(12) **PATENT**

(19) NO (11) **317691** (13) **B1**

NORGE (51) Int Cl[7] A 61 K 47/48, 47/34

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19954434	(86)	Innt.inng.dag og søknadsnr	1995.03.07 PCT/US95/03045
(22)	Inng.dag	1995.11.06	(85)	Videreføringsdag	1995.11.06
(24)	Løpedag	1995.03.07	(30)	Prioritet	1994.03.07, US, 207494 1994.09.30, US, 316536
(41)	Alm.tilgj	1996.01.05			
(45)	Meddelt:	2004.12.06			

(71) Søker The Dow Chemical Company , P O Box 1967, Midland, MI 48640, US
The Regents of the University of Michigan , 3003 South State Street, Wolverine Tower, Room 2071, MI48109-1280 ANN ARBOR, US

(72) Oppfinner David M. Hedstrand, Midland, MI, US
Donald A Tomalia, Midland, MI, US
Ian A. Tomlinson, Midland, MI, US
Michael J. Fazio, Midland, MI, US
Roberta C. Cheng, Midland, MI, US
William J Kruper Jr, 230 Barden Road, Sanford, MI 48657, US
James R Baker, Ann Arbor, MI, US
Anna U. Bielinska, Ypsilanti, MI, US
Herberg M. Brothers II, Midland, MI, US
Jennifer A. Johnson, Livonia, MI, US
Donald A. Kaplan, Marina Del Rey, CA, US
Scott L. Klakamp, Russell, PA, US
Jolanta Kukowska-Latallo, , Ann Arbor, MI, US
Bartley D. Maxon, Saint Louis, MI, US
Lars T. Piehler, Midland, MI, US
Larry R. Wilson, Beaverton, MI, US
Rui Yin, Mount Pleasant, MI, US

(74) Fullmektig Bryn Aarflot AS , Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, NO

(54) Benevnelse **Tette stjernepolymerkonjugat samt sammensetning og formulering derav, og fremgangsmåte for fremstilling av et kompleks.**

(56) Anførte publikasjoner
WO 88/01178 A
WO 88/01179 A
WO 88/01180 A

(57) Sammendrag

Dendritiske polymerkonjugater som består av minst en dendrimer forbundet med minst én enhet av et bærermateriale, er blitt fremstilt, hvor bærermaterialet kan være et modifiseringsmiddel for biologisk virkning. Konjugatet kan også bestå av en målsøkende forbindelse, og når den er til stede, kan det transporterte materiale være en bioaktiv forbindelse. Foretrukne dendritiske polymerer er tette stjernepolymerer som er blitt kompleksbundet til modifiseringsmidler for biologisk virkning. Disse konjugater og komplekser har spesielle fordelaktige virkninger på grunn av sine enestående egenskaper.

Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse vedrører tette stjernepolymerkonjugat, samt sammensetning og formulering derav og fremgangsmåte for fremstilling av et kompleks.

Bakgrunn for oppfinnelsen

I de siste år har polymerer som er blitt betegnet som tette stjernepolymerer eller STARBURST®-polymerer (et registreringsprodukt fra Dendritech Inc.) blitt utviklet. Det er påvist at størrelsen, formen og egenskapene til disse tette stjernepolymerer kan bli molekylært skreddersydd for å møte spesialiserte anvendelseskrav. Tette stjernepolymerer har betydelige fordeler og kan gi muligheter for å avlevere høye konsentrasjoner av båret materiale pr. enhet polymer, kontrollert frigjøring, målsøkende frigjøring og/eller mange typer frigjøring eller anvendelseskrav.

Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse vedrører følgelig tett stjernepolymerkonjugat, kjennegnet ved at det omfatter minst én tett stjernepolymer forbundet med minst én enhet av minst ett genetisk materiale så som nukleotidbaserte forbindelser, så som virus og virusfragmenter, plasmider, phag, cosmider, gener og genfragmenter (for eksempel exoner, introner), deoksyribonukleinsyre (DNA) både enkelt- og dobbelttrådet, ribonukleinsyre (RNA), ribosomal RNA (rRNA), katalytisk RNA (cRNA), små nukleær RNA (snRNA), messenger RNA (mRNA), transport RNA (tRNA), DNA og RNA-oligonukleotider (både enkelt og dobbelttrådet) eller oligomerer og (antisense) oligonukleotider, proteinnukleinsyrer (PNA), og substituerte nukleinsyreoligonukleotider, hvori nevnte stjernepolymer omfatter minst et løsningsmiddel løselig, radialt symmetrisk dendrimer, hvor nevnte dendrittiske polymer omfatter partikler med dimensjoner fra 20Å ved deres snevreste dimensjoner til 1.000Å ved deres største dimensjoner, og hvor dendrimeren har minst én kjernegren ut fra en kjerne, idet nevnte gren har minst én terminal gruppe forutsatt at

(1) forholdet mellom de terminale gruppene til kjernegrenene er to eller høyere,

(2) tettheten til terminale grupper pr. enhetsvolum i polymeren er minst 1,5 ganger den til en utstrakt konvensjonell stjernepolymer som har lignende kjerne og monomere grupper og en sammenlignbar molekylvekt og antall kjernegrener, idet hver av nevnte grener til den utstrakte konvensjonelle stjernepolymeren har kun bærer én terminal gruppe, og

(3) det molekylære volum som ikke er mer enn omtrent 80% av det molekylære volumet til en utstrakt konvensjonell stjernepolymer som bestemt av dimensjonsstudier ved anvendelse av graderte Corey-Pauling molekylære modeller, og har regelmessig dendrittisk forgrening;

hvori nevnte genetisk materiale utgår mellom og virker slik at det binder en rekke tette stjernepolymerpartikler sammen; idet ladningsforholdet av genetisk materiale til dendrimer er fra 1:1 til 1:100.

Polymerkonjugatforbindelsene omfatter tette stjernepolymerer forbundet med ønskede forbindelser (heretter vil disse polymerkonjugater ofte bli referert til som "tette stjernepolymerkonjugater" eller "tette stjernekonjugater" eller "konjugater").

En tett stjernepolymer som er forbundet med minst én måldirigent og minst én enhet av et båret materiale er også beskrevet. Slike konjugater kan formuleres med aksepterbare bærere, fortynnere eller tilsetningsmidler for ønsket anvendelse, f.eks. farmasøytisk eller landbruksmessig.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre sammensetning, kjennetegnet ved at den omfatter minst et stjernepolymerkonjugat ifølge krav 1, hvori nevnte stjernepolymer som er en dendrittisk polymer omfatter partikler med dimensjoner fra 20Å ved deres snevreste dimensjoner til 1.000Å ved deres største dimensjoner og den omfatter en stjernepolymer som er en dendrittisk polymer som har positiv overflatefunksjonalitet over en vesentlig del av polymeroverflaten og nevnte genetiske materiale og stjernepolymeren som er en dendrittisk polymer er kompleks-bundet i et ladningsforhold fra 1:1 til 1:100;

hvori stjernepolymeren som er en dendrittisk polymer har minst én kjernegren som utgår fra en kjerne, idet nevnte gren har minst én terminal gruppe forutsatt at

(1) forholdet mellom terminale grupper og kjernegrener er to eller høyere,

(2) tettheten til de terminale grupper pr. enhetsvolum i polymeren er minst 1,5 ganger den til en utvidet konvensjonell stjernepolymer som har lignende kjerne og monomeriske grupper og en sammenlignbar molekylvekt og antall kjernegrener, idet hver av nevnte grener til den utstrakte konvensjonelle stjernepolymeren kun bærer én terminal gruppe, og

(3) det molekylære volumet som ikke er mer enn omtrent 80% av det molekylære volumet til en utstrakt konvensjonelle stjernepolymer som bestemt ved dimensjonsstudier ved anvendelse av graderte Corey-Pauling molekylære modeller, og som har regelmessig dendrittisk forgrening;

hvori nevnte genetiske materiale utgår mellom og virker slik at den binder en mengde dendrittiske polymerpartikler.

Det er videre beskrevet formulering, kjennetegnet ved at den omfatter et konjugat eller en sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1-48, som har minst ett farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel eller bærer tilstede.

Oppfinnelsen vedrører videre en fremgangsmåte for fremstilling av et kompleks av dendrittisk polymer og genetisk materiale ifølge krav 1, kjennetegnet ved at den omfatter:

omsetning av nevnte dendrittiske polymer med nevnte genetiske materiale i et egnet løsningsmiddel ved en temperatur som letter kompleksbinding av nevnte genetiske materiale med nevnte dendrittiske polymer, idet nevnte fremgangsmåte innbefatter plassering av nevnte kompleks i en løsning med DEAE-dekstran eller glycerol.

Konjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse passer for anvendelse innenfor en rekke bruksområder hvor spesifikk frigjøring ønskes, og er spesielt tilpasset frigjøring av biologisk aktive forbindelser. I en foretrukket utførelsesform av foreliggende oppfinnelse,

omfatter de tette stjernekonjugatene én eller flere stjernepolymerer forbundet med én eller flere bioaktive forbindelser.

Innenfor ett område av oppfinnelsen blir et tett stjernepolymerkonjugat følgelig benyttet for avlevering av båret bioaktiv forbindelse (f.eks. en biologisk virknings-moderator), som har minst én tett stjernepolymer forbundet med minst én enhet av minst én båret bioaktiv forbindelse, polymeren har (a) en start-kjerne, (b) minst to konsentriske dendrittiske lag, ("generasjoner") med symmetriske grenede forbindelser, lagene strekker seg utover radialt på en geometrisk progressiv måte fra en kjernegren, hvorved forholdet mellom terminale grupper til kjernegren(er) er minst 4:1, og (c) en ytre overflate med endelig funksjon. En annen måte å definere disse tette stjernepolymerer er som et dendrittisk polymerkonjugat som har

(i) en dendrittisk polymer som har
  (a) en startkjerne,
  (b) et indre lag med minst tre (3) generasjoner som består av symmetriske, radiale repeterende enheter bundet til startkjernen, og
  (c) en ytre overflate som består av terminale funksjonelle atomer eller atomgrupper (terminale funksjonelle grupper) bundet til den ytterste generasjonen, og

(ii) minst én båret forbindelse som er intimt knyttet til nevnte dendrittiske polymer.

Ytterligere an annen måte å definere disse tette stjernepolymerer er som en klasse dendrittiske polymerer hvor den dendrittiske polymer

(i) har en regelmessig grenet struktur som i det vesentlige representeres ved den følgende formel (1), som har en kjerne (C) med et antall (s) i form av valens eller funksjon av én eller flere, minst én av valensene av nevnte kjerne (C) er bundet til en gruppe (B) gjennom en gruppe (A), idet nevnte gruppe (B) har minst to funksjonaliteter (r_1, r_2...) etter kobling til gruppen (A), enheten (AB) dannet ved å koble nevnte gruppe (A) med nevnte gruppe (B) hvilket utgjør en gren, idet nevnte grener (AB) er repetert i et ønsket antall generasjoner (G) på minst tre, og funksjonen til gruppe (B) i hver av de siste grenene (AB) blokkeres med minst to (r_G)-atomer eller atomgrupper (X):

Formel (1) $C[AB(AB(AB....(AB(ABX r_G) r_{G-1}) r_{G-2}...) r_2) r_1]_s$ (1)

hvor

hvert anførte tall er 1,2...G-1 og G av r_1, r_2...r_{G-1} og r_G står for antallet av hver generasjon med økende kjede (AB) der man regner fra den første grenen eller grenene (AB) som er bundet til kjernen (C) som den første generasjon, nemlig G = 1, hver eller r_1, r_2... og r_G representerer antall funksjoner i gruppen (B) i grenen (AB) i den tilsvarende generasjon, idet nevnte funksjon gir muligheter for å binde til en gruppe (A) fra en annen gren (AB) i den neste generasjon,

s betyr et tall på minst 1 men ikke større enn valenstallet eller funksjonene til kjernen (C),

hver av gruppene (A) og (B) kan være den samme eller forskjellig for hver generasjon, og X representerer atomene eller atomgruppene som blokkerer funksjonen til de funksjonelle gruppene (B) i de siste grenene (AB) som kan være den samme eller forskjellig.

Foretrukne konjugater i den foreliggende oppfinnelse omfatter dem hvor et tett stjernekonjugat omfatter minst én tett stjernepolymer forbundet med minst én enhet av minst én biologisk responsmoderator. Noen eksempler på disse biologiske responsmoderatorer er interleukiner, interferoner, tumor-nekrose-faktor, granulocyttkolonistimulerende faktor, virus, virusfragmenter eller annet genetisk materiale. Betegnelsen "genetisk materiale" som benyttet her refererer til nukleotidbaserte forbindelser, deriblant inkludert uten begrensning, virus og virusfragmenter, plasmider, phag, cosmider, gener og genfragmenter (f.eks. exoner, introner), deoksyribonukleinsyre (DNA) både enkelt- og dobbelttrådet, ribonukleinsyre (RNA), ribosomal RNA (rRNA), katalytisk RNA (cRNA), små nukleær RNA (snRNA), messenger RNA (mRNA), transport RNA (tRNA), DNA og RNA-oligonukleotider (både enkelt og dobbelt-trådet) eller oligomerer og (anti-sense) oligonukleotider, protein-nuklein-syrer (PNA), og substituerte nukleinsyreoligonukleotider. Genetisk materiale, spesielt virus og virusfragmenter, kan kompleksbindes eller kobles med et protein. Betegnelsen genetisk materiale omfatter også "modifiserte nukleotider" som beskrevet mer fullstendig nedenfor.

De tette stjernekonjugatene har betydelige fordeler over andre bærere kjent i feltet på grunn av fordelaktige egenskaper som de tette stjernepolymerer har. Tette stjernepolymerer er en spesiell type av dendrittisk polymer. Innenfor et utvidet område av foreliggende oppfinnelse kan andre typer dendrittiske polymerer benyttes hvor en biologisk responsmoderator (spesielt genetisk materiale) er det medbragte materiale.

En "dendrittisk polymer" er en polymer som viser regelmessig dendrittisk forgrening, laget ved en gradvis eller generasjonsmessig påbygging av grenede lag til eller fra en kjerne. Betegnelsen dendrittisk polymer omfatter "dendrimerer," som karakteriseres av en kjerne, minst ett indre grenet lag, og et overflategrenet lag. (Se Petar R. Dvornic og Donald A. Tomalia i Chem. in Britain, 641-645, august 1994). En "dendron" er en type dendrimer som har grener som sprer seg ut fra et fokalt punkt som er eller kan bli koblet til en kjerne, enten direkte eller ved å binde en forbindelse for å lage en dendrimer. Mange dendrimerer omfatter to eller flere dendroner bundet til en felles kjerne. Betegnelsen dendrimer benyttes imidlertid bredt for å omfatte en enkelt dendron.

PAMAM tette stjernedendrimerene beskrevet her er symmetriske, ved at grenenes armer er av lik lengde. Forgreningen opptrer ved hydrogenatomene i en terminal $-NH_2$-gruppe på en foranliggende generasjonsgren. De lysinbaserte dendrimerer er ikke-symmetriske, ved at grenarmene er av ulik lengde. Én gren opptrer ved ϵ-nitrogenet i lysinmolekylet, mens en annen gren opptrer ved α-nitrogenet, ved siden av den reaktive karboksygruppe som binder grenen til den foranliggende generasjonsgren.

Hyperforgrenede polymer, f.eks. hyperforgrenede polyoler kan være ekvivalente til en dendrittisk polymer hvor forgreningsmønsteret viser en grad av regularitet som nærmer

seg en dendrimer selv om de ikke er dannet ved regulær gradvis påbygging av forgrenede lag.

Tette stjernepolymerer viser en molekylær arkitektur som er karakterisert av regelmessige dendrittiske grener med radial symmetri, d.v.s. på punktet for forgrening. Disse radialsymmetriske molekyler omtales å besitte "tett stjernetopologi". Disse stjernepolymerer lages på en måte som kan gi konsentriske dendrittiske lag rundt en startkjerne. Den tette stjernetopologi oppnås ved en ordnet oppbygging av organisk repeterende enheter i konsentriske, dendrittiske lag rundt en startkjerne; dette utføres ved å innføre variasjon og selvreplikasjon (innenfor hvert lag) på en geometrisk progressiv måte gjennom et antall molekylære generasjoner. De resulterende høyt funksjonsdyktige molekyler er blitt betegnet "dendrimerer" i forhold til deres forgrenede (tre-lignende) struktur såvel som deres oligomere natur. Således omfattes betegnelsene tett stjerne-oligomer og tett stjernedendrimer og STARBURST® dendrimer innenfor betegnelsen tett stjernepolymer eller STARBURST®-polymer.

Topologiske polymerer med størrelse og form kontrollert, er dendrimerer som er forbundet med hverandre (som et eksempel kovalent forbundet eller gjennom annen binding som definert heretter) via deres reaktive terminale grupper, som refereres til som tette stjerne "bro-laget dendrimerer". Betegnelsen bro-laget dendrimer omfattes også av betegnelsen "tette stjernepolymer" eller STARBURST®-polymer. Når flere enn to tette stjernepolymerer kobles sammen blir de referert til som "tette stjerneaggregater" eller STARBURST®-aggregater og er også karakterisert ved betegnelsen "tett stjernepolymer" eller STARBURST®-polymer.

Derfor omfatter dendrittiske polymerer brodannede dendrimerer og dendrimer-aggregater. Dendrittiske polymerer omfatter både generasjonen monodisperse og generasjonen polydisperse løsninger av dendrimerer. Dendrimerene er en monodispers løsning som i det vesentlige stammer fra samme generasjon, og er derfor av enhetlig størrelse og form. Dendrimerer i en polydispers løsning omfatter en fordeling av ulike generasjons-dendrimerer.

Dendrittiske polymerer omfatter også overflatemodifiserte dendrimerer. F.eks. overflaten til en PAMAM-dendrimer kan modifiseres med påkobling av en aminosyre, f.eks. lysin eller arginin.

Det skal forstås at henvisning til en bestemt type av dendrittisk polymer som "polymer", f.eks. en "tett stjernepolymer", en "usymmetrisk dendrittisk polymer", en "kaskadepolymer" er også ment å omfatte bro-lagede dendrimerer av den type, dendrimer-aggregater av den type, polydisperse dendrimerer av den type, og overflatemodifiserte dendrimerer av den type.

Dendrittiske polymer-konjugater med biologisk responsmoderatorer er nyttige innenfor en lang rekke terapeutiske og diagnostiske anvendelser. F.eks., dendrittiske polymer-konjugater av biologisk respons-moderatorer omfatter genetisk materiale som har bred anvendelse i områdene for genterapi, analyse, modifisering, aktivering, antisens-anvendelser og lignende; og dendrittiske polymer-konjugater av biologisk respons-

moderatorer omfatter ikke-genetiske materialer slik som proteiner (f.eks. interleukiner, interferoner, tumor nekrosefaktor, granulocyttkoloni-stimulerende faktor, og andre proteiner) og er anvendbare som terapeutiske forbindelser (f.eks. antivirale forbindelser) og diagnostiske forbindelser.

Det som omfattes her: en blanding som omfatter et kompleks av dendrittisk polymer med genetisk materiale, det kan være i løsning med DEAE-dekstran; og en blanding som omfatter et kompleks av en første dendrittisk polymer og genetisk materiale, som er til stede i en løsning som inneholder en annen dendrittisk polymer, nevnte andre dendrittiske polymer er større enn nevnte første dendrittiske polymer.

Også omfattet i den foreliggende oppfinnelse er en fremgangsmåte for å lage disse konjugater. F.eks. vil en fremgangsmåte for å fremstille et konjugat av en dendrittisk polymer og biologisk responsmoderator være karakterisert ved at det omfatter en reaksjon mellom den dendrittiske polymer og den biologiske responsmoderator i en passende løsning ved en temperatur som underletter koblingen mellom den biologiske responsmoderator og den dendrittiske polymer. Når den biologiske responsmoderator er genetisk materiale så fremstilles et kompleks ved: (1) reaksjon mellom nevnte dendrittiske polymer og nevnte genetiske materiale i en passende løsning ved en temperatur som underletter kompleksdannelsen mellom nevnte genetiske materiale med nevnte dendrittiske polymer, nevnte fremgangsmåte kan valgfritt omfatte det nevnte kompleks i en løsning av DEAE-dekstran; eller (2) kompleksbinde genetisk materiale med en første dendrittisk polymer og reagere polymeren med det genetiske materiale i en passende løsning ved en temperatur som underletter koblingen av det genetiske materiale med polymeren, så plassere nevnte kompleks i en løsning som inneholder en annen dendrittisk polymer, nevnte andre dendrittiske polymer er større enn nevnte første dendrittisk polymer. Mer spesielt med hensyn til fremstilling (1) ovenfor, blir 1 til 10 μg genetisk materiale pr. ml eller pr. 20 μl, avhengig av konsentrasjonen som ønskes, reagert med tilstrekkelig dendrittisk polymer ved pH ca. 5 til 10 og ved en temperatur på ca. 20 til 40°C for å gi genetisk materiale: dendrittisk polymerkompleks i et ladet forhold på ca. 3:1 til ca. 1:10.000. En mer komplett diskusjon av fremgangsmåten er gitt nedenfor.

Fremgangsmåter for anvendelse av disse konjugater omfatter effektiv celle-transfeksjon og biotilgjengelighet av genetisk materiale som innebærer et kompleks av en dendrittisk polymer og genetisk materiale og lager nevnte kompleks tilgjengelig for celler som skal transfekteres. Kompleksdannelsen stabiliserer og konsentrerer det genetiske materiale, beskytter det genetiske materiale fra ødeleggelse under transport til og transfeksjon inn i en celle, og underletter transport av genetisk materiale gjennom en cellemembran og inn i en celle, deriblant inn i en cellekjerne.

Genetisk materiale kan videre transportere gjennom en cellemembran og inn i en cellekjerne hvilket omfatter å kompleksbinde det genetiske materiale med dendrittisk polymer, etterfulgt av å gjøre nevnte kompleks tilgjengelig til celler som skal transfekteres; og beskyttelse av genetisk materiale fra spaltning under transport og transfeksjon inn i en celle hvilket omfatter å kompleksbinde nevnte genetiske materiale med dendrittisk polymer

før det genetiske materiale får kontakt med fordøyelsesenzymer; og stabilisering og konsentrasjon av genetisk materiale som består av å kompleksbinde nevnte genetiske materiale med en dendrittisk polymer.

Kort beskrivelse av figurene

Følgende beskrivelse av figurene hjelper til å forstå den foreliggende oppfinnelse.

Fig. 1 viser ulike generasjoner av tette stjernedendrimerer.

Fig. 2(A) viser en dendrimer som har ikke-symmetrisk (ulik) grenstruktur.

Fig. 2(B) viser en dendrimer som har symmetrisk (lik) grenstruktur.

Fig. 3 viser ulike dendrimer-familiestørrelser [I, II, III av (B)] i forhold til antistoffdimensjoner (A).

Fig. 4 viser karbon-13 spinnmønster relaksjonstider (T1) for aspirin bygget inn i ulike dendrimergenerasjoner, eks. 1. Den vertikale akse er (sek.), og den horisontale akse er generasjonen av tilsatt PAMAM tett stjernedendrimer.

Fig. 5 viser resultatene av den dynamiske analyse av eks. 2. Den vertikale akse er prosent (%) legemiddel i reseptorfasen, og den horisontale akse er tid (timer).

Fig. 6 viser innflytelsen av generasjon 6,5 dendrimer på dialysehastigheten av pseudoefedrin ved pH 5,9 fra eks. 2. Den vertikale akse er prosent (%) legemiddel i reseptorrommet, og den horisontale akse er tid (timer).

Fig. 7 viser effekten av dendrimerhydrolyse på permeabiliteten til pseudoefedrin fra eks. 3. Den vertikale akse er prosent (%) legemiddel i reseptorrommet, og den horisontale akse er tiden (timer).

Fig. 8 viser sammenligningen mellom prosent salicylsyre frigitt til reseptorrommet i nærvær av tett stjernepolymer
(Gen = 4,0) ved pH 5,0 og 6,65 med salicylsyrekontroll,
eks. 4. Den vertikale akse er prosent (%) legemiddel i reseptorrommet, og den horisontale akse er tiden (timer).

Fig. 9 viser sammenligningen mellom prosent salicylsyre tapt fra donorrommet med tett stjernepolymer (Gen = 4,0) i reseptorrommet ved pH 8,0 til salicylsyreinnholdet, eks. 4. Den vertikale akse er prosent (%) legemiddel i donorrommet, og den horisontale akse er tiden (timer).

Fig. 10 viser sammenligningen mellom prosent salicylsyre tapt fra donorrommet i nærvær av tett stjernepolymer (Gen = 4,5) til salicylsyrekontroll, eks. 4. Den vertikale akse er prosent (%) legemiddel i donor-rommet, og den horisontale akse er tiden (timer).

Fig. 11 viser karbon-13 spinn-mønster relaksjonstider (T_1) for 2,4-D innbygget i ulike dendrimergenerasjoner, eks. 15. Den vertikale akse er tiden (sek.), og den horisontale akse er generasjonen av tilsatt PAMAM tett stjernedendrimer.

Fig. 12 er et søylediagram som sammenligner DNA-transfeksjonsevnen til dendrimerene ved forskjellig DNA/dendrimer-ladningsforhold, ved å analysere luciferaseaktivitet etter transfeksjon, eks. 44. Den vertikale akse er de relative lysenheter/μg protein og antallet på den horisontale akse er prøvenummerne (beskrevet i eks. 44) for kontroll og forskjellig

dendrimer og DNA-komplekser ved ulike DNA til dendrimer-ladningsforhold, som oppført i tabell XV.

Fig. 13 er en gel-elektroforese som sammenligner DNA-bindingsevne til dendrimerer ved ulike DNA/dendrimer-ladningsforhold, ved bruk av de samme DNA/dendrimer-komplekser som anvendt i fig. 12, eks. 44.

Fig. 14 er et diagram som viser prosent økning i transfeksjon over en kontroll mot generasjon av dendrimer benyttet i DNA/dendrimerkomplekset, eks. 45. Den vertikale akse er prosent økning i transfeksjon over dekstrankontroll, og den horisontale akse er dendrimergenerasjonen. De faste sirklene er ammoniakk (NH_3) kjernedendrimerer og de fylte firkantene er etylendiamin (EDA) kjernedendrimerer.

Fig. 15 er et søylediagram som sammenligner virkningen av gradvis tilsetning av ulike dendrimerer til et DNA/dendrimerkompleks på transfeksjonseffektiviteten av RAT2-celler for etylendiamin (EDA) kjernedendrimerer, eks. 46. Den vertikale akse er de relative lysenhetene/μg protein, og den horisontale akse er konsentrasjonen (μM) av den andre dendrimer. De åpne søylene er resultatet av DNA bundet til G9-dendrimer, etterfulgt av tilsetning av G5-dendrimer. De diagonalt skraverte søylene er resultatene fra DNA kompleksbundet til G5-dendrimer, etterfulgt av tilsetning av G9-dendrimeren.

Fig. 16 er et diagram som viser den samme informasjon som fig. 15, men for ammoniakk (NH3) kjerne dendrimerer, eks. 46. Den vertikale akse er de relative lysenheter/μg protein, og den horisontale akse er konsentrasjonen (μM) av den andre dendrimer. De åpne søylene er resultatene av DNA kompleksbundet med G9-dendrimeren, etterfulgt av tilsetningen av G5-dendrimer. De diagonalt skraverte søylene er resultatene av DNA kompleksbundet med G5-dendrimer, etterfulgt av tilsetningen av G9-dendrimer.

Fig. 17 er et diagram som viser lysenheter pr. μg protein etter transfeksjoner utført med ulike DNA-dendrimerkonjugater og kontroller under forskjellige betingelser, eks. 42. Den vertikale akse er de relative lysenheter/μg protein og antallet på den horisontale akse er prøvetallet for kontrollene og ulike DNA/dendrimerkomplekser ved varierende DNA til dendrimerforhold, som opplistet i tabell XIII.

Fig. 18 er lik fig. 17, men diagramresultatene representerer en større variasjon i dendrimer:DNA-forhold, eks. 42. Den vertikale akse er de relative lysenheter/μg protein og antallet på den horisontale akse er prøvetallet for kontroller og ulike DNA/dendrimer-komplekser ved varierende DNA til dendrimerforhold, som vist i tabell XIV.

Fig. 19 er et søylediagram av relative lysenheter pr. μg protein for transfeksjon av dendrimer:DNA-konjugat for dendrimerene A-S, eks. 42. Den vertikale akse er de relative lysenheter/μg protein og den horisontale aksen er dendrimer som er benyttet og DNA:dendrimerforhold innenfor hvert aksesegment på 1:2, 1:2, 1:10, 1:10, 1:20 og 1:20.

Fig. 20 er en gelelektroforese som sammenligner de kompleks-bindende evner til forskjellige ammoniakk (NH_3) kjernedendrimerer med 15 nukleotidlange, syntetiske enkeltkjedet DNA, eks. 47.

Fig. 21 viser opptaket av radiomerket 23 nukleotidlang syntetisk dobbeltkjedet oligomer i en monocytisk cellelinje over tid, sammenlignet med transfeksjon av DNA alene, transfeksjon av DNA kompleksbundet med en generasjon 8 (G8) ammoniakk (NH_3) stjernedendrimer [d.v.s. G8 (NH_3)-dendrimer] og transfeksjon av DNA/dendrimer-kompleksene i nærvær av natriumazid, eks. 47. Den vertikale akse er opptak i 10^2 cpm/10^4 celler og den horisontale akse er tid (timer). De faste firkanter representerer 23 nuleotid-lang syntetisk enkeltkjedet oligomer; de faste sirklene representerer DNA/G8 (NH_3)-dendrimer; og de faste trianglene representerer DNA/G8 (NH_3)-dendrimer pluss natrium-azid.

Fig. 22 er et søylediagram av transfeksjon plottet mot et dendrimer/DNA-kompleks, karakterisert ved at noe DNA er lineært og noe sirkulært eller supertvinnet, eks. 48. Den vertikale akse er de relative lysenheter/μg protein og den horisontale akse er dendrimer/ DNA-komplekset. De åpne søylene er resultatene av intet DEAE-dekstran til stede. De fylte søylene er resultatene for 0,5 μM DEAE-dekstran.

Fig. 23(A)-(D) viser fire gelelektroforeser som viser DNA-kompleks-bindingsevnen til en G8)NH_3)-dendrimer og en G8(EDA)-dendrimer under ulike ladningsforhold og ulike betingelser, eks. 49.

Fig. 24 er en gelelektroforese som sammenligner DNA-bindingsegenskapene til G8 (NH_3)-dendrimerer og G11(EDA)-dendrimerer i ulike molare forhold, eks. 50.

Fig. 25 er en gelelektroforese som viser DNA-bindingsegenskapene til G8 (NH_3)-dendrimerer og G8(EDA)-dendrimerer over et vidt pH-område, eks. 51.

Fig. 26(A) og (B) er gelelektroforese som viser DNA-bindingsstabiliteten i saltløsninger av økende natriumkloridkonsentrasjon, eks. 52.

Fig. 27 er en gelelektroforese som viser stabiliteten og beskyttelse av DNA som er kompleksbundet med G8 (NH_3)-dendrimerer og G11(EDA)-dendrimerer i nærvær av ulike restriksjonsenzymer, eks. 53.

Fig. 28 er en gelelektroforese som viser stabiliteten og beskyttelse av DNA kompleksbundet med G8(EDA)-dendrimerer i nærvær av cellulære nukleaser, eks. 54.

Fig. 29 sammenligner graden av transfeksjon av DNA kompleksbundet med dendrimerer ved ulike DNA/dendrimerladningsforhold og ulike DNA-konsentrasjoner, mot de samme kombinasjoner i nærvær av dietylaminoetyleter av dekstran (DEAE-dekstran). Der er eksempler på transfeksjon med lipider, d.v.s. der LIPOFECTIN® benyttes og erstattes istedenfor dendrimeren og i fravær av DEAE-dekstran, eks. 55. Den vertikale akse er plasmidkontroll, dekstrankontroll, og de ulike plasmid DNA-komplekser på 1 μg, 5 μg og 10 μg, og den horisontale akse er de relative lysenheter/μg protein. De diagonalt skraverte søyler er resultatene for dendrimer/DEAE-dekstran. De kryss-merkede søyler er resultatende av dendrimerene alene. De prikkede søylene er resultatene for LIPOFECTIN®.

Fig. 30 viser graden av transfeksjon for (NH_3)-dendrimerer og (EDA)-dendrimerer ved varierende DNA/dendrimerladningsforhold, i nærvær av DEAE-dekstran i noen tilfeller og

uten DEAE-dekstran i andre, eks. 56. Den vertikale akse representerer de relative lysenheter/μg protein, og den horisontale akse er ladningsforholdet av DNA:dendrimer. De fylte firkanter med opptrukne linjer representerer G9(EDA)-dendrimer; de åpne firkanter med oppdelte linjer representerer G9(EDA)-dendrimer pluss DEAE-dekstran, de fylte sirkler med helt opptrukne linjer representerer G9(NH_3)-dendrimer, og de åpne sirkler med brukne linjer representerer G9(NH_3)-dendrimer pluss DEAE-dekstran.

Fig. 31 er som fig. 30, men for G8(NH_3)-dendrimerer og G11(EDA)-dendrimerer og alltid i nærvær av DEAE-dekstran, eks. 56. Den vertikale akse er de relative lysenheter/μg protein, og den horisontale akse er ladningsforholdet DNA:dendrimer. De fylte sirkler representerer G8(NH_3) -dendrimer; og de fylte trekanter representerer G11(EDA)-dendrimer.

Fig. 32 er en fremstilling av transfeksjonseffektiviteten av DNA:G7 (NH_3)-dendrimerkompleksene i nærvær av enten DEAE-dekstran eller Hank's bufrede saltvann (HBS), eks. 57. Den vertikale akse representerer de relative lysenheter/μg protein; og den horisontale akse er ladningsforholdet DNA:dendrimer. De fylte sirkler representerer Hank's bufrede saltvann; og de fylte trekanter representerer DEAE-dekstran.

Fig. 33 er en fremstilling av prosent økning i transfeksjon for (NH_3)-dendrimer-DNA-komplekser i DEAE-dekstran ved ulike ladningsforhold av DNA til dendrimer, eks. 58. Den vertikale akse er prosent økning i transfeksjon (over DEAE-dekstrankontroll), og den horisontale akse er dendrimergenerasjonen. De diagonalt skraverte søyler representerer et ladningsforhold på 1:1; de åpne søylene representerer et ladningsforhold på 1:5 og de kryss-skraverte søylene representerer et ladningsforhold på 1:10.

Fig. 34 er en fremstilling av transfeksjonseffektiviteten av DNA/dendrimerkompleksene ved ulike ladningsforhold i nærvær av DEAE-dekstran og uten DEAE-dekstran, eks. 59. Den vertikale akse representerer de relative lysenheter/μg protein, og den horisontale akse representerer ladningsforholdet mellom DNA:dendrimer (presentasjonen lengst til høyre viser plasmid/DEAE-dekstrankontrollen). De åpne søylene representerer DEAE-dekstran; og de fylte søylene er uten DEAE-dekstran.

Fig. 35 er et søylediagram av transfeksjonseffektiviteten til DNA/dendrimerkomplekser ved ulike ladningsforhold og med forskjellige konsentrasjoner av DEAE-dekstran, eks. 60. Den vertikale akse er de relative lysenheter/μg protein; og den øverste horisontale akse er DEAE-dekstrankonsentrasjonen i μM; og den nedre akse er forskjellige ladningsforhold av DNA:dendrimer for hvert segment, inklusive en plasmidkontroll.

Fig. 36 er et søylediagram over transfeksjonseffektiviteten til DNA/dendrimerkomplekser med 1:5 ladningsforhold, sammenlignet med LIPOFECTIN®-formidlede transfeksjoner i ulike cellelinjer, eks. 61. Tallene på den vertikale akse er prøvenummerne som identifiserer transfeksjonsforbindelsen som benyttes (som vist i eks. 61); og den horisontale akse er de relative lysenheter/μg protein. De ulike segmenter (lest nedover diagrammet) for celle-linjene som er testet er ape:COS 7; human:HMEC-1; mus: 10-1; mus: NIH 3T3; og rotte: klon 9.

Fig. 37 er et transfeksjonsdiagram over effektiviteten til DNA/dendrimerkompleksene med ladningsforhold 1:5 i to cellelinjer som er vanskelig å transfektere, sammenlignet med LIPOFECTIN®-formidlede transfeksjoner i disse cellelinjene, eks. 62. Den vertikale akse er prøveantallet; og den horisontale akse er de relative lysenheter/μg protein. Cellelinjene som benyttes er vist ved de skrå-skraverte søylene for NRK52E, og de fylte søylene for YB2.

Fig. 38 er et diagram over transfeksjonseffektiviteten av ulike DNA/dendrimer-komplekser med og uten DEAE-dekstran, sammenlignet med LIPOFECTIN®- og LIPOFECTAMIN®-formidlere transfeksjoner, eks. 63. Den vertikale akse er de relative lysenheter/μg protein; og den horisontale akse er ladningsforhold eller dosen, inklusive kontroller. De åpne søylene representerer G8(NH_3)-dendrimer; de vertikale kryssmerkede søylene representerer LIPOFECTIN®; de diagonale skråmerkede søylene representerer G8(NH_3)-dendrimer med DEAE-dekstran; de prikkede søylene representerer LIPOFECTAMIN®; og de ruteformede søylene representerer G11(EDA)-dendrimer med DEAE-dekstran.

Fig. 39 er et diagram over transfeksjonseffektiviteten til DNA/dendrimerkomplekser ved ulike ladningsforhold og i nærvær av enten DEAE-dekstran, dimetylsulfoksyd (DMSO), blandinger av det foregående eller uten disse, eks. 64. Den vertikale akse er de relative lysenheter/μg protein; og den horisontale akse er ladningsforholdet, inklusive plasmid-kontroller. De prikkede søylene representerer DEAE-dekstran med DMSO-trinn; de diagonalt skraverte søylene representerer DEAE-dekstran uten DMSO-trinn; de rute-formede søylene representeres ikke DEAE-dekstran med DMSO-trinn; og de firkant-skraverte søylene representerer ikke DEAE-dekstran og ingen DMSO-trinn.

Fig. 40 er et diagram over transfeksjonseffektiviteten til ASGPR målsøkende DNA kompleksbundet med galaktosetrisakkarid-konjugat-dendrimer, eks. 65. Den vertikale akse er de relative lysenheter/μg protein; og den horisontale akse er representert av cellelinjer og reseptorstatus. De åpne søylene representerer konjugerte dendrimerer; og de diagonalt skraverte søylene representerer ikke konjugerte dendrimerer.

Fig. 41 er en gelelektroforese som illustrerer DNA-bindingsevnen til G11(EDA) med og uten galaktosetrisakkarid konjugert til, eks. 65.

Fig. 42 er et diagram av transfeksjonseffektiviteten til DNA kompleksbundet med G8(NH_3)-dendrimer, ved ulike dendrimerkonsentrasjoner og med forskjellige serum-konsentrasjoner, eks. 66. Den vertikale akse er de relative lysenheter/μg protein; og den horisontale akse er serumkonsentrasjonen. De åpne søylene representerer 0,05 μM G8(NH_3)-dendrimerer; de prikkede søylene representerer 0,1 μM G8(NH_3)-dendrimerer; de diagonale skrålinjerte søylene representerer 0,5 μM G8(NH_3)-dendrimerer; og de fylte søylene er uten dendrimer.

Fig. 43 er et diagram over transfeksjonseffektiviteten til DNA kompleksbundet med ulike målsøkende, ikke-målsøkende og overflatemodifiserte dendrimerer, eks. 67. Den vertikale akse representerer prosent økning over plasmidkontroll; og den horisontale akse represen-terer de ulike DNA/dendrimerkomplekser. De åpne søylene representerer DNA/dendrimer-

ladningsforhold på 1:1; de fylte søylene viser DNA/dendrimerladningsforhold på 1:5; og de diagonalt linjerte søylene er DNA/dendrimerladningsforhold på 1:10.

Fig. 44 er et diagram over transfeksjonseffektiviteten til DNA kompleksbundet med dendrimerer, der ekspresjon av det transfekterte DNA måles, eks. 68. Den vertikale akse er de relative lysenheter/μg protein; og den horisontale akse er ulike DNA/dendrimer-komplekser. Søylene representerer tiden (timer) mellom transfeksjon og avslutning. De åpne søylene representerer 21 timer; de fra øvre venstre til nedre høyre skrålinjerte søyler representerer 45 timer; de fra øvre høyre til lavere venstre skrålinjerte søyler representerer 69 timer; og de fylte søylene representerer 141 timer.

Fig. 45 er et diagram over cytotoksisitet av G8(NH_3)-dendrimerer og G8(EDA)-dendrimerer i RAT2-cellelinje med og uten DNA og med og uten DEAE-dekstran til stede, eks. 69. Den vertikale akse viser prosent døde celler; og den horisontale akse representerer konsentrasjonen av dendrimeren i venstre del av figuren og konsentrasjonen av dendrimeren i venstre del av figuren og konsentrasjonen av dendrimer-DEAE-dekstran til høyre. De åpne søylene representerer G8(EDA)-dendrimer; og de diagonalt skraverte søylene representerer G8(NH_3)-dendrimer.

Fig. 46 er et lignende diagram over cytotoksisitet til G8(NH_3)-dendrimerer og G8(EDA)-dendrimerer i ulike cellelinjer, eks. 69. Den vertikale akse er prosent døde celler; og den horisontale akse er konsentrasjonen av de ulike dendrimerer som er testet. De åpne søylene representerer ikke DEAE-dekstran; og de fylte søylene representerer 0,5 μM DEAE-dekstran. Cellelinjene som er benyttet (avlesning av segmentene fra venstre til høyre) var klon 9, NIH 3T3, 10-1 og COS7.

Fig. 47(a)-(f) fremstiller cellulært opptak og lokalisering av DNA i to ulike cellelinjer, noe av disse ble transfektert uten dendrimer, noen med dendrimer og noen med dendrimer i nærvær av natriumazid, eks. 70. Den vertikale akse for alle figurer er cellulært opptak i 10^2 cpm/10^4 celler; og den lavere horisontale akse er tid (timer). Figurene (A)-(C) benyttet U937-celler; og figurene (D)-(F) benyttet Rat2-celler. Den øvre horisontale akse for figurene (A) og (D) er kun DNA, for figurene (B) og (E) er DNA pluss dendrimer, og for figurene (C) og (F) er DNA pluss dendrimer pluss natriumazid. På alle figurene representerer de fylte firkantene nukleær, de fylte sirklene membran, og de fylte trekantene cellulære fraksjoner.

Fig. 48 (a) og (b) er fotografier av celler, noen av disse er blitt vellykket transfektert med RSV-lacZ DNA, som uttrykker β-galatosidase-enzym, eks. 71.

Fig. 49 er som fig. 48, bortsett fra at det er et forstørret fotografi og et RSV-lacZ-plasmid ble benyttet med 3 μg pr. testbrønn, eks. 71.

Fig. 50 (a) og (b) er lik fig. 48, bortsett fra at RAT 2 rotte-fibroblastceller er benyttet, og transfekterte celler i (A) er sammenlignet med ikke-transfekterte celler i (B), eks. 71.

Fig. 51 (a)-(c) er en illustrasjon av det genetiske materiale i transfeksjonsprosessen.

Fig. 52 er et diagram av antallet kloner som oppnås fra D5-celler transfekterte med RSV-β-gal-neo-plasmid. Resistente cellekloner ble selektert med geneticin (G4 18) antibiotika

(Gibco/BRL) etter transfeksjon av utgangscellen ved bruk av forskjellige ulike teknikker, deriblant det som er beskrevet i oppfinnelsen, eks. 72. Den vertikale akse er antall kloner; og tallene på den horisontale akse er fra eks. 72 hvor tallene beskriver DNA-mengdene og transfeksjonsbetingelsene for disse prøver. De åpne søylene representerer G418-resistente kloner; og de skraverte søylene representerer β-galaktosidase-enzymproduserende kloner.
Fig. 53 er et diagram som sammenligner antall kloner som oppnås fra RAT2-celler transfekterte med RSV-β-gal-NEO-plasmid ved bruk av forskjellige ulike teknikker, inklusive de som er krevet i oppfinnelsen, eks. 72. Klonene ble selektert med geneticin (G418) for neomycinresistens og deretter evaluert med tanke på β-galaktosidaseaktivitet. Den vertikale akse er antall kloner; og tallene på den horisontale akse er prøvenummerne i eks. 72 med hensyn til DNA-mengder og transfeksjonsbetingelser. De åpne søylene representerer G418-resistente kloner; og de diagonalt skraverte søylene representerer β-galaktosidase-produserende kloner.
Fig. 54 er et diagram som viser produksjon i permanente transfekterte MSU 1,2-celler med EBV-A DNA-plasmid. Den vertikale akse viser hygromycin B-resistente kloner pr. $1x10^6$-celler; og den horisontale akse er prøvetallene (som oppført i eks. 72).
Fig. 55 viser en registreringskurve fra FACS-analyse (fluorescens) i ulike cellekloner transfekterte med et ICAM-produserende plasmid. I alle figurene er den vertikale akse antall celler og den horisontale akse er mengde ICAM som uttrykkes (fluorescens), eks. 72.
Fig. 56 viser LUCIFERASE®-aktivitet i RAT2-celler etter transfeksjon med pH-kontrollert dendrimeraggregat ved et DNA/dendrimerladningsforhold på 1:10. Den vertikale akse er de relative lysenheter pr. μg protein. Den horisontale akse er prøvenummere benyttet i undersøkelsen, eks. 74.
Fig. 57 viser LUCIFERASE®-aktivitet i RAT2-celler etter transfeksjon ved bruk av lysin-modifiserte dendrimerer og ikke-modifiserte dendrimerer, både i nærvær av DEAE-dekstran ved et DNA/dendrimerladningsforhold på 1:10. Den vertikale akse er relative lys-enheter pr. μg protein; og den horisontale akse er prøver benyttet i undersøkelsen, eks. 75.
Fig. 58 viser transfeksjonsresultatene for to cellelinjer (COS1 og RAT2), hver transfektert med ulike dendrimerer, polydisperse dendrimerer, og andre transfeksjonsmidler. Den vertikale akse er relative lysenheter pr. 3 μg cellulært protein; og den horisontale akse er prøvenummeret og ladningsforhold for ulike transfeksjonsmidler som anvendes, eks. 76.
Fig. 59 representerer fotografier av farvede cellekulturer fra mus-melanom D5-celler, hvis utgangsceller ble transfektert med RSV-β-gal plasmid-DNA. Stabile transformanter (kolonier) selekteres med G418 (eks. 72). Transfeksjonssystemene benyttet for utgangs-cellene i hver av de nummererte kulturer er:

1. 10 μg DNA med kalsiumfosfat
2. 10 μg med DEAE-dekstran
3. 5 μg med 0,5 μM G8(NH_3)
4. 10 μg DNA med 0,5 μM G8(NH_3)
5. 5 μg DNA med 0,2 μM G8(NH_3)

Fig. 60 er vist som ulike nummererte paneler.

Panel 1 er et fotografi av vevsseksjoner av D5-muse-melanom-tumor injisert in vivo med 10 μg RSV-β-gal plasmid DNA kompleksbundet til G11 (EDA)-dendrimer i 1:10 DNA/dendrimer-ladningsforhold. Vellykket transfeksjon av tumorceller bekreftes ved nærvær av D5-celler som uttrykker β.gal, som dokumenteres ved den mørke (blå) farve som sees i panel 1, eks. 77.

Panel 2 er et fotografi av kontrollen for panel 1-vevet, ved at D5-muse-melanom-tumor ble injisert med G11 (EDA)-dendrimer alene, eks. 77.

Panelene 3, 4 og 5 er fotografier fra elektronmikroskopi av de følgende DNA/dendrimer-kompleksene, eks. 43:

Panel 3 - DNA med G11 (EDA)-dendrimer ved DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:10;

Panel 4 - samme som for panel 3, men med tilsetning av DEAE-dekstran; og

Panel 5 - DNA med en polydispers størrelsesblanding av dendrimerer med DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:10.

Fig. 61A og 61B er diagrammer som sammenligner transfeksjon ved bruk av ulike tette stjernedendrimerer eller kombinasjoner av disse ved ulike ladningsforhold og under ulike betingelser: transfeksjoner med bruk av et genetisk materiale:dendrimer-kompleks alene (prikkede søyler); det samme genetiske materiale:dendrimer-kompleks i nærvær av DEAE-dekstran (diagonalt skraverte søyler); og det samme genetiske materiale:dendrimer-komplekser i nærvær av klorokin (fylte søyler). De resulterende data som vist i fig. 61A demonstrerer at COS1-celler ble transfekterte og i fig. 61B, ble RAT2-celler transfekterte. Den vertiale akse viser de relative lysenheter pr. 3 μg protein. Tallene på den horisontale akse er de genetiske materialer/dendrimer-kompleksprøvenummerne fra eks. 73.

Fig. 62 er et diagram som sammenligner transfeksjon ved bruk av lysinbaserte, ikke-symmetriske forgrenede dendrimerer med transfeksjon som benytter tette stjerne-dendrimerer, eks. 78. Den vertikale akse er de relative lysenheter pr. μg protein; og den horisontale akse er dendrimeren som benyttes. De åpne søylene er uten DEAE-dekstran; og de fylte søylene representerer DEAE-dekstran.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

De tette stjernepolymerer som illustreres av fig. 1 karakterisert ved sirkel I [her vist som "kjerne (I)"] representerer en startkjerne (i denne figur en tre-funksjonell startkjerne vist i tegningen helt til venstre); Z representerer en terminal gruppe, vist først i den andre tegningen fra venstre, mens det som refererer seg til en stjerne-forgrenet oligomer; A, B, C, D og E representerer spesielle molekylære generasjoner av tette stjernedendrimerer; og $(A)_n$, $(B)_n$, $(C)_n$, $(D)_n$ og $(E)_n$ representerer tette stjernebrobyggede dendrimerer.

De tette stjernedendrimerene er monomolekylære strukturer som besitter tre betydningsfulle arkitektmessige egenskaper, nemlig, (a) en startkjerne, (b) indre lag (generasjoner, G eller Gen) karakterisert ved repeterende enheter, radialt tilkoblet til

startkjernen, og (c) en ytre overflate med terminale funksjonelle enheter (d.v.s. terminale funksjonelle grupper) bundet til den ytterste generasjonen. Størrelsen og formen på disse tette stjernedendrimer-molekylene og de funksjonelle gruppene til stede i dendrimer-molekylet kan kontrolleres ut fra valg av startkjerne, antall generasjoner (d.v.s. utviklet struktur som dannes ved hver generasjon når den utvikles til neste generasjon) som benyttes i å utvikle dendrimeren, og valget av de repeterende enheter som benyttes for hver generasjon. Siden dendrimerene kan isoleres ved enhver gitt generasjon, omtales hjelpe-midler for å oppnå dendrimerer som har de ønskede egenskaper. For å ha egenskapene til en tett stjernedendrimer må alle de tre ovenfor arkitektmessige egenskaper være til stede. Disse egenskapene har vært diskutert videre av Petar R. Dvornic og Donald A. Tomalia i Chem. in Britain, 641-645, august 1994. Som benyttet i denne søknad, kan dendrimerene merkes ved deres generasjonstall og startkjernen som benyttes, f.eks. G7 (EDA)-dendrimer.

Valget av disse tette stjernedendrimer-komponentene påvirker egenskapene til dendrimerene. Startkjernetypen kan påvirke dendrimerformen, og utvikle (avhengig av valg av startkjerne), f.eks., runde dendrimerer, sylindriske eller stav-formede dendrimerer, ellipsoidale dendrimerer, eller sopp-formede dendrimerer. Gradvis påbygging av generasjoner
(d.v.s. generasjonstall og størrelse og type av de repeterende enheter) bestemmer størrelsene på dendrimerene og typen av deres indre.

Fordi tette stjernedendrimerer er grenede polymerer som inneholder dendrittiske gener og som har funksjonelle grupper fordelt i periferien av grenene, kan de fremstilles med en rekke egenskaper. F.eks. makromolekyler som er avbildet i fig. 2A (slik som Denkewalter, US-patent 4.289.872), og de foreliggende tette stjernedendrimene, slik som avbildet i fig. 2B, har tydelige forskjellige egenskaper på grunn av grenlengden. Dendrimertypen vist i fig. 2A besitter usymmetriske (ulike segment) grenfordelings-punkter, ytre (d.v.s. overflate)-grupper (representert av Z'), og indre deler (representert av Z) men meget mindre indre fritt rom. Den foretrukne dendrimer-type vist i fig. 2B besitter symmetriske (lik segment) forgreningspunkter med overflategrupper (representert av Z'), to forskjellige indre deler (representert henholdsvis av X og Z) med indre fritt rom som varierer som en funksjon av generasjonen (G). Dendrimerer slik som dem avbildet i fig. 2B kan utvikles gjennom tilstrekkelig generasjoner til å omfatte fullstendig og inneholde fritt rom slik at man kan få en enhet med hovedsakelig tomt indre og en sterkt fortettet overflate.

Den er den endelige strukturen som er hovedsaken i tette stjernedendrimerer fremfor den elimentære sammensetning. Derfor kan repeterende enheter bestå av en kombinasjon av ethvert element, så lengde som disse enheter besitter egenskaper med tanke på variasjon og bygges inn i strukturen som beskrevet her. Disse repeterte enheter kan bestå fullstendig av elementer som vanligvis sees i polymere strukturer, slik som kull, hydrogen, oksygen, svovel, nitrogen og silikon, eller kan bestå av mindre tradisjonelle elementer, forutsatt at disse repeterte enheter kan konstrueres til en stabil forgrenet struktur. F.eks. metalloider og overgangsmetaller er velkjent i feltet for å danne stabile

kovalente forbindelser og komplekser med organiske forbindelser. Disse stabile kovalente forbindelser og komplekser med organiske elementer kan eksistere som forgrenede materialer slik som f.eks. boraner, borater, germaner, stannaner og plumbaner, eller ikke-forgrenede bindinger, f.eks. dialkylsink eller kvikksølvforbindelser. Anvendelsen av passende ligander kan forårsake at et overgangsmetall, f.eks. kobolt kan fungere som en forgreningsenhet (ved å forbinde tre ulike ligander) eller en ikke-forgrenet binding (ved å forbinde to separate ligander). Derfor er de grenede strukturer som passer mønsterene beskrevet her og som kan innbygge ethvert element innenfor området av foreliggende oppfinnelse.

Også tette stjernedendrimerer, når de blir utviklet gjennom tilstrekkelige generasjoner viser "tett stjerne tett pakking" hvor overflaten av dendrimeren inneholder tilstekkelige terminale forbindelser slik at dendrimer-overflaten blir tett og omslutter tomme rom i det indre av dendrimeren. Denne fortetning kan gi molekylære nivågrenser som kan benyttes for å kontrollere diffusjon av forbindelser inn i eller ut av det indre av dendrimeren.

Overflatekjemien til dendrimerene kan kontrolleres på en på forhånd bestemt måte ved å velge en repeterende enhet som inneholder den ønskede kjemiske funksjon eller ved å modifisere kjemisk alle eller en del av overflategruppene for å gi nye overflatefunksjoner. Disse overflater kan f.eks. enten bli målrettet mot spesifikke seter, eller laget for å motstå opptak av spesielle organer eller celler, f.eks. av reticulo-endotheliale celler.

Innen en alternativ anvendelse av de tette stjernedendrimerene kan dendrimerene selv bli bundet sammen på ulik måte (deriblant innen betegnelsen "forbundet med") for å lage polydendrittiske deler (tett stjerne-koblede dendrimerer eller dendrimeraggregater) eller tett stjernedendrimer-aggregater som også er brukbare som bærere i konjugatene.

I tillegg kan dendrimerene fremstilles slik at de har avvik fra en ensartet forgrening i spesielle generasjoner, og på denne måte gi muligheter for å utvikle ikke sammenhengende og forskjellige egenskaper av dendrimeren (d.v.s. avvik fra den ensartede forgrening på spesielle steder innenfor dendrimeren).

De tette stjernepolymerene som benyttes i tette stjernekonjugater i foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ifølge fremgangsmåter kjent fra feltet, f.eks. US-patent 4.587.329, og beskrivelsen av denne er herved inntatt som referanse. Polyamin-dendrimerer kan fremstilles ved å reagere ammoniakk eller et amin som har en rekke primære amingrupper eller sekundære amingrupper med N-substituert aziridin, f.eks. N-tosyl eller N-mesylaziridin, for å lage en beskyttet første generasjon polysulfonamid. Den første generasjon polysulfonamid blir så aktivert med syre, f.eks. svovelsyre, saltsyre, trifluoreddiksyre, fluorsulfonsyre eller klorsulfonsyre, for å lage den første generasjon polyaminsalt. Det foretrekkes at desulfonyleringen utføres av en sterk syre som er flyktig nok til å tillate fjerning ved destillasjon, slik som saltsyre. Den første generasjon polyaminsalt kan så bli reagert videre med N-beskyttet aziridin for å lage beskyttet annen generasjon polysulfonamid. Sekvensen kan repeteres for å lage høyere generasjon-polyaminer.

Polyamidoaminer kan fremstilles ved å reagere ammoniakk (eller et amin som har flere primære og/eller sekundære amingrupper) med metylakrylat først under betingelser som forårsaker at Michael-tilsetningen av ett molekyl av ammoniakk til tre molekyler metylakrylat danner kjerneforbindelsen. Deretter fjernes ikke-reagert metylakrylat, denne forbindelse reageres med overskudd etylendiamin under betingelser slik at én amingruppe av etylendiaminmolekylet reagerer med metylkarboksylatgruppene til kjerneforbindelsen for å danne en første generasjon addukt eller forbindelse som har tre amidoamin-forbindelser. Deretter fjernes ikke-reagert etylendiamin, den første generasjon addukt blir så reagert med overskudd metylakrylat under Michael's betingelser slik at en annen generasjon forbindelse dannes som har terminale metylestergrupper. Den annen generasjon addukt blir så reagert med overskudd etylendiamin under amid-dannende betingelser for å lage den ønskede polyamidoamin-dendrimer som har regelmessige, annen generasjon dendrittiske grener med terminale amingrupper. Lignende dendrimerer som inneholder amidoamingrupper kan fremstilles ved å bruke organiske aminer som kjerneforbindelse, f.eks. etylendiamin som fremstiller en tetra-forgrenet dendrimer eller dietylentriamin som fremstiller en penta-forgrenet dendrimer.

For å fremstille anhydridet tette stjerne-polyetyleniminer, etter syrespalting av sulfonamidbindinger, kan en løsning som danner en azeotrop med vann, slik som benzen, toluen, xylen eller mesitylen, fortrinnsvis toluen, tilsettes og blandingen vann/løsnings-middelazeotrop fjernes ved azeotrop destillasjon, slik at oppvarming av blandingen vil fjerne vann hvilket utføres ved hjelp av en Dean-Stark-felle. Alternativt, kan klorinerte løsninger hvor anhydrid-polyetylenimin er løselig, slik som kloroform, benyttes i tørke-trinnet. Tilsetningen av klorinert løsning eller løsning som danner en azeotrop med vann, gjør det mulig å unngå å måtte oppvarme polymeren til temperaturer som skader eller degraderer polymeren. Anhydridet polyetyleniminer er spesielt anvendbare som bærere for antigene forbindelser (f.eks. antistoffer eller antistoff-fragmenter).

Dendrimerer kan fremstilles som har sterkt ensartet størrelse og form og viktigst gjør det mulig å ha et større tall funksjonelle grupper pr. enhet overflateområde i dendrimeren, og kan ha et større antall funskjonelle grupper pr. enhet molekylært volum sammenlignet med andre polymerer som har den samme molekylvekt, samme kjerne og monomere komponenter og det samme antall kjernegrener som tette stjernepolymerer. Den forøkte funksjonelle gruppetetthet i de tette stjernnepolymerer kan tillate en større mengde av forbindelse å bli båret pr. dendrimer. Siden antallet funksjonelle grupper på dendrimerene kan kontrolleres på overflaten og i det indre, gir det også et hjelpemiddel til å kontrollere mengden av bioaktiv forbindelse som skal avgis pr. dendrimer. I en spesielt foretrukket utførelsesform av foreliggende oppfinnelse, er tette stjernepolymerer, spesielt tette stjernedendrimerer, målsøkende bærere for bioaktive forbindelser som kan avgi de bioaktive forbindelsene til et spesielt målorgan eller til en spesiell determinant eller sted i en målorganisme.

En analogi kan gjøres mellom tidlig generasjon tette stjernedendrimerer (d.v.s. generasjon = 1-7) og klassiske runde miceller. Dendrimer-micelleanalogien kan avledes ved å sammenligne egenskaper som de har til felles slik som form, størrelse og overflate-egenskaper.

Tabell I

Parameter	Regulære klassiske miceller	Tette stjernedendrimerer
Form	Runde	Runde
Størrelse (diameter)	20-60Å	17-67Å
Overflate-aggregering	4-202	Z=6-192 (Z er antall overflategrupper) (generasjon = 2-7)
Areal/over-flategrupper ($Å^2$)	130-80$Å^2$	127-75$Å^2$

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

I tabell I ble formen bekreftet ved overflatetransmisjons-elektronmikroskopi (STEM). Størrelsen ble bekreftet ved hjelp av indre viskositet (η)-målinger og størrelses-eksklusjons-kromatografi (SEC). Overflateaggregasjonstallene ble bekreftet ved titrermetri og høy-felt NMR. Område/overflategruppe ble beregnet fra SEC hydrodynamiske målinger.

De første fem generasjoner av tett stjerne-polyamidoamin (PAMAM)-dendrimerer er mikro-områder som ligner meget sterkt på klassiske runde miceller på nesten alle områder (d.v.s. form, størrelse, antall overflategrupper, og område/overflate-grupper). En hovedforskjell er imidlertid at de er kovalent bundet og robuste sammenlignet med den dynamiske tilpasningsevnen til miceller. Denne forskjellen er en betydelig fordel når disse mikro-områder benyttes som innkapslingsmidler.

Som videre konsentriske generasjoner bygges på utover fem, skjer det en fortetning av overflaten. Denne fortetning kan lede til økede barriereegenskaper ved overflaten og viser seg som et mindre overflateområde pr. hode (overflate)-gruppe som vist i tabell II.

Tabell II

PAMAM-DENDRIMER-EGENSKAPER vs. GENERASJON

Generasjoner	1	2	3	4	5	6	7	8	9
% overflate-grupper, Z	3	6	12	24	48	96	192	384	768
Molekylvekt	275	875	2411	5147	10.619	21.563	43.541	87.227	174.779
Diameter* målt SEC	10,4Å	15,8Å	22Å	31Å	40Å	53Å	67Å	76Å	88Å
Overflate-pr.dendrimer	366$Å^2$	783$Å^2$	1519$Å^2$	3018$Å^2$	5024$Å^2$	8.820$Å^2$	14.096$Å^2$	18.136$Å^2$	24.328$Å^2$
Overflate-areal pr. Z-gruppe	122$Å^2$	131$Å^2$	127$Å^2$	126$Å^2$	104$Å^2$	92$Å^2$	73$Å^2$	47$Å^2$	32$Å^2$
Avstand mellom Z-grupper	12,4Å	12,8Å	12,7Å	12,6Å	11,5Å	10,8Å	9,8Å	7,75Å	6,28Å
Eksklusjon, volum	311,6$Å^3$	1.470,2$Å^3$	4.737,9$Å^3$	11,427,0$Å^3$	--	--			

* Hydrodynamiske diametere er bestemt ved størrelses-eksklusjonskromatografimålinger kalibrert mot monodisperse (Mw = 1,02) polyetylenoksyd-standarder
Mn

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

F.eks. har amin-terminale generasjoner 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 og 9,0 nedsatte overflateområder på henholdsvis 104, 92, 73, 47 og 32Å^2 pr. Z-gruppe. Typisk tilsvarer dette en overgang fra en mindre tett overflate til en mer tett micelle-lignende overflate med en bilag/monolag-barrierelignende overflate som normalt er forbundet med vesikler (liposomer) eller Langmuir-Blodgett-type membraner.

Hvis denne overflatefortetning skjer skulle en forandring i fysiske egenskaper og morfologi observeres som at generasjonene øker fra mellomgenerasjoner (G6-G8) til de mer utviklede generasjoner (G9 eller G10). Overflatetransmisjons-elektronmikroskopibilder (STEM) ble oppnådd for generasjonene (G) = 7,0, 8,0 og 9,0 etter fjernelse av metanol-løsningsmidlet for hver av prøvene slik at de kunne gi farveløse, lysegule faste filmer etterfulgt av farving med osmiumtetroksyd. Den morfolgiske forandring som var antatt opptrådte ved generasjon (G) = 9-trinnet. Det indre tomrom ved G = 9, måler ca. 63Å i diameter og omgis av en mørk kant som er ca. 22Å tykk. Metanol-oppløsningsmiddel har tilsynelatende blitt fanget innenfor 22Å ytre membran-lignende barriere slik at det gir et farveløst indre. Ved G = 9,0 oppfører den tette stjerne PAMAM seg topologisk som en vesikkel (liposom). Imidlertid har den tette stjerne en størrelse som er 10 ganger mindre og er meget monodispersert sammenlignet med et liposom og er meget mer fysisk stabil enn et liposom. De foreliggende dendrimerer har følgelig et stort nok indre tomrom til å innkapsle molekyler i løsningsmidlet som fyller hulrommet med en diameter opp til 63Å (volumet er ca. 131.000Å^3) eller mer. Disse micellestørrelse-prototyper synes å oppføre seg som en kovalent bundet liposom ved dette avanserte generasjonsstadium. Oppførselen gjør det mulig for disse prototyper å ha en ytterligere evne som bærere for f.eks., ikke-chelaterende radionuklider i tette stjerne-antistoffkonjugater for behandling av ulike pattedyrsykdommer.

Siden antallet av funksjonelle grupper på dendrimerene kan kontrolleres både på overflaten og inne i det indre, gir det også mulighet for å kontrollere mengde av båret materiale som skal avleveres pr. dendrimer. I én utførelsesform, er dendrimerene målsøkende bærere av forbindelser, som er i stand til å avlevere det bårede materiale, f.eks. en bioaktiv forbindelse, til f.eks. en plante eller plantesykdom eller en spesiell determinant eller locus i en målorganisme.

Dendrimerer som passer for anvendelse i konjugater ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter tette stjernepolymerer eller tette stjerenpolymerer beskrevet i US-patenter 4.507.466, 4.558.120, 4.568.737 og 4.587.329, som herved er inntatt som referanse.

Den foretrukne utførelsesformen vedrører spesielt et tett stjernekonjugat som er karakterisert ved at det omfatter minst én tett stjernepolymer forbundet med minst én båret landbruks-relatert, farmasøytisk eller annen forbindelse. Tette stjernekonjugater omfatter innenfor oppfinnelsens område de som representeres av formelen:

$$(P)_x{}^*(M)_y \qquad (I)$$

hvor:

hver P representerer en dendrimer;
* representerer et helt tall fra 1 eller større:
hver M representerer en enhet (f.eks. et molkeyl, atom, ion og/eller en annan basal enhet) av et båret materiale, idet nevnte bårede materiale kan være det samme bårede materiale eller forskjellige bårede materialer, fortrinnsvis er bårede materialer en bioaktiv forbindelse;
y representerer et helt tall på 1 eller større; og
* viser at det bårede materiale er forbundet med dendrimeren; og med den forutsetning at det bårede materiale beholder sin effektivitet.

I formel (I) over kan P være en tett stjernpolymer eller dendrittisk polymer, når det bårede materiale er en responsmoderator, spesielt genetisk materiale.

Foretrukne tette stjernekonjugater ifølge formel (I) er de hvor M er et legemiddel, pesticid, radionukleotid, chelator, kompleksbundet metall, toksin, antistoff, antistoff-fragment, antigen, signaldanner, f.eks. fluorescerende forbindelser, signalreflektor, f.eks. para-magnetiske forbindelser, eller signal-absorpsjonsmateriale, f.eks. elektronstråle-modifiserere, fragrans, pheromoner, eller farvestoffer. Betegnelsene "signalgenerator" og "signal-absorpsjonsmateriale" er velkjente for fagmannen. En signalgenerator kan defineres som en enhet som er i stand til å sende ut en påvisbar mengde energi i form av elektromagnetisk stråling (f.eks. røntgenstråler, UV-stråler, IR-stråler, synlig stråling og lignende) og omfatter fosforescerende og fluorescerende enheter (f.eks. luciferase og alkanisk fosfatase) og bioluminiscerende markører, og gamma- og røntgenstrålekilder, eller materiale (f.eks. neutroner, positroner, β-partikler, α-partikler, og lignende) og omfatter radionuklider, positronemittorer og lignende. Et signal-absorpsjonsmateriale kan defineres som en enhet som absorberer en påvisbar mengde energi i form av elektromagnetisk stråling eller masse. Noen eksempler er farvestoffer, kontraststoffer og boron (som absorberer neutroner). En gitt enhet kan være både et signal-absorberende materiale og en signalgenerator, f.eks. fluorescerende eller fosforescerende forbindelser kan absorbere lys og/eller utsende lys, noen ganger etter påvirkning av lys slik som fluorin inneholdende markører som benyttes i DNA-sekvenseringen; boron absorberer neutroner og gir stråling, paramagnestiske partikler kan benyttes til å fange målrettede molekyler og energi-stråling, og mange andre slike eksempler. Betegnelsen feromon er velkjent av fagmannen og defineres og eksemplifiseres, f.eks. i McGraw-Hill Encyclopedia of Science & Technology, 7. utg. vol. 13, s. 360-361; og "Insect Pheromone Technology: Chemistry and Applications", ACS Symposium Series 190 (1982). Eksempler på passende fragranser, slik som parfymer og smaksstoffer, er velkjente for fagmannen, og illustreres og defineres videre i Perfume and Flavor Chemicals, vol. I og II, av Steffen Arctander, pub. Montclair, NJ (1969). Farvestoffer og farve-forbindelser er velkjente for fagmannen på området, og illustres og defineres i f.eks. Webster's Third New International Dictionary, s. 706-710, utg. G.C. Merriam Company (1981); Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, vol. 8. s. 151-406, 3. utg. pub. John Wiley & Sons, (1979). Det blir spesielt foretrukket at x = 1 og y = 2 eller flere.

Også inkludert er tette stjernekonjugater ifølge formel (I) hvori de tette stjerne-dendrimerene er kovalent bundet sammen, tette stjerne-brobygde dendrimerer, via valgfrie koblingsgrupper, for å lage polydendriske samlemolekyler (d.v.s. hvor x > 1). Anvendelse av disse tette stjerne-brodannede dendrimerer omfatter topologiske kontrollerte frigjørings-forbindelser, synovektomi (fjernelse av synovialhinnen) ved hjelp av bestråling og andre.

Som anvendt her betyr "forbundet med" at det bårede materiale kan kapsles inn fysisk eller fanges inne i dendrimerens kjerne, bli oppløst delvis eller helt inne i dendrimeren, eller bundet til eller koblet til dendrimeren eller til enhver kombinasjon av disse, hvorved bindingen eller båndet er gjennom kovalent binding, hydrogenbinding, adsorpsjon, absorbsjon, metallbinding, van der Waalske krefter eller ionebinding, eller enhver kombinasjon av disse. Sammenhengen mellom det bårede materiale(er) og den drimeren(ene) kan etter valg benytte overganger og/eller mellomstykker for å lette fremstillingen eller anvendelse av de tette stjernekonjugatene. Passende forbindelses-grupper er grupper som binder en målsøkende dirigerende forbindelse (d.v.s. T) til dendrimeren (det er P) uten å hindre på nevneverdig måte effektiviteten til den dirigerende forbindelse eller effektiviteten til annet båret materiale(r) (d.v.s. M) som er til stede i de tette stjernekonjugater. Disse forbindelsesgrupper kan eller kan ikke spaltes og er vanligvis benyttet for å unngå rom-messig hindring mellom den mål-dirigerende forbindelse og dendrimeren, forbindelsesgruppene er fortrinnsvis stabile (d.v.s. ikke-klyvbare). Siden størrelse, form og funksjonell gruppetetthet av stjernedendrimerene kan kontrolleres rigorøst, er det mange måter som det bårede materiale kan forbindes med dendrimeren. F.eks. (a) kan det være en kovalent, coulombisk, hydrofob, eller chelaterende form for forbindelse mellom den (de) bårede materiale(er) og enhetene, vanligvis funksjonelle grupper, lokalisert på eller nær overflaten til dendrimeren; (b) det kan være kovalente coulombiske, hydrofobe eller chelerings-forbindelse mellom det bårede materiale og deler lokalisert i det indre av dendrimeren; (c) dendrimeren kan fremstilles slik at den har et indre som er hovedsakelig tomt hvilket tillater oppfangelse (f.eks. fysisk innenfor eller ved binding til de indre deler av den tette stjerendendrimer) av de bårede materialene i det indre (void-volum), (f.eks. magnetisk eller paramagnetiske kjerner eller områder som lages ved chelering og reduksjon av metall-ioner til null valens-tilstand inne i dendrimeren), disse dendrimerer inneholder magnetiske indre som kan benyttes for å hente ulike bioaktive enheter som kan kompleksbindes med forskjellige dendrimeroverflater ved bruk av magneter og lignende, hvori frigjøringen av det bårede materiale kan valgfritt kontrolleres ved fortetning på overflaten av dendrimeren med diffusjons-kontrollerende forbindeler; eller (d) forskjellige kombinasjoner av de foran nevnte fenomener kan benyttes.

Dendrimerer, her representert med "P", omfatter de tette stjernepolymerene beskrevet i US-patenter nr. 4.507.466, 4.558.120, 4.568.737 eller 4.587.329.

I en foretrukket utførelsesform er de bårede materialene, her representert ved "M", farmasøytiske materialer. Slike materialer er passende for anvendelse i tette stjernekonjugater deribant ethvert materiale for in vivo, ex vivo eller in vitro anvendelse for diagnostisk eller terapeutisk behandling av pattedyr som kan forbindes med den tette

stjernedendrimeren uten på nevnteverdig måte å forstyrre den fysiske integritet til dendrimeren, f.eks., men ikke begrenset til:

legemidler, slik som, men ikke begrenset til, antibiotika, smertestillende, antihypertensiver, hjertestimulerende og lignende; eksempler er acetaminofen, acycklovir, alkeran, amikacin, ampicillin, aspirin, bisantren, bleomycin, neokardiostatin, klorambucil, kloramfenikol, cytarbin, daunomycin, doxorubicin, fluorurasil, gentamycin, ibuprofen, kanamycin, mefrobamat, metotrexat, novantron, nystatin, oncovin, fenobarbital, polymyxin, probukol, prokarbazin, rifampin, streptomycin, spectinomycin, symmetrel, tioguanin, tobramycin, trimetoprim og valban;

toksiner, slik som, men ikke begrenset til, difteri-toksin, gelonin, eksotoksin A, abrin, modeccin, recin, eller toksiske fragmenter derav;

metall-ioner, slik, men ikke begrenset til, metallene i de periodiske tabellgruppene VIIIA (Fe, Co, Ni, Ru, Rh, Pd, Os, Ir, Pt), IVB (Pb, Sn, Ge), IIIA (Sc, Y, lantanider og aktinider), IIIB (B, Al, Ga, In, Ti), IA alkalimetaller (Li, Na, Rb, Cs, Fr) og IIA jordalkalimetaller (Be, Mg, Ca, Sr, Ba, Ra) og overgangsmetaller;

radionuklider, slik som, men ikke begrenset til, slike som er utviklet fra aktinider eller lantanider eller andre lignende overgangselementer eller fra andre elementer, slik som ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{82}Rb, ^{89}Sr, ^{88}Y, ^{90}Y, ^{99m}Tc, ^{105}Rh, ^{109}Pd, ^{111}In, ^{115m}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{140}Ba, ^{140}La, ^{149}Pm, ^{153}Sm, ^{159}Gd, ^{166}Ho, ^{175}Yb, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{194}Ir og ^{199}Au, fortrinnsvis ^{88}Y, ^{90}Y, ^{99m}Tc, ^{125}I, ^{131}I, ^{153}Sm, ^{166}Ho, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{67}Ga, ^{111}In, ^{115m}In og ^{140}La;

signaldannere, som omfatter alt som resulterer i en påvisbar og målbar forstyrrelse av systemet på grunn av sitt nævær. En signaldanner (generator) kan defineres som en enhet som utstråler en påvisbar mengde energi i form av elektromagnetisk stråling (f.eks. røntgenstråler, ultrafiolett (UV)-stråling, infrarødt (IR)-stråling og lignende) og omfatter fosforescerende og fluorescerende typer, gamma og røntgenstråle-kilder, eller materie (slik som neutroner, positroner, β-partikler, α-partikler og lignende) og omfatter radionuklider, positronkilder og lignende; slik som, men ikke begrenset til, fluorescerende enheter, fosforescerende enheter og stråling, slik som radionuklider, partikler og strålingskilder, og nukleotider, toksiner eller legemidler merket med én eller flere av disse ovenfor, inklusive men ikke begrenset til signalgeneratorer;

signalreflektorer, slik som, men ikke begrenset til, paramagnetiske eller magnetiske enheter, f.eks. Fe, Gd eller Mn, nitroksylradikaler, NMR skift-reagenser, f.eks. Eu eller Pr-salter;

chelatert metall, slik som, men ikke begrenset til, ethvert av metallene eller deres ioner gitt ovenfor, uavhengig om de er radioaktive, d.v.s. kontrastforbindelser, paramagnetiske eller magnetiske enheter og metall-ioner, når de er forbundet med en chelaterende forbindelse;

signalabsorpsjonsmateriale kan defineres som en enhet som absorberer en påvisbar mengde energi i form av elektromagnetisk stråling eller materiale. Noen eksempler er

farvestoffer, kontrastmidler, elektronstråle-absorpsjonsmateriale, aromatisk UV-absorbsjonsmateriale, og boron (som absorberer neutroner). En gitt enhet kan være både et signalabsorpsjonsmateriale og en signalgenerator, d.v.s. fluorescerende eller fosforescerende substanser kan absorbere lys og utsende lys; boron-absorberende neutroner og utsender stråling, og mange andre slike eksempler; f.eks. slik som, men ikke begrenset til, kontrastforbindelser, f.eks. Gd, Mn eller Fe, og elektronstråle-absorpsjonsmateriale slik som Pb eller Fe;

antistoffer, inklusive monoklonale antistoffer og anti-idiotype-antistoffer;

antistoff-fragmenter;

hormoner;

biologisk responsmoderatorer, d.v.s. bioaktive forbindelser som forandrer svaret til organismen overfor stimulering, slik som, men ikke besgrenset til, interleukiner, interferoner, tumor-nekrose-faktor, granulocyttkoloni-stimulerende faktor, virus, virusfragmenter og annet genetisk materiale;

diagnostisk absorpsjonsmateriale, slik som signal-absorpsjonsmaterialer nevnt ovenfor, biologiske farvemetoder og lignende;

fluorescerende enheter; og

oppfangende forbindelser slik som chelaterende forbindelser, antigener, antistoffer eller enhver enhet som er i stand til å fange selektivt terapeutiske eller diagnostiske forbindelser.

I en annen utførelsesform, er de bårede materialer, her representert ved "M" jordbruksforbindelser. Slike forbindelser er også passende for anvendelse i tette stjernekonjugater inklusive ethvert materiale for in vivo, ex vivo eller in vitro behandling, diagnose, eller anvendelse overfor planter eller ikke-pattedyr (inklusive mikroorganismer) som kan forbindes med den tette stjernedendrimer uten på nevneverdig måte å forstyrre den fysiske integritet av dendrimeren. F.eks. kan de bårede materialer være

toksiner, slik som, men ikke begrenset til, difteritoksin, gelonin, eksotoksin A, abrin, modeccin, ricin eller toksiske fragmenter av disse;

metall-ioner, slik som beskrevet ovenfor for farmasøytisk båret materiale;

radionuklider, f.eks. slike som stammer fra aktinider eller lanthanider eller lignende overgangselementer eller fra andre elementer slik som ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{82}Rb, ^{85}Sr, ^{88}Y, ^{90}Y, ^{99m}Tc, ^{105}Rh, ^{109}Pd, ^{111}In, ^{115m}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{140}Ba, ^{140}La, ^{149}Pm, ^{153}Sm, ^{159}Gd, ^{166}Ho, ^{175}Yb, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{194}Ir og ^{199}Au, eller de som er beskrevet ovenfor for farmasøytisk bårede forbindelser;

signalgeneratorer som omfatter alt som resulterer i påvisbare og målbare forstyrrelser av systemet på grunn av sitt nærvær, slik som fluorescerende enheter, fosforescerende enheter og stråling, eller de som beskrevet ovenfor for farmasøytisk båret materiale;

signalreflektorer, slik som paramagnetiske enheter, f.eks. Fe, Gd eller Mn, eller de som beskrevet ovenfor for farmasøytisk båret materiale;

signal-absorpsjonsmateriale, slik som kontrastforbindelser og som elektronstråle-absorpsjonsmateriale, f.eks. Fe, Gd eller Mn eller de beskrevet ovenfor for farmasøytisk båret materiale;

feromoner eller hormoner;

biologiske responsmoderatorer, slik som interleukiner, interferoner, virus, virus-fragmenter og/eller annet genetisk materiale, pesticider, inklusive antimikrobielle forbindelser, algicider, anthelmintia, akaridicider, insekticider, tiltrekningsforbindelser, repellent, herbicider og/eller fungicider, slik som acefat, acifluorfen, alaklor, atrazin, benomyl, bentazon, captan, karbofuran, klorpikrin, klorpyrifos, klorsulfuron, cyanazin, cyheksatin, cypermethrin, 2,4-diklorfenoksy-eddiksyre, dalapon, dicamba, diclofop metyl, diflubenzuron, dinoseb, endothall, ferbam, fluazifop, glyfosat, haloxyfop, malathion, naptalam, pendimethalin, permethrin, picloram, propaklor, propanil, sethoxydim, temefos, terbufos, trifluarin, triforin, zineb, og lignende; og

oppfangingsforbindelser slik som chelerende forbindelser, chelert metall (uansett om de er radioaktive) og enhver forbindelse som er i stand til å fange opp selektivt terapeutiske eller diagnostiske forbindelser.

Det bårede materiale, heretter representert ved "M" er også immunopotenserende forbindelser. Slike forbindelser er passende for anvendelse i tette stjernekonjugater inkludert ethvert antigen, hapten, organisk del eller organisk eller inorganiske forbindelser som vil øke et immunsvar som kan være forbundet med de tette stjernedendrimerene uten på nevneverdig måte å forstyrre den fysiske integriteten til dendrimerene. F.eks. kan de bårede materialer være syntetiske peptider anvendt for produksjon av vaksiner mot malaria (US-patent 4.735.799), kolera (US-patent 4.751.064) og urinsysteminfeksjoner (US-patent 4.740.585), bakterielle polysakkarider for fremstilling av antibakterielle vaksiner (US-patent 4.695.624), og virusproteiner eller virus-partikler for fremstilling av antivirus-vaksiner for å forhindre slike sykdommer som AIDS og hepatitt.

Anvendelsen av tette stjernekonjugater som bærere for immun-potenserende forbindelser unngår ulempene med tvetydighet med hensyn til kapasitet og struktur forbundet med de vanlig kjente eller syntetiske polymerkonjugater som benyttes for å gi makromolekylær struktur til antigen-bæreren. Anvendelse av tette stjernedendrimerer som bærere for immun-potenserende forbindelser muliggjør kontroll av størrelsen, formen og overflatesammensetningen til konjugatet. Disse muligheter tillater optimalisering av antigen-presentasjon overfor en organisme, og på den måte oppnås antistoffer som har en større selektivitet og høyere affinitet enn bruk av konvensjonell adjuvants. Det kan også være ønskelig å forbinde multiple antigene peptider eller grupper til den tette stjerne-dendrimer, slik som binding av både T- og B-celle-epitoper. En slik design ville lede til forbedrede vaksiner.

Det kan også være ønskelig å konjugere pesticider eller forurensningsforbindelser som kan utløse et immunsvar, slik som de som inneholder karbamat, triazin eller organofosfat-forbindelser, til en tett stjernedendrimer. Antistoffer fremstilt mot det ønskede pesticid eller pollutant kan renses ved standard fremgangsmåter, og bli

immobilisert på et passende underlag og anvendt for følgende påvisning av pesticidet eller forurensningsmidlet i omgivelsene eller i en organisme.

I en videre utførelsesform omfatter de bårede materialer, her representert som "M", som er passende for anvendelse i tette stjernekonjugater, ethvert materiale andre enn jordbruks- eller farmasøytiske forbindelser som kan være forbundet med den tette stjernedendrimer uten å på nevneverdig måte forstyrre den fysiske integritet til dendrimeren, f.eks.: metall-ioner, f.eks. alkali- og alkali-jordmetaller, magnetiske indre, eller som for det farmasøytisk bårede materiale som definert tidligere;

signalgeneratorer, som omfatter alt som resulterer i en påvisbar og målbar forstyrrelse av systemet på grunn av sitt nærvær, slik som fluorescerende enheter, fosforescerende enheter og strålingskilder, eller som for det farmasøytisk bårede materiale som definert tidligere;

signalreflektorer, f.eks. paramagnetiske enheter, f.eks. Fe, Gd eller Mn, eller som for det farmasøytisk bårede materiale som definert tidligere;

signal-absorpsjonsmaterialer, slik som kontrastforbindelser og elektronstråle-absorpsjonsmaterialer, f.eks. Fe, Gd eller Mn; feromonforbindelser, eller som for det farmasøytisk bårede materiale som definert tidligere;

fragrans-deler;

farvedeler; og lignende; og

oppfangende forbindelser slik som chelerende forbindelser eller enhver del som er i stand til å fange opp selektivt ulike forbindelser.

De bårede materialer er fortrinnsvis bioaktive forbindelser. Som brukt heri, refererer "bioaktive" seg til en aktiv enhet slik som et molekyl, atom, ion og/eller en annen enhet som er i stand til å påvise, identifisere, hemme, behandle, katalysere, kontrollere, drepe, forøke eller modifisere en målsøkende del slik som et protein, et gen, glykoprotein, lipoprotein, lipid, en målsøkende celle, et målsøkende organ, en målsøkende organisme [f.eks. en miroorganisme, plante eller dyr (inklusive pattedyr slik som mennsker)] eller annen målsøkende enhet.

De tette stjernekonjugater ifølge formel (I) fremstilles ved å reagere P med M, vanligvis i et passende løsningsmiddel, ved en temperatur som letter forbindelsen av det bårede materiale (M) med den tette stjernedendrimer (P).

Passende løsningsmidler er midler hvor P og M i det minste er delvis blandbare og løsningene er inerte til dannelsen av konjugater. Hvis P og M er minst delvis blandbare med hverandre, er det mulig at løsningsmiddel ikke er nødvendig (f.eks. reaksjonen er grei). Når det ønskes kan blandinger av passende løsningsmidler benyttes. Eksempler på slike passende løsningsmidler er vann, metanol, etanol, kloroform, acetonitril, toluen, dimetylsulfoksyd og dimetylformamid.

Reaksjonsbetingelser for å danne det tette stjernekonjugatet ifølge formel (I) avhenger spesielt av dendrimeren (P), det bårede materiale (M), og type bånd (*) som dannes. F.eks. hvis P er PEI (polyetylenimin), så blir den tette stjernedendrimer med et alkylen (f.eks. metylen) karboksylatoverflate, M er radionuklid, f.eks. yttrium, reaksjonen

utført ved romtemperatur i vann. Imidlertid hvir P er en ester med terminal polyamidoamin (PAMAM) tett stjernedendrimer, og M er aspirin, så blir reaksjonen utført ved romtemperatur i kloroform. Temperaturen kan variere fra romtemperatur til tilbakeløp. Valget av et spesielt løsningsmiddel og temperatur vil være klart for fagmannen.

Forholdet mellom M:P vil avhenge av størrelsen av dendrimeren og mengde av det bårede materiale. F.eks. er det molare forhold (molforhold) av enhver ionisk M til P vanligvis 0,1-1.000:1, fortrinnsvis 1-50:1, og det foretrekkes 2-6:1. Vektforholdet av ethvert legemiddel, pesticid, organisk eller toksisk M til P er vanligvis 0,1-5:1, fortrinnsvis 0,5-3:1.

Når M er et radionuklid, er det tre måter det tette stjernekonjugatet kan fremstilles på, nemlig: (1) P kan benyttes som en chelerende forbindelse. F.eks. en metylenkarboksylat-overflate PEI eller PAMAM vil chelere et metall slik som yttrium eller indium. (2) En chelerende forbindelse kan bli kovalent bundet til P. F. eks. kan et amin endestilt i PEI tett stjernedendrimer bli reagert med 1-(p-isotiocyanatbenzyl)dietylentriaminpentaeddiksyre og så chelert, eller kompleksbundet slik som rhodiumklorid kompleksbundet med isotiocyanatbenzyl-2,3,2-tet (d.v.s. 6-[4.(isotiocyanatbenzyl)]-1,4,8,11-tetraazaundekan; beskrevet i europeisk patentsøknad 0296522) bli utviklet. (3) Et på forhånd chelatert radionuklid kan bli bundet til P ved hjelp av hydrofob eller ione-binding.

Andre tette stjernekonjugater som er spesielt foretrukket for anvendelse med farmasøytiske materialer, er de konjugater som inneholder en mål-dirigerende forbindelse (herved betegnet som "T") og som er representert med formelen:

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

hvor
hver T representerer en mål-dirigerende forbindelse;
e representerer et tall på 1 eller større; og
P, *, *, M og y er som tidligere definert her; og
med den forutsetning at M bevarer sin effektivitet.

Blant de tette stjernekonjugater ifølge formel (II) foretrekkes slike hvor M er et legemiddel, pesticid, radionuklid, chelator, chelatert metall, toksin, signalgenerator, signalreflektor, eller signal-absorpsjonsmateriale. Også de konjugater foretrekkes hvor e = 1 eller 2; og de hvor x = 1 og y = 2 eller mer. Spesielt foretrukne konjugater er slike hvor x = 1, e = 1, y = 2 eller mer og M og T er forbundet med polymeren via de samme eller ulike forbindingsmolekyler.

I tillegg kan T og/eller M i formel (II) bli dekket eller beskyttet for å hindre immunogenesitet eller RES-svar ved f.eks. lever. Forbindelser som kan benyttes for dette formål omfatter polyetylenglykol (PEG) og andre kjent i feltet.

De tette stjernekonjugater ifølge formel (II) fremstilles enten ved å lage T*P og så tilsette M eller ved å lage P*M og så tilsette T. Begge reaksjonsskjemaer utføres under betingelser som er ikke-ødeleggende til den spesielle konjugatkomponenten (slik som en spesiell pH, temperatur eller saltkonsentrasjon) og i nærvær av et passende løsningsmiddel

når det er nødvendig. For å kontrollere pH, benyttes buffere eller tilsetning av passende syre eller base. Reaksjonsbetingelsene er avhengig av type forbindelse som dannes, (*), den tette stjernedendrimeren benyttet (P), det bårede materiale (M) og den målsøkende dirigerende forbindelse (T). F.eks., når T er et monoklonalt antistoff og M er et chelatert radionuklid, opptrer T*P-forbindelsen gjennom en funksjonell gruppe slik som et isotiocyanat i vann eller i vann med en organisk moderator slik som acetonitril eller dimetylformamid. Vanligvis blir konjugeringen utført i buffer ved pH 7-10, fortrinnsvis pH 8,5-9,5. Det utviklede konjugatet blir så chelert med et radionuklid slik som yttriumacetat, fortrinnsvis i romtemperatur. Alternativt kan P og M bli chelatert, vanligvis i vann, før konjugering til T. Konjugeringen med T utføres i en passende buffer.

Det molare forhold mellom T:P er fortrinnsvis 1:1, spesielt når T er et antistoff eller et antistoff-fragment. Det molare forhold av M:P vil være som tidligere.

Mål-dirigerende forbindelser som kan målrette de tette stjernekonjugatene er enheter som når de benyttes i de tette stjernekonjugatene i foreliggende oppfinnelse resulterer i at minst en del av de tette stjernekonjugatene blir avlevert til et ønsket mål (f.eks. et protein, et gen, glykoprotein, lipoprotein, lipid, en målsøkt celle, et målsøkt organ, en målsøkt organisme eller andre målsøkte enheter) omfatter antistoffer, fortrinnsvis monoklonale antistoffer, antistoff-fragmenter slik som Fab, Fab', $F(ab')_2$-fragmenter eller ethvert antistoff-fragment som har den nødvendige målspesifisiteten, hormoner, biologiske virkningsmoderatorer; epitoper; kjemiske funksjoner som viser målspesifisitet; og lignende.

Antistoffene eller antistoff-fragmentene som kan benyttes i foretrukne tette stjernekonjugater beskrevet her kan fremstilles ved hjelp av fremgangsmåter velkjent i feltet. Et eksempel på passende antistoffer er immunoglobuliner slik som IgG, IgM, IgA, IgD og IgE. Høyspesifisitets monoklonale antistoffer kan fremstilles ved hybridiseringsteknikker velkjente i feltet, se f.eks. Kohler og Milstein (1975), Nature 256:495-497; og 1976, Eur. J. Immunol. 6:511-519). Slike antistoffer kan normalt ha en høy spesifikk reaktivitet.

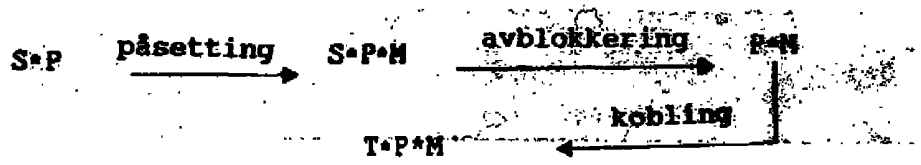
I de antistoff-målsøkende tette stjernekonjugatene, kan antistoffer som er rettet mot ethvert antigen eller hapten benyttes. Selv om konvensjonelle polyklonale antistoffer kan anvendes, byr monoklonale antistoffer på flere fordeler. Selekterte monoklonale antistoffer er sterkt spesifikke for en enkel epitop. I tillegg, kan store mengder av hvert monoklonalt antistoff fremstilles ved vevskultur (f.eks. en hybridom-cellelinje). Antistoffer benyttet i foreliggende oppfinnelse kan rettes mot f.eks. tumorer, bakterier, sopp, virus, parasitter, mycoplasma, differensiering og andre cellemembran-antigener, polynukleinsyrer slik som DNA eller RNA, patogene overflate-antigener, toksiner, enzymer, allergener, legemidler og ethvert biologisk aktivt molekyl. For en mer komplett liste over antigener, se US-patent 4.193.983.

Det kan være ønskelig å konjugere flere antistoffer eller fragmenter til dendrimeren, og i spesielle tilfeller å benytte antistoffer av ulik spesifisitet. F.eks. kan et bifunksjonelt

konjugat som har evne til å lokaliser og bindes til en svulst og så fange opp sirkulerende cytotoksiske, diagnostiske eller biostatiske forbindelser bli utformet.

I fravær av en mål-dirigerende forbindelse (eller i nærvær av en mål-dirigerende forbindelse hvis ønskelig), på grunn av antall funksjonelle grupper som kan lokaliseres ved eller nær overflaten til dendrimeren, kan alle (eller en vesentlig del av) slike funksjonelle grupper gjøres anioniske, kationiske, hydrofobe eller hydrofile for å hjelpe effektiv avlevering av tette stjernekonjugater til et ønsket mål med motsatt ladning eller til et hydrofobt eller hydrofilt sammenlignbart mål.

Fremstilling av konjugatene ifølge formel (II) ved bruk av en P med et utvidet håndtak (S) er også ment som en fremgangsmåte for å fremstille konjugatene ifølge formel (II). Reaksjonsskjemaet er vist nedenfor:



hvor

S*P representerer den beskyttede dendrimer;

S*P*M representerer den beskyttede dendrimer konjugert med M;

P*M representerer den avbeskyttede dendrimer konjugert til M (tett stjerne-konjugat);

T*P*M representerer det tette stjernekonjugat bundet til den måldirigerende forbindelse.

Passende oppløsningsmidler kan benyttes som ikke har en uheldig virkning på P*M. F.eks. når S er t-butoksykarbonyl, og P*M er stabil i en vandig løsning, kan S fjernes av vandig syre.

Også foretrukket er tette stjernekonjugater hvor polymeren bindes direkte til eller via bindeledd når de bårede materialer er farmasøytiske forbindelser; disse stjernekonjug-ater representeres av formelen:

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

hvor:

hver C' representerer den samme eller forskjellig forbindelses-gruppe:
hver C" representerer den samme eller forskjellig forbindelsesgruppe;
g og k representerer hver for seg et tall på 1 eller større;
f og h representerer hver for seg et tall på 0 eller større;
- viser et kovalent bånd under forhold hvor en forbindelsesgruppe er til stede; og
P, x, *, M, y, T og e er som tidligere definert her; og
med den forutsetning at M opprettholder sin effektivitet.

Foretrukket blant de tette stjernekonjugatene ifølge formel (III) er slike hvor M er et radionuklid, legemiddel, toksin, signalgenerator, signalreflektor eller signal-absorpsjonsforbindelse. Også foretrukket er de konjugater hvor x = 1. Spesielt foretrukne konjugater er der x, e, f, h og y hver er 1, og g er 1 eller mer og k er 2 eller mer. Mest foretrukket er slike konjugater hvor x, e, f, h, y og g er hver 1, og k er 2 eller mer. Spesielt foretrukket er også de tette stjernekonjugater hvor M representerer en bioaktiv forbindelse slik som et radionuklid, legemiddel eller toksin.

Passende forbindelsesgrupper er slike som representeres av C" som binder det bårede materiale til dendrimeren uten i vesentlig grad å hemme effektiviteten til det bårede materiale eller effektiviteten til den mål-dirigerende forbindelse som er til stede i det tette stjernekonjugatet. Disse forbindelsesmolekyler må være stabile (d.v.s ikke spaltbare) eller kan spaltes avhengig av type aktivitet i det bårede materiale og er vanligvis benyttet for å unngå romlig hindring mellom det bårede materiale og polymeren.

Mest foretrukket er konjugater hvor dendrimeren er direkte forbundet med, eller via forbindelsesgruppe(r), til et antistoff eller antistoff-fragment. Polymeren i disse foretrukne konjugater kan, i tillegg, være valgfritt forbundet enten direkte eller via forbindelsesgruppe(r) med én eller flere bårede materialer, fortrinnsvis en radioisotop. Slike tette stjernekonjugater er representert av formelen:

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

hvor:

hvert antistoff representerer et antistoff eller antistoff-fragment som kan reagere med en ønsket epitop;

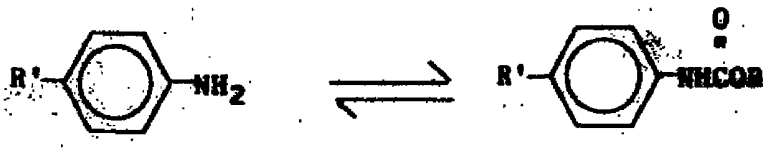
- viser en kovalent eller coulombisk binding under forhold hvor en forbindelsesgruppe er til stede; og

P, x, *, M, T, e, y, C', C", g, k, f og h er som tidligere definert her; og med den forutsetning at M opprettholder sin effektivitet.

For syntesene ovenfor av tette stjernedendrimerer (P) som har en funksjonell gruppe tilgjengelig for kobling (C' eller C") med en mål-dirigerende forbindelse (T), krever den foretrukne fremgangsmåte at den reaktive funksjon er beskyttet som et syntetisk forstadie. Denne beskyttelse foretrekkes fordi det tillater syntesen av dendrimeren eller konjugatene å bli av meget høy kvalitet. Denne fremgangsmåte tillater at kjemisk binding av en enhet av båret farmasøytisk materiale (M) til de terminale funksjonelle grupper i den tette stjernedendrimeren (M) til de terminale funksjonelle grupper i den tette stjernedendrimer (P) på måter som på annet vis ville resultere i en reaksjon med en forbindelsesfunksjonell gruppe og på den måte gjøre det umulig å koble til den målsøkende dirigerende forbindelse (T). Den etterfølgende avbeskyttelse eller syntetiske omforming til den ønskede funksjonelle koblingsgruppe gjør det så mulig for det tette stjernekonjugatet å bli bundet til den målsøkende dirigerende forbindelse.

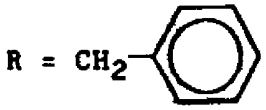
Én av de foretrukne "funksjonelle koblingsgrupper" (heretter referert til som et "håndtak") er en anilinforbindelse. Denne gruppe foretrekkes fordi den kan benyttes direkte for binding til den målsøkende dirigerende forbindelse eller den kan lett modifiseres til andre funksjonelle grupper som passer til reaksjon med den målsøkende forbindelse, f.eks. isotiocyanat, isocyanat, semitiokarbazid, semikarbazid, bromacetoamid og maleimid. Anilindelen foretrekkes også som et håndtak for kobling med den målsøkende forbindelse fordi den lett kan beskyttes når den brukes i tett stjernedendrimersyntese, eller nitrogruppen kan benyttes som et forstadium som kan overføres til den ønskede aminofunksjonen ved enden av syntesen.

Det er et antall beskyttelsesgrupper som passer for å beskytte anilinamino-funksjonen under tett stjernedendrimersyntese. (Se Theodora W. Green, Protective Groups in Organic Synthesis., publ. John Wiley & Sons, New York, 1981). En foretrukket klasse av beskyttelsesgrupper er karbamater vist nedenfor, hvori R' representerer en dendrimer.



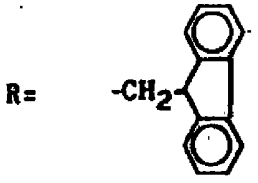
Mange karbamater er blitt benyttet for beskyttelse av aminer. De mest foretrukne karbamater for STARBURST®-syntese er t-butoksykarbamat, R = $-C(CH_3)_3$.

Avbeskyttelse oppnås ved hjelp av mild syrehydrolyse. Også foretrukket er benzylkarbamat-beskyttelsesgruppen,

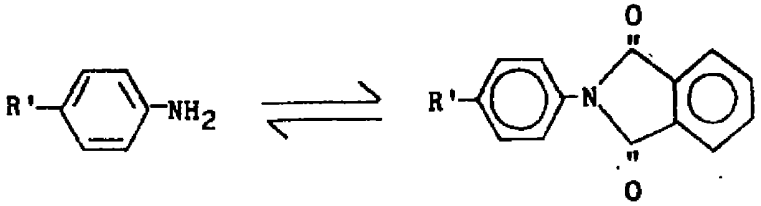


som foretrekkes når dendrimeren er følsom overfor syrehydrolyse. Avbeskyttelse oppnås ved hjelp av katalytisk hydrogenering.

Andre beskyttelsesgrupper som kan benyttes for å beskytte de reaktive delene i den ønskede generasjon omfatter 9-fluorenylmetylkarbamat

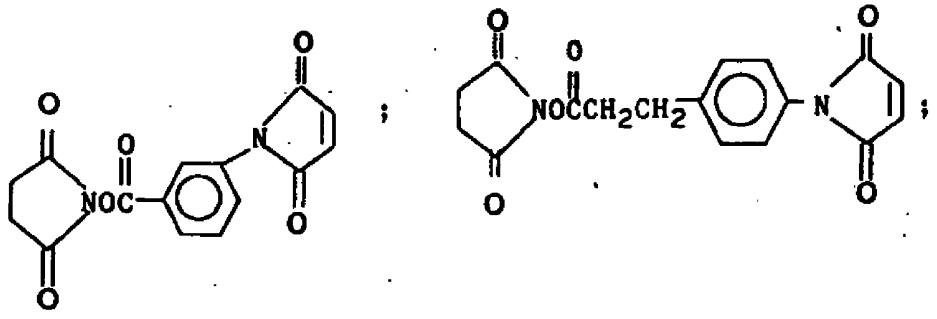


og ftalimid-beskyttelsesgruppen,



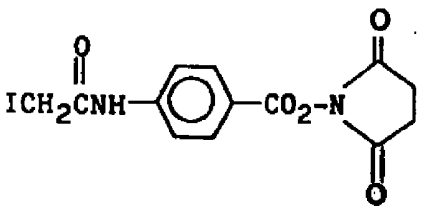
Andre beskyttelsesgrupper som benyttes for aminer som er velkjent i litteraturen kunne også benyttes i denne syntese. De preferanser som er nevnt ovenfor er utelukkende gitt som illustrasjon, men er ikke de eneste beskyttelsesgrupper som kan benyttes. Enhver beskyttelsesgruppe som er stabil under reaksjonsbetingelsene og kan fjernes uten å forandre integriteten av den tette stjernedendrimeren kan benyttes.

En alternativ prosess omfatter reaksjonen til et aktivert arylhalogenid, f.eks. 4-nitrofluorbenzen, 2,4-dinitrofluorbenzen, med en aminofunksjon på forbindelsen for konjugering, f.eks. tett stjerne-polyetyleniminer (PEI) og etterfølgende katalytisk hydrogenering av nitrogruppen til anilin-funksjonen for deretter konjugering. Det er spesielt anvendelig for forbindelser, f.eks. polyaminer, som trenger videre modifisering før anvendelse, på grunn av den relative kjemiske stabilitet til nitrofenyl-funksjonaliteten overfor alle ikke-reduserende reaksjonsbetingelser. Forskjellige koblingsreagenser som passer for konjugeringen er velkjente i feltet, f.eks. som diskutert i europeisk publisert søknad 0430863, publisert 5. juni 1991. De mer vanlige bifunksjonelle koblingsforbindelser, f.eks. aktive estere eller diisocyanater, som er reaktive under et stort antall reaksjonsbetingelser og som ville gjøre dem brukbare for konjugering, omfatter:



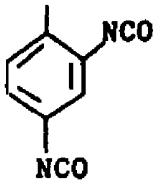
;

;



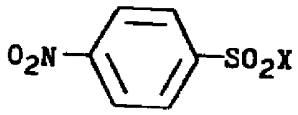
;

og



Oppfinnelsen omfatter også anvendelse av nitro-substituerte arylsulfonylhalogenider for å lage sulfonamider,

f.eks.

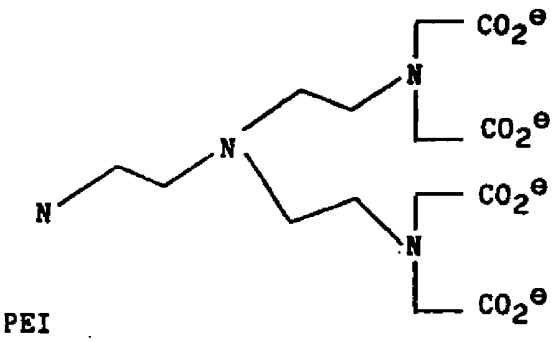


Fordelen når det gjelder denne fremgangsmåte over kjente prosesser når det gjelder å innføre en aminofenylgruppe for konjugering er at det finner sted i et senere trinn av syntesen. Gansow et al., US-paetnt 4.472.509, i sin fremgangsmåte innførte nitrofenyl-gruppen i det første trinnet av en lang syntetisk prosedyre, hvilket hadde begrensninger på den tilgjengelige kjemien.

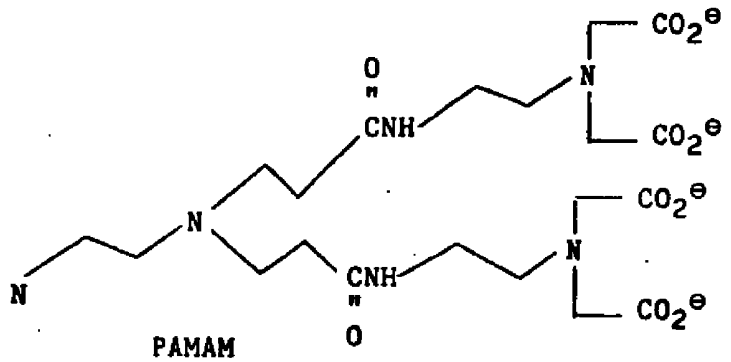
Denne fremgangsmåte innfører også et håndtak som klart kan skilles fra resten av molekylet. Manabe et al., beskriver at åpningen av ringen i ravsyreanhydrid med rest-aminer ga en koblingsgruppe gjennom hvilken konjugering til et antistoff var mulig. Denne fremgangsmåte ga imidlertid ingen mulighet for å differensiere mellom de ikke-cheleterte seter på polymeren, siden chelateringsgruppene var de samme som koblings-gruppen.

Den ovenfor nevnte fremgangsmåte kan innføre en aminofenyl-funksjon inn i enhver forbindelse som inneholder en aminogruppe som så konjugeres med bioaktiv forbindelse, f.eks. monoklonalt antistoff eller enzym. Forbindelsen kan konjugeres ved hjelp av oksydativ kobling til karbohydrater på den bioaktive forbindelse, f.eks. et antistoff. Aminofenyl-gruppen kan også overføres til et isotiocyanat eller isocyanat for etterfølgende reaksjon med aminogruppene på lysinrester på den bioaktive forbindelse.

Foreliggende fremgangsmåte omfatter også en direkte chelatering av lanthanider med STARBURST®-dendrimerer, fortrinnsvis med PEI-acetat-dendrimer. I motsetning hevder Denkewalter, US-patent 4.289.872 at det virker når kun acetater kobles til over-flaten av hans polymer. Imidlertid viser denne reaksjon at PEI-acetat virker meget bedre enn PAMAM, d.v.s. overflate av iminodiacetater er kun del av historien, også hvilken type skjelett, og forgrening er også meget viktig. PEI-acetatet har bedre chelateringsegenskaper enn PAMAM-acetat.



PEI



PAMAM

Blant de tette stjernekonjugater ifølge formel (IV) er slike foretrukket hvor M er et radionuklid, legemiddel, toksin, signalgenerator, signalreflektor eller signal-absorpsjonsforbindelse. Også foretrukket er de konjugater hvor x = 1. De konjugater hvor x, e, f, h og y hver er 1, og g er 1 eller mer og k er 2 eller mer foretrekkes spesielt. De konjugater hvor x, e, f, h, y og g hver er 1, k er 2 eller mer foretrekkes mest. De tette stjernekonjugater hvor T representerer et monoklonalt antistoff eller et epitop-bindingsfragment av dette foretrekkes også; likeledes de hvor M representerer en bioaktiv forbindelse slik som et radionuklid, legemiddel, toksin, og T er en mål-dirigerende forbindelse slik som et antistoff, monoklonalt antistoff eller antistoff-fragment, virusfragment, enkeltkjedet DNA, en polynukleinsyre, et gen-fragment, eller T er ikke til stede.

De tette stjernekonjugater kan benyttes for mange in vitro eller in vivo diagnostiske anvendelser slik som radioimmunoassays, elektronmikroskopi, enzym-bundet immunoadsorpsjonsmetoder, nukleær magnetisk resonansspektroskopi, kontrastbildedannelse, og immunoscintigrafi, i analytiske anvendelser, i terpeutiske anvendelser som bærer for antibiotika, radionuklider, legemidler eller andre forbindelser som passer for anvendelse i behandling av sykdommer såsom kreft, autoimmunsykdommer, genetiske defekter, sentralnervesystemsykdommer, infektiøse sykdommer, og hjertesykdommer; i biologiske kontrollerte anvendelser som et middel for å avlevere pesticider, f.eks. herbicider, fungicider, frastøtende forbindelser, tiltrekkende forbindelser, antimikrobielle eller andre toksiner; eller benytte som startmateriale for å lage andre nyttige forbindelser.

Tette stjernekonjugat-komposisjoner hvor de tette stjernekonjugatene formuleres med andre passende bærere. De tette stjernekonjugat-sammensetningene kan valgfritt inneholde andre aktive bestanddeler, tilsetningsstoffer og/eller fortynningsmidler. Blandinger for injeksjon av foreliggende oppfinnelse kan enten være suspensjon eller løsning. I løsning blir komplekset oppløst i en fysiologisk aksepterbar bærer. Slike bærere omfatter en passende løsning, tilsetningsstoffer slik som benzylalkohol, hvis nødvendig, og buffere. Anvendbare løsninger omfatter, f.eks. vann, vandige alkoholer, glykoler og fosfonat- eller karbonatestere. Dendrimer-legemiddelkonjugatet kunne også inkorporeres i vesikler eller liposomer. Konjugatet kunne også bli kapslet inn i polymert vertssystem slik at det enten kan degraderes (f.eks. melke-glykolsyre-kopolymerer eller en polyanhydrid-polymer) eller ikke nedbrytes (etylen/vinylacetat-kopolymer). Konjugatet kan også bli innbygget i en hydrogelmatriks som omfatter enten poly(hydroksyletylmetakrylat) eller poly(vinylalkohol). En rekke tarmeffektive overflatesystemer kan benyttes for å hjelpe dendrimer-legemiddelkonjugatet til å komme gjennom maven.

Dendrimer-legemiddel-konjugatet kunne formuleres til en tablett ved bruk av bindemidler kjent av fagfolk. Slike doseformer er beskrevet i Remington's Pharmaceutical Science, 18. utg. 1990, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania. Passende tabletter omfatter komprimerte tabletter, sukkerbelagte tabletter, film-overtrukne tabletter, tarmbeskyttelses-tabletter, multiple komprimerte tabletter, kontrollerte avleveringstabletter, og lignende.

Tarm-overflatebehandlede tabletter er spesielt fordelaktig i utførelsen av foreliggende oppfinnelse. Tarm-overflater er slike som forblir intakte i maven, men som løser seg opp og frigjør innholdet av tabletten når den når tynntarmen. Formålet for en tarmoverflate er å forsinke frigjøringen av legemidlene som blir inaktivert av maveinnholdet, eller kan forårsake kvalme eller blødning ved å irritere maveslimhinnen. I tillegg kan slik overflate bli benyttet for å gi en enkel gjentatt-virkningseffekt hvor ytterligere legemiddel som er blitt lagt over tarmoverflaten frigjøres i maven, mens resten, som er beskyttet av overflatehinnen, blir frigitt lenger nede i tarmkanalen.

Virkningen av tarmoverflatene kommer av en forskjell i sammensetning av henholdsvis mave- og tarm-miljø med hensyn til pH og enzymer. Selv om det har vært gjentatte forsøk på å fremstille overflater som er gjenstand for tarm-enzym-nedbrytning, er denne fremgangsmåte ikke populær siden enzymatisk degradering av filmen er nokså langsom. Mesteparten av de vanligvis brukte tarmoverflater er således slike som forblir ikke-dissosiert ved lav pH i maven, men raskt ioniserer når pH øker til ca. 4 eller 5. De mest effektive tarmpolymerer er polysyrer som har pK på 3 til 5.

Anvendbare polymerer for fremstilling av tarmoverflate-behandlede tabletter omfatter celluloseacetatftalat, polyvinylacetatftalat, hydroksypropylmetylcelluloseftalat, metakrylsyreester-kopolymerer og lignende.

I jordbruksforbindelser som omfattes av oppfinnelsen, kan de tette stjernekonjugater formuleres med passende bærere som er nyttig i landbruket slik som behandling av avlinger eller beiteland, eller som pesticider eller behandling av in vivo eller in vitro utprøving på dyr. En landbruksmessig aksepterbar bærer eller fortynner som også kan være til stede med én eller flere tette stjernekonjugater av den foreliggende oppfinnelse omfatter de bærere eller fortynningsmidler som vanligvis benyttes i granulære formuleringer, emulgerende konsentrater, løsninger eller suspensjoner slik som f.eks. toluen, xylen, benzen, fenol, vann, metan, hydrokarboner, naftalen og lignende.

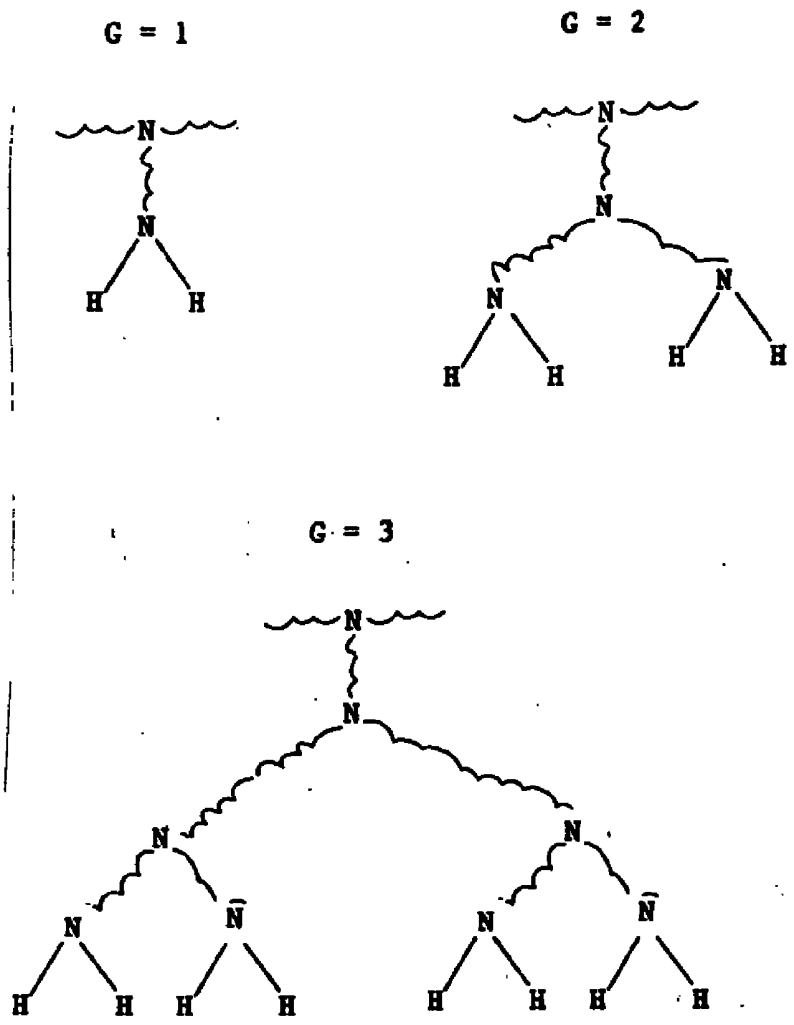
Den foretrukne tette stjernepolymer for anvendelse i de tette stjernekonjugatene beskrevet i oppfinnelsen er en polymer som kan beskrives som en tett stjernepolymer som har minst én gren (heretter kalt en kjernegren), fortrinnsvis to eller flere grener, som går ut fra en kjerne, idet nevnte gren har minst én terminal gruppe forutsatt at (1) forholdet mellom terminale grupper til kjernegrener er mer enn én, fortrinnsvis 2 eller større, (2) tettheten av de terminale grupper pr.
volumenhet i polymeren er minst 1,5 ganger den av en utvidet vanlig stjernepolymer som har en lignende kjerne og monomere forbindelser og en sammenlignbar molekylvekt og et antall av kjernegrener, hver av slike grener i den utvidede konvensjonelle stjernepolymer har kun én terminal gruppe, og (3) et molekylært volum som ikke er mer enn ca. 80% av det molekylære volum av nevnte utvidede konvensjonelle stjernepolymer som bestemt ved dimensjonsstudier ved bruk av graderte Corey-Pauling-Koltun (CPK) molekylære modeller. Som benyttet her betyr betegnelsen "tett" som den står til "stjernepolymer" eller "dendrimer" at den har et mindre molekylvolum enn en utvidet konvensjonell stjerne-polymer som har den samme molkylvekt. Den utvidede konvensjonelle stjernepolymer

som er benyttet som basis for sammenligning med den tette stjernepolymer er én som har den samme molkylære vekt, samme kjerne og monomere komponenter og samme antall av kjernegrener som den tette stjernepolymer. Med "utvidet" betyr det at de individuelle grener i den konvensjonelle stjernepolymeren utvides eller strekker seg til sin maksimale lengde. I tillegg mens antallet av terminale er større for det tette stjernepolymermolekylet enn i det konvensjonelle stjernepolymermolekyl, er den kjemiske struktur til de terminale grupper de samme.

Dendrimerer som benyttes i konjugater i foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ved hjelp av fremgangsmåter kjent i feltet. De ovenfor nevnte dendrimerer, de ulike medreaktanter og kjerneforbindelser, og fremstilling av disse kan være som definert i US-patent 4.587.329. F.eks. kan kjerneforbindelser være alt på hvilke andre grupper kan bli bundet [se fig. 1 og 2(B)].

Dendrimerene som anvendes i konjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse, kan ha terminale grupper som er tilstrekkelig reaktive slik at de undergår påkobling eller substitusjonsreaksjoner. Eksempler på slike terminale grupper omfatter amino, hydroksy, merkapto, karboksy, alkenyl, nitril, allyl, vinyl, amido, halogen, urea, oksiranyl, aziridinyl, oksazolin, imidazolinyl, sulfat, silanyl, fosfonat, kroneetere, bipyridiner, klormetylfenyl, isocyanat og isotiocyanat. De terminale grupper kan modifiseres til å bli biologisk uvirksomme, f.eks. å lage dem ikke-immunogene og unngå ikke-spesifikt opptak i lever, milt eller andre organer, f.eks. ved bruk av polyetylenglykol (PEG) eller polyacylpolyalkylenimin (d.v.s. polyacylpolyetylenimin)-grupper av varierende lengde som er bundet til dendrimeroverflaten. Dendrimerene varierer fra konvensjonelle stjerne eller stjerneforgrenede polymerer ved at dendrimerene har en større konsentrasjon av terminale grupper pr. enhet molekylvolum enn utvidede stjernepolymerer som har et likt antall av kjernegrener og en lik kjernegren-lengde. Således er tettheten av terminale grupper pr. volumenhet i dendrimeren vanligvis minst 1,5 ganger tettheten til terminale grupper i de konvensjonelt utvidede stjernepolymerer, fortrinnsvis minst 5 ganger, helst minst 10 ganger og aller helst fra 15 til 50 ganger. Forholdet av terminale grupper pr. kjernegren i den tette polymer er fortrinnsvis minst 2, vanligvis minst 3 og helst fra 4 til 1024. Det er ønskelig for en gitt polymermolekylvekt, at molekylvolumet av den tette stjernepolymer er mindre enn 70 vol%, mer ønskelig fra 16 til 60, og helst fra 7 til 50 vol% av molekylvolumet av den konvensjonelle utvidede stjernepolymer.

Foretrukne dendrimerer for anvendelse i konjugatene i denne oppfinnelse er karakteriserte ved å ha en univalent eller polyvalent kjerne som er kovalent bundet til dendrittiske grener. En slik ordnet forgrening kan illustreres av den følgende sekvens hvor G viser antall generasjoner:



Den presise sekvensering som inngår i fremstillingen av dendrimerene leder til presise, forutsigbare matematiske støkiometrier innenfor hvert dendrimermolekyl. F.eks. er antallet gjentatte enheter inne i en dendrimer avhengig av antallet generasjoner (G), multiplisiteten av den repeterte enhet (N), og multiplisiteten til kjernemolekylet eller kjerneatomet (N_c). I en homopolymer-dendrimer, hvor den samme repeterende enhet benyttes gjennom molekylet, er det totale antall av repeterte enheter i en dendrimer, dets grad av polymerisering (DP), gitt ved:

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

Den totale valens eller antall terminale enheter på dendrimeren (Y) er gitt ved:

$$Y = N_c N_r^G$$

Det er ofte lettere eller intuitivt å betrakte antall terminale grupper på dendrimeren (Z) fordi hver gruppe kan inneholde mange valenser eller et bestemt antall valenser som varierer i etterfølgende kjemiske modifikasjoner. Derfor blir antallet terminale grupper definert ved:

$$\text{\# terminale grupper pr. dendrimer (Z)} = \frac{N_c N_f^G}{\text{multiplisitet terminal gruppe}}$$

Dette kan illustreres av den amin-terminale gruppe, som har en multiplisitet på 2 i polyaminsyntese, i dette tilfelle er

$$\text{\# terminale grupper pr. dendrimer (Z)} = \frac{N_c N_r^G}{2}$$

For videre modifiseringer av dendrimerer, er dette tall lettere å benytte fordi valensen til amingruppen avhenger av kjemien som benyttes. F.eks. vil en primær amin-endegruppe reagere lett med kun ett molekyl ester til å danne et amid med to molekyler av alkylerende forbindelse (under milde betingelser, f.eks. Eschweiler-Clarke-betingelser) slik at det dannes et tertiært amin, eller med tre molekyler av alkylerende forbindelse (under mer rigorøse betingelser, f.eks. reaksjon med alkylsulfonater) til å danne et kvaternært aminsalt.

Følgelig kan dendrimerene ifølge denne oppfinnelse representeres med hensyn til komponentdeler som følger:

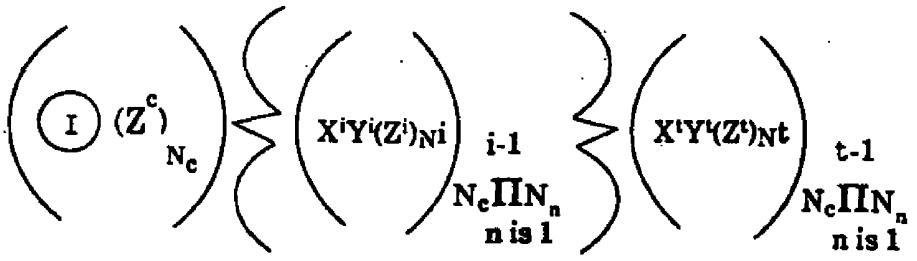
$$\text{Kjerne}\left\{\left(\text{(Repetert enhet)}\left(\text{Terminal del}\right)_{\frac{N_r^G-1}{N_r-1}}^{N_r^G}\right)^{N_c}\right.$$

hvor kjernen (I) er et startmolekyl eller atom; terminal del er atomet, molekyl eller en funksjonell gruppe som opptar bindingssetene av den repeterte enhet, f.eks. hydrogen eller metoksygruppe av en ester; G og N_c er definert tidligere; og den repeterte enhet har en valens eller funksjonalitet på $N_r + 1$, hvor N_r er som definert ovenfor.

En kopolymer-dendrimer som er en foretrukket dendrimer med hensyn til denne oppfinnelse er en enestående forbindelse konstruert av polyfunksjonelle monomere enheter i en sterkt forgrenet (dendrittisk) rekke. Dendrimermolekylet fremstilles fra en polyfunksjonell startenhet [kjerneforbindelse, kjerne (I), polyfunksjonelle repeterende enheter og terminale enheter som kan være de samme eller forskjellig fra de repeterende enheter. Kjerneforbindelsen representeres av formelen (I) $(Z^c)_{Nc}$ hvori kjerne (I) representerer kjernen, Z^c representerer bindingssetene som er tilgjengelige i kjernen (I) og N_c representerer kjernefunksjonaliteten eller antall bindingsseter, som fortrinnsvis er 2 eller fler, helst 3 eller fler. Således omfatter dendrimermolekylet en polyfunksjonell kjerne, (I), bundet til et antall (N_c) funksjonelle grupper, Z^c, hver av disse forbundet til den monofunksjonelle hale av den repeterende enhet, $X^1Y^1(Z^1)_N1$, av den første generasjon og hver av Z-gruppene av den repeterende enhet av én generasjon er bundet til en monofunksjonell hale av en repeterende enhet av den neste generasjon til det endelige belte eller lag er nådd.

I dendrimermolekylet er de repeterende enheter de samme innenfor en enkel generasjon, men kan variere fra generasjon til generasjon. I den repeterende enhet $X^1Y^1(Z^1)_N1$, representerer X^1 den monofunksjonelle hale av den første generasjon repeterende enhet, Y^1 representerer delen som utgjør den første generasjon, Z^1 representerer et bindingssete på det polyfunksjonelle hode av den repeterende enhet av første generasjon og kan være den samme eller forskjellig fra bindingssetene av kjerneforbindelsen (I) $(Z^c)_{Nc}$ eller andre generasjoner; og N^1 er et tall på 2 eller mer, helst 2, 3 eller 4, hvilket representerer multiplisiteten av det polyfunksjonelle hode av den repeterende enhet i den første generasjon. Generisk er den repeterende enhet vist ved formel $X^iY^i(Z^i)Ni$, hvori "i" representerer den spesielle generasjon fra den første til t-1 generasjon. Således er i det foretrukne dendrimermolekylet, hver Z^1 av første generasjon repeterende enhet bundet til den X^2 av en repeterende enhet av annen generasjon o.s.v. gjennom generasjonene slik at hver Z^i-gruppe av en repeterende enhet $X^iY^i(Z^i)_Ni$ i generasjon nr. "i" er forbundet til halen (X^{i+1}) av den repeterende enhet i generasjonstallet "i+1". Det endelige eller terminale belte av et foretrukket dendrimermolekyl omfatter terminale enheter, $X^tY^t(Z^t)_Nt$ hvori t representerer en terminal enhet og X^t, Y^t, Z^t og N^t kan være den samme som eller

forskjellig fra X^i, Y^i, Z^i og N^i bortsett fra at det er ingen etterfølgende generasjon bundet til Z^t-gruppene og N^t kan være mindre enn to, f.eks.
null eller én og alle disse terminale enhetene, $X^tY^t(Z^t)_Nt$, trenger ikke være identisk med hverandre. Derfor har den foretrukne dendrimer en molekylformel representert ved



hvori i er 1 til t-1; symbolene er som tidligere definert.
Π-funksjonen er produktet av alle verdiene mellom sine definerte grenser. Således

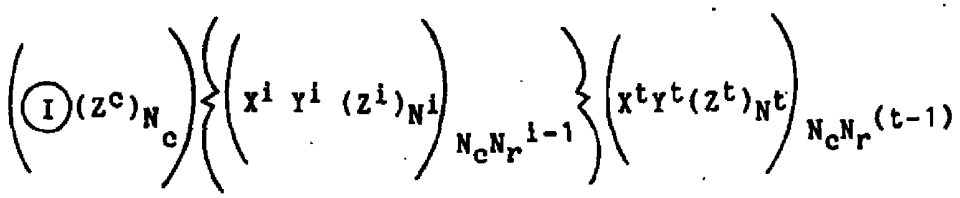
$$\prod_{n=1}^{i-1} N^n = (N^1)(N^2)(N^3)...(N^{i-2})(N^{i-1})$$

som er antallet repeterende enheter, $X^iY^i(Z^i)_Ni$, hvilket omfatter den i'te generasjon av én dendrittisk gren

og når i er 1, så er $\prod_{n=1}^{0} N^n = 1$

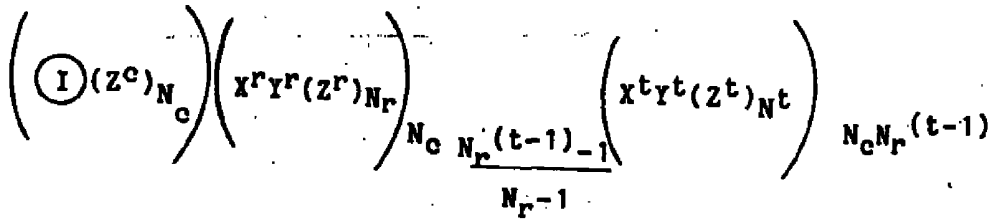
I kopolymere dendrimerer, varierer den repeterte enhet for én generasjon fra den repeterte enhet i minst én annen generasjon. De foretrukne dendrimerer er meget symmetriske som illustrert i strukturformler beskrevet nedenunder. Foretrukne dendrimerer kan overføres til funksjonaliserte dendrimerer ved kontakt med et annet reagens. F.eks. overføring av hydroksyl i det terminale lag eller belte til ester ved hjelp av reaksjon med et syreklorid som gir som resultat en ester som terminal funksjonell dendrimergruppe. Denne funksjonalisering må ikke utføres til det teoretiske maksimum som definert ved antall av tilgjengelige funksjonelle grupper og, en funksjonalisert dendrimer trenger ikke å ha en høy symmetri eller en presis definert molekylformel som i tilfelle med den foretrukne dendrimer.

I en homopolymer dendrimer, er alle de repeterte enhetene $X^iY^i(Z^i)_Ni$ identiske. Siden verdiene av alle N^i er like (definert som N_r) reduserer produktfunksjonen som representerer antallet repeterte enheter til en enkel eksponensiell form. Derfor kan den molekylære formel uttrykkes på en enkel måte som:

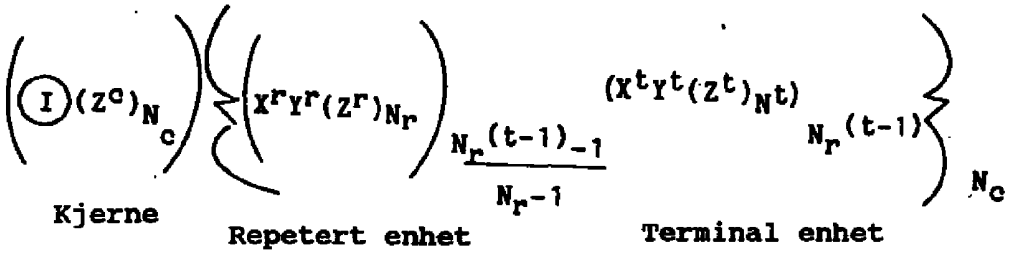


hvor i = 1 til t-1

Denne form viser fremdeles forskjellen mellom de ulike generasjoner i, som hver består av $N_cN_r^{(i-1)}$ repeterende enheter, $X^iY^i(Z^i)_{Ni}$. Kombinasjon av generasjoner til ett uttrykk gir:



eller



hvori $X^rY^r(Z^r)_{Nr}$ er en repeterende enet som benyttes i alle generasjoner i. Denne formen er i det vesentlige den samme som på side 39, linje 5 med G = t-1.

Hvis en polymerforbindelse vil passe inn i disse ovenfor beskrevne formler, så er følgelig polymeren en tett stjernepolymer. Omvendt hvis en polymerforbindelse ikke vil passe inn i disse formlene, så er polymeren ikke en tett stjernepolymer. Også for å bestemme hvorvidt en polymer er en tett stjernepolymer, er det ikke nødvendig å kjenne fremgangsmåten som den er fremstilt ved, men kun undersøke hvorvidt den passer formlen. Formlen viser også generasjonene (G) eller lagdelingene av dendrimerene.

Den foregående matematiske formel er basert på referanse til den første gjentagelse av reaksjoner rundt kjernereaktanten som generasjon 1. Således ville for en polyamidoamin tett stjernedendrimer, reaksjonsproduktet av metylakrylat med ammoniakk-

kjerne bli referert til som generasjon 0,5 og det etterfølgende reaksjonsprodukt EDA med metylakrylat ville bli referert til som generasjon 1,0.

Som en variasjon av nomenklaturen, blir den første gjentagelse referert til som generasjon 0 istedenfor generasjon 1. Reaksjonsproduktet av metylakrylat med ammoniakk-kjerne ville bli generasjon -0,5, og det etterfølgende reaksjonsprodukt av EDA med metylakrylat ville være generasjon 0. Under denne alternative nomenklatur, ville alle generasjonstallene benyttet andre steder i søknaden, bli redusert med 1.

Under denne reviderte nomenklatur blir formlen for polymeriseringsgraden (DP):

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

Formlen for antallet terminale forbindelser på dendrimeren (Y) er:

$$Y = N_c N_r G$$

hvor Y kan overføres til Z (antall terminale grupper/dendrimer) ved å dele ved hjelp av antallet terminale grupper som beskrevet tidligere.

Antallet dendrimere gren-celler (N_{BC}) uttrykkes som følger:

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

Den teoretiske molare masse (M) kan så uttrykkes:

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

or

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

hvor Mc er den molare masse av startkjernen, M_{RU} er den molare masse av repeterende enheter, M_{BC} er den molare masse av de grenede cellene og M_t er den molare masse av de terminale enheter.

Det er flere måter å bestemme forholdet mellom forbindelse (M) til dendrimer (P) som avhenger av hvordan og hvor koblingen mellom P*M opptrer. Når det er en indre innkapsling, blir vektforholdet M:P vanligvis 10:1, fortrinnsvis 8:1, mer ønskelig 5:1, helst 3:1. Forholdet kan være så lavt som 0,5:1 til 0,1:1. Når den indre støkiometri benyttes, er vektforholdet M:P det samme som for indre innkapsling. Når den ytre støkiometri bestemmes, er mol/molforholdet av M:P gitt av den følgende formel:

	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

hvor N_c betyr kjernemultiplisitet, N_t betyr gjennomsnittlige terminale gruppe-antall og N_r betyr antall forgreninger. Uttrykket $N_c N_t N_r^{t-1}$ vil gi antall terminale deler. F.eks. kan (A) ovenfor være et resultat når proteiner, enzymer eller sterkt ladede molekyler er på overflaten; (B) ovenfor, når det er aspirin, 2,4-D eller oktansyre; (C) når overflate-ester-grupper overføres til karboksylat-ioner eller grupper.

Andre strukturer av forskjellige dimensjoner kan selvfølgelig lett fremstilles av en fagmann ved å variere dendrimerkomponentene og antall generasjoner. En grov sammenligning av tre forskjellige dendrimerserier relativt til et IgG-antistoff er vist i fig. 3. Serien tegninger som er vist i fig. 3(B)I viser de tette stjerne-polyamidoaminene (PAMAM); hvor II viser de tette stjernepolyetere (PE); og III viser de tette stjerne-polyetyleniminer (PEI). På en måte som ligner den i fig. 1, har alle tre seriene (I, II og III) i deres venstre tegningsdel vist startkjernen, den neste tegning fra venstre viser stjerne-grenoligomeren og de gjenværende tegninger viser tette stjerneoligomerer og henholdsvis tett stjerne-brobygget dendrimer. Det kan sees at i de serier tegninger er dendrimer-dimensjonene nær til og faktisk mindre enn de som var bemerket for hele IgG-antistoffet fig. 3(A). IgG-antistoffet er vist helt til venstre i fig. 3. Skalaen er 1 mm = 1,5Å. I fig. 3(A) er det variable område vist ved (A); det konstante område ved (B); og karbohydrat-bindingssetene ved (C). Passende målinger vist på fig. 3 følger: (1) er 35-40Å; (2) er 70Å; og (3) er 60Å. Disse dimensjonene foretrekkes f.eks. hvor målsøking omfatter utvandring fra karsystemet. Derfor er dendrimerdiametere på 125Å enheter eller mindre spesielt foretrukket fordi de kan tillate utvandring fra karsystemet til målsøkte organer som betjenes av kontinuerlige eller fenestrerte kapillærer. Disse dimensjonene er viktige ved at de er små sammenlignet med størrelsen av en spesiell målsøkende komponent slik som et antistoff (se fig. 3). En lineær polymer av tilsvarende molekylvekt ville ha en gyrasjons-radius, (i sin fullt utviklede form), som ville være meget større enn den samme molekylvektdendrimeren. En lineær polymer av denne type ville forventes å påvirke på en uheldig måte de molekylære gjenkjennelsesegenskaper til mange aksepterte målsøkende

forbindelser. Det er også ønskelig at konjugatene er av minimums molekylvolum slik at de ikke vanskeliggjør utvandring fra årene, f.eks. ved kobling av Fab, Fab', Fab'_2 eller enkeltkjede eller deler av disse, eller andre passende antistoff-fragmenter til lavmolekylært volum dendrimerer.

Dendrimerer ønskelig for avlevering av radionuklider eller sterke paramagnetiske metall-ioner til svulst-seter på grunn av deres evne til å chelatere et antall metall-ioner i et lite romvolum. Kobling av antistoffer eller antistoff-fragmenter som er spesifikke for svulster kan avgi et antall metaller pr. antistoff, med kun én modifisering av antistoffet.

Kobling av mål-regulerende forbindelser til dendrimerer er et annet område av den foreliggende oppfinnelse. I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen, spesielt der hvor det er ønskelig å benytte et antistoff som mål-regulerende forbindelse, kan en reaktiv funksjonell gruppe slik som karboksyl, sulfhydryl, reaktivt aldehyd, reaktivt olefin-derivat, isotiocyanat, isocyanat, amino, reaktivt arylhalogenid eller reaktivt alkylhalogenid med letthet bli benyttet på dendrimeren. De reakative funksjonelle grupper kan innføres på dendrimeren ved bruk av kjente fremgangsmåter, f.eks.:

(1) Anvendelse av en heterofunksjonell start (som startmateriale for å syntetisere dendrimeren) som har innbygget i seg funksjonelle grupper med ulik rekativitet. I en slik heterofunksjonell starter vil minst én av de funksjonelle grupper tjene som et startsted for dendrimerdannelse og minst én av de funksjonelle grupper vil være tilgjengelig for kobling til en mål-regulerende forbindelse men ikke kunne starte dendrimersyntesen. F.eks. anvendelse av beskyttet anilin tillater videre modifisering av NH_2-grupper i molekylet, uten å reagere anilin NH_2.

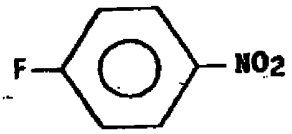
Den funksjonelle gruppe som vil være tilgjengelig for kobling til en mål-regulerende forbindelse kan være en del av startmolekylet i én av tre former; nemlig:

(a) i den form hvor det vil bli benyttet for kobling til den mål-regulerende forbindelse. Dette er mulig når ingen av syntesetrinnene omfattet i dendrimersyntesen kan føre til reaksjon i dette senter.

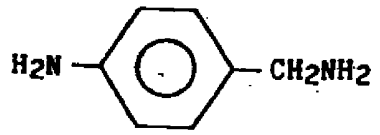
(b) Når den funksjonelle gruppe som benyttes som kobling til den mål-regulerende forbindelse er reaktiv i syntesetrinnene som omfattes av dendrimersyntesen, kan den beskyttes ved bruk av en beskyttelsesgruppe, som gjør gruppen ikke-reaktiv overfor synteseprosessen, men som selv kan fjernes lett på en måte som ikke forandrer integriteten til den gjenværende del av makromolekylet.

(c) I den situasjon at ingen enkel beskyttelsesgruppe kan dannes for den reaktive funksjonaliteten som benyttes for binding med den mål-regulerende forbindelse, kan et syntetisk forstadium benyttes som ikke er reaktivt i de syntetiske prosesser som benyttes i dendrimersyntese. Når syntesen er fullført må denne funksjonelle gruppe lett kunne overføres til den ønskede koblingsgruppe på en måte som ikke forandrer integriteten til den gjenværende del av makromolekylet.

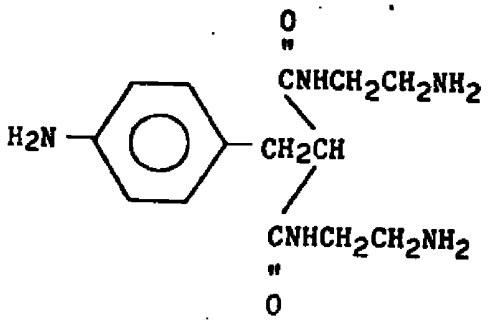
(2) Når den ønskede reaktive funksjonelle gruppe kobles (kovalent) på en foretrukket dendrimer, må det anvendte reagens inneholde en funksjon som gjør at det reagerer lett med de terminale funksjonelle gruppene på dendrimeren. Den funksjonelle gruppe som til syvende og sist benyttes for å binde til den målsøkende forbindelse kan være i sin endelige form, som en beskyttet funksjonalitet, eller som et syntetisk forstadium. Formen som den påkoblede funksjonelle gruppe benyttes i avhenger av dens integritet under den syntetiske fremstilling og evnen til det endelige makromolekyl å stå imot betingelser som er nødvendige for å gjøre denne gruppen tilgjengelig for kobling. Eksempler på passende koblingsforbindelser kan finnes i feltet, f.eks. europeisk publiserte søknad 0430863, publisert 5. juni 1991. F.eks. benytter den foretrukne anvendelse for PEI



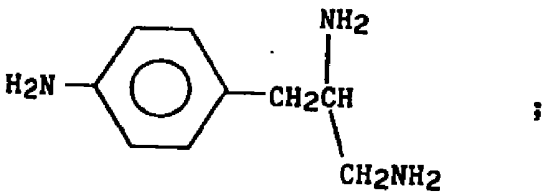
Eksempler på heterofunksjonelle startere for anvendelse i (1) ovenfor, omfatter de følgende illustrerende eksempler:



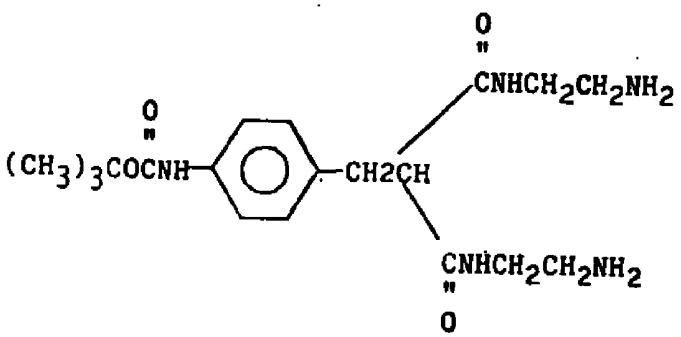
;



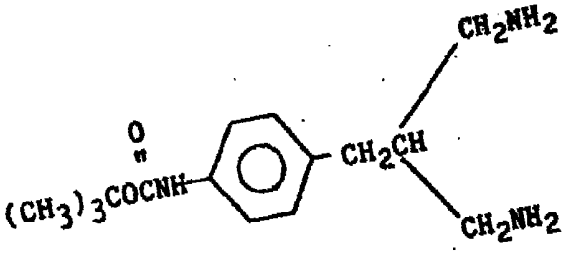
;

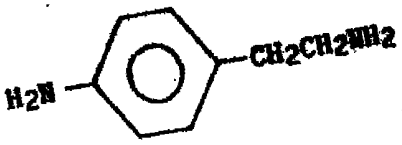


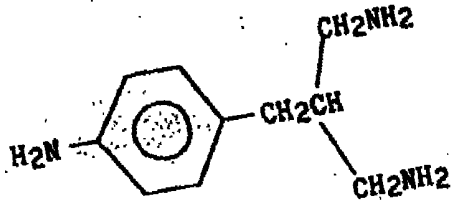
;

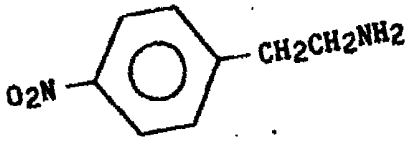


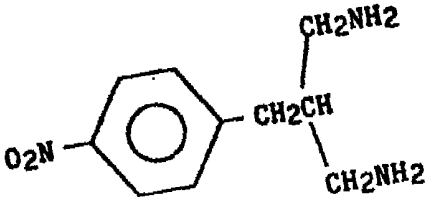
;

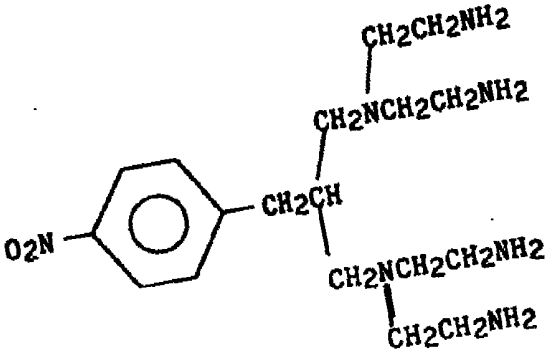












Der er flere kjemier som er av spesiell viktighet:

1) tett stjerne eller STARBURST® polyamidoaminer ("PAMAM") kjemi;

2)tett stjerne eller STARBURST® polyetyleniminer ("PEI") kjemi;

3)tett stjerne eller STARBURST® PEI-forbindelse med overPAMAM-overflate;

4)tett stjerne eller STARBURST® polyeter ("PE") kjemi.

Modifikasjoner av dendrimeroverflatens funksjonelle grupper kan gi andre funksjonelle grupper slik som de følgende:

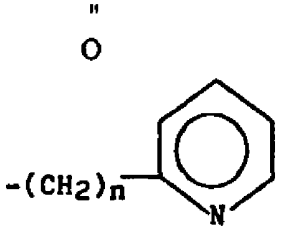
$-OPO_3H_2$, $-PO_3H_2$, $-PO_3H^{(-1)}$, $-PO_3^{(-2)}$, $-CO_2^{(-1)}$, $-SO_2H$,

$-SO_2^{(-1)}$, $-SO_3H$, $-SO_3^{(-1)}$, $-NR^1R^2$, $-R^5$, $-OH$, $-OR^1$,

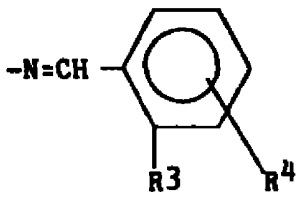
$-NH_2$, polyetere, perfluorert alkyl, $-CNHR^1$, $-COH$,



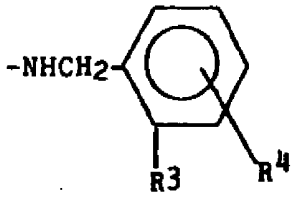
acetat ($-OCCH_3$),



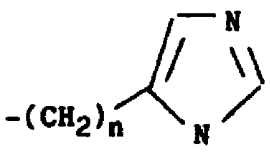
,



,



,

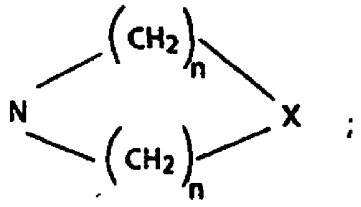


,

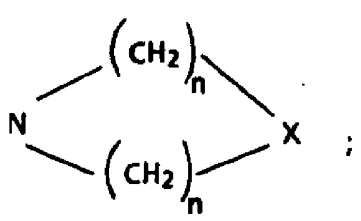
hvori:

R representerer alkyl, aryl eller hydrogen;

R^1 representer alkyl, aryl, hydrogen eller



R^2 representerer alkyl, aryl eller



R^3 representerer -OH, -SH, $-CO_2H$, $-SO_2H$ eller $-SO_3H$;

R^4 representerer alkyl, aryl, alkoksy, hydroksyl, merkapto, karboksyl, nitro, hydrogen, brom, klor, jod eller fluor;

R^5 representerer alkyl;

X representerer NR, O eller S; og

n representerer tallet 1, 2 eller 3;

polyetere eller andre immuno-ufølsomme forbindelser,

karakteristisk for alle ovenfor er at alkyl er et lineært eller forgrenet C_1-C_{18}-hydrokarbon og aryl er en benzyl eller naftylgruppe som kan substitueres med én eller flere C_1-C_4-alkyl, brom, klor, jod, fluor eller trifluormetyl-forbindelser.

Valget av funksjonelle gruppe avhenger av den spesielle ende-anvendelse som dendrimeren er bygget for. F.eks. en dendrimer som har 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraeddisyre (DOTA) eller 1,4,7-tris(karbometoksymetyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (DO3A metylester) som funksjonell gruppe kan benyttes som bærere for magnetisk resonans- bildedannelse eller nukleære magnetiske resonansforbindelser.

Disse funksjonaliserte dendrimerer fremstilles, f.eks. ved å reagere den funksjonelle gruppe, slik som en DO3A metylester, med et epoksyd eller epoksyd-substituert med en C_1

-C_{18}-alkylgruppe til å danne et hydroksyetylert produkt. Det hydroksyetylerte produkt reageres med en koblingsforbindelse, slik som dicykloheksylkarbodiimid (DCC), og så reageres med en PAMAM tett stjernepolymer. En dendrimer som har DOTA som funksjonell gruppe kan fremstilles ved å anvende en isotiocyanat-derivatisert DOTA, slik som 1-[1-karboksy-3(4'-isotiocyanatfenyl)propyl]-4,7,10-tris(karboksymetyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan med en PAMAM tett stjernepolymer. Andre passende chelateringsforbindelser kan tilsettes ved hjelp av syntetiske metoder. Når det ønskes kan et lanthanid-ion eller pseudolanthanid-ion bygges inn ved hjelp av konvensjonelle fremgangsmåter.

Kobling av antistoffene til dendrimerene er et annet område av foreliggende oppfinnelse. Vanligvis blir antistoffene eller antistoff-fragmentene bundet til dendrimeren ved hjelp av teknikker som er velkjente i feltet. f.eks. kobling mellom en funksjonell gruppe på dendrimeren og forbindelsene slik som karbohydrat, amino, karboksyl eller sulfhydrylfunksjonsgrupper til stede i antistoffet eller antistoff-fragmentet. I noen tilfeller kan forbindelsesgrupper benyttes som forbindelsesledd mellom dendrimeren og antistoffer eller antistoff-fragmentet. Bindingen av dendrimeren til antistoffet eller antistoff-fragmentet bør utføres på en måte som ikke i vesentlig grad interfererer med immunreaktiviteten til antistoffet eller antistoff-fragmentet, d.v.s. ved å binde antistoffet eller antistoff-fragmentet via en funksjonsgruppe i antistoffet eller antistoff-fragmentet som ikke er en del av antigen-gjenkjennelses- og bindingssete.

PRESENTASJON OG TRANSFEKSJON AV GENETISK MATERIALE

A. Innføring

Overføring av genetisk materiale til celler har mange potensielle anvendelser som terapeutisk og/eller diagnostiske forbindelser innenfor medisin. Genetisk materiale kan transfekteres, og deretter transkriberes og uttrykkes, for å lage nye proteiner i cellene, derved erstattes enten gale proteiner eller manglende proteiner forårsaket av genetisk feil. I tillegg kan mindre deler genetisk materiale inklusive enten DNA eller RNA, transfekteres inn i celler for å virke som enzymer som kan forandre cellefunksjon eller behandle spesifikke budskaps RNA'er for å rette andre typer genetiske feil. Syntetisk genetisk materiale, slik som modifiserte former av antisens oligonukleotider, kan overføres til celler for å blokkere produksjon av spesifikke proteiner. Dette kan være nyttig for å undertrykke celler som vokser abnormt, slik som kreftceller, eller for å forandre normale cellefunksjoner, slik som immunsuppresjon før organtransplantasjon. Mindre deler genetisk materiale, slik som aptimerer, kan også fungere som legemidler, og overføringen av disse former av nukleinsyrer kan forandre spesifikt cellulære funksjoner på en måte som ligner legemidler.

Den viktigste del av genoverførings-legemidler utgjøres av bæreren eller presentasjonsmodellen gjennom hvilken det genetiske materiale overføres til celler.

Overføringen er en komplisert prosess som omfatter en rekke trinn. Den første funksjon av bæreren er å binde og beskytte DNA fra hydrolyse eller enzymatisk spaltning. Bæreren må så underlette overføringen av det genetiske materiale til cellen. Når det er inne i cellen skulle bæreren beskytte DNA fra degradering i endosomer og dirigere materialet til spesifikke deler av cellen. Disse deler kan omfatte kjernen, enten for innbygging av genetisk materiale inn i kromosomene eller for forbigående ekspresjon av det transfekterte genetiske materiale gjennom transkripsjon og translasjon. I motsetning kan det være et krav når det gjelder transport til det cytoplasmatiske endoplasmatiske retikulum for funksjoner slik som ribosomforandring eller avbrytelse av proteinproduksjon gjennom anti-sens hemming. Når det genetiske materiale er i den rette del av cellen må det også frigjøres fra bæreren slik at det kan fungere. Således er evnen til å beskytte, overføre og tillate genetisk materiale å fungere avgjørende egenskaper til en passende bærer for genterapi.

Ved siden av de mange aktiviteter som bæreren av genetisk materiale må utføre, er det visse ting som er viktig å unngå i en bærer. Bæreren må ikke være immunogen og skulle ikke indusere et immunologisk svar overfor det bårede DNA hvis det tilføres in vivo. I tillegg skulle den ikke lage uløselige komplekser med DNA som hindrer tilføring eller evnen til å reagere effektivt med det cellulære mål, hvorvidt det er vevskultur eller i et individ. Det er viktig at bæreren ikke er toksisk til cellene in vitro eller til organismen in vivo, da dette markert vil redusere mengde materiale som kunne tilføres og kunne være potensielt farlig.

Det er to generelle former for overføring av genetisk materiale. Begge krever binding og beskyttelse av det genetiske materiale, overføring av genetisk materiale til celler og frigjøring av materiale for funksjonell aktivitet. Det er imidlertid en hovedforskjell mellom de to former for overføring. Én form benytter en bærer som binder ikke-spesifikt til celler gjennom ladning eller annen reaksjon, og overfører DNA til omtrent alle celler det treffer. Dette skjer in vitro eller in vivo i et begrenset rom, slik som et ledd. En bærer av denne type er spesielt viktig i terapier hvor celler transfekteres i vevsceller og gjen-innføres i et individ. Denne "ex vivo"-terapi er meget anvendbar i en rekke av ulike sykdoms-tilstander og krever at bæreren er meget effektiv i binding og overføring av det genetiske materiale til nesten alle celler som den treffer. Den andre type bærer målfører seg selv spesifikt til kun visse typer celler. En mål-dirigerende forbindelse koblet til denne bærer underletter den spesifikke virkningen mellom et mål på en celle og DNA bærerkomplekset som underletter opptaket i de målsøkte celler. Når denne bærer benyttes er ikke-spesifikk transfeksjon av celler uønsket fordi virkningen til det transfekterte genetiske materiale i ikke-målceller kan være ødeleggende. Mål-regulerende legemidler kan også øke transfeksjonen av celler in vitro for ex vivo terapi eller diagnose ved å øke bindingen og overføringen til celler. I dette tilfelle er bivirkningene av ikke-spesifikk transfeksjon uviktig siden alle celler i kulturen er et mål.

Feltet genterapi utvikler seg raskt. Mange artikler og lærebøker er blitt skrevet som beskriver teknikker for genterapi. Recombinant DNA, 2. utg. av James D. Watson et al., 1992, utgitt av W. H. Freeman and Company, New York, er en slik bok.

De tette stjernepolymerer ifølge denne oppfinnelse kan være kompleksbundet med genetisk materiale og benyttet i genterapi hos pattedyr, f.eks. mennesker. En fremgangsmåte for å hindre eller behandle sykdom karakteriseres ved at den omfatter transfeksjon av en pattedyrcelle med en tett stjernepolymer kompleksbundet til genetisk materiale. Som diskutert tidligere, kan genetisk materiale bli transfektert inn i celler av mange grunner deriblant for produksjon av proteiner i cellene, for å forandre cellefunksjonen, for å rette opp genetiske defektfunksjoner og som legemidler o.l. Således kan genetiske sykdommer eller tilstander bli hindret eller behandlet ved bruk av komplekset til en tett stjernepolymer og genetisk materiale ifølge foreliggende oppfinnelse.

Mengde genetisk materiale som benyttes i det genetiske materiale:dendrimer-kompleksløsningen er tilstrekkelig til å oppnå den ønskede profylaktiske, terapeutiske eller diagnostiske virkning. Denne mengde vil variere som funksjon av virkningen som ønskes, hvor lett målcellene blir transfektert på en vellykket måte, effektiviteten til en bestemt måldirigerende forbindelse bundet til dendrimeren, og tilførselsmåten, f.eks. in vitro, ex vivo, in vivo, og, hvis in vivo, hvorvidt det skal anvendes intravenøs, overflate eller direkte injeksjon i en spesiell svulst, organ, kjertel eller annet vev.

Når mengden genetisk materiale og dens ladning er bestemt, blir mengde dendrimer som benyttes fastlagt som en funksjon av det genetiske materiale/dendrimer-ladningsforhold. Tilstrekkelig dendrimer benyttes i løsningen til å gi det ønskede ladningsforhold. Det ladningsforhold som velges vil variere som funksjon av de samme variable som påvirker konsentrasjon av genetisk materiale i løsningen, både under forhold hvor DNA-dekstran eller glycerol benyttes eller ikke benyttes for å øke synergistisk transfeksjonen. Generelt kan det genetiske materiale/dendrimer-ladningsforhold være fra ca. 10:1 til ca. 1:10.000 (muligens enda lavere), men det foretrekkes fra ca. 3:1 til 1:1000, 1:1 til 1:100, 1:1 til 1:15 eller 1:5 til 1:10, som funksjon av de ovenfor nevnte variable.

En fremgangsmåte for å innføre humane gener i pattedyrceller for å unngå vesentlig gen-rearrangement eller andre forandringer som kan påvirke gen-ekspresjon kan utføres ved å transfektere en pattedyrcelle med dendrittiske polymerer, fortrinnsvis en tett stjernedendrimer, kompleksbundet til genetisk materiale.

Genoverføring kan utføres ved å transfektere en rekke celletyper slik som hematopoetiske celler, fibroblaster, hepatocytter og lignende. Således kan en fremgangsmåte for å forhindre eller behandle genetisk sykdom omfatte transfeksjon med en tett stjernepolymer kompleksbundet til genetisk materiale inn i en hematopoetisk stamcelle, hud-fibroblastcelle, hepatocytt eller lignende, tilføring av den transfekterte celle i en pattedyrorganisme og påvirke nevnte celle for å få en profylaktisk eller terapeutisk virkning.

Transfeksjonen som diskutert i foreliggende oppfinnelse kan benyttes for en rekke formål, inkludert in vitro, in vivo og ex vivo-anvendelser. In vitro-anvendelsen av de komplekse tette stjernepolymer og genetisk materiale ifølge denne oppfinnelse kan videre benyttes for å påvise eller diagnostisere ulike sykdommer. En fremgangsmåte for å

diagnostisere sykdom eller tilstand i et pattedyr kan påvises eller diagnostiseres ved bruk av den komplekse tette stjernepolymer og genetisk materiale ifølge oppfinnelsen.

Det dendrimer-genetiske materialkomplekset beskrevet her kan også betraktes som "et konjugat" ifølge oppfinnelsen siden denne betegnelse benyttes bredt. Dendrimeren (eller tette stjernepoymer P) er forbundet med en båret biologisk respons-moderator, M, som er et bioaktivt materiale, og i dette tilfelle er et genetisk materiale, danner et konjugat ifølge foreliggende oppfinnelse. En mål-dirigerende forbindelse, T, kan også være til stede. Dette muliggjør en målrettet avgivelse av genetisk materiale til spesifikke celler, og disse enestående egenskaper diskuteres videre nedenfor.

Funksjonen til dendrimerene som bærer av genetisk materiale og overføring diskuteres nedenfor. Eksempler omtales for både ikke-spesifikk transfeksjon av celler og spesifikk målrettet transfeksjon. Liten toksisitet eller immunogenisitet observeres i begge anvendelser. Dendrimerbærerne kan således omfatte alle typer nødvendige bærere som kreves for genoverføringsterapi.

Som vist tidligere, kan de tette stjernepolymerer ifølge oppfinnelsen benyttes som bærere for jordbruksmaterialer, inklusive genoverføring.

Det er en rekke tidligere beskrevne fremgangsmåer for å overføre genetisk materiale inn i planteceller. Én fremgangsmåte omfatter anvendelsen av Agrobacterium sp., en typisk fremgangsmåte er å innføre genet i plantecellene ved først å innsette det i kloningssetet til et plasmid som kan replikere i E. coli og inneholde et segment av T-DNA (et DNA funnet i Ti-plasmidene som forekommer naturlig i agrobakterier). Den resulterende mellomledds-forbindelsesvektor blir så innført i E. coli-celle, og transformanter velges ut fra motstand mot ampicillin, kodet for i pBR 322-sekvensene. Deretter blir plasmidet overført fra E. coli-celler til en Agrobacterium-celle ved kryssing. Når plasmidet er inne i Agrobacterium integreres det i Ti-plasmidet ved hjelp av homolog rekombinasjon ved hjelp av Ti-DNA-sekvensene på de to plasmider. Denne fremgangsmåte setter det hele integrerte plasmidet (plasmid integrert i Ti-plasmidet) mellom venstre og høyre grenser av T-DNA. Plasmider som ikke integrerer akkumulerer ikke fordi de mangler start for replikasjon for Agrobacterium. Agrobakterier som inneholder rekombinante Ti-plasmider velges og benyttes til å infisere planteceller. Plantecellene som har tatt opp T-DNA identifiseres ved hjelp av planteseleksjonsmarkøren NPTII, som overfører resistens overfor kanamycin. Disse celler inneholder også det klonede gen av interesse.

Det gentiske materiale blir i tillegg transfektert inn i planteceller ved hjelp av virusvektorer. Virusvektorer er virus som utviklingsmessig er tilpasset å fordele sine gener gjennom en infisert plante. Hvis virusgenomet omfatter et fremmed gen, så vil den også bli fordelt systematisk gjennom planten. Virusvektorer kan omgå problemene med hensyn til å overføre gener til monocoty edoner, som er mindre følsomme overfor agrobakterier. Genetisk materiale kan erstatte det kapselprotein-kodende område i A-komponenten til en geminivirus (f.eks. tomatgyldne mosaikk-virus)-genom. Dette er DNA-virus med genomer som er laget opp av to enkelt-kjedede DNA-molekyler som hver går gjennom en dobbelt-

kjedet replikativ form. A-molekylet kan replikere alene i planteceller, men B-molekylet kreves for infeksjon. Både A og B-genene må være til stede i en celle for å oppnå produktiv virusinfeksjon.

Andre fremgangsmåter for å overføre genetisk materiale inn i planteceller omfatter innføring av genetisk materiale direkte i cellene ved bruk av fysiske metoder. Én fysisk fremgangsmåte for å innføre gentisk materiale i planteceller benytter elektroporering. Vanligvis blir en høy konsentrasjon av plasmid-DNA som inneholder det genetiske materiale tilsatt en løsning av protoplaster og blandingen sjokkes ved hjelp av en elektrisk felt på 200 til 600 V/cm. Etter elektroporering, dyrkes protoplastene i vevskultur i 1 til 2 uker før seleksjon begynner for celler som har tatt opp DNA. Vanligvis oppnår denne fremgangsmåte en effektivitet mellom 0,1 og 1%.

En annen fremgangsmåte for å innføre fysisk genetisk materiale i planteceller omfatter bruken av små mengder metall (f.eks. tungsten)-kuler dekket med det relevante DNA. Disse kulene, f.eks. mikrosfærer 1 μm i diameter, blir skutt direkte inn i cellene. DNA blir for lettehets skyld felt ut på overflaten av kulene som fyres fra "revolver" med hastigheter på 430 meter/sek. Målene kan være suspensjonskulturer av embryonale celler sådd ut på filtere og intakte blader eller frø. Cellene som er i direkte linje for skuddet drepes, men det er en konsentrisk sone med celler for prosjektilene går gjennom cellene uten å drepe dem. Morfologisk analyse av bladene som bombarderes med en β-glukoron-diase (GUS)-rappportgen viser at tungstenpartiklene kan penetrere minst ett lag vev, blad epidermis, til å nå mesofyllen. DNA-dekkede mikrokuler er også blitt benyttet for å innføre genetisk materiale i kloroplaster.

De dendrittiske polymer, spesielt de tette stjernepolymerer, ifølge foreliggende oppfinnelse byr på betydelige fordeler når de benyttes i transfeksjon av genetisk materiale inn i planteceller. Fremgangsmåter som tidligere er beskrevet, kan f.eks. modifiseres for å tillate den tette stjernepolymer (f.eks. tett stjernedendrimer) sammen med det genetiske materiale å transfektere cellen og derved gi de fordeler beskrevet ovenfor. Elektroporering eller små metallkuler kan spesielt benyttes for å oppnå transfeksjon av tett stjernepolymer og genetisk materiale i planteceller.

B. Dendrimeren

Foreliggende oppfinnelse berører i ett område konseptet for å bære genetisk materiale på dendrittiske polymerer, og/eller utføre transfeksjon med slike komplekser. I et bredere aspekt, er betegnelsen "dendrittisk polymer" som benyttet her ikke ment å være begrenset til tette stjernepolymer, selv om den inkluderer tette stjernepolymerer. En "dendrittisk polymer" er en polymer som viser regelmessige dendrittiske forgreninger, dannet ved hjelp av etterfølgende eller generasjonsmessig tilbygging av grenede lag på eller fra en kjerne. Betegnelsen "dendrittisk polymer" omfatter "dendrimerer" som karakteriseres av en kjerne, minst ett indre eller grenet lag, og et overflate-forgrenet lag. (Se Peter R. Dvornic og Donald A. Tomalia, Chem. in Britain, 641-645, august 1994). En "dendron" er en art dendrimer som har grener som går ut fra et bestemt punkt som er eller

kan forbindes med en kjerne, enten direkte eller gjennom en koblingsdel for å bli en dendrimer. Mange dendrimerer omfatter to eller flere dendroner som bindes til en felles kjerne. Imidlertid er betegnelsen dendrimer benyttet bredt slik at det omfatter en enkelt dendron.

Dendrittisk polymer omfatter, men er ikke begrenset til, symmetriske og ikke-symmetriske forgrenede dendrimerer, kaskade-molekyler, arboroler og lignende, selv om det foretrekkes at dendrittiske polymerer er tette stjernepolymerer. PAMAM tette stjernedendrimerene beskrevet her er symmetriske, ved at grenarmene er av lik lengde. Forgreningen skjer ved hydrogenatomene i en terminal $-NH_2$-gruppe på en foregående generasjonsgren. Lysin-forgrenede dendrimerer ifølge eks. 78 er ikke-symmetriske, ved at de forgrenede armer er av ulik lengde. Én gren opptrer ved ϵ-nitrogenet av lysinmolekylet, mens en annen gren opptrer ved α-nitrogenet, ved siden av den reaktive karboksygruppe som binder grenen til en forutgående generasjonsgren.

Hyperforgrenede polymerer, f.eks. hyperforgrenede polyoler, kan være ekvivalente til en dendrittisk polymer hvor forgreningsmønsteret viser en regularitet som nærmer seg den til en dendrimer selv om den ikke er dannet gjennom regelmessig etterfølgende påbygging av forgrenede lag.

Dendrittiske polymerer omfatter bro-dannede dendrimerer og dendrimeraggregater. Dendrittisk polymerer omfatter både generasjonsmessig monodisperse og generasjons-messig polydisperse løsninger av dendrimerer. Dendrimerene i en monodispers løsning er i det vesentlige samme generasjon og derfor av lik størrelse og form. Dendrimerer i polydispers løsning omfatter en fordeling av ulik generasjonsdendrimerer. I en foretrukket utførelsesform, varierer de polydisperse dritiske polymerer som utgjør dendrimerer av minst tre forskjellige generasjoner i størrelse fra ca. 22 til ca. 110Å. Prøvene P og Q i eks. 42 er eksempler på slike polydisperse dendrittiske polymerer.

Dendrittiske polymerer omfatter også overflate-modifiserte dendrimerer. F.eks. kan overflaten til PAMAM-dendrimeren modifiseres ved tilsetning av en aminosyre, f.eks. lysin.

Det skal forstås at referanse til en spesiell type av dendrittisk polymer som en "polymer", f.eks. en "tett stjernepolymer" og "ikke-symmetrisk dendrittisk polymer", en "kaskade-polymer", er også ment å omfatte bro-dannede dendrimerer av den type, dendrimeraggregater av den type, polydisperse dendrimerer av den type og overflate-modifiserte dendrimerer av den type.

Når det bårede materiale er genetisk materiale, blir overflaten til dendrimeren utgjort fortrinnsvis av hovedsakelig positivt ladede funksjonelle grupper. Det foretrekkes at slike positive funksjoner oppnås ved å påsette amino-terminale grupper på dendrimeroverflaten. Positivt ladede funksjonelle grupper kan også innføres på overflaten kjemisk (f.eks. kvaternære aminer). Slik aminofunksjon representeres av polyamin, polyamidoamin og polyalkylenimin (f.eks. polyetylenimin og polypropylenimin) dendrimerer beskrevet ovenfor, selv om den kan oppnås på andre måter.

Bredt forstått er dendrimerer som benyttes for å bære genetisk materiale kuleformede, ellipsoidale eller stav-formet. Deres smaleste diameter(e) er minst 50Å. Denne størrelse tilsvarer omtrent diameteren av en generasjon 6 ammoniakk-kjerne [G6(NH_3)] PAMAM-dendrimer eller en generasjon 6 etylendiaminkjerne [G6 (EDA)]-dendrimer (som er noe større enn ammoniakk-kjernedimensjonen). (Se eks. 44, fig. 12 og 13; eks. 45, fig. 14; og eks. 42, fig. 19). Den øvre grense for denne størrelse er ikke blitt undersøkt, selv om det er kjent at G11 (EDA) PAMAM-dendrimerer med diameter på ca. 110Å, viser utmerket transfeksjon. Basert på resultater som viser at aggregatene til dendrimerer opp til 1.000Å i diameter transfekterer tilstrekkelig mens aggregater på 2.000-5.000Å ikke gjør det; antas det at dendrimerpartiklene kunne ha diametere så store som ca. 1.000Å, eller mindre partikkelaggromerater kunne ha diametere så store som ca. 1.000Å, fortrinnsvis fra 50 til 110Å. Disse diametere blir generelt antatt å være makromolekylære dimensjoner, og derfor blir disse dendrimerer referert til som dendrittiske makromolekyler.

Dendrimerer med mindre diametere kan også benyttes til å transfektere celler med genetisk materiale, selv om de beste resultatene oppnås hvis det mindre DNA/dendrimer-komplekset deretter blir koblet med større dendrimerer som har omtrent 50Å diameter som deres smaleste diameterdimensjon. (Se eks. 46, fig. 15 og 16.) I eksempel 46 (fig. 15 og 16), ble utmerket transfeksjon oppnådd ved å kompleksbinde DNA med en G5 (EDA)-dendrimer eller G5 (NH_3)-dendrimer (diameter ca. 40Å), etterfulgt med tilsetning av en G9(EDA)-dendrimer eller G(NH_3)-dendrimer (diameter ca. 90Å) til komplekset. Det er interessant at den omvendte rekkefølge synes ikke å være så effektiv.

Det antas at de små dendrimerer kan ha som deres smaleste diametere, diametere så små som omtrent 22Å, d.v.s. tilsvarende G3(NH_3) PAMAM-dendrimer når de benyttes på denne sekvensielle måte. Dendrimerene nedenfor omtrent generasjon 3(G3) synes ikke å bli uavhengig kompleksbundet til DNA. Den større dendrimer kan ha som sin minste diameter, diametere så små som ca. 50Å til ca. 1.000Å.

Kombinasjoner av to ulik størrelse dendrimerer kompleksbundet med DNA kan å øke transfeksjonen. Dette er spesielt tilfelle når blandingen av dendrimerer er polydisperse i størrelse, d.v.s slike som har partikkelstørrelser som varierer fra 22 til ca. 110Å. Prøver P og Q i eks. 42 er eksempler på slike polydisperse blandinger.

En sfæroidal dendrimer kan lages ved å starte generasjons-reaksjonssekvensen med et generelt kuleformet start- eller kjernemateriale, som fortrinnsvis har tre reaktive seter som vender ut fra kjernen, med vanligvis en lik avstand fra hverandre, f.eks. ammoniakk. (Se f.eks. europeisk publikasjon 0 115771 og US-patenter 4.507.466, 4.558.120, 4.568.737, 4.631.337, 4.587.329 og 4.737.550). Dendrimeren kan gis en forlenget ellipsoidal eller stav-lignende form ved å starte med en forlenget, polymer kjerne som har en rekke reaktive seter som vender stråleformet ut fra kjernen på ulike punkter langs lengden, f.eks. polyetylenimin. (Se f.eks. europeisk publikasjon 0 234 408, og US-patent 4.694.064).

En ellipsoidal dendrimer starter med en kortere kjerne enn kjernen som benyttes for den stav-formede dendrimer, f.eks. etylendiamin (EDA).

I en kuleformet dendrimer faller diameteren av kulen helst innenfor de foretrukne diameterområdene beskrevet ovenfor. I en ellipsoidal dendrimer eller en stav-formet dendrimer, har den riktige diameter i ellipsoiden eller staven helst den(de) foretrukne diameter(e) som er anført ovenfor. Det riktige tverrsnittet må ikke være en perfekt sirkel, og kan derfor ha diametere av ulik lengde, avhengig av hvor tverrsnittet legges. Lengden på opp til 1.000Å blir omtalt.

De bro-byggede dendrimerer kan også være anvendbare for å bære genetisk materiale. Disse strukturene kan varieres sterkt i form, men er hovedsakelig laget ved å forbinde nærliggende tette stjernedendrimerer med hverandre, spesielt gjennom en kovalent binding, men ikke-kovalente bindinger er også mulig. Fire eller fem mindre kuleformede, ellipsoidale eller stav-formede dendrimerer kan brobygges til å lage en aggregat unimolekylær struktur, som har transfeksjonseffektiviteten til en høyere ordens dendrimer.

En intressant variasjon over det brobyggede dendrimerkonseptet omfatter dannelsen av makromolekylaggregater hvor DNA eller RNA-materialet tjener som den ikke-kovalente bakgrunn for at adskilte dendrimerer, når bakgrunnsnettverket formes, f.eks., på basis av elektrostatiske reaksjoner. Denne modell synes å nærme seg komplekset omtalt i eks. 46 diskutert ovenfor, hvor DNA først blir kompleksbundet med en mindre dendrimer (f.eks. G5), med DNA/dendrimer-kompleksene som deretter blandes med større diameter dendrimer (f.eks. G9), som i
fig. 15 og 16.

Større diameteraggregater av dendrimerer dannes ved å tiltrekke amino-terminale dendrimerer rundt en kjerne av karboksylerte-terminale dendrimerer. Avhengig av ladningsforholdet mellom de to klasser dendrimerer benyttet i formuleringen og også konsentrasjonen som de lages i, blir ulike typer dendrimeraggregater laget. Transfeksjons-effektiviteten synes å være størst når den amino-terminale dendrimer og karboksylat-terminal dendrimer er til stede i en dendrimer:dendrimer-positiv ladning til negativt ladningsforhold på helst fra omtrent 25:1 til 100:1, hvilket resulterer i aggregatdannelse som har en netto positiv ladning (eks. 74). Når de passende forhold benyttes, kan transfeksjonseffektiviteten være større enn den som observeres med den utgangs amino-terminale dendrimer som benyttes i samme DNA/dendrimer-ladningsforhold og i nærvær av DEAE-dekstran (som også kan virke til å øke transfeksjonseffektiviteten).

Hel-generasjon (amino-terminert) og halv-generasjon karboksylat-terminerte dendrimerer danner dendrimeraggregatet ved pH ca. 6-9, avhengig av forholdet mellom amino-terminale og karboksylat-terminale dendrimerer, og på prøvekonsentrasjonene. Ved pH >9, begynner de protonerte primære aminer i de hele generasjonsdendrimerene å deprotonere, og således brytes aggregatene ned. Ved pH <6, blir karboksylatene og de indre tertiære aminene i halv generasjons-dendrimerene protonert, hvilket resulterer i dannelse av zwitterioner blant de halv generasjons-dendrimer, og derved dissosierer

aggregatene også. Så vidt vi vet er PAMAM-dendrimer-aggregatet det eneste materiale som besitter denne enestående egenskap.

Det er kjent at pH ved utsiden av cellen er 7,2 og innsiden av cellen ca. 5,0. Derfor er det rimelig å lage og fremstille høyere molekylærvekt-dendrimer-aggregater fra de lavere generasjons-dendrimerer ved pH 7,4 slik at dendrimeraggregatstørrelsene er store nok til å kompleksbinde effektivt DNA-molekylet. Imidlertid for å binde DNA må disse dendrimer-aggregatene bære netto positive ladninger, som betyr at full-generasjons-dendrimerene må være i stort overskudd over halv-generasjons-dendrimerene. Ett av de interessante trekk til dette avleveringssystem er at etter at komplekset går inn i cellen, vil dendrimer-aggregatene brytes ned på grunn av den lavere pH i cellens indre. Denne dissosiasjon kunne også øke transfeksjonseffektiviteten.

Den kovalente modifikasjon av PAMAM-dendrimer-overflate-aminogruppene med aminosyre og lysin, viste en overraskende og enestående økning av transfeksjonseffektiviteten (eks. 75, fig. 57). Ved bruk av en lysin-modifisert G7(NH_3)-dendrimer kompleksbundet til plasmidet ble det oppnådd en sterkt øket ekspresjon av luciferase-genet sammenlignet med en ikke-modifisert G7(NH_3)-dendrimer og videre, kompleksene dannet med lysin-modifisert G7(NH_3)-dendrimeren viste transfeksjonslikhet til G10(NH_3)-dendrimeren (alle eksperimenter ble utført med et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:10 og i nærvær av DEAE-dekstran). Dette eksperiment antyder at øking av ladningstettheten på dendrimerene påvirker transfeksjonsprosessen siden pKa av ϵ-aminogruppen er 10,53 til sammenligning med den omtrentlige pKa på 9 for de terminale aminogrupper på en PAMAM-dendrimer. Andre overflatemodifikasjoner kunne også forventes å øke transfeksjonen på en lignende eller endog sterkere måte.

C. Beskrivelse av dendrimerers ikke-spesifikke transfeksjonsaktiviteter

Den eksakte mekanisme for ikke-spesifikk (d.v.s. ikke-målrettet) transfeksjon av celler med DNA-dendrimer-komplekser er ikke kjent men flere ting er innlysende. Uten å være bundet av noen teori tror vi at DNA binder til dendrimeren på basis av ladnings-reaksjon og at den mest effektive transfeksjon skjer når komplekset befinner seg med overskudd positiv ladning. Interaksjon mellom DNA/dendrimer-komplekset og cellen skyldes sannsynligvis binding av det positive ladekompleks til negativt ladede fosfolipider på celleoverflaten. Transfeksjon i nærvær av serum eller dersom man ikke vasker serum av, synes overflaten til cellene å hindre transfeksjon gjennom nøytralisering av celle-overflateladninger, og på denne måte hindre at kompleksene bindes til cellene. Det er interessant at visse typer DNA/dendrimer-komplekser virker bedre for ikke-spesifikk transfeksjon av bestemte celler. Dette funn tyder på at det er forskjeller i overflater til celler som fremmer reaksjonene med visse typer DNA/dendrimer-komplekser. Forskjellige dendrimerer kan muligens måtte bli benyttet eller utviklet for mest effektiv transfeksjon av ulike typer celler.

Det er også mulig at forskjellige størrelser og ladningstetthet på dendrimerene kan være nødvendig for effektiv, ikke-spesifikk transfeksjon av de ulike former av genetisk materiale gitt de markerte forskjellene i størrelse av de ulike former genetisk materiale benyttet i genoverføringsbehandling. Teoretisk kan genetisk materiale/dendrimer-kompleks som binder til cellen effektivt på basis av ladningsreaksjon være meget forskjellig mellom små deler av genetisk materiale, slik som oligonukleotider men kun få baser i lengde, og større deler genetisk materiale, slik som store DNA-plasmider. Vanligvis ønsker man at genetisk materiale danner et lite kompleks som har en høy tetthet av positiv ladning på sin overflate for transfeksjon basert på ladningsreaksjon. I dette område kan ved bruk av mindre dendrimerer som følges av større dendrimerer eller polydisperse dendrimerer være viktige for å danne enekeltstående komplekser som er mest effektive for DNA-overføring. Også tilsetningen av DEAE-dekstran eller glycerol til transfeksjonsbufferen etter dannelsen av DNA/dendrimer-komplekset viser overraskende og uventet økning av celletransfeksjon. Tilsetning av andre forbindelser i transfeksjons-buffere, slik som klorokin, som kan enten hjelpe i frigjøringen av DNA fra endosomer eller hindre degradering i endosomer, kan også være av verdi ved å øke transfeksjonen med dendrimer-kompleksene. Imidertid kan disse kompleksene være unike for ikke-spesifikk transfeksjon in vitro, med forskjellige betingelser eller kombinasjoner av materialer, slik som fusogene peptider, som er mer effektive i å øke transfeksjonen in vivo eller med målrettete dendrimerbærere.

D. Genetisk materiale og kompleksbinding med dendrimer for å lage et konjugat

Genetisk materiale er nukleotid-baserte forbindelser, som omfatter uten begrensning, virus og virusfragmenter, plasmider, fag, cosmider, gener og gen-fragmenter (d.v.s. exoner, introner), deoksyribonukleinsyre (DNA) både enkelt- og dobbelt-kjedet, ribonukleinsyre (RNA), ribosomal RNA (rRNA), katalytisk RNA (cRNA), mindre nukleære RNA (snRNA), messenger RNA (mRNA), transport RNA (tRNA), DNA og RNA oligonukleotider (både enkelt- og dobbelt-kjedet), eller oligomerer og (anti-sens) oligonukleotider, protein-nukleinsyre (PNA), og substituerte nukleinsyre-oligonukleotider. Genetisk materiale, spesielt virus og virusfragmenter, kan kompleksbindes eller kobles med protein. Betegnelsen genetisk materiale er også ment å omfatte "modifiserte nukleotider" som beskrevet mer fullstendig nedenfor. Nukleotidene kan modifiseres slik at de blir mer resistente overfor enzymatisk degradering, øke cellulært opptak, eller for andre formål. For å bedre opptak av celler og/eller motstand mot enzymatisk degradering, har forskere erstattet det negative oksygenet på fosfodiester-bakgrunnen med metyl eller svovel, og derved laget metylfosfonater eller fosforyltioater. Dette vil resultere i en enzym-resistent syntetisk oligonukleotid-derivatkjede som besitter vedvarende integritet når det blandes med cellulært biologisk materiale. Nuklease-resistente kjeder kan også bli fremstilt ved å bygge inn 2'-O-allylgrupper i de syntetiske oligokjedene. Fosforylditioater er også blitt laget. Modifisering ved å lage fosfatestere og fosforylamidater er blitt gjennomført.

En annen type modifisering som er blitt undersøkt er erstatning av fosfodiesterbroen mellom nukleotidene med en fullstendig ulik gruppe, slik som en siloksanbro, karbonatbro, karboksymetylesterbro, acetamidbro, karbamatbro, tioeterbro og peptidbro. Ved siden av å erstatte fosfatbroen, kan en erstatte sukkeret og fosfatdelene ved hjelp av en syntetisk polymer og således oppnå et plastisk DNA. Nukleosidenhetene selv kan modifiseres.

Betegnelsen "genetisk materiale" som benyttet gjennom denne teksten er ment å omfatte nukleotidsegmenter som er modifisert på én av de ovenfor nevnte måter eller andre måter. Generelt vil i den følgende beskrivelse av oppfinnelsen betegnelsen "oligonukleotid" bli benyttet for alle korte former genetisk materiale.

Genetisk materiale (d.v.s. nukleinsyrer) kan variere dramatisk i lengde fra tre baser (ca. 10Å) for en kodon til
10 milliarder Å eller 1 meter for humant DNA. Mange ulike former for genetisk materiale har potensielle anvendelser i genetisk terapi. [f.eks. er slike områder: et typisk humant gen er omtrent 34 mikron (μ) (340,000Å) i lengde, den gjennomsnittlige lengde av E. coli mRNA er omtrent én og en halv mikron (μ); og tRNA som antas å være de minste RNA-molekyler, er typisk omtrent 0,03 mikron (μ)]. Ethvert genetisk materiale kan potensielt bli benyttet i foreliggende oppfinnelse.

Konjugater av genetisk materiale og dendrimerer henvises til som komplekser. Et "kompleks" som betegnelsen benyttes her referer til en type dendrimerkonjugat og båret materiale hvor kobling mellom det bårede materiale og dendrimeren skjer gjennom ionebinding, van der Waal's krefter, hydrogenbinding, metallbinding eller en kombinasjon av disse. I et kompleks er det bårede materiale ikke forbundet med dendrimer med kovalent binding.

Opptak av DNA/dendrimer-komplekser av celler er blitt vist for relativt lav-molekylvekt, enkelt-kjedet DNA-nukleotider (eks. 47, fig. 20 og 21) såvel som høy-molekylvekt DNA. Genoverføring og ekspresjon er også blitt vist i fig. 22, for sirkulær eller supertvinnet DNA og lineært DNA (eks. 48, fig. 22), og i andre eksperimenter og figurer for hele gener og lengre DNA-segmenter (f.eks. 6,5 kb). Dette opptaket som er observert med DNA:dendrimer er økt i sammenligning med cellulært opptak som skjer med DNA alene, og er en aktiv, energi-avhengig reaksjon i målcellen (eks. 47).

For å binde det genetiske materiale til dendrimeren, blir dendrimeren, som helst allerede er målrettet for in vivo bruk på den måte som er beskrevet nedenfor, blandet med det genetiske materiale i en vandig løsning i romtemperatur (20-40°C) ved pH fra ca. 5 til ca. 10. De negativt ladede nukleinsyre-kompleksene med de positivt ladede overflatene til dendrimer-makromolekylene danner en nettverkstruktur.

Genetisk materiale, f.eks. DNA, danner stabile komplekser med dendrimerene ved genetisk materiale/dendrimer-ladningsforhold så høye som ca. 10:1, og større grad av kompleksdannelse skjer ved ladningsforhold på ca. 2:1 og under. (I eks. 42, er en effektiv transfeksjon observert for prøve 4 ved et ladningsforhold på 1:0,6; se tabell XIV, fig. 18 og 42. Dette ladningsforhold tillater også komplett DNA kompleksbinding ved måling i en

agarosegel). Ved lavere ladningsforhold, f.eks. 1:10 eller 1:100, forblir kompleksene meget stabile (se eks. 49, fig. 23) og transfeksjon observeres selv i fravær av DEAE-dekstran (eks. 56 og fig. 30). Kompleksdannelse er minst ved ladningsforhold for DNA:dendrimer over 40:1, som vist i eks. 49, fig. 23(A)-(D). Ved den andre ende av ladningsforhold-området blir gode transfeksjonsresultater observert for noen dendrimer ved DNA/dendrimer-ladningsforhold på ca. 1:1000 og for noen så lav som ca. 1:10.000 (eks. 56, fig. 30). Det er mulig at med andre dendrimersystemer kan ladningsforhold så lave som 1:1.000.000 være effektive når det gjelder formidling av transfeksjon.

Ladningsforholdet synes å være den avgjørende faktor i dannelsen av DNA/dendrimer-kompleksene som indikert i eks. 50 (fig. 24), hvor det samme molare forhold 1:16, en G11(EDA)dendrimer, som har større overflateladning enn en G8(NH_3-)dendrimer, danner et stabilt kompleks med DNA, mens G8(NH_3)-dendrimer blandet med DNA med samme molare forhold ikke gjør det. Dette antyder at kompleksdannelsen er mer avhengig av ladningsforhold enn molarforhold.

DNA/dendrimer-kompleksene er bemerkelsesverdig stabile og vannløselige over et ganske vidt pH-område, f.eks. 5,2-9,8 (eks. 51, fig. 25) og innenfor et vidt variasjonsområde av saltkonsentrasjoner, d.v.s. 0-1,5M (eks. 52, fig. 26). Kompleksbinding av genetisk materiale til dendrimer beskytter det fra spalting i nærvær av enten restriksjons-endonuklease-enzymer eller cellulær nuklease (eks. 53, fig. 27 og eks. 54, fig. 28). Dette gjør disse kompleksene passende for transfeksjon av celler in vivo.

Mengden genetisk materiale pr. celle som kan transfekteres ved bruk av DNA/dendrimer-kompleksene kan variere, og til et punkt, vil øking av konsentrasjon av genetisk materiale fremme graden av transfeksjon (eks. 50, fig. 29). Ved et gitt ladningsforhold, synes transfeksjonen å være større enn 5 μg av plasmid-DNA pr. celle kulturbrønn (ca. 200.000 celler) enn ved 1 μg plasmid-DNA selv om denne effekt synes å nå et platå ved 10 μg av plasmid-DNA pr. brønn.

Det antas at genetisk materiale/dendrimer-løsninger hvor konsentrasjonen av genetisk materiale er fra 1,0 til ca.
10,0 μg/ml er nyttige in vitro og in vivo. In vivo-konsentrasjonen som er benyttet vil selvfølgelig variere som en funksjon av tilføreselsmåte. En mer konsentrert løsning ville benyttes ved intravenøs injeksjon, gitt den fortynning som vil skje i blodstrømmen. En mer fortynnet løsning kunne benyttes for set-spesifikk tilførsel, f.eks. for injeksjon direkte inn i en svulst eller et organ.

Tilstrekkelig genetisk materiale for å oppnå en endelig konsentrasjon på ca. 1,0 til ca. 10,0 μg/ml blandes i vann med tilstrekkelig dendrittisk polymer som inneholder i det vesentlige positive ladede overflategrupper til å gi et genetisk materiale, dendrittisk polymerladningsforhold er fra ca. 10:1 til ca. 1:10.000, helst fra ca. 3:1 til ca. 1:1.000 eller mer, fortrinnsvis fra ca. 1,5:1 til ca. 1:100, eller fra ca. 1:1 til ca. 1:15, eller fra ca. 1:5 til ca. 1:10, som funksjon av de variable som diskutert ovenfor. Blandingen utføres ved pH fra ca. 5 til ca. 10 og ved en temperatur på fra ca. 20 til ca. 40°C.

Det genetiske materiale/dendrimer-ladningsforhold kan være fra ca. 10:1 til ca. 1:10.000 (muligens enda lavere), men det er ønskelig at det er ca. 5:1 eller 3:1 til endog 1:10.000. Forholdet som velges innenfor det område kan variere som funksjon av hvorvidt en stimulerende forbindelse slik DEAE-dekstran, glycerol eller klorokin benyttes eller ikke, eller om en mål-dirigerende forbindelse anvendes. Selv om de beskrevne vide områder kan benyttes er den foretrukne ladningsforhold-variasjon når ingen stimulator benyttes, fra ca. 1:5 til ca. 1:10.000, helst 1:10 til ca. 1:10.000. På samme måte, når en stimulator benyttes, er det foretrukne ladnings-forhold ca. 5:1 til ca. 1:10.000, helst fra ca. 1:1 til ca. 1:100; mer foretrukket fra ca. 1:1 til ca. 1:15, og mest foretrukket fra ca. 1:5 til ca. 1:10. Til slutt, når en mål-dirigernde forbindelse benyttes, antas det at høyere ladningsforhold kan benyttes med bedre effekt enn for ikke-dirigert transfeksjon. Det foretrukne område er således antatt å være fra 10:1 til ca. 1:10, mer foretrukket fra ca. 3:1 til ca. 1:10, og mest foretrukket fra ca. 1:1 til ca. 1:10, og i noen tilfeller helst ca. 1:1. Disse områder diskuteres i større omfang nedenunder.

Kompleksene blir først blandet med genetisk materiale med konsentrasjoner fra ca. 1,0 til ca. 10,0 µg pr. 20 µl, og deretter fortynnet 50 ganger til den endlige konsentrasjon på 1,0 til ca. 10,0 µg genetisk materiale pr. ml. Enten den første mer konsentrerte, eller de endelige genetisk materiale: dendrittisk polymerløsninger kunne pakkes som passende diagnostiske eller farmasøytiske blandinger.

E. Forsterkning av transfeksjon

Man kan utføre transfeksjon av en celle med genetisk materiale ved bruk av dendrittiske polymerer alene, men helst med større (>G8) dendrimerer med lavere genetisk materiale til dendrimer-ladningsforhold, f.eks. ca. 1:5 og lavere, fortrinnsvis lavere enn ca. 1:10, (eks. 56, fig. 30 og 31). Transfeksjon ved bruk av dendrimer og genetisk materiale alene kan økes ved først å kompleksbinde genetisk materiale med en lavere generasjons-dendrimer, f.eks. G5, etterfulgt av tilsetning av en større dendrimer, f.eks. G9, som diskutert ovenfor (eks. 46, fig, 15 og 16). Dette synes å virke best hvor den andre dendrimeren benyttes i en konsentrasjon fra ca. 0,1 til ca. mikromolar, selv om den spesifikke konsentrasjon kan variere avhengig av typen av dendrimer (saml. fig. 15 og 16). Den første dendrimer og dens kompleksbundne genetiske materiale benyttes i konsentrasjoner som er tilstrekkelig til å kompleksbinde omtrent 1 µg genetisk materiale pr. testbrønn.

Komplekser som transfekterer celler ikke-spesifikt burde oppnå to motstridende målsetninger; det første er å pakke DNA så tett som mulig og, på samme tid, ha en stor positiv ladningstetthet på overflaten av komplekset for å formidle binding til negativt ladede fosfolipider på cellemembranene. Dette krav for tosidig aktivitet antyder at en polydispers størrelsesblanding av dendrimerer kan være av verdi i ikke-spesifikk transfeksjon med de mindre dendrimerer som hjelper med å kontaktbinde DNA mens de større formidler binding til celler. Dette kan også hjelpe på å utvikle DNA:dendrimer-komplekser med mindre størrelse, siden de lavere generasjonsdendrimerer ville ødelegge

det regelmessige nettverket dannet av de større dendrimerer og DNA. Arbeidshypoteser slik som disse støttes av resultater som er oppnådd gjennom elektron-mikrografier (f.eks. fig. 60, panelene 3, 4 og 5), som viser små kompakte DNA-komplekser når polydispers-store dendrimerer benyttes sammenlignet med massive DNA/dendrimer-komplekser som fremstilles ved hjelp av store dendrimerer alene.

Transfeksjon kan også økes ved tilsetning av en rekke forbindelser til transfeksjons-bufferen. Synergistiske transfeksjonsresultater kan uventet oppnås når DEAE-dekstran er til stede i transfeksjonsbufferen med komplekset av genetisk materiale og dendrimeren. Det genetiske materiale/:dendrimer-ladningsforhold er fra ca. 5:1 til ca. 1:10.000, bedre ca. 1:1 til ca. 1:100, det foretrekkes fra ca. 1:1 til ca. 1:15 og helst fra ca. 1:5 til ca. 1:10. (Eks. 56, fig. 30; eks. 57, fig. 32; eks. 58, fig. 33; eks. 59, fig. 34; eks. 42, fig. 17). DEAE-dekstran-konsentrasjonen skulle helst være innenfor et smalt område fra ca. 0,25 til 2 mikromolar, og fortrinnsvis fra 0,25 til 1 mikromolar (eks. 60, fig. 35). Det genetiske materiale må også kompleksbindes til dendrimeren før det er plassert i DEAE-dekstran-løsningen for å øke transfeksjons-effekten. Når dette er gjort er transfeksjon i nærvær av DEAE-dekstran ved DNA/dendrimer-kompleksene i ladningsforhold fra ca. 1:1 til ca. 1:100, å foretrekke fremfor ca. 1:5 til ca. 1:10, flere hundre ganger mer effektive enn transfeskjon med DNA/dendrimer-komplekser alene overfor en lang rekke ulike celletyper (eks. 60, fig. 36). Dette er riktig selv med vanskelig transfekterbare cellelinjer (eks. 62, fig. 37). Det er også mer effektivt enn transfeksjon ved bruk av andre forbindelser slik som LIPOFECTIN® og LIPOFECTAMINE® (eks. 61-63, fig. 36-38).

Det genetiske materiale/dendrimer-komplekset tillates typisk å stå i 3-5 min. etter at det er dannet før det er kombinert med DEAE-dekstran. Selv om DEAE-dekstran kan tilsettes enten til den mer konsentrerte kompleksløsning (d.v.s. 1-10 μg genetisk materiale/20 μl løsning) eller til transfeksjonsbufferen foretrekkes det å tilsette til den sistnevnte der den mer konsentrerte genetiske materiale-dendrimer-kompleksløsningen da er fortynnet.

In vitro-transfeksjon er kjent å bli forbedret ved bruk av en konvensjonell celle-perturbasjonsforbindelse. I følge foreliggende oppfinnelse, synes DEAE-dekstran å virke mer som en celle-perturbasjonsforbindelse som kan sees fra eks. 64, fig. 39, hvor virkningene til DEAE-dekstran og celle-perturbasjonsforbindelsen DMSO er sammen-lignet. DMSO alene synes å ha liten virkning på transfeksjon med DNA/dendrimer-kompleksene sammenlignet med virkningen til DAEA-dekstran. Det er interessant at DMSO synes å øke synergistisk virkningen av DEAE-dekstran når de to er benyttet sammen, hvilket antyder at virkningen til DAEA-dekstran omfatter virkninger andre enn celleperturbering.

Fordi tilsetningen av DEAE-dekstran eller andre forbindelser til DNA/dendrimer-komplekset (etter at det er blitt dannet) har vist seg å være effektiv i å øke transfeksjonen på en enestående måte, ble en annen type eksperiment utført for å undersøke videre rollen til denne forbindelse i å øke ikke-spesifikk transfeksjon. Elektronmikrofotografier ble tatt av DNA/dendrimer-komplekser med og uten tilsetning av DEAE-dekstran. Tilsetning av DEAE-dekstran eller anvendelse av polydisperse blandinger av dendrimerer reduserte

størrelsen av DNA/dendrimer-kompleksene dramatisk (f.eks. fig. 60, panelene 3, 4 og 5). Dette gir et grunnlag for hvorfor disse forbindelser øker transfeksjonen siden det er sannsynlig at de mindre kompleksene som lages ved hjelp av disse forbindelser, gjør dem mer egnet til å komme inn i cellene og utløse transfeksjon.

DNA/dendrimer-kompleksene må inneholde et elektrotett positivt ladnings-materiale, for å virke som startpunkt for binding til negativt ladede fosfolipider på celleoverflaten. Dette oppnås best ved bruk av høyere generasjonsdendrimerer, som har større overflateladningstetthet. Uheldigvis synes disse dendrimerer å kompleksbinde DNA til store aggregater eller makronettverk fra ca. 2.000 til 5.000Å som det er vanskelig for en celle å oppta.

DEAE-dekstran virker som et dispersjonsmiddel som reduserer de store aggregatene til mindre komplekser, men som fremdeles beholder den ladningstette dendrimer på sin overflate for binding til cellene. Polydisperse dendrittiske polymerer, f.eks. blandinger av partikler av ulike dimensjoner, fra ca. 22 til ca. 110Å (se f.eks. prøvene P og Q i eks. 42), synes ikke å danne de 2.000 til 5.000Å-aggregatene. I stedet synes de å danne aggregater som ikke er større enn opp til 1.000Å, som underletter effektivt transfeksjon av genetisk materiale uten anvendelse av DEAE-dekstran. En sammenligning mellom elektronmikrofotografier for kompleksene av genetisk materiale med en ensartet stor dendrimer G10 (EDA) med (fig.60, panel 4) og uten (fig. 60, panel 3) DEAE-dekstran tilsatt, viser vesentlig forskjell i aggregatstørrelse. Et elekronmikrofotografi av et genetisk materiale kompleksbundet med en polydispers dendrimer (fig. 60, panel 5) viser aggregater som ligner mer på dem som er fresmtilt i fig. 60, panel 4.

Glycerol lik DEAE-dekstran ser ut til overraskende å øke synergistisk transfek-sjonen av genetisk materiale i genetisk materiale/dendrittisk-polymerkomplekset. Transfeksjonsløsningskonsentrasjonen av glycerol er fortrinnsvis fra 2 til 10% i vekt, helst fra ca. 2 ca. 5%. Den synes å tjene en dispersjonsfunksjon sammenlignet med DEAE-dekstran.

Klorokin øker også transfeksjon, og gjør dette med overraskende synergi, enten benyttet alene som en forstørrelse eller sammen med DEAE-dekstran. Selv om man ikke ønsker å være bundet av en spesifikk teori antas det at klorokin virker på en fullstendig forskjellig måte fra DAEA-dekstran. Det antas at klorokin nøytraliserer endosomer, og hindrer således sekvestrering og rask degradering av genetisk materiale/dendrimer-kompleksene. Dette muliggjør at det genetiske materiale blir transkribert og translatert til en større grad enn hvis det hadde blitt transfektert alene eller kun i nærvær av DEAE-dekstran uten tilsetning av klorokin (se fig. 61A og 61B, og eks. 73). Fordi det er forskjeller mellom cellene i deres evne til å oppta komplekser i endosomer, vil den stimule-rende virkning av klorokin variere betydelig mellom ulike cellelinjer, som illustrert ved forskjellen i resultater for transfeksjon av COS1-celler (fig. 61A) og RAT2-celler (fig. 61B).

Vilkårlig innføring av negativt ladede funksjonelle grupper på den tette stjerne-polymeroverflate vil også påvirke transfeksjonen (eks. 67, fig. 43). Slike negative

funksjonsgrupper oppnås ved å innføre vilkårlig en fortrinnsvis positiv ladet overflate (f.eks. ved å ha amino-overflatefunksjonsgruppe) med karboksygrupper. Dendrimerer med både positive (kationiske) og negative (anioniske) gruppefunksjoner blir noen ganger referert til her som dendrimerer med zwitterion-overflater. Reduksjon av total positiv overflateladning, synes vanligvis å redusere transfeksjonseffektiviteten, bortsett fra kanskje ved lavere ladningsforhold, f.eks. 1:10 som sammenlignet med 1:5 eller 1:1 (fig. 43).

F. Målrettet dirigert transfeksjon

Innbygging av målsøkende dirigerende forbindelser i dendrimergenetiskmaterial-komplekset vil ikke bare dirigere komplekset til en ønsket celle, men vil også øke transfeksjonen av celler i måldelen (eks. 65, fig. 40). Tilstrekkelig mengde av mål-dirigerende forbindelse bindes til makromolekylet for å tiltrekke og binde det til reseptorseter på celler som skal transfekteres, men ikke ved å redusere overflateladning til det punkt at DNA-kompleksdannelse ikke skjer. Som et resultat oppnås binding av målsøkende forbindelse på en slik måte eller med proporsjonalt små mengder realtivt til funksjonelle grupper på overflaten av makromolekylet slik at den målsøkende forbindelse ikke i betydelig grad interfererer med kation-karakteren av den dendrittiske polymeroverflate. Derfor har dendrimeren evne til å danne stabile komplekser med DNA (med et på forhånd tilmålt ladningsforhold) og er ikke svekket av nærværet av den mål-dirigerende forbindelse (eks. 65, fig. 41).

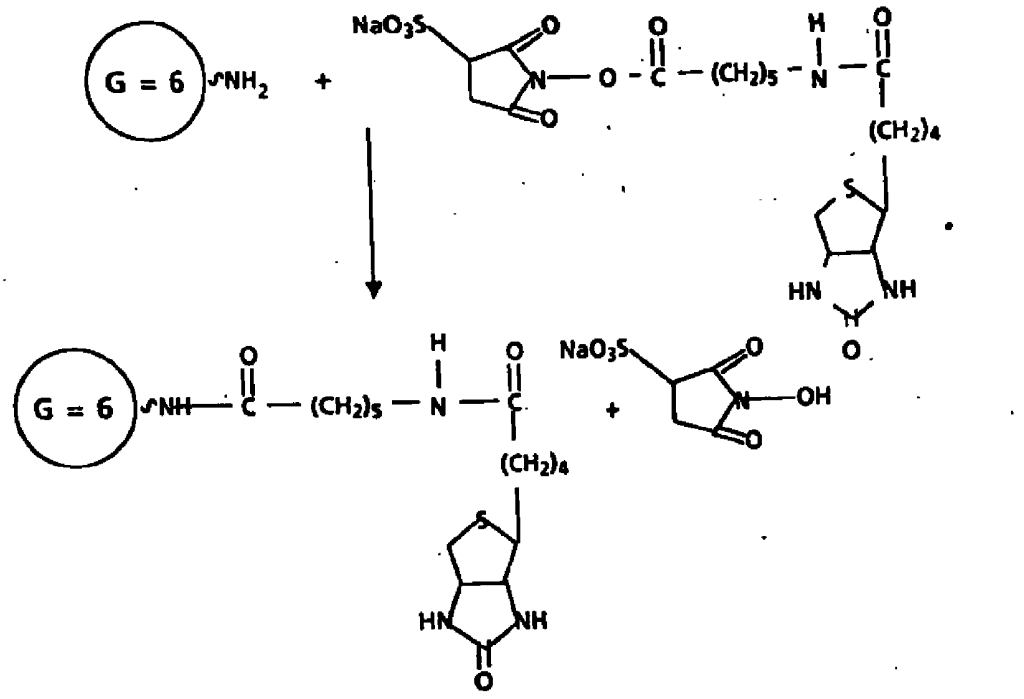
Anvendelse av målsøkende forbindelser sammen med dendrimer-genetisk materiale er en av de viktigste foretrukne områder av oppfinnelsen. Det faktum at ikke-målsøkende transfeksjon ikke skjer så effektivt som ved ladningsforhold av DNA:dendrimer over ca. 1:10 og 1:5 uten stimulering kan skyldes det faktum at disse komplekser ikke har nok positiv ladning til å binde til negativt ladede fosfolipider på overflaten av cellene. Komplekset som dannes i disse høyere genetisk materiale/dendrimer-ladningsforhold (f.eks. 1:10 til 1:1, eller muligens endog 3:1 eller så høyt som 10:1) kan fremdeles målsøkes for å transfektere spesifikke celler ved hjelp av en målsøkende forbindelse. Ikke-ønsket transfeksjon av tilfeldig påtruffede celler (som kan være lite ønskelig under mange forhold) unngås når DNA/dendrimer-kompleksene fremstilles på denne måte i høyere ladningsforhold eller når serum er til stede (eks. 66, fig. 42). Når en målsøkende forbindelse benyttes, foretrekkes et ladningsforhold på 1:1 i mange bruksformer.

Bruken av en målsøkende forbindelse er meget viktig for in vivo-transfeksjon av genetisk materiale inn i en celle. DEAE-dekstran, selv om det ikke er toksisk for in vitro-formål, vil ikke være passende for in vivo-anvendelse som transfeksjonsstimulator. Komplekser av dendrimer-genetisk materiale, med eller uten stimulerende forbindelse, transfekterer ikke celler i vesentlig grad i nærvær av serum (eks. 66, fig. 42). En målsøkende forbindelse, som stimulerer binding av det genetiske materiale/dendrimer-komplekset til spesifikt målsøkte celler, underletter transfeksjon av det genetiske materiale inn i disse celler endog i nærvær av serum.

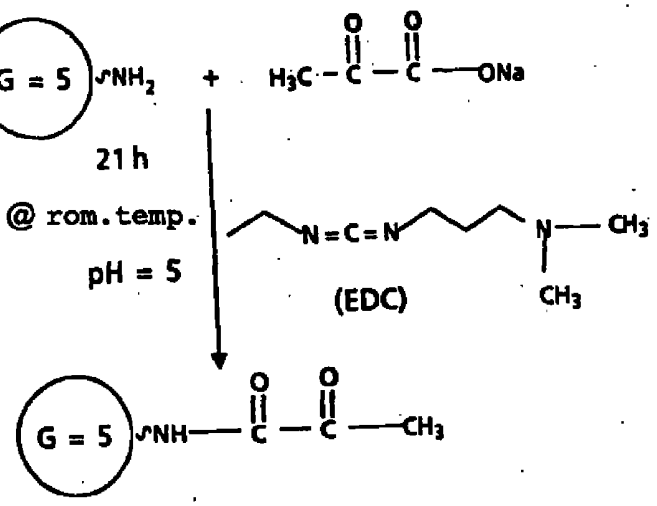
Målsøkende forbindelser eller modifiserte dendrimeroverflater kan også benyttes med dendrimer-genetisk materiale i nærvær av DEAE-dekstran in vitro for å øke transfeksjonen. Tilstedeværelsen av målsøkende forbindelser slik som galaktosetrisakkarid på dendrimeren synes å øke betydelig transfeksjon av genetisk materiale i celler som uttrykker reseptoren for dette sukker. Dette kan sammenlignes med transfeksjon som oppnås ved bruk av ikke-konjugert G11 (EDA) PAMAM-dendrimer. (Se fig. 40).

Passende målsøkende forbindelser omfatter ethvert materiale som binder spesifikt og med høy affinitet, f.eks. antistoff, antistoff-fragmenter slik som Fab, Fab', $F(ab')_2$-fragmenter, enkelt-kjedede antistoffer, eller ethvert annet antistoff-fragment som har den nødvendige målspesifisitet, glykoproteiner, proteiner, glykolipider, hormoner, og andre biologiske responsmoderatorer, epitoper, celle-ernæringsmidler, kjemiske funksjonelle grupper som viser mål-cellespsifisitet og lignende. Et antall veier vil være åpenbare for fagmannen på området for kobling av en målsøkende forbindelse til dendrimeren.

Én fremgangsmåte for å koble en foretrukket målsøkende forbindelse, biotin, til en dendrimer som har en aminosyre-overflategruppe illustreres skjematisk nedenfor:



Koblingen av pyrodruesyre som er en annen mulig målsøkende forbindelse, til en dendrimer som har aminofunksjons-overflategrupper går ifølge følgende reaksjon som viser koblingen mellom 64 pyruvater til G5-dendrimerer:



Graden av funksjonalisering mellom dendrimeren og den mål-søkende forbindelse er liten for å minimalisere interferens mellom den målsøkende forbindelse og den totale kationiske overflatekarakter til dendrimeren. Således er det støkiometriske forhold mellom målsøkende forbindelse til dendrimer-makromolekylet omtrent 1:1 til omtrent N_cNb^{G-1}:1. (hvor N_c og G defineres som tidligere og N_b er forgreningsgraden). På en dendrimer hvor $N_c = 3$, $N_b = 2$, krever dette bruken av bare én $N_cN_b^{G-1}$ terminale grupper, hvilket gjør at $N_cN_b^{G-1}$ utgjør 1 terminal gruppe som er tilgjengelig til å gi positiv karakter (f.eks. amino)-funksjon og innblandet negative karboksylfunksjonsgrupper i noen tilfeller. Dendrimerens vedvarende struktur, spesielt for tette stjernepolymerer og dendrimerer, tillater konjugering med høy grad av presisjon som ikke kan oppnås med annen type materiale. Denne presisjon gjør det mulig å fremstille målsøkende dendrimerer som beholder evnen til å binde og bære genetisk materiale.

Akkurat som individuelle dendrimermolekyler kan differensieres ved å koble til en målsøekende forbindelse, så kan også aggregater differensieres. Man kan koble en målsøkende forbindelse til alle dendrimer i aggregatet, eller til én eller en del av dem, som så blir aggregert med andre ikke-differensierte dendrimerer. Etter å blande de to typer under milde fysiologiske forbindelser (f.eks. pH 7,4) vil de to former bindes sammen basert på elektrostatiske reaksjoner. Denne nye fremgangsmåte tillater ikke bare en ny måte å syntetisere de differensierte dendrimeraggregatene, men gir også et system som kan avlevere de målsøkende delene ved fysiologiske betingelser.

G. Anvendelse av konjugater av genetisk materiale-dendrimer

Konjugatene av dendrittisk materiale-dendrimer ifølge foreliggende oppfinnelse kan benyttes for DNA-overføring enten in vivo eller in vitro. In vivo-bruk omfatter innføring av konjugatet i blodstrømmen for å nå en målsøkt celle, f.eks., DNA/dendrimer-kompleksene blir injisert inn i portalvenen for å nå hepatocytter. Kompleksene kan også injiseres i et spesielt lokalisert område av interesse, slik som et kne eller i peritonealhulen for å transfektere celler lokalt. Transdermal innføring av konjugatet i kroppen kan også benyttes, og som med andre teknikker kan det bli benyttet på en måte som ligner for å innføre legemidler i kroppen.

En målsøkende forbindelse på dendrimeren tillater dirigering og binding av konjugatet til en celleoverflate-reseptor og dens deretter transfeksjon via endocytose. Fig. 51 illustrerer den hypotetiske fremgangsmåte for et målsøkende DNA:dendrimer-kompleks i transfeksjon av en celle. Ved "A", blir DNA (10) kompleksbundet og konsentrert sammen emd et antall tette stjernedendrimerer (20) med påkoblet målsøkende forbindelse (30). Ved "B", har konjugatet (10-20-30) bundet seg til en celle (40) på reseptorene (50) via den målsøkende forbindelse (30). Ved "C", har transfeksjonen funnet sted, ettersom DNA (10)-dissosiasjon fra dendrimeren (20) er illustrert, hvilket underletter den etterfølgende transkripsjon og translasjon.

Radionuklidestudier indikerer at en vesentlig del av det transfekterte gentiske materiale går inn i kjernen av eukaryote celler (eks. 70, fig. 47, A-F). Resultatet av dendrimer-transfektert genetisk materiale viser utmerket holdbarhet (eks. 68, fig. 44). LUCIFERASE® enzymatisk aktivitet er uttalt etter 21 timer, og er fremdeles vesentlig ved 45 timer etter transfeksjon, og en viss aktivitet fortsetter selv ved 69 timer. Ekspresjon av lacZ-genet avgitt til cellene med RSV-β-gal-plasmidet og dendrimer er fotografisk vist i fig. 48, 49 og 50 (se også eks. 71). Cellene som uttrykker lacZ-genet er cellene som er blitt mørklagt i figurene. Under passende betingelser blir nesten hver celle fravet, hvilket dokumenterer at transfeksjon er skjedd i nesten alle celler i kulturen.

DNA/dendrimer-kompleksene per se har meget lav cytotoksisitet (eks. 69, fig. 45 og 46). Normal celledød i kultur er ca. 5 til 10%. Tilsetningen av DNA/dendrimer-kompleksene til cellekulturen øker ikke nevneverdig dødshastigheten. Tilsetning av DEAE-dekstran med DNA/dendrimer-komplekset øker toksisiteten, men ikke tilstrekkelig til å hindre dens anvendelse in vitro (fig. 45 og 46). Det foregående er blitt vist for en rekke ulike celletyper (ibid).

Genetisk materiale transfektert ifølge foreliggende oppfinnelse kan inkorporeres permanent i kromosomalt DNA i cellen og blir på en vellykket måte reprodusert og båret videre i etterfølgende generasjonskloner (eks. 72, fig. 52 og 53). Gener som utvikler G4 18 (neomycin)- resistens og β-galaktosidase ble transfektert på vellykkket måte inn i D5 og RAT2-cellelinjer ved bruk av teknikkene ifølge foreliggende oppfinnelse. Begge genene ble avgitt på en enkel RSV-β-gal-NEO-plasmid. Disse cellelinjer replikerer hver 24 time. 4 uker etter transfeksjon, fortsatte de nylig dannede kloner å utvikle neomycin-resistens og

β-galaktosidase. Resultatene som er oppnådd ved bruk av teknikkene ifølge foreliggende oppfinnelse er overraskende overlegne sammenlignet med tidligere teknikker, slik som formidling av transfeksjon med kalsiumfosfat eller DEAE-dekstran alene. Lignende resultater er oppnådd når rapportgener fra ulike ekspresjonsplasmider ko-transfekteres (f.eks. neomycin eller β-galaktosidase).

Transfeksjon av genetisk materiale kan også oppnås ved bruk av andre typer dendrittiske polymerer enn tette stjernepolymerer, f.eks. lysin-basert, ikke-symmetrisk grenet dendrimer, er vist i eks. 73 (fig. 54). Alle disse betingelser i de forangående diskusjoner av transfeksjon med tette stjernepolymerer gjelder også transfeksjon ved bruk av andre typer dendrittiske polymerer. F.eks. DEAE-dekstran øker også synergistisk slik transfeksjon med en asymmetrisk lysin-dendrimer ved ladningsforhold på 1:5 til 1:10 DNA:dendrimer.

Eksempler

Følgende eksempler illustrerer videre oppfinnelsen. De bokstaverte eksempler omfatter fremstillingen av startmaterialer; de nummererte eksemplene vedrører fremstillingen av produkter i denne oppfinnelse.

I de følgende eksempler, ble følgende betegnelser og betingelser benyttet med mindre annet er spesifisert.

Ordliste:

Omgivelsestemperatur betyr romtemperatur eller ca. 20 til ca. 25°C.

ASGPR betyr asialoglykoprotein-reseptor.

BHA betyr benzhydrylamin.

β-gal betyr RSV-lacZ.

Bindingsbuffer betyr en spesifikk bufferløsning som beskrevet heretter under protokoll for dendrimer-dekstran-transfeksjon, dag 2, trinn 1, diskusjon vedrørende fremstilling av løsningen.

BOC betyr t-butoksykarbonyl.

Kons. betyr konsentrert.

Cyt c betyr proteinet, cytokrom c.

DCC betyr dicykloheksylkarbodiimid.

DEAE-dekstran betyr en dietylaminoetyleter av dekstran, en elektropositivt ladet polymer.

DMEM betyr Dulbeccos modifiserte Eagles Medium.

DMF betyr dimetylformamid.

DMSO betyr dimetylsulfoksyd.

DO3A betyr 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trieddiksyre.

DOTA betyr 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraeddiksyre.

DTAF betyr diklortriazinyl-fluorescein.

DTPA betyr dietylentriaminpentaeddiksyre.

DTPMP betyr dietylentriaminpentametylenfosfonsyre.

DTT betyr 1,4-ditiotreitol.

EBV betyr Epstein-Barr-virus.

EBV-A betyr ekspresjonsplasmid som produserer et hygromycin B fosfotransferaseprotein som inaktiverer HYGROMYCIN B® antibiotika fra et kinasegen dirigert av EBV-promotoren.

EDA betyr etylendiamin.

EDAC betyr 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)-karbodiimid.

EDC betyr 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylkarbodiimid.

EDTA betyr etylendiamintetraeddiksyre.

FACS-analyse betyr fluroescens-aktivert cellesortering.

FITC betyr fluorescein-isotiocyanat.

G eller Gen betyr dendrimergenerasjonen.

GC betyr gasskromatografi.

GGE betyr gradient gel-elektroforese.

HBS betyr Hank's bufret saltvann.

HEPES = N-2-hydroksyetylpiperazin-N'-2-etansulfonsyre.

HOBT betyr N-hydroksybenzotriazol.

HPLC betyr høytrykks væskekromatografi.

HRP betyr pepper-rot-peroksydase.

HYGROMYCIN B® er et aminoglykosid-antibiotikum fremstilt fra Streptomyces hygroscopicus.

ICAM betyr intercellulært celleadhesjonsmolekyl.

Immunoglobuliner betyr IgG, IgM, IgA, IgD og IgE, inkludert Fab, $F(ab')_2$ og andre fragmenter.

LC betyr væskekromatografi.

LUCIFERASE® betyr et enzym fremstilt fra ildflue-luciferasegenet, enzymet er tilgjengelig fra Promega, Madison, WI, US.

LUCIFIREN® betyr et substrat for å måle LUCIFERASE® enzymaktivitet.

MB + betyr en kationisk form av farvestoffet, metylenblått.

NHS-LC-biotin betyr en standard forlengerarm med linker som benyttes med biotin.

NMP betyr N-metylpyrrolidon.

Over natten betyr fra ca. 9 til 18 timer.

PAMAM betyr polyamidoamin.

PBS betyr fosfatbufret saltvann (kjøpt fra Sigma Chemical), inneholdende 120 mM NaCl, 2,7 mM KCl og 10 mM fosfatbuffer, pH 7,4.

PEI betyr polyetylenimin.

P_i betyr uorganisk fosfat (benyttet i buffere).

PTFE betyr polytetrafluoretylen.

RSV-β-gal-NEO betyr ekspresjonsplasmid som produserer β-galaktosidaseprotein fra lacZ-genet og aminoglykosid-fosfotransferaseprotein fra APH-genet (NEO)kontrollert av RSV-promoteren.

RSV-lac betyr ekspresjonsplasmid produserende β-galaktosidaseprotein fra lacZ-genet kontrollert av en RSV-promoter.

RSV-luc betyr et rapportplasmid som uttrykker ildflue-luciferasegenet aktivert av RSV-promoteren.

SDS betyr natriumdodecylsulfat.

SP-Sephadex® C-25-harpiks er en kationebytterharpiks som har sulfonsyre som funksjonell gruppe, solgt av Pharmacia, Inc.

TREN betyr tris-(2-aminoetyl)amin.

THF betyr tetrahydrofuran.

TLC betyr tynnsjiktskromatografi.

TMB betyr 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin.

TRIS-glycin betyr N-[2-hydroksy-1,1-bis(hydroksymetyl)-etyl]glycin.

TRIS betyr tris-aminbuffer, d.v.s. tris(hydroksymetyl)aminometan.

Triton X-100 betyr oktoxynol-9, og er den etoksylerte alkylfenol som generelt kan uttrykkes i formelen $C_8H_{17}C_6H_4(OCH_2CH_2)_nOH$ hvor n har en gjennomsnittlig verdi på 9 (kjøpt fra Rohm & Hass), en overflateaktiv forbindelse.

X-gal betyr 5-brom-4-klor-3-indolyl-β-D-galaktosid.

Generelle eksperimentelle betingelser

Massespektra ble oppnådd på enten et Finnigan TSQ massespektrometer (Q^1MS modell) eller et VGZAB-MS høyresolusjons-massespektrometer (hurtig atombombe-bombardement med xenon, ved bruk av 3:1 ditiotreitol:ditioerytritol).

^1H og ^{13}C NMR-spektra ble oppnådd ved bruk av Varian VXR-300 Bruker APC 300, IBM/Bruker NR-80 eller Jeol FX 400 spektrometer. Alle spektra ble oppnådd ved 30°C med mindre annet er angitt. ^1H NMR ble utført ved 300 MHz, 80 MHz eller 400 MHz, med utstyret oppført ovenfor; ^{13}C NMR ble utført ved 75MHz, 20 MHz eller 100 MHz, med utstyret oppført ovenfor. Verdiene for NMR er δ versus TMS (tetrametylsilan) eller når D_2O var løsningsmidlet versus DSS (2,2-dimetyl-2-silapentan-5-sulfonsyre, natriumsalt).

Infrarødt spektrum (IR) ble registert på et Nicolet 55X FT/IR-instrument.

For kromatografimetoder, var de fleste løsninger Fisher HPLC gradmaterialer. Ammoniumacetat ble kjøpt fra Aldrich. Vann ble renset ved bruk av Barnstead NANOpure® vann-

filtrasjonssystem. Preparativ kromatografi av organiske forbindelser ble utført enten ved hjelp av normal gravitetskromatografi ved bruk av standard teknikker eller ved hurtig-kromatografi som beskrevet av C.W. Still et al., J.Org. Chem. 43, 2923-24 (1978).

TLC og R_f-verdier er rapportert ved bruk av disse løsningssystemer og kommersielt tilgjengelig, normal fase, silika TLC-plater [GHLF 250 mikron, Analtech Inc. eller Merck Kiesel-gel $60F_{254}$]. Preparativ søylekromatografi ble utført ved bruk av Merck grad 60, 60Å silikagel.

Alle prosentangivelser er i forhold til vekt med mindre annet er nevnt.

pH-stat er en mekanisk ordning som måler og justerer pH i en løsning til en på forhånd bestemt, ønsket verdi ved tilsetning av en passende mengde av en på forhånd valgt syre
og/eller base.

Noen faste stoffer ble tørket ved bruk av roterende evaporering (Buchi 461) og/eller en vakuumovn ved en temperatur på ca. 55-60°C i løpet av flere timer. I tillegg ble en Virtis modell 10-010 automatisk frysetørker eller Speed Vac®-konsentrator benyttet for å fjerne løsninger.

HPLC-søyler som ble benyttet var: håndpakket Q-Sepharose® (Pharmacia) enten 1,5 cm x 25 cm eller 2,5 cm x 25 cm; Zorbax® BIO Series GF-250 (9,4 mm x 25 cm) fra DuPont Instruments; Vydac® (varemerke til Separasjons Gruppen, Hesperia, CA) protein C-4 (4,6 mm x 25 cm) fra Separasjons Gruppen (Hesperia, CA); Mono-Q® og SP-Sephadex® (varemerke til Pharmacia Biotechnology Products) fra Pharmacia; Sep-Pak® (varemerke til Waters Associates) C-18 patron ble kjøpt fra Waters Associates (Milford, MA); Sephadex® G-25 engangs-søyler (2,2 ml) fra Isolab Inc. (Akron, OH); Centricon® - 30 (varemerke fra Amicon Division, W.R. Grace & Co., Danvers, MA) mikrokonsentrerings-utstyr fra Amicon; og Spherisorb® ODS-1 (varemerke til Phase Separation, Ltd.).

For sentrifugering og konsentrering ble en Sorvall RT 6000B (kjølesentrifuge fra DuPont) benyttet. En Speed Vac-konsentrator (Savant Instruments Inc., Hicksville, N.Y.) ble benyttet for å fjerne flyktige løsningsmidler.

Eksempel A: Fremstilling av 2-karboksamido-3-(4'-nitrofenyl)-propanamid

p-nitrobenzylmalonat-dietylester (2,4 g, 8,13 mmol) ble løst opp i 35 ml metanol. Løsningen ble varmet opp til 50-55°C under omrøring og en strøm av anhydridammoniakk ble boblet gjennom løsningen i 64 timer. Løsningen ble avkjølt og det hvite luftige produkt ble filtrert og rekrystallisert fra 225 ml kokende metanol til å gi 1,85 g (7,80 mmol) av bis-amid med 96% utbytte, [smp. = 235,6°C(d)]. Tittelstrukturen ble bekreftet ved MS, ^1H og ^{13}C NMR-spektroskopi.

Anal.: Beregnet for $C_{10}H_{11}O_4N_3$

C H N

Teoretisk:	50,63	4,69	17,72
Funnet:	50,75	4,81	17,94

Eksempel B: Fremstilling av 1-amino-2-(aminometyl)-3-(4'-nitrofenyl)propan

2-karboksamido-3-(4'-nitrofenyl)propanamid (2,0 g, 8,43 mmol) ble løst opp i 35 ml tørt THF under nitrogenatmosfære under omrøring. Til denne blanding ble satt boran/THF-kompleks (106 ml, 106 mmol) ved hjelp av sprøyte. Reaksjonsblandingen ble så oppvarmet til tilbakeløp i 48 timer under hvilken tid det suspenderte amid løste seg opp. Løsningen ble avkjølt og TFH ble fjernet i vakuum ved bruk av en roterende evaporator. Det urene produkt og boranresten ble løst opp i 50 ml etanol og denne løsning ble gjennomboblet med vannfri hydrogenkloridgass. Løsningen ble refluksert i 1 time og løsningsmidlet fjernet i vakuum. Det grove hydrokloridsaltet ble løst opp i 15 ml deionisert vann og ekstrahert med to 50 ml porsjoner av metylenklorid. Det vandige laget ble avkjølt på isbad under et argonteppe og 50% natriumhydroksyd ble langsomt tilsatt til basis pH = 11,7. Det basiske vandige laget ble ekstrahert med fire porsjoner 25 ml metylenklorid og disse kombinerte ekstrakter ble avdampet ved bruk av en roterende fordamper til å gi 1,45 g av farvet olje. Denne olje ble triturert med dietyleter (50 ml) og filtrert under trykk gjennom en kort silikagel (grad 62 Aldrich)-søyle. Søylen ble vasket med 100 ml eter og de kombinerte filtrater ble vakuum-fordampet til å gi 1,05 g (5,02 mmol) av det tittelbenevnte diaminet som en klar olje [smp. = 275-278°C(d) bis-HCl-salt]. Tittelstrukturen ble bekreftet ved MS, ^{1}H og ^{13}C NMR-spektroskopi.
Anal.: Beregnet for $C_{10}H_{17}N_3O_2Cl_2$

	C	H	N
Teoretisk:	42,57	6,07	14,89
Funnet:	43,00	6,14	15,31

Eksempel C: Fremstilling av 1-amino-2-(aminometyl)-3-(4'-aminofenyl)propan

Boran/THF-løsning (70 ml, 70 mmol) ble tilsatt under nitrogen ved hjelp av en nålkanyle i en flaske som inneholdt 4-aminobenzylmalonamid (1,5 g, 7,24 mmol) under omrøring. Løsningen ble varmet opp til tilbakeløp i 40 timer. Den farveløse løsning ble avkjølt og overskudd THF fjernet ved hjelp av roterende fordampning hvilket ga en klar gelatinøs olje. Metanol (50 ml) ble tilsatt forsiktig til oljen med merkbar gassutvikling. Tørt hydrogenklorid ble boblet gjennom suspensjonen for å fremme oppløsning, og løsningen ble så tilbakeløpbehandlet i 1 min. Metanol/HCl-løsningen ble fjernet ved hjelp av roterende fordampning og det resulterende hydrokloridsaltet båret gjennom den samme oppløsning/refluks-prosedyre igjen. Hydrokloridsaltet som ble oppnådd ble løst opp i 10 ml vann og avkjølt på isbad under argon. Konsentrert natriumhydroksyd (50%) ble tilsatt

langsomt under omrøring til pH = 11. Den vandige delen ble så ekstrahert med 2 x 100 ml porsjoner av kloroform som ble kombinert og filtrert gjennom en kort silikagel-plugg uten tørking. Løsningen ble fjernet med vakuum (roterende evaporator) hvilket tittelforbindelsen (0,90 g, 5,02 mmol) med 70% utbytte (R_f = 0,65-$CHCl_3$/MeOH/-NH_4 OH konsentrert - 2/2/1). Tittelstrukturen ble bekreftet ved ^1H og ^{13}C NMR spektroskopi og benyttet uten videre rensing.

Eksempel D: Fremstilling av 6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetra-aza-5,7-dioksoundekan

4-aminobenzylmalonat-dimetylester (2,03 g, 8,43 mmol) ble oppløst i 10 ml metanol. Løsningen ble tilsatt dråpevis til en omrørt løsning av nylig destillert etylendiamin (6,00 g, 103,4 mmol) i 10 ml metanol under nitrogen i løpet av 2 timer. Den kalre løsning ble rørt i 4 dager og TLC-analyse viste total overføring av diester (R_f = 0,91) til bis-amidet (R_f = 0,42-20% konsentrert NH_4OH/80% etanol). Dette materiale var sterkt ninhydrin positivt. Metanolen og overskudd diamin ble fjernet på en roterende fordamper og det resulterende hvite faste stoff ble vakuum-tørket (10^{-1} mm, 50°C) over natten til å gi det urene produkt (2,45 g, 8,36 mmol) med 99% utbytte. En analytisk prøve ble rekrystallisert fra kloroform/heksan, MP = 160-161°C. Massespektrum, ^1H og ^{13}C NMR-resultater var forenlige med strukturen til tittelforbindelsen.

Eksempel E: Reaksjon mellom mesylaziridin med 1-amino-2-(aminometyl)-3-(4-nitrofenyl)propan

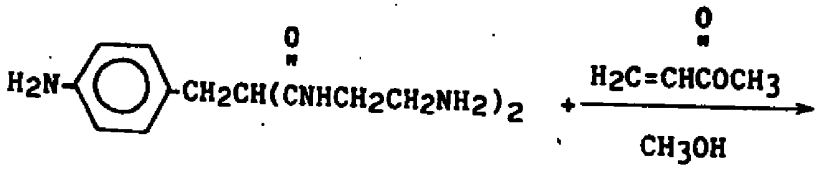
1-amino-2-(aminometyl)3-(4-nitrofenyl)propan (400 mg, 191 mmol, >96% rent, ble oppløst i 10,5 ml absolutt etanol under nitrogen. Mesylaziridin (950 mg, 7,85 mmol) ble satt til den omrørte diaminløsning som et fast stoff. Reaksjonen ble rørt ved 25°C i 14 timer ved bruk av en magnetisk rører og i løpet av denne periode dannet det seg et hvitt, gummiaktig bunnfall på siden av flasken. Etanolen ble dekantert og bunnfallet behandlet med en annen 15 ml porsjon av etanol for å fjerne alt ikke-reagert aziridin. Gummiproduktet ble vakuum-tørket (10^1 mm, 25°C) til å gi tetrakismetylsulfonamid (1,0 g, 1,44 mmol) med 75% utbytte (R_f = 0,74 - NH_4OH/etanol - 20/80). Tittelstrukturen ble bekreftet ved ^1H og ^{13}C NMR-spektroskopi.

Eksempel F: Fremstilling av 2-(4-nitrobenzyl)-1,3-(bis-N,N'-2-aminoetyl)diaminopropan

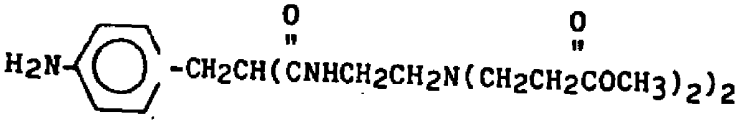
Det urene metylsulfonamid fra eks. E (650 mg, 0,94 mmol) ble oppløst i 5 ml nitrogen gjennomstrømmet, konsentrert svovelsyre (98%). Denne løsning ble holdt under

nitrogen og varmet opp til 143-146°C i 27 min. under kraftig omrøring. En liten formørkning ble lagt merke til og den avkjølte løsningen ble slått opp i en løsning av eter (60 ml) under omrøring. Det utfelte hvite saltet ble filtrert og straks løst opp i 10 ml deionisert vann. pH i løsningen ble justert til pH = 11 med 50% NaOH under argon under avkjøling. Den resulterende løsning ble blandet med 90 ml etanol og de utfelte uorganiske salter filtrert. Løsningen ble fjernet fra det urene aminet under redusert trykk og til den resulterende brune olje ble det tilsatt 190 ml toluen under nitrogen. Blandingen ble omrørt kraftig og vann fjernet ved hjelp av azeotropisk destillasjon (Dean-Stark-felle) til det gjenværende toluen antok en lysegul farve (30-40 ml forble i glasset). Toluenet ble avkjølt og dekantert fra det mørke utilgjengelige bunnfallet og saltet. Løsningen ble fjernet i vakuum og den resulterende lysegule olje ble vakuum-tørket (0,2 mm, 35°C) over natten hvilket ga 210 mg av tittelproduktet (60%) som ble karakterisert ved MS, ^{1}H og ^{13}C NMR-spektroskopi.

Eksempel G: Fremstilling av en STARBURST®-polymer (som inneholder et anilinderivat) i en halv-generasjon vist ved følgende formel:



Forbindelse nr. 1

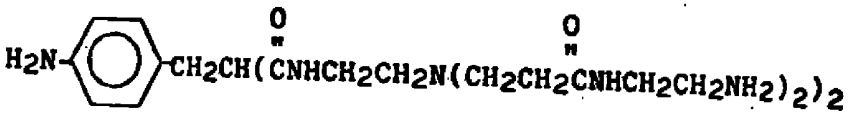


Forbindelse nr. 2

Metylakrylat (2,09 g, 24 mmol) ble løst opp i metanol (15 ml). Forbindelsen 6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioksoundekan (1,1 g, 3,8 mmol) (d.v.s. forbindelse nr. 1, fremstilling av denne forbindelse er vist i eks. D) ble oppløst i metanol (10 ml) og tilsatt langsomt i løpet av 2 timer med kraftig omrøring til metylakrylatløsningen. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 48 timer ved romtemperatur. Løsningen ble så fjernet og en roterende fordampning utført med temperatur på under 40°C. Estere (forbindelse nr. 2) ble fremstilt som en gul olje (2,6 g). Ingen karboksylering av anilinfunksjonen ble observert.

Eksempel H: Fremstilling av en STARBURST®-polymer (som inneholdt en anilindel) i én generasjon; vist ved følgende formel:

Forbindelse nr. 2 + $H_2NCH_2CH_2NH_2$ / CH_3OH

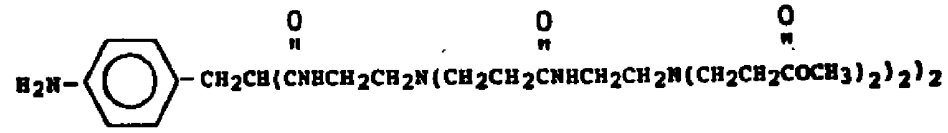


Forbindelse nr. 3

Esteren (forbindelse nr. 2) (2,6 g, 3,7 mmol) ble løst opp i metanol (100 ml). Denne ble omhyggelig satt til en kraftig omrørt løsning av etylendiamin (250 g, 4,18 mol) og metanol (100 ml) i en hastighet slik at temperaturen ikke steg over 40°C. Etter avsluttet tilsetning ble reaksjonsblandingen omrørt i 28 timer ved 35-40°C (varmekappe). Etter 28 timer kunne ingen estergrupper påvises ved hjelp av infrarødt spektroskopi. Løsningen ble fjernet under roterende fordampning ved 60°C. Overskudd etylendiamin ble fjernet ved bruk av en ternær azeotrop løsning av toluen/metanol/etylendiamin. Til slutt ble alt gjenværende toluen azeotrop-behandlet med metanol. Fjerning av metanolen ga 3,01 g av tittelproduktet (forbindelse nr. 3) som en orange glassaktig fast forbindelse.

Eksempel I: Fremstillin av en STARBURST®-polymer (som inneholder en anilin-andel) i 1 1/2 generasjon vist ved følgende formel:

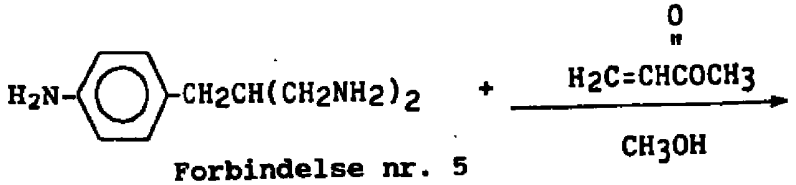
Forbindelse nr. 3 f.s77 + $H_2C{=}CHCOCH_3$ / CH_3OH



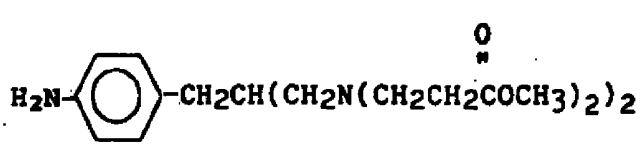
Forbindelse nr. 4

Aminet (forbindelse nr. 3) (2,7 g, 3,6 mmol) ble løst opp i metanol (7 ml) og tilsatt langsomt i løpet av 1 time til en omrørt løsning av metylakrylat (3,8 g, 44 mmol) i metanol (15 ml) ved romtemperatur. En lett oppvarming av løsningen ble observert under tilsetningen. Løsningen ble omrørt ved romtemperatur i 16 timer. Løsningen ble fjernet ved hjelp av roterende fordampning ved 40°C. Etter fjerning av alt løsningsmiddel og overskudd metylakrylat ga esteren (forb. nr. 4) 4,7 g i form av en orange olje.

Eksempel J: Fremstilling av en STARBURST®-polymer (som inneholder en anilinforbindelse) i 1/2 generasjon vist ved følgende formel:



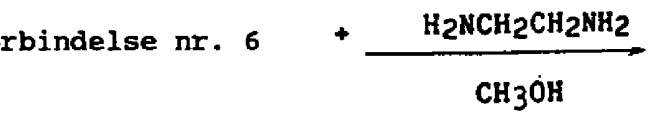
Forbindelse nr. 5

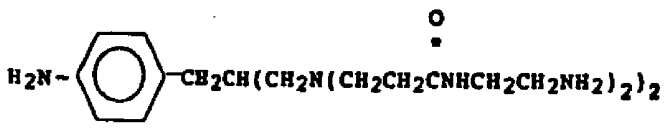


Forbindelse nr. 6

Triaminet (forb. nr. 5, fremstilling av denne forbindelse som vist i eks. C) (0,42 g, 2,3 mmol) ble løst opp i metanol (10 ml) og tilsatt dråpevis i løpet av 1 time, til metylakrylat (1,98 g, 32 mmol) i metanol (10 ml). Blandingen ble omrørt ved romtemperayur i 48 timer. Løsningen ble fjernet ved hjelp av roterende fordampning, temperaturen ble holdt ikke høyere enn 40°C. Overskudd metylakrylat ble fjernet ved gjentatt azeotrop destillasjon med metanol. Tittelesteren (forb. nr. 6) ble isolert som en orange olje (1,24 g).

Eksempel K: Fremstillin av en STARBURST®-polymer (som inneholder en anilinforbindelse) i 1 generasjon; representert ved følgende formel:



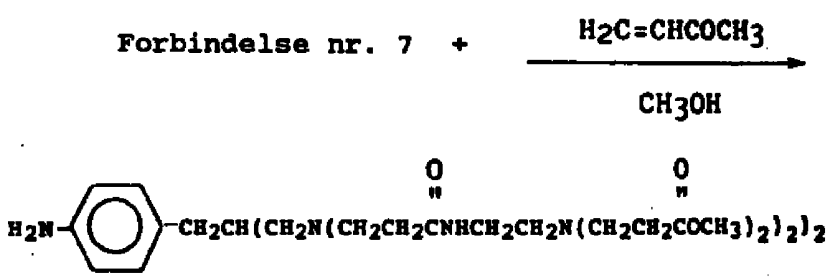


Forbindelse nr. 7

Esteren (forb. nr. 6) (1,24 g, 2,3 mmol) ble løst opp i metanol (50 ml) og tilsatt dråpevis i løpet av 2 timer til etylendiamin (73,4 g, 1,22 mol) i metanol (100 ml). En liten

eksoterm reaksjon ble observert og kraftig omrøring fortsatt. Løsningen ble fortsatt rørt ved romtemperatur i 72 timer. Løsningen ble fjernet ved roterende fordampning ved 60°C. Overskudd etylendiamin ble fjernet ved bruk av en ternær azeotrop behandling av toluen/metanol/etylendiamin. Til slutt ble alt gjenværende toluen fjernet med metanol, og så pumpet over med en vakuum-pumpe i 48 timer slik at aminet nevnt i tittelen (forb. nr. 7) (1,86 g) ble isolert som en gul/orange olje.

Eksempel L: Fremstilling av en STARBURST®-polymer (som inneholder en anilinforbindelse) (i 1 1/2 generasjon (G1,5); vist ved følgende formel:



Forbindelse nr. 8

Aminet (forb. nr. 7) (1,45 g, spor av metanol til stede) ble løst opp i metanol (100 ml) og tilsatt langsomt i løpet av 1,5 time til en omrørt løsning av metylakrylat (5,80 g) i metanol (20 ml). Løsningen ble tillatt å omrøres i 24 timer ved romtemperatur. Fjerning av løsningsmidlet ble etterfulgt av gjentatt azeotropisk destillasjon med metanol hvilket muliggjorde fjerning av alt overskudd metylakrylat. Etter pumpeisolering ved hjelp av en vakuum-pumpe i løpet av 48 timer ble tittelesteren (forb. nr. 8) isolert som en orange olje (2,50 g, 1,8 mmol).

Eksempel M: Hydrolyse av (G4,5) dendrimer og fremstilling av kalsiumsalt

4,5 generasjon PAMAM (estergrupper endestilt, starter fra NH_3) (2,11 g, 10,92 mekv.) ble løst opp i 25 ml metanol som opptok 10% NaOH (4,37 ml, 10.92 mekv.) (pH = 11,5-12). Etter 24 timer ved romtemperatur var pH ca. 9,5. Etter ytterligere 20 timer ble løsningen fjernet ved bruk av roterende fordampning, 50 ml toluen tilsatt, og fordampet igjen.

Den resulterende olje ble løst opp i 25 ml metanol og utfelt som en hvit gummimasse etter tilsetning av 25 ml dietyleter. Løsningen ble dekantert, og gummimaterialet fordampet til å gi et meget fint nesten hvitt pulver som ved videre tørking ga 2,16 g produkt (98% utbytte). Ingen estergrupper ble funnet etter NMR og infrarød analyse.

Natriumsaltet til 4,5 Generasjon PAMAM (ester-endestilte grupper, starter fra NH_3) ble erstattet med kalsiumsalt ved hjelp av dialyse. Natriumsaltet (1,03 g) ble løst opp i 100 ml vann og filtrert gjennom hule fiberrør (avskjæringspunkt: 5000) ved 3 ml/min. Det ytre av rørene ble badet i 5% kalsiumkloridløsning. Fremgangsmåten ble så gjentatt.

Den resulterende løsning ble så igjen dialysert, denne gang mot vann, så gjentatt ytterligere 2 ganger.

Fordampning ga 0,6 g av vått, fast materiale, som ble tatt opp i metanol (ikke fullstendig løselig) og tørket slik at man fikk 0,45 g av tittelproduktet som nesten hvite krystaller.

$C_{369}H_{592}O_{141}N_{91}Ca_{24}$ MV = 9526,3

	C	H	N	Ca	
Teoretisk:	46,5	6,32	13,38	10,10	
Funnet:	47,34	7,00	13,85	8,83	

Eksempel N: Fremstilling av dendrimerer med endestilte karboksylatgrupper

Halv-generasjon STARBURST®-polyamidoaminer ble hydrolysert for å overføre deres terminale metylestergrupper til karboksylater. Dette ga sferoidale molekyler med negative ladninger fordelt på overflaten. Dendrimerene som ble hydrolysert varierte fra 0,5 generasjon (tre karboksylater) til 6,5 generasjon (192 karboksylater).

Produktene kunne gjenvinnes som Na^+, K^+, Cs^+ eller Rb^+-salter.

Eksempel O: N-t-butoksykarbonyl-4-aminobenzylmalonat-dimetylester

4-aminobenzylmalonat-dimetylester (11,62 g, 49 mmol) ble løst opp i 50 ml t-butanol:vann (60:40 v:v) under omrøring. Di-t-butoksydikarbonat (19,79 g, 90 mmol) ble tilsatt og reaksjonsblandingen omrørt over natten. Butanolen ble fjernet under roterende fordampning, hvilket ga en gul løsning av produktet i vann. Ekstraksjon i metylenklorid, tørking ($MgSO_4$) og fordampning ga en gul olje (21,05 g, forurenset med di-t-butoksydikarbonat). Rekrystallisering fra 2-propanol:vann (75:25) ga blekgule krystaller (11,1 g, 33 mmol, 67%) av tittelproduktet. Strukturen ble bekreftet ved ^{13}C NMR-spektroskopi og renhet undersøkt ved hjelp av HPLC-analyse (Spherisorb® ODS-1, 0,05M H_3PO_4pH3:CH_3CN 55:45). Materialet ble benyttet uten videre rensing.

Eksempel P: N-t-butoksykarbonyl-6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioksoundekan

N-t-butoksykarbonyl-4-aminobenzylmalonat-dimetylester (8,82 g, 26 mmol), fremstilt i eks. O, ble løst opp i 50 ml metanol. Løsningen ble tilsatt dråpevis (2 timer) til en løsning av nylig destillert etylendiamin (188 g, 3,13 mmol) og 20 ml metanol, under nitrogenatmosfære. Løsningen ble omrørt i 24 timer. Etylendiamin/metanol-løsningen ble fjernet ved hjelp av roterende fordampning. Bunnfallet ble løst opp i metanol og toluen ble tilsatt. Løsningen ble fjernet ved hjelp av roterende fordampning og ga et urent produkt som et hvitt fast materiale (10,70 g forurenset med etylendiamin). prøven ble delt opp i to for videre rensing. Azeotrop fjerning av etylendiamin med toluen, ved bruk av en ekstraktor med sulfon-ionebyttermateriale i utstyret for å fange opp etylendiaminet, ga delvis nedbrytning av produktet og resulterte i en brun olje. Det gjenværende produkt ble isolert som et hvitt fast materiale fra toluenet etter avkjøling (2,3 g, ca. 50%). Analyse av en 10% løsning i metanol ved hjelp av GC (Column, Tenax 60/80) viste ikke noe tilstedeværende etylendiamin i prøven (<0,1%). Den andre fraksjonen ble løst opp i metanol for å gi en 10% løsning (i vekt) og renset fra etylendiaminet ved hjelp av revers osmose, ved bruk av metanol som løsnings-middel. (Filmtec® FT-30-membran og en Amicon® TC1R tynn kanalseparator; EDA gikk tvers over membranen). Produktet ble isolert som et hvitt fast stoff (2,7 g), hvor det ikke var noen påvisbare mengder etylendiamin undersøkt ved hjelp av GC. ^{13}C NMR-resultatene og HPLC-analysen (Spherisorb® ODS-1, 0,05M H_3PO_4pH3:CH_3CN 55:45) var forenelig med den foreslåtte tittelstruktur. Produktet ble benyttet uten videre rensing.

Eksempel Q: Fremstlling av en STARBURST®-dendrimer av 1/2 generasjon (G0,5) fra N-t-butoksykarbonyl-6-(4-aminobenzyl)-1,4,8-11-tetraaza-5,7-dioksoundekan.

N-t-butoksykarbonyl-6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioksoundekan (5,0 g, 13 mmol), fremstilt i eks. P, ble løst opp i 100 ml metanol. Metylakrylat (6,12 g, 68 mmol) ble tilsatt og løsningen rørt ved romtemperatur i 72 timer. Reaksjonen ble fulgt ved HPLC (Spherisorb®ODS1, acetonitril:- 0,04M ammoniumacetat 40:60) for å optimalisere overføringen til det ønskede produkt. Løsningen ble konsentrert i 30% faste forbindelser, og metylakrylat (3,0 g, 32 mmol) tilsatt. Reaksjonsblandingen ble rørt ved romtemperatur til ingen delvis alkylerte produkter ble påvist ved hjelp av HPLC (24 timer). Fjerning av løsninsmidlet ved 30°C ved bruk av roterende fordampning, og pumping ved 1 mm Hg i 24 timer, ga produktet som en gul viskøs olje, utbytte 7,81 g. ^{13}C NMR-resultatene var forenlige med strukturen nevnt i tittelen. Produktet ble benyttet uten videre rensing.

Eksempel R: Fremstilling av en STARBURST®-dendrimer i én full generasjon (G1,0) fra N-t-butoksykarbonyl-6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioksoundekan.

Halv-generasjonsproduktet (eks. Q) (7,70 g, 10,45 mmol) ble løst opp i 75 ml metanol og tilsatt dråpevis i løpet av 2 timer til en omrørt løsning med etylendiamin (400 ml, 7,41 mol) og metanol (50 ml). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i

48 timer. Etylendiamin og metanolen ble fjernet ved roterende fordampning til å gi en gul olje (11,8 g kontaminert med etylendiamin). Produktet ble løst opp i 90 ml metanol, renset fra etylendiamin ved revers osmose (Filmtec® FT-30 membran og Amicon® TC1R tynn kanalseparator, metanol som løsningsmiddel). Etter 48 timer kunne intet etylendiamin påvises ved GC (Column, Tenax® 60/80). Fjerning av løsningsmidlet ved roterende fordampning, etterfulgt av pumping ved bruk av vakuum i 24 timer resulterte i produktet som en gul glassaktig masse (6,72 g). Analyse ved hjelp av HPLC, PLRP-S-søyle, acetonitril:0,015M NaOH, 10-20% gradient i 20 min. og ^{13}C NMR-analyse var forenlig med strukturen vist i tittelen.

Eksempel S: Fremstilling av en STARBURST®-polymer på 1 1/2 generasjon (G1,5) fra N-t-butoksykarbonyl-6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioksoundekan.

Et generasjonsprodukt (eks. R) (2,14 g, 25 mmol) ble løst opp i 12,5 ml metanol, og tilsatt metylakrylat (3,5 g, 39 mmol) i 5 ml metanol. Løsningen ble rørt ved romtemperatur i 48 timer, analysert ved hjelp av HPLC (Spherisorb® ODS-1, acetonitril:0,04M ammoniumacetat, 60:40). En annen prøve av metylakrylat ble tilsatt (3,5 g, 39 mmol) og reaksjonsblandingen omrørt ved romtemperatur i ytterligere 72 timer. Fjerning av løsningen ved roterende fordampning ga tittelproduktet som en gul olje (3,9 g) etter bruk av en vakuumpumpe natten over. Produktet ble benyttet uten videre rensing.

Eksempel T: Fremstilling av en STARBURST®-polymer i to fulle generasjoner (G2,0) fra N-t-butoksykarbonyl-6-(4-aminobenzyl)-1,4,8,11-tetraaza-5,7-dioksoundekan.

1 1/2 generasjonsproduktet (eks. S) (3,9 g, 2,5 mmol) ble løst opp i 50 ml metanol, og tilsatt dråpevis i løpet av 2 timer en omrørt løsning etylendiamin (600 g, 10 mol) og metanol (50 ml). Løsningen ble rørt ved romtemperatur under nitrogenatmosfære i 96 timer. Etylendiamin/metanol ble fjernet ved roterende fordampning til å gi et gult, glassaktig materiale (4,4 g forurenset med etylendiamin). En 10% løsning av produktet ble laget i metanol, og renset fra etylendiamin ved revers osmose (Filmtec® FT-30 membran og en Amicon® TC1R tynn separator) inntil intet dietylenamin kunne påvises ved GC (Column, Tenax 60/80). Fjerning av løsningsmidlet ga produktet som et gult, glassaktig materiale /3,52 g). ^{13}C NMR-data og HPLC-analyse (PLRP-S-søyle, acetonitril:0,015M NaOH, 10-20% gradient i 20 min.) var forenlig med strukturen nevnt i tittelen.

Eksempel U: Reaksjon til de to generasjon (G2,0) STARBURST®-polymerer med brom-eddiksyre for å utvikle en metylenkarboksylat-terminert STARBURST®-dendrimer.

Det andre genersjonsproduktet (eks. T) (0,22 g, 0,13 mmol) ble løst opp i 15 ml deionisert vann og temperaturen ekvilibrert ved 40,5°C. Brom-eddiksyre (0,48 g, 3,5 mmol) og litiumhydroksyd (0,13 g, 3,3 mmol) ble løst opp i 5 ml deionisert vann, og tilsatt reaksjonsblandingen. Reaksjonens pH ble omhyggelig opprettholdt ved 9, ved anvendelse av pH stat (titrering ved 0,1N NaOH) ved 40,5°C over

natten. Avlesning ved revers fase HPLC, (Spherisorb®ODS-1-søyle, eluering med 0,25M H_3PO_4pH3 [NaOH]:acetonitril 85:15) bekreftet syntesen av hovedsakelig én enkelt komponent.

Eksempel V: Fremstilling av isotiocyanat funksjonsformet annen generasjon (G2,0) metylenkarboksylat-terminert STARBURST®-dendrimer.

5 ml av en 2,8 mM løsning av den annen generasjon metylen-karboksylat-terminert STARBURST®-dendrimer (eks. U) ble fortynnet med 20 ml vann og pH justert til 0,5 med konsentrert saltsyre. Etter 1 time ved romtemperatur ble blandingen analysert ved hjelp av HPLC for å bekrefte fjerningen av butoksykarbonylgruppen og så behandlet med 50% natriumhydroksyd for å justere pH til 7. En pH stat (titrering med 0,1N NaOH) ble benyttet for å holde pH ved 7 og 250 µl tiofosgen ble tilsatt. Etter 15 min. ved romtemperatur ble pH i blandingen justert til 5 med 1N HCl. Blandingen ble vasket med kloroform (20 ml x 2) så konsentrert ved roterende fordampning ved redusert trykk. Bunnfallet ble isolert, 0,91 g, hvilket er en blanding av isotiocyanat og salter.

Eksempel W: Fremstilling av annen generasjon (G2,0) STARBURST®-polyetylenimin-metansulfonamid.

Til en løsning av 125 g N-metansulfonyl-aziridin i 50 ml etanol ble tilsatt 25,0 g tris(2-aminoetyl)amin. Løsningen ble omrørt i romtemperatur i 4 dager. Vann ble tilsatt reaksjonsblandingen etter behov for å opprettholde homogeniteten til løsningen. Løsningsmidlet ble fjernet ved destillasjon i vakuum, og ga den annen generasjon STARBURST® PEI-metansulfonamid som et gult, glassaktig materiale (161 g).

Eksempel X: Spalting av metansulfonamider for å fremstille annen generasjon (G2.0) STARBURST®-polyetylenimin.

En løsning av 5,0 g av en annen generasjon STARBURST® PEI-metansulfonamid, fra eks. W, i 20 ml 38% HCl ble forseglet i en glassampulle. Ampullen ble varmet opp til 160°C i 16 timer, så avkjølt på isbad og åpnet. Løsningen ble fjernet ved destillasjon i vakuum og bunnfallet løst opp i vann. Etter justering av pH i løsningen til større enn eller lik 10 med 50% NaOH, ble løsningsmidlet fjernet ved destillasjon i vakuum. Toluen (150 ml) ble tilsatt bunnfallet og blandingen oppvarmet til tilbakeløp under en Dean-Stark-felle til ikke mer vann kunne fjernes. Løsningen ble filtrert for å fjerne salter og filtratet konsentrert i vakuum for å gi 1,9 g annen generasjon STARBURST® PEI som en gul oljeforbindelse.

Eksempel Y: Fremstilling av tredje generasjon (G3.0) STARBURST®-polyetylenimin-metanfulfonamid.

Til en løsning av 10,1 g annen generasjon STARBURST® PEI, fra eks. 10, ble 100 ml etanol tilsatt 36,6 g N-metansulfonyl-aziridin. Løsningen ble omrørt ved romtemperatur i 1 uke. Vann ble tilsatt etter behov for å vedlikeholde homogeniteten til løsningen. Løsningsmidlet ble fjernet ved destillasjon i vakuum til å gi tredje generasjon STARBURST® PEI-metansulfonamid som et gult, glassaktig materiale (45,3 g).

Eksempel Z: Spalting av metansulfonamider til å lage tredje generasjon (G3,0) STARBURST® polyetylenimin.

Metansulfonamidgruppene i tredje genrasjon STARBURST® PEI-metansulfonamid (5,0 g), fra eks. Y, ble fjernet ved hjelp av samme fremgangsmåte som beskrevet for det andre generasjonsmateriale i eks. X for å gi 2,3 g tredje generasjon STARBURST PEI som en gul olje.

Eksempel AA: Reaksjon til den tredje generasjon (G3,0) STARBURST®-polyetylenimin med (4-fluor)-nitrobenzen.

Tredje generasjon STARBURST® polyetylenimin (eks. Z) (1,06 g, 1,2 mmol) ble løst opp i 12 ml absolutt etanol. (4-fluor)nitrobenzen (120 μl, 1,2 mmol) ble tilsatt og reaksjonsblandingen oppvarmet over natten til tilbakeløp. Løsningsmidlet ble fjernet ved roterende fordampning, og den lysegule olje løst opp i vann. Den vandige løsning ble vasket i kloroform for å fjerne alt ikke-reagert (4-fluor)nitrobenzen. Fjerning av vannet ga produktet som en dypgul olje (0,80 g). ^{13}C NMR-spektret var forenlig med strukturen i tittelsen. (Det var ikke gjort noe forsøk på å bestemme den statistiske fordeling). Produktet ble benyttet uten videre rensing.

Eksempel BB: Reaksjon mellom nitrofenylderivatet i den tredje generasjon (G3,0) STARBURST® polyetylenimin og glykonitril.

Nitrofenylderivatet i den tredje generasjon STARBURST® polyetylenimin (eks. AA) (0,8 g) ble løst opp i 20 ml deionisert vann. Natriumhydroksyd (2,80 g, 50% vekt/vekt) ble tilsatt den omrørte løsningen og løsningen gjennomboblet med nitrogen, og ført gjennom et natriumhydroksyd-filter. Glyko-nitril (2,85 ml av en 70% vandig løsning) ble tilsatt ved romtemperatur. Det ble observert et gult bunnfall etter få minutter. Etter 2 timer ble temperaturen øket langsomt til tilbakeløp, og løsningen ble holdt ved tilbakeløp med nitrogen-gjennombobling i 24 timer. Fjerning av vannet ga produktet som et gult fast materiale forurenset med glykolsyre og natriumhydroksyd. ^{13}C NMR-spektret var forenlig med tittelstrukturen. Produktet ble benyttet uten videre rensing.

Eksempel CC: Hydrogenering av nitrofenylderivatet til aminofenylmetylenkarboksylat avsluttet tredje generasjon (G3,0) STARBURST® polyetylenimin.

Det gule faste materiale fra eks. BB (1,70 g) ble løst opp i 10 ml deionisert vann, og den resulterende pH i løsningen var ca. 11. Palladium-på-kull (200 mg av 5% Pd/C) ble

tilsatt reaksjonsblandingen i en Parr-risteflaske. Reaksjonsblandingen ble plassert under trykk på 40 psi (275 kPa) hydrogen, og rystet ved romtemperatur i et Parr-hydrogenerings-apparat, i 6 timer. Reaksjonsblandingen ble så filtrert gjennom et 0,5 μm Millipore®-filter for å fjerne Pd/C, og oppløsningen fjernet i vakuum og gel-filtrert gjennom en Biogel P2-harpiks (25 g svellet i vann). Surgjøring av HCl resulterte i en orange-brun løsning, som ble gjennomboblet med nitrogen over natten. Fjerning av løsningen i vakuum ga tittelproduktet som et saltsyresalt som var et lysebrunt, fast materiale (3,98 g, forurenset med NaCl og glykolsyre, maksimal teoretisk produktmengde 1,15 g). Produktet ble benyttet uten videre rensing.

Eksempel DD: Fremstilling av 4-isotiocyanat-fenylmetylenkarboksylat terminale grupper i tredje generasjon (G3,0) STARBURST®-polyetylenimin.

Produktet fra eks. CC (3,98 g) ble løst opp i 15 ml deionisert vann og en alikvot (2,5 ml) av denne løsning ble fortynnet med 10 ml vann. pH i løsningen ble justert til 7 med natriumhydroksyd. En pH stat (titrering med 1N NaOH) ble benyttet for å opprettholde pH, og 200 μl tiofosgen tilsatt. Etter 10 min. ble pH i blandingen justert til 4 med saltsyre. Vann ble fjernet ved roterende fordampning ved redusert trykk (en liten mengde N-butanol ble tilsatt for å hindre skumdannelse). Bunnfallet ble vasket med metylenklorid og deretter tørket. Det urene tittelprodukt (0,95 g) som var en blanding av isotiocyanat (0,14 g) og salter ble benyttet uten videre rensing.

Eksempel EE: Fremstilling av metylenkarboksylat-terminale grupper i annen generasjon (G2,0) STARBURST®-polyamidoamin (startet fra ammoniakk).

Den andre generasjon STARBURST®-polyamidoamin (2,71 g, 2,6 mmol) og bromeddiksyre (4,39 g, 31,6 mmol) ble løst opp i 30 ml deionisert vann og pH justert til 9,7 med 5N NaOH ved bruk av pH stat. Reaksjonen ble opprettholdt ved denne pH i 0,5 time, og temperaturen ble langsomt hevet til 60°C og holdt ved 60°C i 3 timer ved konstant pH. pH ble øket til 10,3, og reaksjonsblandingen forble under kontroll av pH stat ved romtemperatur over natten. Reaksjonsblandingen ble tilbakeløpsbehandlet i ytterligere 4 timer før videre arbeid. Fjerning av løsningsmidlet, og azeotrop destillasjon av de siste spor av vann med metanol ga tittelproduktet som et blekt gult pulver (8,7 g, kontaminert med natriumbromid). ^{13}C NMR-spektrum var forenlig med tittelstrukturen (med en viss forurensning på grunn av en liten mengde tilblandet materiale som et resultat av en viss mono-alkylering).

Eksempel FF: Fremstilling av metylenkarboksylat-terminale grupper i annen generasjon (G2,0) STARBURST®-polyetylenimin (startet fra ammoniakk).

Annen generasjon STARBURST®-polyetylenimin (2,73 g,

6,7 mmol), fra eks. X, og bromeddiksyre (11,29 g, 81 mmol) ble løst opp i 30 ml deionisert vann. pH ble langsomt hevet til 9,5 ved opprettholdelse av temperaturen under 30°C. Temperaturen ble øket langsomt til 55°C og reaksjonens pH holdt på 9,5 i 6 timer ved hjelp av en pH stat (titrering med 5N NaOH). pH ble hevet til 10,2, og holdt ved denne pH over natten. Fjerning av løsningsmidlet ved hjelp av fordampning under rotasjon, og azeotrop destillasjon av de siste spor av vann ved bruk av metanol, ga tittelproduktet som et gult pulver (17,9 g, kontaminert med natriumbromid). ^{13}C NMR-spektret var forenlig med tittelstrukturen (med en viss forurensning på grunn av en liten mengde materiale laget som et resultat av en viss monoalkylering).

Eksempel GG: Fremstilling av 3,5, 4,5, 5,5 og 6,5 generasjon STARBURST® PAMAM.

Til en 10 vekt% metanol-løsning på 2,46 g av tredje generasjon PAMAM STARBURST® ble tilsatt 2,32 g metylakrylat. Denne blanding ble tillatt å sitte ved romtemperatur i 64 timer. Etter at løsningsmiddel og overskudd metylakrylat var fjernet, ble 4,82 g av tittelproduktet (G3,5) gjenvunnet (105% av teoretisk verdi).

Fremstilling av høyere halv-generasjon STARBURST® PAMAM'er:

Generasjoner 4,5, 5,5 og 6,5 ble fremstilt som beskrevet ovenfor uten nevneverdige forskjeller i reaktantenes konsentrasjoner, reaktant-molforhold eller reaksjonstider.

Eksempel HH: Fremstilling av 4, 5 og 6 generasjon STARBURST® PAMAM.

Til 2000 g predestillert etylendiamin ble tilsatt 5,4 g av 4,5 generasjon STARBURST® PAMAM som en 15 vekt% løsning av metanol. Dette ble tillatt å være i ro ved romtemperatur i 48 timer. Metanolen og mesteparten av overskudd etylendiamin ble fjernet ved hjelp av fordampning under rotasjon under vannpumpe-vakuum ved en temperatur mindre enn 60°C. Den totale vekten av produktet som ble gjenvunnet var 8,07 g. På dette punkt viste GC at produktet fremdeles inneholdt 34 vekt% etylendiamin. En 5,94 g porsjon av dette produktet ble løst opp i 100 ml metanol og ultrafiltrert for å fjerne resterende etylendiamin. Ultrafiltreringen ble utført ved bruk av Amicon® TC1R tynn kanalresirkulerende separator utstyrt med en Amicon® YM2-membran. En intern trykkavlastningsventil ble benyttet for å opprettholde 55 psig (380 kPa) trykk over membranen. 100 ml ble først konsentrert til 15 ml ved å tvinge løsningsmidlet gjennom membranen. Etter denne første konsentrasjon ble strømhastigheten overført til et konstant volum retentat i gjensirklingsmodus i 18 timer. Etter denne tid, ble 60 ml metanol ført over membranen for å gjenvinne produkt som fremdeles var i denne delen og tilstøtende rør. Løsningsmidlet ble fjernet fra produktet og 2,53 g av femte generasjon (G5,0) STARBURST® PAMAM ble gjenvunnet. Analyse ved GC viste 0,3% rest-etylendiamin som ble igjen i produktet. Fremstilling av generasjon 4 og 6 fortsatte som ovenfor og den eneste forskjell var vektforhold mellom etylendiamin og startmateriale. For å fremstille fjerde generasjon var dette forhold 200:1 og for sjette generasjon var forholdet 730:1.

Eksempel II: Modifisering av polyamidoamin-dendrimerer ved reaksjon med epoksyoktan.

Til en løsning på 0,50 g av sjette generasjon PAMAM i 5 ml metanol ble tilsatt 0,56 g epoksyoktan. Etter 6 dager ved romtemperatur ble løsningsmidlet fordampet i vakuum til å gi 0,8 g farveløs olje. Materialet var løselig i kloroform, toluen eller metanol, men ikke i vann. ^{13}C NMR-spektrum var i tråd med en dendrimer med C-8-alkylgrupper bundet til sine terminale aminer.

Eksempel JJ: Modifisering av polyamidoamin-dendrimerer ved reaksjon med t-butyl-glycidyleter.

Til en løsning av 0,5 g sjette generasjon (G6,0) PAMAM i 5 ml metanol ble tilsatt 0,57 g t-butylglycidyleter. Etter 6 dager i romtemperatur ble løsningen fordampet i vakuum til å gi 1,0 g farveløs olje. Materialet ble løst i kloroform, toluen eller metanol, men ikke i vann. ^{13}C NMR-spektrum var i tråd med en dendrimer med 3-(t-butoksy)-1-propan-2-ol-grupper bundet til dens terminale aminer.

Eksempel KK: Modifisering av polyamidoamin-dendrimerer ved reaksjon med epoksyoktadekan.

Til en løsning av 0,50 g av sjette generasjon (G6,0) PAMAM i 25 ml metanol ble tilsatt 1,1 g epoksyoktadekan. Løsningen ble varmet opp til tilbakeløp i 5 dager. Under denne tid, ble en farveløs viskøs olje utfelt fra løsningen. Løsningsmidlet ble fordampet i vakuum til å gi 1,6 g av hvitt skum. Materialet var løselig i kloroform eller toluen, men ikke i vann eller metanol. ^{13}C NMR-spektret var ifølge med en dendrimer med C-18-alkylgrupper bundet til sine terminale aminer.

Eksempel LL: Reaksjon mellom STARBURST® PEI og et hydrofobt epoksyd.

I en flaske som var utstyrt med magnetisk rører ble det tilsatt 0,397 g (2×10^{-4} mol) av fjerde generasjon (G4,0) PEI (NH_3 kjerne; MV 1.955) og 2,1 g ($9,6 \times 10^{-3}$ mol) metyl-10,11-oksoundekanoat (MV 214,3); i 5 ml metanol. Reakjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 1 dag og så varmet til 80°C i 8 timer for å gi en brun, viskøs sirup. Etter avslutning av reaksjonen som åpner ringen ble karbometoksy-terminert, hydrofob dendrimer utviklet og dette ble bekreftet ved NMR-analyse og sammenligning til modellsystemet.

Den ovenfor hydrofobe dendrimer ble overført til vannløselig form ved en enkel kombinasjon mellom en ekvivalent mengde av dette produkt med natriumhydroksyd i vann og oppvarming i 30-60 min. En homogen løsning som ikke viste tegn til karbometoksygrupper ble oppnådd. Tilsetning av overskudd NaOH eller NaCl forårsaket natriumkarboksylatsaltet å bli tåket og lage en egen fase som en olje.

Eksempel MM: Modifikasjon av PAMAM-dendrimerer med akrylsyre.

2:1 akrylat:amin (Reaksjon A)

En 3,84 g mengde akrylsyre ble blandet med 3,84 g metanol og avkjølt på isbad i 10 min. Så ble 18,72 g av en 26,7% (vekt/vekt) løsning av G6(NH_3) PAMAM tilsatt akrylsyre-løsningen under røring. Reaksjonen ble holdt ved 4°C i 15 min., gjennomboblet med nitrogen, påsatt lokk og tillatt å reagere ved romtemperatur i 5 dager.

1:1 akrylat:amin (Reaksjon B

En 1,6 g mengde akrylsyre ble blandet med 1,6 g metanol og avkjølt på isbad i 10 min. Så ble 18,72 g av 26,7% (vekt/vekt) løsning av G6(NH_3) PAMAM tilsatt akrylsyreløsningen under omrøring. Reaksjonen ble holdt ved 4°C i 15 min., gjennomboblet med nitrogen, påsatt lokk og tillatt å reagere ved romtemperatur i 5 dager.

0,5:1 akrylat:amin (Reaksjon C)

En 0,80 g mengde akrylsyre ble blandet med 0,8 g metanol og avkjølt på isbad i 10 min. Så ble 18,72 g av en 26,7% (vekt/vekt) løsning av G6(NH_3) PAMAM tilsatt akrylsyreløsningen under omrøring. Reaksjonen ble holdt ved 4°C i 15 min., gjennomboblet med nitrogen, påsatt lokk og tillatt å reagere ved romtemperatur i 5 dager.

0,25:1 akrylat:amin (Reaksjon D)

En 0,40 g mengde akrylsyre ble blandet med 0,4 g metanol og avkjølt på isbad i 10 min. Så ble 18,72 g av en 26,7% (vekt/vekt) løsning av G6(NH_3) PAMAM tilsatt akrylsyreløsningen under omrøring. Reaksjonen ble holdt ved 4°C i 15 min., gjennomboblet med nitrogen, påsatt lokk og tillatt å reagere ved romtemperatur i 5 dager.

Ultrafiltrerin og tørking

Oppløsningsmidlet fra reaksjonene ble fjernet ved fordampning under rotasjon og det gjenvunne bunnfall ble løst opp i ca. 150 ml vann. Den 150 ml løsning ble ultrafiltrert mot vann på en YM3 (MWCO=3000) flat membran inntil 4 l av løsningen var samlet opp. Retentatet ble fjernet for vann på en rotoevaporator til en fast masse eller viskøs løsning var igjen. De halv-faste materialene ble så plassert under sterkt vakuum over natten for å fjerne gjenværende vann.

Konklusjon

Produktene av reaksjonene mellom G6(NH_3) PAMAM ammoniakk-kjernedendrimer og akrylsyre i forskjellige forhold ga de forventede produkter. Produktene viste ladningskarakteristika forenlig med mengde akrylsyre tilsatt. Når overskudd akryl er tilsatt, nærmet produktet seg det som oppnås i konvensjonell syntese av halv-generasjon PAMAM-karboksylatsaltet. Som mengden av akrylsyre tilsatt reduseres, blir analyse av

materialet forenlig med en positiv ladet dendrimer med noen negativt ladede overflategrupper, eller en amfotær overflate.

Eksempel NN: Konjugering av tette stjernedendrimerer med mål-dirigerende forbindelser slik som biotin, insulin og avidin, og også inkludert et bærermateriale (fluorescein).

Materialer

G4(NH_3) PAMAM STARBURST®-dendrimer og generasjon 6,0 STARBURST®-dendrimer ble fremstilt. Fluorescein-5-isotiocyanat (isomer I) (FITC) ble oppnådd fra Molecular Probes. Dansylklorid ble oppnådd fra Aldrich Chemical Co. NHS-LC-Biotin og avidin ble kjøpt fra Pierce. Diklortriazinyl-fluorescein (I) og insulin stammet fra Sigma Chemical. Alle reagenser ble benyttet uten ytterligere rensing.

I. Biotin/dendrimer-konjugeringskoblinger:

A. Fremstilling av biotin/dendrimer-konjugater

En stamløsning av G6(NH_3) PAMAM dendrimer ble laget i en konsentrasjon på 1,8 mg/ml i 100 mM fosfatbuffer med pH 7,0. En annen stamløsning av G6(NH_3) ble laget i konsentrasjon 1,9 mg/ml i H_2O. En 1 ml prøve fra hver løsning ble fjernet og 5 mg fast NHS-LC-biotin tilsatt i hver løsning. Prøvene ble rystet sterkt i 5 min. for å løse opp biotinet. Inkubasjonen ble utført ved romtemperatur i 18 timer. Lignende reaksjoner ble utført med løsninger av G4(NH_3) i både fosfatbuffer og i H_2O. G4(NH_3)-stamløsningene var 2,0 mg/ml og 5 mg NHS-LC-biotin ble satt til 1 ml prøve av hver.

Andre konjugeringer ble utført med mindre forhold ligand til amin. F.eks. i et forsøk på å konjugere 20 biotiner til en G7(NH_3) PAMAM-dendrimer, ble en 844 µl prøve av 11,85% G7-dendrimer tilsatt 0,0244 g av NHS-LC-biotin i 5 ml boratbuffer, pH 9. Etter 3 timer ble reaksjonsblandingen dialysert mot deionisert vann for å fjerne ikke-reagert biotin.

Elektroforese

Etter 18 timer ble 100 µl av hver reaksjonsblanding og av hver fulle generasjon-stamløsning satt til side for elektroforetisk analyse. 10 µl av 0,1% MB+ med 50% sukrose ble satt til hver løsning og det ble utført elektroforese på en 5-50% T gradient Hylinx®-gel (oppnådd fra Gradipore). Bufferen som ble benyttet var 90 mM tris, 80 mM borsyre, og 2,5 mM EDTA , pH 8,3. 10 µl av hver prøve ble påsatt gelen. Gelen ble kjørt i 30 min. ved 200 V (konstant). De ulike sporene var som oppført nedenfor:

1 G7 (NH_3)

2 G6 i P_i, (NH_3)

3 G6 (NH_3) med biotin i P_i

4 G4 i P_i, (NH_3)

5 G4 (NH_3) med biotin i P_i

6 G6 i H_2O, (NH_3)

7 G6 (NH_3) med biotin i H_2O

8 G4 i H_2O, (NH_3)
9 G4 (NH_3) med biotin i H_2O
10 G4 (NH_3)
11 Cyt c/G3,5 (NH_3)
12 G5 (NH_3)

Resultater og diskusjon

Elektroforese viste klart nedsatt mobilitet av dendrimerer behandlet med biotin sammenlignet med vandringsdistansen av de ikke-modifiserte dendrimerer. Molekylvekten økte på grunn av kovalent binding av biotinmolekyler til dendrimer-overflaten. Dette forårsaket at dendrimeren vandret kortere distanse på grunn av filtreringseffekten av GGE som forsinker molekyler med høyere molekylvekt.

Antallet biotinmolekyler bundet pr. dendrimer er ikke kjent idag. Fordelinegn av biotinmolekyler på dendrimeren er statistisk, og prøven som er kjørt er ikke en enkel type. Noen reaksjoner ble utført slik at alle overflategruppene på dendrimeren (Z i fig. 1; Z' i fig. 2) ville teoretisk bli biotinylert. Ingen synlig uløselig masse ble utviklet i løpet av disse reaksjonene.

B. Fremstilling av dendrimer-fluorescein (FITC)-konjugater

En 5 ml metanol-løsning på 12,7% (vekt/vekt) G4(NH_3) kjerne, PAMAM-dendrimer ble vakuumtørket ved roterende fordampning. Ca. 40 mg (7,4 μmol) av den tørkede dendrimer ble fjernet og løst opp i 5 ml av 0,1M fosfatbuffer, pH 9,0.

Fluoresceinisotiocyanat (FITCI) (14,5 mg, 37 μmol) ble løst opp i 2 ml DMSO i mørket. FITCI-løsning ble satt til den omrørte dendrimer-løsningen dråpevis i løpet av 1-2 min. Reaksjonsblandingen ble beskyttet fra lys og omrørt ved romtemperatur i 15-20 timer. Løsningen ble svakt farvet.

Etter omrøring, ble reaksjonsblandingen plassert i to Centricon®-mikrokonsentreringsrør (molekylvekt-avskjæringspunkt: 3000 Dalton), og ble ulltrafiltrert for å fjerne all ikke-reagert FITCI. Tre 2 ml tilsetninger av 0,1M fosfatbuffer av pH 9 ble utført under ultrafiltreringen. Den konjugerte fjerde generasjon (ammoniakk-kjerne) dendrimer-FITCI ble fjernet fra retentatet etter ultrafiltrering.

C. Fremstilling av biotinylert dendrimer-FITCI-konjugater

Ved bruk av 20 mg/ml stamløsning av G4(NH_3) PAMAM Starburst® dendrimer-FITCI (fremstilt i foregående del), ble 1 ml av dendrimer-FITCI stamløsningen fjernet og tilsatt 3 ml 0,1M fosfatbuffer (pH=9,0).

En 10,0 mg (18 mmol) mengde av NHS-LC-biotin ble tilsatt 0,5 ml DMSO og oppløst under rysting.

NHS-LC-biotinløsningen ble satt til dendrimerløsningen i løpet av 30 sek. og reaksjonsblandingen rørt ved romtemperaur, i mørket, i 4 timer. Så ble reaksjonsblandingen fjernet fra rørerplaten og overført til to Centricon®-

mikrokonsentreringsrør (molekylvekt-avskjæringspunkt:3.000 Dalton) og ultrafiltrert for å fjerne ethvert ikke-bundet biotin. Åtte, 2 ml tilsetninger av 0,1M fosfatbuffer pH 9, ble utført i løpet av ultrafiltreringen for å underlette opprensingen.

D. Fremstilling av biotinylert G4 dendrimer-FITCI/avidin-kompleks

3,0 mg (45 μmol) avidin ble løst opp i 1 ml 10 mM fosfatbuffer (pH 7,1). 300 μl (10 mg/ml, 450 μmol) biotinylert G4 (NH_3) dendrimer-FITCI (fremstilt tidligere) ble tilsatt avidinløsningen og rørt forsiktig ved romtemperatur i 4 timer. Reaksjonsblandingen ble så overført til Centricon®-mikrokonsetratorrør (molekylvekt-avstengningsnivå:30.000 Dalton) og ultrafiltrert for å fjerne overskudd biotinylert dendrimer. Åtte 2 ml tilsetninger av 10 mM fosfatbuffer pH 7,1 ble utført under ultrafiltreringen for å lette rensingen. Det resulterende biotin-dendrimer/avidin-kompleks ble fjernet fra mikro-konsentreringsrørene og lagret ved -10°C.

E. Fremstilling av dendrimer/diklortriazinyl-fluorescein (I)

Omtrent 300 μl G6 (EDA) PAMAM Starburst®-dendrimer (21,5% fast materiale) ble tilsatt til 700 μl deionisert vann og blandet (64,5 mg, 2,24 μmol). Ytterligere 4 ml deionisert vann ble tilsatt for å fortynne dendrimeren til en konsentrasjon på 12,9 mg/ml.

Diklortriazinyl-fluorescein (isomer I) hydroklorid [DTAF(I)] (6,0 mg, 11,3 μmol) ble løst opp i 0,5 ml metanol i mørket, og to dråper av trietylenamin tilsatt. DTAF(I)-løsningen ble tilsatt til den omrørte dendrimerløsning på dråpevis måte i løpet av 30 sek. Reaksjonsblandingen ble beskyttet fra lys, og rørt ved romtemperatur i 15-20 timer. Løsningen forble klar og orange under reaksjonen.

Etter røring, ble reaksjonsblandingen overført til to Centricon® mikrokonsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt: 10.000 Dalton), og ble ultrafiltrert for å fjerne alt ikke-reagert DTAF(I). Femten 2 ml tilsetninger av 0,1M fosfatbuffer med pH 9,0 ble utført under ultrafiltreringen for å underlette opprensingen. Ca. 3 ml av konjugert G6 (EDA-kjerne) dendrimer-DTAF(I) ble gjenvunnet fra opprensingen.

F. Fremstilling av multi-biotinylerte/dendrimer-DTAF(I)-konjugater

Ved bruk av en 20 mg/ml stamløsning til G6 (EDA) PAMAM Starburst® dendrimer-DTAF(I) (frmsmtilt i foregående seksjon) ble 0,425 ml (8,5 mg, 0,0003 mmol) dendrimer-DTAF(I) stamløsning fjernet og tilsatt 0,575 ml 0,1M fosfatbuffer (pH 9,0).

8,1 mg (0,029 mmol) NHS-LC-biotin ble tilsatt til 3 ml DMSO og rystet.

NHS-LC-biotinløsningen ble satt til dendrimerløsningen i løpet av 30 sek. og reaksjonsblandingen tillatt å blandes ved romtemperatur i mørket i 4 timer.

Etter 4 timer ble reaksjonsblandingen fjernet fra røringen og overført til to Centricon® mikrokonsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt:10.000 Dalton) og

ultrafiltrert for å fjerne alt ikke-bundet biotin. Åtte 2 ml tilsetninger av 0,1M fosfatbuffer med pH 9,0 ble utført under ultrafiltreringen for å underlette opprensingen.

II. Insulin/dendrimer konjugeringskobling

A. Fremstilling av dansylert dendrimer-konjugat

En 5 ml metanol-løsning (12,7% (vekt/vekt) G4(NH_3) PAMAM dendrimerløsning ble tørket under vakuum ved roterende fordampning. Ca. 40 mg (7,4 μmol) av den tørre dendrimer ble fjernet og løst opp i 5 ml 0,1M fosfatbuffer, pH 9,0.

En 10 mg (0,037 mmol) mengde dansylklorid ble tilsatt 5 ml aceton og rystet i 5-10 min. (Denne løsning var dypt gul og hadde spor av fast stoff i seg).

Dansylkloridløsningen ble tilsatt dendrimerløsningen i løpet av 30 sek., og reaksjonsflasken overført i vannbad av 40°C i 90 min. Under oppvarmingen ble reaksjonsblandingen rystet av og til. (Bemerk at farven av løsningen ble bleket fra sterkt til svak gul).

Etter 90 min. ble reaksjonsflasken fjernet fra varmen og avkjølt til romtemperatur. (Reaksjonsblandingen var svakt uklar). Den merkede dendrimer ble så renset mens man holdt den i løsning. Reaksjonen ble plassert under roterende fordampning og aceton fjernet under vakuum ved 30-35°C. Dette syntes å klargjøre løsningen i sterk grad. Reaksjonsblandingen ble så overført til to sentrifugerør og sentrifugert ved 5000 opm i 30 min. Ikke noen ytterligere utfelling var synlig etter sentrifugeringen.

Den dansylerte fjerdegenerasjon-dendrimerløsningen ble så plassert i to Centricon® mikrokonsentratorrør (molekylvekt- avskjæringspunkt:3000 Dalton) og ultrafiltrert for å fjerne alt ikke-bundet dansylklorid. Ultrafiltrasjonen ble undersøkt med hensyn til renhet ved hjelp av tynnsjikt-kromatografi for å forsikre fullstendig fjernelse av alt ikke-reagert dansylklorid. Filtratet ble beholdt og undersøkt ved TLC som følger: Silikagel 60-plater (E. Merck) ble benyttet med et etylacetat (100%) oppløsningssystem (synliggjort ved hjelp av UV-lys). Mens den merkede dendrimer forble ved starten, eluerte det gjenværende dansylklorid nær en R_f på 0,3. Ca. 1-2 ml av antatt dansylert dendrimerløsning ble gjenvunnet.

B. Fremstilling av insulin/dansylert dendrimerkonjugat

I et 2 dram glass, ble 0,5 ml dansylert dendrimer (fremstilt tidligere) satt til 1,5 ml deionisert vann for å få en 10 mg/ml løsning. 1 ml (10,0 mg, 0,0019 mmol) ble fjernet og benyttet for insulinkoblingen.

I et annet glass, ble en 12,3 mg (0,0020 mmol) mengde insulin (fra storfe-pankreas) løst opp i 2 ml deionisert vann. Den resulterende løsning var tåket av utseende, før pH ble senket til 4, med 1 dråpe 1N saltsyre for å løse opp det faste materiale.

I et tredje glass ble 88,7 mg (0,46 mmol) EDAC løst opp i 1 ml deionisert vann.

Insulinløsningen ble satt til den rørte dendrimerløsning i løpet 1-2 min., og ble øyeblikkelig tåket. pH ble så justert fra pH 7,0 til 4,0 ved bruk av 1N saltsyre. (Løsningen ble klar nær pH 4,2). Med fortsatt røring, ble EDAC-løsningen tilsatt i 200-300 µl mengder hvert 10 til 15 minutt (i løpet av 1 time). pH i reaksjonsblandingen ble holdt mellom 3,90 og 4,2 med 1N saltsyre. Etter den endelige EDAC-tilsetningen, ble reaksjonen tillatt å stå omrørt over natten ved romtemperatur (15-20 timer).

Reaksjonblandingen ble så overført til Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekylvekt-avskjæringspunkt:3.000 Dalton) og ultrafiltrert med deionisert vann (som dannet et bunnfall) men ble så resuspendert ved tilsetning av 1 dråpe 1N saltsyre. Denne prosess ble gjentatt 2 til 3 ganger, og det dansylerte dendrimer/insulin-konjugatet løst opp igjen. Ca. 1 ml av dansylert dendrimer/insulin-konjugat ble gjenvunnet fra ultrafiltreringsprosessen.

C. Fremstilling av insulin/diklortriazinyl-fluorescein(I)

Til en 2 dram glass, ble 9,3 mg (0,002 mmol) insulin (fra storfe-pankreas) løst opp i 2 ml 0,1M fosfatbuffer (pH = 9,0). Diklortriazinyl-fluorescein (isomer I) hydroklorid [DTAF(I)] (4,1 mg, 0,008 mmol) ble løst opp i 0,5 ml metanol i mørket og 2 dråper av trietylamin tilsatt.

DTAF(I)-løsningen ble satt til den rørte insulinløsning dråpevis i løpet av 2 min. Reaksjonsblandingen ble beskyttet fra lys og rørt ved romtemperatur i 6 timer og så plassert ved 2-8°C natten over. (Løsningen forble klar og organge under reaksjonen).

Den følgende morgen ble reaksjonsblandingen overført til to Centricon®-mikrokonsentreringsrør (molekylvekt-avskjæringspunkt:3.000 Dalton) og ble ultrafiltrert for å fjerne alt ikke-reagert DTAF(I). Ti 2 ml tilsetninger av 0,1M fosfatbuffer med pH 9,0 ble gjort under ultrafiltreringen for å underlette rensingen. Ca. 2 ml insulin-DTAF(I) ble gjenvunnet etter rensing.

D. Fremstilling av insulin-DTAF(I)/dendrimer-konjugat

Til et 2 dram rør, ble 1 ml (7,05 mg, 0,0014 mmol) av G4 (NH_3)-dendrimer tilsatt, og pH justert til 4,5 ved bruk av 1N saltsyre. 1 ml (10,1 mg, 0,0020 mmol) insulin-DTAF(I) (fremstilt tidligere) ble satt til den omrørte dendrimer og pH justert igjen til 4,0 ved bruk av 1N saltsyre.

I et annet rør, ble 54,3 mg (0,28 mmol) EDAC løst opp i 0,5 ml deionisert vann.

EDAC-løsningen ble satt til reakjonsblandingen i 100 µl økninger hver 10-15 min. (i løpet av 1 time). pH i reaksjonsblandingen ble holdt mellom 3,90 og 4,20 med 1N saltsyre. Etter den endelige EDAC-tilsetning, gikk reaksjonen videre ved romtemperatur i 6 timer, og ble så plassert over natten ved
2-8°C.

Reaksjonsblandingen ble så overført til Centricon®-mikro-konsentreringsrør (molekylvekt-avkuttingspunkt:10.000

Dalton) og ultrafiltrert med deionisert vann, mens pH ble holdt mellom 4 og 5 med 1N saltsyre.

Denne fremgangsmåte ble gjentatt 2-3 ganger og insulin-DTAF(I)-dendrimerkonjugatet isolert og det ga en klar orange løsning.

III. Dendrimer/avidin-konjugeringskoblinger:

A. Fremstilling av dendrimer/avidin-konjugater

I et 2 dram glass ble 120 µl G7 (EDA)-dendrimer (21,9% fast materiale) satt til 0,8 ml deionisert vann. Den fortynnede dendrimer, 0,5 ml, ble fjernet og satt til 4,5 ml deionisert vann til å gi en 2,6 mg/ml løsning.

I et annet glass blir 3,0 mg (0,045 mmol) EDAC løst opp i 0,5 ml deionisert vann.

Avidinløsningen ble satt til den rørte dendrimerløsning i løpet av 1-2 min. og forble klar. pH ble så justert til 4 ved bruk av 1N saltsyre. Med fortsatt omrøring ble EDAC-løsningen tilsatt i 100 µl mengder hvert 10-15 minutt (i løpet av 1 time). pH i reaksjonsblandingen ble opprettholdt mellom 4,5 og 5,5 med 1N saltsyre. Etter den endelige EDAC-tilsetning, ble reaksjonen tillatt å røres natten over ved romtemperatur (15-20 timer).

Reaksjonsblandingen ble så overført til Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekylvekt-avkuttingspunkt:100.000 Dalton) og ultrafiltrert med 10 mM fosfatbuffer for å fjerne enhver ikke-bundet dendrimer eller avidin. Åtte 2 ml tilsetninger av 10 mM fosfatbuffer med pH 7,1 ble laget under ultrafiltreringen for å underlette opprensingen.

Eksempel OO: Målrettede tette stjernedendrimerer med pyro-druesyre-natriumsalt

0,5 g EDC ble blandet med 0,0065 g natriumsalt av pyrodruesyre i 2 ml H_2O. Løsningens pH ble justert til 5,0 (som bestemt ved pH-papir) og løsningen ble omrørt i 5 min. Deretter ble 62 µl (20 mg) av G6(NH_3)-dendrimer (32,45% faste stoffer) satt til reaksjonsblandingen og løsningen rystet i 21 timer. Opprensing for å frigjøre løsningen med hensyn til overskudd EDC ble utført med en Amicon® Microcon-10-konsentrator. Fortynningsfaktoren var 57 x 10^6. En liten ^{13}C-NMR-resonans ble observert for metylgruppen i pyruvat konjugert til G6-dendrimer; og en enkeltstående kapillar-elektroforese-topp ble også observert for konjugatet.

Fremstilling av konjugatene ifølge denne oppfinnelse benytter startmaterialene som beskrevet ovenfor, eller startmaterialer som er fremstilt på analog måte, eller startmaterialer beskrevet i feltet, eller startmaterialer som er tilgjengelige.

Eksempel 1: Innbygging av 2-(acetyloksy)benzosyre (aspirin) i STARBURST®-dendrimerer

En meget akseptert fremgangsmåte for å undersøke hvorvidt et "markørmolekyl" befinner seg i det indre av en micelle er å sammenligne dens karbon-13-spin nettverk-

relaksjonstider (T_1) i et ikke-micelle-holdig mot et micelle-holdig medium. En vesentlig nedgang i T_1 for det micelle-holdige medium indikerer "markørmolekyl"-inklusjon i micellen. Siden STARBURST®-dendrimerene er "kovalent bundne" analoger i micellene, ble denne T_1 relaksasjonstid-teknikk benyttet til å undersøke graden (omfanget) hvor ulike farmasøytiske molekyler ble forbundet med STARBURST®-polyamidoaminer. I de følgende eksempler, ble T_1-verdiene for (acetyloksy)benzosyre (I) (aspirin) bestemt i løsningen ($CDCl_3$) og så sammenlignet med T_1-verdier i $CDCl_3$ ved ulike (I:dendrimer) molare forhold.

Innbygging av aspirin (I) inn i ulike STARBURST®-polyamidoamin-dendrimerer som en funksjon av generasjonstall.

Ulike halv-generasjons (ester-terminerte grupper, startet fra NH_3) STARBURST® polyamidoamin-dendrimerer (G = 0,5 → 5,5) ble kombinert med 2-(acetyloksy)benzosyre i $CDCl_3$ til å gi syre:tertiære aminforhold på = 1,0. Et diagram av T_1-verdier for 2-(acetyloksy)benzosyre versus generasjon STARBURST®-dendrimer tilsatt (se fig. 4 hvor • representerer C-4,
□ representerer C-6 og O representerer C-5) viser at T_1 når et minimum over generasjonsnummerne
2,5 → 5,5 for karboner 4, 5 og 6 i 2-(acetyloksy)-benzosyre. Dette viser en indre kobling av 2-(acetyloksy)benzosyre i dendrimerene (G = 2,5 til 5,5) og bekrefter videre at poly-amidoamin-dendrimerer (gen = 2,5 eller større) kan fungere som bærermolekyler.

<u>Eksempel 2: Frigjøring av pseudoadrenalin fra STARBURST®</u>
dendrimer-PAMAM

Pseudoadrenalin (0,83 mg/ml) og STARBURST® PAMAM dendrimer [1,0 mg/ml; G = 6,5; terminalgruppe (Z) = 192 (metylester)] ble løst opp i deionisert destillert vann og pH av donorfasen justert til 9,5, med natriumhydroksydløsning, og lagret ved romtemperatur i 12 timer. Pseudoandrenalin-løsningen ble behandlet på samme måte (kontroll). Legemiddel-dendrimerløsning ble lagret ved 40°C i 8 timer etter første eksperiment og det ble utført dynamisk dialyse. Dialysemembranen som ble benyttet var et SpectraPor® 7.MWCO 1.000,
28,6 mm i diameter i spektrum adskillelsesceller (halve cellevolum 5 og 10 ml, celledimensjoner: 38 mm diameter for både cellene og celledybden på 10 og 20 mm for henholdsvis 5 og
10 ml celler).

Prøvene ble analysert ved HPLC utviklet for pseudoadrenalinbetingelser hvilke er:
Søyle: μBondapak® C-18
Mobilfase: pH 3,2 fosfatbuffer pluss acetonitril (80:20)
Strømningshastighet: 0,3 ml/min.
Påvisning: UV ved 210 nm

Retensjonstid: 13,3 min.

Dialysemembranen ble vasket med deionisert vann og holdt fuktig i reseptorfasen i minst 12 timer før anvendelse. Dialysemembranen ble plassert mellom donor og reseptoravdelingen, og donor-avdelingen ble omrørt ved hjelp av en liten magnetisk rører. Kjente volumer av donor og reseptorløsninger ble tilsatt i riktige avdelinger og tilsetning av pseudoadrenalin til reseptoravdelingen ble fulgt som funksjon av tid. For å opprettholde nedsunkne betingelser ble hele reseptorfasen fjernet av og til (hvert 30. min.) og erstattet med frisk reseptorfase. Mengde pseudoadrenalin ble målt i prøver fra reseptorfasen. Eksperimenter ble utført ved romtemperatur (22°C). Reseptorfasen var enkelt deionisert destillert vann.

Resultatene fra den dynamiske analyse er vist i fig. 5. I fig. 5 representerer • kun pseudoadrenalin (kontroll),
der



representerer pseudoadrenalin pluss dendrimeren, og



representerer pseudoadrenalin pluss dendrimeren holdt ved 40°C i 8 timer før dialyse. Det er tydelig at i nærvær av G6,5-dendrimeren i donoravdelingen blir dialysehastigheten av pseudoadrenalin redusert. Lagring av donorløsningen ved 40°C synes videre å redusere dialysehastigheten.

Eksperimentet ble gjentatt ved lavere konsentrasjoner (forholdet mellom antallet legemiddelmolekyler til antallet terminale grupper ble holdt uforandret). G6,5-dendrimer 120 μg/ml pseudoadrenalin 100 μg/ml (122 μg/ml salt).

Dynamisk dialyse av pseudoadrenalin (alene) ved denne konsentrasjon var nesten identisk den ved høyere konsentrasjon. Fig. 6 oppsummerer resultatene fra dette eksperimentet hvor • representerer bare pseudoadrenalin (kontroll), og O representerer pseudoadrenalin pluss dendrimer.

Eksempel 3: Fremgangsmåten fra eks. 2 ble gjentatt ved bruk av forandringene gitt nedenfor.

Reseptorfase: pH 7,4 fosfatbuffer

Donorfase: pH 7,4 fosfatbuffer pluss legemiddel og den- drimer i følgende forhold:

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

Donorfase-sammensetningen ovenfor pluss pseudoadrenalin alene ble undersøkt ved dynamisk dialyse. Bokstaven "H" etter dendrimergenerasjonstallet viser hydrolysert dendrimer. Hydrolyse ble utført ved hjelp av fremgangsmåten beskrevet i eks. M og N.

Resultatene fra disse eksperimenter er summert i fig. 7, hvor donoren og reseptoravdelingen inneholdt fosfatbuffer, pH 7,4. For pseudoadrenalin alene (P) blir gjennomsnittskurven fra tre eksperimenter registrert (vist ved hel-opptrukken linje), og én typisk kjøring fra de andre eksperimentene er vist. I fig. 7 representerer de følgende symboler dendrimeren av den anviste generasjon.

Tabell III

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

Pseudoadrenalin synes ikke å forbinde seg sterkt med den terminale ester-dendrimer ved pH 7,4. Hydrolyse av de terminale funksjonelle gruppene til karboksylform har en dramatisk virkning på dialysehastigheten (reduksjon). Generasjonstallet synes ikke å influere dialysehastigheten.

Eksempel 4: Reaksjonsstudier mellom salicylsyre og PAMAM STARBURST®-dendrimerer.

Dette eksempel vurderte reaksjonsegenskapene til salicylsyre og PAMAM STARBURST®-dendrimerer. Disse dendrimerer besto av ammoniakk-startet kjerne med gjentatte enheter som stammet fra N-(2-aminoetyl)akrylamid. Både fulle (amin-avsluttede grupper) og halv (ester-avsluttede grupper)-generasjonspolymerer ble inkludert i undersøkelsene. Forholdet mellom salicylsyre og STARBURST®-dendrimerer benyttet i

eksperimentene resulterte i ca. ett salicylsyremolekyl til én terminal amin-funksjonell gruppe for full-generasjonspolymerer. I halv-generasjonspolymerer ble det samme forhold benyttet med justeringer gjort for høymolekylvektpolymeren.

Eksperimentene ble utført ved romtemperatur ved bruk av en likevekts statisk celle-dialysemetode. Spektrum statiske dialyseceller (halv-cellevolum, 10 ml) adskilt ved SpectraPor® 6-membraner (molekylært avslutningspunkt = 1000) ble benyttet for alle eksperimentene. Transport av salicylsyre ble overvåket som funksjon av tid ved å fjerne prøver fra passende celleavdelinger og undersøkt ved hjelp av HPLC-analyse ved bruk av en UV-detektor ved 296 nm (Bondapak C-18-søyle, eluere mobil fase av acetonitril/0,1M fosfatbuffer (pH = 3,2) ved et forhold på 20:80 (vol/vol) med strømningshastighet på 30 ml/time).

10 ml av en løsning som inneholder 1 mg/ml salicylsyre og 2,5 mg/ml STARBURST®-polymer (gen = 4) justert til pH 6,65 og 5,0 med HCl-løsning ble overført til donoravdelingen i dialysecellen og en lik mengde renset vann justert til samme pH ble plassert i reseptoravdelingen. Transport av salicylsyre til reseptoravdelingen ble analysert. Resultatene er gitt i fig. 8. I fig. 8 er den frie syre vist ved •, syren pluss generasjon 4,0 dendrimer, pH 6,65 er vist ved ○, og syre pluss generasjon 4,0-dendrimer, pH 5,0 er vist ved □.

På grunn av den lavere prosent ionisering av amingruppene på polymeren ved pH 6, kan en større grad av interaksjon med salicylsyre forventes ved pH 5, hvilket resulterer i at mindre forbindelse transporteres ved lavere pH. Resultatene gitt i fig. 8 viser en meget lavere prosentandel av salicylsyretransport i nærvær av polymer ved begge pH-nivåer som er studert sammenlignet med salicylsyrekontrollstudie. Det observeres også at mer salicylsyre blir transportert ved pH 6,65 enn ved pH 5,0 som antatt. Resultatene viser en reaksjon mellom STARBURST®-polymeren med salicylsyre som kan kontrolleres av pH. Vedvarende frigjøringsegenskaper er også berørt av disse resultatene siden salicylsyrenivåene i nærvær av polymer fortsetter å stige etter det ca. 12 timers likevektspunkt som er observert i kontrollstudiet.

For å undersøke videre reaksjonsegenskapene mellom salicylsyre og STARBURST®-polymerene (gen = 4,0) ble et eksperiment utført ved pH 8,0. Utførelsen av studiet adskilte seg fra det tidligere beskrevne ved at kun salicylsyreløsningen (1 mg/ml), var justert til pH 8,0 og plassert i donoravdelingen og polymerløsningen (2,5 mg/ml) overført til reseptoravdelingen. Tap av salicylsyre fra donoravdelingen ble analysert som tidligere beskrevet. Resultatene fra eksperimentet er gitt i fig. 9. I fig. 9 blir den frie syre vist ved •, og syren pluss generasjon 4,0-dendrimer ved pH 8,0 vist ved ---_---

Som vist i fig. 9, adskiller likevektsegenskapene til salicylsyre i donoravdelingen med STARBURST®-polymerene i reseptoravdelingen fra salicylsyrekontrollstudiet. Basert på ioniseringsegenskapene til molekylene ved pH 8, er det forventet en ca. 6-7% reaksjon. Graden av observert reaksjon er vist å være i området 4-5%. Den lavere

reaksjon som er observert kan skyldes eksperimentell variasjon eller at ioniseringskonstanten er mindre enn én.

Dette eksperiment viser et opptak eller fjerning av fri salicylsyre fra den kontinuerlige fase av polymeren. Denne type virkning kunne føre til nedsatt reaktivitet av molekylene, hvilket tyder på en mulig chelateringseffekt eller molekyl-reaksjonstype forbundet med polymerene.

Reaksjonsegenskapene til salicylsyre ved pH 6,6 med halv-generasjon STARBURST®-polymer (gen = 4,5) som har terminale esterfunksjonelle grupper ble undersøkt. Salicylsyre (1 mg/ml) ble kombinert med STARBURST®-polymer (gen = 4,5) 3,6 mg/ml ved pH 6,6. 10 ml av løsningen ble satt til donoravdelingen og transport fra donoravdelingen ble analysert som tidligere beskrevet. Resultatene er gitt i fig. 10. I fig. 10 blir den frie syre representert ved -•-, og syren pluss polymer er representert ved ---O---.

Under disse eksperimentelle betingelser antas det at ingen reaksjon på grunn av ladning skjer, siden de tertiære amingruppene er ikke-ioniserte ved pH 6,6. Som vist i fig. 10, er tapet av salicylsyre i nærvær av polymeren (gen=4,5) omtrent identisk under de første 10 timer med dialyse sammenlignet med salicylsyre-kontrollstudium.

Følgende observasjoner er gjort fra resultatene presentert i dette eksempel:

(1)Full generasjon PAMAM STARBURST®-polymerer fungerer som en bærer for salicylsyre.

(2)Full generasjon PAMAM STARBURST®-polymerer har vedvarende evne til frigjøring av salicylsyre.

(3)Salicylsyre-bæreregenskapene til full generasjon PAMAM STARBURST®-polymerer kan kontrolleres av pH.

Eksempel 5: Påvisning av multippel chelering av jern med natriumpropionat-terminerte grupper i sjette generasjon STARBURST®-polyamidoamin.

Natriumpropionat terminale sjette generasjons polyamidoamin (startet fra ammoniakk), fremstilt som i eks. M og N, (97,1 mg, 2,45 mol) ble løst opp i 1,5 ml deionisert vann. Tilsetning av 0,5 ml 0,5N HCl reduserte pH til 6,3. Ferri-klorid ble tilsatt (0,5 ml av 0,2M løsning, 0,051 mmol) ga et lett lysebrunt gelatinert bunnfall. Ved oppvarming til 60°C i 0,5 time, ble det gelatinøse bunnfall løselig, hvilket resulterte i en homogen orange løsning. Løsningen ble filtrert gjennom Biogel Pr akrylamidgel (10 g, 2x) og isolering av det orange bånd (fritt fra halogenforurensning). Fjerning av løsningsmidlet i vakuum ga produktet som en orange film (30 mg). Analysen var forenlig med chelatering av ca. 20 mol ferri-ioner pr. mol STARBURST®-dendrimer.

Tabell IV

		Teoretisk		
	Funnet	$Na_4Fe_{20}H_{128}SB$	$Na_5Fe_{20}H_{127}SB$	$Na_6Fe_{20}H_{126}SB$
	Na 0,39, 0,24 (0,310, 1%)	0,25	0,31	0,38
	Fe 3,14, 3,11 (3,120, 0,2%)	3,05	3,05	3,04
	C 47,11	49,87	49,84	49,8
	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
	MV	36632,2	36654,21	36676,18

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

Disse resultater bekrefter chelatering av 20 ± 2 mol ferri-ioner pr. mol STARBURST®-dendrimer.

Eksempel 6: Fremstilling av et produkt som inneholder mer enn ett rhodiumatom pr. STARBURST®-polymer.

2,5 gen PAMAM (ester-terminale grupper, startet fra NH_3), fremstilt som i eks. GG, (0,18 g, 0,087 mmol) og $RhCl_3.3H_2O$ (0,09 g, 0,3 mmol) ble blandet i dimetylformamid (DMF) (15 ml) og varmet opp til 70°C i 4 timer. Løsningen ble dyp purpur og mesteparten av rhodium ble tatt opp. Det ikke-reagerte rhodium ble fjernet ved filtrering og løsningen ble gjenstand for fordampning under rotering. Oljen som ble dannet var løselig kloroform. Denne ble vasket med vann og tørket ($MgSO_4$) før fjerning av løsningen til å gi en rød olje (0,18 g). NMR-spektret ble analysert i $CDCl_3$ og kun små forskjeller ble bemerket mellom det chelaterte og ikke-chelaterte STARBURST®. Fortynning av noe av denne $CDCl_3$-løsning med etanol etterfulgt av $NaBH_4$-tilsetning ga utfelling av rhodium. $RhCl_3.3H_2O$ er uløselig i kloroform og i kloroform STARBURST®-løsning hvilket bekreftet chelateringen.

Eksempel 7: Fremstilling av et produkt som inneholder Pd chelatbundet til en STARBURST®-polymer.

3,5 generasjon PAMAM (ester-terminal gruppe, startet fra NH_3) fremstilt som i eks. GG, (1,1, 0,24 mmol) ble løst opp under omrøring i acetonitril (50 ml). Palladiumklorid (0,24 g, 1,4 mmol) ble tilsatt og løsningen varmet opp til 70-75°C (vannbad) natten over. $PdCl_2$ ble tatt opp i STARBURST®. Etter fjerning av løsningsmidlet bekreftet NMR i $CDCl_3$ at chelering hadde funnet sted. Fortynning av $CDCl_3$-løsningen med etanol og tilsetning av $NaBH_4$ resulterte i utfelling av palladium. Det chelerte produktet (1,23 g) ble isolert som en brun olje.

Eksempel 8: Demonstrasjon av omfattende ytterium-chelatering ved en metylenkarboksylat-endestilt annen generasjon STARBURST®-polyetylenimin ved transchelatering fra ytteriumacetat.

STARBURST® polyetylenimin-metylenkarboksylat-terminert materiale (0,46 g, 52,5% aktivt), gjenværende natriumbromid, 0,18 mmol aktiv STARBURST®-dendrimer, f.eks. FF, ble løst opp i 0,5 ml deuteriumoksyd. Den resulterende pH var 11,5-12. En løsning av ytteriumacetat ble fremstilt ved å løse opp ytteriumklorid (0,15 g, 0,5 mmol) og natriumacetat (0,41 g, 0,5 mmol) i 1,5 ml deuteriumoksyd (2,9 mol ytterium pr. mol dendrimer). Prøver på 0,5 ml av ytterium/acetat-løsningen ble satt til dendrimerløsningen og ^{13}C NMR-spektrum avlest ved 75,5 MHz.

^{13}C NMR-spektret av ytteriumacetat viser to resonanser, 184,7 ppm for karboksylkarbonet og 23,7 ppm for metylkarbonet, sammenlignet med 182,1 og 24,1 ppm for natriumacetat, og 177,7 og 20,7 ppm for acetat syre (Sadtler ^{13}C NMR standard spektra). Avlesning av posisjonen til disse båndene antydet grad chelatering med STARBURST®-dendrimer. Det mest informative signalet for STARBURST®-dendrimeren som indikerer chelatering er α-CH_2 (av metylenkarboksylatgruppen blandet inn i chelatering), som kommer til syne ved 58,4 ppm i den ikke-chelaterte dendrimer, og ved 63,8 ppm i den chelaterte dendrimer. Ved chelatering med ytterium, forkortes spinnettverk-relakseringstidene til α-CH_2 som ventet fra 0,24 ± 0,01 sek. til 0,14 ± 0,01 sek., hvilket antyder chelatering.

Etter tilsetning av 0,5 ml ytteriumacetatløsning til STARBURST®-dendrimeren, synes alt ytterium å bli chelatert av dendrimeren, hvilket ble bekreftet av signalene for acetat som var de for natriumacetat. Den samme observasjon ble gjort for tilsetning av en annen 0,5 ml prøve av ytteriumacetat-løsning. Ved tilsetning av den tredje prøve av ytteriumacetat, ble ikke alt ytterium tatt opp som STARBURST®-chelat, og acetatkarboksylresonansen ble observert å skifte til 183,8 ppm, hvilket viste at noe ytterium ble forbundet med acetatet. Det integrerte areale av de chelaterte CH_2-gruppene på

dendrimeren økte, hvilket antydet at noe av den tredje mol-ekvivalenten til ytterium som var tilsatt, ble virkelig chelatert med dendrimeren. Resultatene peker på at dendrimeren kan chelatere fra 2-3 ytterium-ioner pr. dendrimermolekyl (generasjon = 2,0).

Eksempel 9: Demonstrasjon av omfattende ytterium-chelatering av metylenkarboksylat-terminale grupper på annen generasjons STARBURST®-polyamidoamin ved transchelatering fra ytterium-acetat.

De eksperimentelle fremgangsmåter ble benyttet for denne studie som for eks. 8. STARBURST®-polyamidoaminmetylen-karboksylat-endestilt materiale (0,40 g, 62,5% aktivt, gjenværende natriumbromid, 0,12 mmol) ble løst opp i 4-5 ml deuteriumoksyd. Den resulterende pH var 11,5-12, hvilken ble senket til 9,4 med 6N HCl før eksperimentet. En løsning av ytteriumacetat ble fremstilt ved å løse opp ytteriumklorid (0,1125 g, 0,37 mmol) og natriumacetat (0,0915 g, 1,1 mmol) i 1,5 ml deuteriumoksyd, og på denne måte inneholder hver 0,5 ml løsning 1 molekv. metall.

De første to molekvivalentene ytteriumacetat som ble tilsatt ble chelatert fullt ut av STARBURST®-polyamidoamin. Ved tilsetning av en tredje molekv. ytterium, skjedde utfelling av produktet og på den måte kunne ingen NMR-opplysning oppnås. Signalene som ga mest informasjon vedrørende chelatering av STARBURST®-dendrimeren var de hvor to karboner var tilstøtende til det chelaterende nitrogen. Den kjemiske endring av disse karboner i den ikke-chelaterte dendrimer skjedde ved 59,1 ppm for α-CH_2, og ved 53,7 for det første metylenkarbon i skjelettet. Ved chelatering ble disse to resonanser observert å skifte nedover til henholdsvis 60,8 og 55,1 ppm. Trans-chelateringen viste at to metall-ioner kan lett chelateres pr. dendrimermolekyl, ved chelatering av en viss ukjent fraksjon av en tredje molekvivalent kan imidlertid produktet felles ut av løsningen.

Eksempel 10: Demonstrasjon av omfattende chelatering av ^{90}Y ved metylenkarboksylat-endestilte grupper i annen generasjon STARBURST®-polyetylenimin.

Standardløsning av ytteriumklorid ($3x10^{-2}$M, tilblandet ikke-bærer ^{90}Y og metylenkarboksylat-endestilt annen generasjon STARBURST®-polyetyelenimin ifølge eks. FF ($6x10^{-2}$M) ble fremstilt. Disse ble så reagert sammen med ulike metall:STARBURST®-forhold i HEPES-buffer. Utbytte av komplekset ble bestemt ved ionebytter-kromatografi ved bruk av Sephadex G50-ionebytter, og eluering med 10% NaCl:NH_4OH, 4:1 ved pH 10. Ikke-kompleksbundet metall er fjernet på søylen, kompleksbundet metall elueres. Utbyttene ble oppnådd ved å samle inn radioaktiviteten som ble eluert med den på søylen, ved bruk av en brønnteller.

Innenfor nøyaktigheten av eksperimentene antyder disse resultatene at 2,5 gen, STARBURST® PEI-acetat kan chelatere mellom 2 og 3 metaller pr. dendrimer hvilket gir et løselig kompleks.

Tabell V

Chelatering av 2,5 gen. PEI-acetat med ^{90}Y

Vol. Y+3	Vol. PEI	Vol. HEPES	M:L teor.	% kompleks	M:L akt.
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

Alle volum i tabell V er i µl

Eksempel 11: Konjugering av 4-isotiocyanatfenyl-metylenkarboksylat-endestilt gruppe i tredje generasjon STARBURST®-polyetylenimin med IgG monoklonalt antistoff.

Isotiocyanatet, (10 mg (50 µmol), fra eks. DD, ble løst opp i 500 µl 3 mM indiumklorid som var tilsatt radioaktivt indium-11-klorid og pH justert til 9 med 600 µl 1N NaOH. Prøver av hele anti-monoklonalt antistoff IgG CC-46 ble så blandet med prøver av chelatert STARBURST®. Blandingene ble rystet og latt stå i 18 timer. Blandingene ble så analysert ved HPLC (søyle DuPont Zorbax Biosphere GF-250; eluant var 0,25M natriumacetat, pH 6) og med UV-detektor ved 254 nm og en adioaktivitetsmåler. Resultatene er vist i tabell VI.

Tabell VI

Starburst-IgG-konjugater

	1	2	3	4
IgG-løsning (µl)	20	20	20	20
Chelatert Starburst-løsning (µl)	5	20	50	100
% radioaktivitet i IgG	6	5	5	3
% IgG konjugert	2	7	17	22

Eksempel 12: Konjugering av 4-isotiocyanatfenyl-metylenkarboksylat-endestilte grupper i tredje generasjon STARBURST®-polyetylenimin med IgG-monoklonalt antistoff.

Isotiocyanat fra eks. DD, 4 mg (20 μmol) ble blandet med 200 μl 3 mM indiumklorid (60 μmol). En 20 μl prøve av løsningen ble så tilsatt radioaktivt indium-111 klorid og pH justert til 9 ved tilsetning av 30 μl 1N NaOH og 10 μl 0,1N HCL. Indium-chelatet ble blandet med 150 μl CC-49 helt antistoff IgG, 10 mg/ml i 50 mM HEPES-buffer ved pH 9,5. Etter 18 timer ved romtemperatur ble antistoffet gjenvunnet ved preparativ HPLC (søyle DuPont Zorbax Biosphere GF 250; elueringesmiddel 0,25M natriumacetat, pH 6); og en UV-detektor ved 254 nm og en radioaktivitet-detektor. Det gjenvunne antistoff ble konsentrert på en Amicon-membran og byttet ut i PBS-buffer (fosfatbufret saltvann, pH 7,4, som inneholder 0,12M NaCl, 2,7 mM KCl og 10,0 mM fosfat) ved pH 7,4. Det gjenvunne antistoff hadde en spesifikk aktivitet på ca. 0,5 μCi/100 μg.

Eksempel 13: In vivo-lokalisering av ^{111}In-merket STARBURST®-antistoff-konjugat.

Anvendelsen av det merkede STARBURST®-konjugat fremstilt i eks. 12 ble vist ved å måle opptaket av materialet in vivo i et menneske-svulst-transplatat i en athymisk mus. Athymiske hunn-mus ble inokulert subkutant med menneske-colon karsinom-cellelinjer, LS174T (ca. 4 x 10^6 celler/dyr). Ca. 2 uker etter inokulering, ble hvert dyr injisert via halevenen. Musene ble ofret etter 17 og 48 timer (fem dyr ved hvert tidspunkt), svulsten og de valgte vev ble fjernet og veiet, radioaktivitet ble målt i gamma-teller. Etter 17 timer hadde 13,5% av den injiserte dose pr. gram vev lokalisert i svulsten. Etter 48 timer var 21,6% av den injiserte dose pr. gram vev lokalisert i svulsten.

Eksempel 14: Binding av herbicidmolekyler (2,4-D) til overflaten av STARBURST®-dendrimerer.

Tredje generasjon PAMAM (startkjerne = NH_3) (2,0 g, 0,8 mmol) ble løst opp i H_2O (10 ml) og kombinert med toluen (20 ml). To-fasesystemet ble så omrørt og avkjølt ved hjelp av is og syrekloridet av 2,4-D-[2,4-diklorfenoksy)-eddiksyre] (2,4 g, 12 ekv.) løst opp i toluen (10 ml) tilsatt dråpevis i løpet av 30 min. Når tilsetningen var nesten ferdig, ble NaOH (0,5 g, 12,5 mmol, 50% vekt/vekt løsning tilsatt og løsningen omrørt i ytterligere 2 timer. Reaksjonsblandingen ble så fordampet til tørrhet og det resulterende faste materiale rystet opp i $CHCl_3$/MeOH (1:1 v/v) og filtrert. Materialet var ikke helt løselig i $CHCl_3$ og syntes å være uløselig i vann; tilsetningen av aceton underlettet imidlertid løseligheten. Materialet ble rørt i $CHCl_3$ i 24 timer og løsningen filtrert (et seigt materiale ble oppnådd). Etter tørking over $MgSO_4$, ble filtratet konsentrert til å gi en orange olje som ble fast ved henstand. ^{13}C NMR viste delvis amidering på overflaten ved 2,4-D og er forenlig med bindingen mellom 2,4-D og

STARBURST®-polymeren.

Eksempel 15: Inklusjon av 2,4-diklorfenoksyeddiksyre (2,4-D) i STARBURST®-dendrimerer.

En generelt akseptert fremgangsmåte for å påvise hvorvidt et "markørmolekyl" er inkludert i micellens indre, er å sammenligne dets karbon-13-spin-nettverks-relaksasjonstider (T_1) i en ikke-micelleform mot micelle-medium. En vesentlig nedgang i T_1 for det micellede mediet viser at "markørmolekyl" er inkludert i micellen. Siden STARBURST®-dendrimerer er "kovalent bundet" analoger av miceller, ble T_1-relaksasjonstids-teknikken benyttet for å påvise graden (omfanget) som ulike herbicidtype-molekyler var forbundet med STARBURST®-polyamidoaminer. I de følgende eksempler, ble T_1-verdier for 2,4-diklorfenoksyeddiksyre (I) (2,4-D) bestemt i løsning ($CDCl_3$) og så sammenlignet med T_1-verdier i $CDCl_3$ ved ulike [I:dendrimer] molare forhold.

Inklusjon av 2,4-D i ulike STARBURST®-polyamidoamin-dendrimerer som en funksjon av generasjon.

Forskjellige halv-generasjon (ester-terimale grupper, startet fra NH_3) STARBURST®-polyamidoamindendrimerer (generasjon (gen) = 0,5, 1,5, 2,5, 3,5, 4,5 og 5,5) ble kombinert med 2,4-diklorofenoksyeddiksyre (I) i $CDCl_3$ til å gi et syre:tertiært aminforhold på 1:3,5 og molare forhold av syre:dendrimer på 1:86, som vist i tabell VII. Relaksasjons-tidene (T_1) oppnådd for de ulike karbonatomer i 2,4-diklorfenoksyeddiksyre og en generasjon = 3,5 STARBURST® PAMAM-dendrimerer er vist i tabell VIII, begge for 1:1 syre/aminforhold og for mettede løsninger av 2,4-D.

Tabell VII

	(A)	(B)	(C)	(D)
Gen.	Syre/amin	Syre/amin	Syre/totalt nitrogen	Molforhold (syre/Star-burst)
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

* representerer eksempler på 2,4-D-inklusjon i det indre av dendrimeren i mengder større enn det støkiometriske forhold.

Tabell VIII

T_1 for 2,4-D/G = 3,5 PAMAM STARBURST®

Inklusjonskompleks:konsentrasjonseffekter

	(A)		(B)	
Karbon	1:1 syre/amin		Mettet med 2,4-D	
	T_1	^{13}C**	T_1	^{13}C**
1	3,19±.12	(152,73)	3,08±.09	(152,30)
3	0,34±.01	(126,64)	0,29±.09	(129,62)
5	0,38±.01	(127,41)	0,32±.01	(127,34)
2	3,28±.08	(125,79)	2,72±.68	(125,99)
4	4,58±.16	(123,27)	3,95±.07	(123,16)
6	0,31±.01	(114,66)	0,28±.01	(114,48)
CH_2	0,16±.01	(67,29)	0,46±.003	(66,79
C = O	1,24±.07	(179,12)	- -	

** representerer ^{13}C kjemiske forandringer med referanse til kloroform ved 76,9 ppm.

Disse resultater viser at større enn støkiometriske forhold av 2,4-diklorfenoksyeddiksyre (d.v.s. [(I):gen = 3,5 dendrimer] = 67) kan benyttes uten å øke T_1 på noen måte i den mettede tilstand (se søyler (A) og (B) i tabell VIII). Relaksasjonstidene T_1 i søyle (B) er litt nedsatt, hvilket antyderat større enn støkiometriske mengder 2,4-

diklorfenoksyeddiksyre kan inkluderes i det indre av dendrimeren, F.eks., et molart forhold på
[(I):gen = 2,5 dendrimer] = 34, mens [(I):gen = 3,5 dendrimer] = 67, (se søyle D i tabell VII).

Fig. 11 er et diagram av T_1-verdier for karboner 3, 5 og 6 i 2,4-diklorfenoksyeddiksyre som funksjon av dendrimergenerasjon (d.v.s. 0,5 → 5,5). Den nedre stiplede linje (---) er for karboner 3 og 6 og den øvre heltrukne linje er for karbon 5. En minimumsverdi av T_1 oppnås i alle tilfeller for generasjon 2,5 → 5,5, hvilket indikerer at innbygging i dendrimer-generasjonsområdet skjer. Fig. 11 omfatter også T_1-verdier for 2,4-D i nærvær av trietylamin [$N(Et)_3$] (punktene B1 og B2) og $N(Et)_3$ + N-metylacetamid (punktene A1 og A2). Det kan sees at disse verdiene er meget større enn for dendrimerer G = 1.5 → 5.5, hvilket støtter ytterligere at det skjer en molekylær innvirkning i dendrimermolekylet.

Eksempel 16: Fremstilling av et produkt som inneholder fluorescein i en STARBURST®-polymer.

Et eksempel på 5-karboksyfluorescein (0,996 g) og STARBURST®-polyetylenimin (gen=2,0; aminterminalgruppe, startet fra NH_3) (0,202 g) ble blandet i 10 ml metylenklorid og 5 ml metanol og tillatt å reflukse i 10 min. Etter filtrering ble det oppnådd et uløselig rødt pulver (0,37 g) (det meste representerer ikke-reagert 5-karboksyfluorescein). Fra filtratet ble det isolert 0,4 g av et klart rødt fast materiale som viste et oppmykingspunkt på 98-103°C og smeltet til klart rødt materiale ved 175-180°C; NMR-spektra (D_2O) av dette var forenlig med dendrimer som hadde fluorescein bundet til overflaten.

Eksempel 17: I en fremgangsmåte lik den beskrevet i eks. 16, ble STARBURST®-polyetylenimin (gen = 2,0; amin-terminal gruppe, startet fra NH_3) reagert med fluorescein-isotiocyanat for å lage et klart rødt, lysende fast materiale som var passende for anvendelse som fluorescerende merkningsreagens.

Eksempel 18: Innkapsling av R(+)-limonen i polyamidoamin STARBURST®-dendrimerer.

En 5-50 vekt% oppløsning i metanol av STARBURST®-PAMAM-dendrimer (M.V. ca. 175.000; generasjon er = 9,0) blir tilsatt dråpevis til R(+)-limonen i metanol til metning. Løsningen røres ved romtemperatur (ca. 25°C) i flere timer og så avdampet på en Büchi rotovap ved romtemperatur til å gi et fast materiale. Oppvarming ved temperaturer høyere enn 80°C gir løsnings-uløselige produkter som beholder vesentlige mengder av R(+) limonen i en innkapslet form. Disse produkter er utmerkede prototyper for langsom frigjøring av (R+)-limonen som deodoriseringsprodukt.

Eksempel 19: Innkapsling av tungmetall-salter i polyamidoamin STARBURST®-dendrimerer.

En 5-50 vekt% løsning i vann av STARBURST® PAMAM-dendrimer (M.V. ca. 350.000; generasjon = 10,0) røres som mettet løsning av blyacetat [$Pb(C_2H_3O_2)_2$] med dråpevis tilsetning. Løsningen røres ved romtemperatur (ca. 25°C) i flere timer og avdampes så på en Büchi-rotovap til å gi faste produkter. Scannings-transmisjons-elektronmikrofotografier av disse produkter viste at de tunge metall Pb-saltene er kapslet inn i det indre av dendrimerene. Disse filmene som inneholder tungmetall-salter er nyttige som beskyttelse for å absorbere elektromagnetisk stråling.

Eksempel 20: Innkapsling av fluorescein (vannløselig) farve-stoff i polyamidoamin STARBURST®-dendrimerer.

En 5-50 vekt% oppløsning (H_2O/CH_3OH) av STARBURST® PAMAM-dendrimer (M.V. ca. 175.000; generasjon = 9,0) blir omrørt mens fluorescein, dinatriumsalt (syre gul 73, Cl, 45350; uranin; tilgjengelig fra Aldrich (Chemical Co., Milwaukee, Wi) settes til metning. Løsningen røres ved romtemperatur (ca. 25°C) i flere timer og fordampes så ved romtemperatur til å gi et farvet fast materiale. Disse farve-innkapslede dendrimerer er utmerkede referansmarkører for å kalibrere ultrafiltrasjons-membraner.

Eksempel 21: Fremstilling av dendrimerer med terminal-fluorescerende grupper.

A. Reaksjon mellom amin-endestilte dendrimerer med N-dansyl-aziridin

En prøve (1,5 g, $1,6x10^3$ mol) av STARBURST® polyetylenimin (PEI), G = 3,0, terminale grupper (Z) = 12, M.V. = 920) løses opp i 20 ml metanol. Løsningen omrøres og 0,884 g ($3,84x10^3$ mol) av en løsening av N-dansylaziridin (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA) tilsettes dråpevis i løpet av 20 min. Reaksjonsblandingen blir rørt ved romtemperatur over natten. Fjerning av løsningsmidlet i vakuum gir et fast produkt. NMR og infrarød analyse viser at produktet hadde kovalent bundet dansylgrupper på overflaten av dendrimeren.

B. Reaksjon mellom amin-endestilte dendrimerer og dansyl- klorid.

En løsning av STARBURST®-polyamidoamin (1,0 g. $1,9x10^{-4}$ mol) (startet fra ammoniakk, G = 4,0, terminale grupper (Z) = 24, M.V. = 5.147) i 30 ml vann omrøres i en 3-halset kolbe med 80 ml toluen mens en løsning av dansylklorid (1,23 g, $4,5 \times 10^{-3}$ mol) (5-dimetylamino-1-naftalensulfonylklorid, fra Aldrich Chemical Co., Milwaukee Wi) i 40 ml toluen tilsettes dråpevis under avkjøling på is. Samtidig tilsettes en løsning på 10% NaOH (13,3 mol, 10% overskudd) til reaksjonsblandingen slik at det dannes en olje-preget ball. Det urene produkt vaskes med vann, løses i metanol, og utfelles

med dietyleter til å gi et fast produkt. NMR og infrarød analyse er forenlig med kovalent bundne dansylgrupper på dendrimeroverflaten.

Eksempel 22: Fremstilling av magnesium PAMAM tett stjerne polymer.

Ved å følge fremgangsmåten som er vist i eks. 1 i US-patent nr. 4.587.329, fremstilles en tredje generasjon ester-terminal-stilt polyamidoamin tett stjernepolymer. Esterdelene hydrolyseres til natriumsalt ved å løse den tette stjernepolymer i 0,1N NaOH. En 131 mg (0,496 mmol) del av resulterende urene natriumsalt av den tette stjernepolymer løses opp i vann (1 ml, pH 11,4) og nøytraliseres til pH 7,0 ved tilsetning av 0,5M HCl. En 26 mg (2 ekv.) del av $MnCl_2.4H_2O$ settes til den nøytraliserte løsning og løsningen oppvarmes til 55°C i 2 dager. Den resulterende lysegule løsning renses ved bruk av Bio-Gell P2-søyle (15,0 g, 150 mm lengde x 25 mm diameter), elueres med vann, og isoleres som et farvet bånd. Produktet bekreftes å være kloridfritt (f.eks. NaCl, $MgCl_2$) ved hjelp av sølvnitrat-test. Eluatet ble tørket til å gi en klar gel som ble tørket videre under høyt vakuum til å gi 45 mg av det ønskede tette stjernepolymerkomplekset som ble analysert til å ha de følgende elementer, $[NaMn_2H_7][C_{69}H_{105}N_{19}O_{33}]$

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

Etter en lignende fremgangsmåte ved bruk av en syvende generasjon natriumkarboksylat-terminalstilt polyamidoamin tett stjernepolymer, fremstilles ytterligere et magnesium tett stjernepolymerkompleks som bestemmes å ha de følgende elementer, $[Na_{30}H_{354}][Mn_{10}C_{3057}H_{4965}N_{763}O_{1149}]$,

	Mn	C	H	N
Beregnet:	0,759	50,72	7,4	14,76
Funnet:	0,72	46,34	7,91	14,72

Relaksivitetene til de foregående kompleksene måles i vann og resultatene er vist i tabell IX. Med hensyn til sammenligning, blir relaksivitetene til magnesiumkompleksene med to kjente kompleksforbindelser beregnet fra de tilsvarende relaksasjonstider ved bruk av nukleær magnetisk resonans. Resultatene er vist i tabell IX.

Tabell IX

Relaksivitet

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

* $(mM\ sek.)^{-1}$, 37°C, 90 MHz. Verdier pr. metall-atom

Eksempel 23:

Med bruk av fremgangsmåten i eks. 22, fremstilles tette stjernepolymer-komplekser av jern. I én utførelsesform fremstilles natriumsaltet av syren fra en sjette generasjon polyamidoamin ved å løse esterformen av polyamidoaminet laget ifølge overskudd reaktantmetoden i 1N NaOH beskrevet i US-patent nr. 4.587.329. Natriumsaltet (97 mg, $2,4 \times 10^{-3}$ mmol) løses opp i 2 ml vann og løsningen (pH på 11,3) nøytralseres til pH 7 med 0,5M HCl. Den nøytraliserte løsning tilsettes en vandig løsning av $FeCl_3$ (0,102 M, pH 1,4, 0,5 ml, 0,051 mmol, 21,6 ekv.). Den resulterende dyp orange løsning (pH 4,9) oppvarmes til 55°C i 23 timer. Løsningen avkjøles til romtemperatur og filtreres ved hjelp av gelkromatografi (Biogel P2-søyle, 175 x 25 mm). Det orange eluatet tørkes under vakuum ved 50°C til å bli 45 mg av et orange fast materiale som har følgende molekylformel: $[Na_5H_{127}]\{Fe_{20}$[PAMAM-P(6,5G]} karakterisert ved at PAMAM-P representerer det tette stjernepolyamidoamin i propionat-terminal gruppeform. Dette orange faste materiale bestemmes å være et kompleks av jern og den polyamidoamin tette stjernepolymer representert ved formelen $Na_5H_{127}Fe_{20}(C_{1521}H_{2469}N_{379}O_{573})$,

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

Etter de ovenfor beskrevne fremgangsmåter, fremstilles lignende komplekser av jern og acetat-terminalstilt polyamidoamin tette stjernepolymerer eller acetat-terminalstilt

polyetylenimin tette stjernepolymerer som har 2-6 generasjoner. Relaksasjonstidene for disse komplekser måles ved bruk av nukleær magnetisk resonans og de tilsvarende relaksiviteter beregnes som rapportert i tabell X.

Tabell X

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

*(mM sek.)$^{-1}$, 37°C, 90 MHz. Verdier pr. metallatom.

**Verdier pr. kompleks.

Eksempel 24:

Ved bruk av fremgangsmåten ifølge eks. 22, fremstilles komplekser av gadolinium og polyamidoamin og polyetylenimin tette stjernepolymerer beskrevet i eks. 23 og deres relaksasjonstider måles og relaksivitetene beregnet med resultatet som vist i tabell XI. Som en illustrasjon for fremstilling av gadoliniumkomplekset, blir 0,40 g, (0,16 mmol) natriumacetat-formen av polyetylenimin tett stjernepolymer (annen generasjon) fremstilt

som i eks. 6 ifølge US-patent 4.587.329, etterfulgt av reaksjon med et overskudd bromeddiksyre ved
pH = 9, 40°C, oppløst i 5 ml vann. pH i den resulterende løsning senkes til 9,2 med 0,5N HCl og 3,2 ml vandig løsning av $GdCl_3$ (0,31 mmol) tilsettes. pH av den resulterende løsning økes fra 4,1 til 8,3 med 1N NaOH og løsningen står i 24 timer. Fordampningene blir så fjernet fra løsningen i vakuum og bunnfallet kromatografert to ganger i chelex resin. Det gjenværende lysegule materiale ble funnet å ha et atomforhold av Gd til N på 2:1. Funnet (%): C, 14,5; H, 2,1; N, 3,6; Gd, 7,9; Br, 28,7.

Etter den ovenfor nevnte fremgangsmåte, fremstilles lignende komplekser av gadolinium og acetat-terminale polyamidoamin tette stjernepolymerer eller acetat-terminale polyetylenimin tette stjernepolymerer som har fra 2 til 6 generasjoner. Relaksasjonstidene for disse komplekser måles ved bruk av nukleær magnetisk resonans og de tilsvarende relaksiviteter beregnes og er vist i tabell XI.

Tabell XI

Forbindelse	Relaksasjon* R_1
$Gd(NO_3)_3$	8,6±0,3
$GdCl_3$	8,7±0,1
$GdCl_3$(0,15M saltvann)	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)	15,35±0,17
Gd_2(PEI-A) + 3PEI-A	8,0±0,19
Gd(DTPMP)	10,8±0,4
Gd_2(PEI-A) + 2EDTA	ca. 6

* (mM sek.$^{-1}$, 37°C, 90 MHz. Verdier pr. metallatom.

Eksempel 25: Fremstilling av polyamidoamin STARBURST®-konjugatv med Bradykinin C.

Bradykinin potensiator C, 4,7 mg (Sigma Chemical Company), ble løst opp i 90 µl N-metylpyrrolidon (NMP) som inneholder 7,1 mg/ml N-hydroksybenzotriazol (HOBT) og blandet med 33 µl av en frisk fremstilt løsning av dicykloheksylkarbodiimid (DCC) (28 mg/ml NMP). Etter 4 timer ved romtemperatur, ble 60 µl av femte generasjon (G5) PAMAM i NMP (13,4 mg/ml) tilsatt Bradykinin-blandingen. Etter 72 timer ved romtemperatur ble 1,5 ml av 17 mM eddisyre tilsatt. Blandingen ble sentrifugert og løsningen dekantert fra det faste materiale som så ble vasket med 1,5 ml fortynnet eddiksyreløsning. Løsningen og vaskene ble kombinert og filtrert gjennom et 25 mm PTFE 0,45 µ sprøytefilter. Ikke-reagert peptid, HOBT og løsnings-middel ble adskilt fra konjugater ved ultrafiltrering ved bruk av to Centricon®-10 mikrokonsentreringsrør. Konjugatet ble vasket med 2 ml av 17 mM eddiksyre, og så 2 ml PBS-buffer. Konjugatet ble gjenvunnet i 450 µl retentat og fortynnet til 750 µl frisk PBS-buffer.

Fire prøver av konjugatet ble hydrolysert med konsentrert HCl ved 115°C i 20 timer og analysert for glutarsyre. Glutarsyren ble kvantifisert som o-ftalaldehyd/2-merkaptoetanol-derivat ved bruk av revers fase HPLC med en fluorescens-detektor (søyle: Whatman Partisil® 5CCS/C8(10 cm); Gilson Spectra®Glo- detektor; tyrosin som intern standard; eluent 50 mM natriumacetat og metanol; gradient: 12% til 30% metanol i 5 min. holdetid i 1 min. ved 30%, så øket til 80% metanol i løpet av 14 min. og holdt ved 80% i 5 min.). o-ftalaldehyd-derivatet ble fremstilt ved å blande 25 µl av aminosyreløsningen med 50 µl Fluoraldehyde®-o-ftalaldehyd-reagensløsning (Pierce), blandet i 1 min. og så fortynnet med 0,05 ml PBS-buffer (fosfatbufret saltvann; 120 millimolar natriumklorid, 2,7 millimolar kaliumklorid, 10 millimolar fosfatbuffersalter, pH 7,4). For en 25 µl prøve av konjugatet ble 58 nmol glutarsyre funnet. Dette tilsvarer 1,74 µmol Bradykinin C på konjugatet.

Eksempel 26: Fremstilling av polyamidoamin STARBURST®-konjugat med BOCPheLeuPheLeuPhe.

N-t-butoksykarbonyl-L-fenylalanyl-D-leucyl-L-fenylalanyl-D-leucyl-L-fenylalanyl (BOCPheLeuPheLeuPhe), 4,1 mg (Sigma Chemical Company), ble tatt opp i 100 µl NMP som inneholdt 7,1 mg/ml HOBT og blandet med 30 µl av frisk fremstilt løsning av DCC (36 mg/ml) i NMP. Etter 90 min. ved romtemperatur ble

60 µl av en løsning av 5 G PAMAM i NMP (13,4 mg/ml) tilsatt. Etter 72 timer ved romtemperatur ble konjugatet isolert ved å følge fremgangsmåten i eks. 24. Konjugatet ble gjenvunnet i 750 µl retentat.

Fire prøver av konjugatet ble hydrolysert med konsentrert HCl ved 115°C i 20 timer og analysert med hensyn til fenylalanin. Fenylalaninet ble målt som o-ftalaldehyd/2-merkapto-
etanol-derivat ved bruk av revers fase HPLC med en fluorescens-detektor (HPLC-betingelser som i eks. 24 bortsett fra at elueringsgradienten var 12% til 80% metanol i løpet av 20 min., og så holdt ved 80% i 5 min.). o-ftalaldehyd-derivatet ble fremstilt som beskrevet i eks. 24. For en 25 µl prøve av konjugatet, ble 26 nmol fenylalanin funnet. Dette tilsvarer 0,26 µmol BOCPheLeuPheLeuPhe på konjugatet.

Eksempel 27:

Til en metanol-løsning av 1,4,7-tris-(karbometoksymetyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (DO3A metylester) tilsettes
1,0 ekv. nylig fremstilt vannfritt natrium-metoksyd og løsningen omrøres i flere timer. Til denne løsning tilsettes 1 ekv. 10,11-epoksy-undekansyre og løsningen behandles til refluks over natten. Løsningen fjernes i vakuum til å gi et urent hydroksyetylert produkt, 1,4,7-tris-(karbometoksymetyl)-10-[2'-hydroksy-10'-karboksy(decyl)]-1,4,7,10-tetraazacyklododekan. 2-5 ekv. av dette produktet løses i dimetylformamid (DMF) og tilsvarende ekvivalenter av dicykloheksylkarbodiimid (DCC) og N-hydroksysuksinimid tilsettes med røring natten over. Til denne løsning settes en 1 ekv. generasjon 2 PAMAM og omrøring fortsetter ytterligere 24 timer. Det tilsvarende DO3A metylesterkonjugatet hydrolyseres selektivt ved behandling med vandig natriumhydroksyd i metanol. Behandling av DO3A-konjugatet med overskudd gadolinium(III)-acetat [$Gd(OAc)_3$, bufret til pH = 6] etterfulgt av inkubasjon med overskudd dietylentriaminpentaeddiksyre (DTPA) og rensing av konjugatet ved bruk av preparativ revers fase HPLC gir et hydroksyetyl DO3A PAMAM STARBURST®-konjugat som inneholder to tl fem ekvivalenter gadolinium som ikke fjernes ved videre behandling med overskudd DTPA.

Eksempel 28:

Til en vandig løsning av generasjon 2 PAMAM, som er bufret til pH = 9,0, blir tilsatt to til fem ekvivalenter av 1-[1-karboksy-3(4'-isotiocyanat-fenyl)propyl]-4,7,10-tris-(karboksymetyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan fremstilt ved hjelp av fremgangsmåten beskrevet i EP-publisert søknad
0353450, publisert 7. febr. 1990. Løsningen omrøres over natten ved romtemperatur. Behandling av løsningen med overskudd $Gd(OAc)_3$ ved pH = 6,0, resulterer i dannelse av et tiourea-bundet DOTA PAMAM STARBURST®-konjugat som inneholder to til fem ekv. av inert bundet gadolinium som ikke kan fjernes ved behandling med DTPA.

Eksempel 29: Fremstilling av IgG/dendrimer-FITCI-konjugat.

A: Fremstilling av PAMAM-dendrimer konjugert i fluorescein-Isotiocyanat.

En 2,2 ml metanol-løsning av G9(EDA) PAMAM-dendrimer ble tørket under vakuum ved hjelp av rotasjon. Ca. 300 mg (7,4 μmol) av den tørkede dendrimer ble hurtig fjernet og løst opp i 1 ml deionisert vann til å lage stam-dendrimerløsningen. En 60 mg/ml løsning ble fremstilt ved å blande 200 μl av stam-dendrimerløsningen og sette den til 800 μl deionisert vann. For å oppnå en endelig dendrimerkonsentrasjon på 10 mg/ml (endelig dendrimerløsning), ble 5 ml av 0,1M fosfatbuffer (pH = 9,0) tilsatt til 60 mg/ml løsningen. Den endelige dendrimerløsning, 3 ml, ble overført til et 2 dram glass (30 mg, 0,13 μmol).

Fluorescein-isotiocyanat (FITCI, Molecular Probes), 5 mg, ble løst opp i 1 ml dimetylsulfoksyd i mørket. Fluorescein-isotiocyanatløsningen (200 μl, 2,57 μmol) ble tilsatt dendrimerløsningen under røring. Den resulterende reaksjonsblanding ble beskyttet fra lys og rørt ved romtemperatur i 15-20 timer. Løsningen forble klar og lys.

Etter røring, ble reaksjonsblandingen overført i to Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekylvekt-avgrensningspunkt: 10.000 Dalton), og ble ultrafiltrert ved å fjerne alt ikke-reagert FITCI. Under ultrafiltreringen ble ti, 2 ml tilsetninger av en 0,1M fosfatbuffer, pH 9, utført for å lette opprensingen. Ultrafiltreringene ble analysert for renhet ved tynnsjikt-kromatografi for å sikre den fullstendige fjerning av alt ikke-reagert FITCI. Tynnsjikt-kromatografi ble utført ved bruk av silikagel 60-plater (Merck) ved bruk av etylacetat (100%) oppløsningssystem. Mens den merkede dendrimer forble ved startpunktet, eluerte gjenværende FITCI nær med en R_f=0,7. Omtrent 2 ml konjugert G9 PAMAM-dendrimer-FITCI ble gjenvunnet fra renseprosessen.

B. Fremstilling av PAMAM-dendrimer konjugert til fluorescein-isotiocyanat og IgG.

Kanin-immunoglobulin (IgG, Sigma Chemical Co.), 9,8 mg, ble løst opp i 1 ml 30 mM natriumacetat og 150 mM natriumkloridbuffer (pH=5,5). Til IgG-løsningen ble tilsatt 1,5 mg natriumperiodat med svak røring til det var oppløst. Blandingen ble beskyttet fra lys og rørt forsiktig ved romtemperatur i 15-18 timer. Etter røring, ble reaksjonsblandingen plassert i to Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekyvekt-eksklusjonspunkt: 10.000 Dalton) og ble ultrafiltrert i 20 mM fosfatbuffer, pH 6,0 (4 x 2 ml). Omtrent 1-2 ml av IgG-dialdehyd-løsningen ble gjenvunnet fra opprensingen.

En prøve av den merkede dendrimer-FITCI-løsning fra trinn A (0,88 ml, 17,6 mg, 0,075 μmol) ble tilsatt dråpevis til IgG-dialdehydløsningen. (Dette representerer ca. 1,15:1-forhold mellom merket dendrimer og antistoff). Ved tilsetning av den første dråpe av dendrimerløsningen, skjedde det utfelling i reaksjonsblandingen. Ytterligere 3 ml 20 mM fosfatbuffer (pH = 6,0) ble tilsatt men den løste ikke opp de faste materialer.

IgG/dendrimer-FITCI-konjugatet ble beskyttet for lys og tillatt å bli rørt ved romtemperatur i 1 time. Etter den tid ble 1,7 mg natriumcyanoborhydrid tilsatt og reaksjonen rørt over natten (15-20 timer) ved romtemperatur. Løsningen var fluorescerende orange med noe utfelling. Reaksjonsproduktet, inklusive presipitatet, ble overført til to Centricon®-mikro-konsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt: 100.000 Dalton), og ble ultrafiltrert. Seks ytterligere 2 ml volumer av 20 mM fosfatbufferen (pH = 6) ble tilsatt under fremstillingen for å fjerne alt ikke-bundet dendrimer-FITCI. IgG/dendrimer-FITCI-konjugatet ble gjenvunnet og overført til en glassflaske for lagring ved -10°C.

Eksempel 30: Fremstilling av IgG/dendrimer-dansylkonjugate.

A: Fremstilling av G9 PAMAM dendrimer-dansylkonjugat.

Ved bruk av 200 µl av stam-dendrimerløsningen fremstilt ifølge eks, 29A og tilsetning av 800 µl deionisert vann, ble en 60 mg/ml løsning fremstilt. For å oppnå den endelige dendrimer-konsentrasjon på 10 mg/ml, ble 5 ml 0,1M fosfatbuffer (pH = 9,0) satt til 60 mg/ml løsningen.

Dansylklorid (13,9 mg, 0,052 mmol, Aldrich Chem. Co.) ble tilsatt i 5 ml aceton og ristet i 5-10 min. (Denne løsning var dyp gul av farve og hadde spor av fast materiale til stede). Dansylkloridløsningen ble satt til dendrimerløsningen i løpet av 30 sek. og reaksjonsflasken plassert i vannbad ved 40°C i 90 min. Under oppvarming, ble reaksjonsblandingen rystet av og til. Reaksjonsblandingen var lett tåket av utseende og farven ble svekket fra dyp gul til lys gul. Etter 90 min., ble reakasjonsflasken fjernet fra varmen og tillatt å avkjøles til romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble så plassert under roterende fordampning, under vakuum, ved 30-35°C for å fjerne acetonet. Reaksjonsproduktet ble overført til to Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt: 100.000 Dalton), og ble ultrafiltrert for å fjerne alt ikke-bundet dansylklorid. Ti, 2 ml tilsetninger av 0,1M fosfatbuffer (pH = 9,0) ble utført under ultrafiltreringen.

Ultrafiltreringene ble analysert med hensyn til renhet ved hjelp av tynnsjiktskromatografi for å forsikre fullstendig fjerning av alt ikke-reagert dansylklorid. Tynnsjiktskromatografi ble utført ved hjelp av silikagel 60-plater (Merck) ved bruk av etylacetat (100%) løsningssystem (synliggjøring ved UV-lys). Mens den merkede dendrimeren forble ved utgangspunktet, eluerte det gjenværende dansylklorid nær en R_f-verdi = 0,3. Omtrent 1,2 ml konjugert G9 PAMAM dendrimer-dansyl ble gjenvunnet etter opprensingen.

B: Fremstilling av PAMAM dendrimer konjugert i dansyl og IgG.

Kanin-immunoglobulin (IgG, Sigma Chemical co.), 9,8 mg, ble løst opp i 1 ml av 30 mM natrimacetat og 150 mM natriumkloridbuffer (pH = 5,5). Til IgG-løsningen ble tilsatt 1,5 mg natriumperiodat med forsiktig omrøring til det løste seg opp. Blandingen ble beskyttet fra lys og rørt forsiktig ved romtemperatur i 15-20 timer. Etter røring, ble

reaksjonsblandingen overført i to Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt: 100.000 Dalton) og ble ultrafiltrert i 20 mM fasfatbuffer, pH = 6,0 (4 x 2 ml). Omtrent 1,9 ml av IgG-dialdehydløsningen ble gjenvunnet etter opprensingen.

En prøve, 1,25 ml, av den merkede dendrimer-dansyl-løsningen fra trinn A (14,1 mg/ml) ble tilsatt dråpevis i IgG dialdehydløsningen. (Dette representerer et ca. 1,15:1-forhold mellom merket dendrimer og antistoff). Ved tilsetning av den første dråpen av den merkede dendrimerløsningen, skjedde utfelling i reaksjonsblandingen.

IgG/dendrimer-dansylkonjugatet ble beskyttet fra lys og tillatt å bli rørt ved romtemperatur i 1 time. Etter den tid ble 1,7 mg natriumcyanoborhydrid tilsatt og reaksjonen rørt over natten (15-20 timer) ved romtemperatur, Reaksjonsproduktet, inklusive bunnfallet, ble overført til to Centricon®mikrokonsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt: 100.000 Dalton) og ble ultrafiltrert. Ytterligere seks 2 ml volum ev 20 mM av fosfatbufferen (pH = 6,0) ble tilsatt under fremstillingen for å fjerne alt ikke-bundet dendrimer-dansyl. IgG/dendrimer-dansylkonjugatet ble fjernet og overført til en ikke-klar glassflaske for lagring ved -10°C.

Eksempel 31: Fremstilling av PAMAM-dendrimer konjugert til HRP og IgG.

A: Fremstilling av PAMAM-dendrimer konjugert til IgG

Kanin-immunglobulin (IgG, Sigma Chemical Co.), 9,6 mg, ble løst opp i 1 ml av 30 mM natriumacetat og 150 mM natriumkloridbuffer (pH = 5,5). Til IgG-løsningen ble tilsatt 1,5 mg natriumperiodat med forsiktig røring til det ble løst opp. Blandingen ble beskyttet fra lys og rørt forsiktig ved romtemperatur i 15-18 timer. Etter omrøring ble reaksjonsblandingen overført i to Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt: 100.000 Dalton), og ble ultrafiltrert i 20 mM fosfatbuffer, pH = 6,0 (4 x 2 ml). Omtrent 1,5 ml av IgG-dialdehydløsningen ble gjenvunnet etter opprensingen.

En prøve, 100 µl, dendrimer stamløsning fra trinn A i eks. 29 ble tilsatt til 100 µl deionisert vann slik at man fikk 150 mg/ml løsning. Den endelige konsentrasjon på 15 mg/ml ble oppnådd ved videre fortynning av 100 µl av dendrimer-løsningen med 900 µl deionisert vann. Den endelige dendrimer-løsningen, 1 ml, ble tilsatt dråpevis til IgG-dialdehyd-løsningen og blandingen omrørt i 1 time ved romtemperatur. Et bunnfall utviklet seg. Etter den tid ble 1,7 mg natriumcyano-borhydrid tilsatt og reaksjonen ble rørt over natten (15-20 timer) ved romtemperatur. Reaksjonsproduktet, inklusive bunnfallet, ble overført til to Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt: 100.000 Dalton), og ble ultrafiltrert. Fire ytterligere 2 ml volum av 20 mM fosfatbuffer (pH = 6,0) ble tilsatt under fremstillingen for å fjerne alt ikke-bundet dendrimer-IgG. IgG/dendrimer-konjugatet ble gjenvunnet og overført til et 2 dram glass.

B: Fremstilling av PAMAM dendrimer/IgG-HRP-konjugat

Pepperrot peroksydase (HRP, 2,6 mg, Pierce) ble løst opp i 0,5 ml deionisert vann for å lage HRP-løsningen. Natriumperiodat, 10,7 mg, ble løst opp i 5 ml av 10mM natriumfosfat (pH = 7,0). Omtrent 1,6 ml periodatløsning ble tilsatt til HRP-løsningen ved romtemperatur. Enzym-reaksjonsblandingen ble beskyttet fra lys og forsiktig rørt ved romtemperatur i
30 min. Det oksyderte HRP-produkt ble overført til to Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt: 10.000 Dalton), og ultrafiltrert. Ytterligere fire 2 ml volum av 30 mM natriumacetat/150 mM natriumkloridbufferen (pH = 5,5) ble tilsatt under fremstillingen.

Den oksyderte enzymløsning ble tilsatt til PAMAM dendrimer/IgG-konjugatblandingen under røring. Selv om bunnfallet forble i reaksjonen, ble blandingen tillatt å bli rørt i 2 timer ved romtemperatur. Etter 2 timer, ble 2,1 mg natriumborhydrid løst opp i 1 ml deionisert vann og 100 µl borhydrid-løsning tilsatt PAMAM dendrimer-IgG-HRP-blandingen. Reaksjonen ble rørt over natten (15-20 timer) ved 2-8°C.

Reaksjonsproduktet, inklusive bunnfallet, ble overført i to Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt: 100.000 Dalton), og ble ultrafiltrert. Ytterligere fire 2 ml volum av 20 mM fosfatbufferen (pH = 6,0) ble tilsatt under fremstillingen. IgG/dendrimer/HRP-konjugatet ble gjenvunnet og overført til et 2 dram glass for lagring ved -10°C.

Eksempel 32: Fremstilling av IgG/dansylert PAMAM dendrimer/-HRP-konjugat.

A: Fremstilling av HRP-løsning

Pepperrot-peroksydase (HRP, 2,6 mg, Pierce) ble løst opp i 0,5 ml deionisert vann for å lage HRP-løsningen. Natriumperiodat, 10,7 mg, ble løst opp i 5 ml av 10mM natriumfosfat (pH = 7,0). Omtrent 1,6 ml periodatløsning ble tilsatt til HRP-løsningen ved romtemperatur. Enzymreaksjonsblandingen ble beskyttet fra lys og forsiktig rørt ved romtemperatur i
30 min. Det oksyderte HRP-produkt ble overført i to Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt: 10.000 Dalton), og ble ultrafiltrert. Fire ytterligere 2 ml volum av 30 mM natriumacetat/150 mM natriumkloridbufferen
(pH = 5,5) ble tilsatt under fremstillingen. Den oksyderte enzymløsning ble gjenvunnet og overført til et 2 dram glass.

B. Fremstilling av dansyl G4 PAMAM dendrimerløsning

En 5 ml metanol-løsning med 12,7% (vekt/vekt) av G4(NH_3) PAMAM-dendrimer (NH_3 kjerne)-løsning ble tørket under vakuum med rotasjon. Omtrent 40 mg (7,4 µmol) av den tørre dendrimer ble fjernet og løst opp i 5 ml av 0,1M fosfatbuffer (pH=9,0).

En 10 mg (0,037 mmol) mengde dansylklorid ble tilsatt til 5 ml aceton og rystet i 5-10 min. Løsningen var dyp gul og hadde spor av utfelling. Dansylkloridløsningen ble satt

til dendrimerløsningen i løpet av 30 sek. og reaksjonsflasken overført til vannbad ved 40°C i 90 min. Under oppvarmingen, ble reaksjonsblandingen rystet av og til. Farven på løsningen var svak gul. Etter 90 min. ble reaksjonsflasken fjernet fra varmen og avkjølt til romtemperatur. Reaksjonsblandingen var svakt tåket.

Reaksjonsløsningen ble fordampet for å fjerne aceton ved bruk av rotasjon under vakuum ved 30-35°C. Løsningen klarnet opp ved denne fremgangsmåte. Reaksjonsblandingen ble så overført til to sentrifugerør og sentrifugert ved 5.000 opm i 30 min. Dendrimerløsningen ble så plassert i to Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt: 3.000 Dalton), og ble ultrafiltrert fire ganger fra et volum på 2 ml for å fjerne alt ikke-bundet dansylklorid. Omtrent 1-2 ml dansylert dendrimer-produktløsning ble gjenvunnet.

C: Fremstilling av IgG/dansyl G4 PAMAM dendrimerløsning

En 6,9 mg mengde kanin-immunoglobulin (IgG) ble løst opp i 1 ml av 50 mM fosfatbuffer (pH = 7,2). En 14,7 mg mengde natriumperiodat ble tilsatt og blandingen omrørt inntil det faste materiale var løst opp. Blandingen ble beskyttet fra lys og rørt i ytterligere 30 min. ved romtemperatur. Løsningen ble så overført i to Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt; 3.000 Dalton), og ble ultrafiltrert fire ganger fra et volum av 2 ml hver gang ved bruk av 50 mM fosfatbuffer (pH = 7,7) for å sikre fjerning av alt ikke-reagert natriumperjodat. Omtrent 1 ml dialdehydløsning ble gjenvunnet og overført til et glass for å forberede kobling med den dansylerte dendrimer.

En prøve av den merkede dansylerte dendrimer fra del B ble fjernet fra stam-løsningen og fortynnet til den endelige dendrimerkonsentrasjon på 3,0 mg/ml. Et 100 µl volum av den fortynnede dansylerte dendrimer ble tilsatt IgG/dialdehyd-løsningen og rystet opp. Dette representerer et ca. 1,2:1- forhold mellom den merkede dendrimer og IgG.

Det IgG/dansylerte dendrimerkonjugat ble beskyttet fra lys og rørt ved romtemperatur i 1 time. Deretter ble 1,4 mg natriumcyanoborhydrid tilsatt og reaksjonen rørt over natten (15-20 timer) ved romtemperatur. Løsningen syntes å være klar. En prøve på 200 µl ble tatt ut for elektroforese og resten av løsningen ble så overført i to Centricon®-mikro-konsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt: 100.000 Dalton), og ultrafiltrert. Fire ytterligere 2 ml volum av 50 mM fosfatbuffer (pH = 7,2) ble tilsatt under fremstillingen for å fjerne alt ikke-bundet dansyldendrimer. Det forønskede konjugat ble isolert.

D: Fremstilling av G4 PAMAM dendrimer/dansyl/IgG/HRP-konjugat

Til 650 µl (10,1 mg) av IgG/dansyl G4 PAMAM dendrimer-løsning (fremstilt i del C) ble tilsatt 2,6 mg oksydert HRP. IgG/dansyldendrimer/HRP-konjugatet ble beskyttet fra lys og rørt ved romtemperatur i 2 timer. Etter 1 time ble 2,1 mg natriumborhydrid løst opp i 1 ml deionisert vann og 100 µl borhydridløsning tilsatt PAMAM dendrimer-IgG-HRP-blandingen. Reaksjonen ble rørt over natten (15-20 timer) ved 2-8°C. Blandingen var en klar farvet løsning.

Reaksjonsproduktet ble overført i to Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt: 100.000 Dalton), og ultrafiltrert. Fire ytterligere 2 ml

volum av 20 mM fosfatbuffer (pH = 6,0) ble tilsatt under fremstillingen. IgG/-dansyl/dendrimer/HRP-konjugatet ble gjenvunnet og overført til et glassrør for lagring ved -10°C.

E: Karakterisering av G4 PAMAM dendrimer/dansyl/IgG-HRP-konjugat

Prøver av IgG/dendrimer/HRP-konjugater ble undersøkt for nærvær av HRP-enzym ved bruk av 3,3'-5,5'-tetrametylbenzidin (TMB). HRP katalyserer hydrogenperoksydoksydering av substrater, slik som TMB, ved å overføre elektroner fra TMB til peroksydet hvilket gir et farvet produkt. Derfor gir tapet av én elektron en blå farve og tapet av to elektroner gir en gul farve.

De følgende dendrimer/dansyl/IgG-HRP-konjugatene ble fremstilt for å bekrefte tilstedeværelsen av HRP-enzymet:

(1) 0,1 mg/ml IgG/dansyl G4 PAMAM dendrimer
(2) 0,1 mg/ml IgG/dansyl G4 PAMAM dendrimer/HRP
(3) 0,1 mg/ml IgG/G9 PAMAM dendrimer/HRP
(4) Ultrafiltrat fra IgG/G9 PAMAM dendrimer/HRP, som inneholder ikke-bundet HRP

TMB-substratløsningen ble fremstilt ved bruk av TMB-dihydroklorid. Hver av de ovenfor fortynnede prøver, 200 µl, ble tilsatt i 200 µl TMB-substratløsning. De to HRP-konjugater (nr. 2 & nr. 3) ble øyeblikkelig grønne, så gule. Ultrafiltratet (nr. 4) ble klart gult. IgG/dendrimer (nr. 1) forble farveløs. Alle fire prøver ble inkubert ved romtemperatur i 30 min., deretter stoppet med 200 µl 1N svovelsyre. Den gule farven til enzymkonjugatene (nr. 2 & nr. 3) ble mer intens. IgG/dendrimer (nr. 1) var svak grønn og viste fluorescens under UV-lys.

Prøver på alle konjugatene ble analysert ved polyakrylamid gelelektroforese. Prøvekonsentrasjoner på ca. 1 mg/ml ble fremstilt for elektroforese, hvilket tilsvarer ca. 10 µg elektroforeseprøve. En Amicon Gradipore® (Hylinx) 5-50% T- gradientgel ble benyttet sammen med 0,05M natriumacetatbuffer (0,025% i natriumazid) pH = 4,0. Gelen ble kjørt ved konstant spenning på 200 V i 2 timer. Konjugater som inneholdt utfelling ble sentrifugert før elektroforese-analyse. Supernatanten ble fjernet og benyttet for elektroforese. De følgende prøver ble kjørt:

(1) G9 PAMAM dendrimer
(2) Dansylert G9 PAMAM dendrimer
(3) G9 PAMAM dendrimer-FITCI
(4) IgG (kontroll)
(5) IgG/dansyl G9 PAMAM dendrimer
(6) IgG/G9 PAMAM dendrimer/FITCI
(7) IgG/G9 PAMAM dendrimer/HRP
(8) HRP (kontroll)

(9) IgG/dansyl G4 (NH_3) PAMAM dendrimer/HRP

(10) Åpen

(11) Gjenta nr. 7

(12) Gjenta nr. 9

Før farving ble gelen lagt under UV-lys for å identifisere all fluorescens. Kun prøvene nr. 2, 3 og 6 viste fluorescens.

Synliggjøring av gelen etter TMB, men før farving viste prøver nr. 7, 8, 9, 11 og 12 å bekrefte nærvær av enzym ved høyere molekylvekter på gelen.

Gelen ble deretter farvet med 0,025% Coomassie-blå farve over natten i 5% eddiksyre og 7% metanol. Prøve nr. 10 var det eneste ufarvede spor på gelen. Prøver nr. 4 og 8 var ved lavere molekylvekter. Alle andre prøver viste høye molekylvekter uten noen lavere molekylvekter til stede.

Eksempel 33: Fremstilling av G6 PAMAM dendrimer/diklor-triazinyl-fluorescein

G6 (EDA) PAMAM dendrimer, 300 µl (21,5% faststoffer) ble tilsatt 700 µl deionisert vann og slemmet opp (64,5 mg, 2,24 µmol). Dendrimeren ble videre fortynnet med 4 ml deionisert vann til en konsentrasjon på 12,9 mg/ml.

Diklortriazinylfluorescein-hydroklorid DTAFI, (tilgjengelig fra Sigma), 6,0 mg (11,3 µmol) ble løst opp i 0,5 ml metanol i mørket, og 2 dråper trietylamin ble tilsatt. DTAFI-løsningen ble tilsatt dråpevis til den omrørte dendrimerløsningen i løpet av 30 sek. Reaksjonsblandingen ble beskyttet fra lys og rørt ved romtemperatur i 15-20 timer. Løsningen forble klar og orange under reaksjonen. Etter røring ble reaksjonsblandingen overført i to Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt: 10.000 Dalton), og ble ultrafiltrert for å fjerne alt ikke-reagert DTAFI. Femten, 2 ml volum av 0,1M fosfatbuffer (pH = 9,0) ble tilsatt under prosessen. Omtrent 3 ml konjugert G6(EDA) PAMAM dendrimer/DTAFI ble gjenvunnet.

Eksempel 34: Fremstilling av G5,5 PAMAM dendrimer/amino-metylfluorescein.

G5,5 (NH_3) PAMAM dendrimer, 1 ml løsning (4,2% fast materiale, 42 mg, 1,7 µmol) ble tilsatt et 2 dram glass.

I et annet glass, ble 6,6 mg (1,7 µmol) 4'-aminometyl-fluorescein (AMF) løst opp i 0,5 ml deionisert vann. pH ble justert til 9 ved tilsetning av 2 dråper trietylamin.

I et tredje glass ble 63,8 mg 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid (EDAC) løst opp i 1 ml deionisert vann.

AMF-løsningen ble tilsatt den omrørte dendrimerløsningen i løpet av 1-2 min. ved romtemperatur. pH av dendrimer/AMF-løsningen ble justert til 4,5-5,5 ved bruk av 1N

saltsyre. Løsningen forble klar. Med fortsatt omrøring ble blandingen tilsatt EDAC-løsningen, i 200-300 µl porsjoner, i løpet av 1 time med 15-20 minutters intervaller. pH i reaksjonsblandingen ble holdt mellom 4,5-5,5 ved bruk av 1N saltsyre. Reaksjonsblandingen ble beskyttet fra lys og rørt ved romtemperatur i 15-20 timer. Løsningen var klar og orange.

Etter omrøring ble reaksjonsblandingen overført til to Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt: 10.000 Dalton), og ble ultrafiltrert for å fjerne alt ikke-reagert AMF. Femten, 2 ml volum av 0,1M fosfatbuffer (pH = 9,0) ble tilsatt under fremstillingen. Omtrent 2 ml konjugert G5,5 PAMAM dendrimer/AMF ble gjenvunnet.

Eksempel 35: Fremstilling av 3,0 generasjon PAMAM/isatoin-anhydrid-konjugat.

Generasjon 3,0 PAMAM, 2 mg, ble løst opp i metanol og avkjølt på isbad. Til denne løsning ble tilsatt 0,01 g isatoin-anhydrid. Blandingen ble rørt i 2 timer, badet tillatt å nå romtemperatur og røring fortsatte i flere dager. Metanol ble så fjernet ved hjelp av fordampning under rotasjon og produktet løst opp i vann. Løsningen ble så dialysert ved bruk av Spectrapor nr. 1-membran. Løsningen ble så konsentrert til 38 ml og dets fluorescens-spektrum undersøkt ved å bruke bestråling ved 340 nm og påvisning ved 420 nm. Fluorescens var fremdeles påviselig etter en 10.000 ganger fortynning og resultatet var lineært for fortynninger mellom 100 og 1.000.

Eksempel 36: Fremstilling av 4,0 generasjon PAMAM dendrimer/-DTPA/Gd-konjugat.

A: Fremstilling av en 4,0 generasjon PAMAM dendrimer med metylester-terminale grupper

En 3,5 generasjon PAMAM dendrimer med metylester-terminale grupper ble fremstilt ved etterfølgende reaksjon med metylakrylat og etylendiamin. Til 1.000 g predestillert etylendiamin ble så tilsatt ca. 5 g av 3,0 generasjon PAMAM dendrimer, metylester-terminale grupper, som en 15 vekt% løsning i metanol. Løsningen sto i romtemperatur i 48 timer. Metanolen og mesteparten av overskudd etylendiamin ble fjernet ved fordampning under rotasjon og vakuum ved en temperatur på mindre enn 60°C. Totalt ca. 7,5 g produkt ble gjenvunnet. For å fjerne beholdt etylendiamin, ble produktet løst opp i 100 ml metanol og ultrafiltrert gjennom to Centricon®-mikro-konsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt: 2.000 Dalton). Når mesteparten av løsningen hadde gått gjennom membranen, ble flere ytterligere deler metanol tilsatt og ultrafiltreringsprosessen gjentatt. Retentatet ble overført til en flaske med rund bunn og filterkoppen ble renset gjentatte ganger med metanol og kombinert med retentatet. Flyktige løsningsmidler ble fjernet fra retentatløsningen ved

roterende fordampning under vakuum. Ca. 6 g 4.0 PAMAM (M.V. 5.147 Dalton, 24 terminale aminogrupper) ble gjenvunnet.

B: Fremstilling av 4.0 generasjon PAMAM dendrimer/DTPA-anhydrid-konjugat

En løsning av PAMAM (4 g, 7,6 x 10^{-4} mol) i 300 ml vann ble rørt i en tre-halset flaske. I løpet av den neste time ble 29 g (72 x 10^{-3} mol) av det faste stoff, N^3(2,6-dioksomorfolinetyl)-N^6-etoksykarbonylmetyl-3,6-diazaoktandiacid (DTPA anhydrid) tilsatt porsjonsvis. Under tilsetningen ble pH opprettholdt på 8,8-9,2 ved tilsetning av 1N vandig natriumhydroksydløsning. Når tilsetningen var fullstendig ble løsningen rørt i ytterligere 30 min. Løsningens pH ble justert til 7 ved tilsetning av en ionebytterharpiks (H^+ form), og den resulterende oppslemming ble filtrert for å fjerne ionebytter-harpiksen. Filtratet ble overført til to Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt: 5.000 Dalton), og ultrafiltrert. Filtratet ble samlet og frysetørket. Utbyttet var ca. 12 g av farveløst flakformet pulver. Produktet var et polyamidoamid (24 terminale amingrupper) der hver endegruppe var koblet via en amidbinding til én av karboksylgruppene i DTPA.

C: Fremstilling av 4,0 generasjon PAMAM dendrimer/DTPA/Gd-konjugat

Ca. 10 g av cheleringsforbindelsen beskrevet ovenfor ble løst opp i 600 ml vann og blandet med 2,8 g Gd_2O_3. Oppslemmingen ble rørt i ca. 90 min. ved 80°C. Etter avkjøling til romtemperatur ble løsningens pH justert til 7 ved tilsetning av en ionebytterharpiks. Den resulterende oppslemming ble filtrert for å fjerne ionebytterharpiksen. Filtratet ble overført til to Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekylvekt- eksklusjonspunkt: 5.000 Dalton) og ultrafiltrert. Filtratet ble samlet og frysetørket. Utbyttet var ca. 12 g farveløst, flakformet pulver som inneholdt Gd ved atom-absorpsjon spektroskopisk analyse.

Eksempel 37: Fremstilling av et 3,0 generasjon, amino-endestilt dendrimer/DTPA/Gd-konjugat.

A: Fremstilling av en 3,0 generasjon, hydroksy-endestilt dendrimer

En 3,0 generasjon, hydroksy-endestilt dendrimer ble fremstilt fra pentaerytrityltetrabromid og 4-hydroksymetyl-2,6,7-trioksabicyklo[2,2,2]-oktan som beskrevet av Tomalia et al., i US-patent 4.587.329, eks. 11. Etter fremstillingen i trinn C av eks. 11 i US-patent 4.587.329, ble den annen generasjon hydroksy-endestilte polyeterdendrimer overført til det tilsvarende perbromid. Så etter fremgangsmåtene i trinn A og B i dette eksempel, ble det bromerte derivatet fra trinn C først reagert med 4-

hydroksymetyl-2,6,7-trioksabicyklo[2,2,2]-oktan og så demaskert med vann for å lage den ønskede tredje generasjon dendrimer.

B: Fremstilling av en 3,0 generasjon, klorid-endestilt dendrimer

En 500 ml tre-halset flaske utstyrt med rører, kondensator og tilsetningstrakt blandes med 0,1 mol av tredje generasjons-dendrimeren fra del A og 15 mol friskt destillert tionylklorid med en hastighet som gjør at temperaturen holdes under 45°C. Når tilsetningen er avsluttet varmes løsningen til ca. 50°C og holdes ved denne temperatur i ca. 4 timer. Overskudd tionylklorid fjernes under vakuum. Ved denne fremgangsmåte blir hydroksygruppene overført til klorid-andeler.

C. Fremstilling av en 3,0 generasjon, amino-terminal dendrimer

Den klorid-terminale dendrimer fra del B ble overført til en stor polyolefin-flaske og et stort overskudd ammoniumhydroksyd ble tilsatt. Flasken ble forseglet og innholdet lagret ved ca. 55°C i flere dager. Løsningen laget en restolje som ble løst opp igjen med et lite volum vann, pH ble justert til 8 ved tilsetning av natriumbikarbonat, og det ønskede amin ble ekstrahert med kloroform. Kloroformekstraktene ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat, filtrert og konsentrert til en restolje. Ved denne fremgangsmåte ble den klorid-endestilte dendrimer overført til en amino-endestilt dendrimer.

D; Fremstilling av en 3,0 generasjon, amino-endestilt dendrimer

Den hydroksy-endestilte dendrimer fra del A ble alternativt løst opp i dimetylformamid og reagert med overskudd metansulfonylklorid. Den resulterende tosylatester ble isolert ved fortynning av dimetylformamid med vann og ekstrahert med kloroform. Kloroformekstraktene ble vasket med fortynnet natriumbikarbonatløsning og vann, så tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Etter filtrering for å fjerne alt fast materiale ble filtratet konsentrert til tørrhet. Restoljen, den ønskede polymetansulfonatester, ble benyttet uten videre rensing og overført til en stor polyolefinflaske og et stort overskudd ammoniumhydroksydløsning ble tilsatt. Flasken ble forseglet og innholdet lagret ved ca. 55°C i flere dager. Den amino-endestilte dendrimer ble isolert som beskrevet ovenfor i del C.

E: Fremstilling av 3,0 generasjon, amino-endestilt dendrimer/DTPA-konjugat

Et blandet anhydrid av DTPA ble fremstilt ved reaksjon mellom dietylentriaminpentaeddiksyre (DTPA) og isobutylklorformat. Anhydridet (1 mol) ble løst opp i dimetylformamid, og løsningen tilsatt en løsning av amin-endestilt dendrimer (fra enten del C eller D) i samme løsningsmiddel. Til løsningen ble tilsatt 2,6-lutidin hvilket var nødvendig for å holde et basisk miljø. Ved hjelp av dette ble kovalente bindinger dannet mellom amino-terminale grupper i dendrimeren og karboksylgruppen i DTPA.

F: Fremstilling av et 3,0 generasjon, amino-endestilt dendrimer/DTPA-konjugat

Alternativt ble 1 mmol amin-endestilt dendrimer (fra enten del C eller D) løst opp i 300 ml vann. I løpet av 2 timer ble 150 mmol av den faste form av N^3-(2,6-dioksomorfolinoetyl)-N^6-etoksykarbonylmetyl-3,6-diazaoktandiacid tilsatt porsjonsvis til løsningen. pH ble holdt ved ca. 9,0 ved tilsetning av 1N natriumhydroksyd. Løsningen ble rørt i ytterligere 30 min., pH justert til 7,0 med en ionebytterharpiks (H^+), og så filtrert for å fjerne ionebytterharpiksen. Løsningen ble overført til to Centricon®-mikrokonsentratorrør (molekylvekt-eksklusjonspunkt: 5.000 Dalton) og ultrafiltrert. Filtratet ble samlet og frysetørket. DTPA-konjugert dendrimer ble isolert som et farveløst, flakformet pulver.

G: Fremstillin av et 3,0 generasjon, amino-endestilt dendrimer/DTPA/Gd-konjugat

Ca. 10 g DTPA-konjugert dendrimer ble løst opp i 600 ml vann for injeksjon og blandet med ca. 3 g Gd_2O_3. Oppslemmingen ble rørt i ca. 90 min. ved 80°C. Etter avkjøling ble løsningens pH justert til 7 ved tilsetning av en ionebytterharpiks. Løsningen ble filtrert for å fjerne harpiksen og så ultrafiltrert som beskrevet ovenfor. Filtratet ble samlet og frysetørket. Gd/DTPA-konjugert dendrimer ble oppnådd som et farveløst, flakformet pulver som inneholdt Gd ved atom-absorpsjons-spektroskopianalyse.

Eksempel 38: Null valens nikkel i dendrimerer

Til 10 g av 1% $NiCl_2$ (vandig) ble tilsatt 177 mg generasjon 0,5 dietylentriamin (DETA) kjerne STARBURST®-dendrimer (Na-salt). Løsningen ble savkt blå. Til denne løsning ble tilsatt 0,5 ml 28% vandig ammoniumhydroksyd, hvilket forårsaket at løsningen ble mørkere blå. Tilsetning av 12 g 2,78% vandig natrium-hypfosfitt til løsningen og så oppvarming til koking ga utfelling av nikkelmetall med en blå supernatantløsning. Supernatanten ble konsentrert i vakuum til å gi den metall-bundne dendrimer som en blanding med overskudd fosfitt (0,6 g). Opprensing ble utført ved ultrafiltrering på en hulfiber-filtrasjonsenhet (The Dow Chemical Company). (En kontrollreaksjon ble utført på samme måte som ovenfor bortsett fra at ikke noe dendrimer ble tilsatt, og dette ga en farveløs løsning med fullstendig utfelling av nikkel-metall etter koking).

Eksempel 39: Null valens nikkel i dendrimerer

Til 10 g 1% vandig $NiCl_2$-løsning ble tilsatt 270 mg av generasjon 1,5 lineær polyetylenimin (PEI) kjerne STARBURST®-dendrimer (natriumkarboksylatform). Løsningen ble mørkere grønn enn kontrollblandingen (uten STARBURST® til stede). Etter tilsetning av 0,5 ml konsentrert ammoniumhydroksyd ble kontrollen blå og STARBURST®-løsningen var fremdeles grønn. Tilsetning av 12 g 2,78% vandig natriumhypofosfitt og oppvarming til koking forårsaket, i kontrollen, utfelling av sort nikkelmetall og ga en farveløs løsning. STARBURST®-løsningen ga en blek grønn suspensjon under de samme betingelser. Den bleke grønne suspensjonen ble sentrifugert

for å fjerne alt fast materiale (50 mg) og konsentrert i vakuum til å gi 500 mg svakt grønt pulver. Ultrafiltrering av en vandig løsning av denne blanding av metall-holdig dendrimer og fosfitt ved bruk av en Amicon® YM2-membran ble fortsatt til det ikke var mer grønn farve i filtratet. Konsentrasjon i vakuum av det grønne retentatet ga ca. 100 mg av et mørk grønnt, glassaktig materiale.

Eksempel 40: Fremstilling av epoksyoktan-modifisert generasjon 5,0 PAMAM-dendrimer

Generasjon 5,0 PAMAM-dendrimer, 0,30 g (2,7 mekv.) ble løst opp i 10 ml metanol. Epoksyoktan, 0,5 g, (Aldrich, 3,9 mmol) ble tilsatt løsningen. Løsningen ble så varmet opp til 40°C i et oljebad i 3 dager. Løsningsmidlet ble fjernet ved destillasjon i vakuum, og bunnfallet avdampet ved romtemperatur under høyt vakuum til å gi 0,60 g (93% teoretisk) av den modifiserte dendrimer som en farveløs olje. ^{13}C og ^{1}H NMR-spektra viste binding av epoksyoktan på overflaten og er forenlig med epoksyoktan-dendrimeren.

Når den ovenfor nevnte fremstilling ble gjentatt ved bruk av generasjon 2,0, 3,0, 4,0, 6,0 eller 7,0 PAMAM-dendrimer, ble det tilsvarende konjugat dannet.

Eksempel 41: Fremstilling av absciss-syre-modifisert generasjon 4,5 PAMAM-dendrimer.

En vandig løsning av en generasjon 4,5 PAMAM-dendrimer ble hydrolysert ved hjelp av NaOH/MeOH (1 mM, 10 ml) og pH justert til 11 ved hjelp av NaOH/HCl. Til løsningen ble tilsatt et stort overskudd av fast absciss-syre. Løsningen ble omrørt kraftig ved romtemperatur. Etter 1, 2, 6 og 24 timer, ble 500 μl av løsningen fjernet og tatt over i et Eppendorf-rør (1,5 ml mikrosentrifugerør) og alt ikke-oppløst absciss-syre ble fjernet ved sentrifugering ved 15.000 opm i 1 min. Absciss-syrekonsentrasjonen ble beregnet fra absorbansen av supernatenten (λ = 260 nm, ϵ = 19400).

Når fremgangsmåten ble gjentatt ved bruk av forskjellige generasjoner av PAMAM-dendrimerer, ble den høyere generasjon, med mer absciss-syre løst opp. Generasjon 5 og 6-dendrimerer løste opp mer av syren enn generasjon 4. Ved pH 7, ble kun 0,004M absciss-syre løst opp i vann og β-CD-løsning, mens dendrimerløsningene løste opp 0,02-0,08M. Halv-generasjoner av dendrimerer løste opp samme mengde syre som hel-generasjonene. Således antas at absciss-syre må bli tatt opp i dendrimerens indre.

Når den ovennevnte fremgangsmåte ble benyttet med nifedipin (ϵ = 8300 i kloroform), tok nifedipin lang tid for å løse seg opp, men når det var oppløst ble det tatt inn i dendrimeren.

PROTOKOLL FOR DENDRIMER-DEKSTRAN-TRANSFEKSJON

Protokollen for transfeksjon er i hovedsak som følger:

Dag 1:Så ut i 6-brønnskåler ca. 200.000 celler pr. brønn (avhengig av vekstegenskapene).

Dag 2:Trinn 1: Fremstill de følgende løsninger:

A. Dendrimer fortynningsbuffer

20 mM HEPES pH 7,9
100 mM KCl
0,2 mM EDTA
0,5 mM DTT
20% (vol/vol) glycerol

B. 10 X bindingsbuffer

10 mM EDTA
40% (vol/vol) glycerol
50 mM DTT
100 mM tris-HCl pH 7,5
1000 mM NaCl
Bland og filter-steriliser

C. Løsning 1 (benyttet i noen eksempler)

25 mg DEAE-dekstran (Pharmacia eller Sigma Chemical)
5,0 ml 1M tris pH 7,4
95 ml serum-fritt DMEM
Bland ved 37°C under omrysting i 30 min., steril-filtrer (1 ml løsning 1 er nødvendig for hver brønn)

D. Løsning 2 (benyttet i noen eksempler)

10% DMSO i PBS pH 7,4

Bland og steril-filtrer (2 ml løsning 2 er nødvendig for hver brønn)

Trinn 2: Fremstill DNA/dendrimer-kompleksene:
(20 µl kompleks er nødvendig for hver brønn)

Plasser et passende volum med 10X bindingsbuffer og H_2O i et sterilt Eppendorf®-rør

Tilsett fortynnet dendrimer etterfulgt av DNA.

Hvis mulig bør konsentrerte stamløsninger av dendrimerer bli suspendert i vann som er fritt for metanol. Fortynn dendrimerer i fortynningsbuffer til en konsentrasjon ca. 10X den endelige konsentrasjon før bindingsbuffer tilsettes. Selv om komplekset synes å bli dannet øyeblikkelig ved miksing, bør blandingen stå i 3-15 min. slik at kompleksdannelse skjer.

DNA/DENDRIMER-KOMPLEKSDANNELSE, EKS.: RSV-Luc DNA og G10 (EDA)-dendrimer

Det 7,2 kb RSV-luc plasmid DNA har 1,71 x 10^{15} (-) ladninger pr. μg. G10 (EDA)-dendrimer har 2,64 x 10^{15} (+) ladninger pr. μg. Derfor vil et ladningsforhold på 1:10 kreve et forhold som er 1 μg DNA til 6,5 μg dendrimer. Stamløsning G10 (EDA) har en konsentrasjon på 236,4 μg/μl. En fortynning på 1:364 i fortynningsbuffer gir 0,65 μg/μl. For å lage 20 μl av kompleksene (tilstrekkelig til å transfektere 1 μg DNA i én brønn celler i en 6-brønns plate), kombiner da 2 μl 10 x bindingsbuffer, 7 μl sterilt H_2O, 10 μl fortynnet dendrimer, og 1 μl DNA (ved 1 μg/μl). Hvis mer enn én brønn skal transfekteres eller større mengder DNA benyttes, fremstill da ganske enkelt et større volum komplekser av de samme forhold bindingsbuffer, dendrimer og DNA.

Trinn 3: Vask cellene 2x med 2 ml serum-fritt medium.
Trinn 4: Tilsett 1 ml løsning 1 til hver brønn.
Trinn 5: Tilsett 20 μl DNA/dendrimer-komplekser til hver brønn. Bland ved forsiktig omrysting av skålen.
Trinn 6: Inkuber i 3 timer ved 37°C.
Trinn 7: Vask 1x med 2 ml serum-fritt DMEM.
Trinn 8: Sjokk cellene med løsning 2, 2 ml pr. brønn, i 2 min.
Trinn 9: Vask cellene 2x med serum-fritt DMEM.
Trinn 10:Erstatt mediet med DMEM med 5% serum. Inkuber over natten ved 37°C.

Dag 3: Fremstill de følgende løsninger:

Løsning 4 cellekultur lysis 1x reagens
25 mM tris-fosfat pH 7,8
2 ml DTT
2 mM 1,2-diaminocykloheksan-N,N,N',N'-tetraeddiksyre
10% glycerol
1% Triton X-100

Løsning 5 luciferase assay reagens
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 ko-enzym A
40 µM Luciferin®
530 µM ATP; juster til endelig pH 7,8

Trinn 1: Rens cellene 2x med 2 ml av 1 x PBS pH 7,4
(Mg++, Ca++ fritt)

Trinn 2: Tilsett 200 µl løsning 4 til hver brønn og la det stå i 15 min. ved 27°C

Trinn 3: Skrap celler og overfør til Eppendorf®-rør.

Trinn 4: Bestem proteinkonsentrasjon av hvert cellelysat.

Trinn 5: Overfør ikke mer enn 20 µl av hvert celle-lysat til Eppendorf®-rør.

Trinn 6: Tilsett 80 µl løsning 5 og mål øyeblikkelig kjemiluminiscens.

Flere ulike typer genetisk materiale ble benyttet i eksemplene. Med mindre annet er vist, var DNA som ble benyttet et bakterielt ekspresjonsplasmid (RSV-luc) som inneholder genet for luciferase-enzymet som uttrykkes av en promoter fra Respiratory Syncitial Virus (RSV). Konsentrasjonen av genetisk materiale med hensyn til dendrimer ble bestemt enten på basis av ladningsforhold mellom DNA:dendrimer som var ønsket, eller på basis av molare forhold, som vist i ett bestemt eksempel. I transfeksjonseksemplene, ble tilstrekkelig DNA/dendrimer-kompleks benyttet slik at 1 µg DNA ble tilsatt pr. testbrønn (ca. 200.000 celler), med mindre annet er angitt.

I de fleste eksemplene ble tett stjerne PAMAM-dendrimerer benyttet. Generasjon og derfor diameteren til dendrimerene varierer, det gjør også kjernene, og i noen tilfeller også overflatefunksjonsgruppene.

Flere forskjellige cellelinjer ble transfektert på vellykket måte. Med mindre annet er angitt i eksemplet, er det RAT2-celler som er transfekterte.

Når DEAE-dekstran benyttes i eksemplene, er konsentrasjonen 0,5 µM, med mindre annet er angitt. Også med mindre annet angis, er mengden DNA i DNA/dendrimer-komplekset 1 µg pr. testbrønn.

ELEKTROFORESE

Agarosegelene benyttet i elektroforese plasseres i et elektrisk felt med katoden på toppen av gelen (slik som figurene viser) og anoden ved bunnen av gelen (som vist i figure-

ne). Gelene farves med etidiumbromid, som binder til DNA og fluorescerer, og indikerer på den måte hvordan DNA har vandret i gelen. I noen eksempler ble sporene startet fra toppen av gelplaten og i midten av denne, med vandring mot bunnen av figuren i hvert tilfelle. Kompleksbinding og nøytralisering av DNA-ladning er antatt å skje når vandring mot anoden forsinkes.

I den grad ting ikke er beskrevet ovenfor, vil de eksperimentelle teknikker som benyttes i eksemplene være kjente for dem med vanlig kompetanse i feltet og tilgjengelige i litteraturen, hvilket gjør en videre beskrivelse unødvendig.

Eksempel 42: Fremstilling av dendrimer-konjugater med genetisk materiale og eksperimenter (fig. 17-19).

I denne serie eksperimenter ble ulike dendrittiske polymer kompleksbundet med DNA og overført under forskjellige betingelser. DNA kompleksbundet til dendrimeren var to søyle cesium-gradientrenset RSV-luc plasmid. Transfeksjon av DNA-ekspresjonsplasmidet resulterer i vellykket transkripsjon og translasjon av luciferasegenet. Dette fremstiller luciferase-proteinet, et enzym som katalyserer nedbrytningen av LUCIFERIN®, hvilket resulterer i dannelsen av målbart lys. Kvantitering av mengde lys produsert er et mål for hvor vellykket transfeksjonen har skjedd med dette gen.

Dendrimerene som ble undersøkt var som følger:

A.G8 (NH_3) tett stjernedendrimer som har en molekylvekt (MV) på ca. 87.342 og en diameter på ca. 76Å.

B.G6 (NH_3) tett stjernedendrimer som har en molekylvekt (MV) på ca. 21.591 og en diameter på ca. 53Å.

C.G5 (NH_3) tett stjernedendrimer som har en molekylvekt (MV) på ca. 10.633 og en diameter på ca. 40Å.

D.G7 (NH_3) tett stjernedendrimer som har en molekylvekt (MV) på ca. 43.508 og en diameter på ca. 67Å.

E.G3 (NH_3) tett stjernedendrimer som har en molekylvekt (MV) på ca. 2.414 og en diameter på ca. 22Å.

F.G4 (NH_3) tett stjernedendrimer som har en molekylvekt (MV) på ca. 5.154 og en diameter på ca. 31Å.

G.G2 (NH_3) tett stjernedendrimer som har en molekylvekt (MV) på ca. 1.044 og en diameter på ca. 15,8Å.

H.G1 (NH_3) tett stjernedendrimer som har en molekylvekt (MV) på ca. 359 og en diameter på ca. 10,4Å.

I.G1 (EDA) tett stjernedendrimer som har en molekylvekt (MV) på ca. 517 og en diameter på ca. 14Å.

J.G2 (EDA(tett stjernedendrimer som har en molekylvekt (MV) på ca.1,430 og en diameter på ca. 19Å.

K.G3 (EDA) tett stjernedendrimer som har en molekyl-vekt (MV) på ca. 3.256 og en diameter på ca. 26Å.

L.G4 (EDA) tett stjernedendrimer som har en molekyl-vekt (MV) på ca. 6.909 og en diameter på ca. 36Å.

M.G5 (EDA) tett stjernedendrimer som har en molekyl-vekt (MV) på ca. 14.215 og en diameter på ca. 44Å.

N.G6 (EDA) tett stjernedendrimer som har en molekyl-vekt (MV) på ca. 28.826 og en diameter på ca. 57Å.

O.G7 (EDA) tett stjernedendrimer som har en molekyl-vekt (MV) på ca. 58.048 og en diameter på ca. 72Å.

P.Blandingen av tette stjernedendrimerer er i følgende prosenter:

1. G6 (NH_3) 58,8%
2. G5 (NH_3) 30,5%
3. G2 (EDA) 1,86%
4. G2 (NH_3) 1,10%
5. G1 (EDA) 3,37%
6. G1 (NH_3) 4,41%

Q. Blandingen av tette stjernedendrimerer er i følgende prosenter:

1. G6 (NH_3) 60,0%
2. G5 (NH_3) 31,1%
3. G2 (EDA) 1,90%
4. G2 (NH_3) 1,12%
5. G1 (EDA) 1,30%
6. G1 (NH_3) 4,50%

R. G6 (NH_3) delvis degradert tett stjernedendrimer.

S. G7 (NH_3) delvis degradert tett stjernedendrimer.

Vesentlige opplysninger om disse dendrimerer er vist i tabell XII nedenfor:

Tabell XII

Dendrimer	MV	Overflate NH_2-grupper	Minimum dendrimer-mengde[a] 0,5 µg[c] DNA	1 µg[c] DNA
A	87.342	384	0,1 µg	I.B.
B	21.591	96	0,1 µg	I.B.
C	10.633	48	0,1 µg	I.B.
D	43.508	192	0,1 µg	I.B.
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	I.B.
K	3.256	16	0,1 µg	I.B.
L	6.909	32	0,1 µg	I.B.
M	14.215	64	0,1 µg	I.B.
N	28.826	128	0,1 µg	I.B.
O	58.048	256	0,1 µg	I.B.
P	25.951	96	*	0,1 µg
Q	25.951	96	*	0,1 µg
R	b	b	0,001 mg	I.B.
S	b	b	0,001 µg	I.B.

* = ingen binding
a = minimum mengde dendrimer som kreves for å kompleksbinde DNA (oppheve fullstendig gelvandringen til DNA mot anoden)
b = blandinger, forskjellig størrelse; se tidligere sider i eksemplet for definisjon
c = minimum mengde dendrimer som kreves for å kompleksbinde fullstendig DNA
ND = Ikke bestemt

mindre enn G4 (G, H, I), kan binde og kompleks/ladnings-nøytralisere DNA.

For å bestemme hvorvidt dendrimerer kompleksbundet til DNA ville være anvendbare for transfeksjon, ble eksperimentet utført under en lang rekke betingelser.

Fig. 17 viser resultatene av transfeksjon av prøver i RAT2-celler, med lysenheter som måles pr. mikrogram celleprotein for hver av de ulike betingelser, angitt ved nummerne 1-18, som vist i Tabell XIII nedenunder:

Tabell XIII

Prøve nr.	Dendrimer eller kontroll	Ladningsforhold DNA:dendrimer	Betingelser
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 ikke transfektert	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*	Deks. alene	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-deks	NA	c

* = kontroller
NA = ikke relevant
a = DNA og dendrimer kompleksbundet i bindingsbuffer, og transfektert i DMEM.
b = DNA og dendrimer kompleksbundet i HBS, og transfektert i DMEM.
c = DNA og dendrimer kompleksbundet til bindingsbuffer, og transfektert i DEAE-dekstran.

Prøvene 6, 12 og 18 er kontroller. Prøve 6 er ikke-tranfekterte RAT2-celler. Prøve 12 er lik prøve 6 men har DEAE-dekstran tilsatt. I prøve 18, er transfeksjon forsøkt ved bruk av vektoren og sildesperme-DNA i nærvær av DEAE-dekstran. Resultatene i tabell XIII viser at dendrimerer med generasjon lavere enn G8 ikke formidler transfeksjon med mindre DNA/dendrimer-kompleksene er i DEAE-dekstran.

For å bekrefte disse resultatene ved bruk av et større område DNA/dendrimer-ladningsforhold, ble studiene som er illustrerte i fig. 18 utført. Testparameterne er vist i tabell XIV nedenfor:

Tabell XIV

Prøve nr.	Dendrimer eller kontroll	Ladningsforhold DNA:dendrimer	Betingelser
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 Deks.*	NA	NA
22	RSV + hsDNA deks.*	NA	NA
23	Deks. alene *	NA	NA
24	HBS alene*	NA	NA

* = kontroller
NA = ikke relevant
b = DNA og dendrimer kompleksbundet i HBS, og transfektert i DMEM.
c = DNA og dendrimer kompleksbundet i bindingsbuffer, og transfektert i DEAE-dekstran.

Tabell XV

Spor nr.	Generasjon & kjerne	DNA/dendrimer-ladningsforhold
1	Plasmid alene	Kontroll
2	G5 (NH_3)	1:1
3	G5 (NH_3)	1:5
4	G5 (NH_3)	1:10
5	G5 (EDA)	1:1
6	G5 (EDA)	1:5
7	G5 (EDA)	1:10
8	G6 (NH_3)	1:1
9	G6 (NH_3)	1:5
10	G6 (NH_3)	1:10
11	G6 (EDA)	1:1
12	G6 (EDA)	1:5
13	G6 (EDA)	1:10
14	G7 (NH_3)	1:1
15	G7 (NH_3)	1:5
16	G7 (NH_3)	1:10
17	G7 (EDA)	1:1
18	G7 (EDA)	1:5
19	G7 (EDA)	1:10
20	G4 (NH_3)	1:1
21	G4 (NH_3)	1:5
22	G4 (NH_3)	1:10
23	G4 (EDA)	1:1
24	G4 (EDA)	1:5
25	G4 (EDA)	1:10
26	G6 (NH_3)[a]	1:1
27	G6 (NH_3)[a]	1:5
28	G6 (NH_3)[a]	1:10
29	G6 (NH_3)[b]	N.A.
30	G6 (NH_3)[b]	N.A.
31	G6 (NH_3)[b]	N.A.
32	Plasmid alene	Kontroll

a = 25% substituerte
b = 100% substituerte
N.A. = Ikke relevant; 100% substituerte dendrimerer ble blandet i samme mengder som de 25% substituerte dendrimerer.

Kontroller 21-24 omfatter henholdsvis vektoren i DEAE-dekstran, vektoren og sildesperme-DNA i DEAE-dekstran, DEAE-dekstran og HBS.

Resultatene viser at DNA/dendrimer-kompleksene er overraskende mer effektive i å transfektere celler i nærvær av DEAE-dekstran. De viser også at for rene dendrimerer som har amino (positiv ladning)-overflatefunksjonsgruppe, er kun komplekser med overskudd dendrimer-positive ladninger i stand til effektiv transfeksjon. (se spor 4, fig. 18).

Transfeksjonsevnen til et spektrum av ulike dendrimerer er vist (A-S) i fig. 19. Et søylediagram med hensyn til relative lysenheter pr. mikrogram protein, fra celler transfektert med DNA kompleksbundet med ulike dendrimerer (A-S) i nærvær av DEAE-dekstran er vist. Tre forskjellige ladningsforhold mellom DNA og dendrimer ble benyttet: 1:2, 1:10 og 1:20 i duplikat. Således er det seks søyler for hver dendrimer A-S i fig. 19, de to første viser transfeksjon med et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:2, det andre par ved 1:10 og tredje par ved 1:20. Kontrollen (RSV_a) omfatter transfeksjon av plasmid DNA alene i nærvær av DEAE-dekstran. Det kan sees at for forskjellige forhold DNA:dendrimer, varierer vellykket transfeksjon, transkripsjon og translasjon, etter den bestemte type dendrimer som benyttes.

Eksempel 43: Elekromikroskopi av DNA/dendrimer-komplekser i nærvær og fravær av DEAE-dekstran, (fig. 60, paneler 3, 4 og 5).

Tilsetning av DEAE-dekstran eller andre forbindelser til DNA/dendrimer-komplekset etter at det er blitt dannet er vist å være effektivt for å øke transfeksjonen på en spesifikk måte. For å forstå videre betydningen av disse forbindelsene når det gjelder å forandre ikke-spesifikk transfeksjon, ble elektronmikrofotografier utført av DNA/dendrimer-komplekser med og uten tilsetning av DEAE-dekstran. I dette eksempel ble DNA kompleksbundet med dendrimerer som vist i fig. 60 nedenfor.

Panel 3 - DNA:dendrimer G11 (EDA) dendrimer i et ladningsforhold på 1:10

Panel 4 - DNA:dendrimer G11 (EDA) dendrimer i 0,5 μM DEAE-dekstran

Panel 5 - DNA kompleksbundet med en polydispers blanding av dendrimerer (forbindelse B) i et ladningsforhold på 1:10

I fig. 60 representerer paneler 3, 4 og 5 elektronmikrofotografier av DNA/dendrimer-komplekser. DNA ble kompleksbundet med G11 (EDA)-dendrimer ved et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:10 i 1 mM tris, pH 7,8. Under denne betingelse viste elektronmikroskopi at DNA/dendrimer-kompleksene lager store irregulære aggregater

som ikke ble observert med en dendrimer alene (fig. 60, panel 3). Tilsetning av DEAE-dekstran til en endelig konsentrasjon på 0,5 μM reduserte størrelsen på DNA/dendrimer-kompleksene dramatisk (fig. 60, panel 4). Mindre størrelsekomplekser (og fullstendig fravær av store aggregater) ble også sett når DNA ble kompleksbundet med polydisperse blandinger av dendrimerer (f.eks. beskrevet som forbindelse B) med et ladningsforhold på 1:10. Resultatet viser begrunnelsen hvorfor disse forbindelsene kan øke transfeksjonen. Uten å ønske å være bundet av teorien, er det sannsynlig at de mindre komplekser som oppnås med disse forbindelsene har større sannsynlighet for å komme inn i cellene og oppnå transfeksjon.

Eksempel 44: Sammenligning av DNA-binding og transfeksjons-evnen til dendrimerer med og uten overflate-erstatninger ved ulike DNA/dendrimer-ladnings-forhold (fig. 12 og 13).

For å bestemme virkningen av redusert overflateladning på dendrimeren eller transfeksjonseffektiviteten ble det følgende eksperiment utført. DNA/dendrimer-kompleksene ble fremstilt med ladningsforholdene som vist, for de ulike dendrimerer oppført i tabell XV nedenfor. Som tidligere indikerer "G" nummeret generasjon av dendrimeren; og "NH_3" eller "EDA"- betegnelsen viser dendrimerkjernen. De substituerte dendrimerer er vist som eksempler 26-31 i fig. 12 og spor 26-31 i fig. 13. Substituerte dendrimerer har positiv overflateladning-aminer som er modifisert gjennom reaksjon med akrylsyre. I disse substituerte dendrimerer er derfor antallet overflate aminogrupper nedsatt. Således har en 25% substituert G6 (NH_3)-dendrimer teoretisk hatt 25% av dets overflate-aminogrupper reagert med karboksylgruppene i akrylsyre. I en 100% substituert G6-dendrimer har hver overflate-aminogruppe reagert med en karboksylgruppe. Den funksjonelle positive ladning på disse dendrimerer som er tilgjengelige for reaksjon med negativt ladet DNA er derfor redusert. Prøver 1 og 32 i tabell XV nedenfor er "plasmidkontroller" eller med andre ord DNA benyttet alene.

Tabell XV

Spor nr.	Generasjon & kjerne	DNA/dendrimer-ladningsforhold
1	Plasmid alene	Kontroll
2	G5 (NH_3)	1:1
3	G5 (NH_3)	1:5
4	G5 (NH_3)	1:10
5	G5 (EDA)	1:1
6	G5 (EDA)	1:5
7	G5 (EDA)	1:10
8	G6 (NH_3)	1:1
9	G6 (NH_3)	1:5
10	G6 (NH_3)	1:10
11	G6 (EDA)	1:1
12	G6 (EDA)	1:5
13	G6 (EDA)	1:10
14	G7 (NH_3)	1:1
15	G7 (NH_3)	1:5
16	G7 (NH_3)	1:10
17	G7 (EDA)	1:1
18	G7 (EDA)	1:5
19	G7 (EDA)	1:10
20	G4 (NH_3)	1:1
21	G4 (NH_3)	1:5
22	G4 (NH_3)	1:10
23	G4 (EDA)	1:1
24	G4 (EDA)	1:5
25	G4 (EDA)	1:10
26	G6 (NH_3)[a]	1:1
27	G6 (NH_3)[a]	1:5
28	G6 (NH_3)[a]	1:10
29	G6 (NH_3)[b]	N.A.
30	G6 (NH_3)[b]	N.A.
31	G6 (NH_3)[b]	N.A.
32	Plasmid alene	Kontroll

a = 25% substituerte
b = 100% substituerte
N.A. = Ikke relevant; 100% substituerte dendrimerer ble blandet i samme mengder som de 25% substituerte dendrimerer.

Prøver av DNA/dendrimer-kompleksene i løsning ble tilsatt celler for transfeksjon ifølge protokollen for dendrimer-transfeksjon beskrevet ovenfor, i nærvær av DEAE-dekstran med en konsentrasjon på 0,5 μM. Som det kan sees av fig. 12, kan det også bemerkes at G6-dendrimerene er mer effektive (sammenlign søylene 8-19 med søylene 2-7 og søylene 20-25). Hvor overflaten av dendrimeren har 25% substitusjon med negative funksjonsgrupper, er det nødvendig at ladningsforholdet av DNA til dendrimer senkes.

Dendrittiske komplekser og kontrollprøver 1-32, som oppført i tabell XV, ble overført til agarosegeler for elektroforese (se fig. 13). Sporene 1 og 32 viser hvordan DNA vandret alene gjennom gelen (fig. 13). Sporene 2-28 viser ingen vandring, hvilket antyder at DNA er kompleksbundet med dendrimeren og derfor blir vandringen gjennom gelen forsinket. Vandring var imidertid observert for sporene 29-31, hvor de dedritiske polymerene har redusert positiv ladning i funksjonsgruppene. En viss rest-positiv ladningsaktivitet er til stede selv om dendrimerene er 100% substituerte fordi vandringsforsinkelsen observeres ved lavere DNA/dendrimer-forhold (sporene 30-31). Resultatene fra fig. 12 og 13 viser at positiv overflateladningstetthet i dendrimeren var viktig i DNA-binding, kompleksdannelse og transfeksjon.

Eksemepl 45: Økning i DNA-transfeksjonseffektivitet som funksjon av dendrimergenerasjon sammenlignet med DEAE-dekstran-kontroll (fig.14).

I dette eksempel ble kompleksene av DNA og dendrimer fremstilt ved bruk av G2 til G8 (NH_3)-dendrimerer og G3 til G11 (EDA)-dendrimerer. Deres evne til å transfektere DNA i RAT2-celler i nærvær av DEAE-dekstran ble sammenlignet med graden av transfeksjon som ble oppnådd ved bruk av bare DNA og DEAE-dekstran. Prosent økning i transfeksjon for hver av dendrimerene sammenlignet med DNA/DEAE-dekstran-kontrollen er vist i fig. 14. Denne figur viser at transfeksjonseffektiviteten økte eksponensielt med økende dendrimer-generasjon, fra generasjon 5 til og med 10. Dette antyder at øket overflateområde og ladning på dendrimerene øket transfeksjons-effektiviteten.

Eksempel 46: Bestemmelse av effekten til etterfølgende tilsatt G9 og G5-dendrimer på transfeksjonseffektiviteten i RAT2-celler i fravær av DEAE-dekstran (fig. 15 og 16).

I dette eksempel ble:

1.DNA først kompleksbundet til en G9-dendrimer, og så ble det tilsatt en løsning som inneholdt G5-dendrimer; eller

2.DNA ble først kompleksbundet med en dendrimer G5, og så ble løsningen som inneholdt en G9-dendrimer tilsatt.

Resultatene som ble oppnådd når EDA-kjernedendrimerene ble benyttet er vist i fig. 15, mens resultatene for ammoniakk-kjernedendrimerer er vist i fig. 16. I begge figurer 15 og 16, er konsentrasjonen av den andre dendrimer som ble tilsatt komplekset vist på

abscissen i søylediagrammet. I den første søylen er "null"-konsentrasjonen en kontroll hvor annen dendrimer ikke ble tilsatt.

I begge tilfellene ble de første dendrimerer av G9 og G5-generasjonene tilsatt i henholdsvis 0,5 μM og 20 μM konsentrasjon. I hvert tilfelle har G5-dendrimeren en omtrentlig diameter på ca. 40Å, men G9-dendrimeren har en diameter på ca. 88Å. I begge tilfeller er runde, tette stjernedendrimerer benyttet. Når G9-dendrimeren ble tilsatt G5 DNA/dendrimer-komplekset, blir vesentlig bedre transfeksjonsresultater oppnådd, sammenlignet med å tilsette en G5-dendrimer til en tidligere kompleksbundet G9-dendrimer. Dette antyder at DNA/-dendrimer-kompleksdannelse kan omfatte to trinn; henholdsvis, kompleksdannelse og sammentrenging av DNA, etterfulgt av "tildekking" av komplekset med positiv ladning for binding til celler. Det sistnevnte av disse to trinn synes å virke bedre for en dendrimer med større diameter og med større overflate-ladningstetthet.

Eksempel 47: Sammenligning av kompleksegenskapene og transfeksjonsegenskapen til flere (NH_3)-dendrimerer med DNA-fragmenter (fig. 20 og 21).

I dette eksempel ble relativt små fragmenter av DNA kompleksbundet med ulike dendrimerer. I resultatene vist i fig. 20, ble en 15 nukleotid syntetisk enkeltkjedet DNA kompleksbundet med G2 til G7 (NH_3)-dendrimerer med DNA/dendrimer-ladningsforhold som vist i tabell XVI nedenfor.

Tabell XVI

Spor	DNA:dendrimer-ladningsforhold	Dendrimer
1	6:1	G6 (NH_3)
2	1:1	G6 (NH_3)
3	1:1,5	G6 (NH_3)
4	6:1	G7 (NH_3)
5	1:1	G7 (NH_3)
6	1:1,5	G7 (NH_3)
7	6:1	G3 (NH_3)
8	1:1	G3 (NH_3)
9	1:1,5	G3 (NH_3)
10	6:1	G4 (NH_3)
11	1:1	G4 (NH_3)
12	1:1,5	G4 (NH_3)
13	5:1	G2 (NH_3)
14	1:1	G2 (NH_3)
15	1:2	G2 (NH_3)
16	--	*

* DNA-størrelsesmarkør

Fig. 20 viser en agarosegel-elektroforese av ulike komplekser. Som man kan observere i søylene 1, 4, 7 og 10, var det vesentlig vandring av oligonukleotidet. Dette viste at stabile komplekser dannet seg ikke ved et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 6:1. Imidlertid viste mangel på oligonukleotid-vandring i søylene 2,3,5,6,8,9,11 og 12 at det syntetiske oligonukleotid DNA danner stabile komplekser med G3-G7 (NH_3)-dendrimerer med ladningsforhold på 1:1 og 1:1,5. Søylene 13-15 viser at oligonukleotidet dannet ikke stabile komplekser ved noen ladningsforhold med G2 (NH_3)-dendrimerer.

Den vellykkede overføring av et radioaktiv 23 basepar (bp) dobbeltkjedet oligonukleotid kompleksbundet med G8 (NH_3)-dendrimer (med et ladningsforhold på 1:10) er gitt i fig. 21. Siden oligomeren ikke var et funksjonelt rapportgen, ble vellykket overføring holdt ved opptak av radioaktivt merket DNA. De radioaktive tellinger med

celler etter overføring er vist på ordinaten i fig. 21, mot tiden etter overføringsstart som er vist på abscissen.

Funnet at DNA/dendrimer-opptaket i cellen var energiavhengig ble vist av dataene som viste at tilsetning av natriumazid til komplekset senket graden av overføring sterkt, omtrent til et nivå som ble oppnådd for oligonukleotidet alene. Dette viste at dendrimerer kan underlette opptaket i celler ved hjelp av lav-molekylvekt nukleinsyrer.

Eksempel 48: Transfeksjon av sirkulære (supertrinnede) og linearisert RSV-luc i RAT2-celler ved bruk av G8 (NH_3)-dendrimerer og G11 (EDA)-dendrimerer, med og uten DEAE-dekstran (fig. 22).

I dette eksempel ble RSV-luc-genet kompleksbundet med G8 (NH_3) og G11 (EDA)-dendrimerer, enten i sin sirkulære (super-trinnede) form eller i lineær form. Linearisering ble oppnådd ved bruk av enkel sete-spesifikk restriksjonsendonuklease. I fig. 22 på den horisontale akse representerer diagrammene nummerert 1, 3, 5 og 7 den lineære plasmidform, mens søylene nummerert 2, 4, 6 og 8 viser plasmid i sirkulær DNA-form. Fig. 22 illustrerer det faktum at transfeksjon av både den lineære og sirkulære form av DNA var vellykket ved bruk av enten en G8 (NH_3) eller en G11 (EDA)-dendrimer, og at transfeksjonen er øket i alle tilfeller når DEAE-dekstran benyttes.

Eksempel 49: Unike DNA bindingsegenskaper hos dendrimerer (fig. 23).

I dette eksempel ble det foretrukne DNA/dendrimer-ladningsforhold og bindingsbetingelse for effektiv dannelse av stabile DNA/dendrimer-komplekser bestemt. DNA/dendrimer-kompleksene ble dannet i ladningsforhold på ca. 40:1 til 1:50 (fig. 23 og tabell XVII nedenfor).

Tabell XVII

Spor	DNA:dendrimer-ladningsforhold
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-størrelsesmarkør
b = Kontroll-DNA uten dendrimer

Elektroforese ble utført på disse komplekser i geler vist i fig. 23 (a-d). Spor 1 i hver av elektroforesegelene er DNA-størrelsesmarkøren og spor 2 er DNA-kontrollen, d.v.s. uten dendrimer. Geler A og B i fig. 23, var en G8 (NH_3)-dendrimer benyttet for å kompleksbinde DNA. I gelene C og D i fig. 23, ble en G8 (EDA)-dendrimer benyttet. I de øvrige panelene (23a og c), ble kompleksene laget i nærvær av ditiotreitol (DTT), som eliminerer (ved reduksjon av disulfidbindinger) alle proteinurenhetene, og eksponert til EDTA, ville kompleksbinde alle kationer som er til stede og som kunne utfelle DNA. Disse to trinnene fjerner forurensninger som på uriktig måte kan antyde DNA/dendrimer-komplekset. Resultatene viser videre at kompleksdannelsen ikke krever reduserende betingelser eller tilstedeværelse av metall-ioner.

Resultatene for panelene A og C kan sammenlignes med reultatene som oppnås i panelene B og D. DNA kompleksbundet med dendrimerer med ladningsforhold på 20:1 eller større dannet ikke stabile komplekser (se sporene 2-5 i fremstillingene A-D i fig. 23). Retardasjon av DNA/dendrimer-kompleksene, som begynner med et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 2:1 og fortsetter gjennom et ladningsforhold på 1:50 (se sporene 6-12 i

hver av panelene a-d i fig. 23). Dette viser at DNA fortsetter å være kompleksbundet til dendrimeren selv ved lavt DNA/dendrimer-ladningsforhold.

Eksempel 50: DNA bindingsegenskaper til dendrimerer var primært en funksjon av ladningsforhold (fig.24).

I dette eksempel ble 0,2 μg plasmid-DNA (2,9 kb) kompleksbundet med G8 (NH_3) og G11 (EDA)-dendrimerer i de molare forhold som er vist i tabell XVIII nedenfor, der spor 1 er en ikke-kompleksbundet DNA-størrelsesmarkør:

Tabell XVIII

Spor	DNA:dendrimer Molare forhold
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	1:28[c]

a = DNA-størrelsesmarkør
b = DNA:G8 NH_3
c = DNA:G11 EDA

Elektroforese ble utført på disse komplekser i agarosegel med resultater som vist i fig. 24. Det kan sees at ved molare forhold på 1:0,32, 1:3,2 og 1:16 (se sporene 2-4 i fig. 24), ikke ga DNA-kompleksdannelse med G8 (NH_3)-dendrimer. I motsetning var det kun ved molare forhold på 1:0,32 og 1:3,2 (sporene 8 og 9) at DNA ikke kompleksbandt G11 (EDA)-dendrimer. Dette viser at den større G11 (EDA)-dendrimer, som har vesentlig større overflate-ladningstetthet enn G8 (NH_3)-dendrimeren er i stand til å kompleksbinde ved lavere DNA/dendrimer-molforhold, hvilket viser at det viktigste parameter på DNA-kompleksbinding til dendrimeren synes å være ladningsforholdet.

De stabile kompleksene, som er vist i sporene 5-7 og 11-13 i fig. 24, har alle ladningsforhold mindre 5:1 DNA:dendrimer.

Eksempel 51: DNA/dendrimer-kompleksstabilitet innenfor et vidt pH-område (fig. 25)

I dette eksempel ble DNA kompleksbundet med G8 (NH_3) og G8 (EDA)-dendrimerer i DNA/dendrimer-ladningsforhold på 10:1 og 1:5 i en buffer som inneholdt 100 μM natriumklorid of 10 μM Tris ved forskjellige pH-verdier som vist i tabell XIX nedenfor.

Tabell XIX

Spor	pH	DNA:dendrimer* ladningsforhold (kjerne)
1	7,4	10:1 (NH_3)
2	7,4	1:5 (NH_3)
3	7,4	10:1 (EDA)
4	7,4	1:5 (EDA)
5	7,4	DNA alene
6	5,2	10:1 (NH_3)
7	7,0	10:1 (NH_3)
8	9,8	10:1 (NH_3)
9	5,2	1:5 (NH_3)
10	7,0	1:5 (NH_3)
11	9,8	1:5 (NH_3)
12	5,2	10:1 (EDA)
13	7,0	10:1 (EDA)
14	9,8	10:1 (EDA)
15	5,2	1:5 (EDA)

16	7,0	1:5 (EDA)
17	9,8	1:5 (EDA)
18	5,2	DNA alene
19	7,0	DNA alene
20	9,8	DNA alene

* G8

Elektroforese ble utført på de resulterende kompleksene i agarosegel og resultatene er vist i fig. 25.

Sporene 1-5 viser kompleksdannelse utført under standardbetingelser (pH 7,4). Som forventet kompleksbandt ikke DNA med dendrimeren ved et ladningsforhold på 10:1 (sporene 1, 3, 6-8 og 12-14) og som med kontroll-DNA, som ble undersøkt ved hjelp av elektroforese uten dendrimer (sporene 5 og 18-20) vandret det i gelen. Den delvise kompleksbinding av DNA ved 10:1 ladningsforhold dokumentert ved spredningen observert i sporene 1, 3, 6-8 og 12-14) ble heller ikke påvirket av pH-forandring. På den annen side viste DNA-komplekset som ble laget ved et 1:5 ladningsforhold stabilitet ved pH som varierte fra 5,2 til 9,8, og vandret ikke i gelen (sporene 9-11 og 15-17). Sporene 9 og 15 viste dannelse av komplekset ved pH 5,2, mens spor 17 viste dissosiasjon av komplekset ved pH 9,8. Således var kompleksene som ble dannet med G8 (NH_3)-dendrimerene stabile ved pH 9,8 mens de som ble laget med G8 (EDA)-dendrimerer ikke var det. Dette antyder at ladningsegenskapene er forskjellige for de to dendrimerer, og kan påvirke deres DNA-binding under visse betingelser.

Eksempel 52: DNA-dendrimerbinding i økende natriumklorid-konsentrasjoner (fig. 26a og b).

I eksempel 52, ble DNA kompleksbundet i ladningsforhold på 5:1 og 1:5, med både G8 (NH_3) og G8 (EDA)-dendrimerer ved økende natriumkloridkonsentrasjoner som vist i tabell XX nedenfor:

Tabell XX

Spor	NaCl-kons.
1	*
2[a] & 10[b]	0
3[a] & 11[b]	50 μM
4[a] & 11[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 størrelsesmarkør
a = ladningsforhold 5:1
b = ladningsforhold 1:5

Elektroforese ble utført på disse kompleksene med resultatene som vist i fig. 26a og 26b; 26a omfatter G8 (NH_3) dendrimer/DNA-kompleksene og fig. 26b omfattet G8 (EDA)- dendrimer/DNA-kompleksene. Fullstendige dendrimer/DNA-komplekser ble ikke dannet ved et ladningsforhold på 5:1 under noen av de benyttede betingelser, og som resultat vandret DNA i gelen (sporene 2-9 i fig. 26a og 26b). På den annen side ble fullstendige DNA/dendrimer-komplekser dannet og var stabile ved ladningsforhold på 1:5, i natriumkloridkonsentrasjon som varierte fra null (sporene 2 og 10) til 1,5 molar (sporene 9 og 17). Således skjer DNA/dendrimer-kompleksdannelsen uavhengig av ionestyrken i bufferen.

Eksempel 53: Stabilitet av DNA kompleksbundet til dendrimer i nærvær av restriksjons-endonuklease (fig. 27).

I disse eksempler, ble 0,2 μg plasmid pRSV-lac DNA kompleksbundet med G8 (NH_3) eller G11 (EDA)-dendrimerer i et ladningsforhold på 1:10 og inkubert med HindIII eller EcoR1 restriksjons-endonuklease-enzymer i 1 time ved 37°C. Prøvene ble så behandlet med SDS for å separere DNA fra dendrimeren, og elektroforese utført i en agarosegel (fig. 27), sporene som vist i tabell XXI nedenfor):

Tabell XXI

Spor	Plasmid-kompleks
1	DNA-størrelsesmarkør
2	Ikke-spaltet plasmid-DNA
3	Plasmid-DNA spaltet med HindIII
4	Plasmid-DNA kompleksbundet til G8 NH_3 spaltet med HindIII
5	Plasmid-DNA kompleksbundet til G11 EDA spaltet med HindIII
6	Plasmid-DNA spaltet med EcoR1
7	Plasmid-DNA kompleksbundet til G8 NH_3 spaltet med EcoR1
8	Plasmid-DNA kompleksbundet til G11 EDA spaltet med EcoR1

Ikke-kompleksbundet plasmid-DNA spaltet med enten HindIII eller EcoR1 vandret som fragmenter forenlig med antallet restriksjonsseter i plasmidet (sammenlign sporene 3 og 6 med fordøyet DNA i spor 2, fig. 27). I motsetning forble kompleksbundet DNA hovedsakelig uspaltet (sporene 4, 5, 7 og 8) hvilket antydet at dendrimer-kompleksdannelsen beskytter DNA fra endonukleasespalting.

Eksempel 54: Stabilitet av DNA/dendrimer-kompleksene i nærvær av cellulær nuklease (fig. 28).

Eks. 54 er lik eks. 53, bortsett fra at cellulære nukleaser som stammet fra cytoplasma til U937-celler ble benyttet for å spalte ikke-spesifikt DNA. Plasmid DNA (2,9 kb), ble kompleksbundet til G8 (EDA)-dendrimer i ladningsforhold som enten fullstendig (1:5) eller ufullstendig (5:1) kompleksbandt DNA. DNA/dendrimer-kompleksene ble så inkubert med celle-
ekstrakt i 4 timer ved 37°C. SDS ble så tilsatt for å adskille DNA fra dendrimeren og prøvene ble undersøkt ved elektroforese i agarosegel (fig. 28) med spor som vist i tabell XXII nedenfor:

Tabell XXII

Spor	Prøver
1	DNA størrelsesmarkør
2	Plasmidkontroll; uten celle-ekstrakt, uten dendrimer
3	Plasmid, spaltet kontroll; 5 μg celle-ekstrakt, uten dendrimer og SDS
4	Plasmid DNA:G8 (EDA) (1:5); uten celle-ekstrakt
5	Plasmid DNA:G8 (EDA) (1:5) 5 μg celle-ekstrakt
6	Plasmid DNA:G8 (EDA) (5:1) uten celle-ekstrakt
7	Plasmid DNA:G8 (EDA) (5:1) 5 μg celle-ekstrakt

Vandring av det intakte plasmid er vist i spor 2, mens vandringen av plasmidet som var blitt spaltet ved cellulære nukleaser er vist i spor 3. En sammenligning mellom spor 3 til spor 2 viser at cellulære nukleaser spalter DNA til små fragmenter av ulik størrelse (som vist ved utspredningen sett i spor 3).

I spor 4, ble et 1:5 ladningsforhold DNA/dendrimer-kompleks som på forhånd ikke var blandet med cellulært ekstrakt eller tilsatt SDS, undersøkt ved hjelp av elektroforese. Ingen vandring er vist, som ville være forventet for et stabilt DNA/dendrimer-kompleks.

I spor 5, ble det samme 1:5-komplekset blandet med cellulært ekstrakt (5 μg), så spaltet med SDS og så undersøkt ved hjelp av elektroforese. Plasmidet forblir hovedsakelig intakt, hvilket kan sees ved å sammenligne spor 5 med sporene 3 og 4. Dette viser at lite eller ingen spalting av DNA har skjedd mens det var kompleksbundet til dendrimer.

I spor 6, ble et 5:1 DNA/dendrimer-kompleks som ikke ble utsatt for celluært ekstrakt undersøkt ved hjelp av elektroforese. Som forventet er komplekset ikke stabilt og DNA vandrer i gelen. I spor 7, ble det samme komplekset blandet med 5 μg cellulært ekstrakt, så behandlet med SDS for å frigjøre DNA fra dendrimeren og undersøkt ved elektroforese. Siden komplekset ikke er stabilt, ble DNA omtrent fullstendig spaltet, og den forskjellige vandring av ulike fragmenter kan sees i spor i fig. 28. Dette viser at fullstendig kompleks-binding av DNA til dendrimer beskytter DNA fra nuklease-spalting.

Eksempel 55: Transfeksjon av DNA kompleksbundet med G8 (NH_3)-dendrimerer, med eller uten DEAE-dekstran, sammenlignet med transfekskjon ved bruk av LIPOFECTIN® (fig. 29).

I dette eksempel ble DNA kompleksbundet med G8 (NH_3)-dendrimerer ved ulike DNA/dendrimer-ladningsforhold (1:100 til 1:1). Det ble så overført i forskjellig mengde DNA (1, 5 og 10 μg) i nærvær eller fravær av DEAE-dekstran. De foran nevnte mengder DNA ble så transfektert med 20 μg LIPOFECTIN®.

Resultatene av disse transfeksjoner som vist ved utvikling av luminiscens (i lysenheter pr. μg protein), er vist i fig. 29. Meget liten transfeksjon ble oppnådd for kontrollene, d.v.s. DNA i nærvær av DEAE-dekstran eller DNA alene. Vesentlig transfeksjon skjedde med DNA/dendrimer-komplekser laget med 10, 5 og 1 μg DNA pr. brønn i ladningsforhold som varierte fra 1:100 til 1:1 (DNA:dendrimer) i nærvær av DEAE-dekstran. Vesentlig transfeksjon ble også oppnådd med DNA/dendrimer-komplekser selv i fravær av DEAE-dekstran når større mengder DNA ble kompleksbundet ved lavere ladningsforhold. I fravær av DEAE-dekstran, skjedde transfeksjon av DNA/dendrimer-komplekser kun med høyere generasjons-dendrimerer (>G7).

I de tilfeller hvor transfeksjon er betydelig, kan resultatene sammenlignes på gunstig måte med dem som oppnås ved bruk av en lipid-basert transfeksjonsforbindelse, LIPOFECTIN®.

Eksempel 56: Transfeksjon av DNA kompleksbundet med ulike dendrimerer, i nærvær eller fravær av DEAE-dekstran (fig. 30 og 31).

I dette eksempel er transfeksjonsresultatene for DNA kompleksbundet med G9 (EDA), G9 (NH_3) (fig. 30), G8 (NH_3) og G11 (EDA) (fig. 31) dendrimerer ved ulike DNA/dendrimer-ladningsforhold fremstilt. Transfeksjon av DNA i nærvær av DEAE-dekstran ble øket vesentlig der hvor ladningsforhold varierer fra ca. 1:5 (0,2) til ca. 1:100 (0,01) DNA:dendrimer (fig. 30 og 31). Selv ved ladningsforhold så høye som ca. 4:1 (4,0) og så lavt som ca. 1:10.000 (0,0001), ble en viss transfeksjon observert. Transfeksjon i fravær av

DEAE-dekstran, var kun signifikant hvor ladningsforholdet DNA:dendrimer var mindre enn 1:5, og hadde tendens til å øke når landingsforholdene ble så lave som 1:1.000, og endog så lave som 1:10.000 for G9 (NH_3) (fig. 30). Dette antyder at lavere genetisk materiale dendrimer-ladningsforhold kan muligens erstatte for den forøkende effekt til DEAE-dekstran.

Eksempel 57: Transfeksjon av DNA kompleksbundet med G7 (NH_3)-dendrimer i DEAE-dekstran sammenlignet med HBS (fig. 32).

I dette eksempel ble DNA/dendrimer-komplekser med ladningsforhold vist på abscissen i fig. 32, transfektert inn i RAT2-celler enten i nærvær av DEAE-dekstran eller i nærvær av HBS. Transfeksjonsresultatene som målt ved luminescens i relative lysenhet pr. μg cellulært protein er vist i fig. 32. Som det kan sees, øket DEAE-dekstran transfeksjonen vesentlig for komplekser hvor ladningsforhold varierte fra ca. 1:15 til ca. ca. 1:1, spesifikt så høyt som 1:0,6. Ingen transfeksjon ble oppnådd i HBS, hvilket bekreftet at transfeksjon med dendrimerer av generasjon 7 og lavere krever tilsetning av DEAE-dekstran.

Eksempel 58: Effekt av dendrimergenerasjon og DNA/dendrimer-ladningsforhold på transfeksjonseffektiviteten (fig. 33).

I dette eksempel, ble DNA kompleksbundet med G4-G8 (NH_3) tette stjernedendrimerer i ladningsforhold på 1:1, 1:5 og 1:10 (DNA:dendrimer) transfektert inn i RAT2-celler i nærvær av DEAE-dekstran. Prosent øking i transfeksjon over DEAE-dekstran DNA kontrollblanding er vist for hver av de resulterende komplekser i fig. 33. En sterkt signifikant bedring over kontrollresultatet ble sett for G6, G7 og G8-dendrimerer ved alle ladningsforhold; disse dendrimerer har diameter større enn ca. 50Å, mens en liten forbedring sees for G4 og G5-dendrimerer. Videre, når ladningsforholdet var 1:5 eller 1:10, ble transfeksjonen sterkt øket i forhold til kompleksene hvor ladningsforholdet er 1:1. Således ved å øke dendrimergenerasjonen og ladningsforholdet ble en synergistisk bedret transfeksjonseffektivitet oppnådd.

Eksempel 59: Effekt av DEAE-dekstran på transfeksjon under sterkt varierende DNA/dendrimer-ladnings-forhold (fig.34).

I dette eksempel, ble DNA kompleksbundet med G8 (NH_3)-dendrimerer i ladningsforhold som varierte fra 1:1 til 1:3805. Transfeksjonsresultatene, med og uten DEAE-dekstran til stede er vist i fig. 34 som grad luminescens i relative lysenheter pr. μg protein. For 1:1 og 1:100 ble minimal transfeksjon oppnådd enten med eller uten DEAE-dekstran. For ladningsforhold på 1:5 og 1:10, ble imidlertid transfeksjon igjen synergistisk

øket ved bruk av DEAE-dekstran. DEAE-dekstran kan kun øke transfeksjon av DNA/dendrimer-komplekser som er dannet ved passende ladningsforhold.

Eksempel 60: Effekt av varierende DEAE-dekstran-konsentrasjon på transfeksjonseffektiviteten (fig. 35).

I dette eksempel, ble DNA:G11 (EDA)-dendrimerkomplekser dannet ved ladningsforhold på 1:1-1:100 (DNA:dendrimer) benyttet for å transfektere RAT2-celler i nærvær av varierende konsentrasjoner av DEAE-dekstran (0 til 2 μM). Transfeksjons-resultatene målt som luminescens i relative lysenheter pr. μg cellulært protein er vist i fig. 35. En viss transfeksjon ble sett under alle betingelser, og i konsentrasjoner fra 0,125 til 2 μM, syntes DEAE-dekstran å øke transfeksjonen. Økingen var imidertid mest uttalt ved en DEAE-dekstran-konsentrasjon på 0,25 til 1 μM, og der DNA/dendrimer-ladningsforholdet var 1:5 eller 1:10. Dette viser at både ladningsforholdet og DEAE-dekstran-konsentrasjonen må optimaliseres for å oppnå synergistiske transfeksjonsforbedringer.

Eksempel 61: Transfeksjon av DNA ved bruk av dendrimerer sammenlignet med LIPOFECTIN® (fig. 36).

I dette eksempel, ble 5 μg DNA kompleksbundet med G8 (NH_3)-dendrimerer ved et ladningsforhold på 1:5 og benyttet til å transfektere fem ulike cellelinjer. Transfeksjon av de fem celle-typene vist i fig. 36 ble så sammenlignet med transfeksjon formidlet ved LIPOFECTIN®. I tillegg ble transfeksjon av DNA/dendrimer-komplekset som var forbedret av DEAE-dekstran sammenlignet med transfeksjon ved bruk av komplekset alene. I fig. 36 er transfeksjonsforbindelsene identifisert ved følgende tall: 1 er LIPOFECTIN® ved to ulike konsentrasjoner (20 μg og 2 μg); 2 er dendrimer og DEAE-dekstran; 3 er dendrimer alene; 4 er DEAE-dekstran alene som kontroll; og 5 er plasmid-kontroll.

Som sett i fig. 36, var transfeksjon ved bruk av DNA/dendrimer-kompleks i nærvær av DEAE-dekstran helt overlegen til den oppnådde LIPOFECTIN® ved enten 2 eller 20 μg pr. testbrønn, i alle cellene bortsett fra de humane HMEC-1-celler. Transfeksjon av DNA/dendrimer-komplekser i nærvær av DEAE-dekstran var også bedre enn den som ble oppnådd ved bruk av DNA-dendrimer alene. I noen celler, f.eks. rotte: klon 9, muse: NIH3T3 og muse: 10-1, er transfeksjon ved bruk av DNA/-dendrimer-komplekser alene overlegen i forhold til den som ble oppnådd ved bruk av LIPOFECTIN® ved enten 2 eller 20 μg. Dette antyder at DNA/dendrimer-kompleksene kan benyttes til å transfektere en lang rekke celler; det antyder imidlertid at effektiviteten av transfeksjon kan variere mellom ulike celle-typer.

Eksempel 62: Transfeksjon av ytterligere cellelinjer som er vanskelig å transfektere med vanlig tilgjengelige transfeksjonsforbindelser (fig. 37).

Transfeksjon av ytterligere cellelinjer som har vist å være spesielt vanskelig å transfektere med andre fremgangsmåter ble forsøkt med DNA/dendrimer-kompleksene. DNA ble kompleksbundet med G8 (NH_3)-dendrimer ved et 1:5 ladningsforhold og omfanget av DNA/dendrimer-kompleks-transfeksjonen i celle-linjene NRK52E og YB2 ble sammenlignet med transfeksjon av de samme celler med den kommersielt tilgjengelige transfeksjonsforbindelsen LIPOFECTIN® ved 20 eller 2 μg. I fig. 37, er forbindelsene nummererte som i fig. 36.

Transfeksjonsresultatene er vist som luminiscens i relative lysenheter pr. μg protein i fig. 37. De beste resultater i begge celler ble oppnådd ved bruk av DNA/dendrimer-komplekset sammen med DEAE-dekstran. Mens LIPOFECTIN® viste effektiv transfeksjon i NRK52E-cellelinjer, virket den ikke med YB2-cellelinjene, hvor resultatet med DNA/dendrimer-komplekset i DEAE-dekstran var helt overlegent. Igjen bør det bemerkes at total transfeksjonseffektivitet varierte mellom de ulike cellelinjer.

Eksempel 63: Sammenligning mellom DNA-transfeksjon ved bruk av dendrimerer, og to forskjellige lipidforbindel ser: LIPOFECTIN® og LIPOFECTAMINE® (fig. 38).

I dette eksempel ble RAT2-cellelinjer transfektert med RSV-luc DNA kompleksbundet med enten G8 (NH_3)-dendrimer eller G11 (EDA)-dendrimer. Ladningsforhold på 1:1, 1:5 og 1:10 (DNA:dendrimer) ble undersøkt. I noen tilfeller ble DEAE-dekstran benyttet til å øke transfeksjonen. Transfeksjonsresultatene sammenlignes med transfeksjon som benytter 2, 10 og 20 μl LIPOFECTIN® eller 2, 12, 5 og 25 μl LIPOFECTAMINE®.

Resultatene som er vist i fig. 38, viser den eksepsjonelt sterke DNA-transfeksjon som skjer når den kompleksbindes med dendrimerer i 1:5 eller 1:10 DNA/dendrimer-ladningsforhold i nærvær av DEAE-dekstran. LIPOFECTAMINE® resulterte i transfeksjon, men var effektiv kun innenfor et meget begrenset konsentrasjonsområde. LIPOFECTIN® viste minimal aktivitet i denne cellelinje.

Eksempel 64: Virkningen av cellemembran-permeabilisering med bruk av DMSO med hensyn til transfeksjons-effektivitet sammenlignet med DEAE-dekstran (fig. 39).

For å undersøke om DEAE-dekstran virket via membranforstyrrelse eller membran-forøkning, ble transfeksjonen av RAT2-celler med DNA kompleksbundet med en G9 (NH_3)-dendrimer sammenlignet med celler uten eller med DMSO-behandling. Resultatene, som er vist i fig. 39, antyder en 3-gangers økning av transfeksjon ved bruk av DEAE-dekstran, sammenlignet med transfeksjon uten DEAE-dekstran. DMSO hadde i virkeligheten ingen

effekt på transfeksjonen i fravær av DEAE-dekstran. Derfor, er DEAE-dekstranøkningen ikke bare et resultat av celleperturbering eller permeabilisering.

Det er interessant at kombinasjon av DMSO og DEAE-dekstran synes å gi synergi i transfeksjon av DNA kompleksbundet med dendrimer, spesielt ved 1:5 og 1:10 DNA/dendrimer-ladningsforhold. Dette antyder at disse to forbindelser virker gjennom ulike mekanismer.

Eksempel 65: Anvendelse av konjugerte dendrimerer for transfeksjon av celler (fig. 40 og 41).

Konjugeringen av en mål-dirigerende forbindelse (galaktose-trisakkarid) til dendrimerer påvirket ikke dannelsen av et stabilt DNA/dendrimer-kompleks (fig. 41) og kunne benyttes til å øke transfeksjonseffektiviteten (fig. 40). I dette eksempel ble G11 (EDA)-dendrimer konjugert med galaktose-trisakkarid. DNA ble så kompleksbundet med den målsøkende dendrimer, og komplekset ble benyttet til å transfektere RAT2, HepG2, NIH3T3 og AL-celler. Ikke-konjugerte dendrimerer ble også kompleksbundet med DNA og benyttet som kontroller. Resultatene som vist i fig. 40, viser at bindingen av en målsøkende forbindelse øker transfeksjonen av HepG2 og AL-celler som uttrykker reseptoren for galaktose-trisakkarid.

DNA/dendrimer-kompleksene ble også undersøkt ved hjelp av elektroforese. I fig. 41, ble 1 μg DNA kompleksbundet til G11 (EDA)-dendrimer med eller uten en målsøkende forbindelse som vist i tabell XXIII:

Tabell XXIII

Spor	Konsentrasjon i μM dendrimer
1	DNA alene
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 = ikke konjugert
b = konjugert

Ved meget lave konsentrasjoner av dendrimer, d.v.s. høyt DNA/dendrimer-ladningsforhold, ble stabile komplekser ikke dannet (som forventet) med noen av de ikke-målrettede, d.v.s. ikke-konjugerte dendrimerer eller med galaktose-trisakkarid-konjugert dendrimer (se sporene 3, 4, 6 og 7). Stabile komplekser ble imidlertid laget med enten de ikke-konjugerte eller konjugerte dendrimerer med passende ladningsforhold (se sporen 2 og 5 i fig. 41). Dette antyder at konjugerte dendrimerer i målsøkende transfeksjon er potensielt anvendbare.

Eksempel 66: Virkning av serum på ikke-målrettet transfek sjon, (fig. 42).

Nødvendigheten for målsøkende forbindelser in vivo illustreres i dette eksempel, der transfeksjon ble forøkt ved bruk av DNA:dendrimer G8 (NH_3)-komplekser i varierende serumkonsentrasjoner. Resultatene, som vist i fig. 42, viser at økende konsentrasjon av serum øker transfeksjon av RAT2-celler med DNA/dendrimer-komplekser selv i nærvær av DEAE-dekstran. Således er en annen metode slik at målsøkende fobindelse må benyttes for å formidle bindingen av DNA/dendrimer-kompleksene til celler in vivo.

Eksempel 67: Virkningen av potensielle målsøkende forbindelser og andre dendrimer-overflateforandringer på transfeksjonseffektiviteten (fig. 43).

I dette eksempel ble G5 og G6 (NH_3)-dendrimerer konjugerte med 20 biotiner pr. dendrimer, 100 pyruvater pr. dendrimer eller 64 pyruvater pr. dendrimer, eller alternativt ble modifisert på deres overflate ved å reagere 25% av deres overflate-funksjonelle aminogrupper med akrylsyre. Dendrimerene ble så benyttet til å kompleksbinde RSV-luc plasmid-DNA og transfektere RAT2-celler. Graden av transfeksjon er vist ved de relative lysenheter pr. μg protein. All transfeksjon ble utført i nærvær av DEAE-dekstran. Ladningsforholdene på substituerte dendrimerer ble bestemt som hvis ingen substitusjon av negativ funksjonsgruppe hadde blitt utført. Transfeksjonen resulterer i, som vist i fig. 43, at overflateforandringene ikke har noen bivirkninger på transfeksjonen, sammenlignet med transfeksjon ved bruk av en ikke-modifisert G6 (NH_3)-dendrimer.

Eksempel 68: Tilstedeværelse av LUCIFERASE®-aktivitet etter dendrimer-formidlet transfeksjon (fig. 44).

I dette eksempel ble tidsløpet av LUCIFERASE®-aktiviteten bestemt i RAT2-celler transfekterte med DNA/dendrimer-komplekser med og uten DEAE-dekstran. Aktiviteten ble målt ved 21, 45, 69 og 141 timer. Resultatene er vist i fig. 44.

Enten med eller uten DEAE-dekstran, ble graden av transfeksjon i det vesentlige større, særlig ved 21 og 45 timer, for DNA kompleksbundet med dendrimer sammenlignet med DNA transfektert alene (plasmidkontroll). Ladningsforholdet til hvert kompleks var 1:10. Resultatene var spesielt slående når det gjaldt DNA/dendrimer-transfeksjon i nærvær

av DEAE-dekstran ved 21 og 45 timer. Dette viser at gener blir uttrykt i lengre perioder når dendrimertransfeksjon benyttes.

Eksempel 69: Cytotoksisitet (fig. 45 og 46).

I dette eksempel ble prøver utført for å bestemme cytotoksisiteten til DNA/dendrimer-kompleksene, med og uten DEAE-dekstran på antall ulike celletyper: RAT2-celler (fig. 45), klon9-celler, NIH3T3-celler 10-1-celler og COS7-celler (fig. 46). I fig. 45 viser de ulike tallene på diagrammet: 1 er mediumkontroll; 2 er mediumkontroll med DNA; 3 er dendrimer; 4 er dendrimer med DNA; 5 er DEAE-dekstrankontroll; 6 er DEAE-dekstrankontroll med DNA; 7 er dendrimer med DEAE-dekstran; og 8 er dendrimer med DNA med DEAE-dekstran. Normal celle-levedyktighet i kultur er 90 til 95%. DNA/dendrimer-kompleksene alene hadde liten eller ingen virkning på celleoverlevelse med unntak av klon9-cellelinjen, hvor graden av skade ble omtrent fordoblet med DNA/dendrimer-kompleksene. Tilsetning av DEAE-dekstran øket cytotoksisiteten noe, men ikke tilstrekkelig til å avstå fra den meget gode anvendbarheten til denne kombinasjon in vitro.

Eksempel 70: Opptak og cellulær lokalisering av radiomerket DNA transfektert med dendrimer (fig. 47).

I dette eksempel ble radiomerket DNA (2,9 kb) overført i RAT2- og U937-celler ved bruk av G8 (NH_3)-dendrimer. Total overføring i cellen er registrert i fig. 47a-f, sammen med lokaliseringsresultater som ble oppnådd ved å fraksjonere cellene i membran, nukleære og cytoplasmatiske fraksjoner. Mnegder av radiomerket DNA i kjerner og membranfraksjoner ble således bestemt adskilt.

I 47a-c, ble U937-celler transfekterte ved bruk av DNA alene (47a), DNA pluss dendrimer (47b) og DNA pluss dendrimer pluss natriumazid (47c). De samme transfeksjonsserier ble utført for henholdsvis RAT2-celler i 47d, e og f.

Resultatene viser ikke bare at det cellulære opptak er vesentlig når DNA og dendrimer benyttes, men det er også et sterkt kjerneopptak (fig. 47b og e). Energiavhengigheten til DNA-modulert transfeksjon ble undersøkt ved tilsetning av natriumazid (fig. 47c og f), som reduserte graden av DNA-opptak til omtrent den som ble observert når DNA ble inkubert alene med cellene (fig. 47a og d).

Eksempel 71: Mikrofotografier av transfekterte celler (fig, 48a, 48b, 49, 50a og 50b).

I dette eksempel ble mikrofotografier tatt av D5 musemelanom og RAT2 rotte-fibroblast-celler transfekterte med RSV-β-gal plasmid DNA, ved bruk av henholdsvis G11 (EDA) tette stjernedendrimerer og G8 (NH_3) tette stjernedendrimerer. Cellene som ble vellyket transfekterte viste en sterk blåfarve i fig. 48-50.

I fig. 48a, ble transfeksjon av D5-celler utført ved bruk av DNA/dendrimer-komplekser som inneholdt 1 μg genetisk materiale pr. brønn. Fig. 48b viser at en større del av cellene blir tranfekterte når mengden DNA i komplekset er øket til 5 μg pr. brønn. Fig. 49 er et forstørret bilde av flere transfekterte celler der 3 μg genetisk materiale ble benytter pr. brønn.

Fig. 50a er et mikrofotografi av RAT2 rotte-fibroblast-celler transfektert med 3 μg pr. brønn av det genetiske materiale. Fig. 50b er en kontroll som viser ikke-transfekterte celler. Disse studier viser at den store del av celler i kultur (50-95%) ble transfekterte når DNA/dendrimer-kompleksene benyttes.

Eksempel 72: Sammenligning mellom forskjellige fremgangsmåter for å oppnå stabilt transfekterte D5, RAT2, MSU 1,2-cellelinjer (fig. 52, 53, 54, 55 og 59).

I dette eksempel ble transfeksjon av D5, RAT2, MSU 1.2-cellelinjer forsøkt ved bruk av 5 eller 10 μg plasmid som inneholder gener med resistens for G418-antibiotika (neomycin) pr. kulturbrønn, og β-galaktosidase eller mygromycin B resistens. I fig. 52 blir de følgende transfeksjonsteknikker sammenlignet ved bruk av D5-cellelinje og de anførte mengder av RSV-β-gal plasmid-DNA pr. brønn:

1. 10 μg i nærvær av 0,125M kalsiumfosfat;

2. 10 μg i nærvær av 0,5 μM DEAE-dekstran;

3. 5 μg kompleksbundet med 0,5 μM G8 (NH_3)-dendrimer ved et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:13; og

4. 10 μg kompleksbundet med 0,5 μM G8 (NH_3)-dendrimer ved et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:7.

I fig. 53 blir de følgende transfeksjonsteknikker sammenlignet ved bruk av RAT2-cellelinje og de anførte mengder plasmid-DNA pr. brønn:

1. 10 μg i nærvær av 0,125M kalsiumfosfat:

2. 10 μg i nærvær av 0,5 μM DEAE-dekstran;

3. 5 μg kompleksbundet med 0,5 μM G8 (NH_3)-dendrimer ved et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:13; og

4. 10 μg kompleksbundet med 0,5 μM G8 (NH_3)-dendrimer ved et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:7.

I fig. 53 blir de følgende transfeksjonsteknikker sammenlignet ved bruk av RAT2-cellelinje og de anførte mengder plasmid-DNA pr. brønn:

1. 10 μg i nærvær av 0,125M kalsiumfosfat:

2. 10 μg i nærvær av 0,5 μM DEAE-dekstran;

3. 5 μg kompleksbundet med 0,2 μM G8 (NH_3)-dendrimer ved et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:6;

4. 10 μg kompleksbundet med 0,2 μM G8 (NH_3)-dendrimer ved et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:3;

5. 5 μg kompleksbundet med 0,5 μM G8 (NH_3)-dendrimer ved et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:13, og

6. 10 μM kompleksbundet med 0,5 μM G8 (NH_3)-dendrimer ved et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:7.

DEAE-dekstran, 0,5 μM, ble inkludert i transfeksjonsmediet etter at det genetiske materiale var kompleksbundet med dendrimeren.

Cellene ble plassert i medium som inneholdt enten G418-antibiotika eller hygromycin B. Disse celler har en 24 timers doblingstid (d.v.s. replikasjon hver 24 time). Etter 4 uker ble cellekulturene målt med hensyn til antall kloner som uttrykker G418-resistens og β-galaktosidase og/eller hygromycinresistens.

I fig. 54 blir de følgende transfeksjonsteknikker sammenlignet ved bruk av MSU 1,2-cellelinje og de anførte mengder EBV-A-hygromycin plasmid-DNA pr brønn:

1. 5 μg i nærvær av 0,5 μM DEAE-dekstran

2. 5 μg i nærvær av 0,125 μM kalsiumfosfat

3. 5 μg kompleksbundet med G11 (EDA)-dendrimer ved et DNA/dendrimer-ladniningsforhold på 1:2

4. 5 μg kompleksbundet med G11 (EDA)-dendrimer ved et et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:5

5. 5 μg kompleksbundet med G11 (EDA)-dendrimer ved et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:10

6. 5 μg kompleksbundet med G11 (EDA)-dendrimer ved et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:20

7. 5 μg kompleksbundet med 10 μg LIPOFECTAMINE®

Dette antyder at DNA/dendrimer-transfeksjon er mer effektiv enn LIPOFECTAMINE® med hensyn til å frembringe stabile transfekterte cellelinjer.

Fig. 59 illustrerer transfeksjonene presentert i fig. 52. Følgende transfeksjonsteknikker ble sammenlignet ved bruk av D5-cellelinje og de anførte mengder er RSV-β-gal plasmid-DNA pr. brønn:

1. 10 μg i nærvær av 0,125M kalsiumfosfat

2. 10 μg i nærvær av 0,5 μM DEAE-dekstran

3. 5 μg kompleksbundet med 0,5 μM G8 (NH_3)-dendrimer ved et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:13

4. 10 μg kompleksbundet med 0,5 μM G8 (NH_3)-dendrimer ved et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:7

5. 5 μg kompleksbundet med 0,2 μM G8 (NH_3)-dendrimer ved et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:6

Bemerk det økede antall kloner som ble fremstilt ved dendrimer-transfeksjon.

Fig. 55 illustrerer transfeksjon av D5-cellelinje ved bruk av ICAM ekspresjonsplasmid og G11 (EDA)-dendrimer ved et DNA/dendrimer-forhold på 1:10. Kloner som utvikler ICAM-gen ble først valgt med hensyn til neomycinresistens. Neomycin-resistente kloner ble videre analysert ved fluorescens-akivert cellesortering (FACS) ved bruk av anti-ICAM antistoff konjugert med fluorescein. De følgende cellelinjer og kloner er sammenlignet:

1. D5-cellelinje, negativ (ikke farvet) av anti-ICAM antistoff.

2. IC-21-cellelinje, positivt farvet med anti-ICAM antistoff.

3. Klon #23 etter transfeksjon med 15 μg DNA med G11 (EDA)-dendrimer ved et DNA/dendrimer-ladnings-forhold på 1:10.

4. Klon # 27 oppnådd som beskrevet ovenfor.

5. klon # 31 oppnådd som beskrevet ovenfor.

6. Klon # 9 oppnådd som beskrevet ovenfor.

Profiler av positivt farvede celler ble lagt over profilen til ICAM negativ kontroll D5-cellelinje (fig. 55A) som ble benyttet for transfeksjon. Disse resultater viser at DNA/dendrimer-transfeksjon er i stand til å fremstille permanente cellelinjer som uttrykker høye konsentrasjoner av ICAM fra transfektert gen.

Som det kan sees i fig. 52, 53, 54, 55 og 59, er antallet kloner som fortsetter å uttrykke både G418-resistens og β-galaktosidasegenet, hygromycin-resistens og gen for ICAM ved 4 uker bemerkelsesverdig der tranafeksjonen ble utfψrt ifψlge foreliggende oppfinnelse, d.v.s. ved ϵ kompleksbinde det genetiske materiale med dendrittiske polymerer, sammenlignet med transfeksjon som skjedde kun i nærvær av kalsiumfosfat eller DEAE-dekstran eller LIPOFECTAMINE®. Dette viser at transfeksjon av celler med DNA-dendrimer er meget mer efektivt enn andre tilgjengelige teknikker når det gjelder å fremstille stabilt tranfekterte cellelinjer.

Eksempel 73: Sammenligning mellom transfeksjon av COS1 og RAT2-celler ved bruk av forskjellige dendrimerer og dendrimerkombinasjoner med ulike ladnings-

forhold og under tre forskjellige betingelser (fig. 61A og 61B).

I dette eksempel ble 1 μg RSV-luc pr. brønn kompleksbundet med de anførte dendrimerer eller kontroller ved de anførte ladningsforhold vist i tabell XXVI nedenfor:

Tabell XXVI

Prøve nr.	Transfeksjonsforbindelse	Genetisk materiale:dendrimer-ladningsforhold
1	Aggregat av G8 (NH_3) og G8,5 (NH_3)-dendrimerer med G8:G8,5-ladningsforhold på 50 (prøve 13 fra eks. 74 nedenfor)	1:10
2	Samme som prøve 1 over	1:20
3	Samme som prøve 1 over	1,50
4	Aggregat av G6 (NH_3) og G6,5 (NH_3)-dendrimerer med G6:G6,5-ladningsforhold på 100 (prøve 8 fra eks. 74 nedenfor)	1:10
5	Samme som prøve 4 over	1:20
6	Samme som prøve 4 over	1:50
7	Prøve Q fra eks. 42, en polydispers dendrimer-blanding	1:10
8	Samme som prøve 7 over	1:50

Tabell XXVI (forts.)

Prøve nr.	Transfeksjonsforbindelse	Genetisk materiale:dendrimer-ladningsforhold
9	G10 (NH_3)	1:20
10	G10 (NH_3)	1:50
11	LIPOFECTAMINE®	Ikke relevant; benyttet produsentens anbefalinger

De foregående kombinasjoner som ble benyttet til å transfektere både COS1 (fig. 61A) og RAT2 (fig. 61B)-celler under tre ulike betingelser. Ved alle tre betingelser ble DMEM essensielt medium benyttet. I eksemplene vist av de prikkede søylene i fig. 61A og 61B, ble det genetiske materiale/dendrimer-kompleksene benyttet alene. I eksemplene vist av de diagonalt skraverte søylene, ble transfeksjon utført i nærvær av 0,5 μM DEAE-dekstran. I eksemplene illustrert ved de fylte søylene, ble transfeksjon utført i nærvær av 25 μg/ml klorokin.

Resultatene fra dette eksperimentet viser at effektiviteten til klorokin er en funksjon av hvilken celle som blir transfektert (fig. 61B); og at i minst noen celler, er anvendelsen av klorokin overlegen med hensyn til transfeksjons-effektivitet (fig. 61A).

Eksempel 74: Fremstilling av pH-kontrollerte dendrimer-aggregater og anvendelse av disse aggregater i transfeksjonsstudier.

Dendrimeraggregater ble fremstilt av dendrimerløsninger med terminale aminogrupper og dendrimerer med natriumkarboksylatgrupper. Forholdet mellom forskjellige dendrimerer som ble benyttet i dette eksempel er vist i tabell XXIV nedenfor.

Tabell XXIV

Prøve	G n.5 NH_3	G n NH_3	Ladningsforhold 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	*

* betyr ikke relevant

".5"-generasjonstallet (d.v.s. G8,5 og G6,5) viser at disse er halv-generasjonsdendrimerer (i dette tilfelle, halv-generasjon PAMAM-dendrimerer). Som halv-generasjon har disse dendrimerer karboksylat-endegrupper, mens ved hel-generasjon har de terminale aminogrupper.

En typisk dendrimer-aggregatformulering er diskutert nedenfor. Stamløsninger ble fremstilt av G8,5 (NH_3)-dendrimer (2,34 vekt%) og G8 (NH_3)-dendrimer (2,28 vekt%) i en tris-buffer (pH 7,4). For å fremstille dendrimeraggregatene med 50:1 ladningsforhold, ble 8,8 mg G8,5 (NH_3)-dendrimerløsning blandet med 15,4 mg G8 (NH_3)-dendrimerløsning. Den resulterende løsning ble så fortynnet til en total løsningsvekt på 2,0683 g med tris-buffer. Den totale løsningskonsentrasjon var 0,74 vekt%. Fig. 56 viser luciferase-aktiviteten i RAT2-celler etter transfeksjon med dendrimer-aggregatene. Aggregatene som ble dannet mellom G6,5 (NH_3) og G8 (NH_3)-dendrimerer såvel som dem fremstilt fra G8,5 (NH_3) og G8 (NH_3)-dendrimerer viste en sterk øket transfeksjonseffektivitet når de ble sammenlignet med utgangs-helgenerasjons-

dendrimerene selv, hvis det riktige forhold mellom amino-terminale til natriumkarboksylat-terminale dendrimerer benyttes i aggregatformuleringen.

Eksempel 75: Fremstilling av lysin-modifiserte dendrimerer og transfeksjonsstudier ved bruk av modifiserte dendrimervektorer (fig. 57).

En løsning av G7 (NH_3) (0,50 g, 11 μmol) i anhydrid-dimetylformamid ble rørt kraftig mens p-nitroenylester av N,N'-di-t-butoksykarbonyl-L-lysin ble tilsatt hurtig. Etter 5 min., ble pH i blandingen justert til ca. 8,5 med trietylamin. Blandingen ble rørt i 24 timer, deretter langsomt satt til vann under kraftig røring. Trietylamin (0,6 ml) og mettet NaCl (35 ml) ble så satt til den vandige blandingen som ble rørt i 2 dager. Supernatanten ble dekantert av, og det gjenvunne rene produk ble tørket under vakuum ved 40°C i 12 timer. Det tørkede urene produkt ble rørt kraftig i dietyleter og så filtrert mens produktet ble renset med ytterligere dietyleter. NMR-analyse av det tørre, faste produkt (0,96 g, 78% utbytte) var forenlig med kobling av N,N'-di-t-butoksykarbonyl-L-lysin-grupper til overflaten av dendrimeren.

t-butoksykarbonyl-beskyttelsesgruppene ble så fjernet fra lysinrestene ved å løse produktet (0,35 g, 3,3 μmol) i anhyd-
rid-metylenklorid og så langsomt tilsette trifluoreddiksyre (3 ml) i blandingen. Gassene som utviklet seg ble blåst ut av flasken med en nitrogenstrøm. Etter 3 timer ble blandingen konsentrert under en nitrogenstrøm (40°C) og så ble prøven tørket under vakuum. Det urene produktet ble renset ved dialyse (10.000 molekylvekt-eksklusjonspunkt) i 24 timer mot
1 liter vann. Etter fjerning av faste stoffer ved filtrering og konsentrering under vakuum, ble en farveløs masse samlet (0,26 g, 69% utbytte). Ved analyse av produktet ved ^{1}H og ^{13}C nukleær magnetisk resonansspektroskopi, størrelses-eksklusjonskromatografi, kapillær elektroforese og polyakrylamidgel-elektroforese, viste alle den riktige struktur.

Fig. 57 viser de relative lysenheter pr. μg protein som ble fremstilt ved transfeksjon i RAT2-celler ved bruk av lysin-modifisert G7 (NH_3)-dendrimer sammenlignet med ikke-modifisert G7 (NH_3) til G10 (NH_3)-dendrimerer (alle med et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:10 og i nærvær av DEAE-dekstran). Lysin-modifisert dendrimer viser overraskende høy transfeksjonseffektivitet sammenlignet med ikke-modifisert dendrimer av samme generasjon, og faktisk, er transfeksjons-effektiviteten lik den til en ikke-modifisert G10 (NH_3)-dendrimer.

Eksempel 76: Transfeksjonseffektiviteten i COS1 og RAT2-cellelinjer ved bruk av polydisperse blandinger av dendrimerer, (fig. 58).

I dette eksempel ble DNA kompleksbundet med G11 (EDA)-dendrimer, en blanding av G11, G3, G2 og G1 (EDA)-dendrimerer, og en polydispers blanding av dendrimerer som vist i
tabell XXV nedenfor.

Tabell XXV

Prøve	Dendrimer eller kontroll	DNA/dendrimer-ladningsforhold
1	G11 (EDA)	1:10
1	G11 (EDA)	1:20
1	G11 (EDA)	1:100
2	Blanding 1 (EDA)[a]	1:10
2	Blanding 1 (EDA)[a]	1:20
2	Blanding 1 (EDA)[a]	1:100
3	Blanding 2 (EDA)[b]	1:10
3	Blanding 2 (EDA)[b]	1:20
3	Blanding 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 = blanding av G1 (EDA), G2 (EDA) og G3 (EDA)-dendrimerer
b = blanding av 90% G11 (EDA) og 10% av blanding 1
c = blanding av dendrimerer som beskrevet i eks. 42, en polydispers dendrimerblanding

Resultatene som ble oppnådd fra transfeksjoner ved bruk av disse komplekser er vist i fig. 58. I COS1-celler var transfeksjonseffektiviteten som ble oppnådd med den polydisperse blandingen meget høyre enn den som ble oppnådd med G11 (EDA), blandingen av G11, G1, G2 og G3 (EDA), eller

LIPOFECTAMINE®. Denne forskjellen er spesielt stor med et DNA/dendrimer-ladningsforhold på 1:10 og 1:20. Imidlertid viser en sammenligning mellom resultatene i COS1 og RAT2-
linjene forskjeller i transfeksjonseffektiviteten i de to cellene ved bruk av den samme type dendrimer-preparater. F.eks. synes den polydisperse blanding (dendrimer Q fra eks. 42) å være mindre effektiv i transfeksjon av RAT2 enn av COS1-celler. Denne egenskapen kan muligens være nyttig i genoverføring.

Eksempel 77: (fig. 60, paneler 1 og 2)

For å bestemme hvorvidt DNA/dendrimer-kompleksene kan benyttes til å transfektere celler in vivo, ble D5-melanom-celler injisert subkutant i syngenetiske mus. Svulster på ca. 0,5 cm i diameter utviklet seg og ble direkte injisert med RSV-β-gal-DNA, enten alene eller kompleksbundet til G11 (EDA)-dendrimer, og dendrimer alene som kontroll. 24 timer senere ble dyrene drept og svulstene fiksert i formalin, snittet og farvet med X-gal for å påvise ekspresjon av β-galaktosidaseenzym. Som det kan sees i fig. 69, panel 1, viste et betydelig antall celler holdepunkter for transfeksjon (X-gal-farving) i svulsten som ble injisert med DNA/dendrimer-komplekset sammenlignet med bakgrunnsfarvingen (dendrimer-injisert tumor, panel 2). Det ble ikke funnet noen holdepunkter for toksisitet eller vevsødeleggelse i noen av svulstene. Farving av svulster injisert med DNA alene viste ingen holdepunkter for ekspresjon, hvilket antydet at transfeksjon in vivo ble øket ved anvendelse av DNA/dendrimer-kompleksene.

Eksempel 78: Sammenligning mellom LUCIFERASE®-aktivitet i RAT2-celler etter transfeksjon med lysinbasert, ikke-symmetrisk forgrenede dendrimerer og G8 (NH_3) og G11 (EDA) tett stjernedendrimerer (fig. 62).

I dette eksempel ble lysin-baserte, ikke-symmetriske forgrenede dendrimerer sammenlignet med tett stjernedendrimerer for transfeksjonsevne. De lysin-baserte dendrimerer ble fremstilt vanligvis i henhold til instruksjoner i US-patenter 4.289.872, 4.360.646 og 4.410.688. Transfeksjon ble forsøkt med og uten DEAE-dekstran til stede. Ladningsforholdet mellom DNA:dendrimer var, i alle tilfeller, 1:5. Tilstrekkelig DNA/dendrimer-kompleks ble benyttet til å gi 1 μg DNA pr. testprøve. Dendrimerer som ble benyttet i søylene 1-16 er som følger:

1.G1 TREN-kjerne lysin-basert, usymmetrisk forgrenet dendrimer;
2.G2 TREN-kjerne lysin-basert, usymmetrisk forgrenet dendrimer;
3.G3 TREN-kjerne lysin-basert, usymmetrisk forgrenet dendrimer;
4.G4 TREN-kjerne lysin-basert, usymmetrisk forgrenet dendrimer;
5.G5 TREN-kjerne lysin-basert, usymmetrisk forgrenet dendrimer;
6.G1 BHA-kjerne lysin-basert, usymmetrisk forgrenet dendrimer-trifluoracetatsalt;

7.G2 BHA-kjerne lysin-basert, usymmetrisk forgrenet dendrimer-trifluoracetatsalt;
8.G3 BHA-kjerne lysin-basert, usymmetrisk forgrenet dendrimer-trifluoracetatsalt;
9. G4 BHA-kjerne lysin-basert, usymmetrisk forgrenet dendrimer-trifluoracetatsalt;
10.G5 BHA-kjerne lysin-basert, usymmetrisk forgrenet dendrimer-trifluoracetatsalt;
11.G6 BHA-kjerne lysin-basert, usymmetrisk forgrenet dendrimer-trifluoracetatsalt;
12.G7 BHA-kjerne lysin-basert, usymmetrisk forgrenet dendrimer-trifluoracetatsalt;
13.G8 BHA-kjerne lysin-basert, usymmetrisk forgrenet dendrimer-trifluoracetatsalt;
14.G8 BHA-kjerne lysin-basert, usymmetrisk forgrenet dendrimer fritt amin, uten trifluoracetatsalt;
15.G8 (NH_3) tett stjernedendrimer; og
16.G11 (EDA) tett stjernedendrimer.

Som det kan sees fra fig. 62, begynte de lysin-baserte, ikke-symmetriske forgrenede dendrimerer å vise betydelig transfeksjon med G4 og G5, og minst med TREN-kjernen. Trifluoracetatsaltene i de ikke-symmetriske, forgrenede dendrimerene synes å hemme transfeksjonen noe for BHA-kjernedendrimerene. G8 BHA-kjernedendrimer i fravær av trifluoracetatsalt synes å vise god transfeksjon.

Som med tette stjernedendrimerer, viste de lysin-baserte, usymmetrisk forgrenede dendrimerer overlegen transfeksjon ved 1:5 DNA/dendrimer-ladningsforhold i nærvær av DEAE-dekstran.

Patentkrav

1. Tett stjernepolymerkonjugat, karakterisert ved at det omfatter minst én tett stjernepolymer forbundet med minst én enhet av minst ett genetisk materiale så som nukleotid-baserte forbindelser, så som virus og virusfragmenter, plasmider, phag, cosmider, gener og genfragmenter (for eksempel exoner, introner), deoksyribonukleinsyre (DNA) både enkelt- og dobbelt-trådet, ribonukleinsyre (RNA), ribosomal RNA (rRNA), katalytisk RNA (cRNA), små nukleær RNA (snRNA), messenger RNA (mRNA), transport RNA (tRNA), DNA og RNA-oligonukleotider (både enkelt og dobbelt-trådet) eller oligomerer og (anti-sense) oligonukleotider, protein-nuklein-syrer (PNA), og substituerte nukleinsyre-oligonukleotider, hvori nevnte stjerenpolymer omfatter minst et løsningsmiddel løselig, radialt symmetrisk dendrimer, hvor nevnte dendrittiske polymer omfatter partikler med dimensjoner fra 20Å ved deres snevreste dimensjoner til 1.000Å ved deres største dimensjoner, og hvor dendrimeren har minst én kjernegren ut fra en kjerne, idet nevnte gren har minst én terminal gruppe forutsatt at

(1) forholdet mellom de terminale gruppene til kjernegrenene er to eller høyere,

(2) tettheten til terminale grupper pr. enhetsvolum i polymeren er minst 1,5 ganger den til en utstrakt konvensjonell stjernepolymer som har lignende kjerne og monomere grupper og en sammenlignbar molekylvekt og antall kjernegrener, idet hver av nevnte grener til den utstrakte konvensjonelle stjernepolymeren har kun bærer én terminal gruppe, og

(3) det molekylære volum som ikke er mer enn omtrent 80% av det molekylære volumet til en utstrakt konvensjonell stjernepolymer som bestemt av dimensjonsstudier ved anvendelse av graderte Corey-Pauling molekylære modeller, og har regelmessig dendrittisk forgrening;

hvori nevnte genetisk materiale utgår mellom og virker slik at det binder en rekke tette stjernepolymerpartikler sammen; idet ladningsforholdet av genetisk materiale til dendrimer er fra 1:1 til 1:100.

2. Konjugat ifølge krav 1, karakterisert ved at to eller flere genetiske materialer er tilstede.

3. Konjugat ifølge krav 1 eller 2, karakterisert ved at nevnte tette stjernepolymer omfatter hovedsakelig aminofunksjonelle overflategrupper.

4. Konjugat ifølge krav 1, karakterisert ved at nevnte tette stjerne-polymer har en tverrsnittsdimensjon på minst ca. 50Å, hvori nevnte dimensjon er den snevreste dimensjon til nevnte tette stjernepolymer.

5. Konjugat ifølge krav 1, karakterisert ved at ladningsforholdet til det genetiske materiale til dendrimer er fra 1:1 til 1:15.

6. Tett stjernepolymerkonjugat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det har formelen:

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

hvor: hver P representer en tett stjernepolymer;
x representerer et helt tall på 1 eller større;
hver M representerer minst én enhet av et genetisk materiale, idet nevnte genetiske materiale kan være det samme genetiske materialet eller et annet genetisk materiale;
y representerer et tall på 1 eller høyere;
hver T representerer én eller flere målsøkende rettledende forbindelser;
e representerer et tall på 1 eller høyere; og
* indikerer at det genetiske materialet er assosiert med tett stjernepolymer;
hvori nevnte tette stjernepolymer omfatter minst et løsningsmiddel løselig, radialt symmetrisk tett stjernepolymer, hvori den nevnte dendrittiske polymer omfatter partikler med dimensjoner fra 20Å ved deres snevreste dimensjoner til 1.000Å ved deres største dimensjoner, og den tette stjernepolymeren har minst én kjernegren som utgår fra en kjerne, idet nevnte gren har minst én terminal gruppe forutsatt at
(1) forholdet mellom terminale grupper og kjernegrener er to eller høyere,
(2) tettheten til terminale grupper pr. enhetsvolum i polymeren er minst 1,5 ganger den til en utstrakt konvensjonell stjernepolymer som har lignende kjerne og monomere grupper og en sammenlignbar molekylvekt og antall kjernegrener, idet hver av nevnte grener til den utstrakte konvensjonelle stjernepolymeren har kun bærer én terminal gruppe, og
(3) det molekylære volum som ikke er mer enn omtrent 80% av det molekylære volumet til en utstrakt konvensjonell stjernepolymer som bestemt av dimensjonsstudier ved anvendelse av graderte Corey-Pauling molekylære modeller, og har regelmessig dendrittisk forgrening;
hvori nevnte genetiske materialet utgår mellom og virker slik at det binder en mengde tette stjernepolymerpartikler sammen; idet ladningsforholdet av genetisk materiale til dendrimer er fra 1:1 til 1:100,
med den forutsetning at det genetiske materialet opprett-holder dets effektivitet.

7. Tett stjernepolymerkonjugat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at har formelen

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

hvor: hver C' representerer den samme eller annen forbindelsesgruppe;
hver C" representerer den samme eller forskjellig forbindelsesgruppe;
g og k er hver individuelt et tall på 1 eller høyere;

e representerer et tall på 1 eller høyere;
f og h er hver individuelt et tall på 0 eller høyere;
- viser en kovalent binding i de tilfeller hvor forbindelsesgruppen er tilstede;
hver P representerer en tett stjernepolymer;
x representerer et tall på 1 eller høyere;
T representerer en målsøkende rettledende forbindelse:
hver M representerer minst en enhet av genetisk materiale:
y representerer et tall på 1 eller høyere; og
* indikerer at det bårete genetiske materialet er assosiert med polymeren;
hvori nevnte tette stjernepolymer omfatter minst ett løsningsmiddel løselig, radial symmetrisk sett stjernepolymer hvori nevnte dendrittiske polymer omfatter partikler med dimensjoner fra 20Å ved deres snevreste dimensjoner til 1.000Å ved deres største dimensjoner og den tette stjernepolymeren har minst én kjernegren som utgår fra en kjerne, idet nevnte gren har minst én terminal gruppe forutsatt at

(1) forholdet av terminale grupper til kjernegrenene er to eller høyere,

(2) tettheten til de terminale grupper pr. enhetsvolum i polymeren er minst 1,5 ganger den til en utstrakt konvensjonell stjernepolymer som har lignende kjerne og monomeriske grupper og en sammenlignbar molekylvekt og antall kjerne-grener, idet hver av nevnte grener til den utstrakte konvensjonelle stjerne-polymeren kun bærer én terminal gruppe, og

(3) molekylært volum som ikke er mer enn omtrent 80% av det molekylære volumet til nevnte utstrakte konvensjonelle stjernepolymer som bestemt ved dimensjonsstudier ved anvendelse av graderte Corey-Pauling molekylære modeller, og som har regelmessig dendrittisk forgrening;

og hvori nevnte genetiske materialet utgår mellom og virker slik at det binder en mengde tette stjernepolymerpartikler sammen; idet ladningsforholdet til det genetiske materiale til dendrimeren er fra 1:1 til 1:100,

med den forutsetning at det bårete genetiske materialet opprettholder dets effektivitet.

8. Konjugat ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at dendrimeren er polyamidoamin eller et polyalkylenimin.

9. Konjugat ifølge hvilket som helst av kravene 6-8, k a r a k t e r i s e r t v e d at målsøkende rettledende forbindelse, T, er et polyklonalt eller monoklonalt antistoff eller fragment derav.

10. Konjugat ifølge hvilket som helst av kravene 6-9, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er for anvendelse som et diagnostisk middel.

11. Sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter minst et stjernepolymerkonjugat ifølge krav 1, hvori nevnte stjernepolymer som er en dendrittisk polymer omfatter partikler med dimensjoner fra 20Å ved deres snevreste dimensjoner til 1.000Å ved deres største dimensjoner og den omfatter en stjernepolymer som er en dendrittisk polymer som har positiv overflatefunksjonalitet over en vesentlig del av polymeroverflaten og nevnte genetiske materiale og stjernepolymeren som er en dendrittisk polymer er kompleks-bundet i et ladningsforhold fra 1:1 til 1:100;

hvori stjernepolymeren som er en dendrittisk polymer har minst én kjernegren som utgår fra en kjerne, idet nevnte gren har minst én terminal gruppe forutsatt at

(1) forholdet mellom terminale grupper og kjernegrener er to eller høyere,

(2) tettheten til de terminale grupper pr. enhetsvolum i polymeren er minst 1,5 ganger den til en utvidet konvensjonell stjernepolymer som har lignende kjerne og monomeriske grupper og en sammenlignbar molekylvekt og antall kjerne-grener, idet hver av nevnte grener til den utstrakte konvensjonelle stjerne-polymeren kun bærer én terminal gruppe, og

(3) det molekylære volumet som ikke er mer enn omtrent 80% av det molekylære volumet til en utstrakt konvensjonelle stjernepolymer som bestemt ved dimensjonsstudier ved anvendelse av graderte Corey-Pauling molekylære modeller, og som har regelmessig dendrittisk forgrening;

hvori nevnte genetiske materiale utgår mellom og virker slik at den binder en mengde dendrittiske polymerpartikler.

12. Sammensetning ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte positive overflatefunksjonalitet er dannet av aminogruppene ved overflaten til stjernepolymeren som er en dendrittisk polymer.

13. Sammensetning ifølge krav 11 eller 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte stjernepolymer som er en dendrittisk polymer omfatter en dendrimer som har positiv overflatefunksjonalitet over minst 75% av dets dendrimeroverflate.

14. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 11-13, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et kompleks av stjernepolymer som er en dendrittisk polymer med genetisk materiale, i løsning med enten DEAE-dekstran eller glycerol.

15. Sammensetning ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte gentiske materiale og nevnte stjernepolymer som er en dendrittisk polymer kompleksbindes i et ladningsforhold fra 1:1 til 1:15.

16. Sammensetning ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte genetiske materiale og nevnte stjernepolymer som er en dendrittisk polymer kompleksbindes i et ladningsforhold fra 1:5 til 1:10.

17. Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 14-16, k a r a k t e r i s e r t v e d at komplekset er i løsning med DEAE-dekstran i en konsentrasjon fra 0,125 til 2 µm.

18. Sammensetning ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at konsentrasjonen av DEAE-dekstran i nevnte sammensetning er fra 0,25 til 1 µm.

19. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 14-16, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte kompleks er i løsning med glycerol i en konsentrasjon fra 2,0 til 10,0 vol%.

20. Sammensetning ifølge krav 19, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte kompleks er i løsning med glycerol i en konsentrasjon fra 2,0 til 5,0 vekt%.

21. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 14-20, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte sammensetning videre innbefatter DMSO.

22. Sammensetning ifølge krav 14 eller 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte sammensetning videre innbefatter klorkinin.

23. Sammensetning ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte målrettledende forbindelse er assosiert med nevnte stjernepolymer som er en dendrittiske polymer.

24. Sammensetning ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte genetiske materiale og nevnte stjernepolymer som er en dendrittisk polymer kompleksbindes i et ladningsforhold fra 1:1 til 1:15.

25. Sammensetning ifølge krav 24, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte genetiske materiale og nevnte stjernepolymer som er en dendrittisk polymer kompleksbindes i et ladningsforhold fra 3:1 til 1:10.

26. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 23-25, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et kompleks av stjernepolymer som er en dendrittisk polymer med genetisk materiale, i løsning med enten DEAE-dekstran eller glycerol.

27. Sammensetning ifølge krav 23, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte målsøkende rettledende forbindelse er et polyklonalt eller monoklonalt antistoff eller fragment derav.

28. Sammensetning ifølge krav 23, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte målsøkende rettledende forbindelse er galaktose-trisakkarid, biotin, pyrodruesyre, insulin eller avidin.

29. Sammensetning ifølge krav 11, 14, 15, 23 eller 24, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte stjernepolymer som er en dendrittisk polymer omfatter partikler med dimensjoner fra 20Å ved deres snevreste dimensjoner til 1.000Å ved deres største dimensjoner.

30. Sammenstning ifølge krav 29, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte stjernepolymer som er en dendrittisk polymer omfatter en tett stjernedendrimer som generelt er sfærisk, ellipsoidal eller stavstrekformet i konfigurasjon.

31. Sammensetning ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte stjernepolymer som er en dendrittisk polymer omfatter aggregater av dendrimerer med positiv overflate-funksjonalitet og dendrimerer med negativ overflatefunksjonalitet i et positivt:negativt ladningsforhold fra 25:1 til 100:1.

32. Sammensetning ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte stjernepolymer som er en dendrittisk polymer omfatter en tett stjernepolymer med aminosyrer over en vesentlig del av dets overflate, og vesentlig kun på dets overflate.

33. Sammensetning ifølge krav 32, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte aminosyre er lysin eller arginin.

34. Sammensetning ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at den stjernepolymer som er en dendrittiske polymer omfatter en samling av koblete tette stjernedendrimerer.

35. Sammensetning ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte stjernepolymer som er en dendrittisk polymer består av en dispersjon av dendrimerpartikler i forskjellige størrelser, varierende fra partikler som har en diameter så liten som omtrent 20Å ved deres smaleste dimensjon til partikler som har en diameter på omtrent 110Å, idet det er andre partikler med mellomliggende diametere i nevnte dispersjon.

36. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 11-28, k a r a k t e r i s e r t v e d at et genetisk materiale er kompleksbundet med en første stjernepolymer som er en dendrittisk polymer som er plassert i en løsning inneholdende en andre stjernepolymer som er en dendrittisk polymer, idet nevnte andre dendrittiske polymer er større enn den første nevnte stjernepolymer som er en dendrittisk polymer.

37. Sammensetning ifølge krav 36, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte første og andre stjernepolymer som er en dendrittisk polymer er en tett stjernepolymer.

38. Sammensetning ifølge krav 36, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte stjernepolymer som er en dendrittisk polymer har en diameter ved dets snevreste dimensjon fra 22 til 50Å, og nevnte andre stjernepolymer som er en dendrittisk polymer har ved det snevreste dimensjon en diameter fra 50 til 1.000Å.

39. Sammensetning ifølge krav 38, k a r a k t e r i s e r t v e d at én eller begge av nevnte første og andre stjernepolymer som er en dendrittisk polymerer består av sfærisk formede dendrimerer.

40. Sammensetning ifølge krav 39, k a r a k t e r i s e r t v e d at begge av nevnte første og andre stjernepolymer som er en dendrittisk polymerer består av sfærisk formede dendrimerer.

41. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 11-24, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte stjernepolymer som er en dendrittisk polymer omfatter en usymmetrisk forgrenet stjernepolymer som er en dendrittisk polymer.

42. Sammensetning ifølge krav 41, k a r a k t e r i s e r t v e d at den monomeriske byggeblokken til nevnte usymmetriske forgrenede stjernepolymer som er en dendrittisk polymer er en amino-syre.

43. Sammensetning ifølge krav 42, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte aminosyre er lysin eller arginin.

44. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 11-26, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte stjernepolymer som er en dendrittisk polymer omfatter aggregater av dendrimerer med positiv overflatefunksjonalitet og dendrimerer med negativ overflate-funksjonalitet ved en positivt:negativt-ladningsforhold fra 25:1 til 100:1.

45. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 11-26, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte stjernepolymer som er en dendrittisk polymer omfatter en tett stjerne-polymer med aminosyrer over en vesentlig del av dets overflate, og vesentlig kun på dets overflate.

46. Sammensetning ifølge krav 45, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte aminosyre er lysin eller arginin.

47. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 11-26, karakterisert ved at nevnte stjernepolymer som er en dendrittisk polymer består av en dispersjon av dendrimerpartikler med forskjellige størrelser varierende fra partikler som har en diameter som er så liten som omtrent 20Å ved deres minste dimensjon til partikler som har en diameter på omtrent 110Å, idet det er andre partikler med mellomliggende diametere i nevnte dispersjon.

48. Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 11-19, 23-25, karakterisert ved at nevnte sammensetning videre innbefatter klorkinin.

49. Formulering, karakterisert ved at den omfatter et konjugat eller en sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 1-48, som har minst ett farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel eller bærer tilstede.

50. Fremgangsmåte for fremstilling av et kompleks av dendrittisk polymer og genetisk materiale ifølge krav 1, karakterisert ved at den omfatter:

omsetning av nevnte dendrittiske polymer med nevnte genetiske materiale i et egnet løsningsmiddel ved en temperatur som letter kompleksbinding av nevnte genetiske materiale med nevnte dendrittiske polymer, idet nevnte fremgangsmåte innbefatter plassering av nevnte kompleks i en løsning med DEAE-dekstran eller glycerol.

51. Fremgangsmåte ifølge krav 50, karakterisert ved at den innbefatter binding av en målsøkende rettledende forbindelse til nevnte dendrittiske polymer før kompleksbinding av denne med det genetiske materiale.

52. Fremgangsmåte ifølge krav 50 eller 51, hvor nevnte dendrittiske polymer har en hovedsakelig kationisk overflate, karakterisert ved at nevnte fremgangs-måte omfatter elektrostatisk kobling av det genetiske materiale til nevnte dendrittiske polymer for å danne nevnte kompleks.

53. Fremgangsmåte for dannelse av et dendrittisk polymer-genetisk materiale-kompleks ifølge krav 1, karakterisert ved at den omfatter:

kompleksbinding av det genetiske materiale med en første dendrittisk polymer ved reagering med polymeren med det genetiske materiale i et egnet løsningsmiddel ved en temperatur som letter assosiasjonen av det genetiske materiale med polymeren;

og plassering av nevnte kompleks i en løsning inneholdende en andre dendrittisk polymer, idet nevnte andre dendrittiske polymer er større enn nevnte første dendrittiske polymer.

54. Fremgangsmåte ifølge krav 53, k a r a k t e r i s e r t v e d at den innbefatter kobling av en målsøkende rettledende forbindelse til nevnte dendrittiske polymer før kompleksbinding til denne med det genetiske materiale.

55. Fremgangsmåte ifølge krav 53 eller 54, hvori nevnte dendrittiske polymer hovedsakelig har en kationisk overflate, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte fremgangsmåte omfatter elektrostatisk kobling av nevnte genetiske materiale til nevnte dendrittiske polymer.

56. Fremgangsmåte for å danne et genetisk materiale:dendritisk polymerkompleks, ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:

blanding i vann, tilstrekkelig genetisk materiale for å tilveiebringe en slutt-konsentrasjon på 1 til 10 μg pr. ml, med tilstrekkelig dendrittisk polymer, som har positiv overflatefunksjonalitet, for å tilveiebringe et gentisk materiale:dendrittisk polymerladningsforhold fra 1:1 til 1:100;

57. Fremgangsmåte ifølge krav 56, k a r a k t e r i s e r t v e d at den innbefatter tilsetning av tilstrekkelig DEAE-dekstran til nevnte kompleks etter at det er dannet, for å tilveiebringe en DEAE-dekstran-konsentrasjon fra 0,125 til 2 μM.

58. Fremgangsmåte ifølge krav 56, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte ladnings-forhold er 1:1 til 1:15.

59. Fremgangsmåte ifølge krav 58, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte ladningsforhold er 1:5 til 1:10.

60. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 56-59, k a r a k t e r i s e r t v e d at tilstrekkelig DEAE-dekstran blir tilsatt til å tilveiebringe en DEAE-dekstran-konsentrasjon fra 0,25 til 1 μM.

61. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 56-60, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte dendrittiske polymer har en diameter fra 50Å med dets snevreste diameter, til en maksimal diameter på 1.000Å.

62. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 56-61, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte dendrittiske polymer består av en dispersjon av dendrimerpartikler med forskjellige størrelser, variererende fra partikler som har en diameter så liten som 20Å ved deres smaleste dimensjon til partikler som har en diameter på 110Å, idet det er andre partikler med mellomliggende diametere i nevnte dispersjon.

63. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 56-61, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte dendrittiske polymer omfatter aggregater av dendrimerer med positiv overflatefunksjonalitet og dendrimerer som har negativ overflatefunksjonalitet i et positivt:negativt-ladningsforhold fra 25:1 til 100:1, idet nevnte aggregater har diametere som ikke er mer enn 1.000Å.

64. Fremgangsmåte ifølge krav 56, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte dendrittiske polymer omfatter en tett stjernepolymer med aminosyrer over en vesentlig del av dets overflate, og vesentlig kun på dets overflate.

65. Fremgangsmåte ifølge krav 64, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte aminosyre er lysin eller arginin.

66. Fremgangsmåte ifølge krav 56, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte dendrittiske polymer omfatter relativt små dendrimerpartikler som har en diameter på 22-50Å i deres minste dimensjon;

nevnte fremgangsmåte omfatter videre tilsetning av dendrittiske polymerer hvor partiklene har diametere fra 50 til 110Å i deres minste dimensjon, etter at nevnte kompleks er dannet.

67. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 56-66, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte dendrittiske polymerpartikler innbefatter mål-søkende rettledende forbindelsesgrupper koblet dertil.

68. Fremgangsmåte ifølge kravene 56-59, k a r a k t e r i s e r t v e d at den innbefatter tilsetning av tilstrekkelig glycerol til nevnte kompleks etter at det er dannet, for å tilveiebringe en glycerolkonsentrasjon fra 2 til10 vekt%.

69. Fremgangsmåte ifølge krav 68, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte glycerolkonsentrasjon er fra 2 til 5 vekt%.

70. Fremgangsmåte ifølge krav 68, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte ladningsforhold er fra 1:1 til 1:15.

71. Fremgangsmåte ifølge krav 67, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte dendrittiske polymer har en diameter fra omtrent 50Å ved dets smaleste diameter, til en maksimal diameter på omtrent 1.000Å.

72. Fremgangsmåte for å danne et konsentrert genetisk materiale:dendrittisk polymerkompleks ifølge krav 1 som kan fortynnes for bruk, k a r a k t e r i s e r t v e d den omfatter

blanding i vann, tilstrekkelig genetisk materiale for å tilveiebringe en konsentrasjon fra 1 til 10 μg pr. 20 μl, med tilstrekkelig dendrittisk polymer, med positiv overflatefunksjonalitet, for å tilveiebringe et genetisk materiale:dendrittisk polymer-ladningsforhold fra 1:1 til 1:100;

nevnte blanding utføres ved en pH fra 5 til 10 og ved en temperatur fra 20 til 40°C.

73. Fremgangsmåte ifølge krav 72, karakterisert ved at nevnte ladningsforhold er fra 1:1 til 1:15.

74. Fremgangsmåte ifølge krav 73, karakterisert ved at nevnte ladningsforhold er 1:5 til 1:10.

75. Fremgangsmåte ifølge krav 72, karakterisert ved at nevnte dendrittiske polymer har en diameter fra omtrent 50Å ved dets snevreste diameter, til en maksimal diameter på omtrent 1.000Å.

76. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 72-75, karakterisert ved at nevnte dendrittiske polymer består av en dispersjon av dendrimerpartikler i forskjellige størrelsee, variererende fra partikler som har en diameter så er så liten som omtrent 20Å ved deres snaleste dimensjon, til partikler som har en diameter på omtrent 110Å, idet det er andre partikler med mellomliggende diametere i nevnte dispersjon.

77. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 72-74, karakterisert ved at nevnte dendrittiske polymer omfatter aggregater av dendrimerer som har positiv overflatefunksjonalitet og dendrimerer med negativ overflatefunksjonalitet med et positivt:negativt ladningsforhold fra 25:1 til 100:1, idet nevnte aggregater har diametere som ikke er mer enn omtrent 1.000Å.

78. Fremgangsmåte ifølge krav 76, karakterisert ved at nevnte dendrittiske polymer omfatter en tett stjernepolymer som har aminosyrer over en vesentlig del av dets overflate, og vesentlig kun på dets overflate.

79. Fremgangsmåte ifølge krav 78, karakterisert ved at nevnte aminosyre er lysin eller arginin.

80. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 72-74, karakterisert ved at nevnte dendrittiske polymerpartikler innbefatter mål-søkende rettledende forbindelsesgrupper koblet dertil.

81. Fremgangsmåte ifølge krav 80, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte dendrittiske polymer omfatter relativt små dendrimerpartikler som har en diameter på 22 til 50Å ved deres minste dimensjon;

idet nevnte fremgangsmåte videre innbefatter tilsetning av dendrittiske polymerer hvor partiklene har diametere fra 50 til 110Å i deres minste dimensjon, etter at nevnte kompleks er dannet.