 in einem Puffer hergestellt, der 100 mM Natriumchlorid und 10 mM TRIS bei variierenden pH-Werten enthält, wie in der Tabelle XIX unten angegeben:

Tabelle XIX

Linie	pH	DNA:Dendrimer* Ladungsverhältnis (Kern)
1	7,4	10:1 (NH_3)
2	7,4	1:5 (NH_3)
3	7,4	10:1 (EDA)
4	7,4	1:5 (EDA)
5	7,4	nur DNA
6	5,2	10:1 (NH_3)
7	7,0	10:1 (NH_3)
8	9,8	10:1 (NH_3)
9	5,2	1:5 (NH_3)
10	7,0	1:5 (NH_3)
11	9,8	1:5 (NH_3)
12	5,2	10:1 (EDA)
13	7,0	10:1 (EDA)
14	9,8	10:1 (EDA)
15	5,2	1:5 (EDA)
16	7,0	1:5 (EDA)
17	9,8	1:5 (EDA)
18	5,2	nur DNA
19	7,0	nur DNA
20	9,8	nur DNA

* G 8

[0574] Eine Elektorphorese wurde mit den resultierenden Komplexen in einem Agarosegel durchgeführt und die Ergebnisse sind in Fig. 25 angegeben.

[0575] Die Linien 1–5 zeigen eine Komplexierung, die unter Standardbedingungen (pH = 7,4) durchgeführt wurde. Wie erwartet, bildete die DNA keinen Komplex mit Dendrimer bei einem Ladungsverhältnis von 10:1 (Linien 1, 3, 6–8 und 12–14) und ebenso wie die Kontroll-DNA, die einer Elektorphorese ohne Dendrimer unterzogen wurde (Linien 5 und 18–20) wanderte sie in dem Gel. Die partielle Komplexierung von DNA bei dem 10:1 Ladungsverhältnis (dokumentiert durch das in den Linien 1, 3, 6–8 und 12–14 beobachtete Schmieren) wurde ebenfalls durch eine Variation des pH-Wertes nicht beeinflusst. Andererseits zeigte der bei einem Ladungsverhältnis von 1:5 gebildete DNA-Komplex Stabilität bei pH-Werten im Bereich von 5,2–9,8 und wanderte nicht in dem Gel (Linien 9–11 und 15–17). Die Linien 9 und 15 zeigen die Bildung des Komplexes bei pH = 5,2, wobei die Linie 17 die Disassoziierung des Komplexes bei pH = 9,8 zeigt. Somit waren die mit G 8 (NH_3)-Dendrimeren gebildeten Komplexe stabil bei pH = 9,8, während die mit G 8 (EDA)-Dendrimeren gebildeten Komplexe nicht stabil waren. Dies zeigt, dass die Ladungsmerkmale für diese beiden Dendrimere unterschiedlich sind und ihre DNA-Bindung unter bestimmten Bedingungen beeinflussen kann.

Beispiel 52: DNA-Dendrimer-Bindung bei steigenden Natriumchlorid-Konzentrationen (Fig. 26a und b).

[0576] In Beispiel 52 wurde DNA mit Ladungsverhältnissen von 5:1 und 1:5 sowohl mit G 8 (NH_3)- als auch mit G 8 (EDA)-Dendrimeren komplexiert bei steigenden Konzentrationen an Natriumchlorid, wie in Tabelle XX unten gezeigt:

Tabelle XX

Linie	NaCl Konz.
1	*
2[a] & 10[b]	0
3[a] & 11[b]	50 µM
4[a] & 12[b]	100 µM
5[a] & 13[b]	200 µM
6[a] & 14[b]	500 µM
7[a] & 15[b]	750 µM
8[a] & 16[b]	1,0 M
9[a] & 17[b]	1,5 M

* DNA-Größenmarker

a = Ladungsverhältnis 5:1

b = Ladungsverhältnis 1:5

[0577] Eine Elektorphorese wurde mit diesen Komplexen durchgeführt, wobei die Ergebnisse in den Fig. 26a und Fig. 26b gezeigt sind; Fig. 26a umfasst die G 8 (NH_3)-Dendrimer-DNA-Komplexe und Fig. 26b umfasst die G 8 (EDA)-Dendrimer-Komplexe. Bei einem Ladungsverhältnis von 5:1 bildeten sich unter keinen der verwendeten Bedingungen vollständige DNA:Dendrimer-Komplexe und demzufolge wanderte die DNA in dem Gel (Linien 2–9 in den Fig. 26a und Fig. 26b). Andererseits bildeten sich vollständige DNA:Dendrimer-Komplexe, die stabil waren, bei einem Ladungsverhältnis von 1:5 in Natriumchlorid-Konzentrationen im Bereich von 0 (Linien 2 und 10) bis 1,5 molar (Linien 9 und 17). Somit tritt DNA:Dendrimer-Komplexbildung unabhängig von der Ionenstärke des Puffers auf.

Beispiel 53: Stabilität von DNA, die mit Dendrimer komplexiert ist in Gegenwart von Restriktionsendonukleasen (Fig. 27).

[0578] In diesen Beispielen wurden 0,2 µg Plasmid-pRSV-lac DNA mit G 8 (NH_3)- oder G 11 (EDA)-Dendrimeren mit Ladungsverhältnissen von 1:10 komplexiert und mit HindIII oder EcoR1 Restriktionsendonukleaseenzymen für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit SDS behandelt, um die DNA von dem Dendrimer zu trennen und es wurde eine Elektorphorese in einem Agarosegel durchgeführt (Fig. 27, Linien wie in Tabelle XXI unten angegeben):

Tabelle XXI

Linie	Plasmid-Komplex
1	DNA-Größenmarker
2	nicht-verdaute Plasmid-DNA
3	Plasmid-DNA verdaut mit HindIII
4	Plasmid-DNA komplexiert mit G 8 NH_3, verdaut mit HindIII
5	Plasmid-DNA komplexiert mit G 11 EDA, verdaut mit HindIII
6	Plasmid-DNA verdaut mit EcoR1
7	Plasmid-DNA komplexiert mit G 8 NH_3, verdaut mit EcoR1
8	Plasmid-DNA komplexiert mit G 11 EDA verdaut mit EcoR1

[0579] Die nicht-komplexierte Plasmid-DNA, die entweder mit HindIII oder EcoR1 verdaut wurde, wanderte in Fragmenten, die mit der Anzahl an Restriktionsstellen in dem Plasmid übereinstimmt (vergleiche Linien 3 und 6 mit verdauter DNA in Linie 2, Fig. 27). Im Gegensatz dazu blieb die komplexierte DNA vorrangig unverdaut (Linien 4, 5, 7 und 8), was zeigt, dass die Dendrimer-Komplexierung die DNA vor dem Endonuklease-Verdau

schützt.

Beispiel 54: Stabilität von DNA-Dendrimer-Komplexen in Gegenwart zellulärer Nukleasen (Fig. 28).

[0580] Beispiel 54 ist gleich wie Beispiel 53, außer dass zelluläre Nukleasen verwendet wurden, die von dem Zytoplasma von U937-Zellen erhalten wurden, um die DNA nicht-spezifisch zu verdauen. Plasmid-DNA (2,9 kb) wurde mit G 8 (EDA)-Dendrimer in Ladungsverhältnissen komplexiert, die die DNA entweder vollständig (1:5) oder unvollständig (5:1) komplexierten. Die DNA:Dendrimer-Komplexe wurden anschließend mit dem Zellextrakt für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde SDS zugegeben, um die DNA von dem Dendrimer zu trennen und die Proben wurden einer Elektorphorese in einem Agarosegel unterzogen (Fig. 28), wobei die Linien wie in Tabelle XXII unten angegeben, identifiziert sind:

Tabelle XXII

Linie	Proben
1	DNA-Größenmarker
2	Plasmid-Kontrolle; kein Zellextrakt, kein Dendrimer
3	Plasmid-Verdau-Kontrolle; 5 µg Zellextrakt, kein Dendrimer, kein SDS
4	Plasmid-DNA:G 8 (EDA) (1:5); kein Zellextrakt
5	Plasmid-DNA:G 8 (EDA) (1:5); 5 µg Zellextrakt
6	Plasmid-DNA:G 8 (EDA) (5:1); kein Zellextrakt
7	Plasmid-DNA:G 8 (EDA) (5:1); 5 µg Zellextrakt

[0581] Die Wanderung des intakten Plasmids ist in Linie 2 angegeben, während die Wanderung des Plasmids, welches durch die zellulären Nukleasen verdaut wurde, in Linie 3 gezeigt ist. Ein Vergleich von Linie 3 mit Linie 2 zeigt, dass die Behandlung der DNA mit zellulären Nukleasen diese in kleine Fragmente unterschiedlicher Größe verdaut (wie durch das in Linie 3 beobachtete Schmieren gezeigt ist).

[0582] In Linie 4 wurde ein 1:5 Ladungsverhältnis DNA:Dendrimer-Komplex der nicht dem zellulärem Extrakt oder SDS ausgesetzt wurde, anschließend einer Elektorphorese unterzogen. Es ist keine Wanderung gezeigt, wie für einen stabilen DNA:Dendrimer-Komplex erwartet würde.

[0583] In Linie 5 wurde derselbe 1:5-Komplex zellulärem Extrakt (5 µg) ausgesetzt, anschließend mit SDS disassoziiert und anschließend einer Elektorphorese unterzogen. Das Plasmid bleibt vorrangig intakt, wie durch den Vergleich von Linie 5 mit Linien 3 und 4 ersichtlich ist. Dies zeigt, dass wenig oder kein Verdau der DNA aufgetreten ist, während sie mit dem Dendrimer komplexiert war.

[0584] In Linie 6 wurde ein 5:1 DNA:Dendrimer-Komplex, der nicht dem zellulären Extrakt ausgesetzt war, einer Elektorphorese unterzogen. Wie erwartet ist der Komplex nicht stabil und die DNA wandert in dem Gel. In Linie 7 wurde derselbe Komplex 5 µg zellulärem Extrakt ausgesetzt, anschließend mit SDS behandelt, um die DNA von dem Dendrimer freizusetzen und Elektorphorese unterzogen. Da der Komplex nicht stabil ist, wurde die DNA fast vollständig verdaut und die unterschiedliche Wanderung verschiedener Verdaufragmente ist in Linie 7 von Fig. 28 sichtbar. Dies zeigt, dass eine vollständige Komplexierung der DNA mit Dendrimer die DNA vor Nukleaseverdau schützt.

Beispiel 55: Transfektion von DNA, die mit G 8 (NH_3)-Dendrimeren komplexiert ist mit oder ohne DEAE-Dextran, im Vergleich zur Transfektion unter Verwendung von LIPOFECTIN™ (Fig. 29).

[0585] In diesem Beispiel wurde DNA mit G 8 (NH_3)-Dendrimeren bei verschiedenen DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnissen (1:100 bis 1:1) komplexiert. Sie wurde anschließend in unterschiedlichen Mengen an DNA (1,5 und 10 µg) bei Gegenwart oder Abwesenheit von DEAE-Dextran transfiziert. Die vorhergehend erwähnten Mengen an DNA wurden auch mit 20 µg LIPOFECTIN™ transfiziert.

[0586] Die Ergebnisse dieser Transfektionen, wie durch die Bildung von Lumineszenz gezeigt (in Lichteinheiten pro µg Protein), sind in Fig. 29 dargestellt. Für die Kontrollen wurde eine sehr geringe Transfektion erhalten, d.h. DNA in Gegenwart von DEAE-Dextran oder DNA allein. Eine deutliche Transfektion wurde mit DNA:Dendrimer-Komplexen erzielt, die mit 10 µg, 5 µg und 1 µg an DNA pro Well bei Ladungsverhältnissen

im Bereich von 1:100 bis 1:1 (DNA:Dendrimer) hergestellt wurden in Gegenwart von DEAE-Dextran. Eine deutliche Transfektion wurde auch mit DNA:Dendrimer-Komplexen selbst in Abwesenheit von DEAE-Dextran erzielt, wenn größere Mengen an DNA bei niedrigeren Ladungsverhältnissen komplexiert wurden. In Abwesenheit von DEAE-Dextran tritt nur bei Dendrimeren höherer Generationen (> G 7) Transfektion mit DNA:Dendrimer-Komplexen auf.

[0587] In den Fällen deutlicher Transfektion sind die Ergebnisse vorzugsweise vergleichbar mit solchen, die unter Verwendung eines Transfektionsmittels auf Lipidbasis, LIPOFECTIN™, erhalten werden.

Beispiel 56: Transfektion von DNA, die mit verschiedenen Dendrimeren komplexiert ist, in Gegenwart oder Abwesenheit von DEAE-Dextran (**Fig. 30** und **Fig. 31**.

[0588] In diesem Beispiel werden die Transfektionsergebnisse für DNA, die mit G 9 (EDA), G 9 (NH_3) (**Fig. 30**), G 8 (NH_3) und G 11 (EDA) (**Fig. 31**) Dendrimeren bei verschiedenen DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnissen komplexiert ist, aufgetragen. Die Transfektion von DNA in Gegenwart von DEAE-Dextran war bei Ladungsverhältnissen im Bereich von ungefähr 1:5 (0,2) bis ungefähr 1:100 (0,01) DNA:Dendrimer (**Fig. 30** und **Fig. 31**) wesentlich gesteigert. Selbst bei so hohen Ladungsverhältnissen wie ungefähr 4:1 (4,0) und so niedrigen Ladungsverhältnissen wie ungefähr 1:10 000 (0,0001) wurde eine gewisse Transfektion beobachtet. Die Transfektion in Abwesenheit von DEAE-Dextran, war nur dann wesentlich, wenn das Ladungsverhältnis von DNA:Dendrimer kleiner war als 1:5 und die Transfektion sinkt, wenn man zu so kleinen Ladungsverhältnissen wie 1:1000 und sogar so klein wie 1:10 000 übergeht für G 9 (NH_3) (**Fig. 30**). Dies zeigt, dass niedrigere Ladungsverhältnisse von genetischem Material zu Dendrimer möglicherweise die fördernde Wirkung von DEAE-Dextran ersetzen können.

Beispiel 57: Transfektion von DNA, die mit G 7 (NH_3)-Dendrimer komplexiert ist, in DEAE-Dextran gegenüber HBS (**Fig. 32**).

[0589] In diesem Beispiel wurden DNA-Dendrimer-Komplexe bei den auf der Abszisse in **Fig. 32** angegebenen Ladungsverhältnissen in RAT2-Zellen transfiziert, entweder in Gegenwart von DEAE-Dextran oder in Gegenwart von HBS. Die Transfektionsergebnisse gemäß Messung durch Lumineszenz in relativen Lichteinheiten pro µg an zellulärem Protein sind in **Fig. 32** angegeben. Wie ersichtlich ist, förderte DEAE-Dextran die Transfektion wesentlich für solche Komplexe, bei denen das Ladungsverhältnis zwischen ungefähr 1:15 und ungefähr 1:1 liegt, speziell bei einem so hohen Verhältnis wie 1:0,6. In HBS wird im Wesentlichen keine Transfektion erzielt, was bestätigt, dass für die Transfektion mit Dendrimeren von Generation 7 und niedriger die Zugabe von DEAE-Dextran erforderlich ist.

Beispiel 58: Auswirkung der Dendrimergeneration und des DNA/Dendrimer-Ladungsverhältnisses auf die Transfektionseffizienz (**Fig. 33**).

[0590] In diesem Beispiel wurde DNA, die mit G 4 bis G 8 (NH_3)-dichten Sterndendrimeren in Ladungsverhältnissen von 1:1, 1:5 und 1:10 (DNA:Dendrimer) komplexiert waren, in RAT2-Zellen in Gegenwart von DEAE-Dextran transfiziert. Die prozentuale Steigerung der Transfektion gegenüber einer DEAE-Dextran DNA-Kontrollmischung ist in **Fig. 33** für jeden der resultierenden Komplexe angegeben. Eine sehr wesentliche Verbesserung gegenüber der Kontrolle war für G 6-, G 7- und G 8-Dendrimere bei allen Ladungsverhältnissen ersichtlich, wobei diese Dendrimere einen größeren Durchmesser als ungefähr 50 Å aufweisen, wobei für G 4- und G 5-Dendrimere eine geringe Verbesserung ersichtlich ist. Ferner war die Transfektion, wenn das Ladungsverhältnis 1:5 oder 1:10 war, wesentlich verbessert, bezogen auf die Komplexe, bei denen das Ladungsverhältnis 1:1 ist. Somit verbesserten eine Erhöhung der Dendrimergeneration und des Ladungsverhältnisses synergistisch die Transfektionseffizienz.

Beispiel 59: Auswirkung von DEAE-Dextran auf die Transfektion über einen weiten Bereich unterschiedlicher DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnisse (**Fig. 34**).

[0591] In diesem Beispiel wurde DNA mit G 8 (NH_3)-Dendrimeren mit Ladungsverhältnissen im Bereich von 1:1 bis 1:3805 komplexiert. Die Transfektionsergebnisse mit und ohne Vorhandensein von DEAE-Dextran sind in **Fig. 34** als erzielter Lumineszenzgrad in relativen Lichteinheiten pro µg Protein angegeben. Für 1:1 und 1:100 wurde sowohl mit als auch ohne DEAE-Dextran eine minimale Transfektion erzielt. Bei Ladungsverhältnissen von 1:5 und 1:10 wurde die Transfektion jedoch durch die Verwendung von DEAE-Dextran erneut synergistisch gesteigert. DEAE-Dextran kann demnach nur die Transfektion von DNA:Dendrimer-Komplexen, die in entsprechenden Ladungsverhältnissen gebildet sind, steigern.

Beispiel 60: Auswirkung variierender DEAE-Dextran-Konzentration auf die Transfektionseffizienz (Fig. 35).

[0592] In diesem Beispiel wurden DNA:G 11 (EDA)-Dendrimer-Komplexe, die bei Ladungsverhältnissen von 1:1 bis 1:100 (DNA:Dendrimer) gebildet wurden, verwendet, um RAT2-Zellen in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von DEAE-Dextran (0–2 μM) zu transfizieren. Die Transfektionsergebnisse, gemessen als Lumineszenz in relativen Lichteinheiten pro μg an zellulärem Protein, sind in Fig. 35 angegeben. Unter allen Bedingungen wurde eine gewisse Transfektion beobachtet und bei Konzentrationen von 0,125 bis 2 μM steigerte DEAE-Dextran die Transfektion. Die Steigerung war jedoch am deutlichsten ausgeprägt bei einer DEAE-Dextran-Konzentration von 0,25 bis 1 μM und wenn das DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis 1:5 oder 1:10 betrug. Dies zeigt, dass sowohl das Ladungsverhältnis als auch die DEAE-Dextran-Konzentration optimiert werden muss, um eine synergistische Verbesserung der Transfektion zu erzielen.

Beispiel 61: Transfektion von DNA unter Verwendung von Dendrimeren im Vergleich zu LIPOFECTIN™ (Fig. 36).

[0593] In diesem Beispiel wurden 5 μg DNA mit G 8 (NH_3)-Dendrimeren bei einem Ladungsverhältnis von 5:1 komplexiert und verwendet, um fünf unterschiedliche Zelllinien zu transfizieren. Die in Fig. 36 gezeigte Transfektion der fünf Zellarten wurde mit der von LIPOFECTIN™-vermittelten Transfektion verglichen. Außerdem wurde die durch DEAE-Dextran gesteigerte Transfektion des DNA:Dendrimer-Komplexes mit der Transfektion bei Verwendung des Komplexes allein verglichen. In Fig. 36 werden die Transfektionsmittel mit den folgenden Nummern bezeichnet:

1 ist LIPOFECTIN™ in zwei verschiedenen Konzentrationen (20 μg und 2 μg);
2 ist Dendrimer und DEAE-Dextran;
3 ist nur Dendrimer;
4 ist nur DEAE-Dextran als Kontrolle und
5 ist Plasmidkontrolle.

[0594] Wie in Fig. 36 ersichtlich ist, war die Transfektion unter Verwendung des DNA:Dendrimer-Komplexes in Gegenwart von DEAE-Dextran der Transfektion, die mit LIPOFECTIN™ bei entweder 2 oder 20 μg pro Testwell erzielt wurde, in allen Zellen außer den humanen HMEC-1-Zellen weit überlegen. Die Transfektion von DNA:Dendrimer-Komplexen in Gegenwart von DEAE-Dextran war auch besser als die, welche unter Verwendung von DNA-Dendrimer allein erhalten wurde. In manchen Zellen, z.B. Ratte:Klon9, Maus:NIH3T3 und Maus:10-1 ist die Transfektion bei alleiniger Verwendung von DNA:Dendrimer-Komplexen derjenigen überlegen, die bei Verwendung von LIPOFECTIN™ mit entweder 2 oder 20 μg erzielt wird. Dies zeigt, dass DNA:Dendrimer-Komplexe verwendet werden können, um eine breite Vielfalt von Zellen zu transfizieren; es deutet jedoch darauf hin, dass die Effizienz der Transfektion zwischen verschiedenen Zelltypen variieren kann.

Beispiel 62: Transfektion weiterer Zelllinien, die mit üblichen erhältlichen Transfektionsmitteln schwer zu transfizieren sind (Fig. 37).

[0595] Die Transfektion weiterer Zelllinien, die sich mit anderen Techniken als schwierig zu transfizieren erwiesen haben, wurde mit DNA:Dendrimer-Komplexen untersucht. Die DNA wurde mit G 8 (NH_3)-Dendrimeren bei einem 1:5 DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis komplexiert und das Ausmaß, mit welchem die DNA:Dendrimer-Komplexe die Zelllinien NRK52E und YB2 transfizierten, wurde mit der Transfektion derselben Zellen mit dem kommerziell erhältlichen Transfektionsmittel LIPOFECTIN™ bei 20 μg oder 2 μg verglichen. In Fig. 37 sind die Mittel wie in Fig. 36 nummeriert.

[0596] Die Transfektionsergebnisse sind durch Lumineszenz in relativen Lichteinheiten pro μg Protein in Fig. 37 angegeben. Die besten Ergebnisse in allen Zellen wurden unter Verwendung des DNA-Dendrimer-Komplexes in Verbindung mit DEAE-Dextran erzielt. Während LIPOFECTIN™, eine effiziente Transfektion in der NRK52E-Zelllinie zeigte, funktionierte es bei den YB2-Zelllinien nicht, bei denen die Leistung des DNA:Dendrimer-Komplexes in DEAE-Dextran weit überlegen war. Es sollte nochmals festgestellt werden, dass sich die Transfektionseffizienz insgesamt zwischen den verschiedenen Zelllinien unterschied.

Beispiel 63: Vergleich der DNA-Transfektion bei Verwendung von Dendrimeren mit der bei zwei verschiedenen Lipidmitteln: LIPOFECTIN™ und LIPOFECTAMINE™ (Fig. 38).

[0597] In diesem Beispiel wurden RAT2-Zelllinien mit der RSV-luc DNA transfiziert, die entweder mit G 8 (NH_3)-Dendrimer oder G 11 (EDA)-Dendrimer komplexiert war. Ladungsverhältnisse von 1:1, 1:5 und 1:10 (DNA:Dendrimer) wurden untersucht. In manchen Fällen wurde DEAE-Dextran verwendet, um die Transfekti-

on zu steigern. Die Transfektionsergebnisse werden mit der Transfektion bei Verwendung von 2, 10 und 20 µl an LIPOFECTIN™ oder 2, 12,5 und 25 µl LIPOFECTAMINE™ verglichen.

[0598] Die in Fig. 38 gezeigten Ergebnisse zeigen den exponentiellen Grad, mit dem die DNA transfiziert wird, wenn sie mit Dendrimeren in DNA zu Dendrimer-Ladungsverhältnissen von 1:5 oder 1:10 in Gegenwart von DEAE-Dextran komplexiert wird. LIPOFECTAMINE™ erzielte eine Transfektion, war jedoch über einen sehr begrenzten Bereich von Konzentrationen wirksam. LIPOFECTIN™ zeigte in dieser Zelllinie eine minimale Aktivität.

Beispiel 64: Auswirkung des Permeabilisierens von Zellmembranen mit DMSO auf die Effizienz der Transfektion im Vergleich zu DEAE-Dextran (Fig. 39).

[0599] Um die Annahme zu testen, dass DEAE-Dextran lediglich als ein Perturbations- oder Permeabilisierungsmittel wirkt, wurde die Transfektion von RAT2-Zellen mit DNA, die mit einem G 9 (NH_3)-Dendrimer komplexiert war, in Gegenwart und Abwesenheit einer DMSO-Behandlung der Zellen verglichen. Die in Fig. 39 gezeigten Ergebnisse zeigen eine dreifache Steigerung der Transfektion unter Verwendung von DEAE-Dextran im Vergleich zur Transfektion ohne Dextran. Tatsächlich hatte DMSO keine Auswirkung auf die Transfektion in Abwesenheit von DEAE-Dextran. Daher ist die DEAE-Dextran-Steigerung nicht nur auf Zellperturbation oder -permeabilisation zurückzuführen.

[0600] Interessanterweise scheint die Kombination von DMSO und DEAE-Dextran auf die Transfektion von DNA, die mit Dendrimer komplexiert ist, weiter synergistisch zu wirken, besonders bei den 1:5 und 1:10 DNA zu Dendrimer-Ladungsverhältnissen. Dies legt nahe, dass diese beiden Mittel durch unterschiedliche Mechanismen wirken.

Beispiel 65: Die Verwendung von konjugierten Dendrimeren, um Zellen zu transfizieren (Fig. 40 und Fig. 41).

[0601] Die Konjugation eines Zielsteuerungsmittels (Galaktosetrisaccharid) an Dendrimere beeinträchtigte nicht die Bildung eines stabilen DNA:Dendrimer-Komplexes (Fig. 41) und konnte eingesetzt werden, um die Transfektionseffizienz zu steigern (Fig. 40). In diesem Beispiel wurde G 11 (EDA)-Dendrimer mit Galaktosetrisaccharid konjugiert. DNA wurde anschließend mit dem markierten Dendrimer komplexiert und der Komplex wurde verwendet, um RAT2-, HepG 2-, NIH3T3- und AL-Zellen zu transfizieren. Nicht konjugierte Dendrimere wurden ebenfalls mit DNA komplexiert und als Kontrollen verwendet. Die in Fig. 40 gezeigten Ergebnisse demonstrieren, dass die Bindung eines Zielsteuerungsmittels die Transfektion von HepG 2- und AL-Zellen, die den Rezeptor für Galactosetrisaccharid exprimieren, fördert.

[0602] Die DNA:Dendrimer-Komplexe wurden auch einer Elektrophorese unterzogen. In Fig. 41 wurde 1 µg DNA mit G 11 (EDA)-Dendrimer mit oder ohne ein Zielsteuerungsmittel komplexiert, wie in Tabelle XXIII folgt:

Tabelle XXIII

Linie Nr.	Konzentration in µM an Dendrimer
1	nur DNA
2	0,1[a]
3	0,05[a]
4	0,025[a]
5	0,1[b]
6	0,05[b]
7	0,025[b]

a= nicht konjugiert

b= konjugiert

[0603] Bei sehr niederigen Dendrimer-Konzentrationen, d.h. hohen DNA zu Dendrimer-Ladungsverhältnissen, wurden keine stabilen Komplexe gebildet (wie erwartet würde), weder mit dem gerichteten, d.h. unkonjugierten Dendrimer noch mit dem Galactosetrisaccharid-konjugierten Dendrimer (siehe Linien 3, 4, 6 und 7). Es wurden jedoch sowohl mit den unkonjugierten als auch mit den konjugierten Dendrimeren bei entsprechenden Ladungsverhältnissen stabile Komplexe gebildet (siehe Linien 2 und 5 von Fig. 41). Dies deutet die mögliche

Verwendbarkeit von konjugierten Dendrimeren für eine zielgerichtete Transfektion an.

Beispiel 66: Auswirkung von Serum auf die nicht-zielgerichtete Transfektion (Fig. 42).

[0604] Die Notwendigkeit von Zielsteuerungsmitteln in vivo wird in diesem Beispiel veranschaulicht, in dem die Transfektion unter Verwendung von DNA:Dendrimer G 8 (NH_3)-Komplexen in variierenden Konzentrationen von Serum durchgeführt wurde. Die in Fig. 42 gezeigten Ergebnisse zeigen, dass eine Erhöhung der Serum-Konzentrationen die Transfektion von RAT2-Zellen mit DNA:Dendrimer-Komplexen selbst in Gegenwart von DEAE-Dextran hemmt. Somit muss ein anderes Verfahren wie beispielsweise ein Zielsteuerungsmittel verwendet werden, um eine Adhäsion von DNA:Dendrimer-Komplexen an Zellen in vivo zu vermitteln.

Beispiel 67: Auswirkung möglicher Zielsteuerungseinheiten und anderer Dendrimer-Oberflächenmodifikationen auf die Transfektionseffizienz (Fig. 43).

[0605] In diesem Beispiel wurden G 5 und G 6 (NH_3)-Dendrimere mit 20 Biotinen pro Dendrimer, 100 Pyruvaten pro Dendrimer oder 64 Pyruvaten pro Dendrimer konjugiert oder sie wurden alternativ auf ihrer Oberfläche durch Umsetzung von 25% ihrer oberflächenfunktionellen Aminogruppen mit Acrylsäure modifiziert. Die Dendrimere wurden anschließend verwendet, um die RSV-luc Plasmid-DNA zu komplexieren und RAT2-Zellen zu transfizieren. Das Ausmaß der Transfektion ist durch die relativen Lichteinheiten pro µg Protein gezeigt. Alle Versuche zur Transfektion wurden in Gegenwart von DEAE-Dextran durchgeführt. Die Ladungsverhältnisse auf substituierten Dendrimeren wurden so ermittelt, als ob keine Substitution von negativer Funktionalität durchgeführt worden wäre. Die in Fig. 43 gezeigten Transfektionsergebnisse zeigen, dass diese Oberflächenmodifikationen die Transfektion nicht nachteilig beeinflussen, verglichen mit einer Transfektion unter Verwendung eines nicht-modifizierten G 6 (NH_3)-Dendrimers.

Beispiel 68: Beständigkeit von LUCIFERASE™-Aktivität nach Dendrimer-vermittelter Transfektion (Fig. 44).

[0606] In diesem Beispiel wurde der Zeitverlauf der LUCIFERASE™-Aktivität in RAT2-Zellen, die unter Verwendung von DNA:Dendrimer-Komplexen mit und ohne DEAE-Dextran transfiziert wurden, ermittelt. Die Aktivität wurde nach 21 Stunden, 45 Stunden, 69 Stunden und 141 Stunden gemessen. Die Ergebnisse sind in Fig. 44 gezeigt.

[0607] Sowohl mit als auch ohne DEAE-Dextran war das Ausmaß der Transfektion für DNA, die mit Dendrimer komplexiert war wesentlich größer, insbesondere nach 21 und 45 Stunden als für DNA, die alleine transfiziert wurde (Plasmidkontrolle). Das Ladungsverhältnis jedes Komplexes war 1:10. Die Ergebnisse waren besonders eindeutig für die DNA:Dendrimer-Transfektion in Gegenwart von DEAE-Dextran nach 21 und 45 Stunden. Dies verdeutlicht, dass Gene über längere Zeiträume exprimiert werden, wenn sie mit Dendrimeren transfiziert werden.

Beispiel 69: Zytotoxizität (Fig. 45 und Fig. 46)

[0608] In diesem Beispiel wurden Tests durchgeführt, um die Zytotoxizität von DNA:Dendrimer-Komplexen mit und ohne DEAE-Dextran zu ermitteln, an mehreren unterschiedlichen Zelltypen: RAT2-Zellen (Fig. 45), Clone9-Zellen, NIH3T3-Zellen, 10-1-Zellen und COS7-Zellen (Fig. 46). In Fig. 45 zeigen die verschiedenen Nummern an der Balkengrafik: 1 ist Kontrollmedium; 2 ist Kontrollmedium mit DNA; 3 ist Dendrimer; 4 ist Dendrimer mit DNA; 5 ist DEAE-Dextran-Kontrolle; 6 ist DEAE-Dextran-Kontrolle mit DNA; 7 ist Dendrimer mit DEAE-Dextran; und 8 ist Dendrimer mit DNA mit DEAE-Dextran. Die normale Zelllebensfähigkeit in Kultur liegt bei 90 bis 95%. DNA-Dendrimer-Komplexe allein hatten eine geringe oder keine Wirkung auf die Zelllebensfähigkeit außer bei der Clone9-Zelllinie, bei der der Attritionsgrad sich mit DNA-Dendrimer-Komplexen ungefähr verdoppelte. Die Zugabe von DEAE-Dextran erhöhte die Zytotoxizität etwas, aber nicht ausreichend, um die außergewöhnliche Nützlichkeit dieser Kombination in vitro zu beeinträchtigen.

Beispiel 70: Aufnahme und zelluläre Lokalisierung von radiomarkierter DNA, die mit Dendrimer transfiziert wurde (**Fig.** 47).

[0609] In diesem Beispiel wurde radiomarkierte DNA (2,9 kb) in RAT2- und U937-Zellen transferiert unter Verwendung von G 8 (NH_3)-Dendrimer. Der gesamte Transfer in die Zelle ist in Fig. 47a–f aufgezeigt, zusammen mit Lokalisierungsergebnissen, die durch Aufteilen der Zellen in Membran, Kern und Zytoplasma-assoziierte Fraktionen erhalten wurden. Die Menge an radiomarkierter DNA im Kern und in den Membranfraktionen wurden so anschließend getrennt ermittelt.

[0610] In 47a–c wurden U937-Zellen transfiziert unter Verwendung von DNA allein (47a), DNA plus Dendrimer (47b) und DNA plus Dendrimer plus Natriumazid (47c). Dieselbe Serie von Transfektionen wurde für RAT2-Zellen in 47d, e und f entsprechend durchgeführt.

[0611] Die Ergebnisse zeigen nicht nur eine wesentliche zelluläre Aufnahme, wenn DNA und Dendrimer verwendet werden, sondern auch eine wesentliche Kernaufnahme (Fig. 47b und e). Die Energieabhängigkeit von DNA-modulierter Transfektion wurde durch die Zugabe von Natriumazid gezeigt (Fig. 47c und f), wodurch der Grad der DNA-Aufnahme auf ungefähr denjenigen verringert wurde, der beobachtet wurde, wenn DNA allein mit den Zellen inkubiert wurde (Fig. 47a und d).

Beispiel 71: Photomikrographien von transfizierten Zellen (Fig. 48a, Fig. 48b, Fig. 49, Fig. 50a und Fig. 50b).

[0612] In diesem Beispiel wurden Photomikrographien von D5-Mausmelanomazellen und RAT2-Rattenfibroblastzellen aufgenommen, die mit RSV-β-gal Plasmid-DNA transfiziert wurden unter Verwendung von G 11 (EDA) dichten Sterndendrimeren bzw. G 8 (NH_3)-dichten Sterndendrimeren. Zellen, die erfolgreich transfiziert wurden, erscheinen als dunkle (blaue) Zellen in den **Fig.** 48–50.

[0613] In Fig. 48a wurde die Transfektion von D5-Zellen unter Verwendung von DNA-Dendrimer-Komplexen, durchgeführt, die 1 µg an genetischem Material pro Well enthielten. Fig. 48b zeigt, dass ein größerer Anteil von Zellen transfiziert wird, wenn die Menge von DNA in dem Komplex auf 5 µg pro Well erhöht wird. Fig. 49 ist eine vergrößerte Ansicht verschiedener transfizierter Zellen, bei denen 3 µg an genetischem Material pro Well verwendet wurden.

[0614] Fig. 50a ist eine Photomikrographie von RAT2-Rattenfibroblastzellen, die mit 3 µg an genetischem Material pro Well transfiziert wurden. Fig. 50b ist eine Kontrolle, die nicht-transfizierte Zellen zeigt. Diese Studien zeigen, dass die überwiegende Mehrheit von Zellen in Kultur (50–95%) transfiziert wurde, wenn DNA:Dendrimer-Komplexe verwendet werden.

Beispiel 72: Vergleich verschiedener Verfahren, um stabil transfizierte D5-, RAT2-, MSU1.2-Zelllinien zu erhalten (Fig. 52, Fig. 53, Fig. 54, 55 und Fig. 59).

[0615] In diesem Beispiel wurde eine Transfektion von D5-, RAT2-, MSU1.2-Zelllinien bewirkt unter Verwendung von 5 oder 10 µg eines Plasmids pro Kulturwell, das Resistenzgene für G 418 Antibiotikum (Neomycin) -Resistenz und β-Galaktosidase- oder Mygromycin B-Resistenz enthält. In Fig. 52 werden die folgenden Transfektionstechniken bei Verwendung einer D5-Zelllinie und den gezeigten Mengen an RSV-β-gal Plasmid-DNA pro Well, verglichen:

1 10 µg in Gegenwart von 0,125 M Kalziumphosphat;
2 10 µg in Gegenwart von 0,5 µM DEAE-Dextran
3 5 µg komplexiert mit 0,5 µM an G 8 (NH_3)-Dendrimer bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:13; und
4 10 µg komplexiert mit 0,5 µM an G 8 (NH_3)-Dendrimer bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:7.

[0616] In Fig. 53 werden die folgenden Transfektionstechniken verglichen unter Verwendung einer RAT2-Zelllinie und den angegebenen Mengen an Plasmid-DNA pro Well:

1 10 µg in Gegenwart von 0,125 M Kalziumphosphat;
2 10 µg in Gegenwart von 0,5 µM DEAE-Dextran;
3 5 µg komplexiert mit 0,2 µM G 8 (NH_3)-Dendrimer bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:6;
4 10 µg komplexiert mit 0,2 µM G 8 (NH_3)-Dendrimer bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:3;
5 5 µg komplexiert mit 0,5 µM G 8 (NH_3)-Dendrimer bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:13; und
6 10 µg komplexiert mit 0,5 µM G 8 (NH_3)-Dendrimer bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:7.

[0617] DEAE-Dextran, 0,5 µM, wurde in das Transfektionsmedium eingefügt, nachdem genetisches Material mit Dendrimer komplexiert wurde.

[0618] Die Zellen wurden in ein Medium gegeben, welches entweder G 418 Antibiotikum oder Hygromycin B enthielt. Diese Zellen besitzen einen 24 Stunden-Teilungszyklus (d.h. sie replizieren alle 24 Stunden). Nach 4 Wochen wurden die Kulturen auf die Anzahl von Klonen, welche G 418 Resistenz und β-Galaktosidase- und/oder Hygromycin-Resistenz exprimieren, getestet.

[0619] In Fig. 54 werden die folgenden Transfektionstechniken verglichen unter Verwendung einer MSU1.2-Zelllinie und den angegebenen Mengen an EBV-A-Hygromycin Plasmid-DNA pro Well:

1 5 µg in Gegenwart von 0,5 µM DEAE-Dextran
2 5 µg in Gegenwart von 0,125 µM Calziumphosphat
3 5 µg komplexiert mit G 11 (EDA)-Dendrimer bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:2
4 5 µg komplexiert mit G 11 (EDA)-Dendrimer bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:5
5 5 µg komplexiert mit G 11 (EDA)-Dendrimer bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:10
6 5 µg komplexiert mit G 11 (EDA)-Dendrimer bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:20
7 5 µg komplexiert mit 10 µg LIPOFECTAMINE™

[0620] Dies zeigt, dass die DNA-Dendrimer-Transfektion bei der Bildung stabil transfizierter Zelllinien effizienter ist als LIPOFECTAMINE™.

[0621] Fig. 59 veranschaulicht die in Fig. 52 gezeigten Transfektionen. Die folgenden Transfektionstechniken wurden verglichen unter Verwendung einer D5-Zelllinie und mit den angegebenen Mengen an RSV-β-gal Plasmid-DNA pro Well:

1 10 µg in Gegenwart von 0,125 M Kalziumphosphat
2 10 µg in Gegenwart von 0,5 µM DEAE-Dextran
3 5 µg komplexiert mit 0,5 µM G 8 (NH_3)-Dendrimer bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:13
4 10 µg komplexiert mit 0,5 µM an G 8 (NH_3)-Dendrimer bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:7
5 5 µg komplexiert mit 0,2 µM G 8 (NH_3)-Dendrimer bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:6

[0622] Bemerke die erhöhte Anzahl von KIonen, die durch Dendrimertransfektion gebildet werden.

[0623] **Fig.** 55 veranschaulicht die Transfektion einer D5-Zelllinie unter Verwendung von ICAM-Expressionsplasmid und G 11 (EDA)-Dendrimer bei einem DNA zu Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:10. KIone, welche ICAM-Gen exprimieren wurden zunächst auf Neomycinresistenz selektiert. Neomycin-resistente KIone wurden weiter analysiert durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) unter Verwendung von mit Fluorescein konjugiertem Anti-ICAM-Antikörper. Die folgenden Zelllinien und KIone wurden verglichen:

1 D5-Zelllinie, negativ (nicht gefärbt) für Anti-ICAM-Antikörper
2 IC-21-Zelllinie, positiv angefärbt mit Anti-ICAM-Antikörper
3 Klon #23 nach Transfektion mit 15 µg DNA mit G 11 (EDA)-Dendrimer bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:10
4 Klon #27, erhalten wie oben beschrieben
5 Klon #31, erhalten wie oben beschrieben
6 Klon #9, erhalten wie oben beschrieben.

[0624] Profile positiv angefärbter Zellen, gepunktet, wurden über das Profil der ICAM-Negativkontroll-D5-Zelllinie (Fig. 55a), die für die Transfektion verwendet wurde, gelegt. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine DNA:Dendrimer-Transfektion geeignet war, um stabile Zelllinien zu bilden, die große Mengen an ICAM exprimieren von transfiziertem Gen.

[0625] Wie in den Fig. 52, Fig. 53, Fig. 54, 55 und Fig. 59 ersichtlich ist, ist die Anzahl der Klone, welche nach 4 Wochen weiterhin sowohl G 418 Resistenz als auch das β-Galaktosidasegen, Hygromycinresistenz und das Gen für ICAM exprimieren bemerkenswert, falls die Transfektion gemäß der vorliegenden Erfindung, d.h. durch Komplexieren des genetischen Materials mit dendritischen Polymeren erzielt wurde, im Vergleich zu Transfektionsversuchen nur in Gegenwart von Calziumphosphat oder DEAE-Dextran oder LIPOFECTAMINE™. Dies zeigt, dass eine Transfektion von Zellen mit DNA:Dendrimer bei der Bildung stabil transfizierter Zelllinien sehr viel effizienter als andere erhältliche Techniken ist.

Beispiel 73: Vergleich der Transfektion von COS1- und RAT2-Zellen unter Verwendung verschiedener Dendrimere und Dendrimerkombinationen bei verschiedenen Ladungsverhältnissen und unter drei unterschiedlichen Bedingungen (Fig. 61A und Fig. 61B).

[0626] In diesem Beispiel wurde 1 µg RSV-luc pro Testwell mit den angegebenen Dendrimeren oder Kontrollen und bei den angegebenen Ladungsverhältnissen, die in Tabelle XXVI angegeben sind, komplexiert:

Tabelle XXVI

Probe Nummer	Transfektionsmittel	genetisches Material:Dendrimer-Ladungsverhältnis
1	ein Aggregat aus G 8 (NH_3) und G 8,5 (NH_3)-Dendrimeren bei einem G 8:G 8,5 Ladungsverhältnis von 50 (Probe 13 aus Beispiel 74 unten)	1:10
2	ebenso wie Probe 1 oben	1:20
3	ebenso wie Probe 1 oben	1:50
4	ein Aggregat aus G 6 (NH_3) und G 6,5 (NH_3)-Dendrimeren bei einem G 6:G 6,5 Ladungsverhältnis von 100 (Probe 8 aus Beispiel 74 unten)	1:10
5	ebenso wie Probe 4 oben	1:20
6	ebenso wie Probe 4 oben	1:50
7	Probe Q aus Beispiel 42, eine polydisperse Dendrimermischung	1:10
8	ebenso wie Probe 7 oben	1:50
9	G 10 (NH_3)	1:20
10	G 10 (NH_3)	1:50
11	LIPOFECTAMINE™	nicht anwendbar: verwendet entsprechend Herstellerempfehlungen

[0627] Die vorherigen Kombinationen wurden verwendet, um sowohl COS1- (Fig. 61A) als auch RAT2- (Fig. 61B) Zellen unter drei verschiedenen Bedingungen zu transfizieren. Bei allen drei Bedingungen war DMEM das essentielle verwendete Medium. In den durch die gesprenkelten Balken in den Fig. 61A und Fig. 61B gezeigten Beispielen wurden die genetisches Material:Dendrimer-Komplexe alleine verwendet. In den durch die diagonalschraffierten Balken dargestellten Beispielen wurde Transfektion in Gegenwart von 0,5 µM DEAE-Dextran durchgeführt. In den durch die ausgefüllten Balken dargestellten Beispielen wurde die Transfektion in Gegenwart von 25 µg pro ml Chloroquine durchgeführt.

[0628] Die Ergebnisse aus diesem Experiment zeigen, dass die Effektivität von Chloroquine eine Funktion der transfizierten Zelle ist (Fig. 61B); und dass in zumindest manchen Zellen die Verwendung von Chloroquine deutlich überlegene Transfektionsergebnisse ergibt (Fig. 61A).

Beispiel 74: Herstellung von pH-kontrollierten Dendrimeraggregaten und Verwendung dieser Aggregate in Transfektionsstudien.

[0629] Dendrimeraggregate wurden aus Lösungen von Dendrimeren mit terminalen Aminogruppen und Dendrimeren mit Natriumcarboxylat-Gruppen hergestellt. Das Verhältnis der unterschiedlichen in diesem Beispiel verwendeten Dendrimere ist unten in Tabelle XXIV gezeigt.

Tabelle XXIV

Beispiel	G n,5 NH_3	G n NH_3	Ladungsverhältnis G n/G n,5
1	G 6,5	G 6	0,5
2	G 6,5	G 6	1
3	G 6,5	G 6	2,5
4	G 6,5	G 6	5
5	G 6,5	G 6	10
6	G 6,5	G 6	25
7	G 6,5	G 6	50
8	G 6,5	G 6	100
9	G 6,5	G 6	200
10	G 6,5	G 8	25
11	G 6,5	G 8	50
12	G 6,5	G 8	100
13	G 8,5	G 8	50
14	G 8,5	G 8	100
15	*	G 6	*
16	*	G 8	*

* nicht anwendbar

[0630] Die ",5"-Generationsnummer (z.B. G 8,5 und G 6,5) zeigt, dass es sich bei diesen um halbe Generation-Dendrimere handelt (in diesem Fall halbe Generation PAMAM-Dendrimere). Bei der halben Generationsreihe sind diese Dendrimere Carboxylat-terminiert, während sie bei der ganzen Generationsreihe Amino-terminiert sind.

[0631] Eine typische Dendrimeraggregat-Formulierung wird im Folgenden diskutiert. Es wurden Stammlösungen des G 8,5 (NH_3)-Dendrimers (2,34 Gew.-%) und des G 8 (NH_3)-Dendrimers (2,28 Gew.-%) in einem TRIS-Puffer (pH = 7,4) hergestellt. Um die Dendrimeraggregate mit einem 50:1 Ladungsverhältnis herzustellen, wurden 8,8 mg der G 8,5 (NH_3)-Dendrimerlösung mit 15,4 mg der G 8 (NH_3)-Dendrimerlösung gemischt. Die resultierende Lösung wurde anschließend mit TRIS-Puffer auf ein Gesamtlösungsgewicht von 2,0689 g verdünnt. Die Gesamtlösungskonzentration betrug 0,74 Gew.-%. Fig. 56 zeigt die Luciferaseaktivität in RAT2-Zellen nach der Transfektion mit den Dendrimeraggregaten. Die aus G 6,5 (NH_3)- und G 8 (NH_3)-Dendrimeren gebildeten Aggregate zeigen ebenso wie solche die aus G 8,5 (NH_3)- und G 8 (NH_3)-Dendrimeren gebildet wurden eine stark erhöhte Transfektionseffizienz im Vergleich zu den Eltern ganze Generation-Dendrimeren selbst, falls bei der Aggregatformulierung das entsprechende Verhältnis von Amino-terminierten zu Natriumcarboxylat-terminalen Dendrimeren verwendet wird.

Beispiel 75: Herstellung von Lysin-modifizierten Dendrimeren und Transfektionsstudien unter Verwendung der modifizieren Dendrimervektoren (Fig. 57).

[0632] Eine Lösung von G 7 (NH_3) (0,50 g, 11 µmol) wasserfreiem Dimethylformamid wurde heftig gerührt, während der p-Nitrophenylester von N,N'-di-t-Butoxycarbonyl-L-lysin rasch zugegeben wurde. Nach ungefähr 5 min wurde der pH-Wert der Mischung mit Triethylamin auf ungefähr 8,5 eingestellt. Die Mischung wurde für 24 Stunden gerührt, anschließend langsam zu Wasser gegeben unter heftigem Rühren. Triethylamin (0,6 ml) und gesättigte NaCl (35 ml) wurden anschließend zu der wässrigen Mischung zugegeben, welche anschließend für 2 Tage gerührt wurde. Der Überstand wurde abdekantiert und das gewonnene Rohprodukt wurde im Vakuum bei 40°C für 12 Stunden getrocknet. Das getrocknete Rohprodukt wurde heftig gerührt in Diethylether und anschließend filtriert, während das Produkt mit weiterem Diethylether gespült wurde. Die NMR-Analyse des getrockneten festen Produkts (0,96 g, 78% Ausbeute) war in Übereinstimmung mit der Bindung von N,N'-di-t-Butoxycarbonyl-L-lysingruppen an der Oberfläche des Dendrimers.

[0633] Die t-Butoxycarbonyl-Schutzgruppen wurden anschließend von den Lysinresten entfernt, indem das Produkt (0,35 g, 3,3 µmol) in wasserfreiem Methylenchlorid gelöst wurde und anschließend langsam Trifluoressigsäure (3 ml) zu der Mischung zugegeben wurde. Die entstehenden Gase wurden mit einem Stickstoffstrom aus dem Kolben gespült. Nach 3 Stunden wurde die Mischung in einem Stickstoffstrom (40°C) kon-

zentriert und die Probe wurde anschließend im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde gereinigt durch Dialyse (10 000 Molekulargewicht Cutoff Membran) für 24 Stunden gegen 1 Liter Wasser. Nach der Entfernung von teilchenförmigen Feststoffen durch Filtration und Konzentrieren im Vakuum wurde ein farbloser Feststoff gesammelt (0,26 g, 69% Ausbeute). Die Analyse des Produkts durch ^{1}H- und ^{13}C-kernmagnetische Resonanzspektroskopie, Größenexklusionschromatographie, Kapillarelektrophorese und Polyacrylamidgelelektrophorese deuteten alle die korrekte Struktur an.

[0634] Fig. 57 zeigt die relativen Lichteinheiten pro µg an gebildetem Protein für die Transfektion in RAT2-Zellen bei Verwendung des Lysin-modifizierten G 7 (NH_3)-Dendrimers im Vergleich zu nicht-modifizierten G 7 (NH_3)- bis G 10 (NH_3)-Dendrimeren (alle bei einem DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnis von 1:10 und in Gegenwart von DEAE-Dextran). Die Lysin-modifizierten Dendrimere zeigen eine überraschend hohe Transfektionseffizienz im Vergleich zu dem unmodifizierten Dendrimer derselben Generation und tatsächlich ist die Transfektionseffizienz gleich der eines nicht-modifizierten G 10 (NH_3)-Dendrimers.

Beispiel 76: Transfektionseffizienz in COS1- und RAT2-Zelllinien unter Verwendung polydisperser Mischungen von Dendrimeren (Fig. 58).

[0635] In diesem Beispiel wurde DNA mit G 11 (EDA)-Dendrimer, einer Mischung aus G 11, G 3, G 2 und G 1 (EDA)-Dendrimeren und einer polydispersen Mischung von Dendrimeren komplexiert, wie in Tabelle XXV unten angegeben.

Tabelle XXV

Probe	Dendrimer oder Kontrolle	DNA:Dendrimer Ladungsverhältnis
1	G 11 (EDA)	1:10
1	G 11 (EDA)	1:20
1	G 11 (EDA)	1:100
2	Mischung 1 (EDA)[a]	1:10
2	Mischung 1 (EDA)[a]	1:20
2	Mischung 1 (EDA)[a]	1:100
3	Mischung 2 (EDA)[b]	1:10
3	Mischung 2 (EDA)[b]	1:20
3	Mischung 2 (EDA)[b]	1:100
4	Q[c]	1:10
4	Q[c]	1:20
4	Q[c]	1:100
5	LIPOFECTAMINE™	6 L
5	LIPOFECTAMINE™	10 L

a=Mischung aus G 1 (EDA), G 2 (EDA) und G 3 (EDA)-Dendrimeren

b=Mischung aus 90 % G 11 (EDA) und 10 % Mischung 1

c=Mischung von Dendrimeren, wie in Beispiel 42 beschrieben, eine polydisperse Dendrimermischung

[0636] Die bei Transfektionen unter Verwendung dieser Komplexe erhaltenen Ergebnisse sind in Fig. 58 gezeigt. In COS1-Zellen war die mit der polydispersen Mischung erzielte Transfektionseffizienz viel höher als die, welche mit G 11 (EDA), der Mischung aus G 11, G 1, G 2 und G 3 (EDA) oder LIPOFECTAMINE™ erzielt wurde. Dieser Unterschied ist besonders groß bei DNA:Dendrimer-Ladungsverhältnissen von 1:10 und 1:20. Ein Vergleich der Ergebnisse in COS1- und RAT2-Linien zeigt jedoch Unterschiede bei den Transfektionseffizienzen in den beiden Zellen unter Verwendung derselben Art von Dendrimerzubereitungen. Beispielsweise scheint die polydisperse Mischung (Dendrimer Q aus Beispiel 42) weniger effektiv bei der Transfektion von RAT2-Zellen als bei der von COS1-Zellen zu sein. Diese Eigenschaft kann möglicherweise nützlich sein beim Gentransfer.

Beispiel 77: (**Fig.** 60, Felder 1 und 2).

[0637] Um zu ermitteln, ob DNA:Dendrimer-Komplexe verwendet werden können, um Zellen in vivo zu transfizieren, wurden D5-Melanomazellen subkutan in syngenetische Mäuse geimpft. Tumore mit einem ungefähren Durchmesser von 0,5 cm entwickelten sich und wurden direkt injiziert mit RSV-β-gal DNA, entweder allein oder komplexiert an G 11 (EDA)-Dendrimer und Dendrimer allein als Kontrolle. 24 Stunden später wurden die Tiere getötet und die Tumore wurden in Formalin fixiert, sektioniert und angefärbt mit X-gal, um die Expression von B-Galaktosidaseenzym zu detektieren. Wie in **Fig.** 60, Feld 1 ersichtlich ist, zeigten zahlreiche Zellen Hinweise auf Transfektion (X-gal-Anfärbung) in dem Tumor, der mit dem DNA:Dendrimer-Komplex injiziert wurde im Vergleich zu Anfärbungs-Hintergrund (Dendrimer-injizierter Tumor, Feld 2). In keinem der Tumore wurde ein Hinweis auf Toxizität oder Gewebeschädigung festgestellt. Das Anfärben von Tumoren, die mit DNA allein injiziert wurden, zeigte keine Anzeichen einer Expression was zeigt, dass die Transfektion in vivo durch die Verwendung von DNA:Dendrimer-Komplexen gesteigert wurde.

Beispiel 78: Vergleich von LUCIFERASE™-Aktivität in RAT2-Zellen nach der Transfektion mit Lysin-basierten unsymmetrisch verzweigten Dendrimeren und G 8 (NH_3) und G 11 (EDA)-dichten Sterndendrimeren (**Fig. 62**).

[0638] In diesem Beispiel wurden Lysin-basierte, unsymmetrisch verzweigte Dendrimere mit dichten Sterndendrimeren im Hinblick auf ihre Transfektionsfähigkeit verglichen. Die Lysin-basierten Dendrimere wurden generell entsprechend der Instruktionen in den US-Patenten 4,289,872, 4,360,646 und 4,410,688 hergestellt. Die Transfektion wurde mit und ohne Vorhandensein von DEAE-Dextran durchgeführt. Das Ladungsverhältnis von DNA zu Dendrimer betrug in allen Fällen 1:5. Es wurde ausreichend DNA:Dendrimer-Komplex verwendet, um 1 µg an DNA pro Testwell zu erhalten. Die in den Spalten 1 bis 16 verwendeten Dendrimere sind wie folgt:

1 ein G 1 TREN-Kern Lysin-basiertes unsymmetrisch verzweigtes Dendrimer;
2 ein G 2 TREN-Kern Lysin-basiertes unsymmetrisch verzweigtes Dendrimer;
3 ein G 3 TREN-Kern Lysin-basiertes unsymmetrisch verzweigtes Dendrimer;
4 ein G 4 TREN-Kern Lysin-basiertes unsymmetrisch verzweigtes Dendrimer;
5 ein G 5 TREN-Kern Lysin-basiertes unsymmetrisch verzweigtes Dendrimer;
6 ein G 1 BHA-Kern Lysin-basiertes unsymmetrisch verzweigtes Dendrimer Trifluoressigsäuresalz;
7 ein G 2 BHA-Kern Lysin-basiertes unsymmetrisch verzweigtes Dendrimer Trifluoressigsäuresalz;
8 ein G 3 BHA-Kern Lysin-basiertes unsymmetrisch verzweigtes Dendrimer Trifluoressigsäuresalz;
9 ein G 4 BHA-Kern Lysin-basiertes unsymmetrisch verzweigtes Dendrimer Trifluoressigsäuresalz;
10 ein G 5 BHA-Kern Lysin-basiertes unsymmetrisch verzweigtes Dendrimer Trifluoressigsäuresalz;
11 ein G 6 BHA-Kern Lysin-basiertes unsymmetrisch verzweigtes Dendrimer Trifluoressigsäuresalz;
12 ein G 7 BHA-Kern Lysin-basiertes unsymmetrisch verzweigtes Dendrimer Trifluoressigsäuresalz;
13 ein G 8 BHA-Kern Lysin-basiertes unsymmetrisch verzweigtes Dendrimer Trifluoressigsäuresalz;
14 ein G 8 BHA-Kern Lysin-basiertes unsymmetrisch verzweigtes dendrimerfreies Amin ohne Trifluoressigsäuresalz;
15 ein G 8 (NH_3)-dichtes Sterndendrimer; und
16 ein G 11 (EDA)-dichtes Sterndendrimer.

[0639] Wie in **Fig. 62** ersichtlich ist, beginnen die Lysin-basierten unsymmetrisch verzweigten Dendrimere zumindest bei dem TREN-Kern bei G 4 und G 5 eine merkliche Transfektion zu zeigen. Die Trifluoressigsäuresalze der unsymmetrisch verzweigten Dendrimere scheinen die Transfektion für die BHA-Kern-Dendrimere etwas zu hemmen. Das G 8 BHA-Kern-Dendrimer scheint in Abwesenheit von Trifluoressigsäuresalz eine gute Transfektion zu zeigen.

[0640] Ebenso wie bei dichten Sterndendrimeren zeigen die Lysin-basierten unsymmetrisch verzweigten Dendrimere alle eine überlegene Transfektion bei dem 1:5 DNA zu Dendrimer-Ladungsverhältnis in Gegenwart von DEAE-Dextran.

Patentansprüche

1. Dichtes Sternpolymerkonjugat, welches mindestens ein dichtes Sternpolymer umfasst, das assoziiert ist mit mindestens einer Einheit von mindestens einem biologischen response-modifier, worin das Dendrimer mindestens ein in Lösungsmittel lösliches, radial symmetrisches Dendrimer umfasst, worin das Dendrimer mindestens eine Kernverzweigung aufweist, die von einem Kern ausgeht, wobei die Verzweigung mindestens eine terminale Gruppe aufweist, mit der Maßgabe, dass
(1) das Verhältnis von terminalen Gruppen zu den Kernverzweigungen zwei oder größer ist,
(2) die Dichte der terminalen Gruppen pro Volumeneinheit im Polymer mindestens das 1,5fache der Dichte ei-

nes gestreckten herkömmlichen Sternpolymers beträgt, welches den gleichen Kern und die gleichen Monomereinheiten und das gleiche Molekulargewicht und die gleiche Anzahl an Kernverzweigungen hat, worin jede dieser Verzweigungen des gestreckten herkömmlichen Sternpolymers nur eine terminale Gruppe trägt, und
(3) das molekulare Volumen nicht mehr als ca. 80% des molekularen Volumens des gestreckten herkömmlichen Sternpolymers beträgt, wie durch dimensionale Studien unter Verwendung maßstabgetreuer Corey-Pauling Molekül-Modelle bestimmt, und welches regelmäßige dendritsche Verzweigungen aufweist;
und worin der biologische response-modifier genetisches Material ist, ausgewählt aus Plasmiden, Phagen, Cosmiden, Genen und Fragmenten von Genen, sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA), ribosomale RNA (rRNA), katalytische RNA (cRNA), Small Nuclear RNA (snRNA), Messenger RNA (mRNA), Transfer RNA (tRNA), DNA- und RNA-Oligonukleotide (sowohl einzelsträngig als auch doppelsträngig) oder Oligomere und (Antisense) Oligonukleotide, Peptid-Nukleinsäuren (PNA) und substituierte Nukleinsäure-Oligonukleotide; wobei das Ladungsverhältnis von genetischem Material zu Dendrimer von 1:1 bis 1:100 ist; und worin das dichte Sternpolymer Partikel umfasst, deren Größen von 20 Å in ihrer kleinsten Größe bis 1000 Å in ihrer größten Größe betragen.

2. Konjugat nach Anspruch 1, worin zwei oder mehr biologische response-modifier vorhanden sind.

3. Konjugat nach Anspruch 2, worin das genetische Material sich zwischen mehreren dichten Sternpolymer-Partikeln erstreckt und dazu dient, diese zu verbinden.

4. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin das dichte Sternpolymer überwiegend Amino-funktionelle Oberflächengruppen umfasst.

5. Konjugat nach Anspruch 2, worin das dichte Sternpolymer eine Größe im Querschnitt von mindestens ca. 50 Å aufweist, wobei diese Größe die kleinste Größe des dichten Sternpolymers ist.

6. Konjugat nach Anspruch 1, worin das Ladungsverhältnis von genetischem Material zu Dendrimer von 1:1 bis 1:15 ist.

7. Dichtes Sternpolymer-Konjugat nach Anspruch 1, mit der Formel

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

worin:
jedes P ein dichtes Sternpolymer bedeutet;
x eine ganze Zahl von 1 oder größer bedeutet;
jedes M mindestens eine Einheit von einem biologischen response-modifier bedeutet, wobei der biologische response-modifier der gleiche biologische response-modifier oder ein unterschiedlicher biologischer response-modifier sein kann;
y eine ganze Zahl von 1 oder größer bedeutet;
jedes T ein oder mehr Zielsteuerungsmittel bedeutet;
e eine ganze Zahl von 1 oder größer bedeutet, und
* bedeutet, dass der biologische response-modifier mit dem dichten Sternpolymer assoziiert ist;
worin das dichte Sternpolymer mindestens ein in Lösungsmittel lösliches, radial symmetrisches dichtes Sternpolymer umfasst, worin das dichte Sternpolymer mindestens eine Kernverzweigung aufweist, die von einem Kern ausgeht, wobei die Verzweigung mindestens eine terminale Gruppe aufweist, mit der Maßgabe, dass
(1) das Verhältnis von terminalen Gruppen zu den Kernverzweigungen zwei oder größer ist,
(2) die Dichte der terminalen Gruppen pro Volumeneinheit im Polymer mindestens das 1,5fache der Dichte eines gestreckten herkömmlichen Sternpolymers beträgt, welches den gleichen Kern und die gleichen Monomereinheiten und das gleiche Molekulargewicht und die gleiche Anzahl an Kernverzweigungen hat, worin jede dieser Verzweigungen des gestreckten herkömmlichen Sternpolymers nur eine terminale Gruppe trägt, und
(3) das molekulare Volumen nicht mehr als ca. 80% des molekularen Volumens des gestreckten herkömmlichen Sternpolymers beträgt, wie durch dimensionale Studien unter Verwendung maßstabgetreuer Corey-Pauling Molekül-Modelle bestimmt, und welches regelmäßige dendritsche Verzweigungen aufweist;
und worin der biologische response-modifier genetisches Material ist, ausgewählt aus Plasmiden, Phagen, Cosmiden, Genen und Fragmenten von Genen, sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA), ribosomale RNA (rRNA), katalytische RNA (cRNA), Small Nuclear RNA (snRNA), Messenger RNA (mRNA), Transfer RNA (tRNA), DNA- und RNA-Oligonukleotide (sowohl einzelsträngig als auch doppelsträngig) oder Oligomere und (Antisense) Oligonukleotide, Peptid-Nukleinsäuren (PNA) und substituierte Nukleinsäure-Oligonukleotide; wobei das Ladungsverhältnis von genetischem Ma-

terial zu Dendrimer von 1:1 bis 1:100 ist; und worin das dichte Sternpolymer Partikel umfasst, deren Größen von 20 Å in ihrer kleinsten Größe bis 1000 Å in ihrer größten Größe betragen, mit der Maßgabe, dass der biologische response-modifier seine Wirksamkeit behält.

8. Dichtes Sternpolymerkonjugat nach Anspruch 1, mit der Formel

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

worin:
jedes C' die gleiche oder eine unterschiedliche Verbindungsgruppe bedeutet;
jedes C'' die gleiche oder eine unterschiedliche Verbindungsgruppe bedeutet;
g und k jeweils unabhängig eine ganze Zahl von 1 oder größer bedeuten;
e eine ganze Zahl von 1 oder größer bedeutet;
f und h jeweils unabhängig eine ganze Zahl von 0 oder größer bedeuten
- eine kovalente Bindung in Fällen bedeutet, in denen eine Verbindungsgruppe vorhanden ist;
jedes P ein dichtes Sternpolymer bedeutet;
x eine ganze Zahl von 1 oder größer bedeutet;
T ein Zielsteuerungsmittel bedeutet;
jedes M mindestens eine Einheit eines biologischen response-modifiers bedeutet;
y eine ganze Zahl von 1 oder größer bedeutet; und
* bedeutet, dass der getragene biologische response-modifier mit dem Polymer assoziiert ist;
worin das dichte Sternpolymer mindestens ein in Lösungsmittel lösliches, radial symmetrisches dichtes Sternpolymer umfasst, worin das dichte Sternpolymer mindestens eine Kernverzweigung aufweist, die von einem Kern ausgeht, wobei die Verzweigung mindestens eine terminale Gruppe aufweist, mit der Maßgabe, dass
(1) das Verhältnis von terminalen Gruppen zu den Kernverzweigungen zwei oder größer ist,
(2) die Dichte der terminalen Gruppen pro Volumeneinheit im Polymer mindestens das 1,5fache der Dichte eines gestreckten herkömmlichen Sternpolymers beträgt, welches den gleichen Kern und die gleichen Monomereinheiten und das gleiche Molekulargewicht und die gleiche Anzahl an Kernverzweigungen hat, worin jede dieser Verzweigungen des gestreckten herkömmlichen Sternpolymers nur eine terminale Gruppe trägt, und
(3) das molekulare Volumen nicht mehr als ca. 80% des molekularen Volumens des gestreckten herkömmlichen Sternpolymers beträgt, wie durch dimensionale Studien unter Verwendung maßstabgetreuer Corey-Pauling Molekül-Modelle bestimmt, und welches regelmäßige dendritsche Verzweigungen aufweist;
und worin der biologische response-modifier genetisches Material ist, ausgewählt aus Plasmiden, Phagen, Cosmiden, Genen und Fragmenten von Genen, sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA), ribosomale RNA (rRNA), katalytische RNA (cRNA), Small Nuclear RNA (snRNA), Messenger RNA (mRNA), Transfer RNA (tRNA), DNA- und RNA-Oligonukleotide (sowohl einzelsträngig als auch doppelsträngig) oder Oligomere und (Antisense) Oligonukleotide, Peptid-Nukleinsäuren (PNA) und substituierte Nukleinsäure-Oligonukleotide; wobei das Ladungsverhältnis von genetischem Material zu Dendrimer von 1:1 bis 1:100 ist; mit der Maßgabe, dass der biologische response-modifier seine Wirksamkeit behält und worin das dichte Sternpolymer Partikel umfasst, deren Größen von 20 Å in ihrer kleinsten Größe bis 1000 Å in ihrer größten Größe betragen.

9. Konjugat nach Anspruch 8, worin das Dendrimer ein Polyamidoamin oder ein Polyalkylenimin ist.

10. Konjugat nach einem der Ansprüche 7 bis 9, worin das Zielsteuerungsmittel, T, ein polyklonaler oder ein monoklonaler Antikörper oder ein Fragment davon ist.

11. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Verwendung als diagnostisches Mittel.

12. Zusammensetzung, umfassend ein dendritisches Polymer, welches mit mindestens einer Einheit von genetischem Material komplexiert ist, ausgewählt aus Plasmiden, Phagen, Cosmiden, Genen und Fragmenten von Genen, sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA), ribosomale RNA (rRNA), katalytische RNA (cRNA), Small Nuclear RNA (snRNA), Messenger RNA (mRNA), Transfer RNA (tRNA), DNA- und RNA-Oligonukleotide (sowohl einzelsträngig als auch doppelsträngig) oder Oligomere und (Antisense) Oligonukleotide, Peptid-Nukleinsäuren (PNA) und substituierte Nukleinsäure-Oligonukleotide; worin das dendritische Polymer ein dendritisches Polymer umfasst, welches positive Oberflächenfunktionalitäten über einen wesentlichen Teil der Polymeroberfläche aufweist und das genetische Material und das dendritische Polymer in einem Ladungsverhältnis von 1:1 bis 1:100 komplexiert sind; worin das dendritische Polymer mindestens eine Kernverzweigung aufweist, die von einem Kern ausgeht, wobei die Verzweigung mindestens eine terminale Gruppe aufweist, mit der Maßgabe, dass

(1) das Verhältnis von terminalen Gruppen zu den Kernverzweigungen zwei oder größer ist,
(2) die Dichte der terminalen Gruppen pro Volumeneinheit im Polymer mindestens das 1,5fache der Dichte eines gestreckten herkömmlichen Sternpolymers beträgt, welches den gleichen Kern und die gleichen Monomereinheiten und das gleiche Molekulargewicht und die gleiche Anzahl an Kernverzweigungen hat, worin jede dieser Verzweigungen des gestreckten herkömmlichen Sternpolymers nur eine terminale Gruppe trägt, und
(3) das molekulare Volumen nicht mehr als ca. 80% des molekularen Volumens des gestreckten herkömmlichen Sternpolymers beträgt, wie durch dimensionale Studien unter Verwendung maßstabgetreuer Corey-Pauling Molekül-Modelle bestimmt, und welches regelmäßige dendritsche Verzweigungen aufweist; und worin das dendritische Polymer Partikel umfasst, deren Größen von 20 Å in ihrer kleinsten Größe bis 1000 Å in ihrer größten Größe betragen.

13. Zusammensetzung nach Anspruch 12, worin die positive Oberflächenfunktionalität durch Aminogruppen an der Oberfläche des dendritischen Polymers bewirkt ist.

14. Zusammensetzung nach den Ansprüchen 12 oder 13, worin das dendritische Polymer ein Dendrimer umfasst, welches eine positive Oberflächenfunktionalität über mindestens 75% seiner Dendrimeroberfläche aufweist.

15. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 12 bis 14, welche einen Komplex von dendritischem Polymer mit genetischem Material in Lösung entweder mit DEAE-Dextran oder mit Glycerin umfasst.

16. Zusammensetzung nach Anspruch 15, worin das genetische Material und das dendritische Polymer in einem Ladungsverhältnis von 1:1 bis 1:15 komplexiert sind.

17. Zusammensetzung nach Anspruch 16, worin das genetische Material und das dendritische Polymer in einem Ladungsverhältnis von 1:5 bis 1:10 komplexiert sind.

18. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, worin der Komplex in Lösung mit DEAE-Dextran ist, in einer Konzentration von 0,125 bis 2 µM.

19. Zusammensetzung nach Anspruch 18, worin die Konzentration des DEAE-Dextrans in der Zusammensetzung von 0,25 bis 1 µM ist.

20. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, worin der Komplex in Lösung mit Glycerin ist, in einer Konzentration von 2,0 bis 10,0 Volumen-%.

21. Zusammensetzung nach Anspruch 20, worin der Komplex in Lösung mit Glycerin ist, in einer Konzentration von 2,0 bis 5,0 Gew.-%.

22. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 21, worin die Zusammensetzung weiter DMSO umfasst.

23. Zusammensetzung nach Anspruch 15 oder 16, worin die Zusammensetzung weiter Chloroquin umfasst.

24. Zusammensetzung nach Anspruch 12, worin ein Zielsteuerungsmittel mit dem dendritischen Polymer assoziiert ist.

25. Zusammensetzung nach Anspruch 12, worin das genetische Material und das dendritische Polymer in einem Ladungsverhältnis von 1:1 bis 1:15 komplexiert sind.

26. Zusammensetzung nach Anspruch 25, worin das genetische Material und das dendritische Polymer in einem Ladungsverhältnis von 3:1 bis 1:10 komplexiert sind.

27. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 24 bis 26, welche einen Komplex aus dendritischem Polymer mit genetischem Material in Lösung mit DEAE-Dextran oder mit Glycerin umfasst.

28. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 24 bis 27, worin das Zielsteuerungsmittel ein polyklonaler oder ein monoklonaler Antikörper oder ein Fragment davon ist.

29. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 24 bis 27, worin das Zielsteuerungsmittel Galactose-Trisaccharid, Biotin, Brenztraubensäure, Insulin oder Avidin ist.

30. Zusammensetzung nach Anspruch 12, 15, 16, 24 oder 25, worin das dendritische Polymer ein dichtes Sterndendrimer umfasst, welches allgemein in sphärischer, ellipsenförmiger oder stabförmiger Konfiguration vorliegt.

31. Zusammensetzung nach Anspruch 12, worin das dendritische Polymer Aggregate von Dendrimeren mit positiver Oberflächenfunktionalität und Dendrimeren mit negativer Oberflächenfunktionalität umfasst mit einem positiv:negativ Ladungsverhältnis von 25:1 bis 100:1.

32. Zusammensetzung nach Anspruch 12, worin das dendritische Polymer ein dichtes Sternpolymer umfasst, welches Aminosäuren über einen wesentlichen Teil seiner Oberfläche, und im Wesentlichen nur auf seiner Oberfläche, aufweist.

33. Zusammensetzung nach Anspruch 32, worin die Aminosäure Lysin oder Arginin ist.

34. Zusammensetzung nach Anspruch 12, worin das dichte Sternpolymer eine Sammlung von verbrückten dichten Sterndendrimeren umfasst.

35. Zusammensetzung nach Anspruch 34, worin das genetische Material sich zwischen mehreren dichten Sternpolymer-Partikeln erstreckt und dazu dient, diese zu verbinden.

36. Zusammensetzung nach Anspruch 12, worin das dendritische Polymer aus einer Dispersion von verschieden großen Dendrimer-Partikeln besteht, die sich erstrecken von Partikeln, mit einem Durchmesser so klein wie ca. 20 Å in ihrer kleinsten Größe, bis zu Partikeln mit einem Durchmesser von ca. 110 Å, wobei andere Partikel mit dazwischenliegenden Durchmessern in der Dispersion vorhanden sind.

37. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 12 bis 28, worin das genetische Material mit einem ersten dendritischen Polymer komplexiert ist, welches in eine Lösung, die ein zweites dendritisches Polymer enthält, gegeben worden ist, wobei das zweite dendritische Polymer größer ist als das erste dendritische Polymer.

38. Zusammensetzung nach Anspruch 37, worin das zweite dendritische Polymer ein dichtes Sternpolymer ist.

39. Zusammensetzung nach Anspruch 37, worin das erste dendritische Polymer in seiner kleinsten Größe einen Durchmesser von 22 bis 50 Å aufweist, und das zweite dendritische Polymer in seiner kleinsten Größe einen Durchmesser von 50 bis 1000 Å aufweist.

40. Zusammensetzung nach Anspruch 39, worin das erste oder das zweite dendritische Polymer oder beide aus Dendrimeren mit sphärischer Form bestehen.

41. Zusammensetzung nach Anspruch 40, worin sowohl das erste wie auch das zweite dendritische Polymer, aus Dendrimeren mit sphärischer Form bestehen.

42. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 12 bis 25, worin das dendritische Polymer ein unsymmetrisch verzweigtes dendritisches Polymer umfasst.

43. Zusammensetzung nach Anspruch 42, worin der Monomer-Baustein des unsymmetrisch verzweigten dendritischen Polymers eine Aminosäure ist.

44. Zusammensetzung nach Anspruch 43, worin die Aminosäure Lysin oder Arginin ist.

45. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 12 bis 27, worin das dendritische Polymer Aggregate von Dendrimeren mit positiver Oberflächenfunktionalität und Dendrimeren mit negativer Oberflächenfunktionalität umfasst, mit einem positiv:negativ Ladungsverhältnis von 25:1 bis 100:1.

46. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 12 bis 27, worin das dendritische Polymer ein dichtes Sternpolymer umfasst, welches Aminosäuren über einen wesentlichen Teil seiner Oberfläche, und im Wesentlichen nur auf seiner Oberfläche, aufweist.

47. Zusammensetzung nach Anspruch 46, worin die Aminosäure Lysin oder Arginin ist.

48. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 12 bis 27, worin das dendritische Polymer aus einer Dispersion verschieden großer Dendrimer-Partikeln besteht, die sich erstrecken von Partikeln, mit einem Durchmesser so klein wie ca. 20 Å in ihrer kleinsten Größe, bis zu Partikeln mit einem Durchmesser von ca. 110 Å, wobei andere Partikel mit dazwischenliegenden Durchmessern in der Dispersion vorhanden sind.

49. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 12 bis 20, 24 bis 26, worin die Zusammensetzung weiter Chloroquin umfasst.

50. Formulierung, die ein Konjugat oder eine Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 49 umfasst, in der mindestens ein pharmazeutisch verträgliches Verdünnungsmittel oder Trägermittel vorhanden ist.

51. Verfahren zur Herstellung eines Komplexes aus dendritischem Polymer und genetischem Material, umfassend:
Umsetzen des dendritischen Polymers mit dem genetischen Material ausgewählt aus Plasmiden, Phagen, Cosmiden, Genen und Fragmenten von Genen, sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA), ribosomale RNA (rRNA), katalytische RNA (cRNA), Small Nuclear RNA (snRNA), Messenger RNA (mRNA), Transfer RNA (tRNA), DNA- und RNA-Oligonukleotide (sowohl einzelsträngig als auch doppelsträngig) oder Oligomere und (Antisense) Oligonukleotide, Peptid-Nukleinsäuren (PNA) und substituierte Nukleinsäure-Oligonukleotide in einem geeigneten Lösungsmittel bei einer Temperatur, welche die Komplexbildung des genetischen Materials mit dem dendritischen Polymer erleichtert, wobei das Verfahren das Einbringen des Komplexes in eine Lösung mit DEAE-Dextran oder Glycerin umfasst, und worin das dendritische Polymer Partikel umfasst, deren Größen von 20 Å in ihrer kleinsten Größe bis zu 1000 Å in ihrer größten Größe betragen.

52. Verfahren nach Anspruch 51, welches das Anhängen eines Zielsteuerungsmittels an das dendritische Polymer vor der Komplexbildung mit dem genetischen Material umfasst.

53. Verfahren nach Anspruch 51 oder 52, worin das dendritische Polymer eine überwiegend kationische Oberfläche aufweist, wobei das Verfahren das elektrostatische Anhängen des genetischen Materials an das dendritische Polymer umfasst, um den Komplex zu bilden.

54. Verfahren zur Bildung eines Komplexes aus dendritischem Polymer und genetischem Material, umfassend:
Komplexieren von genetischem Material ausgewählt aus Plasmiden, Phagen, Cosmiden, Genen und Fragmenten von Genen, sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA), ribosomale RNA (rRNA), katalytische RNA (cRNA), Small Nuclear RNA (snRNA), Messenger RNA (mRNA), Transfer RNA (tRNA), DNA- und RNA-Oligonukleotide (sowohl einzelsträngig als auch doppelsträngig) oder Oligomere und (Antisense) Oligonukleotide, Peptid-Nukleinsäuren (PNA) und substituierte Nukleinsäure-Oligonukleotide mit einem ersten dendritischen Polymer durch Umsetzung des Polymers mit dem genetischen Material in einem geeigneten Lösungsmittel bei einer Temperatur, welche die Assoziierung des genetischen Materials mit dem Polymer erleichtert; und Einbringen des Komplexes in eine Lösung, die ein zweites dendritisches Polymer enthält, wobei das zweite dendritische Polymer größer ist als das erste dendritische Polymer und worin das dendritische Polymer Partikel umfasst, deren Größen von 20 Å in ihrer kleinsten Größe bis zu 1000 Å in ihrer größten Größe betragen.

55. Verfahren nach Anspruch 54, welches das Anhängen eines Zielsteuerungsmittels an das dendritische Polymer vor der Komplexbildung mit dem genetischen Material umfasst.

56. Verfahren nach Anspruch 54 oder 55, worin das dendritische Polymer eine überwiegend kationische Oberfläche aufweist, wobei das Verfahren das elektrostatische Anhängen des genetischen Materials an das dendritische Polymer umfasst.

57. Verfahren zur Bildung eines Komplexes aus genetischem Material und dendritischem Polymer, umfassend:
das Mischen, in Wasser, von ausreichend genetischem Material, um eine Endkonzentration von 1 bis 10 µg/ml zu ergeben, mit ausreichend dendritischem Polymer, welches eine positive Oberflächenfunktionalität aufweist, um ein genetisches Material: dendritisches Polymer Ladungsverhältnis von 1:1 bis 1:100 zu ergeben, und worin das dendritische Polymer Partikel umfasst, deren Größen von 20 Å in ihrer kleinsten Größe bis zu 1000 Å

in ihrer größten Größe betragen, ausgewählt aus Plasmiden, Phagen, Cosmiden, Genen und Fragmenten von Genen, sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA), ribosomale RNA (rRNA), katalytische RNA (cRNA), Small Nuclear RNA (snRNA), Messenger RNA (mRNA), Transfer RNA (tRNA), DNA- und RNA-Oligonukleotide (sowohl einzelsträngig als auch doppelsträngig) oder Oligomere und (Antisense) Oligonukleotide, Peptid-Nukleinsäuren (PNA) und substituierte Nukleinsäure-Oligonukleotide.

58. Verfahren nach Anspruch 57, welches das Hinzufügen von ausreichend DEAE-Dextran zu dem Komplex nach dem er gebildet ist, umfasst, um eine DEAE-Dextran-Konzentration von 0,125 bis 2 µM zu erreichen.

59. Verfahren nach Anspruch 57, worin das Ladungsverhältnis von 1:1 bis 1:15 ist.

60. Verfahren nach Anspruch 58, worin das Ladungsverhältnis von 1:5 bis 1:10 ist.

61. Verfahren nach einem der Ansprüche 57 bis 60, worin ausreichend DEAE-Dextran hinzugefügt wird, um eine DEAE-Dextran-Konzentration von 0,25 bis 1 µM zu erreichen.

62. Verfahren nach einem der Ansprüche 57 bis 61, worin das dendritische Polymer einen Durchmesser von 50 Å in seinem kleinsten Durchmesser bis zu einem maximalen Durchmesser von 1000 Å aufweist.

63. Verfahren nach einem der Ansprüche 57 bis 62, worin das dendritische Polymer aus einer Dispersion von verschieden großen Dendrimer-Partikeln besteht, die sich erstrecken von Partikeln mit einem Durchmesser so klein wie 20 Å in ihrer kleinsten Größe, bis zu Partikeln mit einem Durchmesser von 110 Å, wobei andere Partikel mit dazwischenliegenden Durchmessern in der Dispersion vorhanden sind.

64. Verfahren nach einem der Ansprüche 57 bis 62, worin das dendritische Polymer Aggregate aus Dendrimeren mit positiver Oberflächenfunktionalität und Dendrimeren, mit negativer Oberflächenfunktionalität umfasst, mit einem positiv:negativ Ladungsverhältnis von 25:1 bis 100:1, wobei die Aggregate einen Durchmesser von nicht größer als ca. 1000 Å aufweisen.

65. Verfahren nach Anspruch 57, worin das dendritische Polymer ein dichtes Sternpolymer umfasst, welches Aminosäuren über einen wesentlichen Teil seiner Oberfläche, und im Wesentlichen nur auf seiner Oberfläche, aufweist.

66. Verfahren nach Anspruch 65, worin die Aminosäure Lysin oder Arginin ist.

67. Verfahren nach Anspruch 57, worin das dendritische Polymer relativ kleine Dendrimer-Partikel umfasst, die einen Durchmesser von 22 Å bis 50 Å in ihrer kleinsten Größe aufweisen;
wobei das Verfahren weiter das Hinzufügen von dendritischen Polymeren umfasst, deren Partikel Durchmesser von 50 Å bis 110 Å in ihrer kleinsten Größe aufweisen, nachdem sich der Komplex gebildet hat.

68. Verfahren nach einem der Ansprüche 57 bis 67, worin die Partikel des dendritischen Polymers daran gebundene Zielsteuerungsmittel-Einheiten aufweisen.

69. Verfahren nach einem der Ansprüche 57 bis 60, welches das Hinzufügen von ausreichend Glycerin zu den Komplex umfasst, nachdem er sich gebildet hat, um eine Glycerinkonzentration von 2 bis 10 Gew.-% zu erhalten.

70. Verfahren nach Anspruch 69, worin die Glycerinkonzentration von 2 bis 5 Gew.-% beträgt.

71. Verfahren nach Anspruch 69, worin das Ladungsverhältnis von 1:1 bis 1:15 ist.

72. Verfahren nach Anspruch 69, worin das dendritische Polymer einen Durchmesser von ca. 50 Å in seinem kleinsten Durchmesser bis zu einem maximalen Durchmesser von ca. 1000 Å aufweist.

73. Verfahren nach Anspruch 54 zur Bildung eines konzentrierten Komplexes aus genetischem Material und dendritischem Polymer, welches zur Verwendung verdünnt werden kann, umfassend:
das Mischen, in Wasser, von ausreichend genetischem Material, ausgewählt aus Plasmiden, Phagen, Cosmiden, Genen und Fragmenten von Genen, sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA), ribosomale RNA (rRNA), katalytische RNA (cRNA), Small Nuclear

RNA (snRNA), Messenger RNA (mRNA), Transfer RNA (tRNA), DNA- und RNA-Oligonukleotiden (sowohl einzelsträngig als auch doppelsträngig) oder Oligomeren und (Antisense) Oligonukleotiden, Peptid-Nukleinsäuren (PNA) und substituierten Nukleinsäure-Oligonukleotiden, um eine Konzentration von 1 bis 10 µg pro 20 µl zu erreichen, mit ausreichend dendritischem Polymer, welches eine positive Oberflächenfunktionalität aufweist, um ein Ladungsverhältnis von genetischem Material zu dendritischem Polymer von 1:1 bis 1:100 zu erreichen;
wobei das Mischen bei einem pH-Wert von 5 bis 10 und bei einer Temperatur von 20 bis 40°C durchgeführt wird, und worin das dendritische Polymer Partikel umfasst, deren Größen von 20 Å in ihrer kleinsten Größe bis zu 1000 Å in ihrer größten Größe betragen.

74. Verfahren nach Anspruch 73, worin das Ladungsverhältnis 1:1 bis 1:15 ist.

75. Verfahren nach Anspruch 74, worin das Ladungsverhältnis 1:5 bis 1:10 ist.

76. Verfahren nach Anspruch 73, worin das dendritische Polymer einen Durchmesser von ca. 50 Å in seinem kleinsten Durchmesser bis zu einem maximalen Durchmesser von ca. 1000 Å aufweist.

77. Verfahren nach einem der Ansprüche 73 bis 76, worin das dendritische Polymer aus einer Dispersion von verschieden großen Dendrimer-Partikeln besteht, die sich erstrecken von Partikeln mit einem Durchmesser so klein wie ca. 20 Å in ihrer kleinsten Größe, bis Partikeln mit einem Durchmesser von ca. 110 Å, wobei andere Partikel mit dazwischenliegenden Durchmessern in der Dispersion vorhanden sind.

78. Verfahren nach einem der Ansprüche 73 bis 75, worin das dendritische Polymer Aggregate aus Dendrimeren mit positiver Oberflächenfunktionalität und Dendrimeren mit negativer Oberflächenfunktionalität, und ein positiv:negativ Ladungsverhältnis von 25:1 bis 100:1 aufweisen, wobei die Aggregate einen Durchmesser von nicht größer als ca. 1000 Å aufweisen.

79. Verfahren nach Anspruch 77, worin das dendritische Polymer ein dichtes Sternpolymer umfasst, welches Aminosäuren über einen wesentlichen Teil seiner Oberfläche, und im Wesentlichen nur auf seiner Oberfläche, aufweist.

80. Verfahren nach Anspruch 79, worin die Aminosäure Lysin oder Arginin ist.

81. Verfahren nach einem der Ansprüche 73 bis 75, worin die Partikel von dendritischem Polymer daran gebundene Zielsteuerungsmittel-Einheiten aufweisen.

82. Verfahren nach Anspruch 81, worin das dendritische Polymer relativ kleine Dendrimer-Partikel umfasst, die einen Durchmesser von 22 Å bis 50 Å in ihrer kleinsten Größe aufweisen;
wobei das Verfahren weiter das Hinzufügen von dendritischen Polymeren umfasst, deren Partikel Durchmesser von 50 Å bis 110 Å in ihrer kleinsten Größe aufweisen, nachdem der Komplex gebildet ist.

83. Konjugat, Zusammensetzung oder Formulierung, hergestellt nach einem der Verfahren gemäß einem der Ansprüche 51 bis 82.

84. Verfahren zum Bewirken von Zelltransfektion und Bioverfügbarkeit von genetischem Material, umfassend das Bereitstellen eines Komplexes aus einem dendritischen Polymer und genetischem Material in Lösung mit DEAE-Dextran oder Glycerin und das zur Verfügung stellen des Komplexes für Zellen die transfiziert werden sollen, worin das dendritische Polymer Partikel umfasst, deren Größe von 20 Å in ihrer kleinsten Größe bis zu 1000 Å in ihrer größten Größe betragen, und worin das genetische Material ausgewählt wird aus Plasmiden, Phagen, Cosmiden, Genen und Fragmenten von Genen, sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA), ribosomale RNA (rRNA), katalytische RNA (cRNA), Small Nuclear RNA (snRNA), Messenger RNA (mRNA), Transfer RNA (tRNA), DNA- und RNA-Oligonukleotiden (sowohl einzelsträngig als auch doppelsträngig) oder Oligomeren und (Antisense) Oligonukleotiden, Peptid-Nukleinsäuren (PNA) und substituierten Nukleinsäure-Oligonukleotiden.

85. Verfahren nach Anspruch 84, welches das Anhängen eines Zielsteuerungsmittels an das dendritische Polymer umfasst.

86. Verfahren zum Bewirken von Zelltransfektion und Bioverfügbarkeit von genetischem Material, umfassend:

das Bilden eines Komplexes aus einem ersten dendritischen Polymer und genetischem Material, gefolgt von Einbringen des Komplexes in eine Lösung, die ein zweites dendritisches Polymer enthält, worin das zweite dendritische Polymer größer ist als das erste dendritische Polymer; und
Bereitstellen des resultierenden Komplexes und des zweiten dendritischen Polymers für Zellen die transfiziert werden sollen, worin das dendritische Polymer Partikel umfasst, deren Größen von 20 Å in ihrer kleinsten Größe bis zu 1000 Å in ihrer größten Größe betragen und worin das genetische Material ausgewählt ist aus Plasmiden, Phagen, Cosmiden, Genen und Fragmenten von Genen, sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA), ribosomale RNA (rRNA), katalytische RNA (cRNA), Small Nuclear RNA (snRNA), Messenger RNA (mRNA), Transfer RNA (tRNA), DNA- und RNA-Oligonukleotiden (sowohl einzelsträngig als auch doppelsträngig) oder Oligomeren und (Antisense) Oligonukleotiden, Peptid-Nukleinsäuren (PNA) und substituierten Nukleinsäure-Oligonukleotiden.

87. Verfahren nach Anspruch 86, worin an mindestens eines des ersten und des zweiten dendritischen Polymers ein Zielsteuerungsmittel gebunden ist.

Es folgen 68 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. I

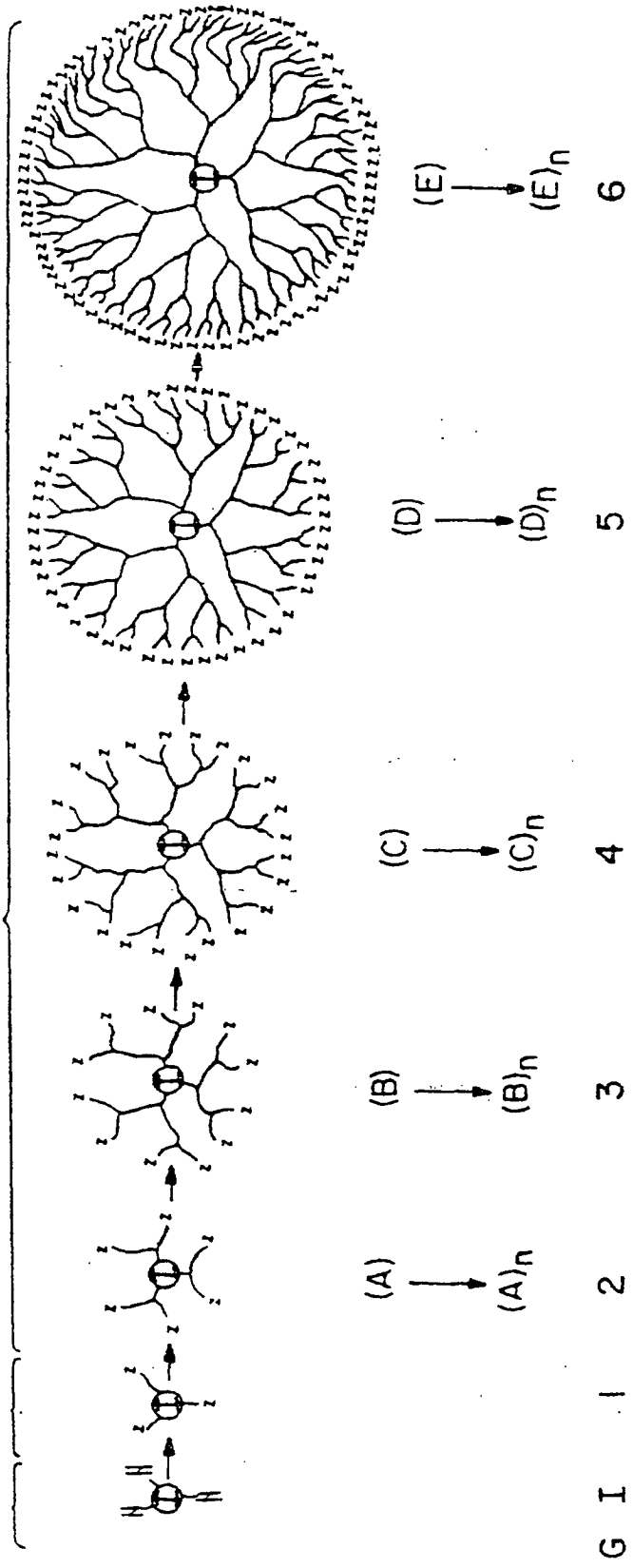


FIG. 2

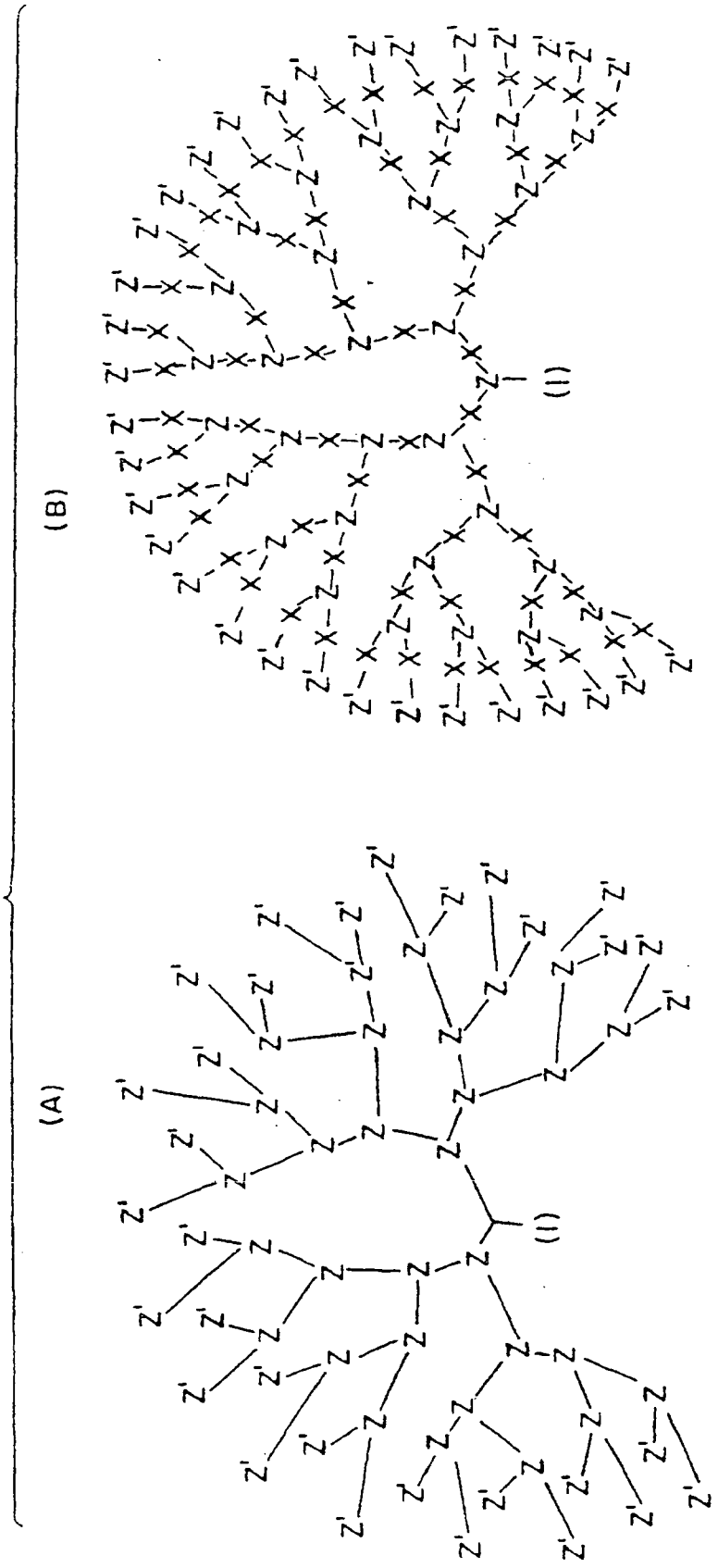


FIG. 3

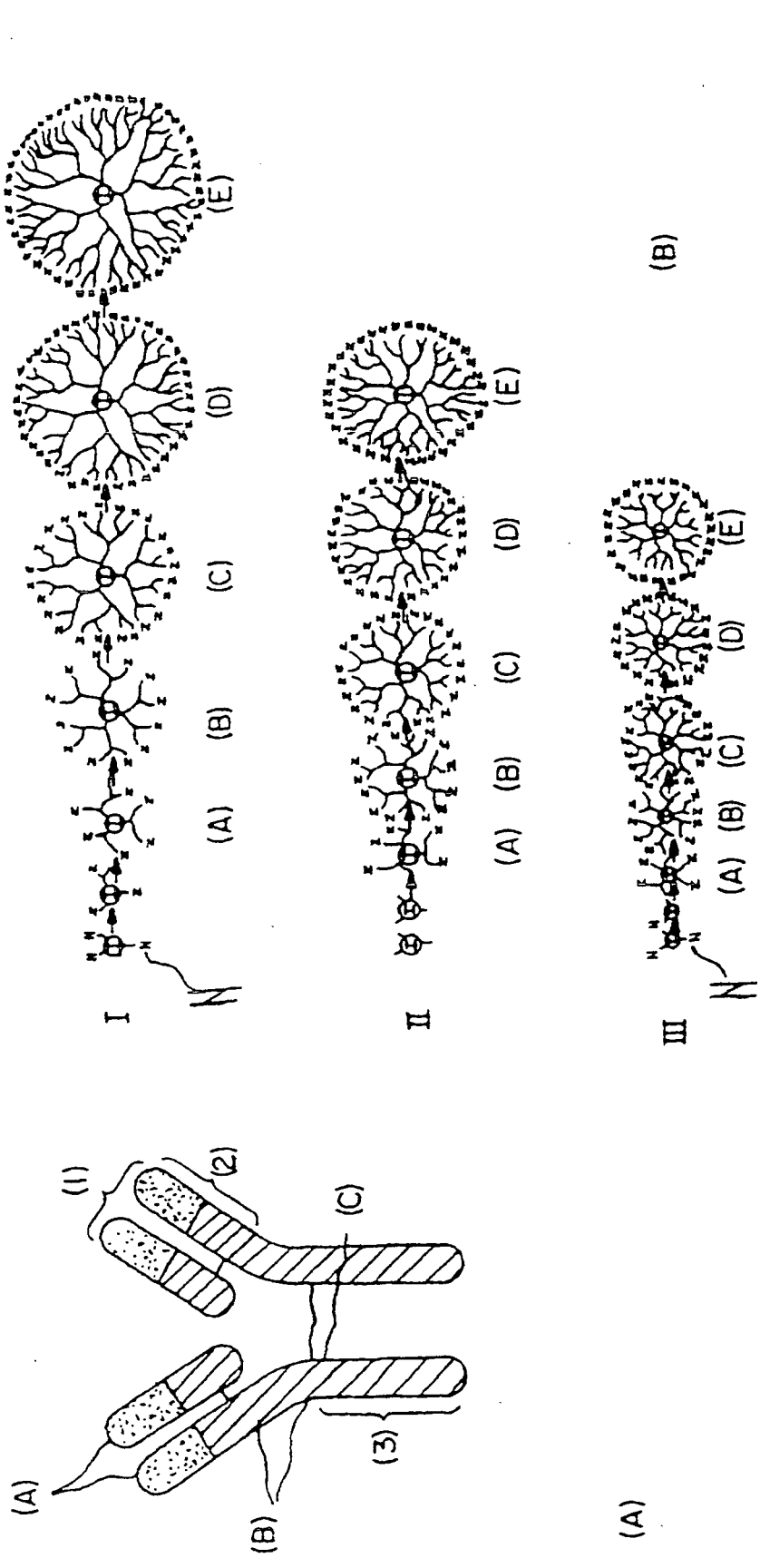


FIG. 4

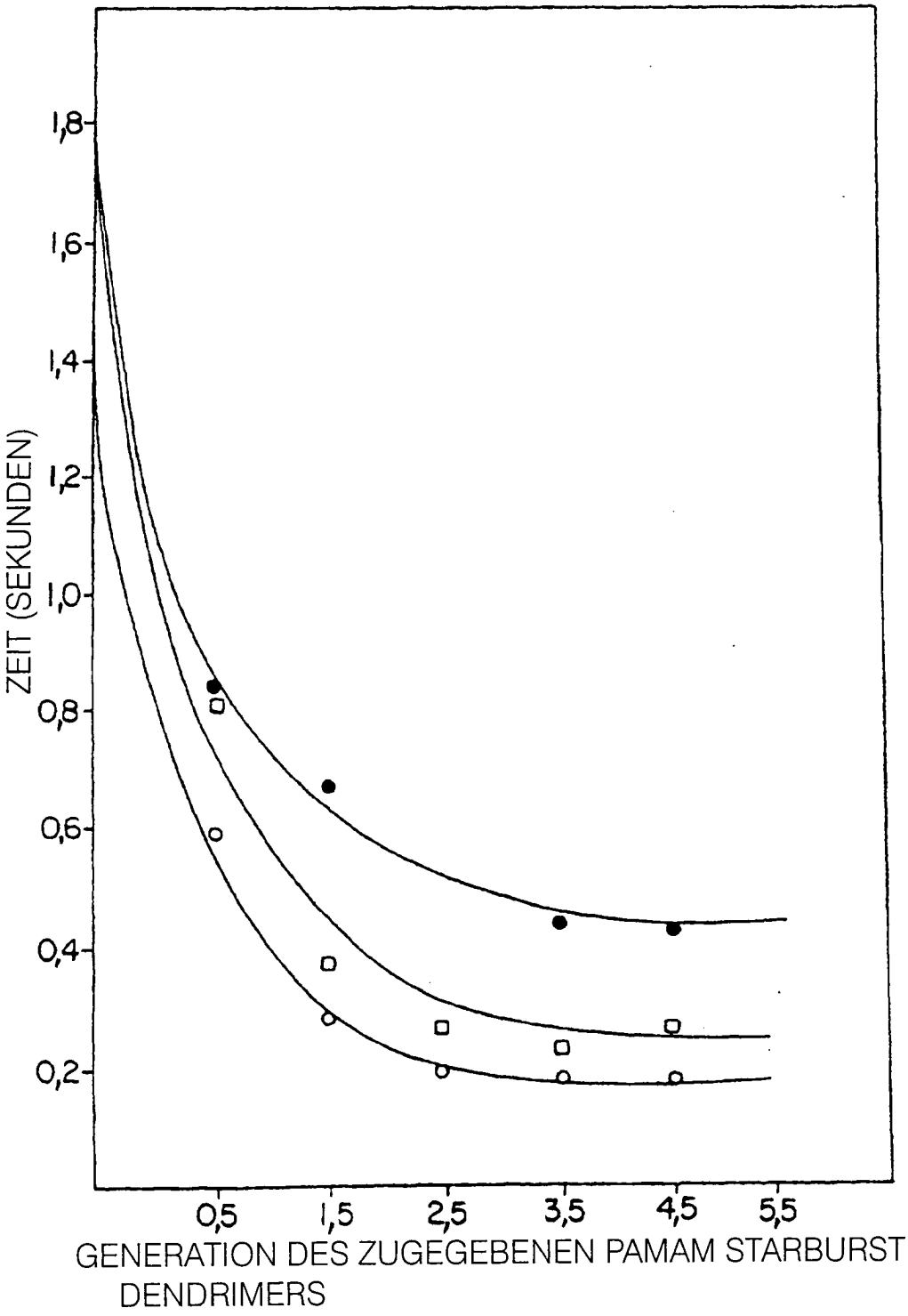

ZEIT (SEKUNDEN)
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,5
1,5
2,5
3,5
4,5
5,5
GENERATION DES ZUGEGEBENEN PAMAM STARBURST DENDRIMERS

FIG. 5

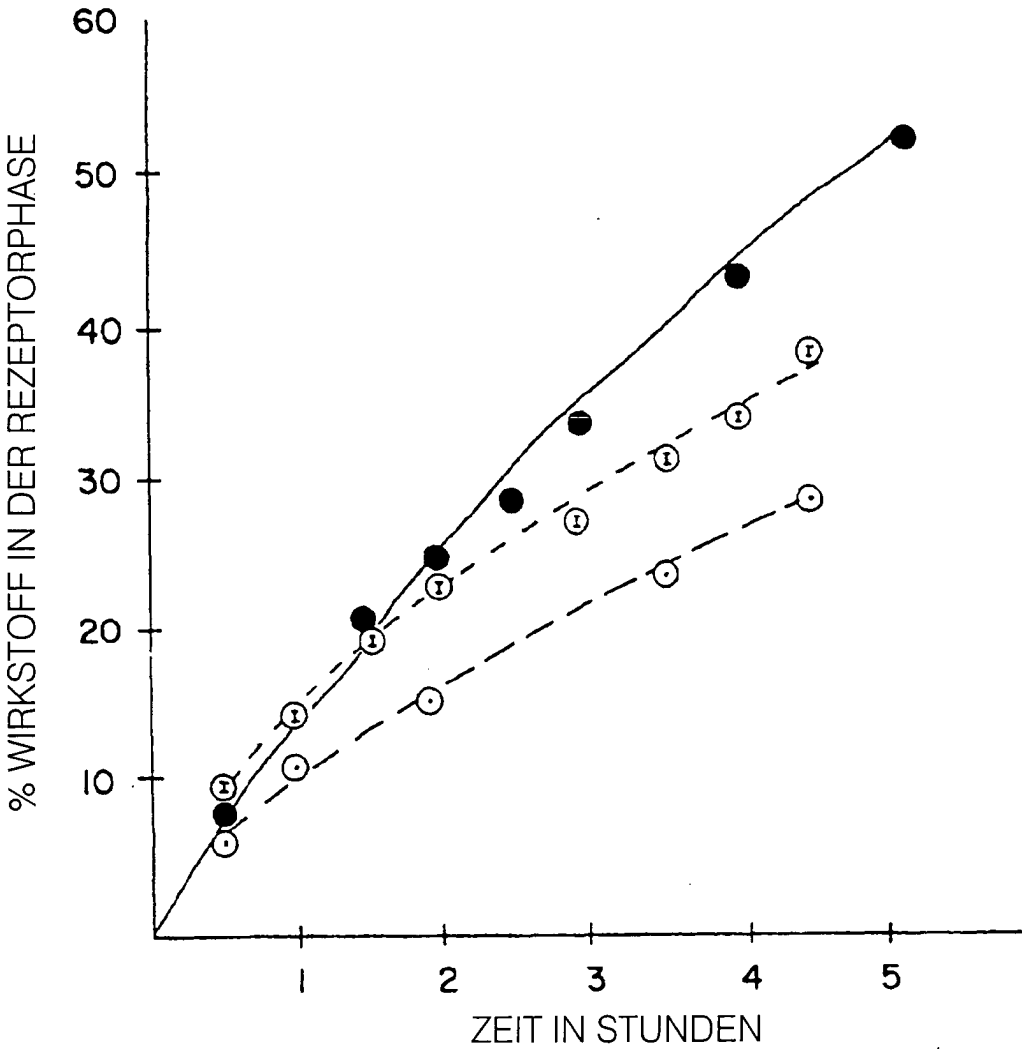

60
50
40
30
20
10
% WIRKSTOFF IN DER REZEPTORPHASE
1
2
3
4
5
ZEIT IN STUNDEN

FIG.6

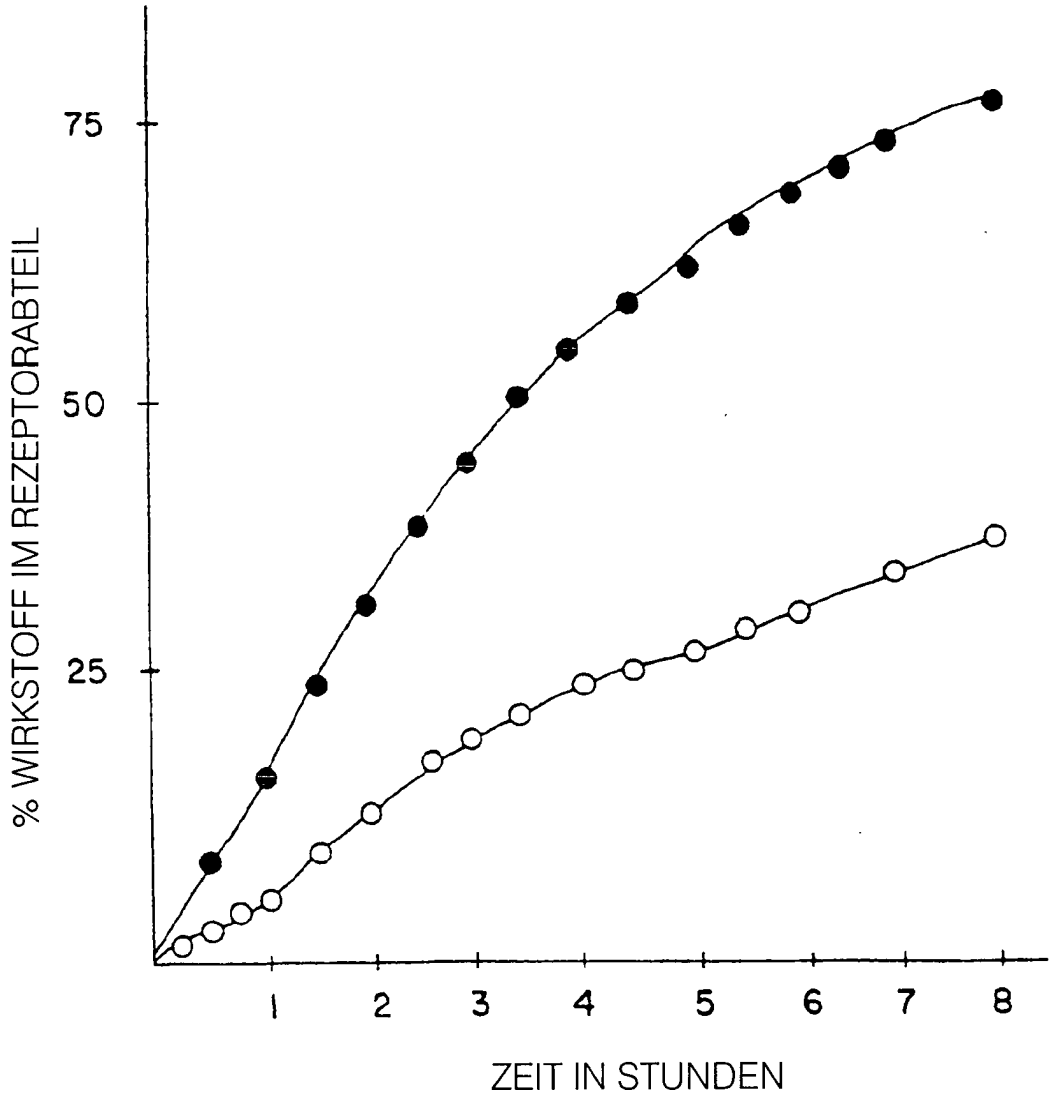

75
50
25
% WIRKSTOFF IM REZEPTORABTEIL
1
2
3
4
5
6
7
8
ZEIT IN STUNDEN

FIG. 7

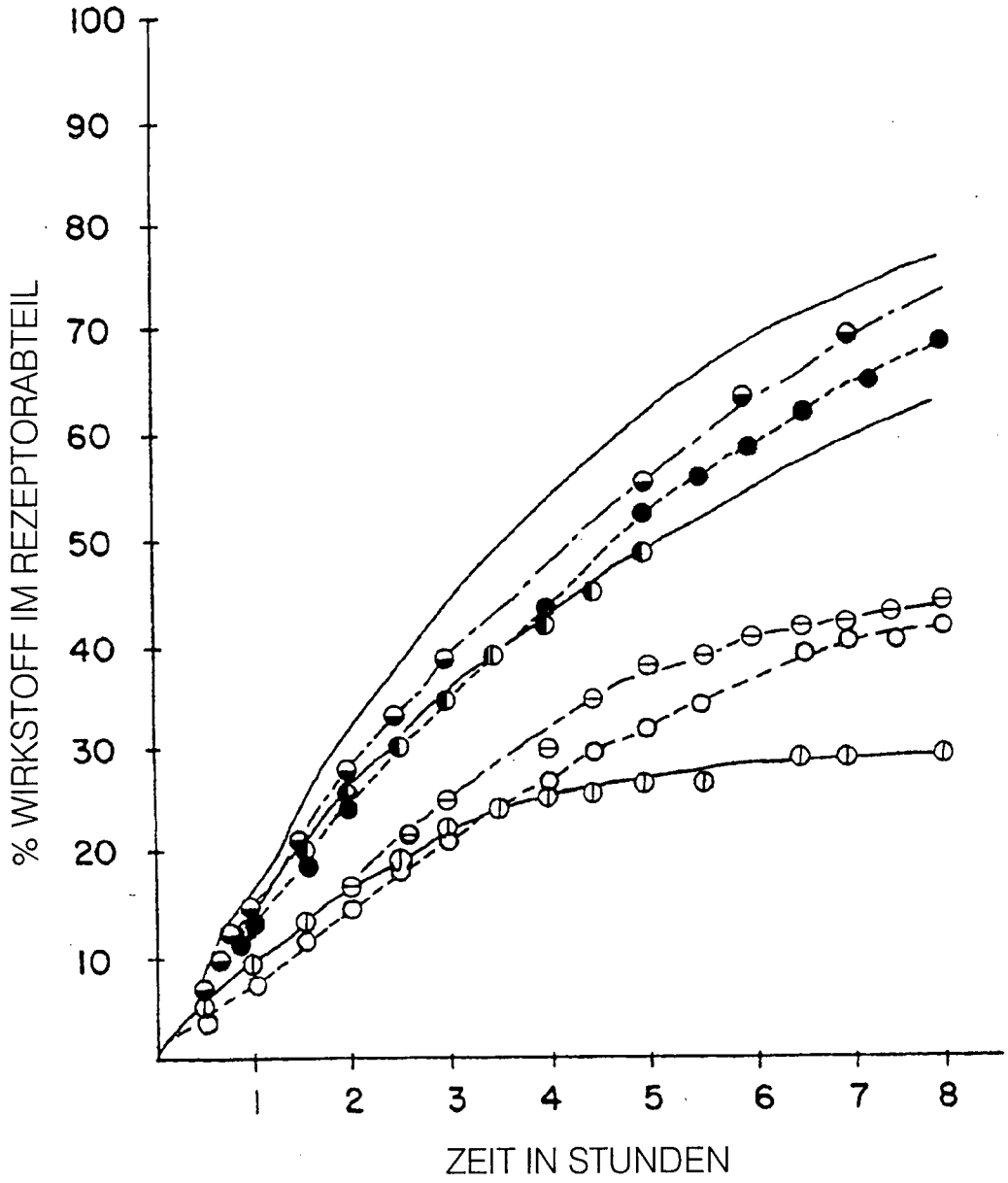

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
% WIRKSTOFF IM REZEPTORABTEIL
1
2
3
4
5
6
7
8
ZEIT IN STUNDEN

FIG.8

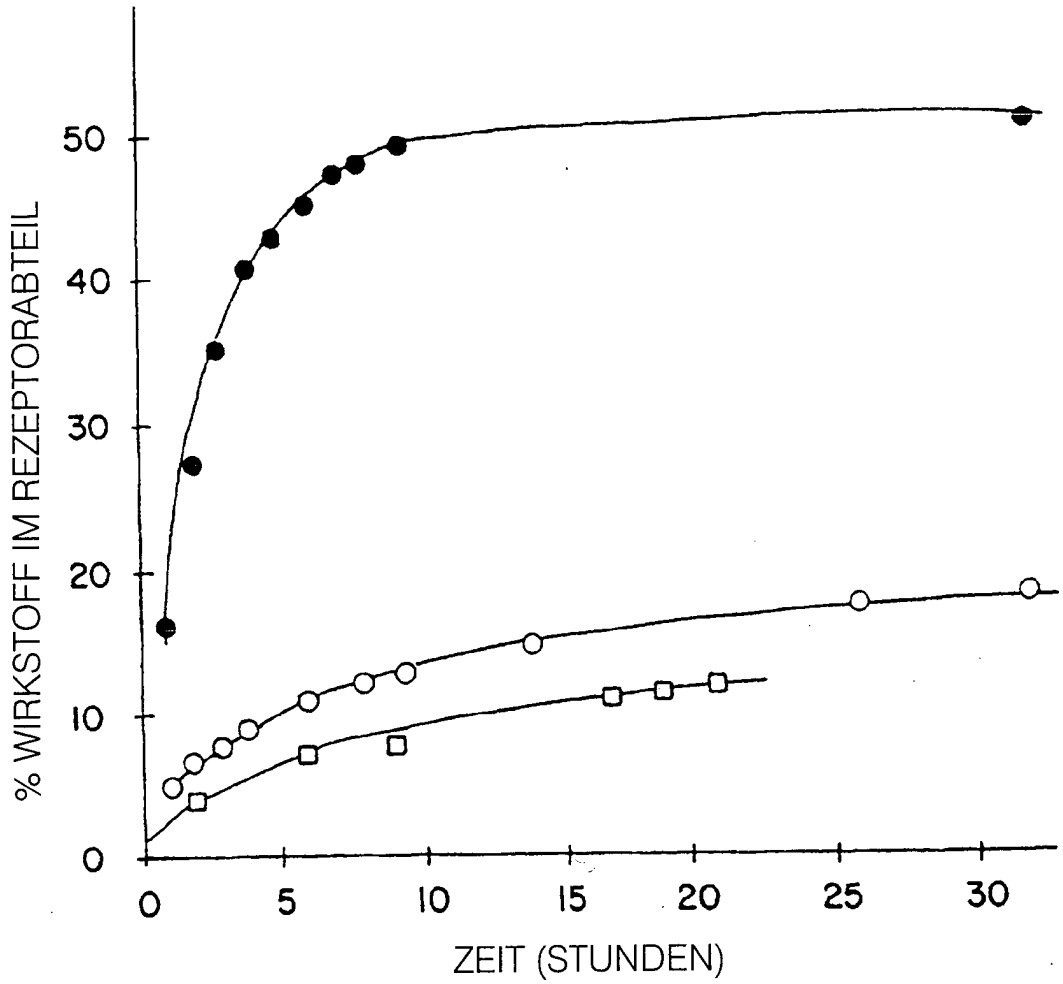

% WIRKSTOFF IM REZEPTORABTEIL
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
30
ZEIT (STUNDEN)

FIG. 9

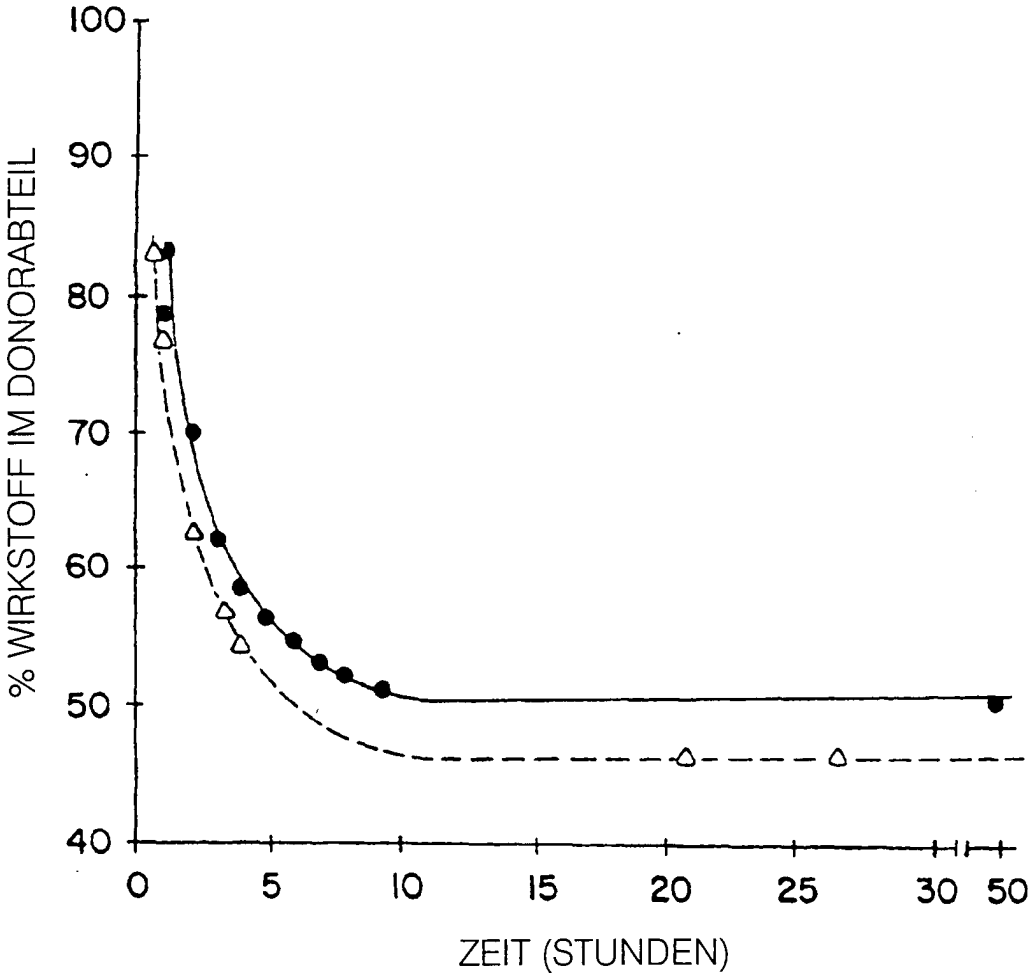

100
90
80
70
60
50
40
% WIRKSTOFF IM DONORABTEIL
0
5
10
15
20
25
30
50
ZEIT (STUNDEN)

FIG. 10

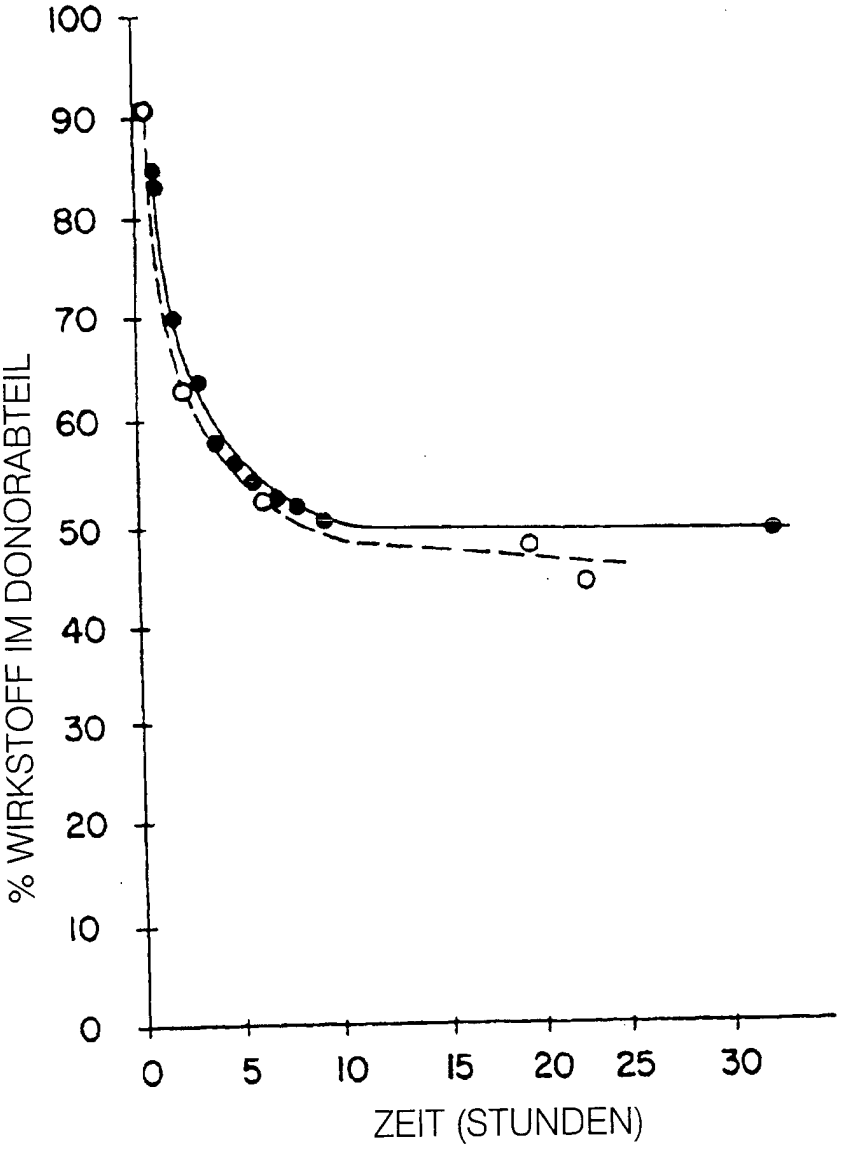

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% WIRKSTOFF IM DONORABTEIL
0
5
10
15
20
25
30
ZEIT (STUNDEN)

FIG. 11

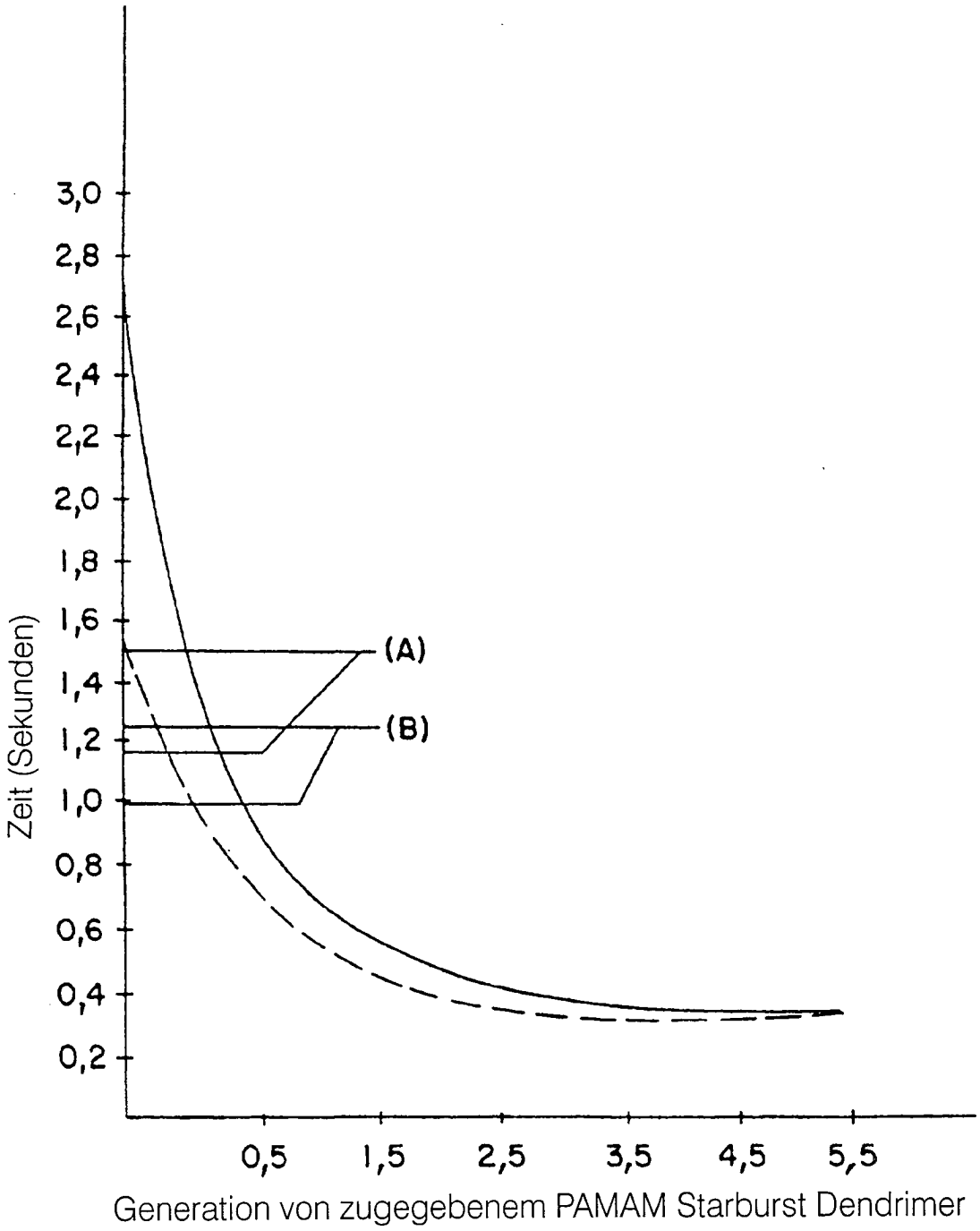
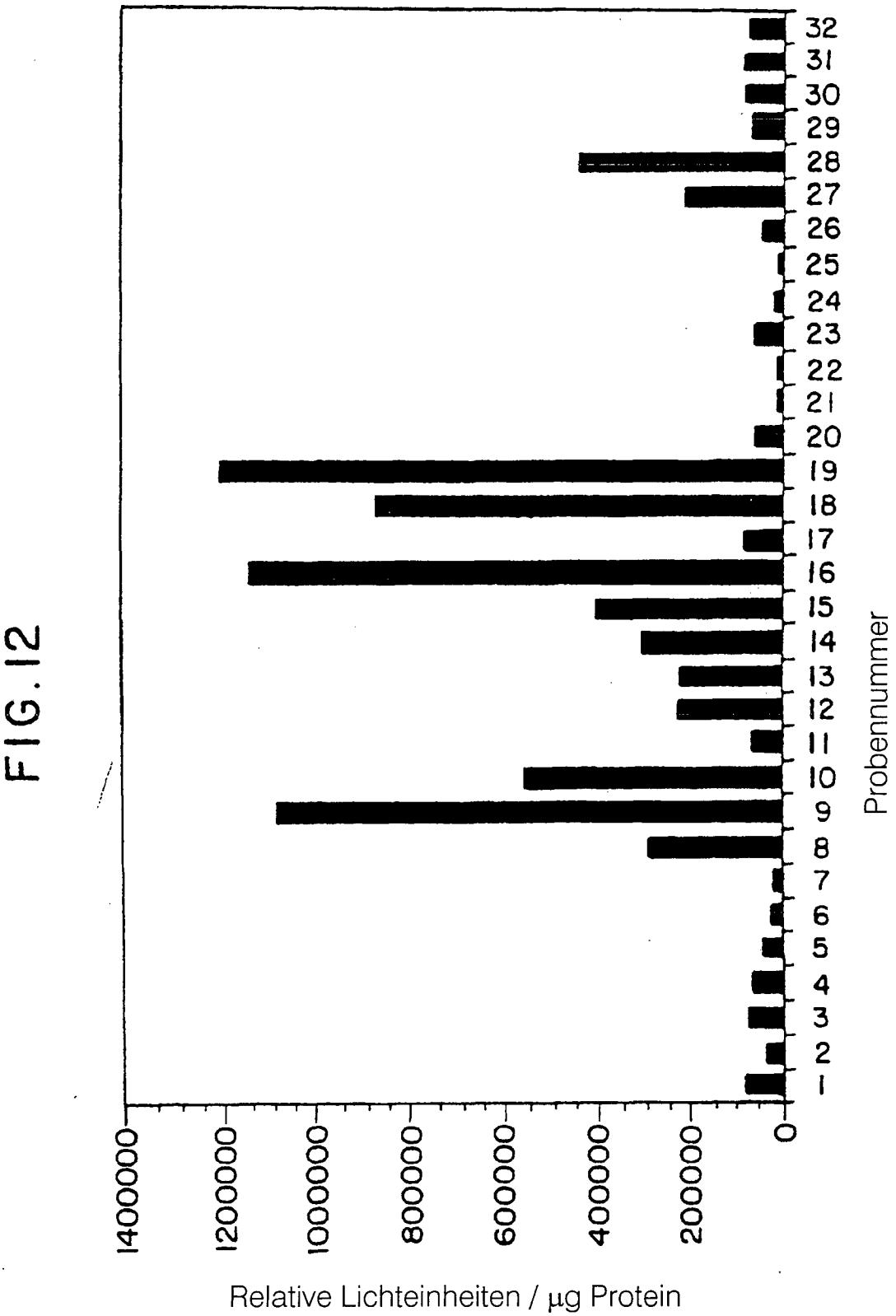

3,0
2,8
2,6
2,4
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
Zeit (Sekunden)
(A)
(B)
0,5
1,5
2,5
3,5
4,5
5,5
Generation von zugegebenem PAMAM Starburst Dendrimer

FIG. 12


32
31
30
29
28
27
26
25
24
23
22
21
20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
Probennummer
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
Relative Lichteinheiten / µg Protein

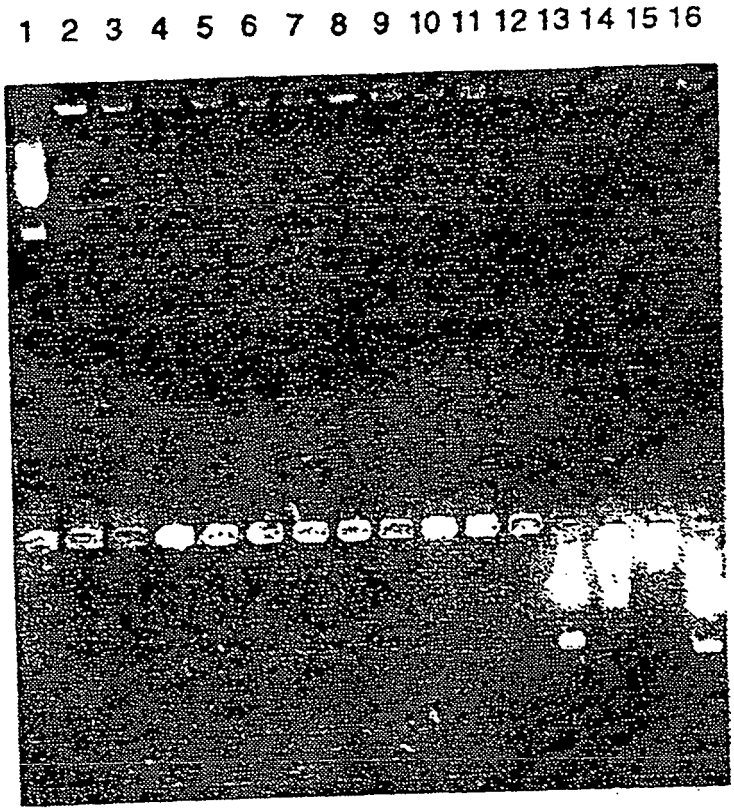
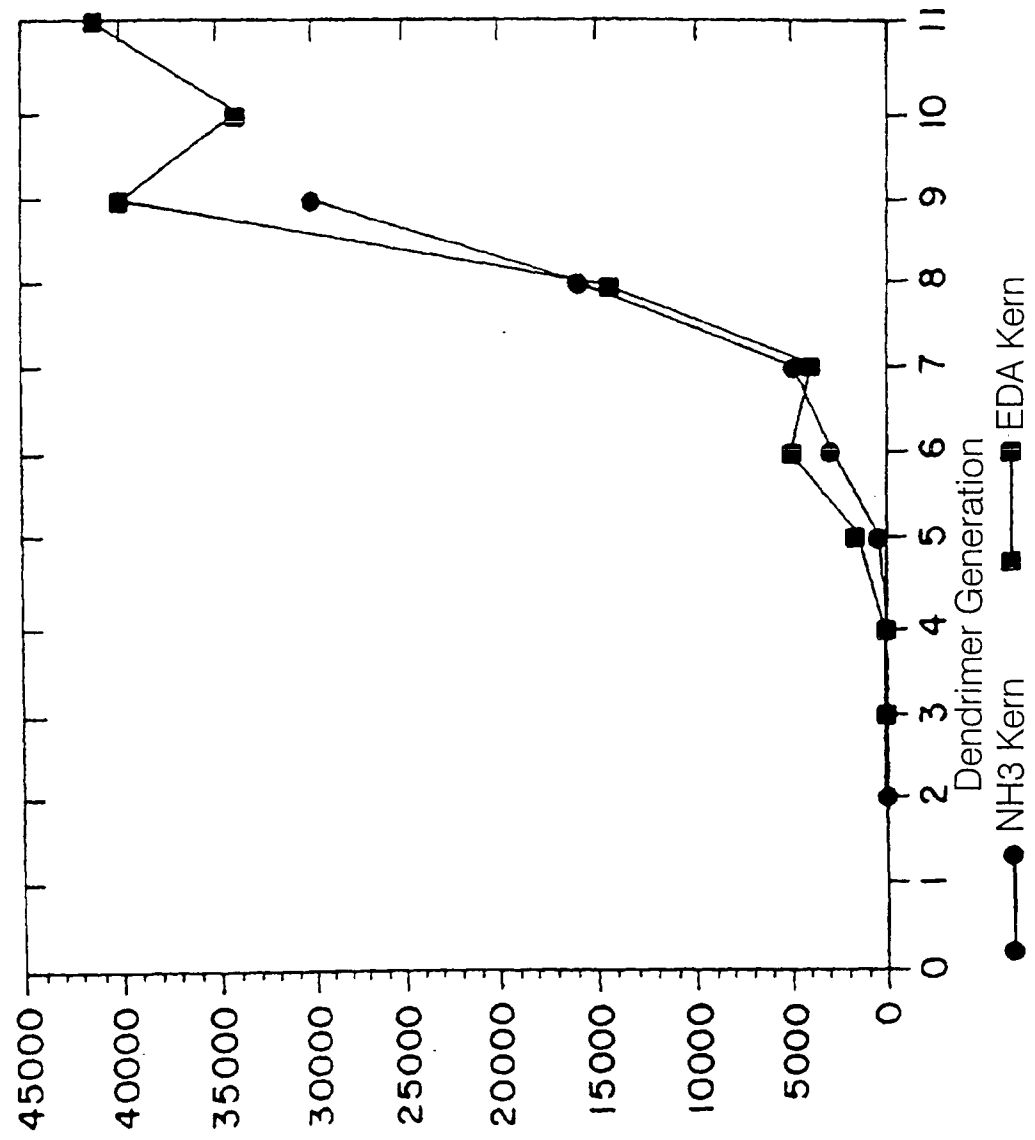

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

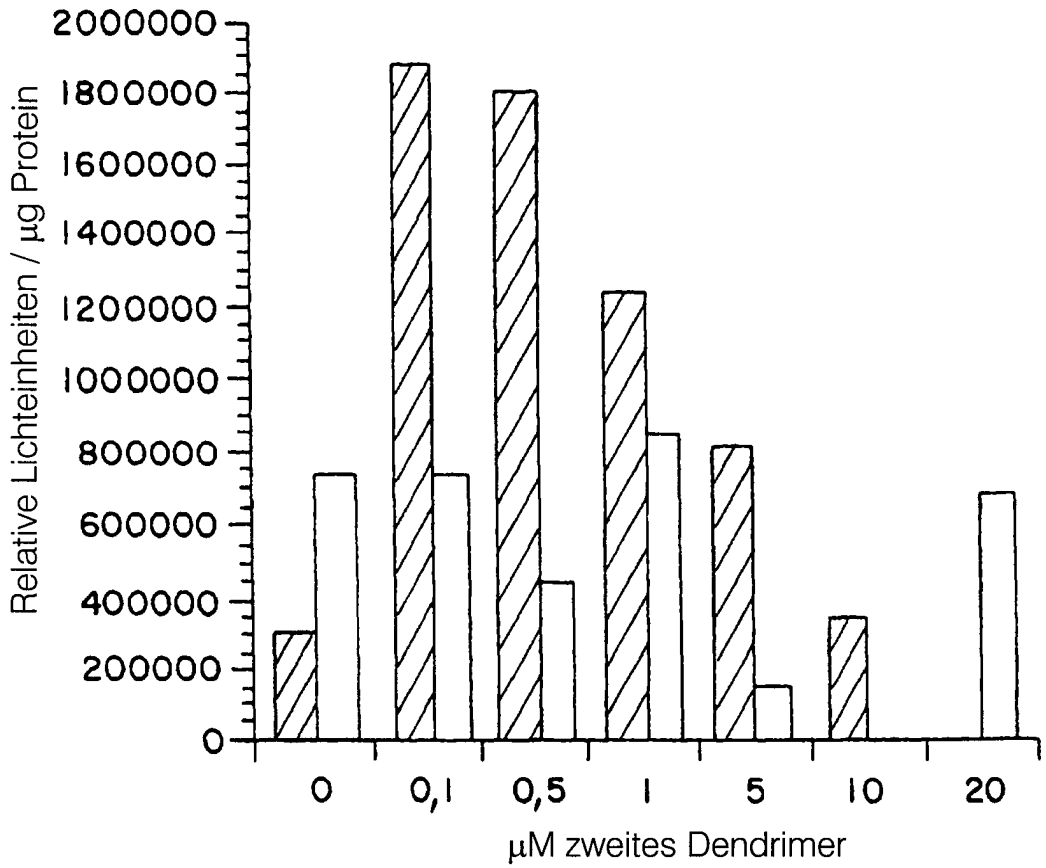
FIG. 13

FIG. 14



Prozentuale Zunahme der Transfektion über Dextran-Kontrolle

FIG. 15



DNA komplexiert mit G9 Dendrimer, anschließend Zugabe von G5 Dendrimer

DNA komplexiert mit G5 Dendrimer, anschließend Zugabe von G9 Dendrimer

FIG. 16

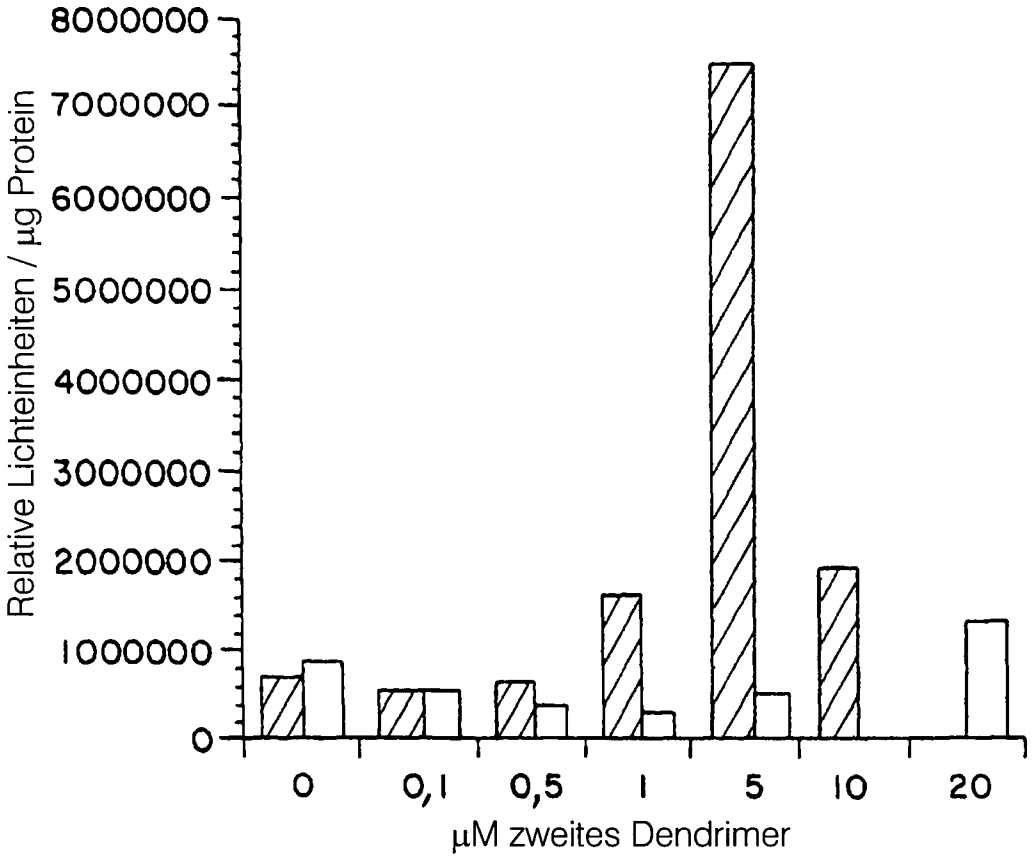

8000000
7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
Relative Lichteinheiten / µg Protein
0
0,1
0,5
1
5
10
20
µM zweites Dendrimer
DNA komplexiert mit G9 Dendrimer, anschließend Zugabe von G5 Dendrimer
DNA komplexiert mit G5 Dendrimer, anschließend Zugabe von G9 Dendrimer

FIG.17

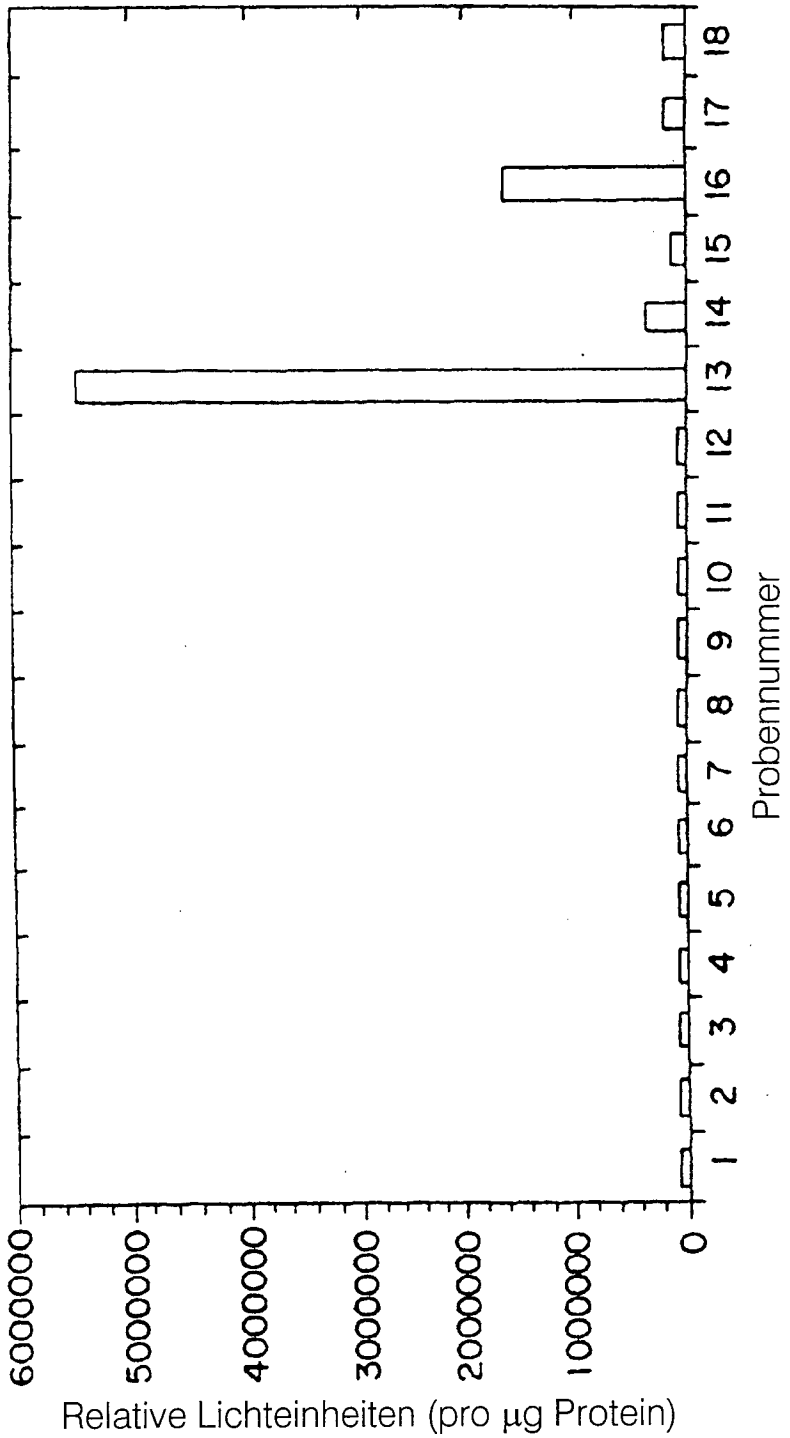

6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
Relative Lichteinheiten (pro µg Protein)
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
Probennummer

FIG.18

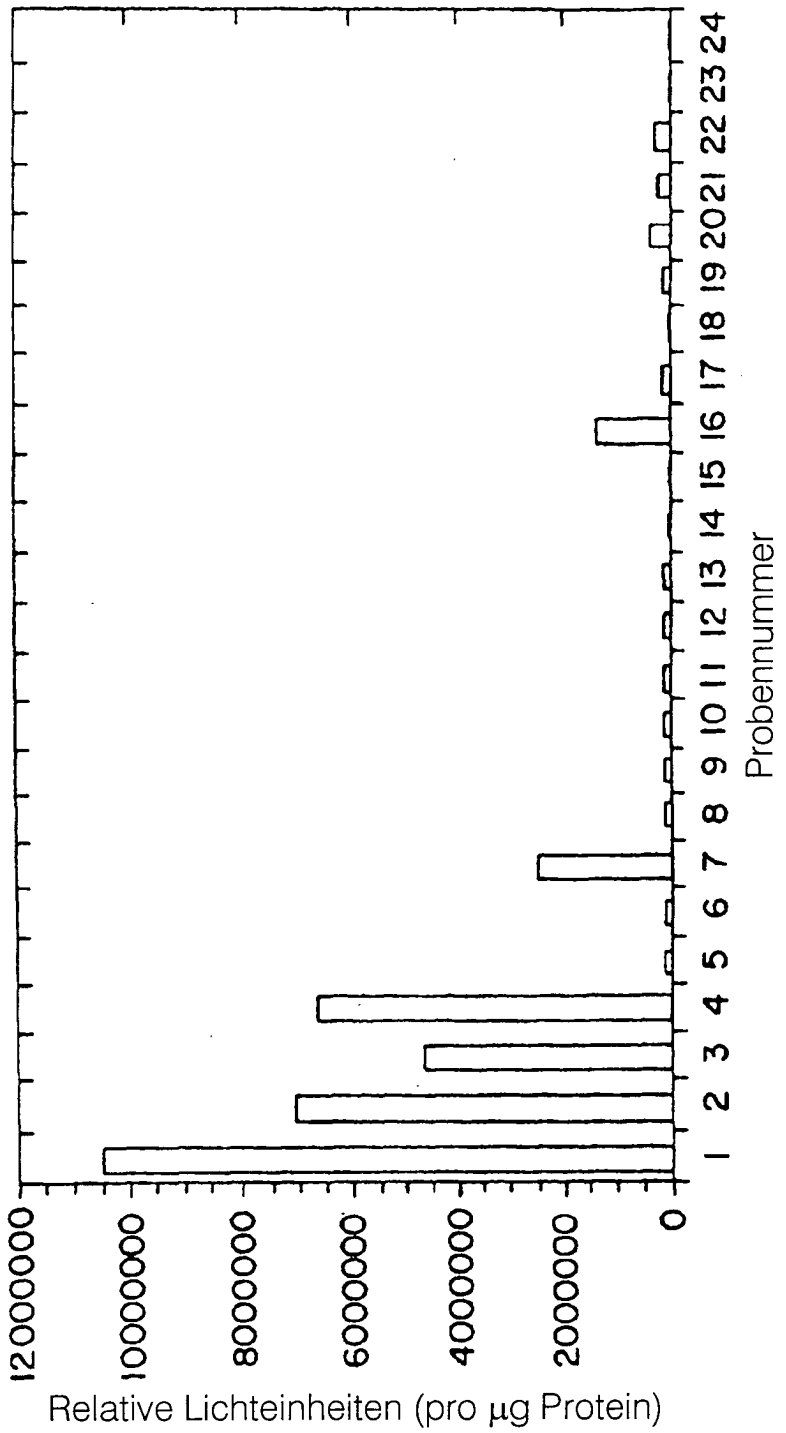
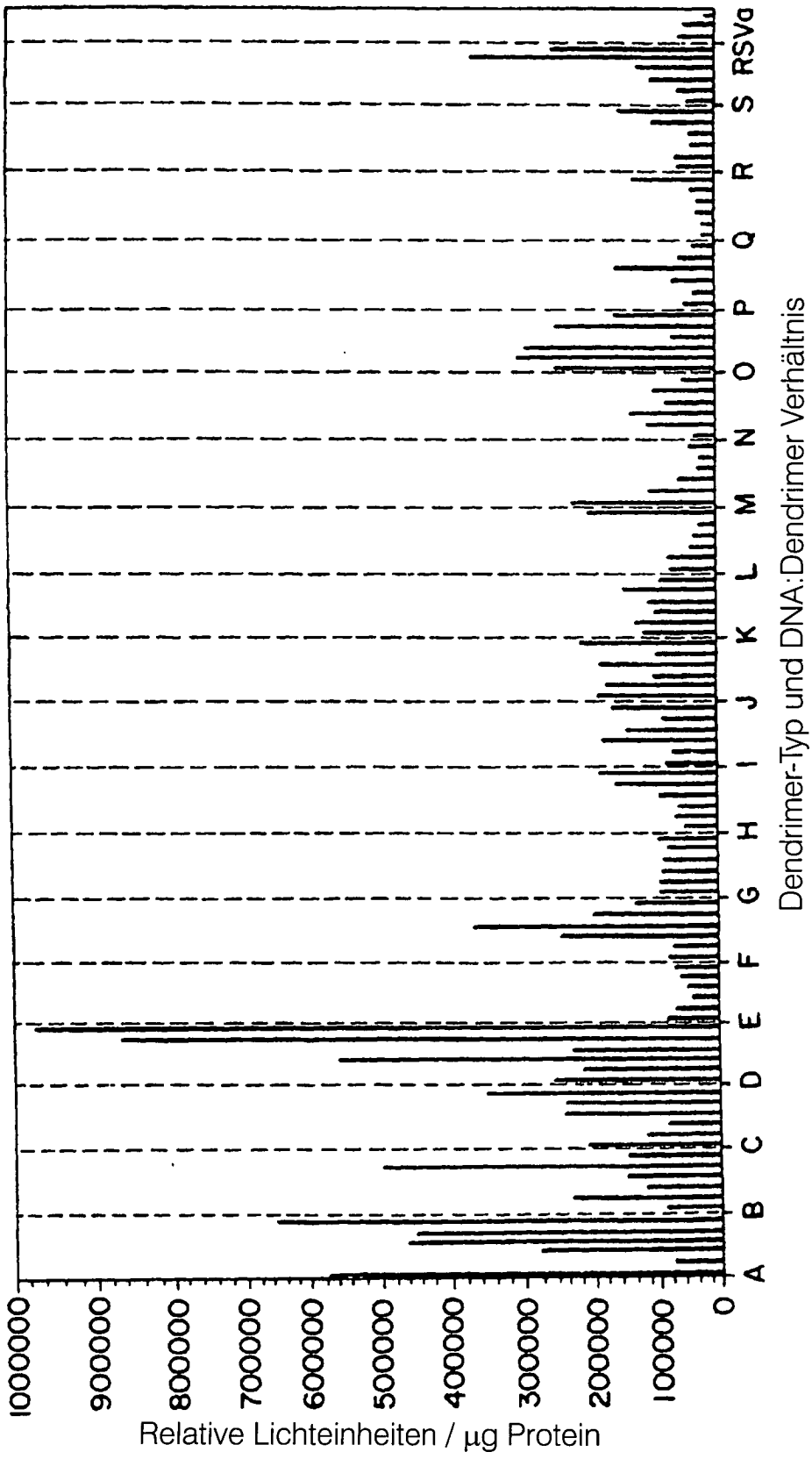

12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
Relative Lichteinheiten (pro µg Protein)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
Probennummer

FIG.19


1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
RSVa
Relative Lichteinheiten / µg Protein
Dendrimer-Typ und DNA:Dendrimer Verhältnis

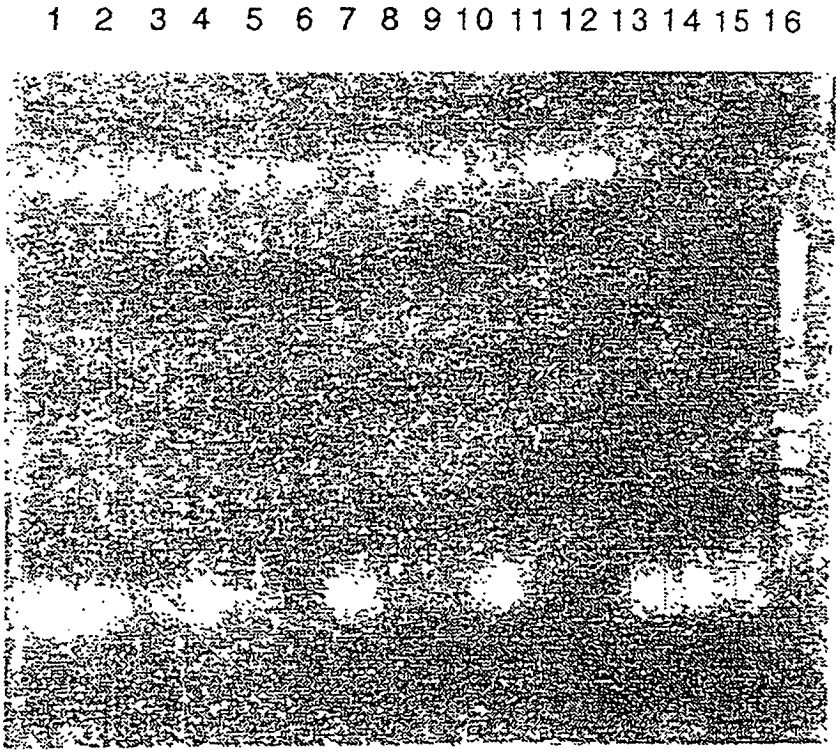


FIG. 20

FIG. 21

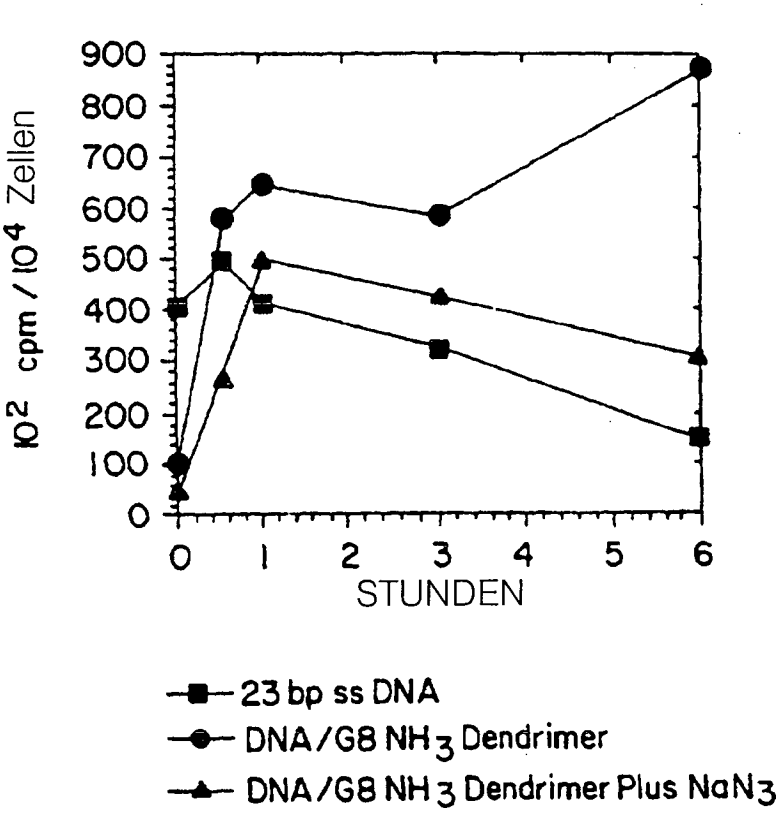
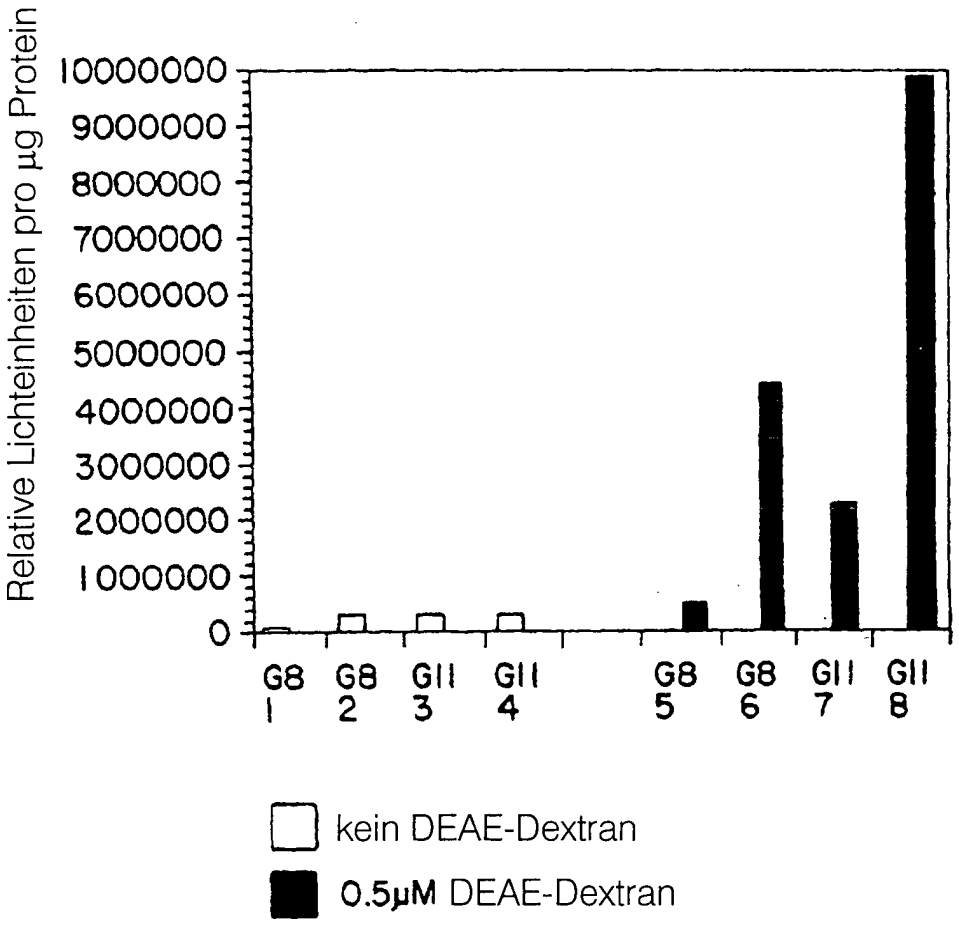
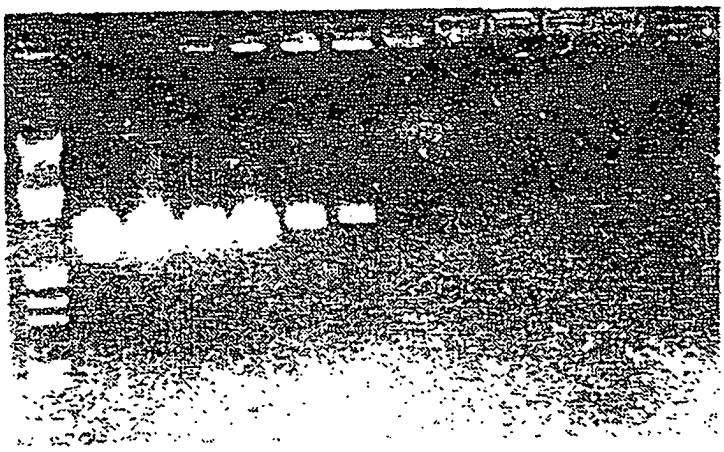

900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
10^2 cpm / 10^4 Zellen
0
1
2
3
4
5
6
STUNDEN
23 bp ss DNA
DNA/G8 NH_3 Dendrimer
DNA/G8 NH_3 Dendrimer Plus NaN_3

FIG.22


Relative Lichteinheiten pro µg Protein
10000000
9000000
8000000
7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
G8 1
G8 2
GII 3
GII 4
G8 5
G8 6
GII 7
GII 8
kein DEAE-Dextran
0.5µM DEAE-Dextran



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

FIG. 23A



FIG. 23B

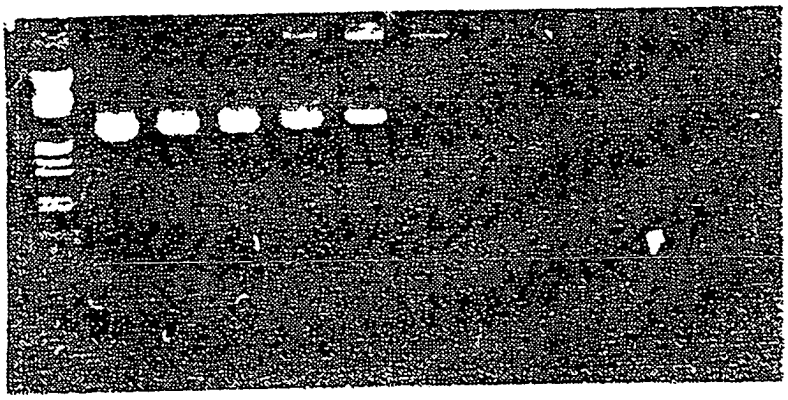


FIG. 23C

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

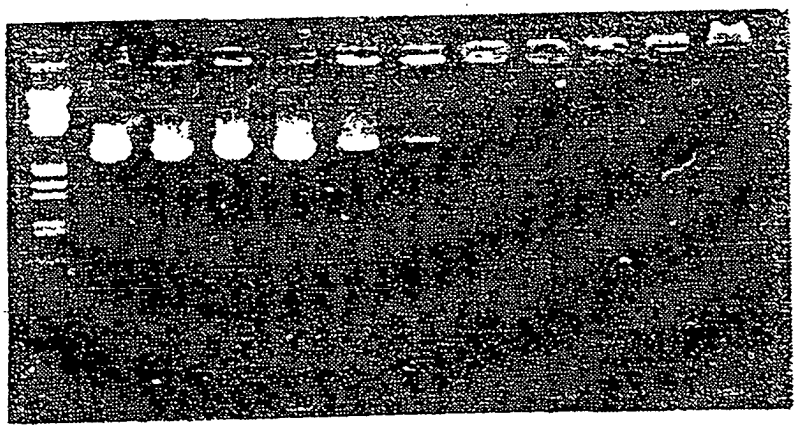


FIG. 23D

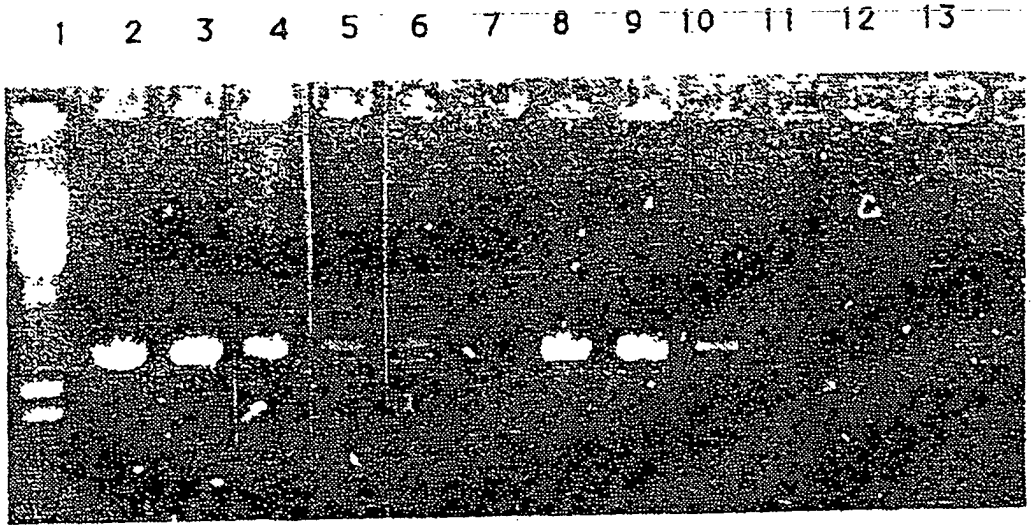


FIG. 24

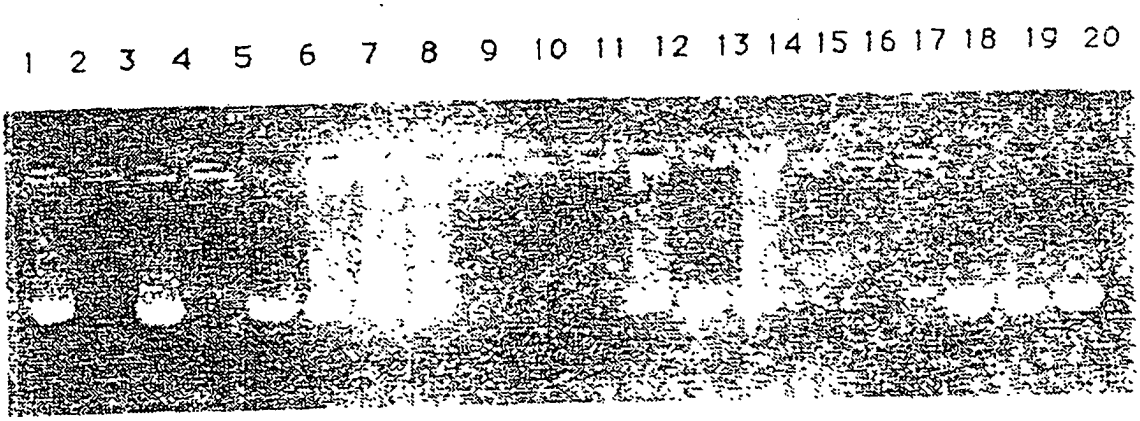


FIG. 25

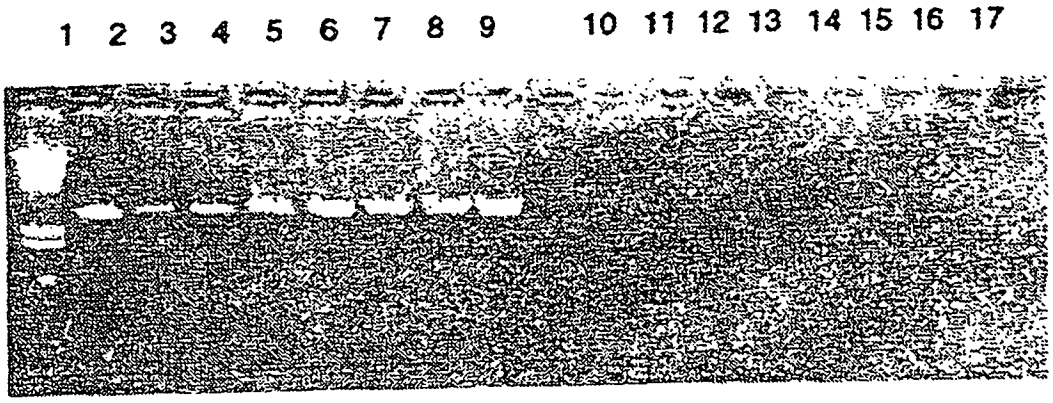


FIG. 26A

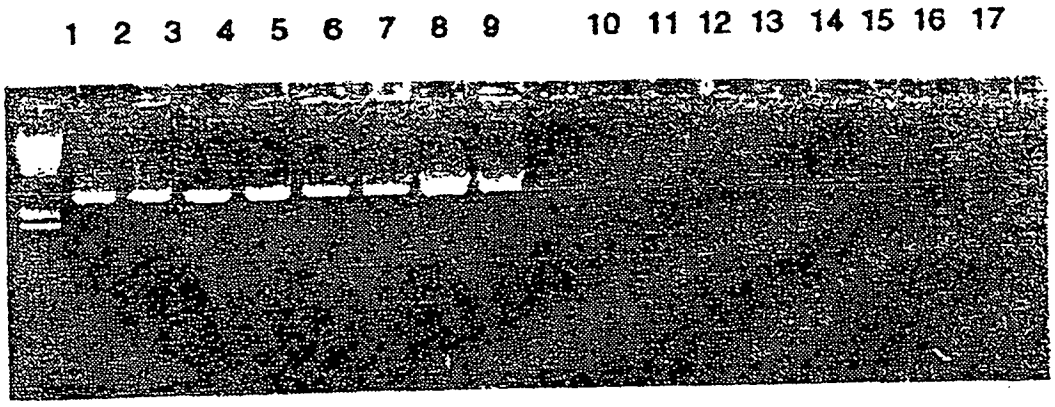


FIG. 26B

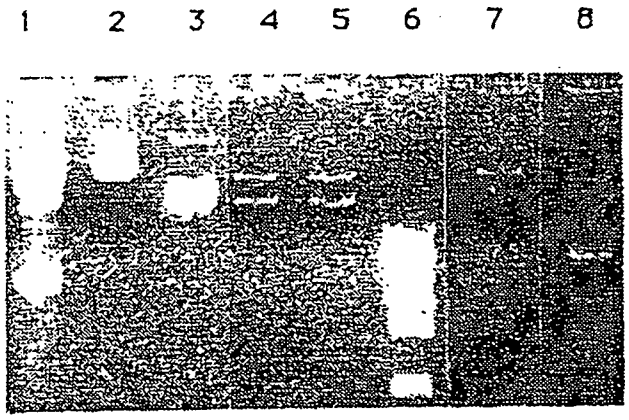


FIG. 27

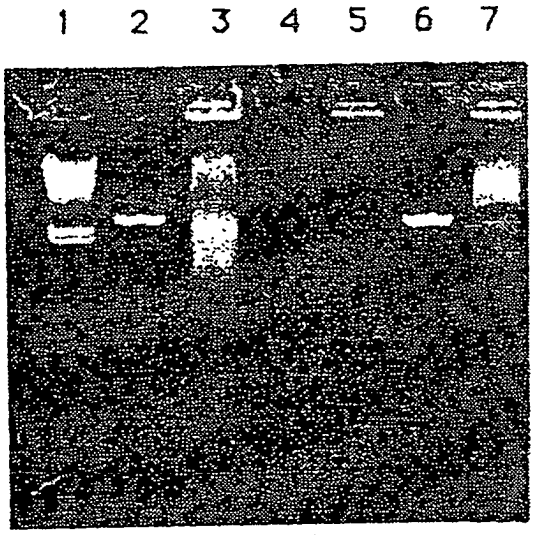


FIG. 28

FIG. 29

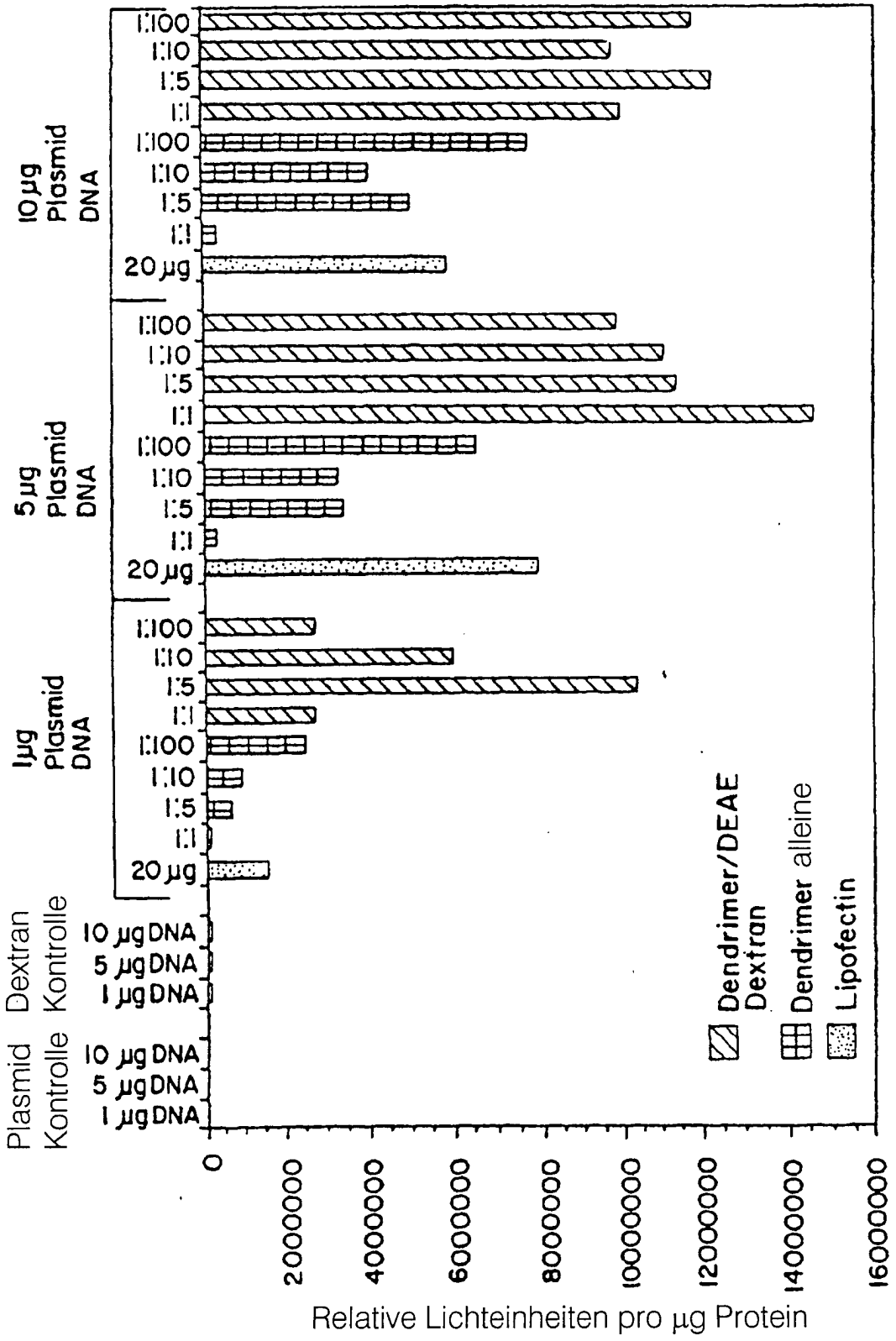

10 µg Plasmid DNA
5 µg Plasmid DNA
1µg Plasmid DNA
1:100
1:10
1:5
1:1
20 µg
Plasmid Kontrolle
Dextran Kontrolle
10 µg DNA
5 µg DNA
1 µg DNA
Dendrimer/DEAE Dextran
Dendrimer alleine
Lipofectin
0
2000000
4000000
6000000
8000000
10000000
12000000
14000000
16000000
Relative Lichteinheiten pro µg Protein

FIG. 30

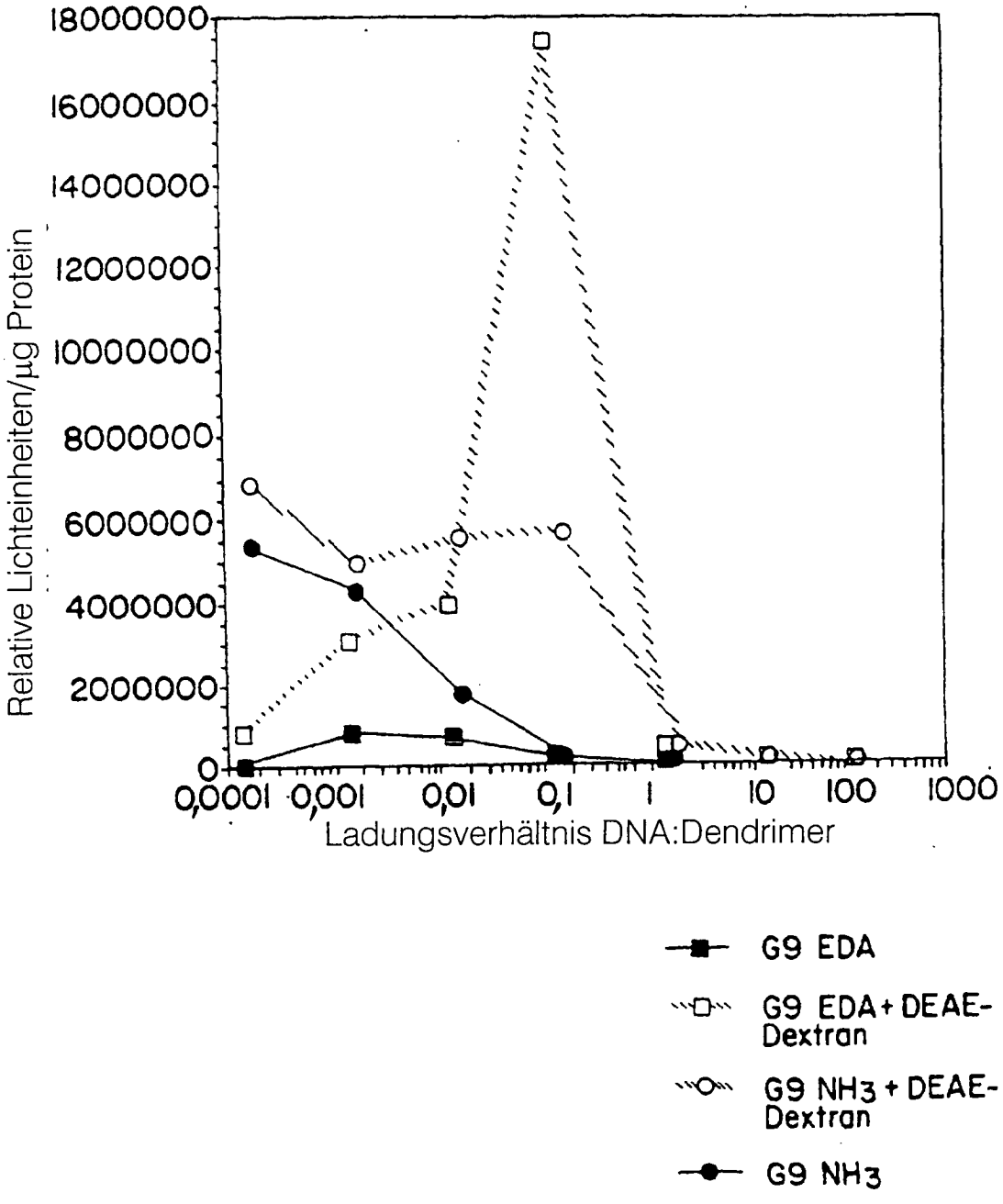

18000000
16000000
14000000
12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
Relative Lichteinheiten/µg Protein
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Ladungsverhältnis DNA:Dendrimer
G9 EDA
G9 EDA + DEAE-Dextran
G9 NH3 + DEAE-Dextran
G9 NH3

FIG. 31

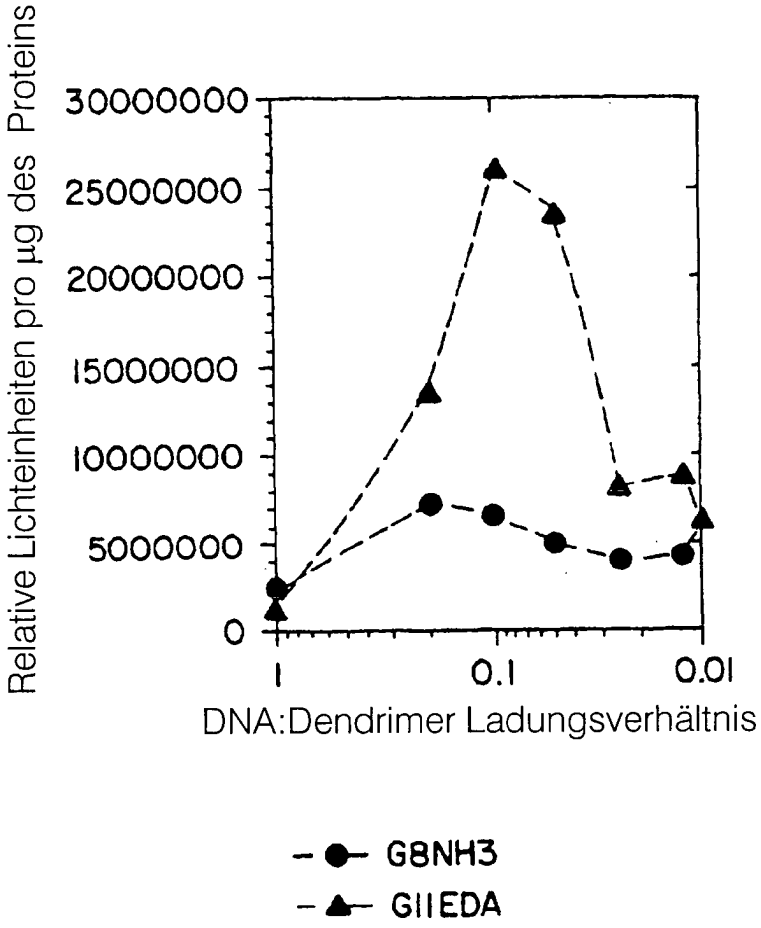

Relative Lichteinheiten pro µg des Proteins
30000000
25000000
20000000
15000000
10000000
5000000
0
1
0.1
0.01
DNA:Dendrimer Ladungsverhältnis
G8NH3
G11EDA

FIG. 32

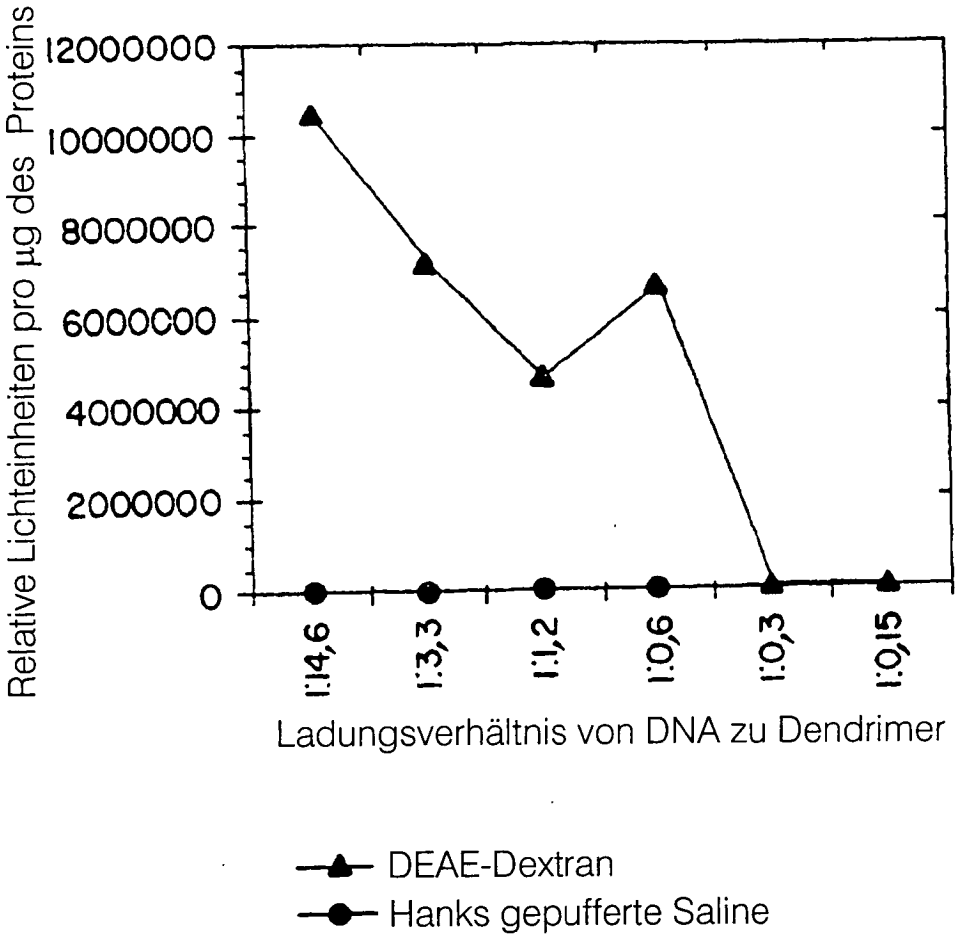

Relative Lichteinheiten pro µg des Proteins
12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
1:14,6
1:3,3
1:1,2
1:0,6
1:0,3
1:0,15
Ladungsverhältnis von DNA zu Dendrimer
DEAE-Dextran
Hanks gepufferte Saline

FIG. 33

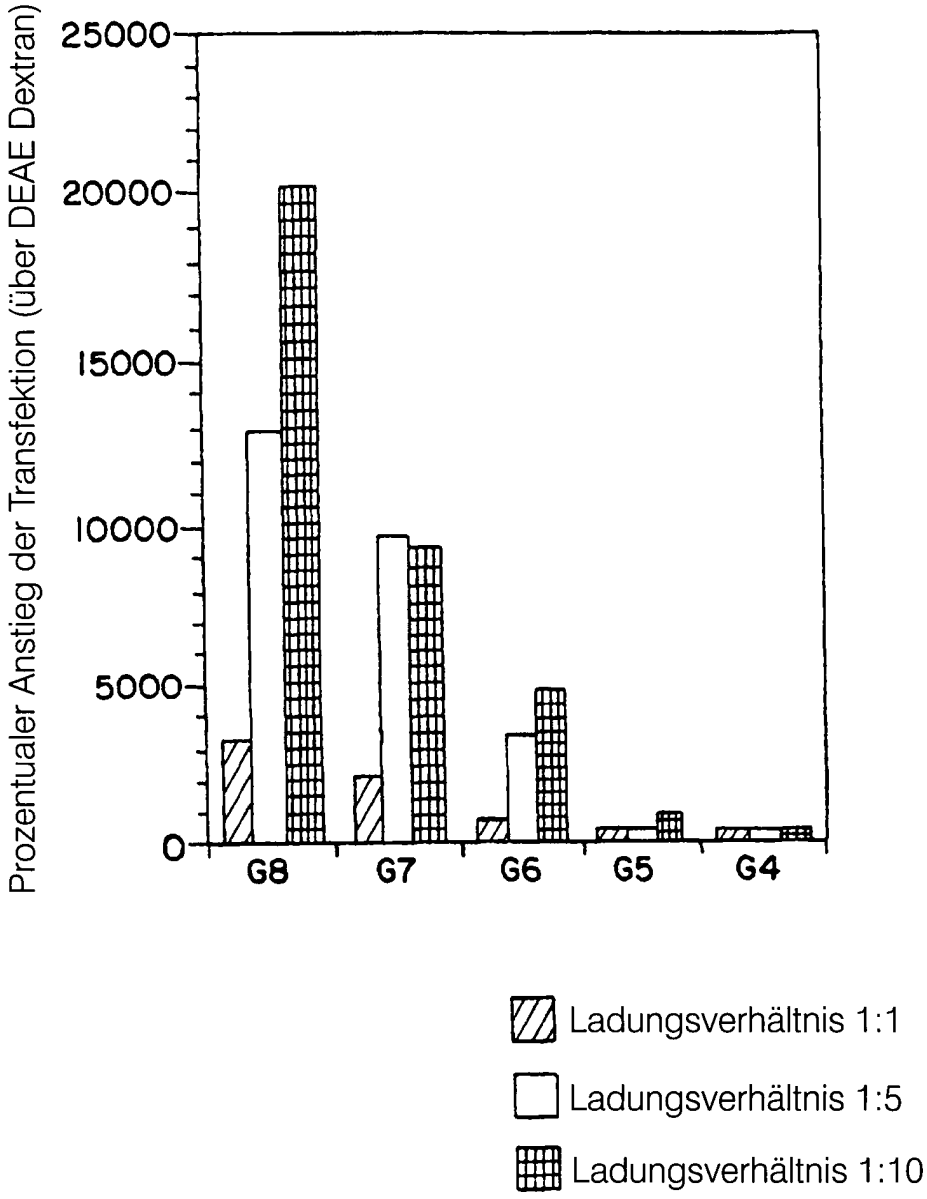

Prozentualer Anstieg der Transfektion (über DEAE Dextran)
25000
20000
15000
10000
5000
0
G8
G7
G6
G5
G4
Ladungsverhältnis 1:1
Ladungsverhältnis 1:5
Ladungsverhältnis 1:10

FIG. 34

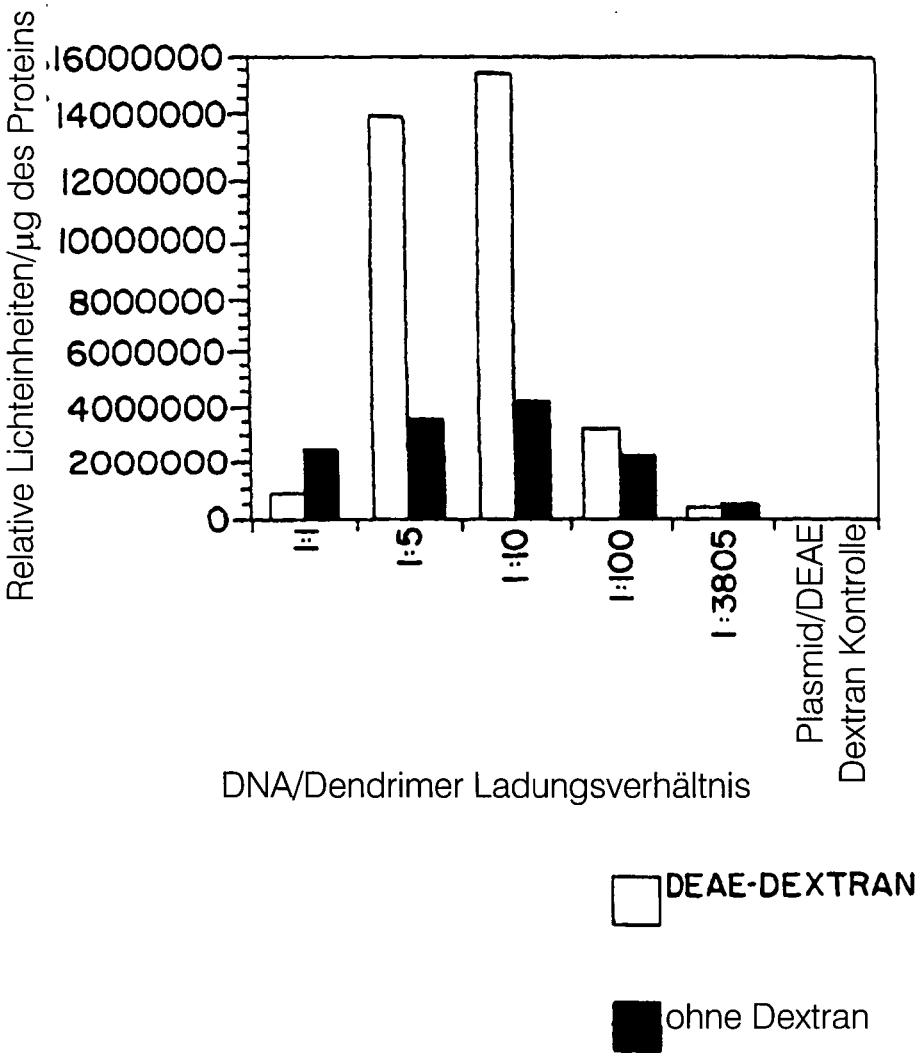

Relative Lichteinheiten/µg des Proteins
16000000
14000000
12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
1:1
1:5
1:10
1:100
1:3805
Plasmid/DEAE Dextran Kontrolle
DNA/Dendrimer Ladungsverhältnis
DEAE-DEXTRAN
ohne Dextran

FIG. 35

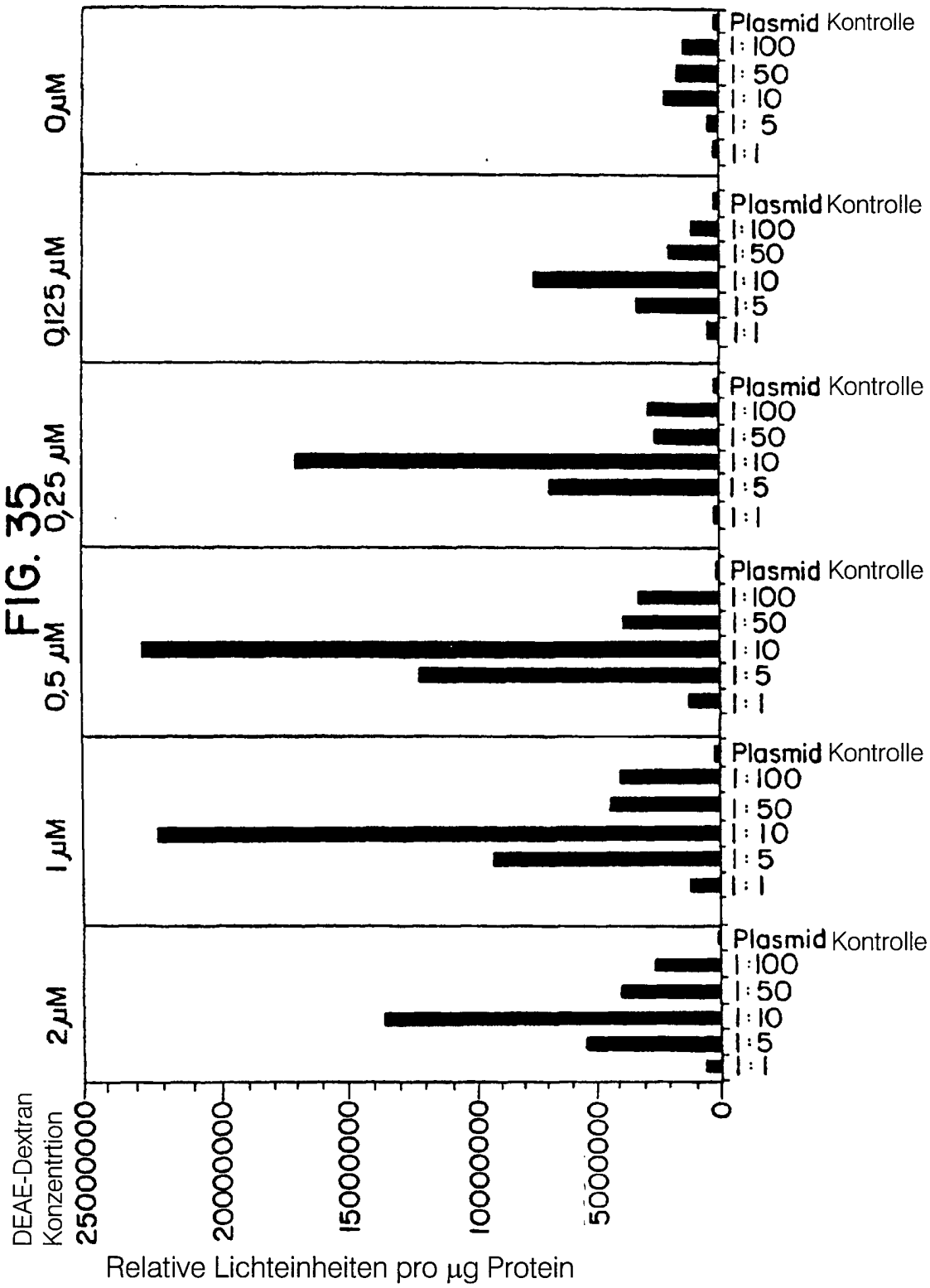

0µM
0,125 µM
0,25 µM
0,5 µM
1 µM
2µM
Plasmid Kontrolle
1:100
1:50
1:10
1:5
1:1
DEAE-Dextran Konzentrtion
25000000
20000000
15000000
10000000
5000000
0
Relative Lichteinheiten pro µg Protein

FIG. 36

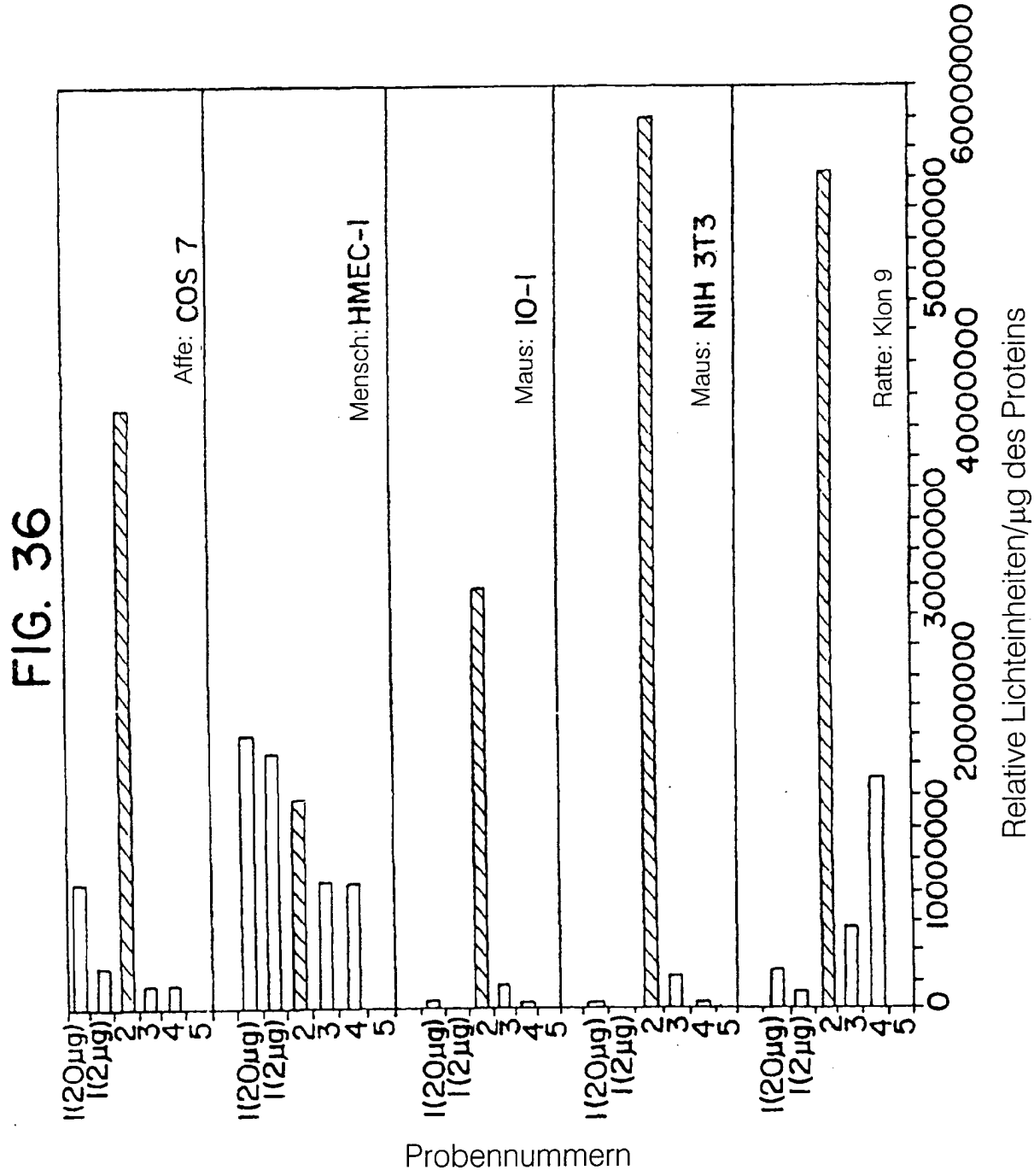

Affe: COS 7
Mensch: HMEC-1
Maus: IO-1
Maus: NIH 3T3
Ratte: Klon 9
I(20µg)
I(2µg)
1
2
3
4
5
0
10000000
20000000
30000000
40000000
50000000
60000000
Relative Lichteinheiten/µg des Proteins
Probennummern

FIG. 37

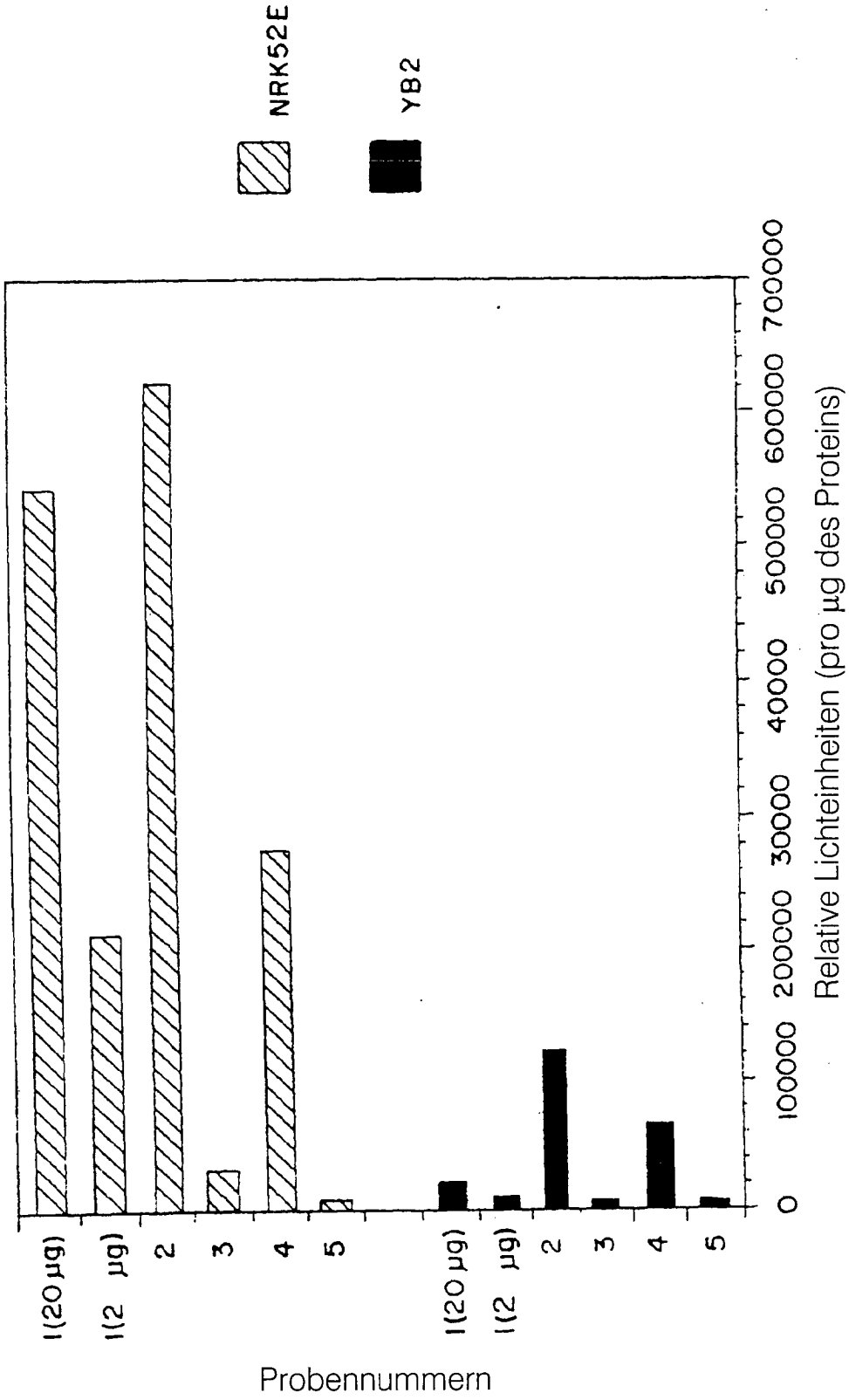

NRK52E
YB2
0
100000
200000
30000
40000
500000
600000
700000
Relative Lichteinheiten (pro µg des Proteins)
1(20 µg)
1(2 µg)
2
3
4
5
1(20 µg)
1(2 µg)
2
3
4
5
Probennummern

FIG. 38

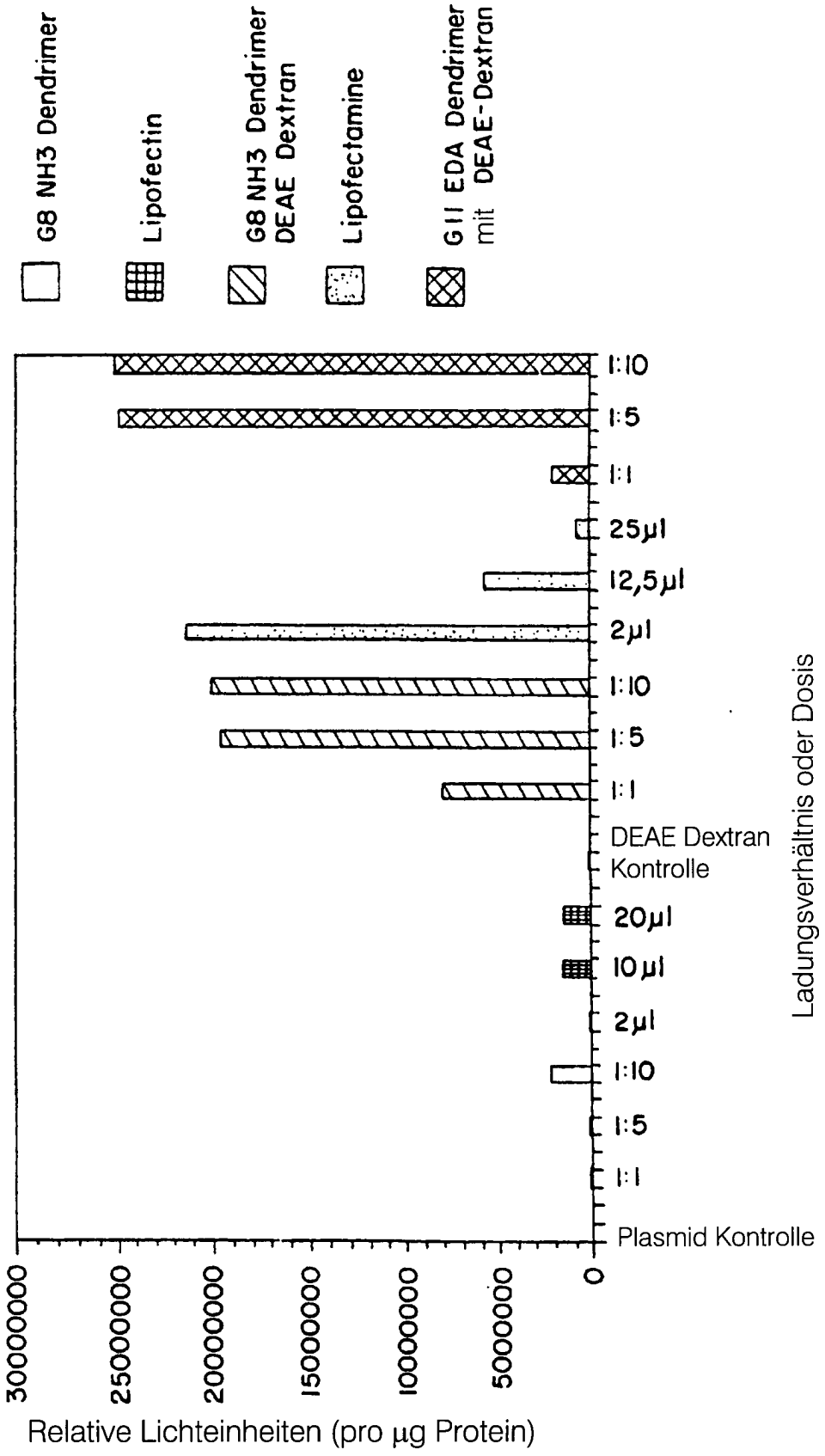

G8 NH3 Dendrimer
Lipofectin
G8 NH3 Dendrimer DEAE Dextran
Lipofectamine
G11 EDA Dendrimer mit DEAE-Dextran
1:10
1:5
1:1
25µl
12,5µl
2µl
1:10
1:5
1:1
DEAE Dextran Kontrolle
20µl
10µl
2µl
1:10
1:5
1:1
Plasmid Kontrolle
Ladungsverhältnis oder Dosis
30000000
25000000
20000000
15000000
10000000
5000000
0
Relative Lichteinheiten (pro µg Protein)

FIG. 39

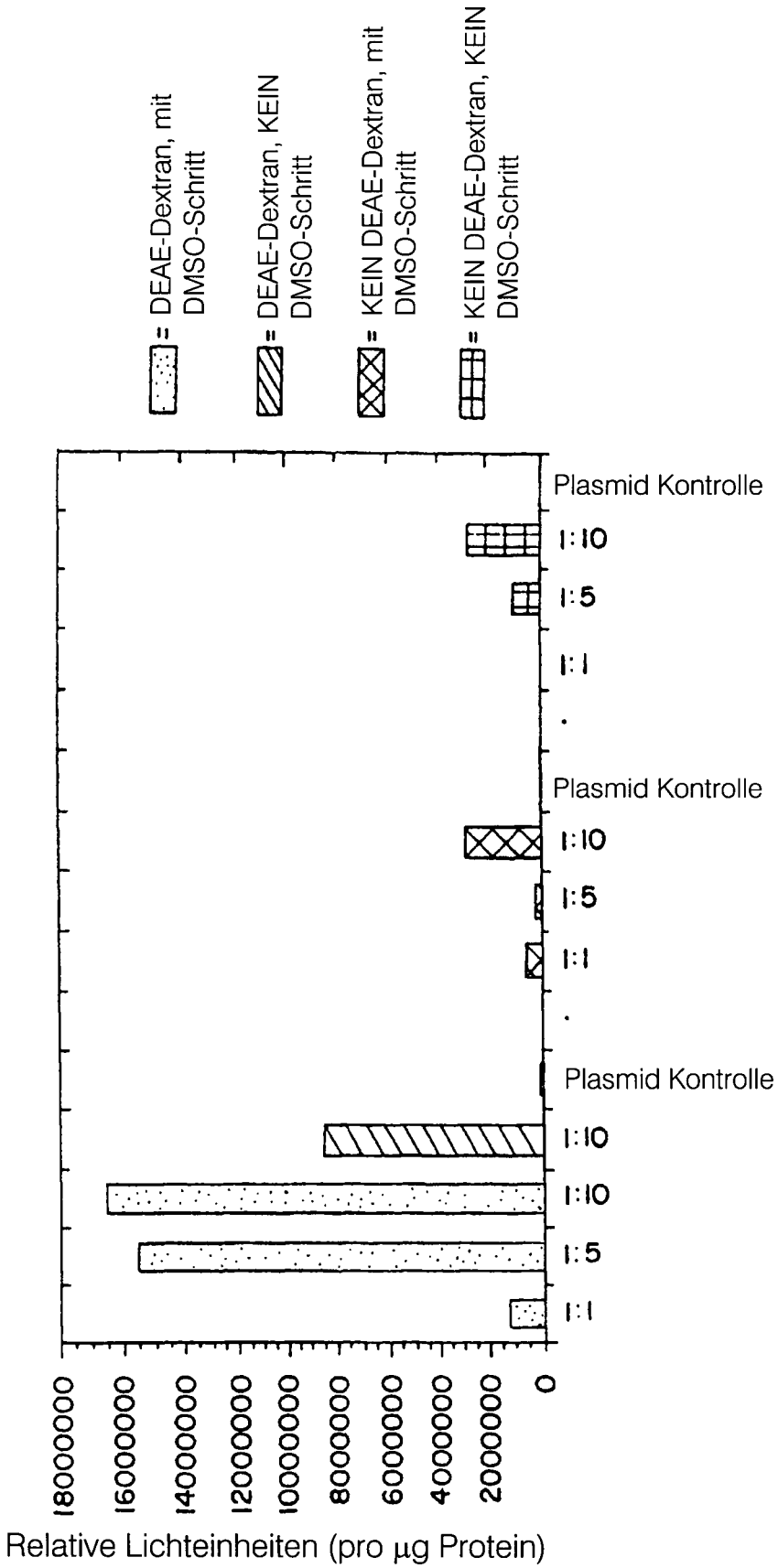
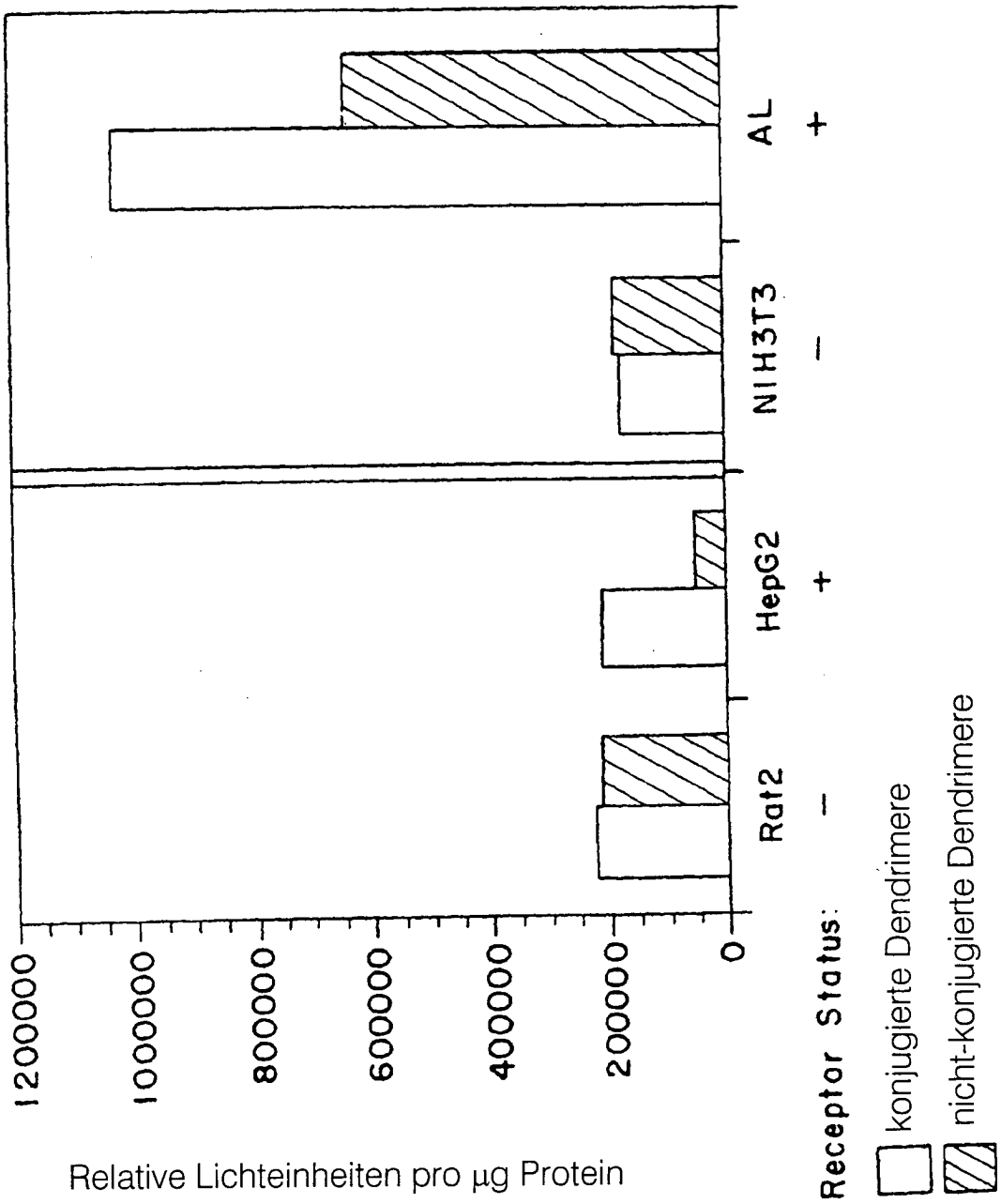

= DEAE-Dextran, mit DMSO-Schritt
= DEAE-Dextran, KEIN DMSO-Schritt
= KEIN DEAE-Dextran, mit DMSO-Schritt
= KEIN DEAE-Dextran, KEIN DMSO-Schritt
Plasmid Kontrolle
1:10
1:5
1:1
Plasmid Kontrolle
1:10
1:5
1:1
Plasmid Kontrolle
1:10
1:10
1:5
1:1
18000000
16000000
14000000
12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
Relative Lichteinheiten (pro µg Protein)

FIG. 40


1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
Relative Lichteinheiten pro µg Protein
Rat2
HepG2
NIH3T3
AL
Receptor Status: – + – +
konjugierte Dendrimere
nicht-konjugierte Dendrimere

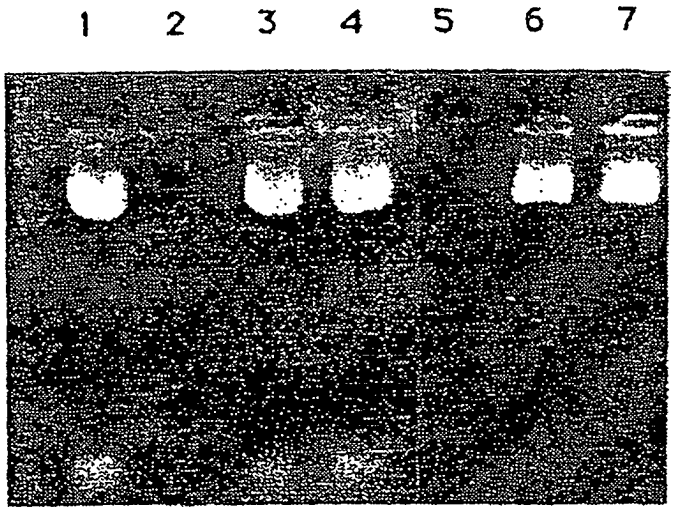


FIG. 41

FIG. 42

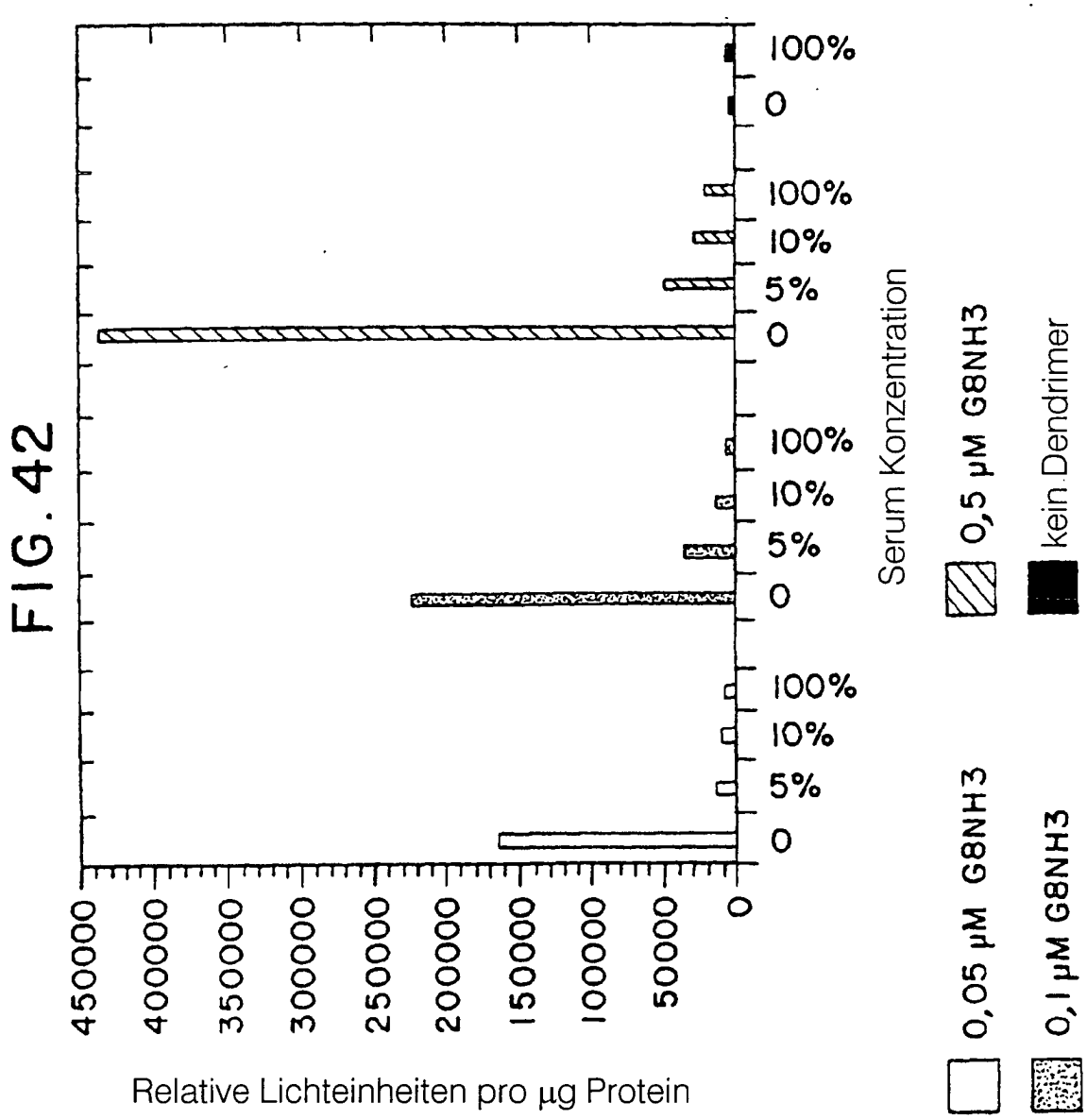

100%
0
100%
10%
5%
0
100%
10%
5%
0
100%
10%
5%
0
450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
Relative Lichteinheiten pro µg Protein
Serum Konzentration
0,5 µM G8NH3
kein Dendrimer
0,05 µM G8NH3
0,1 µM G8NH3

FIG. 43

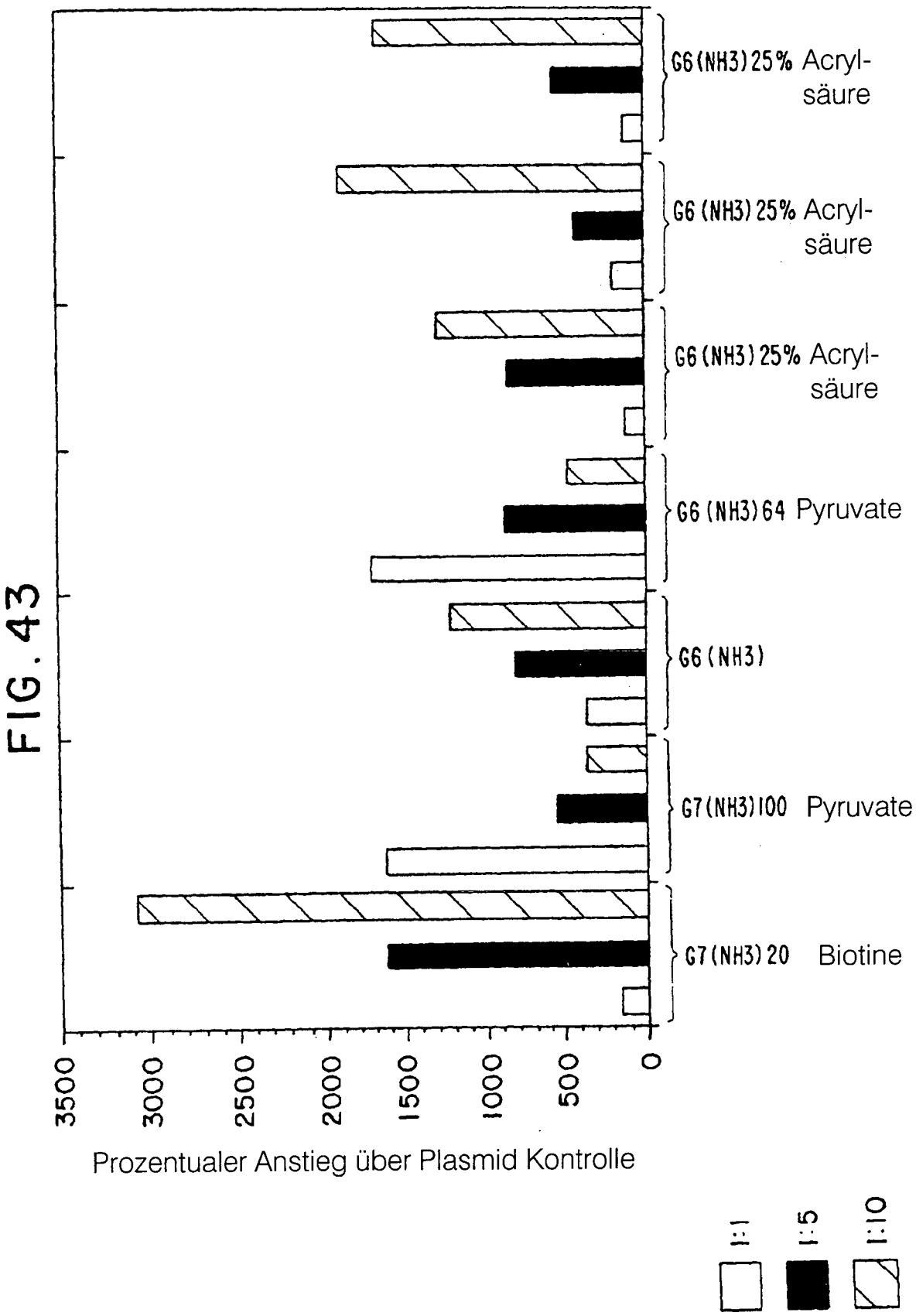

G6(NH3)25% Acryl-säure
G6(NH3)25% Acryl-säure
G6(NH3)25% Acryl-säure
G6(NH3)64 Pyruvate
G6(NH3)
G7(NH3)100 Pyruvate
G7(NH3)20 Biotine
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Prozentualer Anstieg über Plasmid Kontrolle
1:1
1:5
1:10

FIG. 44

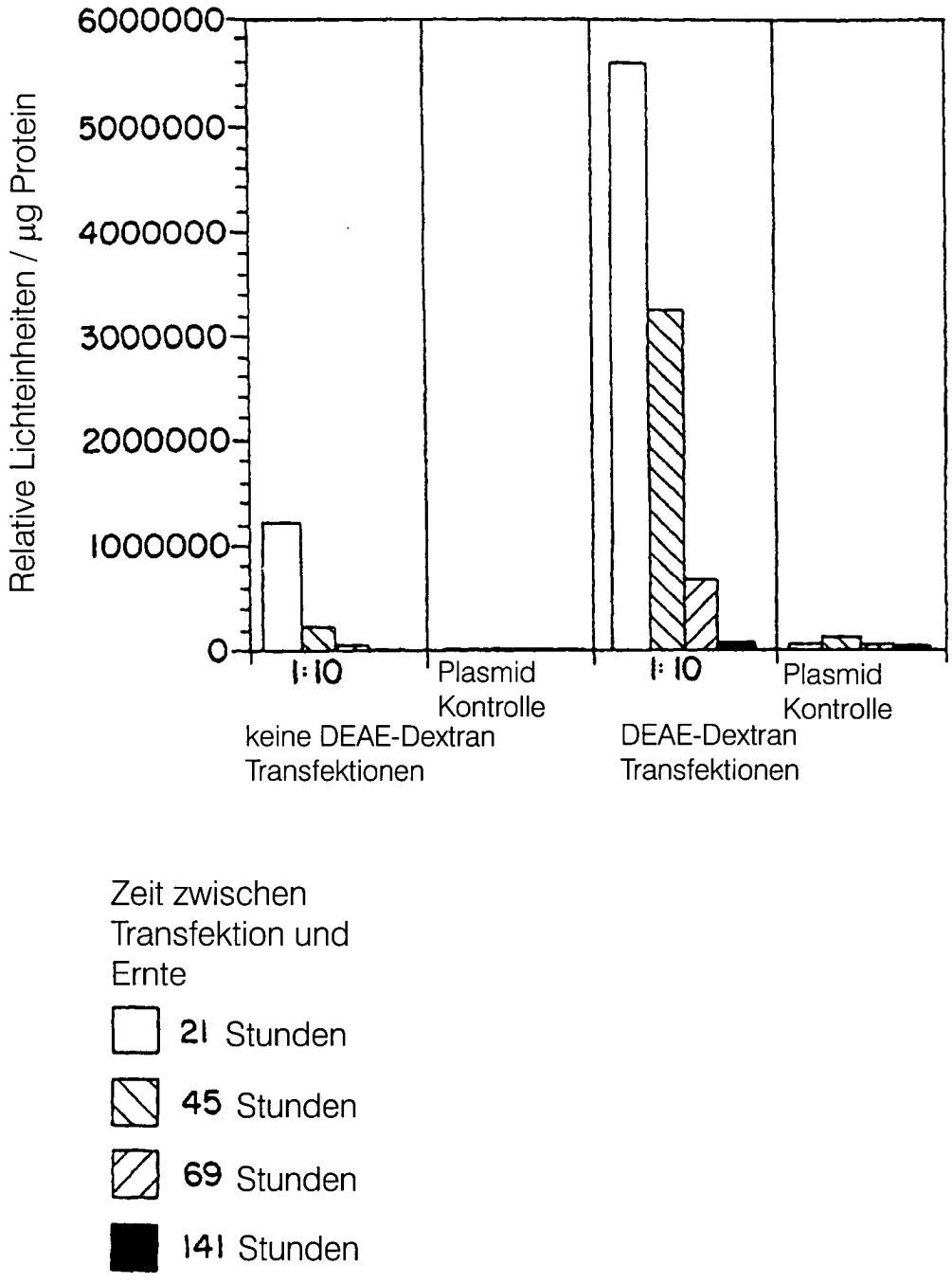

Relative Lichteinheiten / µg Protein
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
1:10
Plasmid Kontrolle
1:10
Plasmid Kontrolle
keine DEAE-Dextran Transfektionen
DEAE-Dextran Transfektionen
Zeit zwischen Transfektion und Ernte
21 Stunden
45 Stunden
69 Stunden
141 Stunden

FIG. 45

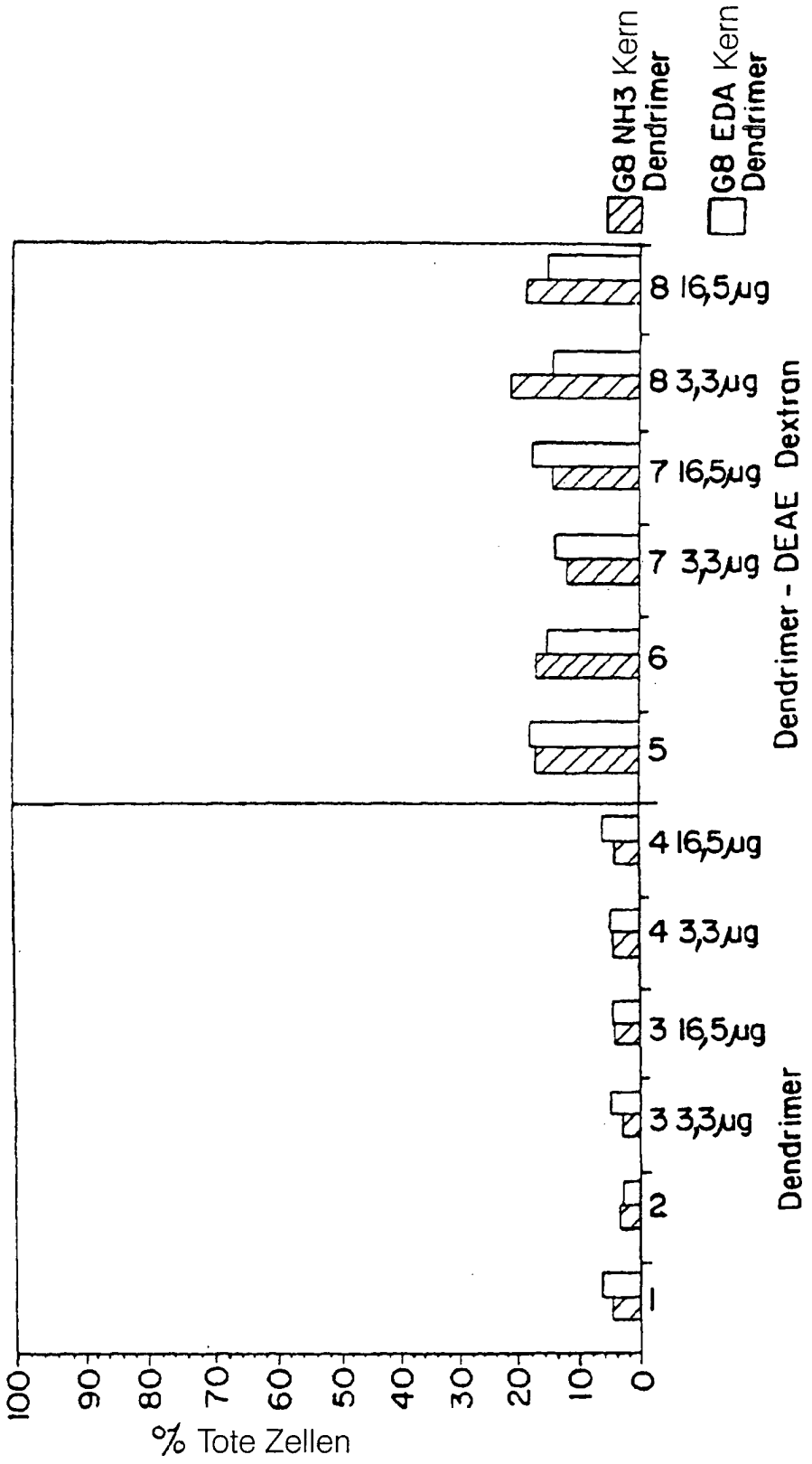

G8 NH3 Kern Dendrimer
G8 EDA Kern Dendrimer
8 16,5µg
8 3,3µg
7 16,5µg
7 3,3µg
6
5
Dendrimer - DEAE Dextran
4 16,5µg
4 3,3µg
3 16,5µg
3 3,3µg
2
1
Dendrimer
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% Tote Zellen

FIG. 46

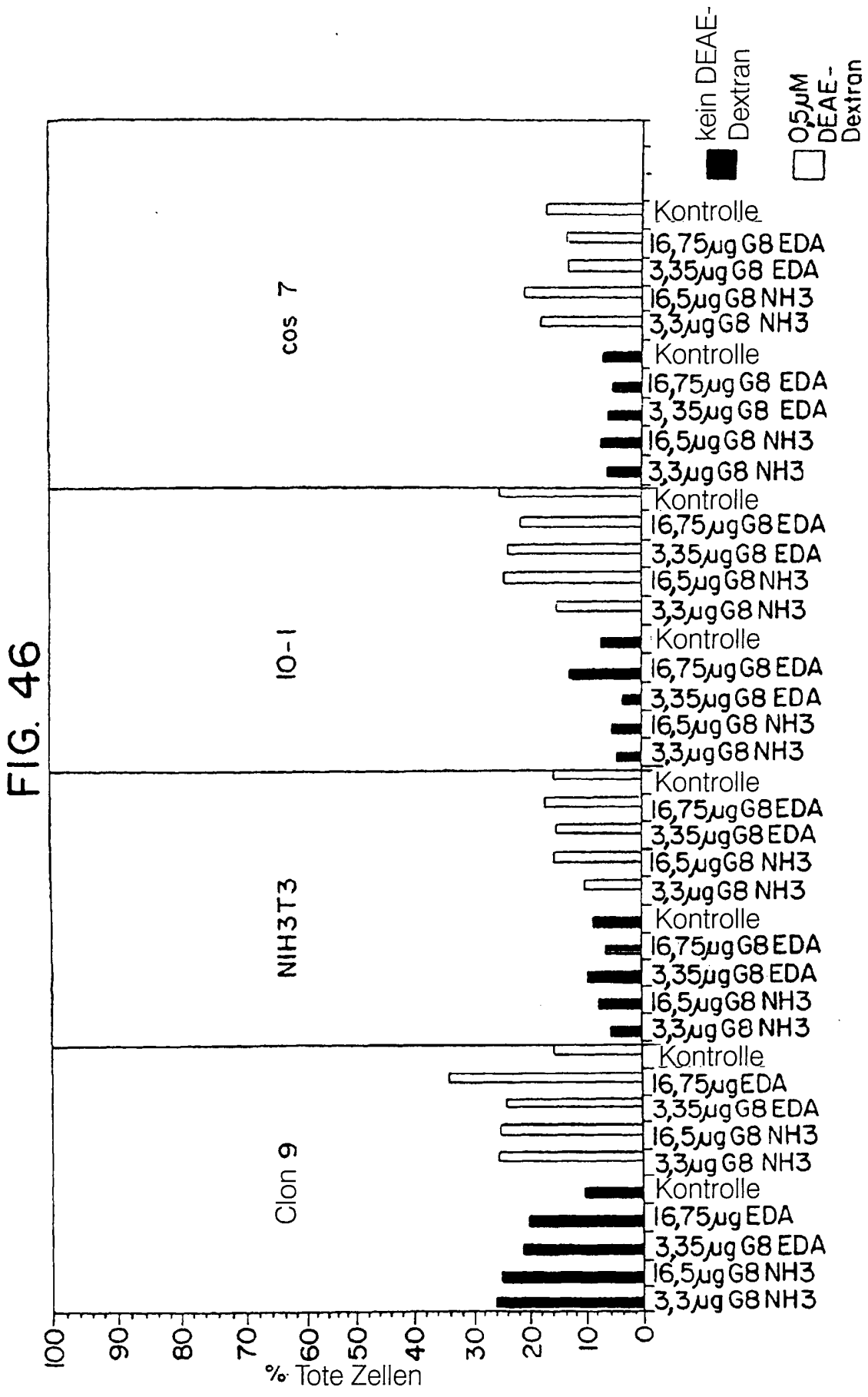

kein DEAE-Dextran
0,5µM DEAE-Dextran
cos 7
10-1
NIH3T3
Clon 9
Kontrolle
16,75µg G8 EDA
3,35µg G8 EDA
16,5µg G8 NH3
3,3µg G8 NH3
% Tote Zellen
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

FIG. 47A

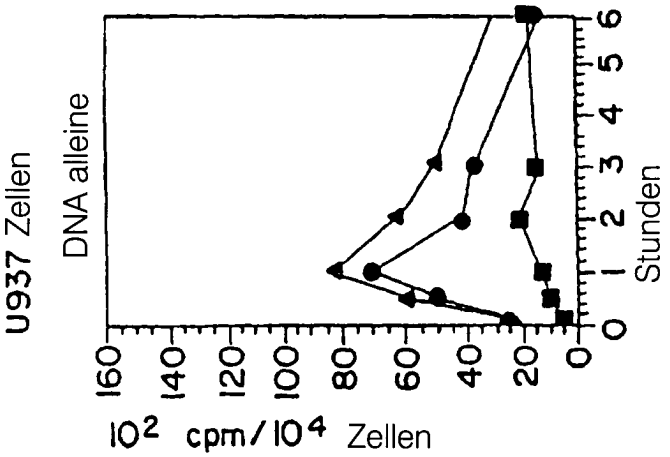


FIG. 47B

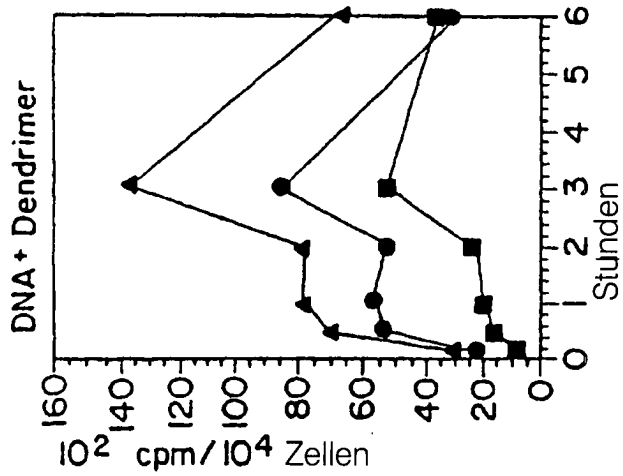


FIG. 47C

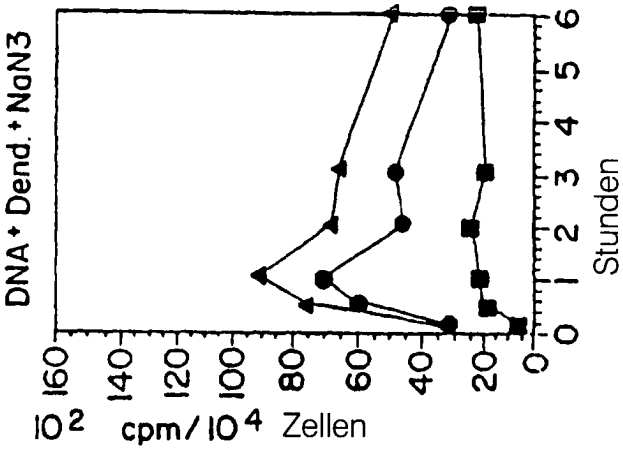


FIG. 47D

RAT 2 Zellen

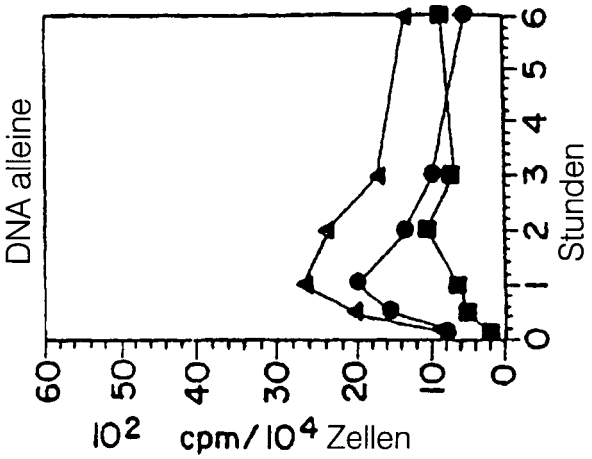


FIG. 47E

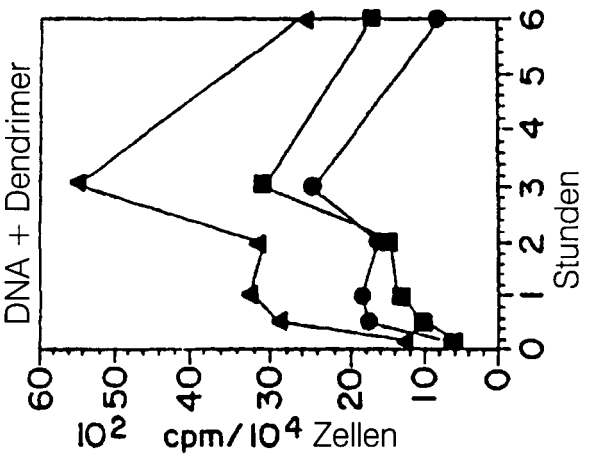
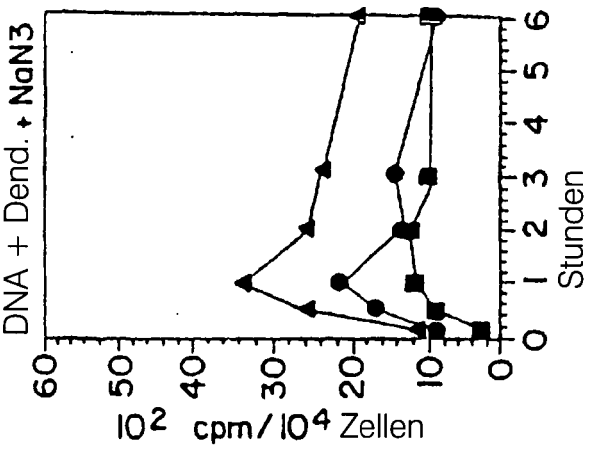


FIG. 47F



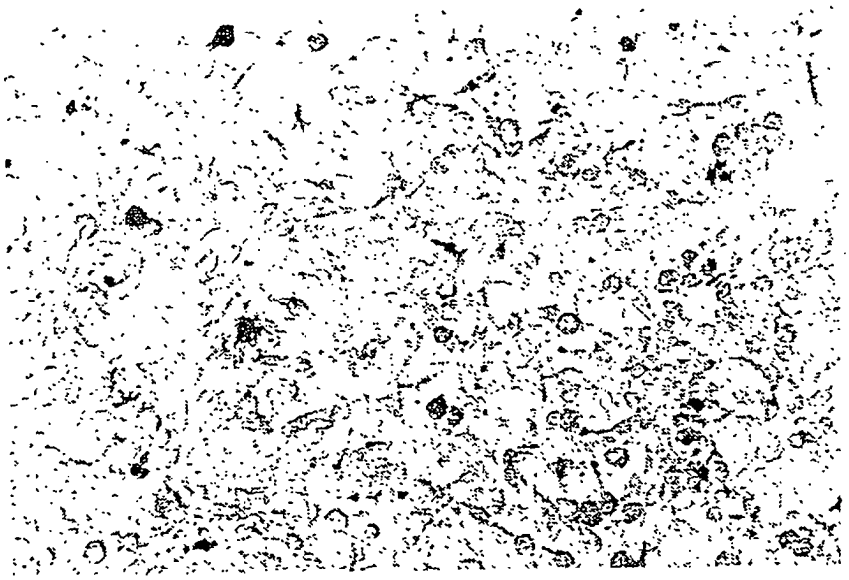


FIG. 48A

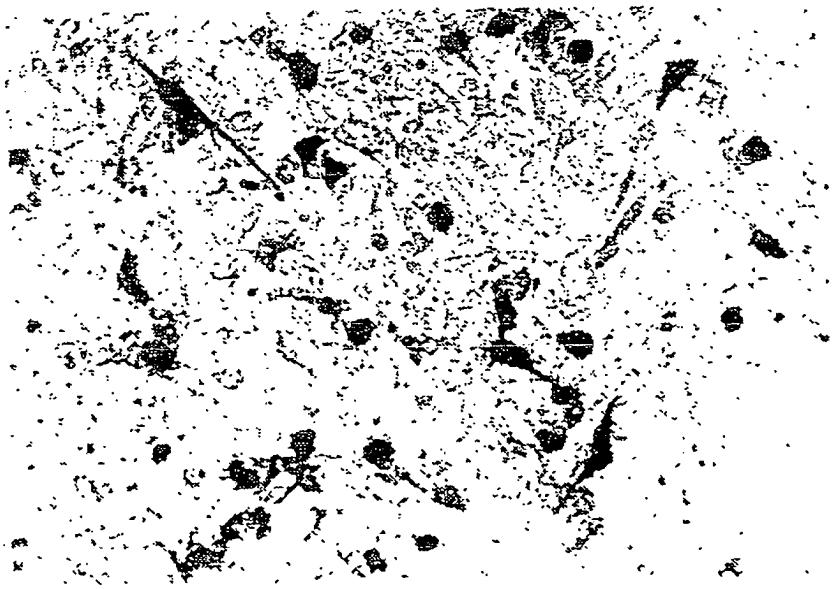


FIG. 48B

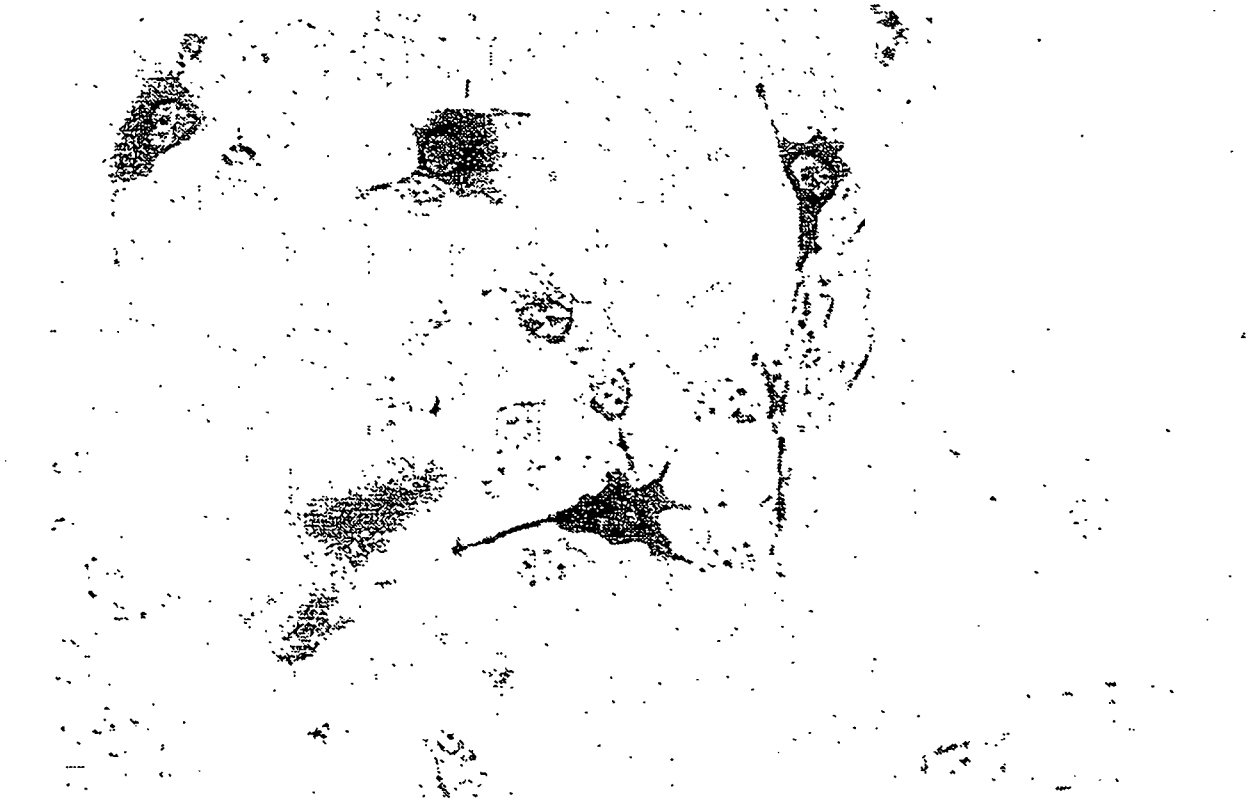


FIG 49

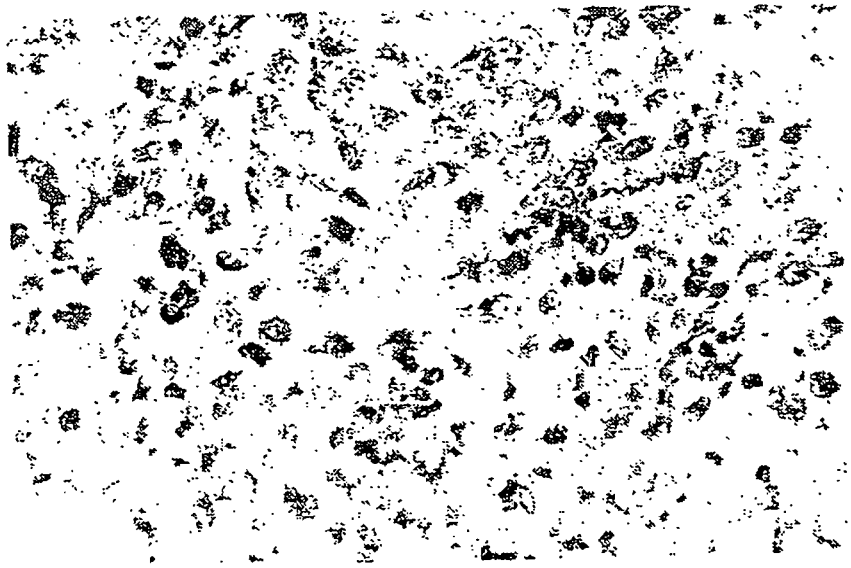


FIG. 50A

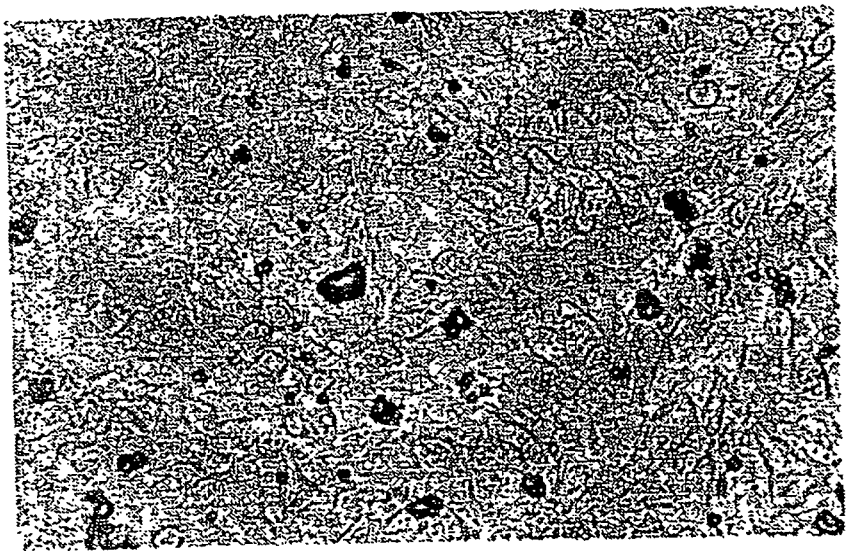


FIG. 50B

FIG. 5IA

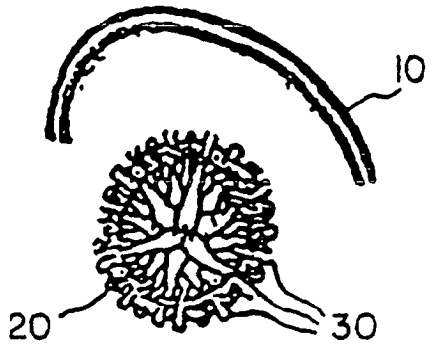


FIG. 5IB

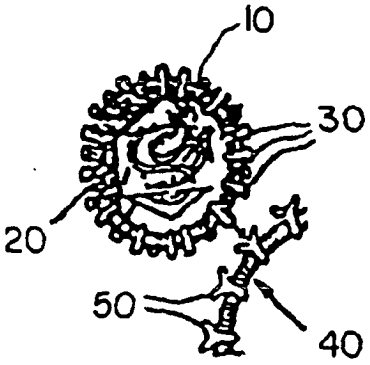


FIG. 5IC

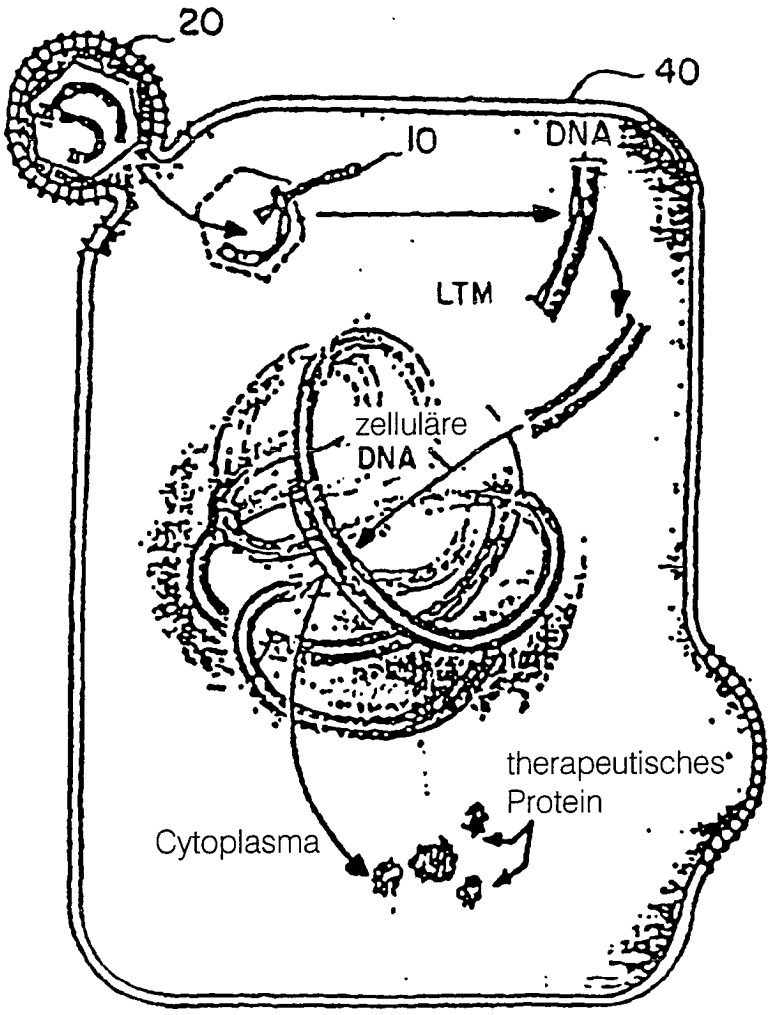


FIG.52

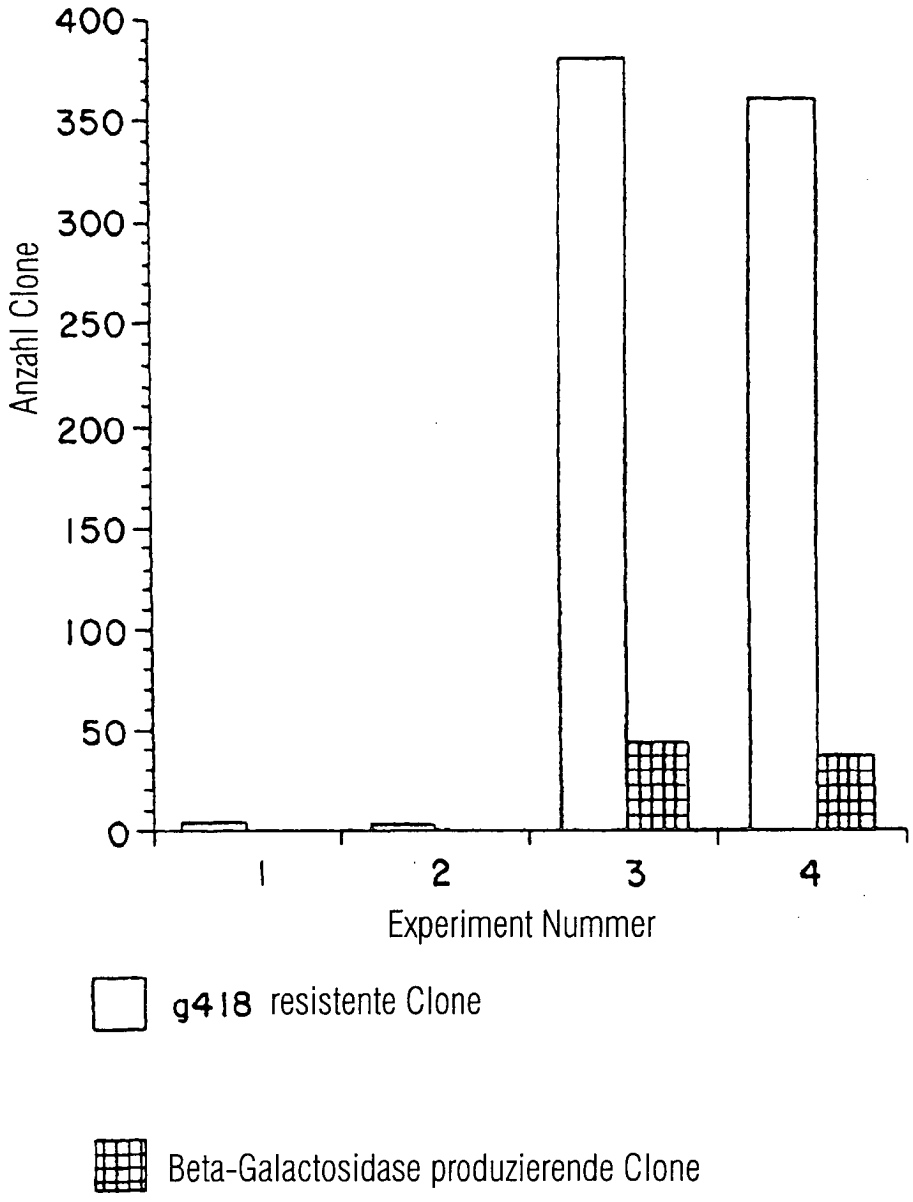

400
350
300
250
200
150
100
50
0
Anzahl Clone
1
2
3
4
Experiment Nummer
g418 resistente Clone
Beta-Galactosidase produzierende Clone

FIG. 53

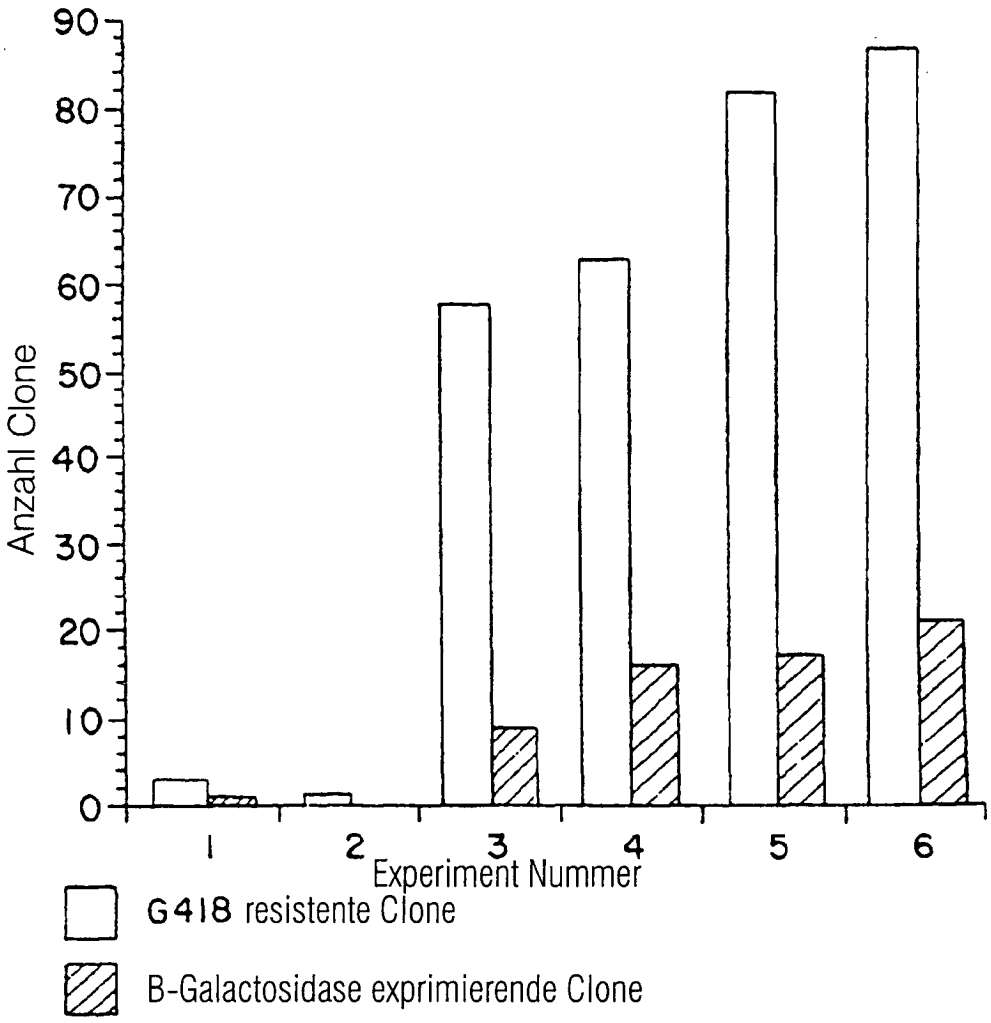

90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Anzahl Clone
1
2
3
4
5
6
Experiment Nummer
G418 resistente Clone
B-Galactosidase exprimierende Clone

FIG.54

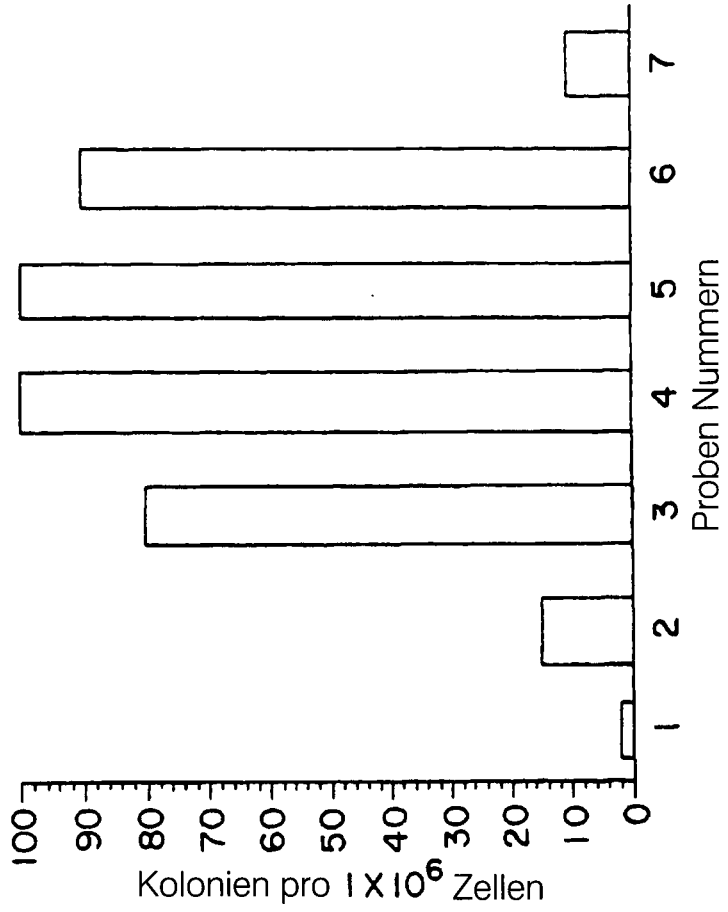

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Kolonien pro 1X10^6 Zellen
1
2
3
4
5
6
7
Proben Nummern

FIG.55A

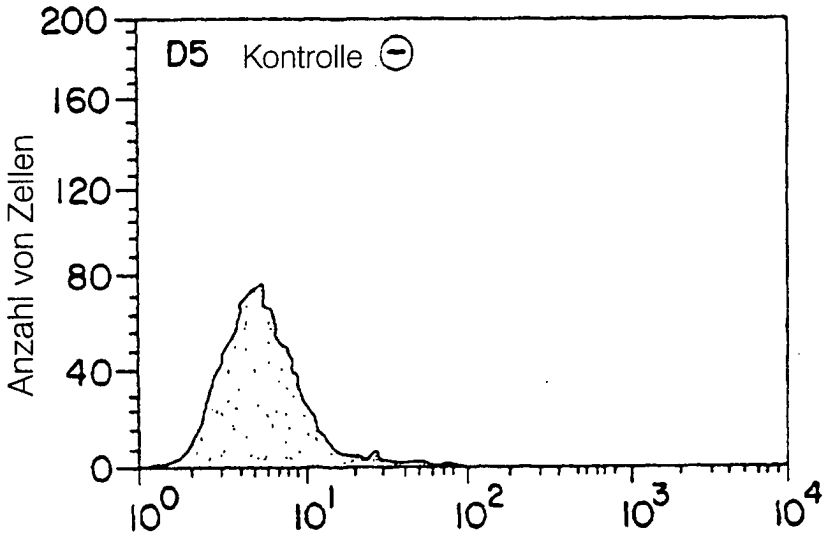


FIG.55B

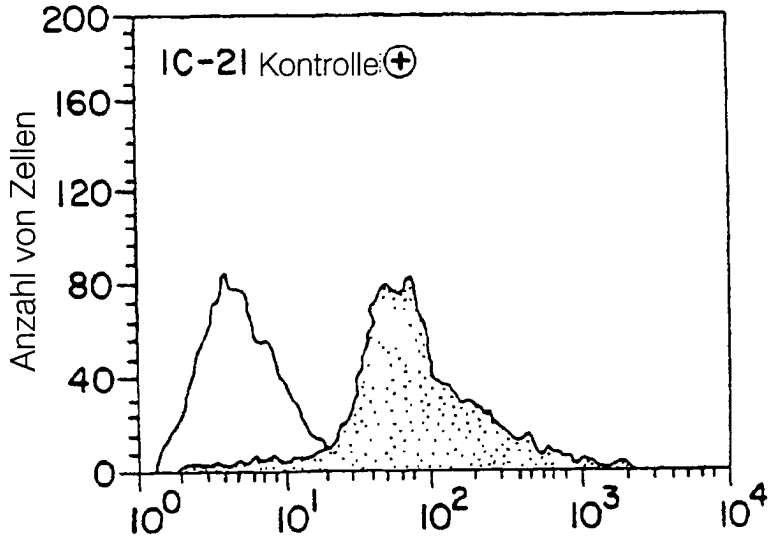


FIG.55C

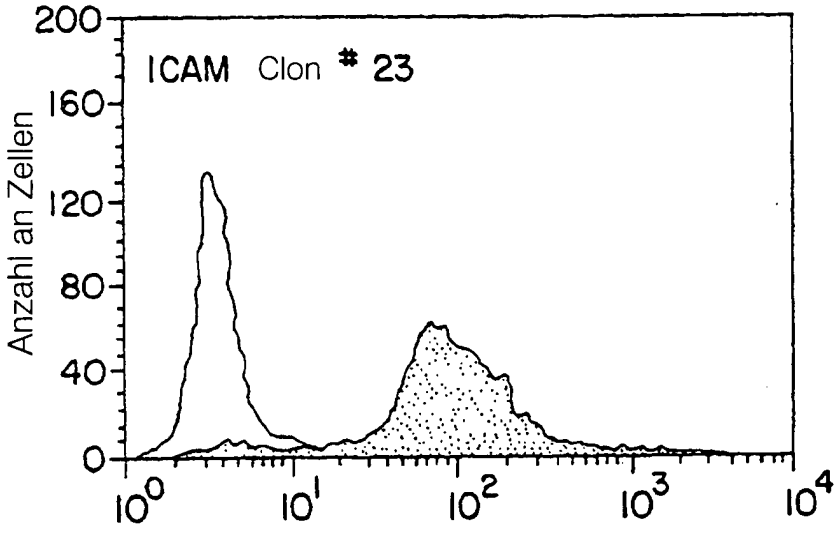


FIG.55D

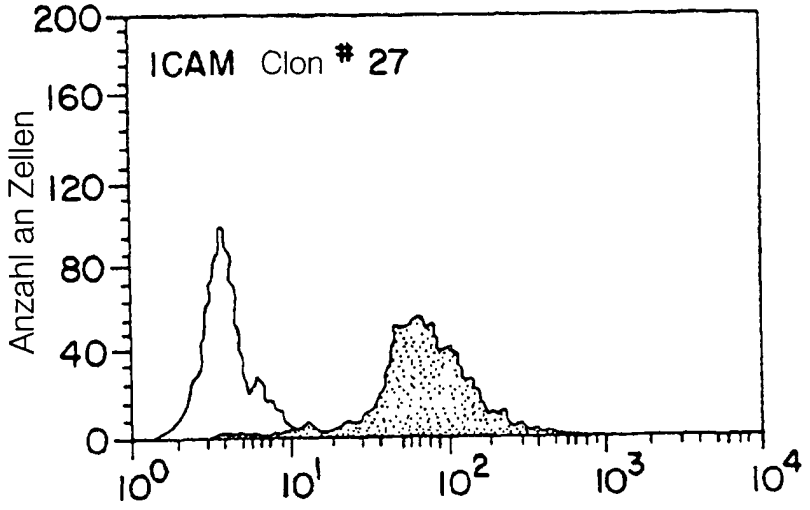


FIG.55E

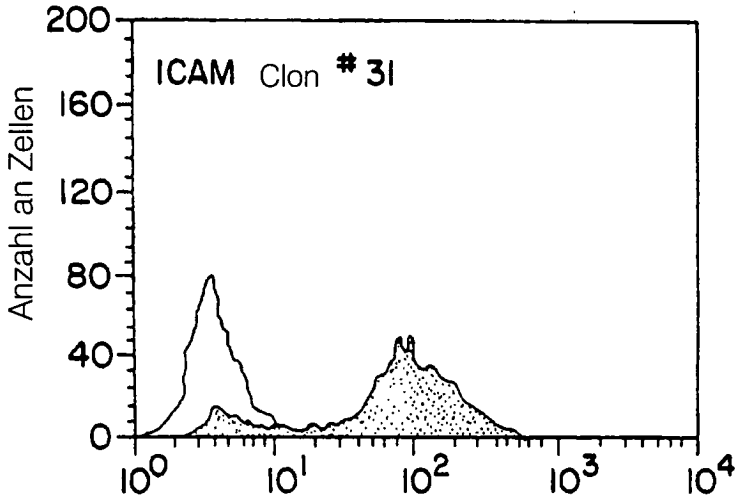


FIG.55F

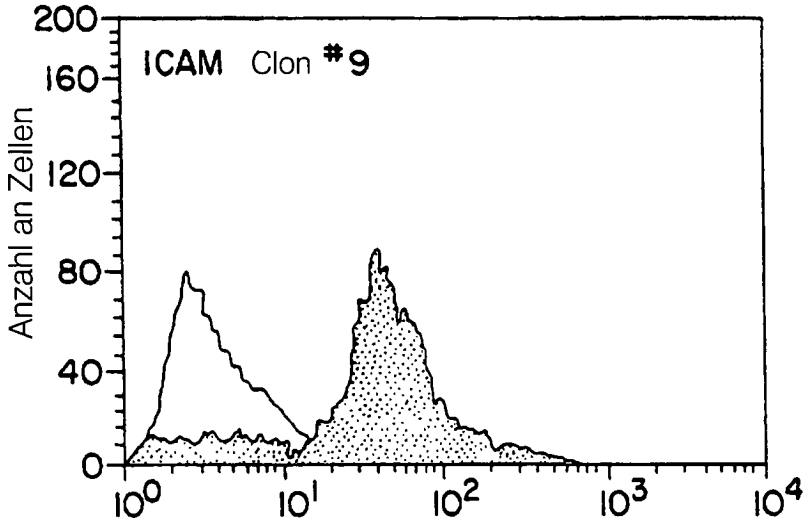


FIG. 56

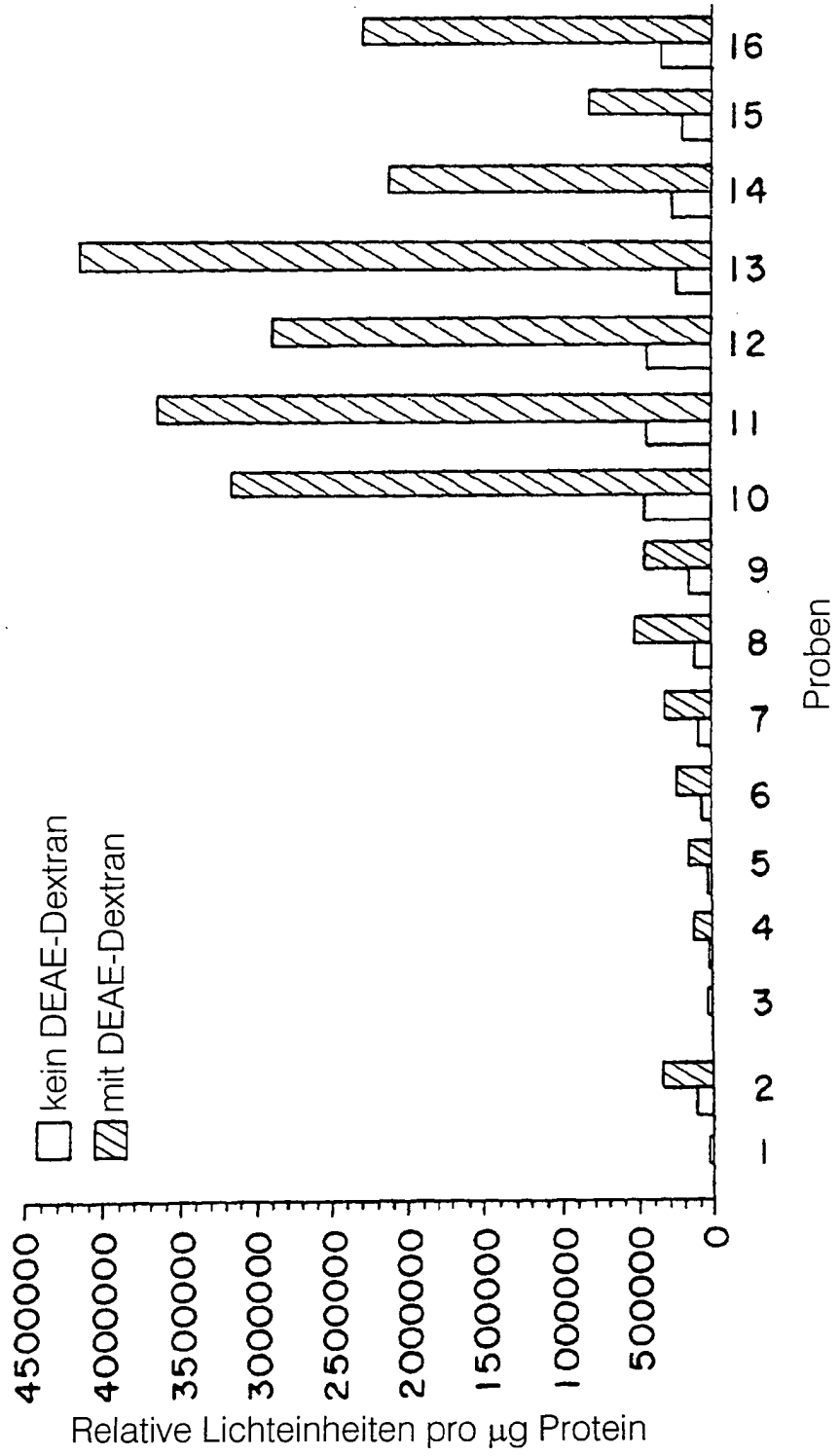

kein DEAE-Dextran
mit DEAE-Dextran
4500000
4000000
3500000
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
Relative Lichteinheiten pro µg Protein
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
Proben

FIG. 57

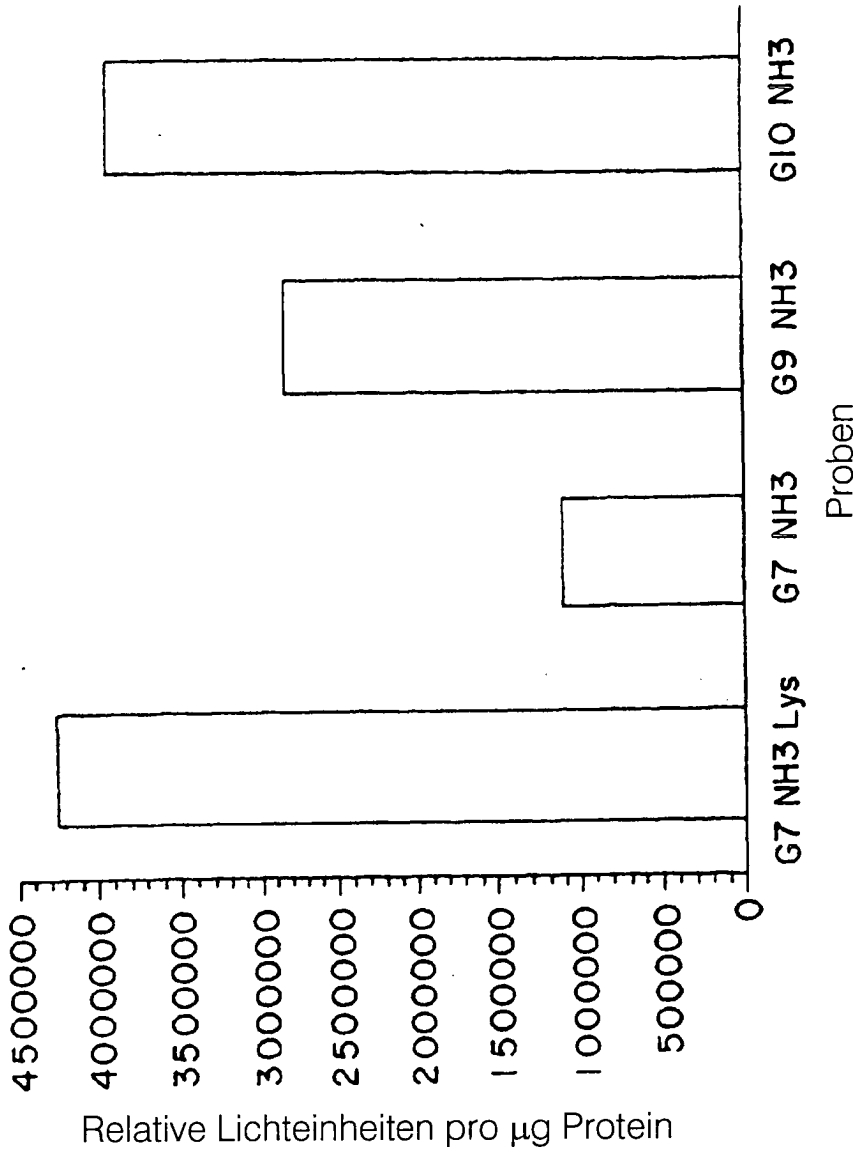
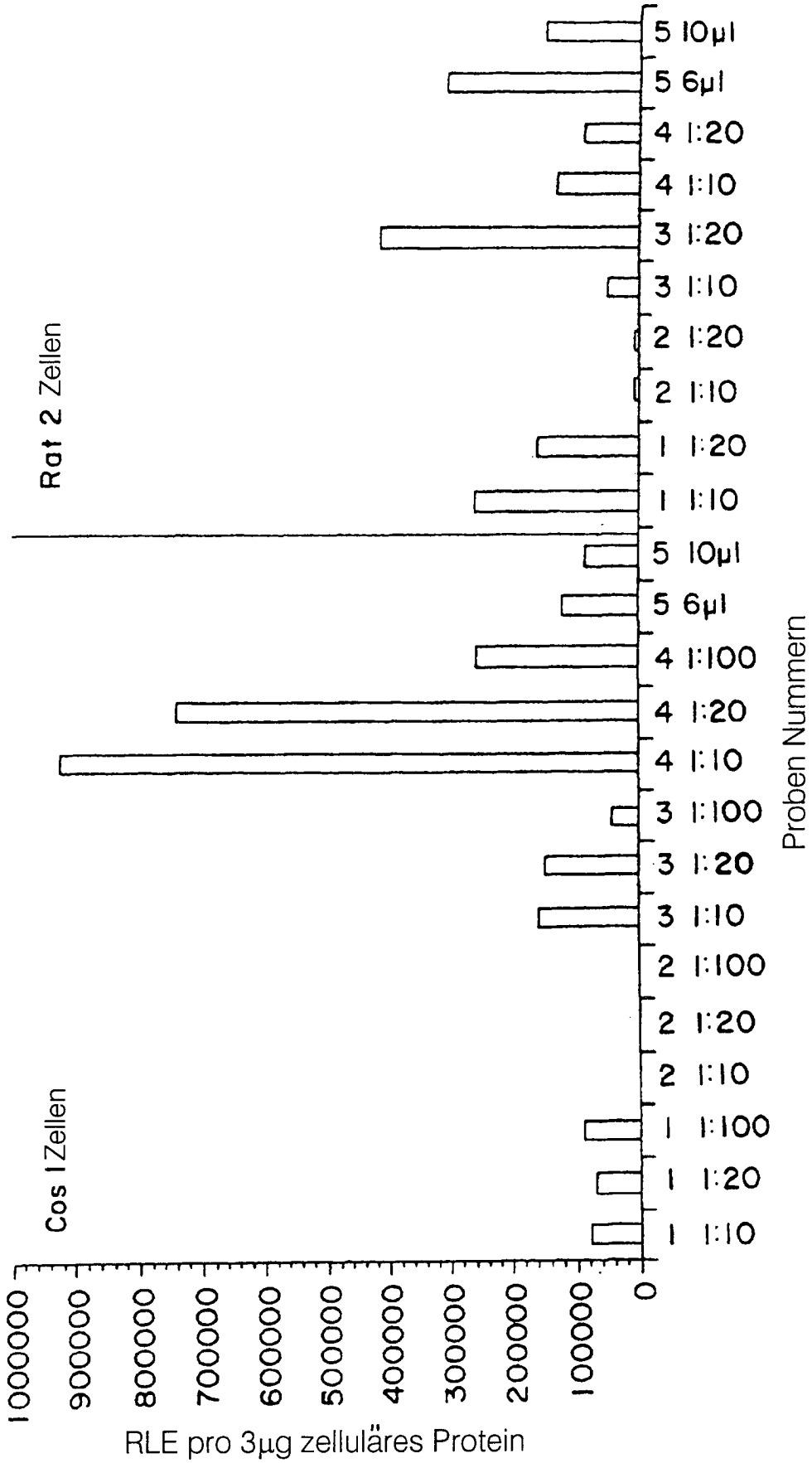

4500000
4000000
3500000
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
Relative Lichteinheiten pro µg Protein
G7 NH3 Lys
G7 NH3
G9 NH3
G10 NH3
Proben

FIG. 58


Rat 2 Zellen
Cos 1 Zellen
5 10µl
5 6µl
4 1:20
4 1:10
3 1:20
3 1:10
2 1:20
2 1:10
1 1:20
1 1:10
5 10µl
5 6µl
4 1:100
4 1:20
4 1:10
3 1:100
3 1:20
3 1:10
2 1:100
2 1:20
2 1:10
1 1:100
1 1:20
1 1:10
Proben Nummern
1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
RLE pro 3µg zelluläres Protein

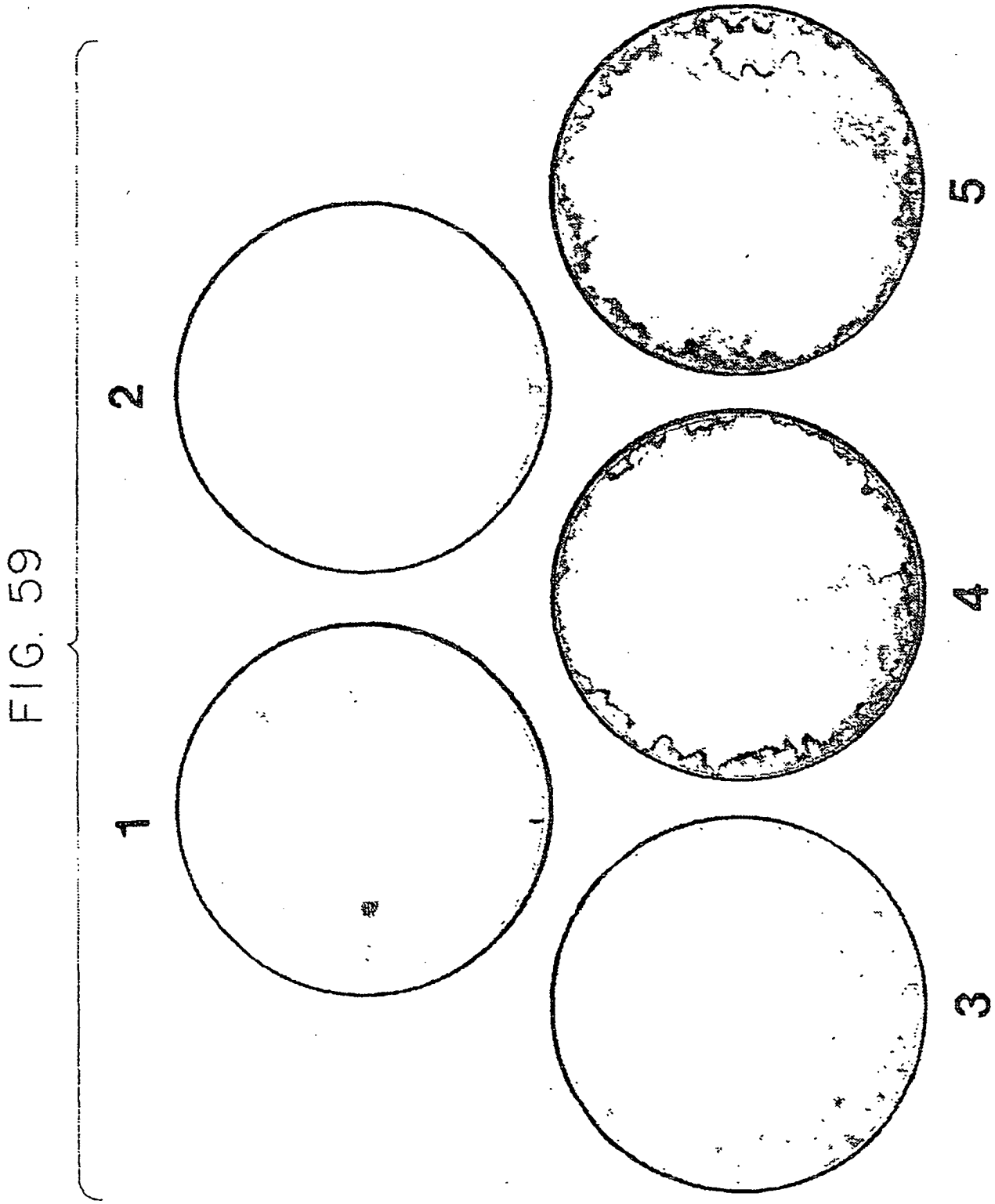
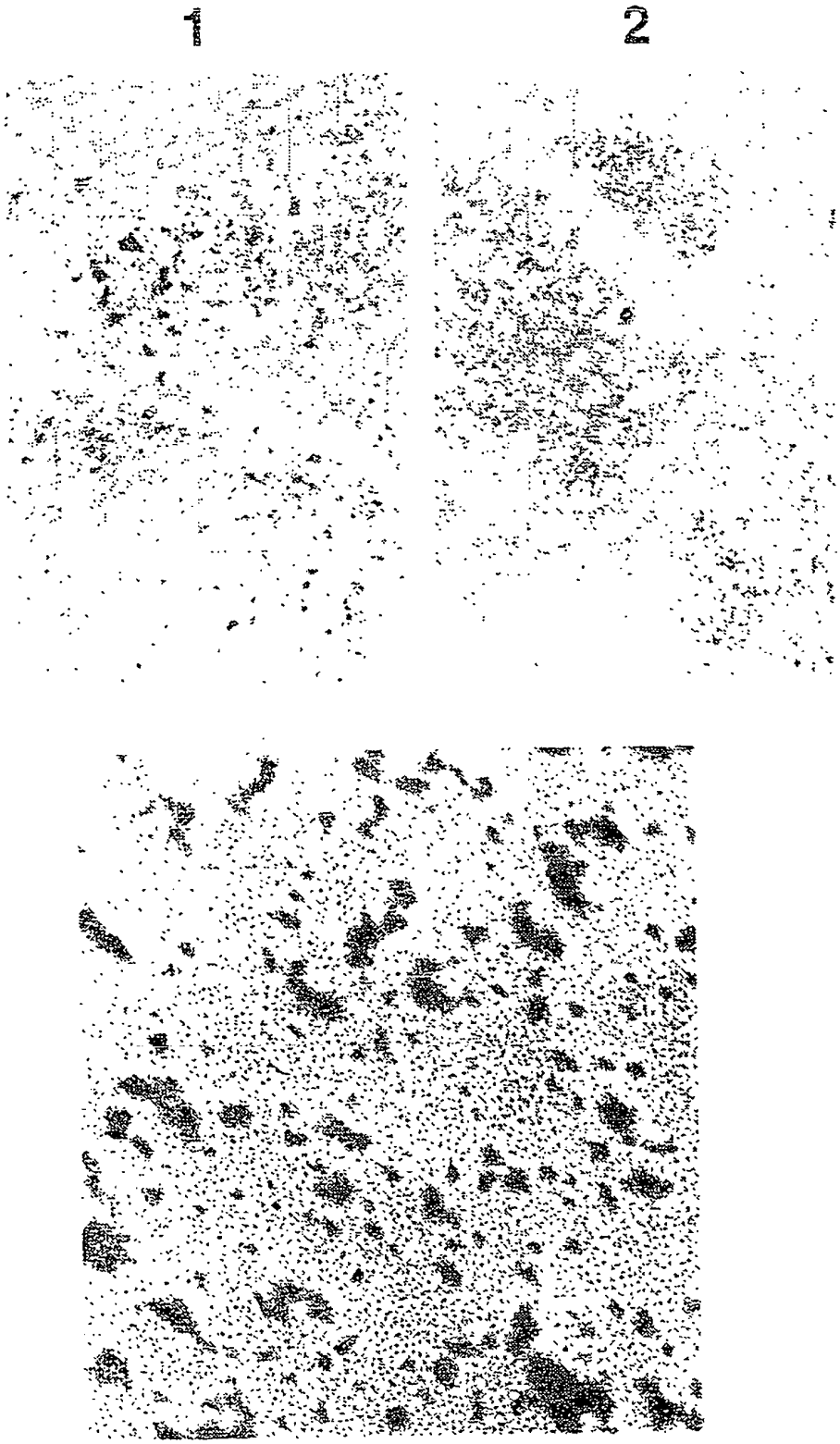


FIG. 59

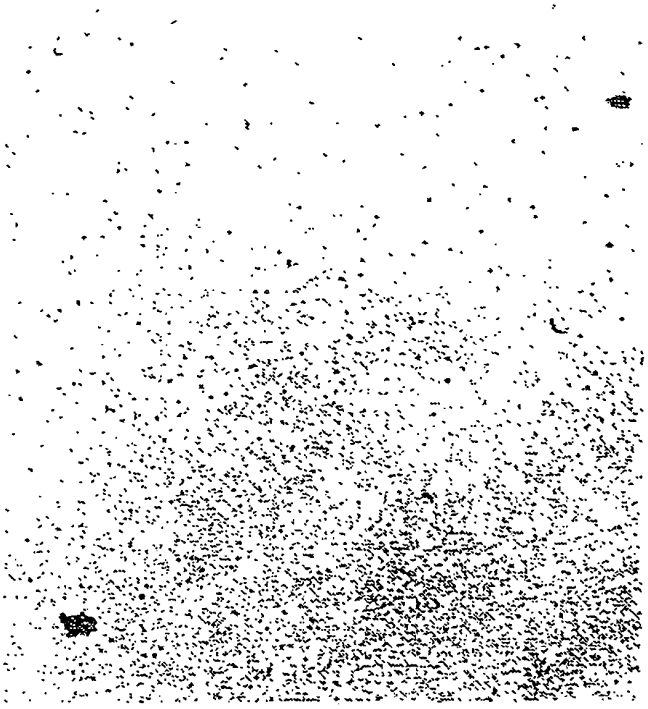
FIG. 60A

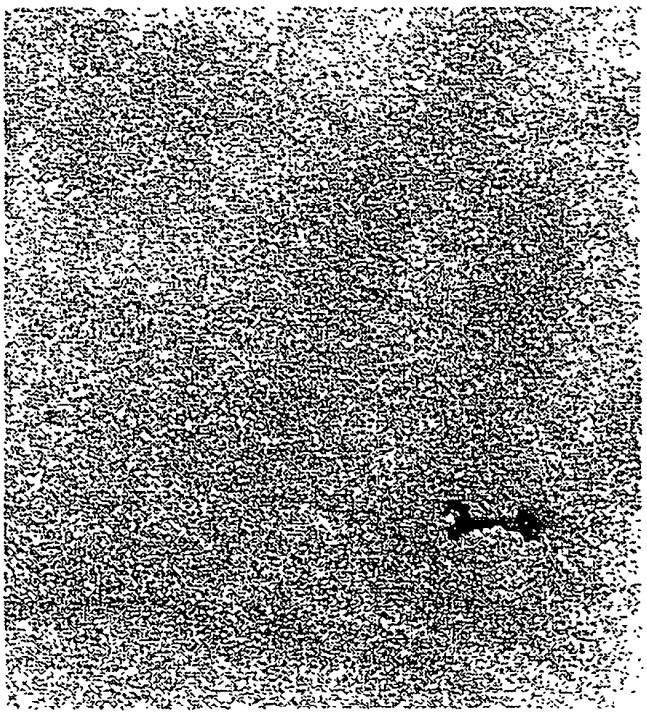


64/68

FIG. 60B

4





5

65/68

FIG.61A

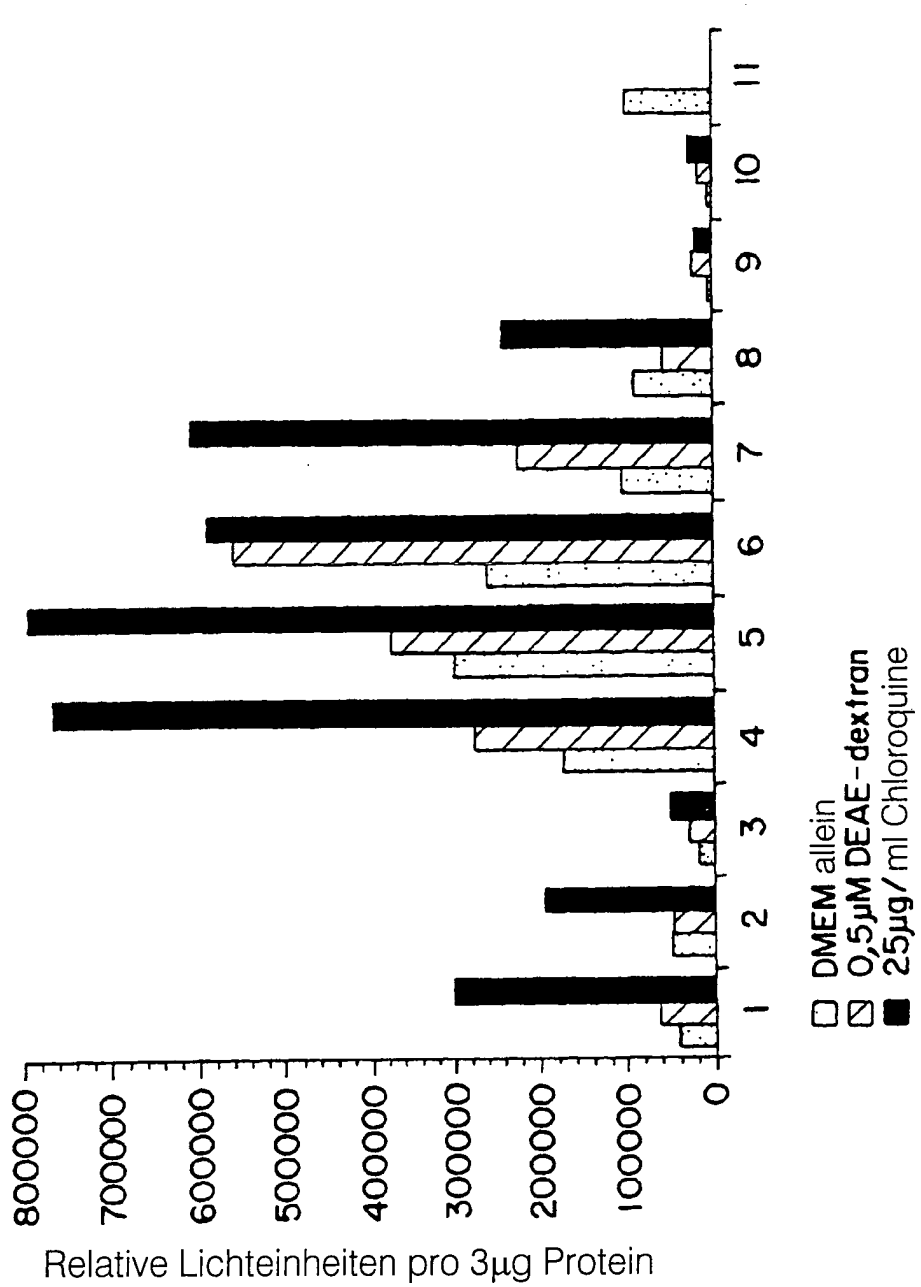

800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
DMEM allein
0,5µM DEAE-dextran
25µg/ml Chloroquine
Relative Lichteinheiten pro 3µg Protein

FIG.6IB

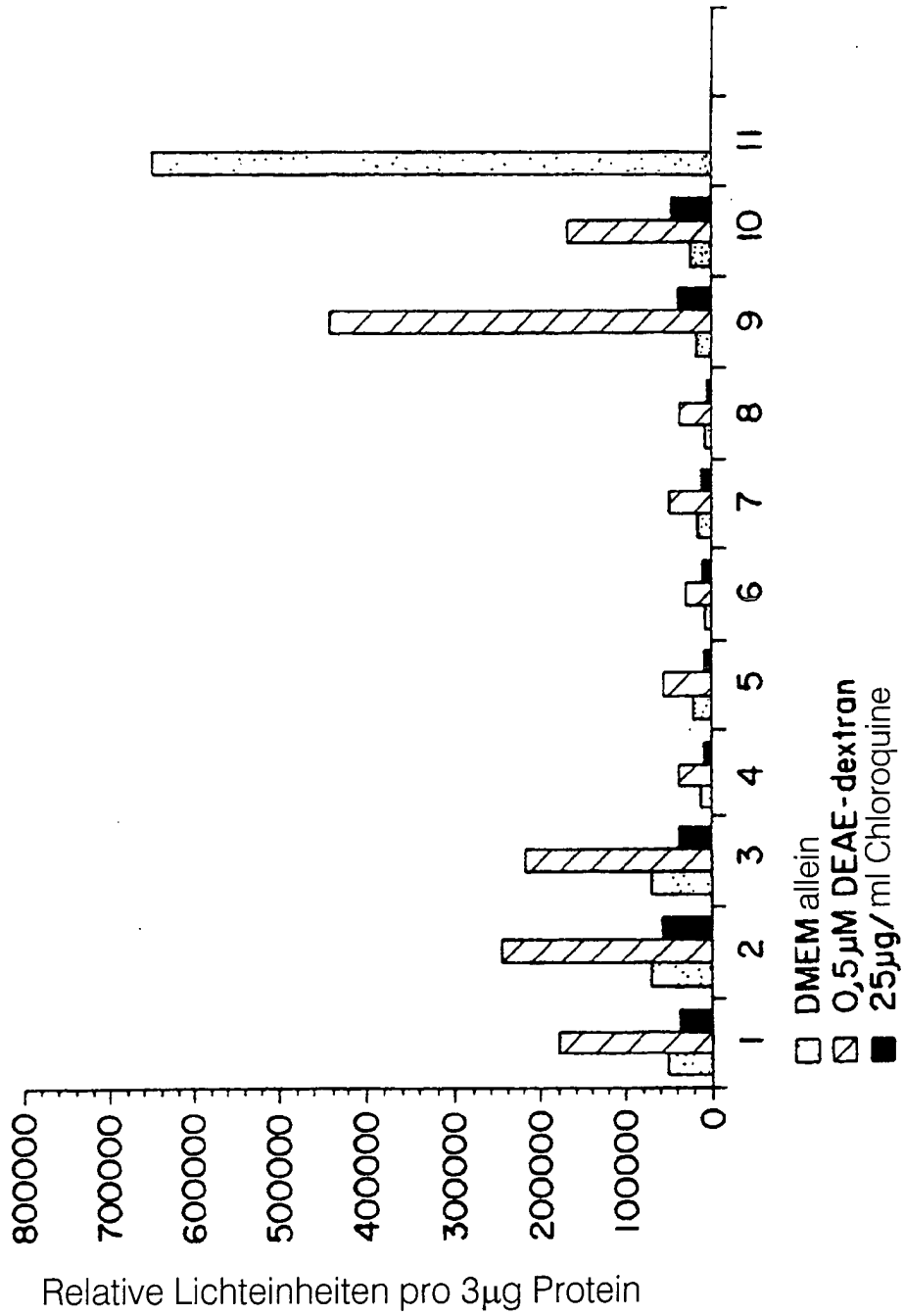
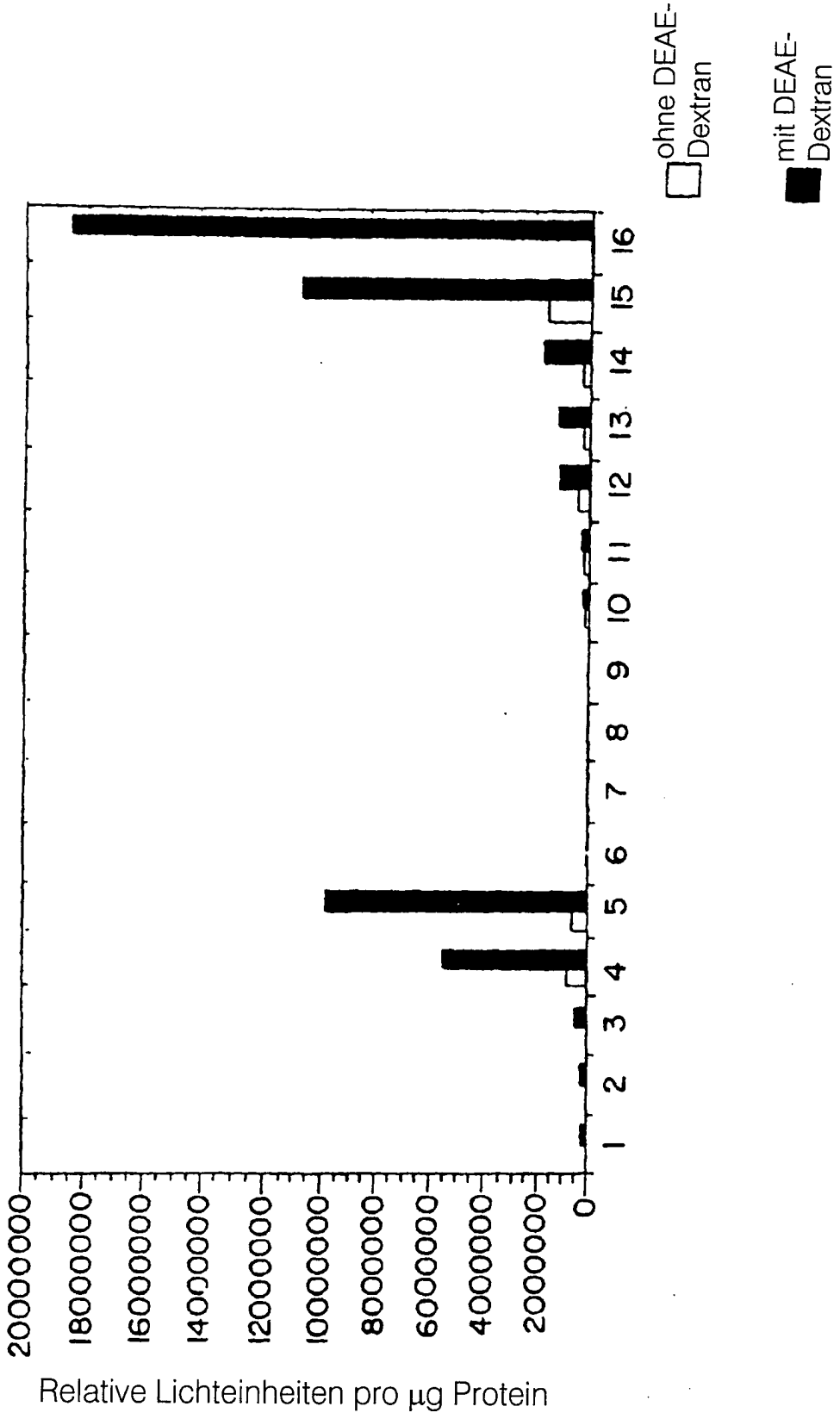

800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
DMEM allein
0,5µM DEAE-dextran
25µg/ml Chloroquine
Relative Lichteinheiten pro 3µg Protein

FIG. 62


ohne DEAE-Dextran
mit DEAE-Dextran
20000000
18000000
16000000
14000000
12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
Relative Lichteinheiten pro µg Protein