

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-530192

(P2017-530192A)

(43) 公表日 平成29年10月12日(2017. 10. 12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 D 207/16 (2006.01)	C O 7 D 207/16 C S P	4 C O 5 O
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	4 C O 6 9
C O 7 D 257/02 (2006.01)	C O 7 D 257/02	4 C O 8 5
C O 7 D 487/08 (2006.01)	C O 7 D 487/08	4 H O O 6
C O 7 C 229/12 (2006.01)	C O 7 C 229/12	4 J O 4 3
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-533730 (P2017-533730)
 (86) (22) 出願日 平成27年9月14日 (2015. 9. 14)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年4月6日 (2017. 4. 6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/050062
 (87) 国際公開番号 W02016/040962
 (87) 国際公開日 平成28年3月17日 (2016. 3. 17)
 (31) 優先権主張番号 62/050, 164
 (32) 優先日 平成26年9月14日 (2014. 9. 14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 517087945
 ナノシンソンス リミティド ライアビリ
 ティ カンパニー
 アメリカ合衆国, ミシガン 48858,
 マウント プレザント, ノース フランチ
 ャー アベニュー 1200
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ピロリドン誘導体、オリゴマー及びポリマー

(57) 【要約】

単純な有機構造、有機／無機ポリマー、及び他の基質が創造されており、それらの全ては少なくとも1つの存在するピロリドン部分を有し、そして低毒性、低補体活性特性を示すことが見出されており、そして注射可能組成物として使用される場合、薬物結合体についてのインビボ残留時間を増強しながら、それらの結合体とのタンパク質相互作用を低めるために使用され得；従って、それらの化合物はまた、PEG化におけるPEGに代わる置換体として使用され得る。驚くべきことには、それらの化合物はまた、現在、従来の光化学及び蛍光パラダイムにより説明され得ない、独特の固有蛍光 (IF) 又は非従来の蛍光 (NTF) 特性も示す。それらの化合物は、細胞イメージング、遺伝子トランスフェクション、生物診断薬、バイオセンシング、蛍光指向性外科的切除、薬物送達、法医学、環境診断、鉱物／宝石の特徴づけ、偽造品検出、液体／水流に関するトレーサー研究、油田の改良及び診断、光退色の防止、及びLEDディスプレイの強化、等において種々の用途を有する。

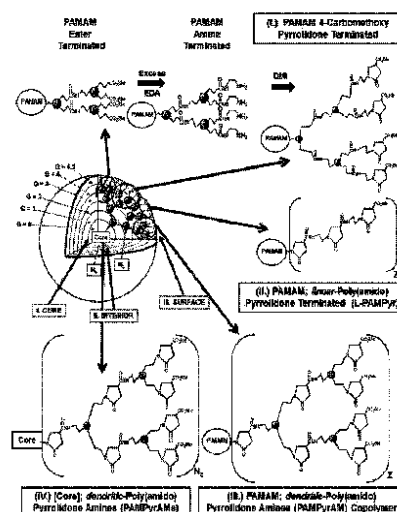


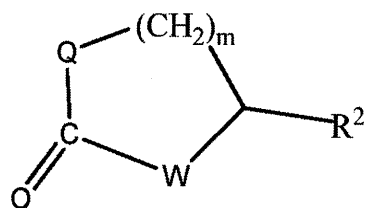
Figure 10

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式：

【化 1】



式 (I)

10

【式中、

Q は、示されるように環に窒素を導入するために反応する第一級アミンを有する任意の実体であり；

W は、N、O、S 又は $(CH_2)_n$ であり、ここで n は 0 又は 1 であり；

R^2 は、 $-C(O)OH$ ； $-C(O)O(C_1 - C_4 \text{ アルキル})$ ； $-C(O)-NH$
 R^5 （ここで、 R^5 は、 $C_1 - C_4$ アルキル、又はポリマー上の部分であり得るアミド基である）であり；そして

20

m は、1 ~ 4 である。]

で表される、蛍光性環状アミド、環状尿素、環状ウレタン及び環状アミノアミド又はアミド尿素化合物（但し、前記式 (I) の化合物は、存在するそのような環状アミド、尿素、ウレタン又は環状アミド実体を有さない QH_2 であるその基本化合物の値の少なくとも 10 倍、蛍光する）。

【請求項 2】

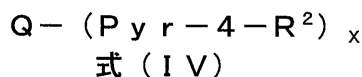
その発光が、400 - 850 nm の可視近赤外領域にある、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

下記式：

【化 2】

30



【式中、

Q は、式 (IV) の化合物中に窒素原子を導入するために反応する少なくとも 1 つの第一級アミンを有し、そしてピロリドン部分の一部になる任意の実体であり；

x は、1 ~ Q に存在する第一窒素の総数であり；

R^2 は、 $-C(O)OH$ ； $-C(O)O(C_1 - C_4 \text{ アルキル})$ ； $-C(O)-NH$
 R^5 （ここで、 R^5 は、 $C_1 - C_4$ アルキル、又はポリマー上の部分であり得るアミド基である）であり；そして

40

但し、総ピロリドン部分は、100 kDa 以下の分子量を有し、そして式 (IV) の化合物は 15 nm 以下である。]

で表される化合物。

【請求項 4】

インビボ生物学的注入及びイメージング用途のために適切である、固有蛍光 (IF)、低毒性及び低補体活性化性質を示す、式 (IV) の MW 調節されたピロリドン部分含有の式 (IV) のポリマー組成物である、請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 5】

50

前記化合物が細胞に対して非免疫原性である、請求項 1 又は 4 に記載の化合物。

【請求項 6】

R^2 が、 $-C(O)O(C_1 - C_4 \text{ アルキル})$ 又は $-C(O)OH$ である、請求項 1 又は 3 に記載の化合物。

【請求項 7】

W が $(CH_2)_n$ (ここで、 n は 1 であり) ; そして m は 1 である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 8】

Q が、アミン末端樹枝状ポリマー又はアミン末端デンドロンである、請求項 1 又は 3 に記載の化合物。

10

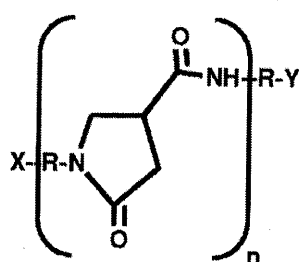
【請求項 9】

Q が、 $(C_1 - C_{20} \text{ アルキル})$ アミン、 $(C_1 - C_{20} \text{ ヒドロキシアルキル})$ アミン、 $(C_1 - C_{20} \text{ アルキルエーテル})$ アミン、 $C_6 - C_{14}$ アリール又は $(C_6 - C_{14} \text{ アリール } C_1 - C_4 \text{ アルキル})$ アミンである、請求項 1 又は 3 に記載の化合物。

【請求項 10】

下記式 (III) :

【化 3】



20

式 (III)

[式中、

30

R は、 $C_1 - C_{18}$ アルキル、 $C_6 - C_{12}$ アリール、 $C_6 - C_{12}$ アリーレン、 $(C_1 - C_{12} \text{ アルキル}) C_6 - C_{12}$ アリーレンであり ; そして

X = Y は独立に、H、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-SH$ 、 $-CO_2H$ 、アルキン、アジド (すなわち、クリック試薬)、又は任意の適切な反応性部分 / 誘導体であり、それらは所望の / 標的化された基質、例えばペプチド、タンパク質、抗体、酵素、ポリ核酸、薬物、ナノ粒子、微粒子、リポソーム、ミセル、デンドリマー、デンドロン、デンドリマーソーム (dendrimersomes)、医薬品、又は他の生物学的実体又はそれらのフラグメントへのピロリジン化試薬を結合するために必要とされる。]

を有する、活性化されたピロリジノン化試薬が製造される、請求項 1 又は 3 に記載の化合物。

40

【請求項 11】

$-CO_2H$ の医薬的に許容できる塩及びエステルがまた含まれる、請求項 1、4 及び 10 に記載の化合物。

【請求項 12】

蛍光により種々のシステム、試験、植物又は動物及びヒトにおける部分及び流体を追跡し、そして請求項 1 に記載の式 (I) の化合物を用いて蛍光により前記部分の位置をモニターするか、又は検出するための方法。

【請求項 13】

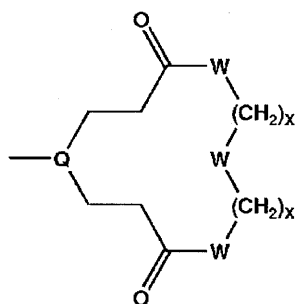
請求項 4 又は 10 に記載の化合物を、PEG 化において PEG の代わりに使用する方法。

50

【請求項 14】

下記式：

【化 4】



式 (II)

10

〔式中、

Q 及び W は、請求項 1 の式 (I) におけるように定義され；そして x は 2 又は 3 である

〕

の 4 ～ 14 の成分を有する蛍光大環状アミド。

20

【請求項 15】

蛍光により種々のシステム、試験、植物又は動物及びヒトにおける部分及び流体を追跡し、そして請求項 14 に記載の式 (II) の化合物を用いて蛍光により前記部分の位置をモニターするか、又は検出するための方法。

【請求項 16】

請求項 3 に記載の式 (IV) の化合物の調製方法であって、請求項 3 に記載の Q と、任意にはメタノール中、ITA、ITE、又はDMI の試薬とを、種々の第一級アミン部分と試薬との間の所望の化学量論比で、反応させ、ここで得られる式 (IV) の化合物は、ピロリドン部分の 100 kDa 以下、好ましくは 50 kDa 以下の全分子量を有し、そして式 (IV) の化合物のサイズが 15 nm 以下、好ましくは 10 nm 以下である、方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は一般的に、ポリ(エチレングリコール)(PEG)を用いて得たものと同様に、生物学的材料のマスキング剤として、ポリ(ビニルピロリドン)(PVP)の誘導体/類似体、すなわちポリ(ピロリドン)大環系、オリゴマー及び低分子量ポリマーの使用に関する。さらに、小分子ピロリドン中間体(すなわち、モノマー前駆体)、及びそれらの誘導体から得られた新規なポリ(ピロリドン)オリゴマー/ポリマーは、従来の光化学及び蛍光パラダイムにより説明され得ない独特な固有蛍光(IV)又は非従来の蛍光(NTF)特性を示す。それらの化合物、すなわちオリゴマー及びポリマーは、生物学的用途、細胞イメージング、遺伝子トランスフェクション、バイオセンシング、蛍光指向性外科的切除、薬物送達、法医学、鉱物/宝石の特徴付け、油田増強及び診断、偽造製品検出、流体/水流に関連するトレーサー研究、蛍光増白剤及びLEDディスプレイの改良などのための薬物のマスキングに種々の用途を有する。

40

【背景技術】

【0002】

関連技術の説明

PEG 化

PEG 化の一般的な概念は、血液循環時間、薬物溶解性及び治療の PK / PD を促進すると共に、治療薬物/タンパク質の毒性、免疫原性及びタンパク質分解を低める戦略とし

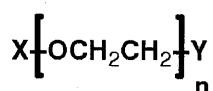
50

て、1970年代、F. Davisなど（米国特許第4,179,337号（1979））により、最初に導入され、そして特許された。その戦略は、所望する治療薬物又は基質へのポリ（エチレングリコール）オリゴマー（すなわち、DP = 4 - 50）の共有結合を包含する。PEG化戦略は、次のものを包含する十数種の重要な薬物にわたって起動するための基礎を提供して来た：いくつか言及すると、癌治療に関しては、Ortho/Schering-Plough (2001)によるDixil / Caelyx（商標）、多発性硬化症に関しては、Biogen（2014）によるPlegridy（商標）、癌関連薬物に関しては、AstraZeneca（2014）によるMovantik（商標）、貧血に関してはAffmax Takeda Pharma, (2012)によるPeginesatide（商標）。この戦略は、いわゆる、下記に記載されるような「活性化されたPEG試薬」を用いての低分子量PEGオリゴマー（すなわち、< 50 - 70 KDa）の共有結合を包含する：

10

【0003】

【化1】



【0004】

ここで、X及びYは、独立に、改変される所望のタンパク質、ポリヌクレオチド又は治療薬が有する官能基と反応性であるか、又は非反応性であり得；nは4 - 50である。

20

【0005】

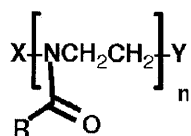
POX化

PEGオリゴマーの化学的性質（すなわち、酸化的、酵素的安定性又は慢性的使用による免疫原性問題及びより高いMW画分による）に関連する多くの欠点のために（G.T. Hermanson, Chapter 18 in Bioconjugate Techniques, Second Ed., (2008) 707-742）、代替りのポリマー型及び組成物について積極的に探究して来た。これは、PEGの代替物としてのポリ（オキサゾリン）の有用性及び潜在的利点を記載する、Zalipsky et al. (S. Zalipsky, et al., J. Pharm. Sci., (1996), 85, 133-137を参照のこと)による初期報告につながった。つい最近では、研究者は、ポリ（オキサゾリン）（F. M. Veronese, et al., Bioconjugate Chem., (2011), 22, 976-986）、及びSerina Therapeutics (www.serina-therapeutics.com) によるパーキンソン病の治療のためにロチゴチン（すなわち、ドーパミンアゴニスト）のPOX化結合の使用に焦点を当てて来た。従って、それらのPOX化プロトコルは、下記のようなそれらの治療薬物／タンパク質への結合のための「活性化されたPOX試薬」の使用を包含する：

30

【0006】

【化2】



40

【0007】

ここで、X及びYは、独立に、改変される所望のタンパク質、ポリヌクレオチド又は治療薬が有する官能基と反応性であるか、又は非反応性であり得；nは4 - 50である。

【0008】

ヒトへの注射可能合成ポリマーとしてのポリ（ビニルピロリドン）（PVP）の従来の使用

50

従来、ヒトにおける内部注射のために使用される、最も広範囲に研究され／文書化されたポリマー組成物は、ポリ（ビニルピロリドン）（PVP）であった。75年以上の間、1930年代、後期におけるその発見以来、このポリマーは、非常に好結果をもたらす代用血液／増量剤として使用のために有害な毒性、免疫原性又は他の負の効果を事実上伴わないで、50万人以上のヒト患者に注入されて来た（Sultana, et al., J. Pakistan Med. Association, (1978), 28 (10), 147-153）。この合成ポリマー組成物を注射剤として使用するより広範囲で且つ現代的なヒト使用は、より高分子量のポリマー画分（すなわち $> 70 \text{ KDa}$ ）が腎臓を通して適切に排泄されず、そして複数回の注射でインビボで長時間にわたって蓄積され得る。この仮説は、いくつかの十分に文書化された医薬研究により確認されているように思える（Wang et al., J. Cutan Pathol., 2006, 33, 454-457）。創造される特定の医学的状態は、PVP蓄積疾患又はDupont-Lachapella疾患として言及される。この医学的状態は、現在入手できるポリ（ピロリドン）製品中に存在する、非排泄性の高分子量PVP画分に起因すると広く認識されている。この医学的状態は致命的ではないが、より高分子量PVP画分は除去するのには不可能ではないが、困難であることが判明しているので、PVPにとって負の特徴であると考えられ（Pfaffmann et al., 米国特許第6,080,397号, 2000）、そして将来の使用のために重要な科学的解決策又は代用物を必要とするであろう。

10

【0009】

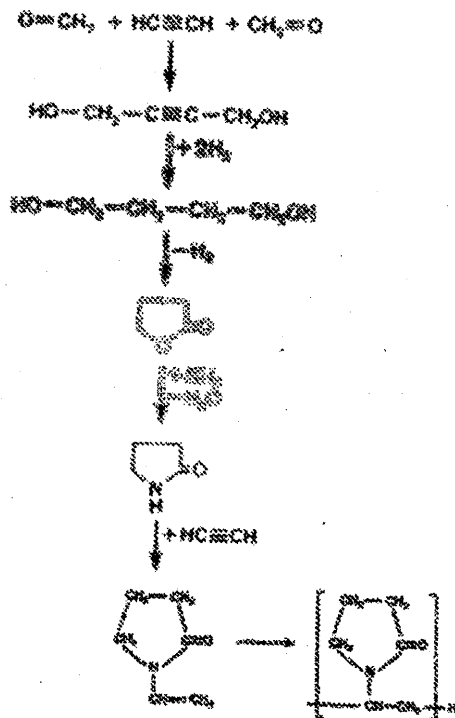
現在、PVPポリマーは、種々の製造業者、例えばBASFにより多量に商業的に製造されている。PVP製造は、N-ビニルピロリドンモノマー（N-VP）のフリーラジカル重合を包含する。N-VPポリマーは、高圧下で、アセチレン、ホルムアルデヒド及びアンモニアの組み合わせを含むオリジナルRepe工程により得られる（下記スキーム1を参照のこと）。

20

【0010】

スキーム 1

【化3】



30

40

【0011】

（N-VP）モノマーは、フリーラジカル触媒（すなわち、過氧化物、過流酸塩）のみ

50

で、バルク、溶液又は懸濁液中で都合良く重合され、 $2500 - 1,000,000$ Da の範囲の重量平均モル質量を有する線状 PVP が得られる (Haaf et al. Polymer Journal, 1985, 17(1), 143-152 を参照のこと)。それらの線状 PVP ポリマーは一般的に、高いポリ分散化された生成物として得られ、そして M_w 、 M_n 及び K (ここで、 $M_w = 15K^2/3$ 及び $M_n = 24K^2$) の関係を用いて、Kern and Cherdron (Kern et al., Houben Weyl, Methoden der Organische Chemie, Vol. 14, 4th ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1961, p.1106) により開発された「Fikentscher K 値分子量関係」に従って、溶液でのそれらの粘度を測定することにより特徴づけられた。適切な数の文字 K を用いて、種々の PVP 分子量画分についての分子量に関連付けた。例えば、 $K - 12$ は、約 $20,000$ Da の平均分子量を有し、そして $K - 90$ は、約 $1M$ Da の分子量を有する。従って、特定された K 値及び平均分子量を有する PVP は、ある範囲の分子サイズから成る。それらの粘度特徴化プロトコルに基づいて、明確に定義された分子量範囲のみでは、PVP のための十分に規定された制御可能な分子量は現在、存在しないことは明らかである。ナノスケールのサイズに関連する PVP ポリマー分子量の制御は、多くのナノ医学用途にとって重要な問題であり、ここでナノスケールサイズは、排泄モード、生体分布、毒物学及び補体活性化特性を決定することが知られている (例えば、Kannan et al., J. Intern. Med. 2014, 276, 579-617 を参照のこと)。

10

20

30

40

50

【0012】

PVP に見られるようなポリリドン部分 (すなわち、ポリリドン、BASF の商標) は、多種多様な医学的用途のための多目的の非毒性、生体適合性、生理学的に不活性な材料としての優れた記録及び普遍的な認識を享受する (Haaf et al., Polymer Journal, 1985, 17(1), 143-152 を参照のこと)。第 1 に、血漿増量剤としての PVP の広範なインビボ使用が存在し (Sultana, et al., J. Pakistan Med. Association, 1978, 25, 28, (10), 147-153 を参照のこと); ここで、それは、間違いなく無数の命を救って来た。第二次世界大戦中に (すなわち、I. G. により開始され; 現在、BASF によるピロリドン)、及びその後の年 (朝鮮戦争) <http://hcvets.com/data/military/korea.htm>; page 44] (スウェーデンでは、ペリストンと呼ばれる)、有害な効果の何れの重大な証拠もなしに (Ravin et al., New England J. of Med., 1952, 247, 921-929)、PVP が血液増量剤として、50 万以上のヒト受容体に注射により内部的に使用されて来たことが実証されている (Sultana, et al., J. Pakistan Med. Association, 1978, 28, (10), 30, 147-153)。放射性研究は、注射された PVP (すなわち、ペリストン) の 95 - 100 % が、72 時間以内に尿を通して排泄され; その 40 % が 20 分以内に排泄され; そして 6 時間以内に、実質的にすべての循環 PVP は、血漿から消失したことを示した。続く研究は、(PVP) 組成物が、他の合成 (すなわち、ポリエステル / ポリアルコール) 又は生物学的ポリマー (すなわち、ポリ (デキストラン) 又は多糖類) に比較して、抗原特性を実質的に示さないことを示した (Maurer et al., J. Immunology, 1956, 77(2), 105-110)。

【0013】

現在、(PVP) は、体外受精プロトコルのために精子を固定化するためのアジュバントとして使用されている (www.coopersurgical.com)。他の例は、化粧品 (例えば、ヘアスプレー) が点眼剤及び経口ピル結合剤に及び用途における PVP の使用を包含する。ポリ (アミドアミン) (PAMAM) デンドリマーの表面上に提示される場合、タンパク質とポリ (ピロリドン) 部分との低毒性及び最小相互作用の最近の確認が報告されている (Ciolkowski et al., Nanomedicine, NBM, 2012, 8, 815-817; 及び Janaszewska et al., Nanomedicine, NBM, 2013, 9, 461-464)。

【0014】

このように、 $3 - 14$ KD の範囲で PVP 分子量を合成 / 制御することが極めて重要である (Pfaffmann et al., U.S. Patent 6,080,397, 2000)。これは、より高い MW PVP 画分のインビボ蓄積を回避し、そしてインビボ適用のための注射用製品として許容できるためには必要である。不運には、PVP ポリマーを製造するために N - ビニルピロリドンを増大するための全ての既知重合機構 (すなわち、フリーラジカル、アニオン、カチオ

ン型)は、実質的な量の制御されていない高分子量(すなわち、 $> 14 \text{ kDa}$)をもたらす。PVP製品、並びに、それらの材料を、インビボ又は注射可能な製品用途のために許容できなくする重合複製品が挙げられる。より特定には、高分子量画分(すなわち、 $> 14 \text{ kDa}$)を含むPVPが静脈内投与される場合、そのポリマーのインビボ蓄積が生じ、これは、「PVP貯蔵疾患」と呼ばれるか、又はDupont-Lachapelle疾患(Wang et al., J. Cutan Pathol., 2006, 33, 454-457)としても知られている。この疾患は、皮膚病、リウマチ性関節痛、及び肺呼吸不全を包含する症状により特徴づけられる。他方では、 $< 14 \text{ kDa}$ の分子量及び17以下のK値を有する低分子量PVPは、非アレルギー性であることが見出され、そして腎臓を通して血流からの排泄により未変化のまま、すばやく除去される。しかしながら、フリーラジカル重合及び続く限外濾過により低MWのPVPを独占的に製造するすべての試みは失敗した(Pfaffmann et al., 米国特許第6,080,397号, 2000;www.rloginconsulting.com/... pyrrolidone%20backbone%20polymers.pdf)。

10

【0015】

蛍光の論議

基底状態(S_0)での原子、分子、ポリマー又はナノ構造体の軌道電子が、何れかの形のエネルギー(すなわち、通常、光子、 $h\nu_{ex}$)の吸収により高い量子状態(S_1)に励起され、そして次に、基底状態に戻る場合に蛍光が発生する(図1を参照のこと)。この二段階工程は次の通りに記載される:

1. 励起: (S_0) + $h\nu_{ex}$ (S_1)

2. 蛍光(発光): (S_1) (S_0) + $h\nu_{em}$ + 熱

20

【0016】

基底状態へのこの緩和又はリターン[すなわち、(S_1) (S_0)]は、蛍光と呼ばれる、光の底エネルギー光子の放出($h\nu_{em}$)を伴う(図1を参考のこと)。(The Molecular Probes Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 2010, 11th Ed.)。

【0017】

(S_1)状態でのフルオロフォアは、放射放出(すなわち、蛍光)、非放射イベント(すなわち、熱)、又は $10^{-10} \sim 10^{-9}$ 秒の程度の時間スケールで非蛍光トリプレット励起状態(T_1)への内部システム間転換(IC)(すなわち、システム間クロスオーバー(ISC))を包含する緩和経路を介して基底状態(S_0)に戻ることができる。

30

【0018】

それらの(T_1)種は、分子酸素に対して非常に敏感であり、そしてレドックス反応を受け、高反応性スーパーオキシドラジカル(ROS)及び「光退色」と呼ばれる不可逆的なフルオロフォア損傷を導く(Q. Zheng, et al., Chem. Soc. Rev., 2014, 43, 1044-1056)。それらの高反応性酸素種(ROS)は、フルオロフォア分解を引き起こすか、又は近くの生体分子と反応することにより光毒性を引き起こすことがあり、そして実際、ナノ医薬に用いられるいわゆる光力学療法(photodynamic therapy)の中心である。

【0019】

励起に続く振動緩和のために、(S_1)から放出される光子エネルギーは一般的に、励起光子よりも低いであろう。これは、励起波長よりも5 - 50 nm高い範囲である蛍光発光波長の増加をもたらす。励起波長と発光波長との間の差異は、ストークスシフト(Stokes shift)と呼ばれる(N.J. Turro et al., Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules, 2010 University Science Books, The Molecular Probes Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 2010, 11th Ed.)。

40

【0020】

蛍光イメージング技法は、生命科学及び臨床研究に広い用途を有する。しかしながら、それらの技法は、明るく且つ光安定性の蛍光プローブに決定的に依存している。生物学的イメージングのための現在入手できる蛍光プローブは主に、有機フルオロフォア(Terai and Nagano, Pflugers Archiv. European J. Physiology, 2013, 465, 347-359)及び量子ドット(Chen et al., Trends Analytical Chemistry, 2014, 58, 120-129)を含む。

50

小さな有機色素は、いくつかの所望しない特性、例えば難溶性、所望の細胞区画を標的化する問題、急速な不可逆的光退色及び細胞漏出に悩まされている。無機ナノコンジュゲート、例えば量子ドットは、例外的に明るく、光安定性であり、そして狭い発光スペクトルにより特徴づけられるが、しかしそれらは重要な欠点を有する。まず第1に、それらは毒性であり、そしてインビボでのその適用を制限している。さらに、それらの細胞内送達は、いくつかの生物学的工程に従うことを困難にする問題を引き起こす (Jamieson et al., Biomaterials, 2007; 28, 4717-4732)。

【0021】

生物学的及びナノ医薬の分野における蛍光は、細胞イメージング、バイオセンシング、蛍光指向性外科的切除 (R. Tsien et al., Proc. of the National Acad. of Sci., 2010, 107, 4317-4322)、及び薬物送達 (S. Lo, et al., Mol. Pharmaceutics, 2013, 10, 793-812; R. Tsien et al., Proc. of the National Acad. of Sci. 2010, 107, 4311-4316) へのそれらの広い適用のために、主な研究焦点となって来た。

10

【0022】

生物学/医学用途以外の蛍光の用途は、次のものを包含するが、但しそれらだけに限定されない：法医学 (M.Y. Berezin et al., Chem. Reviews, 2010, 110, 2641-2684)；油田の強化及び診断 (M. Amanullah, 2013, SPE164162)；偽造品の検出 (2014年5月27日に発行された米国特許第8,735,852号；Y. Zhang et al., Dyes Pigm., 2008, 77, 545)；流体/水流に関するトレーサー研究 (国際公開第2011/030313号, A method for detecting an analyte, Indian Inst. of Science, March 17, 2011)；蛍光増白剤；及びLEDディスプレイの強化 (米国特許出願第20140035960号, Apple Inc.) 及び他のもの。

20

【0023】

従来の標準蛍光剤は通常、次の3つの主要カテゴリーのメンバーであると記載されている：

【0024】

カテゴリーIは、低分子量 (< 1000 da) の小分子を含む有機芳香族結合ポリマーであり、そしてそれらの結合された有機芳香族構造から誘導される。

【0025】

カテゴリーIIは、通常、1又は2以上の3種のキー芳香族部分、例えばトリプトファン、チロシン及び/又はフェニルアラニンを含む蛍光タンパク質から成る。

30

【0026】

カテゴリーIIIは、カドニウム又は鉛カルコゲナイド、例えばポーア励起子又は半径 (2 - 50 nm) よりも小さなサイズを有しなければならない重金属硫化物又はセレニドから誘導される無機ナノ粒子から成る。それらの蛍光は、それらのサイズにより決定されるが、しかし光退色の弱点を示さない。

【0027】

各従来のフルオロフォアカテゴリーの弱点は、次の通りである：カテゴリーI：光退色と呼ばれる急速なフルオロフォア分解に導く酸素の存在下での堅牢性の欠如、及び細胞損傷及び可能性ある発癌性を引き起こすことができる活性酸素種 (ROS) の生成に起因する光毒性；カテゴリーII：変性し、光退色と呼ばれる急速分解を導く酸素の存在下で堅牢性を欠き、免疫原性を示すタンパク質；カテゴリーIII：量子ドットは、重金属毒性、蛍光点滅、インビボ適用のための溶解性の欠如を示し、サイズはナノメートルで且つ正確なサイズ (2 - 50 nm) でなければならない。

40

【0028】

他方では、本発明の重要成分であるピロリドン部分は、多種多様な医療用途のための多目的性で非毒性の生体適合性材料としての卓越した記録的及び国際的認識を有する。最も重要なことは、インビボ血液増量剤としてのポリ (ビニルピロリドン) (PVP) の広範な使用であった (Polyvinyl Pyrrolidone as a Plasma Expander -Studies on Its Excretion, Distribution and Metabolism, Herbert A. Ravin, Arnold M. Seligman, M.D., a

50

nd Jacob Fine, M.D.)。第二次世界大戦以来、それは、有害な影響の証拠なしに、50万人以上のヒト受容体に使用されて来た (H.A. Ravin, N. Engl. J. Med., 1952, 247, 921-929)。

【0029】

別の特徴においては、樹枝状ポリマーが当核技術分野において公知であり、そしてDENDRIMERS, DENDRONS, AND DENDRITIC POLYMERS, Tomalia, D.A., Christensen, J.B. and Boas, U. (2012) Cambridge University Press, New York, N.Y.に広範に論じられている。樹枝状ポリマーは、第4のごく最近報告されたポリマー構造の主要クラスとして認識されている (J. Polym. Science, Part A: Polym. Chem. 2002, 40, 2719-2728)。

【0030】

デンドリマーの3つの主要構成成分、すなわちコア、内部組成物、及びそれらの表面化学が容易に修飾され得る。現在、多数の多様なコア、ほぼ100の異なった内部組成物及び1000以上の異なった表面部分がデンドリマーについて報告されている [例えば、DENDRIMERS, DENDRONS, AND DENDRITIC POLYMERS, Tomalia, D.A., Christensen, J.B. and Boas, U. (2012) Cambridge University Press, New York, N.Y.]。多くの場合、デンドリマー表面の修飾は、新しい出現特性を変更し、増強し、又は得るために、例えば従来のフルオロフォア、例えばフルオロセイン、ローダミンレッド又はシアニン色素を包含する、薬物、標的化又はイメージング剤の結合のために、デンドリマー毒性を修飾し/低めるために、増強された溶解性を得るために、デンドリマータンパク質相互作用/免疫原性 (すなわち、デンドリマーステルス) を低めるために、行われて来た。それらの表面化学増強デンドリマー特性の多くは、種々の生命科学及びナノ医薬用途において非常に貴重であることが示されて来た (例えば、米国特許第5,527,524号)。

【0031】

2001年初期、ポリ(アミノアミン)(PAMAM)デンドリマーが、何れか既知の従来の蛍光パラダイムにより機械的に説明され得なかった固有の蛍光特性を示すために、Tucker et al., (S. Tucker et al., Applied Spectroscopy, 2001, 55, 679-683)により報告されている。デンドリマーに観察される、この新規の非従来の蛍光(NTF)は一般的に、250-400nm間に励起放射線を必要として、続いて可視領域から近赤外領域 (すなわち、400-750nm) に及ぶ特徴的な発光バンドを生成するために、基底状態に緩和する。

【0032】

この初期報告以来、NTF現象は、広範囲の異なったデンドリマーファミリー (すなわち、内部組成物) に観察されており、これらのすべては共通して1つのものを有するように見え、すなわちそれらはそれらの内部骨格組成に多数の第三級アミン(3°-アミン)及び/又はアミドを有する。デンドリマー末端/表面官能基は(NTF)に有意に影響を与えないようであることは注目すべきであり; しかしながら、デンドリマー生成レベル(G. Jayamurugan et al., Org. Lett., 2008, 10, 9-12)、デンドリマー凝集度(P.K. Antharjanam et al., J. Photochemistry & Photobiology A: Chem., 2009, 203, 50-55)、溶剤粘度(P.K. Antharjanam et al., J. Photochemistry & Photobiology A: Chem., 2009, 203, 50-55)、低pH's (T. Imae et al., J. Am. Chem. Soc., 2004, 126, 13204-13205; L. Pastor-Perez et al., Macromol Rapid Commun., 2007, 28, 1404-1409; Y. Wang et al., J. Nanosci. Nanotechnol., 2010, 10, 4227-4233; Y. Shen et al., Chem. Eur. J., 2011, 17, 5319-5326)、エージング(D. Wang et al., J. Colloid & Interface Science, 2007, 306, 222-227)、空気又は酸化剤への暴露(A.J. Bard et al., J. Am. Chem. Soc., 2004, 126, 8358-8359; T. Imae et al., Colloids & Surfaces B: Biointerfaces, 2011, 83, 58-60)、及びさらにいくつかの他のものは、蛍光強度の増強を引起した。初期のより秩序のある、単分散性のデンドリマーの例に加えて、(NTF)現象は続いて、以下を含むいくつかの他の主要高分子構造において観察された: (a) ランダムに超分岐されたポリマー構造 (Y. Chen et al., Bioconjugate Chem., 2011, 22, 1162-1170)、(b) 直鎖状態ポリマー構造 (L. Pastor-Perez et al., Macromol Rapid Commun., 2007

、28、1404-1409）、及び（c）特定の単純分岐ポリマー構造（S.-W. Kuo et al., J. of Nanomaterials, 2012, 749732, 10 Pages）。生物学的細胞又は標識をイメージングするためのそれらのユニークデンドリマー（NTF）特性を利用する多くの試みにも関わらず、低（NTF）蛍光発光強度は一般的に、特定の用途、例えば遺伝子トランスフェクションのための適切な発光強度を得るために、特定の酸化試薬／環境の存在下で又は低pH（すなわち、2 - 3）を除いて、実用的な使用を妨げている（Y. Chen et al., Bioconjugate Chem., 2011, 22, 1162-1170）。

【0033】

デンドリマー（多くの表面官能基を有する、多目的、球状、単分散性ポリマー）の適用は、単一の有機フルオロフォア及び無機ナノ粒子の両者の限界を克服するのに助けとなる解決策であると思われる。デンドリマーのサイズは、蛍光タンパク質と同じスケール上にそれらを置き：それらは有機色素よりも大きく、そして量子ドットよりも小さい。

【0034】

デンドリマーは、フルオロフォアの足場として使用されて来た。PEG鏡を有するG2 PAMAMデンドリマーは、次の2つのタイプのフルオロフォアにより官能化されており：カルボキシフルオレセイン及びテトラメチル-ローダミン、そしてチャイニーズハムスター卵巣細胞において試験されている（Albertazzi et al., PloS ONE, 2011, 6, e28450. doi:10.1371/journal.pone.0028450）。高次生成のG5及びG6 PAMAMデンドリマーが、複数のシアニン色素により結合されている（Kim et al., Biophys. J., 2013, 104, 1566-1575）。多くの場合、デンドリマーの表面上の蛍光標識の共有結合が、インビトロ又はインビボでのその生物学的機能を評価するために必要である。しかしながら、そのような修飾は、低められたデンドリマー生体適合性のリスクを創造し、そしてその生体分布特性に影響を及ぼす。そのために、本質的に蛍光デンドリマーの探索が最も重要である。

【0035】

明確に、底毒性で、所望する波長及び強度の蛍光を表示する生体適合性化合物を有する場合、意図される用途に商業的に適用される。

【発明の概要】

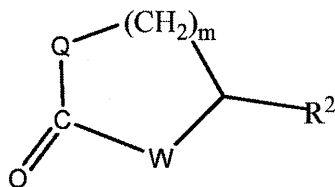
【0036】

発明の簡単な概要

本発明は、下記式：

【0037】

【化4】



式 (I)

【0038】

[式中、

Qは、示されるように環に窒素を導入するために反応する第一級アミンを有する任意の実体であり；

Wは、N、O、S又は(CH₂)_nであり、ここでnは0又は1であり；

R²は、-C(O)OH；-C(O)O(C₁-C₄アルキル)；-C(O)-NH R⁵（ここで、R⁵は、C₁-C₄アルキル、又はポリマー上の部分であり得るアミド基である）であり；そして

10

20

30

40

50

mは、1～4である]で表される、蛍光性環状アミド、環状尿素、環状ウレタン及び環状アミノアミド又はアミド尿素化合物を提供し、但し、前記式(I)の化合物は、存在するそのような環状アミド、尿素、ウレタン又は環状アミド実体を有さないQH₂であるその基本化合物の値の少なくとも10倍、蛍光する。

【0039】

その発光が400～850nmの可視近赤外領域にあり、そして細胞に対して非免疫原性である、式(I)の化合物。

【0040】

式(I)の好ましい化合物は、R²が、-C(O)O(C₁-C₄アルキル)又は-C(O)OHであり、特にここでアルキルはメチルであり；Wが(CH₂)_n(ここで、nは1である)であり；そしてmが1であり、特に好ましくは、Qがアミン末端樹枝状ポリマー又はアミン末端デンドロンであるそれらの化合物である。Q中のいくつかのアミンは、(C₁-C₂₀アルキル)アミン、(C₁-C₂₀ヒドロキシルアルキル)アミン、(C₁-C₂₀アルキルエーテル)アミン、C₆-C₁₄アリール又は(C₆-C₁₄アリールC₁-C₄アルキル)アミンである。

10

【0041】

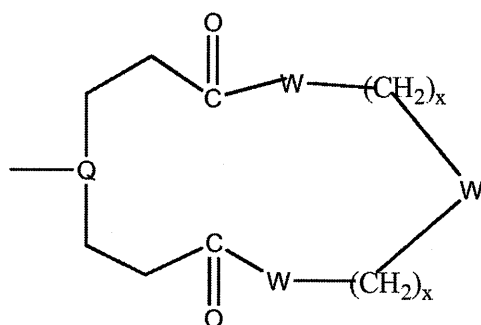
式(I)の化合物は、蛍光により種々のシステム、試験、植物又はヒトにおける部分及び流体を追跡し、そしてその蛍光により前記部分の位置をモニターするか、又は検出する方法に使用される。従って、それらの化合物は、トレーサー、バイオセンサー、又はイメージング剤として作用し、光退色を妨げるか、又はLEDディスプレイを増強することができる。

20

下記式：

【0042】

【化5】



式(II)

30

【0043】

[式中、Q及びWは、上記式(I)のように定義され；そしてxは2又は3である]で表される、4～14の成分を有する追加の蛍光大環状アミド。

40

【0044】

式(II)のそれらの化合物は、蛍光により種々のシステム、試験、植物又はヒトにおける部分及び流体を追跡し、そしてその蛍光により前記部分の位置をモニターするか、又は検出する方法に使用され得る。

【0045】

同様に、式(II)のそれらの化合物は、トレーサー、バイオセンサー、標識剤、非生物センサー又はイメージング剤として使用され：光退色を妨げるか又はLEDディスプレイを増強することができる。

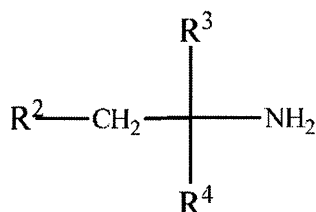
【0046】

50

式 (I) における適切な Q 部分であるいくつかの第一級アミンは、X - Z - N - であり、ここで X は、- NH₂、- OH、又は - C (O) OH であり、そして Z は、次のものである：(C₁ - C₁₈ アルキル)、(C₆ - C₁₂) アリール、(C₆ - C₁₂) アリーレン、又は (C₆ - C₁₂) アルキルアリーレン、例えば (C₁ - C₂₀ アルキル) アミン；(C₁ - C₂₀ ヒドロキシアルキル) アミン；(C₁ - C₂₀ アルキル) エーテルアミン；ベンジルアミン、又は下記式：

【 0 0 4 7 】

【 化 6 】



10

【 0 0 4 8 】

[式中、R² は - NH₂、- OH 又は - C (O) OH であり、そして R³ 及び R⁴ は独立に、- H 又は C₁ - C₄ アルキル又は - CH₂ OH である]；その表面上に第一級アミンを有する、デンドリマー、デンドロン又は樹枝状ポリマー；環化される場合、蛍光ミセルをもたらす両親媒性界面活性剤を形成することができる、第一級アミンを有する脂肪 / 親油性実体、第一級アミン又は一般的アミノ酸、例えばリシン、グリシン、トリプトファン、チロシン及び / 又はフェニルアラニンの何れかを有するタンパク質。

20

【 0 0 4 9 】

式 (I) 実体において適切な Q 部分である第一級アミンは、(1) 小有機分子、(2) 4 つの主要ポリマー構造型、例えば線状、架橋された、分岐及び樹枝状ポリマー型の何れかに由来する、オリゴマー及びポリマー (DENDRIMERS, DENDRONS, AND DENDRITIC POLYMERS, Tomalia, D.A., Christensen, J.B. and Boas, U. (2012) Cambridge University Press, New York, N.Y.) (両有機及び無機組成物 (すなわち、シリカ、無機酸化物、金属カルコゲナイド、フラーレン、等) を含む)、又は (3) (Chapter 8, DENDRIMERS, DENDRONS, AND DENDRITIC POLYMERS, Tomalia, D.A., Christensen, J.B. and Boas, U. (2012) Cambridge University Press, New York, N.Y.) に記載されるような、定義されたソフト又はハードナノ要素 (すなわち、ナノ粒子) の何れかにより提示され得る。

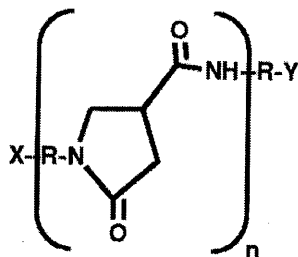
30

【 0 0 5 0 】

本発明はまた、下記式 (III)：

【 0 0 5 1 】

【 化 7 】



40

式 (III)

50

【 0 0 5 2 】

[式中、

R は、 $C_1 - C_{18}$ アルキル、 $C_6 - C_{12}$ アリール、 $C_6 - C_{12}$ アリーレン、($C_1 - C_{12}$ アルキル) $C_6 - C_{12}$ アリーレンであり；そして

X = Y は独立に、H、-OH、-NH₂、-SH、-CO₂H、アルキン、アジド（すなわち、クリック試薬）、又は任意の適切な反応性部分／誘導体であり、それらは所望の／標的化された基質、例えばペプチド、タンパク質、抗体、酵素、ポリ核酸、薬物、ナノ粒子、微粒子、リポソーム、ミセル、デンドリマー、デンドロン、デンドリマーソーム（dendrimersomes）、医薬品、又は他の生物学的実体又はそれらのフラグメントへのピロリジン化試薬を結合するために必要とされる]を有する、活性化されたピロリジノン化試薬が製造されるにも関する。

10

【 0 0 5 3 】

このリストに限定されないが、実証された小分子アミンの多くは、図 3 A 及び B に示されている。言及され得る他のものは、($C_1 - C_{20}$ アルキル)アミン、($C_1 - C_{20}$ ヒドロキシルアルキル)アミン、($C_1 - C_{20}$ アルキエーテル)アミン、($C_6 - C_{18}$ アリール)アミン、又は($C_7 - C_{21}$ アリールアルキル)アミンを包含する。広範囲の化学的表面、基質、種々の巨視的表面、例えばシリカ、金属、歯科用エナメル、綿、羊毛、食品、布、ガラス及び他のものへの、それらの非従来の固有フルオロフォア (NTIF) 構造の化学的結合、キレート化、会合、又は吸着を可能にするであろう、適切な結合及び封鎖（すなわち、キレート化）機能を、それらの Q 実体が有することが、すべての場合において所望される。

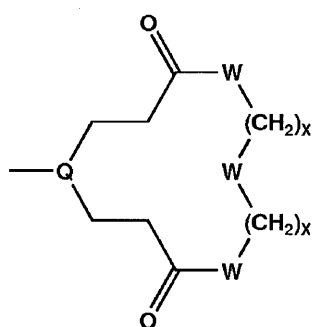
20

【 0 0 5 4 】

それらの反応のいくつかは、また本発明の一部である大環状蛍光アミドを形成することができる。前記環のサイズは、4 ~ 14 個の成分を有し、そして表 2 に示されるように、式 (I) のそれらの化合物について記載される有用性を依然として提供する。大環状化合物は、下記式：

【 0 0 5 5 】

【化 8】



式 (II)

30

40

【 0 0 5 6 】

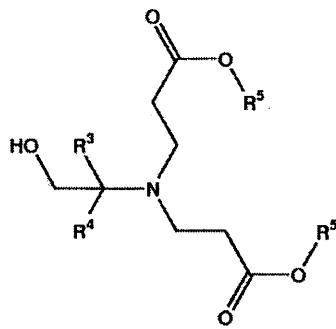
[式中、Q 及び W は、式 (I) の通りに定義され；そして x は 2 又は 3 である]を有する。

【 0 0 5 7 】

それらの環は、下記式：

【 0 0 5 8 】

【化 9】



10

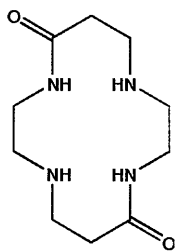
【 0 0 5 9 】

[式中、 R^5 は $C_1 - C_4$ アルキルであり； R^3 及び R^4 は、上記で定義された通りである]の化合物と、EDA、DETA、TETA等とを反応せしめる一般的工程から形成される。図2を参照のこと。理論に縛られることは望ましくないが、14員の環が、下記式：

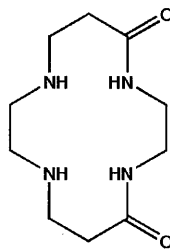
【 0 0 6 0 】

【化 1 0】

20



又は



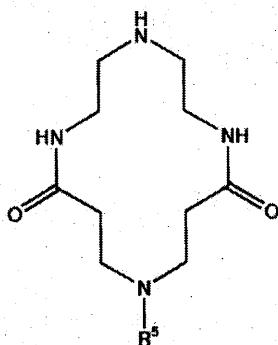
30

【 0 0 6 1 】

の可能な式を有する実施例 18 及び 23 の、下記式：

【 0 0 6 2 】

【化 1 1】



40

【 0 0 6 3 】

の式を有する実施例 5、15 及び 29 の工程の間、形成すると思われる。

【 0 0 6 4 】

50

E D A が 2 当量のジメチルイタコネーと反応させると、蛍光を発するダイマーが形成される。しかし、1 当量のジメチルイタコネーが E D A と反応される場合、蛍光を発するポリマーが形成される。従って、その状態に依存して、得られるフルオロフォアのサイズが制御され得る。

【 0 0 6 5 】

従って、種々の環にアミド基を有する大環状アミド及びポリマーが、使用のための特性、所望の蛍光強度、及び得られる青色から近赤外に至る発光波長に依存して、製造され、そして使用される。

【 0 0 6 6 】

式 (I) のそれらの化合物は、細胞イメージング、バイオセンシング、蛍光指向性外科的切除及び薬物送達のための医学におけるトレーサーとして使用される。生物学 / 医学用途以外の用途は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：法医学；ミネラル / 宝石の特徴付け；油田の強化及び診断、偽造品の検出、液体 / 水流に関するトレーサー研究；光退色の防止；LEDディスプレイの強化。従って、本発明は、式 (I) の化合物を用いて、部分及び流体を追跡し、そして蛍光によりそのような検出のためのシステムにおける位置をモニターする方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 6 7 】

【図 1】図 1 は、基底状態の化合物のエネルギーを上昇させた状態での励起を示し、そして蛍光発光により基底状態に戻る。

【図 2】図 2 は、末端複素環式 dendrimer を調製するための概略的工程を示す。

【図 3 A】図 3 A は、表 2 に番号付けされている例の化合物の化学構造を示す。

【図 3 B】図 3 B は、表 2 に番号付けされている例の化合物の化学構造を示す。

【図 3 C】図 3 C は、表 2 に番号付けされている例の化合物の化学構造を示す。

【図 3 D】図 3 D は、表 2 に番号付けされている例の化合物の化学構造を示す。

【図 4】図 4 は、表 2 に示される比較例の化学構造を示す。

【図 5】図 5 は、5、15、30 分、1、1.5、2、3、4、5、6、24 及び 48 時間のインキュベーションの後、mHippoe-18 (青菱形)、BRL-3A (赤い丸) 及び B-14 (緑の三角) 細胞による、100 μ M の濃度での G4-PAMAM-ピロリドン dendrimer の細胞摂取のデータをグラフで示す。

【図 6】図 6 は、100 μ M の PAMAM-ピロリドン dendrimer により 24 時間、処理された、B14、BRL-3A 及び mHippoe-18 細胞の共焦点画像を示す。(A) 未洗浄で且つ非固定の細胞の固有 dendrimer 蛍光。(B) dendrimer 蓄積 8 青色チャネル) の後、細胞を PBS によりすすぎ、そして染色し、細胞核 (赤色チャネル) 及び原形質膜 (緑色チャネル) を可視化した。イメージングの前、細胞をホルムアルデヒドにより固定した。

【図 7】図 7 は、5、15、30 分、1、1.5、2、3、4、5、6、24 及び 48 時間のインキュベーションの後、mHippoe-18 (青菱形)、BRL-3A (赤い丸) 及び B-14 (緑の三角) 細胞による、100 μ M の濃度での G4-PAMAM-ピロリドン dendrimer の細胞流出のデータをグラフで示す。

【図 8】図 8 は、ランダム PAMAM Pyram の構造を示す。

【図 9】図 9 は、ピロリドン部分を有するシェル試薬により被覆された dendrimer の構造を示す。

【図 10】図 10 は、PAMA dendrimer と本発明のピロリドンとの間の比較を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 6 8 】

発明の詳細な説明

本明細書において使用される用語は、特定の実施形態のみを説明するためのものであり、限定することを意図するものではないことが理解される。本明細書において使用される場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、特にことわらない限り、複数の指示対象

10

20

30

40

50

を含む。本出願で使用される用語集における以下の用語は、以下に述べるように定義され、これらの用語に関しては、単数及び複数を含む。

【 0 0 6 9 】

種々の見出しが、読者を助けるために存在するが、しかしその参照される主題の全ての側面の非他的な場所ではなく、そしてそのような議論の場所を限定するものとしては解釈されるべきではない。

【 0 0 7 0 】

また、特定の米国特許及び P C T 公開出願は、参照により組込まれている。しかしながら、そのような特許のテキストは、そのようなテキストと、本明細書に記載される他の記述との間に矛盾がない限り、参照によってのみ組み込まれる。そのような矛盾が生じた場合、そのような米国特許及び P C T 出願により組込まれているそのような矛盾するテキストは、特にこの特許には組み込まれていない。

10

【 0 0 7 1 】

用語集

本出願に使用されるような以下の用語は、以下に述べられるように定義され、そしてこれらの用語に関しては、単数は複数を含む。太字フォントは、この定義を満たす必要はないが、しかしこのリストにおける用語の意味を容易に見出すことができる。

AEEA は、N - (2 - ヒドロキシエチル) エチレンジアミンを意味する。

AEP は、1 - (2 - アミノエチル) ピペラジンを意味する。

Alkyl は、特にことわらない限り、直鎖及び分枝鎖部分を意味する。

20

BOCは、tert-ブトキシカルボニルを意味する。

BSAは、ウシ血清アルブミンを意味する。

4-CP-PAMAMは、4 - カルボメトキシピロリドン末端PAMAMデンドリマーを意味する。

Daは、ダルトンを意味する。

DABは、1 , 4 - ジアミノブタンを意味する。

DABCOは、1 , 4 - ジアザビスクロ [2 . 2 . 2] オクタンを意味する。

DBAは、ジベンジルアミンを意味する。

DBIは、イタコン酸ジブチルを意味する。

DEAは、ジエタノールアミンを意味する。

樹枝状ポリマーとは、コアシェル型テクトデンドリマーを含むランダムな超分岐、樹枝状突起、デンドロン又はデンドリマーポリマーの樹枝状ポリマークラスを意味する。

30

DETAは、ジエチレントリアミンを意味する。

DMDTBは、ジメチルジチオブチレートを意味する。

DMEMは、ダルベッコ改変イーグル培地を意味する。

DMIは、イタコン酸ジメチルを意味する。

DNA又はRNA又は核酸は、好ましくは4 ~ 9 0 0 0 塩基対または5 0 0 ~ 1 5 0 kDの合成又は天然の一本鎖又は二本鎖DNA又はRNA又はPNA (リン核酸) 又はそれらの組み合わせ又はアプタマーを意味する。

Pは、重合度を意味する。

EAは、エタノールアミンを意味する。

40

EDAは、エチレンジアミンを意味する。

EEMは、励起 - 発光マトリクスを意味する。

equiv. は、当量を意味する。

FBSは、ウシ胎児血清を意味する。

FT-IRは、フーリエ変換赤外分光法を意味する。

FWAは、蛍光増白剤を意味する。

Gは、デンドリマー生成を意味し、これは、コアを取り囲む同心枝細胞殻の数によって示される (通常、コアから連続して数えられる) 。

gは、グラムを意味する。

hは、時間を意味する。

50

ハロは、フルオロ、クロロ、プロモ又はヨード原子、イオン又はラジカルを意味する。

HB-PEIは、ハイパーブランチ - ポリエチレンイミンを意味する。

HEDAは、(2 - ヒドロキシエチル)エチレンジアミンを意味する。

HMDAは、ヘキサメチレンジアミンを意味する。

IAは、イタコン酸を意味する。

IFは、固有の蛍光を意味する。

IRは、赤外分光法を意味する。

ITAは、イタコン酸を意味する。

ITEは、イタコン酸エステルLを意味する。

Lは、リットルを意味する。

10

L-PEIは、線状ポリ(エチレンイミン)を意味する。

MeOHは、メタノールを意味する。

mgは、ミリグラムを意味する。

minは、分を意味する。

mLは、ミリリットルを意味する。

MWは、分子量を意味する。

μ mは、マイクロメートルを意味する。

nmは、ナノメートルを意味する。

NTFは、非従来の蛍光を意味する。

NTIFは、非従来の固有蛍光を意味する。

20

N-VPは、N-ビニルピロリドンモノマーを意味する。

PAMAMは、第一級アミン末端基を有する線状及び分岐ポリマー又はデンドリマーを包含する、ポリ(アミドアミン)を意味する; Starburst (商標) (Dendritic Nanotechnologies, Inc.の商標)

PBSは、リン酸緩衝生理食塩水を意味する。

PEGは、ポリ(エチレングリコール)を意味する。

パーセント又は%は、特に断らない限り、重量を意味する。

PETIMは、ポリ(プロピルエーテルイミン)を意味する。

PIPZは、ピペラジン又はジエチレンジアミンを意味する。

PPIは、ポリ(プロピレンイミン)デンドリマーを意味する。

30

PVPは、ポリ(ビニルピロリドン)を意味する。

PyrAMは、ピロリドンアミンを意味する。

rpmは、1分間当たりの回転数、振とう水浴中での攪拌の頻度を意味する。

RTは周囲温度又は約20~25 の室温を意味する。

ステルスは、細胞に対して非免疫原性を意味する。

TETAは、トリエチレントトラミンを意味する。

TMSは、テトラメチルシランを意味する。

Tracer は、化合物の自然なプロセス又は存在の進行または履歴を追跡するために使用される化合物、例えば細胞及び組織の組成の研究のための組織化学トレーサー; 流体運動を追跡するために使用される任意の流体特性のためのフロートレーサー; 色素トレーサー; 又はそれが使用される環境に位置することができる任意の化合物、を意味する。

40

TRENは、トリス(2-アミノエチル)アミンを意味する。

TRISは、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを意味する。

UV-visは、紫外線および可視分光法を意味する。

【0072】

議論 1

ピロリドン化

より高い分子量画分(すなわち、 > 20 kDa; 下記参照のこと)を除いて、何れの既知の生理学的問題を伴わないで、ヒト(すなわち、50万人を超えるヒト対象において75歳以上)における注射可能な合成ポリマーとしてPVPを使用する広範な肯定的経験を

50

考慮して、それらのピロリドン組成物の本発明の使用は、PEG化又はPOX化の何れかの代替物である。PEG化及びPOX化の両者は、PVPよりもヒト自体の欠点を有し、そしてPVPよりも、ヒトにおいて、はるかに少ないインビボ記録を有する。さらに、PEG化及びPOX化生成物に対するPVPのそれらの新しいピロリドン類似体の付加的特徴は、予想外の固有の蛍光特性である。それらの蛍光特性は、生物学的細胞をイメージングし、そしてインビボ輸送及び生体分布をモニターするためには非常に重要であることが示されている。従来の用語と一致して、ポリヌクレオチド、タンパク質、薬物及び他の実体を修飾するためのそれらの新規プロトコルは現在、ピロリドン化と呼ばれる。それらのピロリドン化試薬の一般的な構造表示は、式(III)で下記に示される通りである。

【0073】

それらのピロリドン反復単位は、(a)線状、(b)架橋、(c)分岐、又は(d)樹枝状を包含する4種の主要ポリマー構造のいずれか中に効果的に組み込まれ、ここで重合度(DP)=(n)は一般的に、4-100であり、そしてX又はYは独立に、修飾される所望のタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド又は治療薬が有する官能基と反応性であっても又は非反応性であっても良い。

【0074】

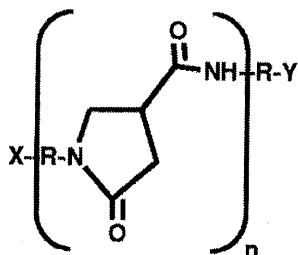
本発明は、腎臓により排泄されるべきであり、そして広範囲の注射可能な生物医学的用途のために適している、PVPの十分に定義され、分散性で、低分子量(すなわち、<100KDa、好ましくは<50KDa)のオリゴマー/ポリマー類似体を提出することにより、この広く認識されたジレンマを改善するような化学的解決法を記載する。このように、それらの個別の官能化された低分子量ポリ(ピロリドン)はまた、注射可能な血液代用物/増量剤として過去75年間にわたってのそれらの広範な且つ非常に安全な医学的使用に基づいて、PEG試薬の代用物又は代替物としての使用のための卓越し且つ実行可能な候補体にもなる。さらに、それらの新規の小分子及びピロリドン組成物の多くは、従来の光化学パラダイムに従って説明できない重要な予想外の蛍光特性を示すが、しかしながら、この新規の蛍光特性は、生物学的細胞をイメージングし、そして生物内のインビボ輸送及び分布をモニターするために非常に価値があり、且つ有用であることが文書化されていることが決定された。

【0075】

本発明は現在、インビボ薬物送達用途のためへのピロリドン組成物の使用に関連する上述の懸念及び欠点の全てを改善する、非常に望ましい末端基「活性薬物結合官能性部位」を有する、明確に定義された、低分子量ポリ(ピロリドン)オリゴマーを生成する新規の方法及び戦略を記載する。PEG及びPOXについて使用される用語の精神及び内容においては、それらの新規プロトコル及び試薬は、ピロリドン化と呼ばれる。それらの活性化されたピロリドン化試薬の一般的な例は、以下に記載される通りである：

【0076】

【化12】



式(III)

【0077】

[式中、R は、 $C_1 - C_{18}$ アルキル、 $C_6 - C_{12}$ アリール、 $C_6 - C_{12}$ アリーレン、($C_1 - C_{12}$ アルキル) $C_6 - C_{12}$ アリーレンであり；そして

X = Y は独立に、H、-OH、-NH₂、-SH、-CO₂H、アルキン、アジド（すなわち、クリック試薬）、又は任意の適切な反応性部分 / 誘導体、例えば G.T. Hermans on, Chapters 1-27 (pp 3-1039) in *Bioconjugate Techniques*, Second Ed., (2008) により記載されるそれらであり、それらは所望の / 標的化された基質、例えばペプチド、タンパク質、抗体、酵素、ポリ核酸、薬物、ナノ粒子、微粒子、リボソーム、ミセル、デンドリマー、デンドロン、デンドリマーソーム (dendrimersomes)、医薬品、又は他の生物学的実体又はそれらのフラグメントへのピロリジン化試薬を結合するために必要とされる]

【 0 0 7 8 】

-CO₂H の医薬的に許容できる塩及びエステルもまた、式 (III) の化合物として含まれる。それらの塩及びエステルは、薬物開発において当業者に良く知られており、そして多くの薬物について、FDA から承認された薬物の許容リストから入手できる。

【 0 0 7 9 】

本発明は、明確に定義された小分子ピロリドン中間体を含む新規ピロリドンポリマー組成物（すなわち、線状、分枝状、架橋及び樹枝状構造）を記載し、それらの合成のための戦略 / プロトコルは、特にオリゴマー又は低分子量ポリマー組成物として、分子量 (MW) 制御を可能にするユニークで明確に定義されたピロリドンポリマー組成物の入手を可能にする。これは、図 10 により理解され得る。

【 0 0 8 0 】

現在、そのようなオリゴマー / 低 MW ポリマーピロリドン組成物は、何れの既知の重合プロトコルによっては入手できない (Pfaffmann et al., 米国特許第 6,080,397 号, 2000; www.rloginconsulting.com/...pyrrolidone%20backbone%20polymers.pdf)。本発明を構成する、新規の制御された低 MW ピロリドンポリマーは、従来の PEG 化（すなわち、上記で論じられたようなポリ（エチレングルコール）ポリマー）に対する劇的に強化された代替案を提供する。PEG ポリマーは、とりわけ、特定の負の特性（すなわち、酸化不安定性、免疫原性特性）を有する。最近では、POX 化（すなわち、ポリ（オキサゾリン））(J. Milton Harris et al., 米国特許第 8,088,884 号, (Jan. 3, 2012)) プロトコルが存在する。それらの PEG 化及び POX 化プロトコルは、広範囲のインビボ薬物送達及びイメージング用途下で、種々のタンパク質、酵素、薬物又はイメージング剤と、ポリ（エチレングルコール）又はポリオキサゾリンとの共有結合又は会合を包含する。PEG 化プロトコルによる生物医薬品の PEG への結合は、C 型肝炎、好中球減少症及び貧血の治療のための多数の有意で、商業的に重要な高分子薬物の臨床 / マーケティングの成功を導いて来た (F. M. Veronese, A. Mro, G. Pausut, (2009) "Protein PEGylation, Basic Science and Biological Applications. PEGylated protein, drugs; basic science and clinical applications, milestones in drug therapy series" F.M. Veronese, Ed., pp 11-31, Birkhauser Verlag, Berlin)。

【 0 0 8 1 】

それらの初期の技法の背景及び精神においては、本発明により記載される技法に基づくこの新規ポリ（ピロリドン）は、（ピロリドン化）（すなわち、ポリ（ピロリドン））プロトコルと命名される。この線状ポリ（アミドピロリドン）(PAMPyr) 生成物は、PEG (Davis et al., *Adv. Drug Delivery Reviews*, 2002, 54(4), 457-458)、及び POX (Harris et al., 米国特許第 7,943,141 号, 2011) タイプのポリマーに類似する。このようにして、それらは、低毒性、低補体活性化特徴を示し、そして注射剤として使用される場合、それらの結合体についてのインビボ保持時間を増強しながら、薬物結合体とのタンパク質相互作用を低めるために使用され得る。それらの新規ポリ（ピロリドン）組成物は、驚くほど低い毒性 [Ciolkowski et al., *Nanomedicine*, NBM, (2012), 8, 815-817; Janaszewska et al., *Nanomedicine*, NBM, (2013), 9, 461-464] 及び低い補体活性化（すなわち、低い免疫原性特性）、並びにインビボステルス特性 (N. Spyropoulos-Ant

10

20

30

40

50

onakkakis et al., Nanoscale Research Letters, (2015); 10:210) を示し、それらは、従来の PEG 化プロトコルについて認識されるそれらの特性を越える。予期しないことには、それらの新規の小分子ピロリドン中間体及びそれらの得られるポリ(ピロリドン)(PVP)組成物の多くは、生物及び動物モデルにおいて、生物学的細胞のインビボイメージング、又は生理学的運動及び生体分布を追跡するために適切な非従来の「固有蛍光」特性を示すことが見出された。

【0082】

ごく最近、ピロリドン末端 PAMAM デンドリマーは、それらの非常に低い毒性 (Ciolkowski et al., Nanomedicine, NBM, 2012, 8, 815-817; Janaszewska et al. Nanomedicine, NBM, 2013, 9, 461-464)、無視できる補体活性化特性 (N. Spyropoulos-Antonakakis et al., Nanoscale Research Letters, (2015); 10:210)、及びヒトアテローム性動脈組織(すなわち、心血管プラーク)を選択的に標的化する非常に顕著な前例のない能力 (N. Spyropoulos-Antonakakis et al., Nanoscale Research Letters, (2015); 10:210) のために、すべての他のナノスケール粒子に比較して、真にユニークであることが報告されている。

10

【0083】

プロセスの議論

PEG 化試薬の代わりの代替物として本質的に蛍光性の小分子ピロリドン中間体、オリゴマー及びポリマーを合成するための方法 / プロセス

それらの小ピロリドン分子は、第一級アミンとイタコン酸又はその誘導体(すなわち、エステル、アミド、無水物)との反応を包含する単純な工程により容易に調製される。この一般的な第一級アミン+イタコン酸誘導体反応スキームは、それらのピロリドン中間体の MW、及び所望する低分子量ピロリドンポリマーの MW を制御するために使用され得、それらのすべては、インビボ用途のために適切な予想外の固有蛍光 (IF) を示す。それらの戦略は、以下の流れ図 (スキーム 2) で例示されている。

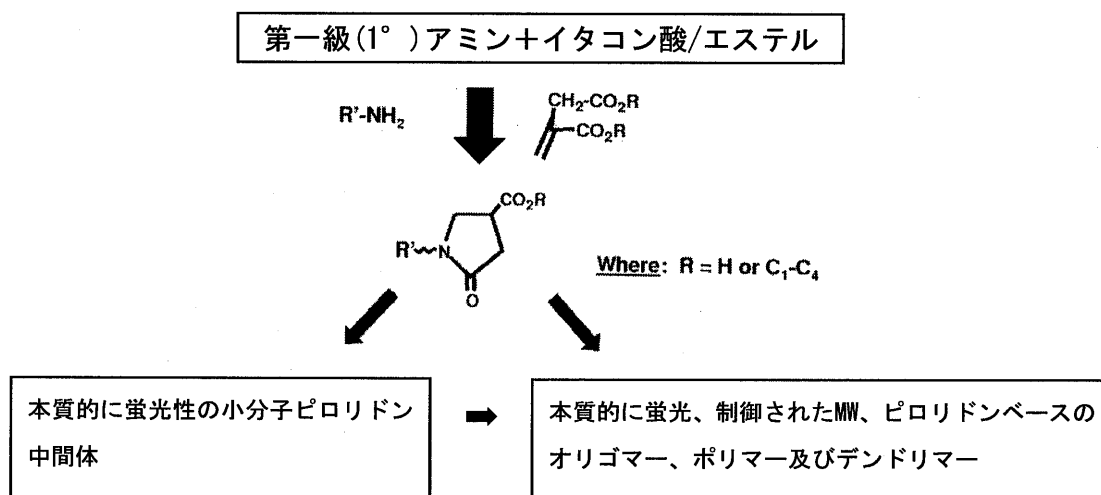
20

【0084】

【化 13】

スキーム 2

30



40

【0085】

このスキームにおいて、R は H 又は C₁ - C₄ アルキルであり；R' は C₁ - C₁₈ アルキルである。

【0086】

本発明のための複素環式 / 大環状 (すなわち、ピロリドン) 環を合成するために使用される合成戦略は、一般的に、モノ - 及びポリ - 第一級アミンと、イタコン酸 (ITA)、

50

イタコン酸エステル (ITE)、例えばDMI、又は無水イタコン酸との反応を包含する。すべての場合、種々の第一級アミンと、イタコン酸試薬との間の化学量論は非常に重要である。それらの化学量論は、広範囲の4-カルボン酸/エステルピロリドンカテゴリーを生成するよう体系的に調整することができた。それらのカテゴリーは、(1)単純な分子機構、(2)二環式/オリゴマー/大環状構造、又は(3)ポリマーピロリドン生成型を包含した。

【0087】

単純な小分子第一級アミンとイタコン酸誘導体との間の高収率反応は、デンドリマー、並びに線状ポリマー、すなわちポリ(ビニルアミン)及びポリ(アリルアミン)を含む、第一級アミンを担持するすべてのポリマー構造に、非常に容易に拡張された。

10

【0088】

スキーム2における(A)により示されるIF小分子ピロリドン中間体を形成する第1の反応は、少なくとも1つの第一級アミンを必要とし、結果的に、モノアミン、ジアミン、トリアミン分子はRであり得、次に、アミンはイタコン酸(ITA)又はイタコン酸エステル(ITE)と反応せしめられる。任意の第一級アミン、例えば2-アミノエタノール、アミノエチルエタノールアミン(AEEA)、tris-ヒドロキシルメチルアミン(TRIS)、グルコサミン、グリシン、ドデシルアミン、又は他の所望のモノアミンが使用され得る。化学量論は、次の通りである：

[1°アミノ部分: ITA/ITE]

[1:1] 2-R(X)置換-4-カルボキシピロリドン

20

[2:1] 2-R(X)-置換-4-カルボキシアミドピロリドン

得られる生成物は、IFを有し、そしてスキーム2における(A)である。

【0089】

2つの第一級アミンを有するジアミンがITA又はITEと反応する場合、2つのピロリドン環がジアミン当たり形成することができる。それらの第一級ジアミンの例は、エチレンジアミン(EDA)、シスタミン(CYS)、ジエチレントリアミン(DETA)、トリエチレントトラアミン(TETA)、又は他の所望のジアミンである。化学量論は、次の通りである：

[1°ジアミン部分: ITA/ITE]

[1:1] R(X)置換-4-カルボキシピロリドン骨格大環状、オリゴマー、ポリマー

30

[4:1] 2-R(X)-置換-4-カルボキシアミドピロリドン

[1:2] 2-[R(X)-]-置換-4-カルボキシアミドジ-ピロリドン

【0090】

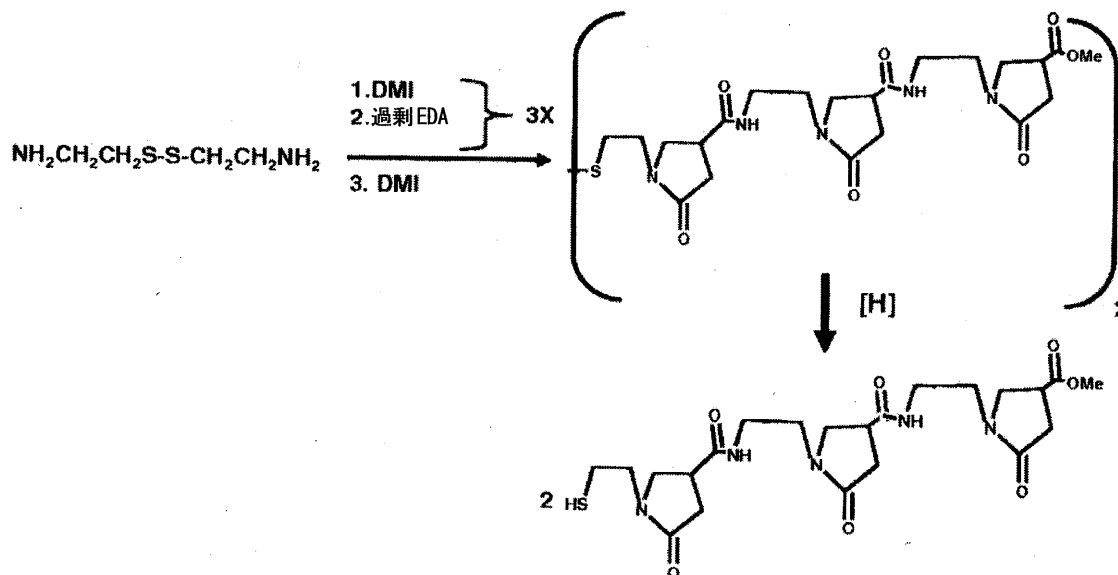
後者の場合、システミンに対してこの[1:2]反応を行ない、ジピロリドン中間体を形成することができ、それから、過剰のEDA及び続くDMIと逐次反復を行うことができる。この反復順序決定は、下記に例示されるように、種々の生物学的基質のピロリドン化にとって非常に重要である所望する長さの主要なチオール保護線状PAMPyrオリゴマーを生成する：

【0091】

40

【化 1 4】

線状ポリ(アミドピロリドン) (L-PAMPyr) - トリマー



10

20

【0092】

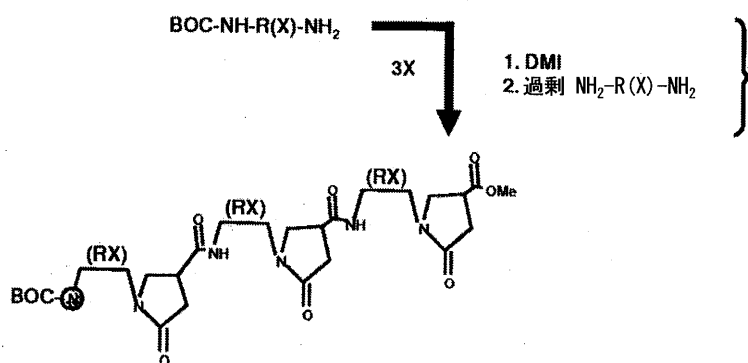
他方では、BOC保護ジアミンに対して反復DMI + 過剰EDA配列決定を行うことができ、この場合、反復の数は、ピロリドン化試薬の長さを決定するであろう。もちろん、従来のMerrifield様基質もまた、そのようなジアミンの類似する保護のために使用され得る。その耐性、適切な末端基修飾、樹脂からの切断及び / 又はBOC基の保護解除は、G. Hermanson (G.T. Hermanson, in Bioconjugate Techniques, Second Ed., (2008).) により広範に記載された手順に従って、すべての所望する生物学的基質又は標的への適切な結合のためのそれらのピロリドン化試薬の選択的官能化提供するであろう。

【0093】

30

【化 1 5】

ピロリドンオリゴマー



40

【0094】

3個の第一級アミンを有するトリアミンがITA又はITEと反応する場合、3個のピロリドン環がトリアミンあたり形成することができる。それらの第一級トリアミンの例は、トリス(2-アミノエチル)アミン(TREN)又は他の所望するトリアミンである。化学量論は、次の通りである：

50

[1° トリアミン部分: I T A / I T E]

[1:1] 三置換-[2 - R (X) , 4 - カルボン酸/エステルピロリドン]

$N - [(CH_2 - CH_2 - NH_2)]_3 (TREN) + 3 DMI \rightarrow N - [(CH_2 - CH_2 - N(4 - カルボン酸/エステル) ピロリドン)]$

【0095】

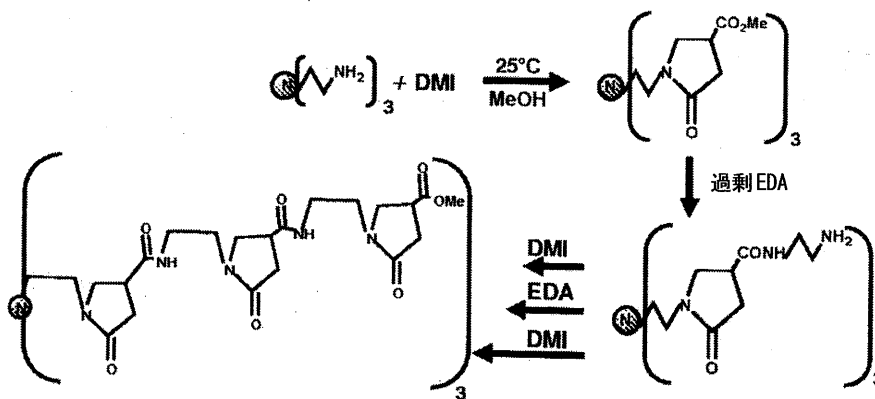
このアプローチで形成された第1のトリ - ピロリドン反応生成物は、MW / 構造制御の3 - アーム分枝の星形ピロリドン化試薬を合成するための反応性足場として使用され得ることが注目されるべきである。下記に示される反復工程は、9つのピロリドン環を含む、星型分枝状ポリ(ピロリドン)オリゴマー生成物を生成する。

【0096】

【化16】

10

ピロリドンベースの星型分枝状ポリマー



20

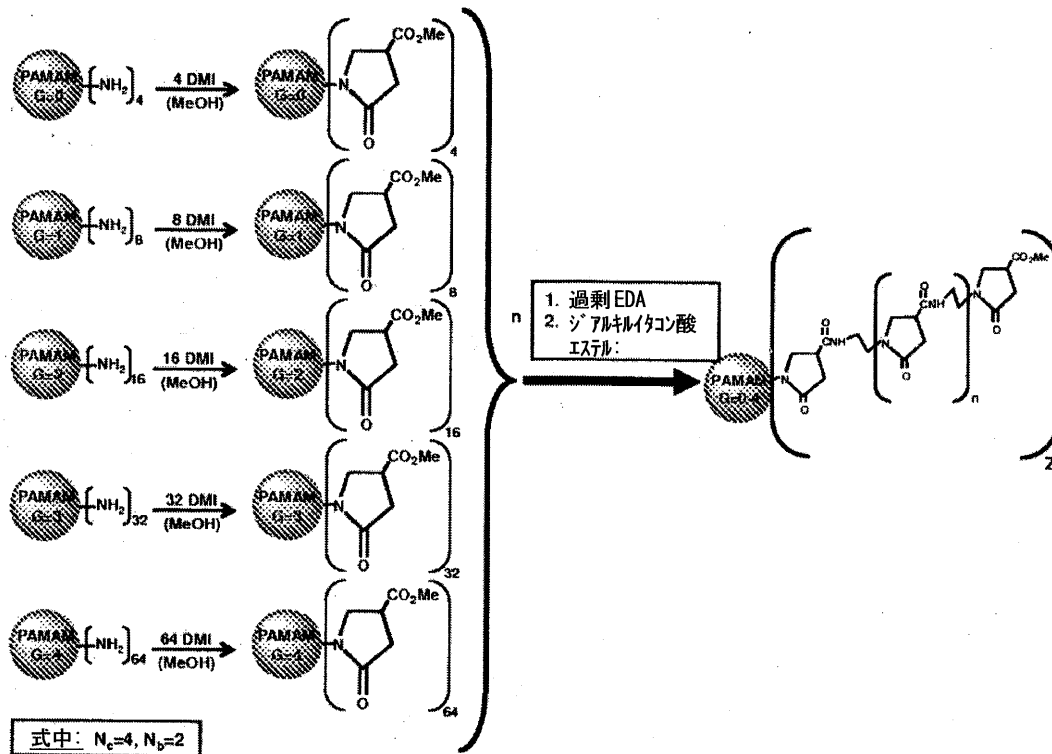
【0097】

このDMI + EDA 介入戦略を、アミン末端デンドリマーシリーズに拡張することにより、以下に示すように、生成レベルの関数として、その対応するデンドリマー提供 N c N b^G ポリ(直鎖状)分枝を製造することができる:

【0098】

30

【化 17】



10

20

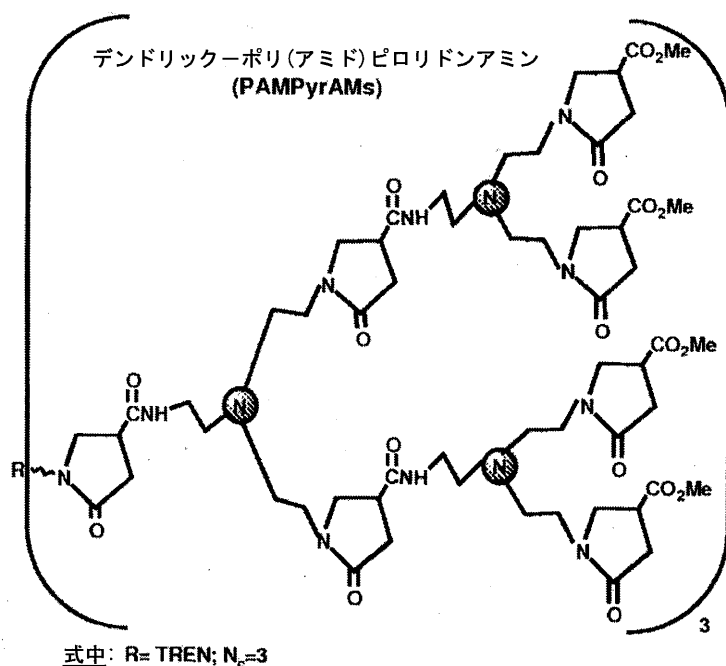
【0099】

同様に、エチレンジアミン (EDA) を、トリ - (2 - アミノエチル) アミン (TREN) により単に置換することにより、類似の十分に定義されたトリ - デンドロン型デンドリマー構造を生成することができる。上記の TREN と同様の反復順序を用いることにより、EDA は、以下に示されるように、TREN の中心 N - コアの周りに 3 つのデンドロンを生成する：

30

【0100】

【化 18】



10

20

【0101】

この新規の前例のない $G=0$; トリ - デンドロンデンドリマー構造は正確に 2 1 - ピロリドン環を含み、そしてポリ(アミノピロリドンアミン)(PAMPyRAM)ファミリーの代表的メンバーと呼ばれる。

[1:2] モノ(NH_2) - R(X) - 置換 - ジ - (4 - カルボキシアミドピロリドン) ハイパーブランチ - R(X) - 置換 - ポリ - (4 - カルボキシアミドピロリドン) $\text{N} - [(\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2)_3 + 2 \text{ DMI} \text{ N} - [(\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2)_2 [(\text{4 - カルボン酸/エステル) ピロリドン}]_2$ ハイパーブランチ - ピロリドン

30

[2:1] ジ - (NH_2) - R(X) - 置換 - モノ - (4 - カルボキシアミドジ - ピロリドン) ハイパーブランチ - R(X) - 置換 - ポリ - (4 - カルボキシアミドピロリドン)

$\text{N} - [(\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2)_3 + 1 \text{ DMI} \text{ N} - [(\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2)_2 [(4 - カルボン酸/エステル) ピロリドン]]$ ハイパーブランチピロリドン

【0102】

スキーム 2 においては、(B) ポリマーが形成される場合、それらは、この工程により制御されるそれらの MW を有し、そしてインビボ生物学的注入及びイメージング用途のために適切な、IF、低毒性及び低補体活性化特性を示すピロリドンポリマー組成物である。すべてのポリマーは、それらの構造中に、すなわち表面基として、又は ITA、ITC 又は DMI と、又はその構造中で、又は表面又はポリマー上で反応するアミンの構造の一部として、ピロリドン部分を含む。それらのポリマー組成物は、次の 4 種の異なった構造形で生成され得る: (a) 線状ポリマー、(b) 架橋されたポリマー、(c) 分岐上ポリマー、及び (d) 樹枝状ポリマー。

40

【0103】

線状 - ペンダントピロリドンオリゴマー / ポリマー :

1 - ポリアミン $[\text{RX} - (\text{NH}_2)_z] + \text{ITA}$ 又は ITE

上記反応においては、いくつかの第一級ポリアミンは、ポリ(ビニルアミン)、ポリ(アリルアミン)、ポリ(ビニルベンジルアミン)、又は 1 又は 2 以上の第一級アミンを有する他の適切なポリアミン; 及び $Z =$ 重合度 (DP) である。化学量論は次の通りである

50

:

[1° アミン部分: I T A / I T E] = [1 : 1]

[1 : 1] 線状 - [ポリ - 2 - (R (X)) - 置換 - 4 - カルボン酸/エステルピロリドン]
 リドン] $DP=n$
 【 0 1 0 4 】
 【 化 1 9 】

線状-ピロリドンオリゴマー



式中: R = $-NH_2$ 、 $-CH_2-NH_2$ 、ベンジル- NH_2

10

【 0 1 0 5 】

架橋された線状 - ペンダントピロリドンポリマー :

[1° アミン部分: I T A / I T E] = [DP : DP - x]

20

[DP : DP - x] 架橋された [2 - (R (X)) - 置換ポリ - 4 - カルボン酸/エステルピロリドン] $DP - x$

【 0 1 0 6 】

DMI : 第一級アミンの化学量論が $< 1 : 1$ になるよう、DMI : 第一級アミンの比を単純に調節することにより、上記線状 - ペンダントピロリドンオリゴマー / ポリマー (上記に示される) の架橋バージョンを容易に形成することができる。

【 0 1 0 7 】

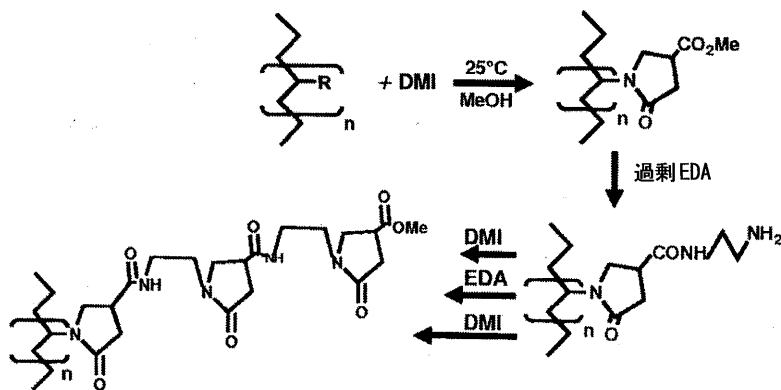
線状 - ペンダント分岐ピロリドンポリマー

【 0 1 0 8 】

【 化 2 0 】

30

線状-ペンダント分岐ピロリドンポリマー



40

【 0 1 0 9 】

樹枝状コア - 樹枝状表面 (ピロリドン) コポリマー-デンドリマー :

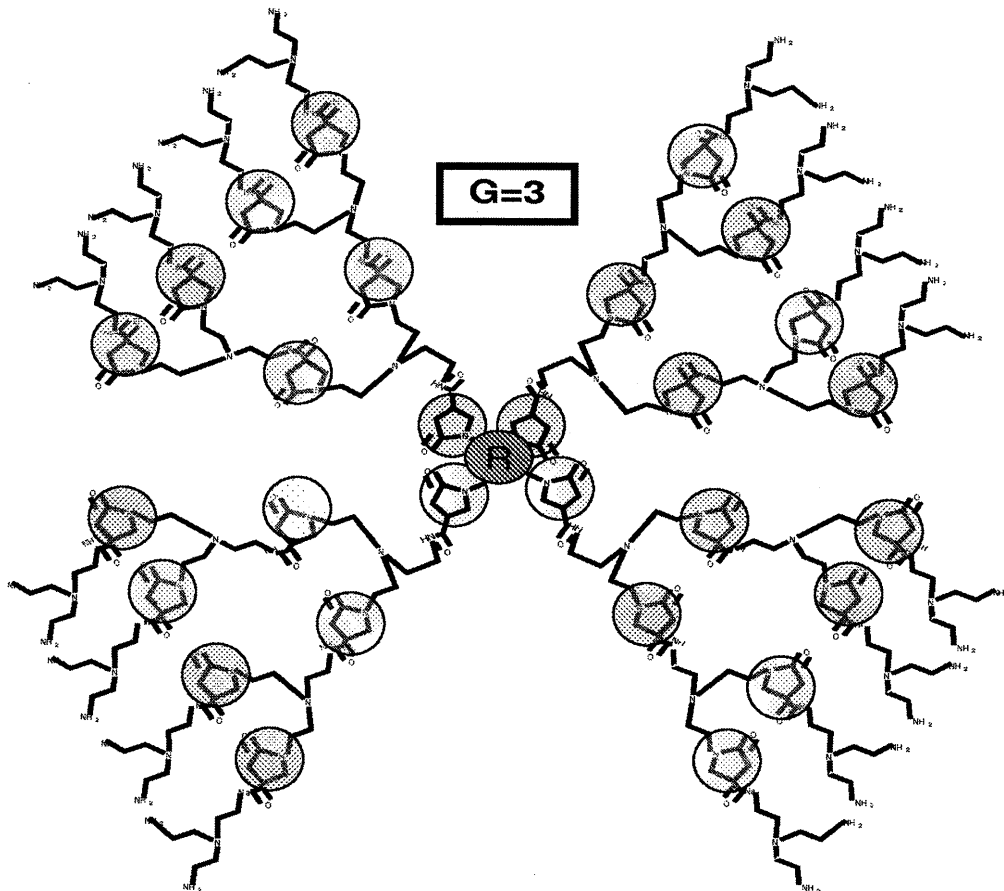
上記に示されるように、[1 : 1] DMI 化学量論、続いて、単純な小分子第一級アミンコア、例えばトリス - (2 - アミノエチル) アミン (すなわち、TREN)、エチレンジアミン (EDA)、1, 4 - ジアミノブタン (DAB)、等から出発しての過剰の TREN を用いて、反復反応順序を実施することにより純粋なすべてのポリ (ピロリドン) ベー

50

スのデンドロンを成長させることができる。そのようなデンドリ - { ポリ (アミドピロリドン) アミン } - (NH_2) $_z$; $G = 3$; コア = $R = [\text{DAB}]$ 由来の (PAMPyrA M) デンドリマー (ここで、 $N_c = 4$) は、正確に 28 - ピロリドン環を含み、そして下記に示される通りである :

【 0 1 1 0 】

【 化 2 1 】



10

20

30

40

50

【 0 1 1 1 】

他方では、任意の所望する内部デンドリマー組成物由来の第一級アミン末端デンドリマーの表面からデンドリ - ポリ (ピロリドン) 型デンドロン成分を成長させ、前例のない新規な [デンドリ - 1] - [デンドリ - 2 (ピロリドン)] 型コポリマーデンドリマーを生成することができる。この戦略は、生成の関数として導入され得、そして従来の表現 ; $Z = N_c N_b^G$ (ここで、 Z = 生成あたり導入されるピロリドン環の数) に従って予測され得るピロリドン環の総数に対する完全な数学的制御を保証する。従って、特定のピロリドン化試薬構造において所望されるピロリドン環の数に対する全体的制御は、以下の数学に従って企画され、そして構築され得る。

【 0 1 1 2 】

本発明の最も重要な側面の 1 つは、ポリ (ピロリドン) オリゴマー、ポリマー、デンドロン及びデンドリマーの分子量を企画し、そして制御する能力である。デンドロン / デンドリマーベースのシステムのために開発された十分に文書化されている反復原理 / 工程を適用すると、以下に記載され、そして図 10 に示されるような数学的に駆動される原理 / 表現に従って企画され、そして構築され得る少なくとも 3 つの新規ポリ (ピロリドン) 組成物を合成することが可能であった。

【 0 1 1 3 】

(I) . 従来のデンドリ - PAMPAM - 4 - カルボメトキシピロリドン末端デンドリマー

従来の P A M A M デンドリマー；末端第一級アミンの数 = $Z = N_c N_b^G$

末端ピロリドン部分の総数 = $P = Z = N_c N_b^G$

(I I) . デンドリ - P A M A M : 線状 - ポリ (アミドピロリドン) 末端 ; (L - P A M P y r) コポリマー ; (直鎖変性表面 ; 鎖長 = n)

ピロリドン部分の総数 = $P = n Z = n N_e N_b^G$

(I I I) . デンドリ - P A M A M : 樹枝状ポリ (アミドピロリドンアミノ) ; (P A M P y r A M) コポリマー

【 0 1 1 4 】

前提条件：

基本的 P A M A M デンドリマー末端第一級アミンの数 = $Z = N_c N_b^G$

10

(P A M P y r A M の数) G' 及び N'^G により定義される表面生成 (上記のような単一のピロリドン $G' = 0$)

表面ピロリドン部分の総数 = $P_z = Z N'^G_b = N_e N_b^G N'^G_b$

内部 + 表面ピロリドン部分の総数 = $P = Z (N'^G_b + 1 - 1) / (N'_b - 1)$

内部 + 表面ピロリドン部分の総数 = $N_c N_b^G (N'^G_b + 1 - 1) / (N'_b - 1)$

(IV) . [コア] : 樹枝状 - ポリ (アミドピロリドンアミン) (P A M P y r A M s)

【 0 1 1 5 】

前提条件：

総ピロリドンデンドリマー (上記のような G' 及び N'_b)

表面ピロリドン部分の総数 = $P_z = N_c N'^G_b$

20

内部 + 表面ピロリドン部分の総数 = $P = N_c (N'^G_b + 1 - 1) / (N'_b - 1)$

1° - ポリアミン末端デンドリマー (すなわち、ここで : デンドリマー - (NH_2) $_z$ = [コア ; (N_c)] ; [内部 ; (N_b)] ; [末端基 ; (Z)])

【 0 1 1 6 】

I T A、I T E 又は D M I との反応のために利用できる Z 部分として、デンドリマーの表面上に少なくとも 1 つの第一級アミンが存在すべきである。いくつかの可能な樹枝状構造は、ポリ (アミドアミン (P A M A M) デンドリマー、ポリ (プロピレンイミン) (P P I) デンドリマー、ポリ (リシン) 樹枝状ポリマー及び / 他のも [DENDRIMERS, DENDRONS, AND DENDRITIC POLYMERS, Tomalia, D.A., Christensen, J.B. and Boas, U. (2012) Cambridge University Press, New York, N.Y.] ; 及び $Z = N_c N_b^G$ である。化学量論は次の通りである：

30

[1° アミン部分 : I T A / I T E] = [1 : 1]。

[1 : 1] [デンドリマー] - [(2 - 置換 - 4 - カルボン酸 / エステル) ピロリドン]

Z

ここで、 $Z = N_c N_b^G$

【 0 1 1 7 】

デンドリマーの生成は、D M I 及びメタノールと反応される $G = 0, 1, 2, 3, 4$ (例えば、P A M A M) であり得、それに応じて、1 ~ 表面上に利用できるアミンの最大数 (すなわち、それぞれ、4, 3, 16, 32, 64) で、所望の数のピロリドン部分が形成される。これは、次のように一般化される：

40

コア = $N_c = 4$ である場合、(X) (Y) が表 1 に示されるようになるよう、デンドリマー生成 (G) の関数としての [(1° アミン部分) x : (I T A / I T E) y] = [X : Y]

【 0 1 1 8 】

【表 1】

表 1

コア (G)	z	(X)	(Y)
0	4	[1-3]	[3-1]
1	8	[1-7]	[7-1]
2	16	[1-15]	[15-1]
3	32	[1-32]	[32-1]
4	64	[1-63]	[63-1]
5	128	[1-127]	[127-1]

10

【0119】

メガマー：

20

ランダム構造のデンドリマーPyraMメガマー：

広範囲のランダム構造のデンドリマーピロリドンアミン(PyraM)メガマーは、任意のアミン末端デンドリマー上の第一級アミン成分(X)及び(ITA又はITE)成分(Y)の化学量論を調整することにより、容易に生成される。より特定には、上記表1に示されるようにPAMAMデンドリマーの関数として、それらの(X)及び(Y)の調節は、ランダム構造のPAMAM-PyraMメガマーに導くことであろう。Y>Xである場合、メガマーは、表面上でピロリドンの優勢を提供するであろう。X>Yである場合、メガマーは、第一級アミン基の優勢を提供するであろう。それらのメガマーは、図8に示される。

【0120】

30

構造的に編成されたメガマー：コア-シェルテクト(デンドリマー)：

図9(A)は、編成されたメガマーとしてのコア-シェルテクト(デンドリマー)を示し；(B)は、ピロリドン部分がシェル試薬に存在する、高反応性メガマー表面を示す。

【0121】

本発明は、特定カテゴリーの4-15員のアミド、ウレア、ウレタン及びアミドアミノ複素環分子について観察される新規の予想外の特性、及び幅広い医療及び商業用途のために価値があり、且つ有用である、末端樹枝状、官能化された線状又は架橋ポリマーへのそれらの使用に関する。前記分子は、強い非従来の固有蛍光を有するトレーサー(上記に定義される)として有用である。

【0122】

40

非従来の固有蛍光(NTIF)材料は一般的に、高い多重度の第三級アミンを含むポリマー材料であることが認識されている。それらは当初、デンドリマー構造からのみ由来すると考えられており；しかしながら、NTIF現象はすべての4種の主要構造カテゴリーにおいて観察されていることが現在、知られている。

【0123】

それらのNTIF現象は、低分子量有機構造体、例えば従来のフルオロフォア、例えば従来のフルオロフォアに記載されるそれら(上記カテゴリーI)においては観察も又は報告も決してされていない。本発明は、従来の蛍光材料の属性又は特性のいずれも有さないが、300~800nmの間の蛍光発光をまだ示す小分子有機材料のクラスに関する。1つの非常に重要な識別特性は、それらが一般的に、非芳香族の低分子量構造(基本単位<

50

500 da) を含み、そして光退色に対して堅牢であると思われる低毒性の非免疫原性成分により特徴づけられることである。さらに、それらは、個々の小 N T I F 構造として独立して使用されるか、又は広範囲の有機 / 無機ポリマー格子又はナノ粒子中に組み込まれ得る、診断、美白剤、日焼け止め、法医学、LED、薬物送達、生物学的細胞標識及びイメージングにおいて有用な蛍光発光特性又は高い価値及び重要性を生むことができる。そのような N T I F ナノ粒子の例は、デンドリマー上の末端基としてのそれらの小構造フルオロフォアの使用である。それらの N T I F フルオロフォアはナノスケールからマイクロスケールまで変化する基質への電荷中和により、重合され、結合され、そして / 又は付着され得る。それらは、ナノメートル (ナノメーター) からマイクロスケール (メーター) の範囲の寸法を有する基質上にそれらのフルオロフォアの高い倍数を関連づけることにより増強される価値ある発光蛍光特性を示すビルディングブロックである。それらの発光特性は、重合、結合、凝集、超分子アセンブリー、電荷中和により及び物理的に、それらのフルオロフォアの大きな倍数を関連づけることにより、増強され得る。

10

20

30

40

50

【0124】

デンドリマー又は他のポリマー足場に結合さえされていない、広範囲の種類の単純な低分子量 (すなわち、 < 700 ダルトン) の N - 置換 - 4 - カルボアルコキシ / カルボン酸官能化ピロリドン化合物 (すなわち、環状アミド型複素環) が試験される場合、それらは、可視近赤外領域 (すなわち、 $400 - 850$ nm) における発光を伴う、有意な非従来の蛍光 (N T F) / 固有蛍光 (I F) を示す。それらの発光は、特手の電子求引 / 供与基の有無により影響されると思われる。例えば、そのような基は、ヒドロキシル、アミノ、カルボキシル、アミド、ウレア、カルバメート (すなわち、ウレタン) である。それらの単純ピロリドン誘導体は、それらの N T F フルオロフォアの広範囲の無機 / 有機粒子又は足場、例えばシリカ、炭素、金属、合成ポリマー、タンパク質、DNA / RNA、ウィルス及び他のものへの結合を可能にする種々のコネクター官能性を有する。

【0125】

驚くべきことには、それらの単純ピロリドンベースの N T I F フルオロフォアの吸収 / 発光特性は、商業的に有意な蛍光増白剤 (F W A) のために必要とされる非常に所望の特徴と非常に密接に一致する。本質的に、F W A の目的は、UV 光を吸収し、そしてそのエネルギーを、より高い波長の可視光 (すなわち、青色領域) に転換する蛍光化合物を使用することである。このようにして、基質の黄色の外観が、蛍光化合物による対応する量の青紫色光の発光により補正され得る。蛍光剤の有効性は、光源における紫外線の存在に依存する。

【0126】

F W A は、多くの大規模商業用途、例えば次のものに使用される：織物 / 布 / 歯科用ホワイトナー、歯科用複合材、パーソナルケア、塗料、紙コーティング、インク、合成ポリマー、コーティング、天然ポリマー (すなわち羊毛 / 絹及び他のもの)、化粧品、微小な漏れ (すなわち、接着剤 / シーラント) の検出のための蛍光トレーサー、フィルム、表面、膜又は他の基質又は薬物送達用途 (すなわち、siRNA、DNA、腫瘍学、他の生物医学的役割など) のためのトレーサーとしてナノ気孔を画定するための蛍光キャリブレーター。F W A の最大の用途は、洗剤においてであり、そしてほとんどの市販の洗剤は、1 又は 2 以上の F W A を、 $0.05 \sim 0.3$ 重量 % の割合で含む。

【0127】

それらの現在の N T I F - F W A は、以下の分野において強化された特性を示すことが予測され：低い細胞毒性、低い光毒性、生分解性、非免疫原性、基質に対する保持又は拒絶、消光、貯蔵安定性、そして多くの現在の従来の UV 吸収剤及びフルオロフォアとコスト競争力があり；多くの生命科学 / 医療用途における適用、例えば遺伝子トランスフェクション及び他の薬物送達役割 (すなわち、生体適合性トレーサー) におけるそれらの使用のために適切な広範囲の非常に調整可能な化学成分をまだ提供する。

【0128】

ピロリドン化

過去70年の間に50万人を超えるヒト受容体においてPVPのインビボ使用に関する広範且つ非常に肯定的な歴史に基づいて、PEGの代替物として、このポリマー組成物の欠点の是正に非常に活発な関心が存在している[F.M.Veronese et al., J. Bioactive Compatible Polym., (1995), 10, 103-12], 及び Macromolecular Chem. Phys, (1999), 195, 9-79]。それらの努力は、主に、連鎖移動重合プロトコルを用いることにより、高MW (すなわち、 $> 50 \text{ KDa}$) PVP画分を回避することに向けられて来た[Torchillin et al., Biomaterials, (2001), 22, 3035-3044]。不運なことには、得られた生成物は、非常に多分散され、そして一般的に、治療薬物への共有結合のための適切な機能性を欠いていた。最近の別の努力によれば、Pfisterなど、[米国特許第6,080,397号(2000)]は、市販のPVPの限外濾過により高分子量画分を除去しようと試みたが、完全には成功しなかった。市販のPVPのそれらの広く認識されている欠点を改善するそれらの失敗は、最近、Login et al., (www.rloginconsulting.com/...pyrrolidone%20backbone%20polymers.pdf) により強調表示されており、これは、主鎖にペンダントされたピロリドン環を有する生成物を生成するフリーラジカル重合法の使用に対して、ポリマー主鎖中への非常に所望するピロリドン環の導入のために、縮合重合戦略が考慮されるべきであることを示唆している。

10

【0129】

N - 置換 - 4 - カルボキシ - アルキレート / アリレートピロリドンの合成のための一般的手順

適切なアルキル又はアリアルアミン(0.05モル)を、磁気攪拌機を備え、そして15mlの無水メタノールを含む、100mlの丸底フラスコ中に計量した。15mlの無水メタノールに溶解された適切なジアルキル / ジアリアルイタコネート(0.05モル / 第一級アミン部分)を、攪拌下で、10分間にわたって滴下した。場合によっては、適度な発熱が認められた。反応を、RTで1時間、攪拌し、続いて、8~10時間、還流した。最終生成物を、Buchiローター蒸発器による溶媒の除去により得、75~98%の範囲の収率を伴って、固形物、液体又はシロップを得た。それらの構造については、実施例中の表2及び図3A - 3Bを参照のこと。それらの最終生成物を、FTIR、 ^1H -、 ^{13}C -NMRにより特徴づけた。それらのUV - 可視 / 蛍光特性を、蛍光分光計(Molecular DevicesからのSpectramax)により評価し、実施例中の表2に記載のデータを得た。

20

【0130】

N - 置換 - 4 - カルボン酸ピロリドンの合成のための一般的手順

イタコン酸(Sigma-Aldrich)(0.05モル / 第一級アミン部分)を、磁気攪拌機を備えた100mlの丸底フラスコ中に計量した。攪拌下で、適切なアルキル又はアリアルアミン(0.05モル)を、10分間にわたって滴下した。場合によっては、適度な発熱が液体溶融物への転換で認められたが、他の場合、各反応物は固体のままであり、そして密接に混合された。フラスコ及び反応混合物を、還流冷却器にかけ、そして油浴に浸漬し、そして125℃で2 - 5時間、加熱した。反応からの水凝縮物の形成は、冷却器内で気づくことができる。次に、25mlの部分の無水メタノールを添加し、そして反応混合物を1時間、還流した。Buchiローター蒸発器上での溶媒の除去により、59~95%の範囲の収率で、油状物、シロップ又は固形物として、所望するピロリドンを生成する。それらの最終生成物を、Thomos-Hoover毛細管融点装置、FTIR及び ^1H -、 ^{13}C -NMRを用いることにより特徴づけた。それらのUV - 可視 / 蛍光特性を、蛍光分光計(Molecular DevicesからのSpectramax)により評価し、表2に記載のデータを得た。

30

40

【0131】

官能化樹枝状ポリマー

カルボキシレート末端PAMAMデンドリマーが、弱い、しかし検出できる蛍光を有する最初の報告は、2001年に登場した(Larson and Tucker, Applied Spectroscopy, 2001, 55, 679-683)。それぞれ、380及び440nmの最大励起及び発光を有する広いピークが観察された。蛍光の正確な性質は十分には理解されていないにもかかわらず、著者らは、樹枝状構造を通してアミド基からn^{*}への遷移に起因する可能性があるこ

50

とを主張した。G 2 及び G 4 アミノ末端 P A M A M デンドリマーからのより強い蛍光発光が、後に、非常に類似する励起及び発光波長で観察された (Wang and Imae, J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 13204- 13205)。G 2 及び G 4 P A M A M デンドリマー両者は、有意な pH - 依存性蛍光特性を示した。発光は、5 よりも低い pH の酸性条件下で検出できた。蛍光強度とデンドリマー濃度との間の線状関係が観察された。デンドリマー固有の青色蛍光を観察するのに必要とされる不適切な低 pH 値は、実質的に、生物学的システムにおけるその適用性を制限する。

【 0 1 3 2 】

その後、たぶん第三級アミンの酸化による酸化処理 (Wang et al., J Colloid Interface Science, 2007, 306, 222-227) に基づいて、劇的に増強され得ることが見出された。従って、G 4 P A M A M デンドリマーを、過流酸アンモニウムにより処理し、その固有蛍光を増強した。そのような調製されたデンドリマーは、遺伝子送達及びバイオイメージングを同時に可能にする 3 種のアンチセンスオリゴヌクレオチドのキャリアとして使用された (Tsai et al., Biomacromolecules, 2011, 12, 4283-4290)。

10

【 0 1 3 3 】

ポリ (アミドアミン) (P A M A M) デンドリマーの表面上に提示されるような、タンパク質とポリ (ピロリドン) 部分との低毒性及び最小相互作用の最近の確認は、Klajnert et al. (Nanomedicine, NBM, 2012, 8, 815-817; Nanomedicine, NBM, 2013, 9, 461-464) により報告されている。現在、P V P は、体外受精プロトコル (www.coopersurgical.com) のために精子を固定するためのアジュバントとして使用される。

20

【 0 1 3 4 】

本発明は、その標準表面化学 (すなわち、エステル、アミノ、ヒドロキシル、カルボン酸) は、官能化されたデンドリマーについて観察される「固有蛍光」(I F) の劇的な増強を導いて来た、アミノ、アミド、イミノ、エーテル、エステル、ケト、カルボン酸又はチオエーテル官能基 (但し、それらだけには限定されない) を含む種々の複素複素環式又は大環状部分に転換することにより、P A M A M デンドリマー (G = 0 ~ 6) の表面を修飾する。例えば、図 2 (a) に示されるような、デンドリマーアミン末端基の 4 - カルボメトキシピロリドンへの転換は、アミン末端デンドリマー前駆体に比較して、1.8 倍以上、固有蛍光を増強した。この劇的に増強された I F が生物学的細胞のイメージング / 標識を可能にし ; ところが、非複素環式官能化デンドリマーは、細胞イメージング / 標識のために使用するのには弱過ぎる、非常に低い蛍光発光強度を示す。類似する結果が、図 2 (b)、(c)、(d) 及び (e) に記載されるように、他の複素環式及び大環状部分について観察された。

30

【 0 1 3 5 】

より特定には、本発明は、官能化された 2 - ピロリドン、2 - アザ - シクロヘプタノン、又は 2 - アゼチジノン - 末端樹枝状ポリマーについて観察される、新規の非従来の蛍光 (N T F)、ステルス (すなわち、非免疫原性) 及び増強された温度安定化特性に関する。ピロリドンの 4 - カルボキシアシルコキシ、4 - カルボキサミド又は 4 - カルボン酸誘導体の好ましい例は、前駆体第一級アミン (例えば、- N H₂) - 末端樹枝状ポリマーと、特定の官能化メタクリレートエステル、メタクリル酸又はメタクリルアミド試薬とを反応させ、エステル、カルボン酸又はアミド置換された 2 - ピロリドン部分により終結又は官能化された、又はその両者の何れかである新規の樹枝状、線状、分岐状又は架橋されたポリマーを生成することにより得られる。それらのピロリドン末端デンドリマーは、8 月 19 日に公開された国際公開第 2 0 0 4 / 0 6 9 8 7 8 号に記載される方法により製造される。

40

【 0 1 3 6 】

他の類似の及び適切な小 ~ 大 (4 ~ 15 員) の複素環式部分、例えば 2 - アゼチジノン、2 - ピペリドン、2 - アザ - シクロヘプタノン又は大環状アミドアミン部分は、文献に記載される種々の合成方法を用いて、樹枝状又は架橋ポリマーの表面末端で直接的に、又は線状又は分岐状ポリマーにより提示される適切な官能基を介して導入され得る。それら

50

の複素環式官能基は、本明細書では集合的には、「イドン (idones) 」と呼ばれる。

【 0 1 3 7 】

本発明はさらに、エステル、酸又はアミン反応試薬と、それらの「イドン - 末端 / 官能化」ポリマーとの反応により、それらの新規 N T F、ステルス又は増強された温度安定性を示し、そして表す新規の「混合された官能性」の樹枝状ポリマー材料の提供を具体化する。

【 0 1 3 8 】

本発明は、本明細書に記載されるように、NanoSynthons LLC /The National Dendrimer & Nanotechnology Centerでの未発表の研究に基づいて、次の前例のない結果を示している：

・「ジアミノブタン - コア」；アミン末端 P A M A M デンドリマー（すなわち、G = 0 ~ 6）の、4 - カルボメトキシピロリドン末端 P A M A M デンドリマー（4 - C P - P A M A M）（すなわち、G = 0 ~ 6）への転換のための高収率（すなわち、93 - 98%の収率）の容易な合成工程（すなわち、1 - 工程）が、行われ、そしてマルチグラム量まで都合良くスケールアップされて来た。

【 0 1 3 9 】

・「シスタミン - コア」；アミン末端 P A M A M デンドリマー（すなわち、G = 0 ~ 6）の、4 - カルボメトキシピロリドン末端 P A M A M デンドリマー（4 - C P - P A M A M）（すなわち、G = 0 ~ 6）への転換のための高収率（すなわち、90 - 98%の収率）の容易な合成工程（すなわち、1 - 工程）が、定義され、そしてマルチグラム量まで都合良くスケールアップされて来た。

【 0 1 4 0 】

・4 - カルボメトキシピロリドン末端化 P A M A M デンドリマー（すなわち、G = 4 . 0）は、対応するアミン末端 P A M A M デンドリマー（すなわち、G = 4 . 0）に比較して、酸化剤又はより低い pH 調整を必要としないで、18倍以上の高い N T F 発光強度を示すことが示されている。実施例における表 2 を参照のこと。

【 0 1 4 1 】

・4 - C P - P A M A M デンドリマー（すなわち、G = 4 . 0）は、まだ定義されていないエンドサイトーシス機構により生物学的細胞に侵入することが実証されており、そして3種の異なった細胞系において細胞質ドメインの好都合なイメージングを可能にするのに十分な N T F 発光強度を示した（Lodz大学）。実施例 1 及び図 6 を参照のこと。

【 0 1 4 2 】

・4 - C P - P A M A M デンドリマー（すなわち、G = 0 ~ 4）は、非常に低い細胞毒性、及び「補体活性化」特徴を実質的に示さないことが示されている。実施例 1 を参照のこと。

【 0 1 4 3 】

・30以上の単純ではあるが、異なった4 - カルボメトキシ / カルボン酸ピロリドン誘導体が、合成され、特徴づけられ、そして可視 ~ 近赤外領域（すなわち、400 - 750 nm）の範囲の最大発光を有する有意な N T F 発光特性を示すことが示されている。実施例における表 2 を参照のこと。理論に縛られることは望まないが、それらの最大発光は、適切な励起波長の選択及び適切なピロリドン構造企画の組み合わせにより容易に企画され、そして制御されると思われる。

【 0 1 4 4 】

・この N T F 現象は、そのような単純な低分子量ピロリドン構造又は官能化デンドリマーについては、決して報告されたことはない。それは、これまで非毒性システムにおいては達成できなかった多くの用途に必要な発光強度を有する。

【 0 1 4 5 】

・それらの単純な4 - カルボメトキシ / カルボン酸ピロリドン誘導体は、N T F 及び他の細胞標識評価のための広範なデンドリマー及び他のポリマー構造への結合を可能にするのに適切な化学官能基を有する。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 6 】

式 (I) 又は式 (II) の化合物を用いて、蛍光により、種々のシステム、試験、植物又は動物及びヒトにおける部分及び流体を追跡し、そして蛍光により前記部分の位置をモニタリングするか、又は検出する方法。

【 0 1 4 7 】

デンドリマー表面基の修飾は、デンドリマーの毒性を低減するために一般的に適用される方法である。そのような修飾は、4 - カルボメトキシピロリドン表面基を有するポリアミドアミン (P A M A M) デンドリマーを開発したTomaliaなど、により提案されている (国際公開第 2 0 0 4 / 0 6 9 8 7 8 号、2 0 0 4 年 8 月 1 9 日) 。このデンドリマーの生体適合性は、評価されている (Ciolkowski et al., Nanomedicine NBM, 2012, 8, 815-817; Janaszewska et al., Nanomedicine NBM, 2013, 9, 461-464) 。ヒト血清アルブミンとのデンドリマーの相互作用する能力、その溶血活性、及びマウス神経芽腫細胞系 N Z a に対する毒性効果を分析した後、カルボメトキシピロリドン表面基を有する P A M A M デンドリマーは、アミン表面基を有する未修飾 P A M A M デンドリマーと比較して、卓越した特性を示すという結論を導くことが可能であった (Ciolkowski et al., NBM, 2012, 8, 815-817) 。

10

【 0 1 4 8 】

修飾されたデンドリマーの生体適合性に対するさらなる研究は、ナノ医療における適用の可能性が確認された。以下の3種の齧歯細胞系：チャイニーズハムスター繊維芽細胞 (B 1 4) 、胚性マウスに海馬細胞 (m H i p o E - 1 8) 及びラット肝臓由来の細胞 (B R L - 3 A) を用いて、修飾されたデンドリマーが細胞アポトーシスを誘発せず、反応性酸素種 (R O S) 生成を引起さず、そしてミトコンドリア膜電位を変えなかったことが示されている (Janaszewska et al., Nanomedicine NBM, 2013, 9, 461- 464) 。一般的に、すべての3種の細胞系に関しては、デンドリマーは非毒性であった。そのような結果は、デンドリマーが細胞に侵入するか否かの疑問を生じさせる。この疑問に対処するために、同じ3種の齧歯細胞系に対する修飾された P A M A M - ピロリドンデンドリマーの取り込みが行われた。デンドリマーが細胞に侵入かどうかのモニタリングが、ピロリドン - 修飾 P A M A M デンドリマーのユニーク特性のおかげで可能であり：それらは、強い固有蛍光 ($\text{exc} = 370 \text{ nm}$ 、 $\text{exc em} = 440 \text{ nm}$) を有する。

20

【 0 1 4 9 】

本発明はさらに、次の実施例を考慮することにより、明確にされるが、それらは本発明の純粋な例示であることが意図される。

30

【 実施例 】

【 0 1 5 0 】

実施例に使用される材料及び方法

材料

すべての化学試薬は、市販の供給元から購入された。

デンドリマーの合成のための溶媒は、Sigma - Aldrichから購入された。

すべての細胞培養試薬は、Gibco (商標) (Germany) から購入された。

インビトロ研究のためのフラスコ及び多ウェルプレートはNunc (Germany) から得られた。

40

共焦点顕微鏡のためのSensePlate (商標) 9 6 - ウェルガラス底プレートは、Greiner Bio=One (USA) からであった。

P B S 及び F B S は、Sigma-Aldrichから購入された。

トリパンプルーは、Molecular Probes (USA) から購入された。

NeuroDio及びRedDot1は、Biotium (USA) から購入された。

【 0 1 5 1 】

チャイニーズハムスター線維芽細胞 (B14 ; ATCC番号CCL - 1 4) 細胞系は、A T C C (U S A) から購入された。胚性マウス海馬細胞系 (m H i p p o E - 1 8) は、CEDARLAN E Laboratories Limited (Canada) から購入された。ラット肝臓細胞系 (B R L - 3 A)

50

は、Banca Biologica e Cell Factory (Italy)から購入された。

【0152】

蛍光データは、Perkin- Elmer LS50B Luminescence分光計により取得した。一定のスリット幅（励起及び発光の両者 - 3 nm）を使用し、そして濃度を調整し、スケール発光応答を得た。発光応答を、濃度で割り算し、1 g当たりの応答を与え、そして標準のフルオレセイン - Naの相対的応答を、1, 000, 000に設定するために、倍率を掛けた。

Perkin Elmerからのフーリエ変換赤外分光法（FTIR）1600。

Anasazi 60 HMz NMR

【0153】

すべての生成物はまた、メタノール中、Sephadex LH - 20を用いて精製され得る。ここで使用されるカラムは、約400 gの無水Sephadex LH-20を有する。デンドリマーサンプルに使用される空隙容量は、300 mlである。画分は、それぞれ、約18 mlを、試験管（20 mlの管）に採取した。それらの条件下で、G = 0は、最初、画分6又は7で出現し、そしてG = 5は、画分2又は3で出現する。画分を、シリカゲルTLCプレートを用いてモニターする。プレート上に2本のラインを描き、各ラインを0.5 cmの間隔でマークし、そして各画分を、あらゆる他のマーク上にスポットする。プレートを、単にヨウ素チャンバーに配置する。生成物を含む画分を集め、そして回転蒸発器上で除く。

10

【0154】

一般的合成スキーム

ピロリドン末端PAMAMデンドリマーの合成を、Tomalia et al. (W02004/069878, published 19 August 2004)の方法により行った。国際公開2004/069878号により記載される類似する事項において、すべての樹枝状ポリマー、例えばデンドロン、デンドリマー、デンドリグラフト、コア - シェルテクト（デンドリマー）、末端第一級アミンを有する超分枝ポリマーを、実施例1 - 25を包含するこの方法で反応させることができる。次の表2及び実施例1においては、それらの化合物は、この方法により製造された。一般方法及び特定の例は、番号付けされている。比較例は文字にされている。実施例1は、類似する方法により、論じられた効用において試験された化合物を製造する方法を示す。

20

【0155】

実施例1：第一級アミンからのN - アルキル - 4 - カルボメトキシピロリジノンの一般的調製

30

カルボン酸に対して直交反応性を示す種々の官能基を含むモノ第一級アミン（すなわち、 $-NH_2$ ）を、対応する4 - カルボン酸ピロリドンに、高収率で転換することができる。それらの生成物は、Dean - Stark装置を用いて、約125 °Cで、トルエンの存在下で種々の化学量論的量の第一級アミン及びカルボン酸を加熱することにより得られた。予測される化学量論的量の水の除去の後（約2 ~ 3時間後）、生成物を、UV線（265 ~ 395 nm）に暴露される場合、若干のレベル / 程度の蛍光を示す、吸湿性の粉末球固形物又は脆いガラス状物として得る。生成物を、FTIR、 1H -NMR、 ^{13}C -NMR及びUV / 可視蛍光測定法により特徴づけた（図3C、化合物26 - 37、表2）。

40

【0156】

化学量論：[第一級アミン部分：ITA] = [1 : 1]は、式(I)の化合物を提供し、ここでWは1であり； R^2 は $-CO_2H$ であり；mは1であり；そしてQはX - R - Nであり；そして[第一級アミン部分：ITA / ITE] = [4 : 1]は、式(I)の化合物を提供し、ここでWは1であり； R^2 は $-CO_2H$ であり；mは1であり；そしてQはR(X)Nであり、ここでRは $C_2 - C_{18}$ アルキレン、 $-(NHCH_2CH_2)_n$ 、アリーレン、アルキルアリーレン、オリゴマー、大環状、融合された二環、線状ポリ（アミド）であり、nは0、1 ~ 4であり；そしてXは、 $-OH$ 、 $-NR^2$ 、 NHR 、 $-SH$ 、 $-CO_2H$ である。それらの化合物をさらに反応せしめ、線状ポリマーにピロリドン環を含むポリマーを、又は2つのピロリドン部分を含む複素環式実体として形成することがで

50

きる。より特定には、反応は次の通りに記載され得る。

【0157】

15 ml のメタノールに溶解された 0.5 mmol の第一級アミンの溶液に、50 mmol の DMI (7.9 g) を添加した。溶液を、RT で一晚、攪拌し、そして次に、溶媒を、真空下での蒸留により除去し、所望の生成物を得た。図 3 C 上の構造、化合物番号 26-37、及び表 2 中のデータを参照のこと。

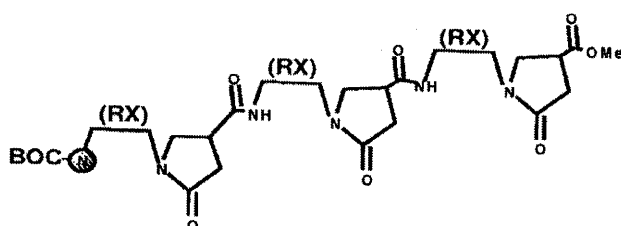
【0158】

それらの中間体の続く反応は、PEG 及びポリ(オキサゾリン)タイプのオリゴマーに類似すると思われる、予測される線状-ポリ(アミド-ピロリドン)(PAMPyr)高分子を生成する。例えば、モノ-BOC-NR(X)NH₂ 開始剤単位、続く DMI 及び過剰の NH₂R(X)NH₂ による線状反復成長により、数回の反復の後に下記に示される一般構造を有する高分子が得られる：

10

【0159】

【化22】



20

【0160】

しかしながら、得られる主要生成物タイプは、R のスペーサー長に依存すると思われる。スペーサー長 R が長い場合、得られる主要生成物は、線状-ポリ(アミド-ピロリドン)(PAMPyr)高分子であると思われる。スペーサー R が分子内環形成に適している場合、図 3 D に示されるような融合された二環式ピロリドン生成物及び/又は大環状ピロリドン生成物(化合物 40 及び 41)のいずれかを得ることができる。

30

【0161】

実施例 2：第一級アミンからの N-アルキル-ピロリジノン-4-カルボン酸の一般的調製

50 mmol の ITA (6.5 g) に、50 mmol の第一級アミンを添加した。その混合物を、125 で 2 時間、加熱した。その混合物を、メタノールと共に粉碎し、濾過により単離し、白色沈殿物を得た。

【0162】

実施例 3：n-アルキル-カルボメトキシピロリドンからの N-アルキル-ピロリジノン-4-(N-2-アミノエチル)カルボキサミドの一般的調製

メタノール(50 重量%)中、N-アルキル-4-カルボメトキシピロリドンの溶液を、攪拌しながら、過剰の EDA (1 モルのエステル当たり 2.5 モル)に添加した。その溶液を、RT で 4 日間、維持した。過剰の EDA を、真空下で除去し、続いて真空下でトルエンと共に共沸蒸留し、所望の生成物を得た。

40

【0163】

実施例 4：N-アルキル-カルボメトキシピロリジノンからの N-アルキル-ピロリジノン-4-(N-2-(ビス(2-アミノエチル)アミノエチル)カルボキサミド)の一般的調製

メタノール(50 重量%)中、N-アルキル-4-カルボメトキシピロリジノンの溶液を、攪拌しながら、過剰の TREN (1 モルのエステル当たり 2.5 モル)に添加した。その溶液を、RT で 4 日間、維持した。過剰の TREN を、水による希釈により除去し、そして 1 kDa のカットオフ再生セルロース膜を用いて限外濾過し、所望する生成物を得た

50

。

【 0 1 6 4 】

注目：上記のように、第一級アミンとDMIとを反応させ、4 - (N - 2 - (ビス (2 - アミノエチル) アミノエチル) カルボキサミドピロリドン) を得、続いて過剰の T R E N と反応させることから成る反復順序の使用が、一連の P A M P y r A M デンドロンについての生成順序を生成する。それらのデンドロンは、カテゴリー (I V) ; [コア] ; 樹枝状ポリ (アミド) ピロリドンアミンデンドロンにより図 1 0 に表される。

【 0 1 6 5 】

実施例 5：第一級ジアミンからのポリマー N - アミノアルキル - ピロリジノン - 4 - (N - アミノアルキル) カルボキサミドの一般的調製

1 5 m l のメタノールに溶解された、5 0 m m o l の第一級ジアミン (例えば、E D A 3 . 0 g) の溶液に、5 0 m m o l の D M I (7 . 9 g) を添加した。その溶液を、R T で 4 時間、攪拌し、そして次に、溶媒を、真空下での蒸留により除去し、所望する生成物を得た。

【 0 1 6 6 】

2 モルのジアミンと、1 モルのイタコン酸との化学量論的反応由来の 2 , 4 - ジアミノピロリドンと、1 モルのアミノ酸と、イタコン酸との反応由来する 2 , 4 - ジカルボン酸ピロリドンと組合して、中間体として使用することができ、ポリ (エチレングリコール) の線状 - ポリ (アミド - ピロリドン) 模倣体であると思われる、その対応する 線状 - アミド - ピロリドン (すなわち、アミド - ピロリドンナイロン) を生成する。 (図 3 D、化合物 3 8 及び 3 9 を参照のこと) 。

【 0 1 6 7 】

第一級アミン部分：イタコン酸 / エステル = 4 : 1 の化学量論では、その対応する二置換ピロリドン (すなわち、2 - (N H ₂ - R (X)) - 4 - (C O N H - R (X) - N H ₂) ピロリドン) を、下記のようにして得ることができる：

N H ₂ - R (X) N H ₂ + イタコン酸 / エステル 2 - (N H ₂ - R (X)) - 4 - (C O N H - R (X) - N H ₂) ピロリドン

【 0 1 6 8 】

それらの 2 , 4 - 二置換ピロリドン生成物の例は、図 3 D、化合物 4 2 及び 4 3 に示される。

【 0 1 6 9 】

第一級アミン表面デンドリマー及びジメチルイタコネーとからの P A M A M ピロリジノン表面の調製

【 0 1 7 0 】

実施例 6：[コア : D A B] ; (4 2) ; デンドリ - { ポリ (アミドアミン) - (P y r - 4 - C O ₂ M e) ₄ } ; (G = 0) ; P A M A M デンドリマー ; M W = 1 0 4 9

5 に冷却されたメタノール 5 m l 中、D M I (1 . 3 g、8 . 2 m m o l、1 0 % 過剰) の攪拌混合物に、2 ~ 3 分間にわたって、メタノール 5 m l 中、[D A B コア] ; デンドリ - { ポリ (アミドアミン) - (N H ₂) ₄ } ; (G = 0) ; (P A M A M) デンドリマー (1 . 0 g、1 . 8 m m o l、7 . 3 m m o l のアミノ基) の溶液を滴下した。その混合物を、R T に暖め、そして 2 4 時間、攪拌した。反応混合物を、T L C プレート上にスポットし、そしてニンヒドリン溶液により染色し、負の試験を得た。反応混合物を、B u c h i 回転蒸発器を用いて揮発物を除去した。得られる残渣を、1 0 m l の水に溶解し、そしてジエチルエーテル (3 x 5 m l) により洗浄した。水性層を、揮発物から除去し、そして得られる残渣を、1 0 m l のメタノールに再溶解した。揮発物を、B u c h i 回転蒸発器を用いて、このサンプルから除去した。この工程を 3 度、反復し、高い真空下での最終溶媒除去の後、以下のスペクトルを有する 1 . 8 g (9 6 % の収率) の標記化合物を得た：

【 0 1 7 1 】

¹³CNMR (75MHz, D20) 23.32, 32.00, 33.72, 35.62, 36.22, 41.94, 48.64, 49.55,

10

20

30

40

50

52.35, 52.79, 174.55, 175.43, 176.75。

【0172】

実施例 7：[コア：DAB]；(4 2)；デンドリ - {ポリ(アミドアミン) - (Py r - 4 - CO₂Me)₄}；(G = 1)；PAMAMデンドリマー；MW = 2466

5 に冷却されたメタノール 5 ml 中、DMI (1.9 g、12 mmol、10% 過剰) の攪拌混合物に、2 ~ 3 分間にわたって、メタノール 5 ml 中、[DAB コア]；デンドリ - {ポリ(アミドアミン) - (NH₂)₈}；(G = 1)；(PAMAM) デンドリマー (2.0 g、1.4 mmol、11 mmol のアミノ基) の溶液を滴下した。この混合物を、RT に暖め、そして 24 時間、攪拌した。反応混合物を、TLC プレート上にスポットし、そしてニンヒドリン溶液により染色し、負の試験を得た。反応混合物を、回転蒸発器を用いて揮発物を除去し、そして得られる残渣を、10 ml の水に溶解した。この混合物を、ジエチルエーテル (3 x 5 ml) により洗浄した。水性層を、揮発物から除去し、そして得られる残渣を、10 ml のメタノールに再溶解した。揮発物を、回転蒸発器を用いて除去した。この工程を 3 度、反復し、高い真空下での最終溶媒除去の後、以下のスペクトルを有する 3.3 g (95% の収率) の標記化合物を得た：

10

【0173】

¹³CNMR (75MHz, D2O) 23.32, 32.41, 33.74, 35.66, 36.25, 36.61, 41.96, 48.79, 49.83, 51.08, 52.80, 174.69, 175.42, 176.73。

【0174】

実施例 8：[コア：DAB]；(4 2)；デンドリ - {ポリ(アミドアミン) - (Py r - 4 - CO₂Me)₁₆}；(G = 2)；PAMAMデンドリマー；MW = 5300

20

5 で冷却されたメタノール 10 ml 中、DMI (2.5 g、16 mmol、10% 過剰) の攪拌混合物に、2 ~ 3 分間にわたって、メタノール 15 ml 中、[DAB コア]；デンドリ - {ポリ(アミドアミン) - (NH₂)₈}；(G = 2)；(PAMAM) デンドリマー (3.0 g、0.91 mmol、14.6 mmol のアミノ基) の溶液を滴下した。この混合物を、RT に暖め、そして 24 時間、攪拌した。反応混合物を、TLC プレート上にスポットし、そしてニンヒドリン溶液により染色し、負の試験を得た。反応混合物を、回転蒸発器を用いて揮発物を除去し、そして得られる残渣を、20 ml の水に溶解した。この混合物を、ジエチルエーテル (3 x 5 ml) により洗浄した。水性層を、揮発物から除去し、そして得られる残渣を、10 ml のメタノールに再溶解した。揮発物を、回転蒸発器を用いて除去した。この工程を 3 度、反復し、高い真空下での最終溶媒除去の後、4.6 g (95% の収率) の標記化合物を得た。

30

【0175】

第二の精製工程において、反応混合物を、メタノールにおいて 100 ml に希釈し、そして限外濾過し、1000 分子量カットオフの再生セルロース膜を含む正接流限外濾過装置を用いて、8 つの保持量の透過物を得た。保持物を、回転蒸発器を用いて揮発物を除去し、続いて高い真空下で除去し、4.6 g (95% の収率) の標記化合物を得た。

【0176】

標記化合物は、次のスペクトルを有する：

¹³CNMR (75MHz, D2O) 32.38, 33.70, 35.59, 36.20, 36.55, 41.92, 48.73, 48.81, 49.52, 51.06, 52.74, 174.38, 174.63, 175.35, 176.68。

40

【0177】

実施例 9：[コア：DAB]；(4 2)；デンドリ - {ポリ(アミドアミン) - (Py r - 4 - CO₂Me)₃₂}；(G = 3)；PAMAMデンドリマー；MW = 10969

5 で冷却されたメタノール 15 ml 中、DMI (3.2 g、20.3 mmol、10% 過剰) の攪拌混合物に、2 ~ 3 分間にわたって、メタノール 15 ml 中、PAMAM デンドリマー、DAB コア、G = 0 (4.0 g、0.58 mmol、18.5 mmol のアミノ基) を滴下した。この混合物を、RT に暖め、そして 24 時間、攪拌した。反応混合物を、TLC プレート上にスポットし、そしてニンヒドリン溶液により染色し、負の試験を得た。反応混合物を、回転蒸発器を用いて揮発物を除去し、そして得られる残渣を、3

50

0 ml の水に溶解した。この混合物を、ジエチルエーテル (3 × 5 ml) により洗浄した。水性層を、回転蒸発器を用いて、揮発物から除去し、続いて高い真空下で除去し、6.0 g (94% の収率) の標記化合物を得た。

【0178】

第二の精製工程において、反応混合物を、メタノールにおいて 100 ml に希釈し、そして限外濾過し、1000 分子量カットオフの再生セルロース膜を含む正接流限外濾過装置を用いて、8 つの保持量の透過物を得た。保持物を、回転蒸発器を用いて揮発物を除去し、続いて高い真空下で除去し、6.0 g (94% の収率) の標記化合物を得た。

【0179】

標記化合物は、次のスペクトルを有する：

¹³CNMR (75MHz, D₂O) 32.43, 32.60, 33.71, 35.62, 36.22, 36.60, 41.95, 48.76, 48.84, 48.94, 49.54, 51.08, 52.77, 174.35, 174.63, 175.33, 176.65.

10

【0180】

実施例 10：[コア：DAB]；(4 2)；デンドリ - {ポリ(アミドアミン) - (Pyrr - 4 - CO₂Me)₆ }；(G = 3)；PAMAM デンドリマー；MW = 22,307

5 で冷却されたメタノール 20 ml 中、DMI (4.7 g、30 mmol、10% 過剰) の攪拌混合物に、2 ~ 3 分間にわたって、メタノール 25 ml 中、PAMAM デンドリマー、DAB コア、G = 0 (6.0 g、0.24 mmol、27 mmol のアミノ基) を滴下した。この混合物を、RT に暖め、そして 24 時間、攪拌した。反応混合物を、TLC プレート上にスポットし、そしてニンヒドリン溶液により染色し、負の試験を得た。反応混合物を、回転蒸発器を用いて揮発物を除去し、そして得られる残渣を、30 ml の水に溶解した。この混合物を、ジエチルエーテル (3 × 5 ml) により洗浄した。水性層を、揮発物から除去し、8.9 g (95% の収率) の標記化合物を得た。

20

【0181】

第二の精製工程において、反応混合物を、メタノールにおいて 100 ml に希釈し、そして限外濾過し、1000 分子量カットオフの再生セルロース膜を含む正接流限外濾過装置を用いて、8 つの保持量の透過物を得た。保持物を、回転蒸発器を用いて揮発物を除去し、続いて高い真空下で除去し、8.9 g (95% の収率) の標記化合物を得た。

30

【0182】

標記化合物は、次のスペクトルを有する：

¹³CNMR (75MHz, D₂O) 32.45, 32.60, 33.71, 35.62, 36.22, 36.60, 41.95, 48.76, 48.84, 48.94, 49.52, 51.08, 52.77, 174.32, 174.60, 175.28, 176.61.

【0183】

[DAB：コア]；デンドリ - {ポリ(アミドアミン) - (4 - アミドエチルアミンピロリドン)_z}；(G = 0 - 5)；PAMAM デンドリマーの調製

【0184】

実施例 11：[コア：DAB]；(4 2)；デンドリ - {ポリ(アミドアミン) - (Pyrr - 4 - CONHCH₂CH₂NH₂)₄}；(G = 0)；PAMAM デンドリマー

攪拌棒を含む、250 ml の丸底フラスコに、57 g の 80% EDA - 20% メタノール混合物 (w/w、エステル当たり 100 当量) を添加した。この混合物を 8 に冷却し、そして PAMAM デンドリマー、DAB コア、G = 0 ピロリジノン表面 (MW = 1049) (2.0 g、1.91 mmol、7.6 mmol のエステル) のメタノールに溶液を、約 1 - 2 分間にわたって、添加した。この得られる混合物を、RT に暖め、そして 2 日間、攪拌した。この材料の赤外線スペクトル (高真空下でアリコートを経る) は、反応が、1738 cm⁻¹ でエステルカルボニル基の消出から決定されるように、約 95% 完結したことを示唆した。この混合物を、回転蒸発器上で揮発物を除去した。得られる残渣を、15 ml のメタノールに溶解し、そして 40 ml のトルエンを添加し、そして混合し、均質溶液を形成した。この混合物を、回転蒸発器上で除き、混合物から EDA を共沸した。この工程を、6 回、反復するか、又は TLC (シリカゲル、メタノール中、10%

40

50

の NH_4OH) が、ヨウ素チャンバーにおける乾燥 TLC プレートの進展による EDA の不在を示すまで、反復した。この混合物をメタノールに溶解し、そして濾過し、そして回転蒸発器上で、続いて高真空下で、50 で 1 時間、揮発物を除き、以下のスペクトルを有する、2.1 g (95%) ($\text{MW} = 1161$) の生成物を得た：

【0185】

$^{13}\text{CNMR}$ (75MHz, D2O) 23.64, 32.32, 34.54, 36.17, 36.61, 39.55, 41.71, 41.92, 48.58, 48.76, 50.28, 52.35, 174.89, 175.45, 176.87。

【0186】

実施例 12：[コア：DAB]；(4 2)；デンドリ - {ポリ(アミドアミン) - (Pyr - 4 - CONHCH₂CH₂NH₂)₈}；(G = 1)；PAMAM デンドリマー

この生成物を、PAMAM デンドリマー、DAB コア、G = 1 ピロリジノンメトキシエステル ($\text{MW} = 2466$) (2 g、0.81 mmol / エステル)、97 g の 80% EDA - 20% メタノールの混合物、W / W、200 当量 / エステルを用いて、PAMAM デンドリマー、DAB コア、G = 0 ピロリジノンアミドエチルアミンと同じ方法で調製し、以下のスペクトルを有する、2.0 g (95% の収率) の標記化合物を得た：

【0187】

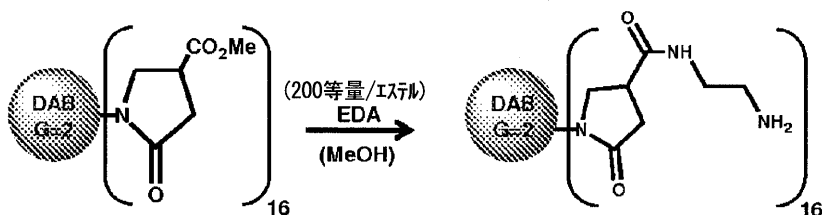
$^{13}\text{CNMR}$ (75MHz, D2O) 23.71, 32.29, 32.42, 34.48, 36.14, 36.64, 39.56, 40.15, 41.25, 41.33, 41.91, 48.70, 48.74, 50.22, 50.96, 52.44, 174.52, 174.74, 175.42, 175.80。

【0188】

実施例 13：[コア：DAB]；(4 2)；デンドリ - {ポリ(アミドアミン) - (Pyr - 4 - CONHCH₂CH₂NH₂)₁₆}；(G = 2)；PAMAM デンドリマー

【0189】

【化 23】



【0190】

この生成物を、PAMAM デンドリマー、DAB コア、G = 2 ピロリジノンメトキシエステル ($\text{MW} = 2466$) (2 g、0.81 mmol、0.65 mmol のエステル)、97 g の 80% EDA - 20% メタノールの混合物、W / W、200 当量 / エステルを用いて、PAMAM デンドリマー、DAB コア、G = 0 ピロリジノンアミドエチルアミンと同じ方法で調製し、以下のスペクトルを有する、2.1 g (97% の収率) の標記化合物を得た：

【0191】

$^{13}\text{CNMR}$ (75MHz, D2O) 32.51, 32.51, 34.54, 36.20, 36.61, 39.65, 41.54, 41.59, 41.95, 48.82, 48.94, 50.21, 51.08, 174.46, 174.75, 175.42, 175.03。

【0192】

実施例 14：[コア：DAB]；(4 2)；デンドリ - {ポリ(アミドアミン) - (Pyr - 4 - CONHCH₂CH₂NH₂)₃₂}；(G = 3)；PAMAM デンドリマー

【0193】

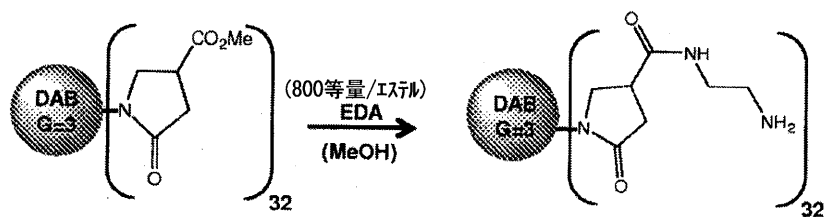
10

20

30

40

【化 2 4】



10

【0194】

この生成物を、PAMAM dendrimer、DABコア、G = 3 ピロリジノンカルボメトキシエステル (MW = 10969) (3 g、0.27 mmol、8.7 mmolのエステル)、522 gの80%EDA - 20%メタノールの混合物、w/w、800当量/エステルを用いて、PAMAM dendrimer、DABコア、G = 0 ピロリジノンアミドエチルアミンと同じ方法で調製し、以下のスペクトルを有する、3.0 g (93%の収率)の標記化合物を得た：

【0195】

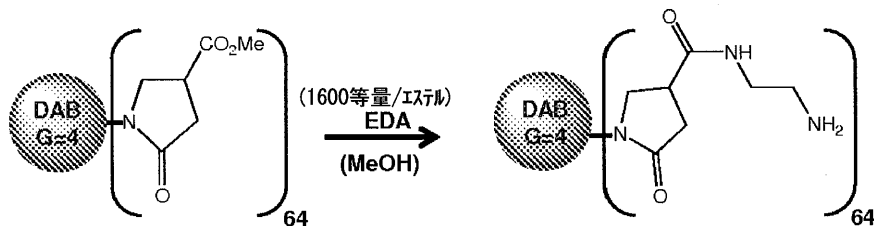
$^{13}\text{CNMR}$ (75MHz, D₂O) 32.52, 32.55, 34.55, 36.22, 36.61, 39.66, 41.71, 41.56, 41.95, 48.83, 50.29, 51.11, 174.42, 174.72, 175.41, 175.80。 20

【0196】

実施例 15 : [コア : DAB] ; (4 2) ; デンドリ - {ポリ (アミドアミン) - (Pyr - 4 - CONHCH₂CH₂NH₂)₆₄} ; (G = 4) ; PAMAM dendrimer

【0197】

【化 2 5】



30

【0198】

この生成物を、PAMAM dendrimer、DABコア、G = 4 ピロリジノンメトキシエステル (MW = 22307) (2 g、0.09 mmol、5.7 mmolのエステル)、714 gの80%EDA - 20%メタノールの混合物、w/w、1600当量/エステルを用いて、PAMAM dendrimer、DABコア、G = 0 ピロリジノンアミドエチルアミンと同じ方法で調製し、以下のスペクトルを有する、2.0 g (92%の収率)の標記化合物を得た：

40

【0199】

$^{13}\text{CNMR}$ (75MHz, D₂O) 32.52, 34.55, 36.20, 36.61, 39.70, 41.62, 41.65, 41.95, 48.78, 48.83, 50.29, 51.11, 174.38, 174.69, 175.36, 175.77。

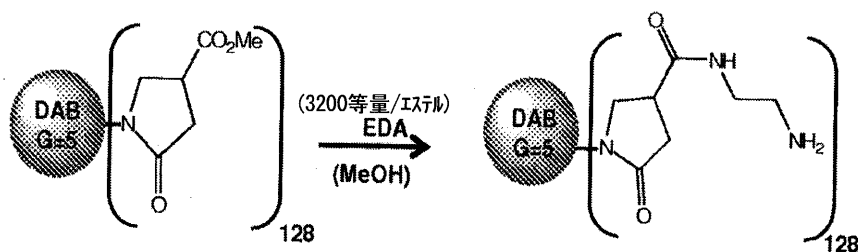
【0200】

実施例 16 : [コア : DAB] ; (4 2) ; デンドリ - {ポリ (アミドアミン) - (Pyr - 4 - CONHCH₂CH₂NH₂)₁₂₈} ; (G = 5) ; PAMAM dendrimer

【0201】

50

【化 2 6】



10

【0202】

この生成物を、PAMAM dendrimer、DABコア、G = 5 ピロリジノンメトキシエステル (MW = 44782) (1.5 g、0.03 mmol、4.2 mmolのエステル)、1024 gの80%EDA - 20%メタノールの混合物、w/w、3200当量/エステルを用いて、PAMAM dendrimer、DABコア、G = 0 ピロリジノンアミドエチルアミンと同じ方法で調製し、以下のスペクトルを有する、1.45 g (91%の収率)の標記化合物を得た：

【0203】

^{13}C NMR (75MHz, D_2O) 32.64, 34.55, 36.20, 36.61, 39.73, 41.66, 41.95, 48.76, 48.87, 50.28, 51.16, 174.32, 174.64, 175.30, 176.72.

20

【0204】

PAMAM dendrimer、DABコア、ピロリジノン - 3 - カルボアミドエチルアミノ - N, N - ビス - エチルアミン表面の調製

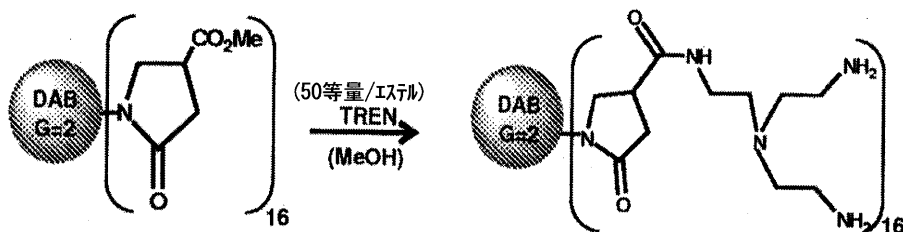
【0205】

実施例 17 : [コア : DAB] ; (4 2) ; デンドリ - {ポリ (アミドアミン) - (Pyrr - 4 - CONH - TREN)₁₆} ; (G = 2) ; PAMAM dendrimer

【0206】

【化 2 7】

30



【0207】

この生成物を、TREN (22 g、151 mmol、50当量/エステル) 及び 6 gのメタノールの混合物に、8 で添加された、3 mlのメタノールに溶解された、PAMAM dendrimer、DABコア、G = 2 ; ピロリジノンカルボメトキシエステル (MW = 5300) (1 g、0.19 mmol、3 mmolのエステル) を含む 100 mlの丸底フラスコにおいて調製した。この混合物を、25 で4日間、攪拌した。この材料の赤外スペクトルは、 1735 cm^{-1} でのエステルカルボニル周波数の完全な消出を示した。この混合物を、メタノールにより希釈し、3 ~ 5% 溶液を得、そして8 ~ 10回の保持再循環又は2400 - 3000 mlのために、又はTLC (メタノール中、20% NH_4OH) がTRENの不在を示すまで、1 K再生セルロース膜を含む正接流限外濾過装置を用いて精製した。揮発物を、回転蒸発器を用いて除去した。残渣をメタノールに溶解し、そして得られる混合物を、回転蒸発器上で、合計3回、揮発物を除去した。この残渣を、高真

40

50

空下で40℃で約2時間、排気し、8.7g(93%の収率)の所望する生成物(MV = 6295)を、白色固形物として得た。透析された混合物を、回転蒸発器上で揮発物を排気した。残渣を、メタノールに再溶解し、続いて揮発物を3度、除き、そして高真空下で40℃で1時間、排気し、1.2(97%の収率)の、次のスペクトルを有する標記化合物を得た。

【0208】

$^{13}\text{CNMR}(75\text{MHz}, \text{D}_2\text{O})$ 32.51, 35.54, 36.22, 36.58, 36.87, 37.71, 41.98, 48.78, 50.24, 51.11, 52.42, 55.47, 174.53, 174.73, 175.07, 175.79。

【0209】

PAMAM dendrimer-pyrrolidone-carboxylic acid sodium surface modification

10

【0210】

実施例18: [コア: DAB]; (4 2); dendrimer-{poly(amidamine)-(Pyrr-4-CO₂⁻Na⁺)₁₆}; (G=2); PAMAM dendrimer

この生成物を、4mlの脱イオン水に溶解された炭酸ナトリウム水和物(MW = 124)(450mg、3.6mmol、1.3等量/エステル)に添加された、3mlの脱イオン水に溶解されたPAMAM dendrimer、DABコア、G=2ピロリジノンメトキシエステル(MW = 5300)(1g、0.19mmol、3mmolのエステル)を用いて、攪拌棒を含む25mlの丸底フラスコにおいて調製した。この混合物を、25℃で3日間、攪拌した。この材料の赤外スペクトルは、1735cm⁻¹でのエステルカルボニル周波数の完全な消出を示した。この混合物を、脱イオン水により希釈し、3~5%溶液を得、そして1000分子量カットオフを有する再生セルロース膜において透析した。250mlの透析液を、交換の間、2~18時間で10回、交換した。透析された混合物を、回転蒸発器上で揮発物を排気した。残渣を、メタノールに溶解し、続いて揮発物を3度、除去し、そして高真空下で40℃で1時間、排気し、次のスペクトルを有する、1.9g(97%の収率)の標記化合物を得た。

20

【0211】

$^{13}\text{CNMR}(75\text{MHz}, \text{D}_2\text{O})$ 32.25, 35.15, 36.35, 38.53, 41.91, 48.87, 51.05, 51.20, 174.40, 174.58, 176.77, 180.98。

【0212】

PAMAM dendrimer-pyrrolidone-amid ethanol surface modification

30

【0213】

実施例19: [コア: DAB]; (4 2); dendrimer-{poly(amidamine)-(Pyrr-4-CONHCH₂CH₂OH)₄}; (G=0); PAMAM dendrimer

攪拌棒を含む、250mlの丸底フラスコに、37gの80%EDA-20%メタノール混合物(w/w、エステル当たり100当量)を添加した。この混合物を8℃に冷却し、そしてPAMAM dendrimer、DABコア、G=0ピロリジノン表面(MW = 2466)(1.5g、0.61mmol、4.9mmolのエステル)のメタノールに溶液を、約1-2分間にわたって、添加した。この得られる混合物を、RTに暖め、そして2日間、攪拌した。この材料の赤外線スペクトル(高真空下でアリコートする)は、反応が、1738cm⁻¹でエステルカルボニル基の消出から決定されるように、約95%完結したことを示唆した。この混合物を、高い真空及び120℃のポット温度で、bulb-to-busb蒸留装置を用いてEAを除いた。ほとんどのEAを蒸留し、粘性の残渣を残した。この残渣を、メタノールに溶解し、30%w/w溶液を得、そしてメタノール中、Sephadex LH-20カラム上に負荷した。空隙間用量が終了した後、合計20画分を、それぞれ20mlで回収した。画分を、TLCプレート上にスポットし、そしてヨウ素チャンバーにおいて展開することにより、モニターした。画分6-11を集め、揮発物を除き、以下のスペクトルを有する、1.44g(95%の収率)(MW = 2474)の標記化合物を得た:

40

【0214】

$^{13}\text{CNMR}(75\text{MHz}, \text{D}_2\text{O})$ 23.64, 32.02, 32.51, 34.55, 36.23, 36.60, 39.55, 41.57, 41

50

.98, 48.84, 50.33, 51.06, 52.53, 59.91, 174.41, 174.80, 175.44, 175.91。

【0215】

実施例 2 0 : [コア : D A B] ; (4 2) ; デンドリ - {ポリ (アミドアミン) - (P y r - 4 - C O N H C H ₂ C H ₂ O H) ₈ } ; (G = 1) ; P A M A M デンドリマー

攪拌棒を含む、250 ml の丸底フラスコに、37 g の 80 % E D A - 20 % メタノール混合物 (w / w 、エステル当たり 100 当量) を添加した。この混合物を 8 に冷却し、そして P A M A M デンドリマー、D A B コア、G = 1 ピロリジノン表面 (M W = 2466) (1.5 g 、 0.61 mmol 、 4.9 mmol のエステル) のメタノールに溶液を、約 1 - 2 分間にわたって、添加した。この得られる混合物を、R T に暖め、そして 2 日間、攪拌した。この材料の赤外線スペクトル (高真空下でアリコート を排気する) は、反応が、 1738 cm^{-1} でエステルカルボニル基の消出から決定されるように、約 95 % 完結したことを示唆した。この混合物を、高い真空及び 120 のポット温度で、b u l b - t o - b u s b 蒸留装置を用いて E A を除いた。ほとんどの E A を蒸留し、粘性の残渣を残した。この残渣を、メタノールに溶解し、30 % w / w 溶液を得、そしてメタノール中、Sephadex LH-20 カラム上に負荷した。空隙間用量が終了した後、合計 20 画分を、それぞれ 20 ml で回収した。画分を、T L C プレート上にスポットし、そしてヨウ素チャンバーにおいて展開することにより、モニターした。画分 6 - 11 を集め、揮発物を除き、以下のスペクトルを有する、1.44 g (95 % の収率) (M W = 2474) の標記化合物を得た：

【0216】

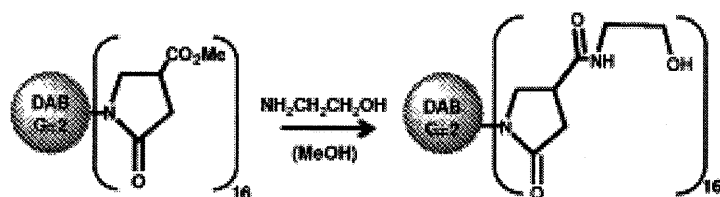
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, D₂O) 23.51, 32.19, 32.48, 34.54, 36.23, 36.58, 41.56, 41.93, 48.72, 48.82, 50.32, 51.05, 59.79, 174.40, 174.44, 175.90。

【0217】

実施例 2 1 : [コア : D A B] ; (4 2) ; デンドリ - {ポリ (アミドアミン) - (P y r - 4 - C O N H C H ₂ C H ₂ O H) ₁₆ } ; (G = 2) ; P A M A M デンドリマー

【0218】

【化 2 8】



【0219】

この生成物を、5 g の 80 % E A - 20 % メタノールの混合物 (w · w) 、約 10 当量のアミン/エステルに添加される、8 ml ノメタノールに溶解された、P A M A M デンドリマー、D A B コア、G = 2 ; ピロリジノンメトキシエステル (M W = 5300) (2 g 、 0.38 mmol 、 6.0 mmol のエステル) を含む 25 ml の丸底フラスコにおいて調製した。この混合物を、25 で 3 日間、攪拌した。この材料の赤外スペクトルは、 1735 cm^{-1} でのエステルカルボニル周波数の完全な消出を示した。この混合物を、脱イオン水により希釈し、3 ~ 5 % 溶液を得、そして 1000 分子量カットオフを有する再生セルロース膜により透析した。1 L の透析液を、交換の間、2 ~ 18 時間で 10 回、交換した。透析された混合物を、回転蒸発器上で揮発物を排気した。残渣を、メタノールに再溶解し、続いて揮発物を 3 度、除去し、そして 40 で 1 時間、高い真空下で排気し、2.1 g (97 % の収率) の標記化合物を得た。

【0220】

実施例 2 2 : [コア : D A B] ; (4 2) ; デンドリ - {ポリ (アミドアミン) - (P

$y r - 4 - CONHCH_2CH_2OH)_3_2\}$; ($G = 3$); PAMAMデンドリマー

この生成物を、8 ml のメタノールに溶解された、PAMAMデンドリマー、DABコア、 $G = 3$ ピロリジノンメトキシエステル ($MW = 10969$) (2 g 、 0.18 mmol 、 5.8 mmol のエステル) を用いて調製し、そして 5 g の $80\% \text{ EA} - 20\% \text{ メタノール}$ 混合物 (w/w)、 10 当量のアミン/エステルに添加した。この混合物を、 25 で 3 日間、攪拌した。この材料の赤外スペクトルは、 1735 cm^{-1} でのエステルカルボニル周波数の完全な消失を示した。この混合物を、脱イオン水により希釈し、 $3 - 6\%$ 溶液を得、そして 1000 分子量カットオフを有する再生セルロース膜により透析した。 1 L の透析液を、交換の間、 $2 - 18$ 時間で、 10 回、交換した。透析された混合物を、回転蒸発器上で揮発物を排気した。残渣を、メタノールに再溶解し、続いて揮発物を 3 回、除去し、そして高真空下で、 40 で 1 時間、排気し、以下のスペクトルを有する、 2.1 g (97% の収率) の標記化合物を得た：

10

【0221】

$^{13}\text{CNMR}(75\text{MHz}, \text{D}_2\text{O})$ $32.60, 34.55, 36.23, 36.61, 41.71, 41.59, 41.95, 48.79, 48.84, 48.97, 52.32, 174.43, 174.74, 175.38, 176.85$ 。

【0222】

実施例 23 : [コア : DAB]; (4 2) ; デンドリ - {ポリ (アミドアミン) - ($y r - 4 - CONHCH_2CH_2OH)_6_4\}$; ($G = 4$); PAMAMデンドリマー

この生成物を、8 ml のメタノールに溶解された、PAMAMデンドリマー、DABコア、 $G = 4$ ピロリジノンメトキシエステル ($MW = 22,307$) (2 g 、 0.09 mmol 、 5.7 mmol のエステル) を用いて調製し、そして 5 g の $80\% \text{ EA} - 20\% \text{ メタノール}$ 混合物 (w/w)、 10 当量のアミン/エステルに添加した。この混合物を、 25 で 3 日間、攪拌した。この材料の赤外スペクトルは、 1735 cm^{-1} でのエステルカルボニル周波数の完全な消失を示した。この混合物を、脱イオン水により希釈し、 $3 - 5\%$ 溶液を得、そして 1000 分子量カットオフを有する再生セルロース膜により透析した。 1 L の透析液を、交換の間、 $2 - 18$ 時間で、 10 回、交換した。透析された混合物を、回転蒸発器上で揮発物を排気した。残渣を、メタノールに再溶解し、続いて揮発物を 3 回、除去し、そして高真空下で、 40 で 1 時間、排気し、以下のスペクトルを有する、 2.1 g (97% の収率) の標記化合物を得た：

20

【0223】

$^{13}\text{CNMR}(75\text{MHz}, \text{D}_2\text{O})$ $32.52, 34.55, 36.23, 36.58, 41.61, 41.95, 48.85, 48.96, 50.30, 59.91, 174.34, 174.40, 174.71, 175.33, 175.80$ 。

30

【0224】

実施例 24 : [コア : DAB]; (4 2) ; デンドリ - {ポリ (アミドアミン) - ($y r - 4 - CONHCH_2CH_2OH)_1_2_8\}$; ($G = 5$); PAMAMデンドリマー

この生成物を、8 ml のメタノールに溶解された、PAMAMデンドリマー、DABコア、 $G = 5$ ピロリジノンメトキシエステル ($MW = 44982$) (2 g 、 0.04 mmol 、 5.7 mmol のエステル) を用いて調製し、そして 75 g の $80\% \text{ EA} - 20\% \text{ メタノール}$ 混合物 (w/w)、 10 当量のアミン/エステルに添加した。この混合物を、 25 で 3 日間、攪拌した。この材料の赤外スペクトルは、 1735 cm^{-1} でのエステルカルボニル周波数の完全な消失を示した。この混合物を、脱イオン水により希釈し、 $3 - 5\%$ 溶液を得、そして 1000 分子量カットオフを有する再生セルロース膜により透析した。 1 L の透析液を、交換の間、 $2 - 18$ 時間で、 10 回、交換した。透析された混合物を、回転蒸発器上で揮発物を排気した。残渣を、メタノールに再溶解し、続いて揮発物を 3 回、除去し、そして高真空下で、 40 で 1 時間、排気し、 2.1 g (97% の収率) の標記化合物を得た。

40

【0225】

PAMAMデンドリマー、[DABコア]、($G = 1$) ピロリジノンアミドエチルピロリジノン表面の調製：PAMAMデンドリマーにおけるピロリジノンカルボメトキシ表面のピロリジノンアミドエチルアミン表面への転換のための構造の証明

50

【0226】

実施例 25 : [コア : DAB] ; (4 2) ; デンドリ - {ポリ (アミドアミン) - (Pyr - 4 - CONHCH₂CH₂NH₂)₈ } ; (G = 1) ; PAMAMデンドリマー

この生成物を、PAMAMデンドリマー、DABコア、G = 1 ピロリジノンメトキシエステル (MW = 2466) (2 g、0.81 mmol、6.5 mmol のエステル)、97 g の 80 % EDA - 20 % メタノールの混合物、w/w、200 当量 / エステルを用いて、PAMAMデンドリマー、DABコア、G = 0 ピロリジノンアミドエチルアミンと同じ方法で調製し、以下のスペクトルを有する 91 % の収率での標記化合物を得た :

【0227】

¹³CNMR (75MHz, D₂O) 23.71, 32.29, 32.42, 34.48, 36.14, 36.64, 39.56, 40.15, 41.25, 41.33, 41.91, 48.70, 48.74, 50.22, 50.96, 52.44, 174.52, 174.74, 175.42, 175.80.

10

【0228】

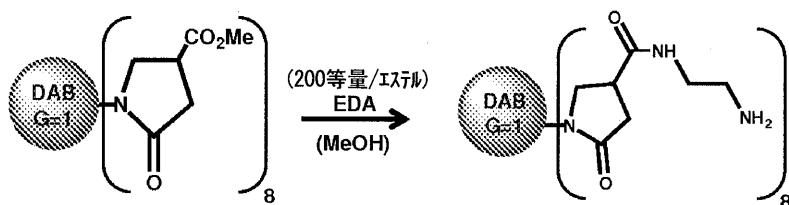
実施例 26 : [コア : DAB] ; (4 2) ; デンドリ - {ポリ (アミドアミン) - (Pyr - 4 - CONHCH₂CH₂-N-Pyr-4-COMe)₈ } ; (G = 1) ; PAMAMデンドリマー

PAMAMデンドリマー、DABコア、G = 1 ピロリジノンアミドエチルピロリジノン表面

【0229】

【化29】

20



【0230】

5 で冷却された、メタノール 5 ml 中、DMI (32 mg、2 mmol、10 % 過剰) の攪拌混合物に、5 ml のメタノール中、PAMAMデンドリマー、DABコア、G = 1 ピロリジノンアミドエチルアミン (MW = 2690) (600 mg、0.22 mmol、1.8 mmol のアミノ基) を、2 ~ 3 分間にわたって滴下した。この混合物を、RTに暖め、そして24時間、攪拌した。反応混合物を、TLCプレート上にスポットし、そしてニンヒドリン溶液により染色し、負の試験を得た。反応混合物を、メタノール中、Sephadex LH = 20 カラムに添加し、そして300 ml の空隙容量、続いて20 x 20 ml の画分により溶出した。画分6 - 12は、TLCプレート (シリカゲル、非蛍光性) 上に各画分をスポットし、そしてヨウ素チャンバーにおいて画分を展開することにより所望する生成物を含むことが見出された。それらの画分の揮発物を、回転蒸発器を用いて除去し、高真空下で最終排気の後、以下のスペクトルを有する、770 mg (95 % の収率) の標記化合物 (MW = 3698) を得た :

30

【0231】

¹³CNMR (75MHz, D₂O) 32.42, 33.73, 34.40, 36.61, 36.24, 36.38, 36.50, 41.95, 48.81, 48.84, 49.51, 50.15, 51.13, 52.90, 174.69, 175.16, 175.42, 175.70.

40

【0232】

実施例 27 : 線状 - ポリ (アミド - ピロリドン) (PAMPyr) オリゴマー

それらの線状 - ポリ (アミドピロリドン) (PAMPyr) 生成物は、PEG (Davis et al., Adv. Drug Delivery Reviews, 2002, 54(4), 457-458) 及び PEOx (Harris et al., 米国特許第7,943,141号、2011年) タイプのポリマーに類似する。このように、それらは低補体活性化特徴を示し、そして注射剤として使用される場合、それらの結合体の

50

インビボ滞留時間を増強しながら、薬物結合体とのタンパク質相互作用を低めるために使用され得る。

【0233】

それらのポリマーを調製する方法は、以下の通りである。

第一級アミン/第一級アルキレンジアミン + n [DMI + 過剰EDA] 線上-Poly[(アミド-ピロリドン)] n (PAMPyr) オリゴマー

【0234】

$RNH_2 + n(DMI + \text{過剰} EDA) \rightarrow R-NH(L-PAMPyr)_n$ - エステル/アミン末端

【0235】

2. BocNHR(X)NH₂ + $n(DMI + \text{過剰} EDA) \rightarrow$ Boc-NH(L-PAMPyr) n - エステル/アミン末端

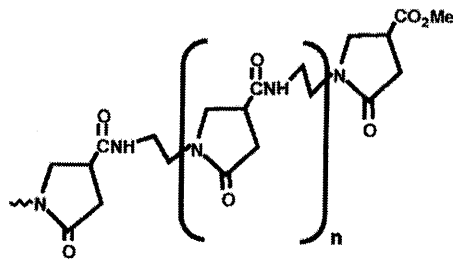
(保護解除された) NH₂(L-PAMPyr) n - エステル/アミン末端

【0236】

3. NH₂CH₂CH₂-S-S-CH₂CH₂NH₂ + $n(DMI + \text{過剰} EDA) \rightarrow$
[-S-CH₂CH₂N(L-PAMPyr) n]₂HSCH₂CH₂N(L-PAMPyr) n

【0237】

【化30】

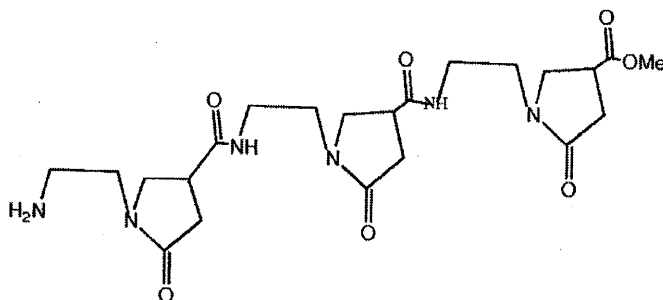


【0238】

4. (L-PAMPyr) n - エステル/アミン末端

【0239】

【化31】

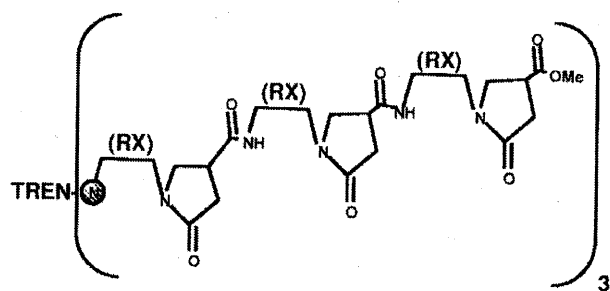


【0240】

実施例 28 : 星形分岐、線状 - ポリ(アミド-ピロリドン)(PAMPyr)
 $N[(CH_2CH_2)NH_2]_3(TREN) + n(DMI + \text{過剰} EDA) \rightarrow$ 樹枝状、
ポリ(アミドピロリドン)アミン(PAMPyrAM)

【0241】

【化 3 2】



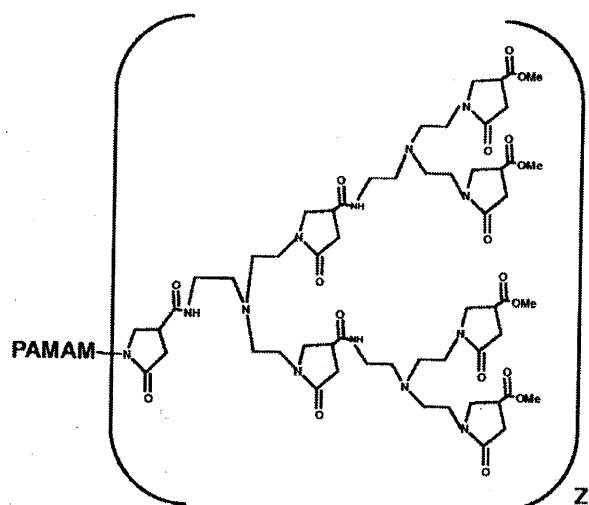
10

【 0 2 4 2】

$$2 \cdot N[(CH_2CH_2)NH_2]_3(TREN) + n(DMI + \text{過剰}TREN)$$

【 0 2 4 3】

【化 3 3】



20

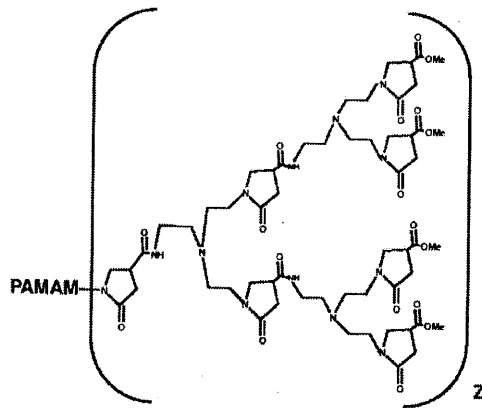
30

【 0 2 4 4】

$$PAMAM - (NH_2)_Z + n(DMI + \text{過剰}TREN)$$

【 0 2 4 5】

【化 3 4】



10

【 0 2 4 6】

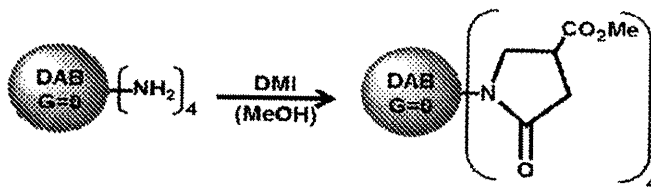
実施例 29：ピロリドン末端 PAMAM デンドリマー
表面官能化された：

デンドリマー（第一級アミン末端）+ DMI

20

【 0 2 4 7】

【化 3 5】



30

【 0 2 4 8】

効用の議論

それらの新規化合物は、MW 制御された複素環式 / 大環状（すなわち、ピロリドン）タイプのポリマー組成物であり、それらは、インビボでの生物学的注射及びイメージング用途のために適切である、IF、低毒性及び低補体活性化特性を示す。それらのポリマー組成物は、次の 4 種の異なった構造形で調製され得る：（a）線状ポリマー；（b）架橋ポリマー；（c）分岐ポリマー；及び（d）樹枝状ポリマー。この一般的な概要が、図 10 に示される。

【 0 2 4 9】

40

下記表 2 は、それらの一般的手順により製造される式（I）の化合物についてのデータを提供する。それらの化合物の化学構造は、図 3 A - D に示され；比較例構造は図 4 に示される。さらに、それらの化合物について得られた蛍光が提供される。

【 0 2 5 0】

【表 2 - 1】

表 2

化合物/例	励起最大 (nm)	発光最大 (nm)	相対的 対応/g
フルオレセイン-Na	470	510	1,000,000.0
32	280	340	99,855.2
33	320	380	391.7
40	305	390	66.4
41 ピーク 1	340	390	62.7
2-フェニル-2-イミダゾリン	340	400	50.1
26	325	390	49.8
27	340	400	46.8
39 ピーク 1	355	415	37.8
3	280	305	36.1
28 ピーク 1	280	310	33.5
28 ピーク 2	270	560	31.7
42	335	405	30.7
62	325	410	26.8
43	355	440	22.8
7	340	390	22.4
24	330	410	22.1
30	275	315	18.9
41 ピーク 2	285	455	18.7
31	300	350	18.7
29	335	400	16.3
G3 DABピロリドンカルボキサミド エチルアミン	245	410	16.1
11 ピーク 1	380	480	15.7
G3 DABピロリドンカルボキサミド エチルアミン pH 2	245	375	15.1
36 ピーク2	255	305	14.6
44	350	450	14.5
2 ピーク 1	330	410	14.4
11 ピーク 2	370	445	14.2
45 ピーク 1	262	285	14.1
46 ピーク 1	345	405	12.5
G3 DAB ピロリドンカルボキサミド エチルアミン	330	410	12.4
2-ピロリドン-5-カルボン酸	245	385	11.8
48	365	435	11.7

【表 2 - 2】

化合物/例	励起最大 (nm)	発光最大 (nm)	相対的 対応/g
47	300	410	11.4
45 ピーク 2	250又は270	575	11.2
39 ピーク 2	245	420	11.1
D	315	380	10.6
G3 DAB ピロリドンカルボキサミド エチルアミン pH 2	340	410	10.0
G3 DAB ピロリドンカルボキサミド エチルアミン pH 2	200	360	9.3
49 ピーク 1	260	302	9.0
10	325	410	8.6
9	340	410	8.4
G3 DAB ピロリドンカルボキサミド エチルアミン pH 10	200	380	8.3
14	345	430	7.7
37 ピーク 1	268	302	7.0
コアシェルテクト (デンドリマー) 1	360	430	6.8
コアシェルテクト (デンドリマー) 2	360	430	6.6
37 ピーク 2	260	565	6.5
36 ピーク 1	340	410	6.4
G3 DAB ピロリドンカルボキサミド エチルアミン pH 10	245	380	6.3
50 ピーク 1	365	440	6.3
51 ピーク 1	305	370	6.3
46 ピーク 2	260	280	6.2
35	277	301	5.8
2 ピーク 3	250	415	5.8
51 ピーク 2	300	350	5.8
G3 DABピロリドンカルボキサミド エチルアミン pH 10	340	420	5.7
6	260	460	5.4
13 ピーク 1	335	400	5.0
13 ピーク 2	295	310	4.7
11 ピーク 3	265	450	4.4
52	340	410	4.0
(A) PVP MW 40,000	240	385	4.0

10

20

30

40

【表 2 - 3】

化合物/例	励起最大 (nm)	発光最大 (nm)	相対的 対応/g
20 ピーク 2	270	440	3.7
18	340	425	3.6
53	340	430	3.4
54	365	440	3.4
55 ピーク 1	340	410	2.9
2 ピーク 1	380	460	2.8
38	335	410	2.7
36 ピーク 2	355	410	2.5
56	335	455	2.5
61	340	420	2.4
36 ピーク 1	365	445	2.3
16	365	440	2.2
34	360	440	2.1
57 ピーク 1	340	420	2.1
57 ピーク 2	285	315	1.9
49 ピーク 2	365	450	1.7
56	315	380	1.7
25	350	440	1.6
54弱いピーク	270	435	1.2
5	320	450	1.1
58	365	455	1.0
22	380	450	0.8
59	280	332	0.7
60	340	440	0.7
55 ピーク 2	305	330	0.7
23	385	460	0.3

【0251】

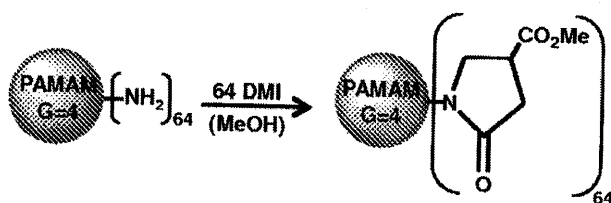
それらの化合物の1つがデンドリマーに結合され、そして種々の細胞系における生物学的目的について試験される場合、結果が、下記実施例Iに提供される。

【0252】

実施例I：PAMAMピロリドン末端デンドリマーの合成

【0253】

【化36】



10

20

30

40

50

【0254】

このデンドリマーは、効用を示すために以下の方法で試験された。

インビボでの効用

細胞培養

チャイニーズハムスター線維芽細胞 (B14) 及び胚性マウス海馬細胞 (mHippo E-18) を、2 mMのグルタミン及び10% (v/v) FBSにより補充されたDMEM培地において増殖した。ラット肝臓由来の細胞 (BRL-3A) を、2 mMのグルタミン及び10% (v/v) FBSにより補充された、HAMのF12変性培地において増殖した。細胞を、5.0% CO₂を含む加湿雰囲気下で、37℃でT-25培養フラスコにおいて培養し、そして2又は3日ごとに継代培養した。細胞を収穫し、そして80-90%の集密性を得た後、実験に使用した。生存細胞の数を、Countess Automated Cell Counter (Invitrogen)の使用により、トリバンプル-排除アッセイにより決定した。100 µlの適切な培地において、1.0 × 10⁴ 個の細胞/ウェルの密度で平底96ウェルプレートにおいて、又は1.0 mlの適切な培地において、2.5 × 10⁵ 個の細胞/ウェルの密度で平底12ウェルプレートにおいて、細胞を播種した。播種の後、プレートを、プレートへの細胞の結合を可能にするために、5.0% CO₂を含む加湿雰囲気下で、37℃で24時間インキュベートした。

10

【0255】

接種及び流出の検出

インビトロ摂取研究を、自家蛍光G4 PAMAM-ピロリドンデンドリマー (実施例Iにおいて調製された) を用いて実施した。手短には、デンドリマーを、1.0 × 10⁵ 個の細胞/ウェルの密度で細胞を含む24ウェルプレートに、100 µMの濃度で添加した。摂取研究においては、細胞を、5.0%のCO₂を含む加湿雰囲気下で48時間、37℃で5分~48時間の範囲の特定時間、デンドリマーと共にインキュベートした。流出研究においては、細胞を24時間、デンドリマーと共にインキュベートした。次に、デンドリマーを除き、細胞をPBSにより洗浄し、そして5.0%のCO₂を含む加湿雰囲気下で5分~48時間の範囲の定義された時間、37℃で培地においてさらにインキュベートした。適切なインキュベーション期間の後、細胞をPBSにより洗浄し、500 µlの培地に懸濁し、そしてすぐに、紫色レーザー (405 nm) 及びパシフィックブルーバンドパスフィルター (450 / 50 nm) を用いて、Becton LSRIIフローサイトメーター (BD Biosciences, USA) により分析した。

20

30

【0256】

共焦点顕微鏡法

共焦点顕微鏡画像を、405 nmレーザーダイオード及びInTune励起レーザーシステムを備えたZeiss LSM780顕微鏡 (Carl Zeiss Micro Imaging, USA) を用いて、6300倍率で得た。細胞を、96ウェルガラス底プレート上で増殖し、そして5.0% CO₂を含む、37℃での加湿雰囲気下で24時間、100 µMのG4-PAMAM-ピロリドンデンドリマー (実施例Iにおいて調製された) と共にインキュベートした。インキュベーションの後、細胞を直接的に (洗浄されていないデンドリマー蛍光)、又は続く原形質膜/核染色の後、画像化した。後者については、細胞を氷上で冷却し、そして冷PBSにより1度、洗浄し、エンドサイトーシスを阻害した。次に、細胞膜を、PBSにより200倍に希釈されたNeuroDiOカルボシアニン色素を用いて、2分間のインキュベーションにより染色した。色素の親油性のために、それらの条件下での染色は均一ではない可能性がある。膜染色の後、細胞核を、PBSにより200倍に希釈されたRed Dot 1核色素により10分間、染色し、そしてRTで15分間、3.6%のホルムアルデヒド溶液により固定した。最終的に、固定され、そして三重染色された細胞を画像化し、青色チャンネル (励起405 nm、発光410-470 nm) でのPAMAM-ピロリドンデンドリマー、緑色チャンネル (励起490 nm、発光510-575 nm) での原形質膜、及び遠赤色チャンネル (励起595 nm、発光600-740 nm) での核の固有蛍光を可視化した。

40

【0257】

50

結果

フローサイトメトリーによりデンドリマーの細胞摂取を分析するために、細胞（B 1 4、B R L - 3 A、及びmH i p p o E - 1 8）を、1 0 0 μ Mの濃度でのデンドリマーと共にインキュベートした。この濃度でのデンドリマーは、何れの試験された細胞に対しても非毒性であることは、これまで示されている（Janaszewska et al., Nanomedicine NBM, 2013, 9, 461-464）。インキュベーション時間は、5分から48時間と多様であった。すべての試験された細胞系は、その最大量がmH i p p o E - 8細胞に観察されたが、P A M A M - ピロリドンデンドリマーを急速に蓄積した（図5）。48時間後、デンドリマー濃度に正比例する固有蛍光強度は、B 1 4細胞よりもそれらの細胞では、ほとんど2倍高かった。

10

【0258】

デンドリマーとの細胞のインキュベーションに基づいて観察される蛍光強度上昇は、2つの工程、すなわち細胞内のデンドリマーの摂取、又は細胞膜の外層へのデンドリマーの結合により生じることができる。デンドリマーが実際、細胞に侵入、そして第2の可能性を排除することを確認するために、共焦点顕微鏡を、可視化技法として使用した。再び、この方法は、デンドリマーの固有蛍光に基づかれている。デンドリマーの濃度は同じままであり、そして1 0 0 μ Mに等しかった。共焦点画像は、図6に提供される。

【0259】

続く洗浄を伴わないで、24時間の処理の後に実施された、3回の試験された細胞系における蓄積したP A M A M - ピロリドンデンドリマーの固有蛍光を示す画像は、化合物の内部局在化を確認した（図6A）。興味深いことには、デンドリマー局在化におけるいくつかの差異が試験された細胞系間で観察され得る。すべての細胞は細胞質においてデンドリマーを蓄積するように思えるが、B - 1 4及びB R L - 3 A細胞においては、核局在がまた観察され、ところがmH i p p o E - 1 8細胞においては、蛍光がリソソーム様構造、及び細胞境界（減刑質膜）で観察され得る。

20

【0260】

デンドリマーの内在化をさらに確かめるために、すべての細胞を、P B Sにより1度、洗浄し、そして染色し、原形質膜及び細胞核を可覚化した（図6B）。P A M A M - ピロリドンデンドリマーの青色蛍光を検出するために、ホルムアルデヒドによる固定化の前、原形質膜を、NeuroDiOカルボシアニン色素を用いて染色し、そして核を、RedDot1核色素により染色した。予想通り、デンドリマー蛍光は、すべての試験された細胞系において内部に局在された。驚くべきことには、B R L - 3 A細胞のみが、デンドリマー洗浄及び細胞固定の前に観察される染色パターンを保持し、細胞質及び核局在化を確認した。B 1 4細胞においては、原形質膜でのデンドリマー蛍光の一部がもはや観察されないmHippoE-18細胞に類似して、蛍光は、核蓄積を欠くエンドソーム様構造においてのみ検出され得た。たぶん、P A M A M - ピロリドンデンドリマーへの色素の意図しない結合のために、RedDot1染色が青色蛍光シグナルと部分的に共局在することにもまた注目される。

30

【0261】

細胞におけるデンドリマー内在化に関係する別の重要な側面は、反対の工程、すなわち細胞からのそれらの流出を知ることである。B 1 4、B R L - 3 A及びmHippoE-18細胞からの研究されたデンドリマーも細胞流出が、デンドリマー固有蛍光に基づいて、フローサイトメトリーにより摂取と同様に分析された。24時間のインキュベーション時間の後、デンドリマーが培地から除かれ、細胞を洗浄し、そしてさらに、デンドリマーを有さない培地においてインキュベートした。図7に示されるように、最初の24時間、デンドリマーはすべての細胞から放出されるが、しかしB - 1 4細胞からは最も遅かった。24時間後、約15%ほどのデンドリマーがB - 1 4細胞から脱出した。最も早い漏出が、mHippoE-18細胞に観察された。B 1 4及びB R L - 3 A細胞の場合、摂取されたデンドリマーの量は、実験の最初の3時間、変化しなかった。それにもかかわらず、48時間後、mHippoE-18細胞においては、最初からの3時間、初期量の半分のみ、B R L - 3 A細胞においては、1/3、及びB - 1 4細胞においては1/5が観察された。

40

50

【0262】

PAMAM - ピロリドン dendrimer と呼ばれる 4 - カルボメトキシピロリドン表面基を有する改質された G4 PAMAM dendrimer は、独特の特性により特徴づけられる。それは、初期手順、例えば酸化を必要としないで、中性 pH で本質的に蛍光性である。さらに、この dendrimer は、アミノ末端 PAMAM dendrimer とは対照的に、非常に生体適合性であり、且つ非毒性であることが見出された (Ciolkowski et al., Nanomedicine NBM, 2012, 8, 815-817; Janaszewska et al., Nanomedicine NBM, 2013, 9, 461-464)。それは、PAMAM - ピロリドン dendrimer が細胞内に内在化されるかどうかという疑問が提起した。共焦点顕微鏡と組合される摂取研究は、この疑問に対して肯定的な答えを提供した。本質的に蛍光性の PAMAM - ピロリドン dendrimer は、3 種の異なる細胞系に内在化し、そして染色することが示されている。BRL-3A 細胞の場合、dendrimer は細胞膜を横断するのみならず、また核にも到達した。要約すると、PAMAM - ピロリドン dendrimer は、以下の 3 種の顕著な特性を有する：(1) 強い固有の蛍光、(2) 低毒性、(3) 細胞内在化。それらの自己蛍光は、dendrimer が細胞内にある場合、目に見えるのに十分に強い。

10

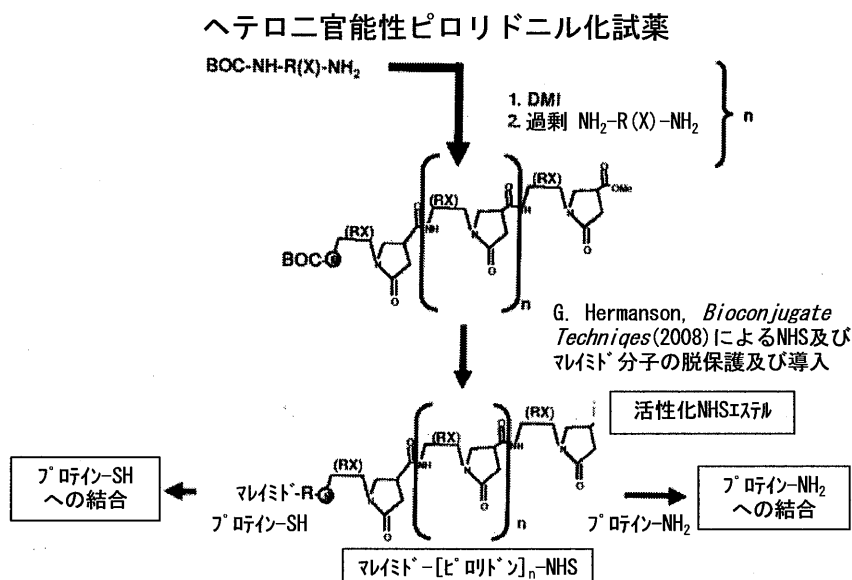
【0263】

強い固有の青色蛍光のために、PAMAM - ピロリドン dendrimer の細胞摂取挙動は、追加の蛍光標識、化学物質による dendrimer の処理、又は pH 調整なしに、共焦点顕微鏡及びフローサイトメトリーにより、直接分析され得た。この最初の成功した生物学的実験は、遺伝子ベクターとしての広範な可能性ある PAMAM - ピロリドン dendrimer 用途、及び輸送とバイオイメージングの 2 つの機能を同様に兼ねる薬物送達プラットフォームを開放する。

20

【0264】

【化37】



30

40

【0265】

G.T. Hermanson, *Bioconjugation Techniques*, Second Ed., (2008) により教示されるような、当業者に良く知られている日常的なプロトコルを用いる場合、それらの個別的な、明確に定義されたホモ - 又はヘテロ - 官能化された (チャプター 4, 5, pp 233 - 334 を参照のこと) ピロリドン化試薬が、従来の PEG 化試薬を模倣するために創造された。それらは、先に記載された種々の新規の小分子ピロリドン誘導体、ピロリドン含有ポリマー、デンドロン、デンドリマー及びポリマーから調製された。それらのピロリドン化試薬は、G.T. Hermanson, Chapter 18, 25; in *Bioconjugation Techniques*, Second Ed.

50

、(2008)により教示されるように、種々のタンパク質、ポリペプチド、酵素、抗体、薬物、ポリヌクレオチド、生物学的基質及びナノ粒子、等に結合され得る。興味あるいくつかの特定基質についてのそれらのプロトコルへのいくつかの言及は、以下の通りである：(a) デンドロン/デンドリマー；Chapter 7, pp 346-394；イメージング/キレート剤、Chapter 9, pp400-496；ビオチン/アビジン、Chapter 11, pp 507-543, Chapter 233, pp 900-921；微粒子/ナノ粒子、Chapter 14,15, pp582-645；ハプテン担体免疫原、Chapter 19, pp745-781；抗体、Chapter 20, pp787-821；免疫毒素、Chapter 21, pp827-857；リボソーム、Chapter 22, pp 858-897；酵素、Chapter 26, pp 961-968；核酸/オリゴヌクレオチド、Chapter 26, pp 970-1002。

【0266】

本発明は、デンドリマーの分岐合成に使用される特定の反復工程及び原理[DENDRIMERS, DENDRONS, AND DENDRITIC POLYMERS, Tomalia, D.A., Christensen, J.B. and Boas, U. (2012) Cambridge University Press, New York, N.Y.]が、個別な、十分に定義されたポリ(ピロリドン)オリゴマー及びポリマーの合成に適用され得ることを実証することにより、この化学的ジレンマに対する解決策を、現在提供する。図10は、デンドリマーの3つの主要構成成分、すなわち(a)コア、(b)内部及び(c)表面を示す。このように、デンドリマーの分岐構造は、開始剤コアで開始し、この周りで、分岐状モノマー(すなわち、枝分かれ細胞モノマー)の同心樹枝状層が十分に定義された反復反応配列に共有結合され、生成(G)として言及される樹枝状シェルの配列を生成する。この内部の樹枝状成長、及び生成の関数として提示される表面基の数は、コア多重度(Nc)、分岐細胞多重度(Nb)及び生成レベル(G)の関数として数学的に制御されることが認識されている。このように、各生成(Z)で提示される表面基の数は、以下の数学的表現に従って予想され得る； $Z = N_c N_b^G$ 。例えば、ポリ(アミドアミン)(PAMAM)デンドリマーの従来の分岐合成は、アミン又はエステル何れかであり得る既知多重度(Nc)の開始剤コアで始まる。一般的に、アミンコア(すなわち、ジアミノブタン；(DAB)； $N_c = 4$)で出発する場合、マイケル付加により、化学量論の量(すなわち、 $4 \times$)のメチルアクリレート(MA)を付加し、PAMAMエステル末端中間体を生成できる(図10)。これに続いて、末端エステル基の軽度で容易なアミド化を生成する過剰のエチレンジアミン(EDA)の添加を伴い、PAMAMアミン末端中間体を生成する(図10)。(a)マイケル付加、続く(b)アミド化のこの反応順序は、デンドロン($N_c = 1$)又はデンドリマー($N_c > 2$)と呼ばれる、個別の十分に定義された樹枝状高分子を生成するための「反復反応順序」を構成する。

【0267】

先に、本発明者は、N-置換-4-カルボメトキシピロリドンを得るためにPAMAMデンドリマー末端第一級アミン部分の容易な反応を報告しており(すなわち、(I)。図10)[国際公開第2004/069878号、2004年8月19日]、ここで正確な数のピロリドン環が、生成の関数として存在する第一級アミン(Z)の数に従って形成された。ピロリドン環上の第二4-カルボメトキシエステル部分と第一級/第二級アミンとの反応は、メチルアクリレートから誘導された第一級エステル基であるとは予想されず、そして実際、それらの基ほど反応性ではなかった。本発明者は、容易な条件下で高収率でそれらの反応を行う適切な条件を、現在見出した。

【0268】

このように、注射可能なインビボ用途又は他の医療用途のために肝臓排泄(すなわち、 $< 20 \text{ KDa}$)を確実にするために、特定の閾値以下の特定のポリ(ピロリドン)オリゴマー/ポリマーの分子量を制御するために、本発明者は、特定のデンドリマー/デンドロンベースの「反復反応工程/原則」の使用を呼び掛けて来た。それらの努力は現在、少なくとも3種の新規で明確に定義されたポリ(ピロリドン)オリゴマー/ポリマー、及びデンドロン/デンドリマー組成物(ポリ(ピロリドン)組成物カテゴリー：II、III及びIV(図10を参照のこと)の発見を導いて来た。それらの組成物は、非常に低い毒性、ポリ(エチレングリコール)(PEG)を非常に連想させるタンパク質との非相補的活性、ステ

10

20

30

40

50

レス性質を示す。従って、それらの組成物は、ピロリドン化試薬と呼ばれ、そしてPEG化よりも、卓越した費用対効果を提供することが予測される。さらに、非従来の「固有蛍光」特性が、それらのピロリドンオリゴマー/ポリマー、並びにそれらのポリマーピロリドンへのモノマー中間体として作用して来た多くの関連する小分子ピロリドン中間体と関連することが意外には発見された。

【0269】

本発明はその好ましい実施形態を参照して記載されて来たが、当業者は、本開示を読み、そして理解すると、以下に請求される本発明の範囲及び趣旨から逸脱しない変更及び修飾を認めることができる。従って、この説明は、例示に過ぎず、本発明を実施する一般的な方法を当業者に教示するためのものであると解釈されるべきである。

10

【図1】

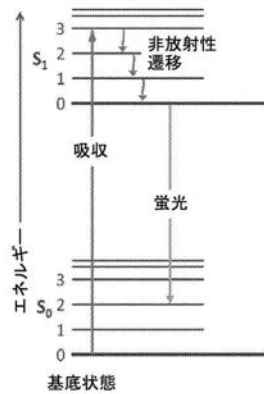


Figure 1

【図2】

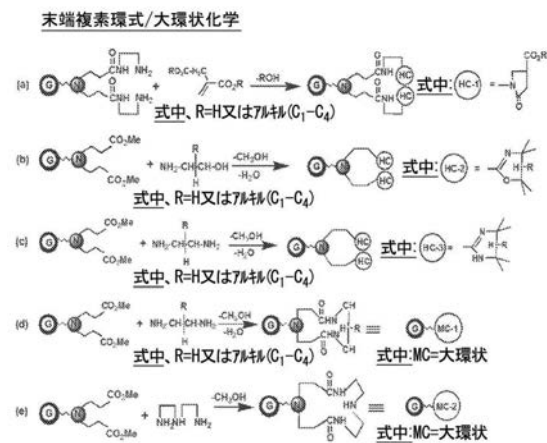


Figure 2

【 ㄨ 3 A 】

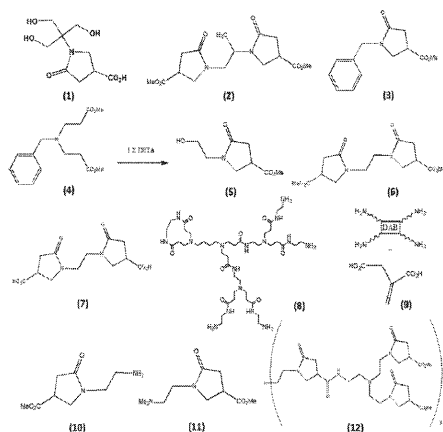


Figure 3A

【 ㄨ 3 B 】

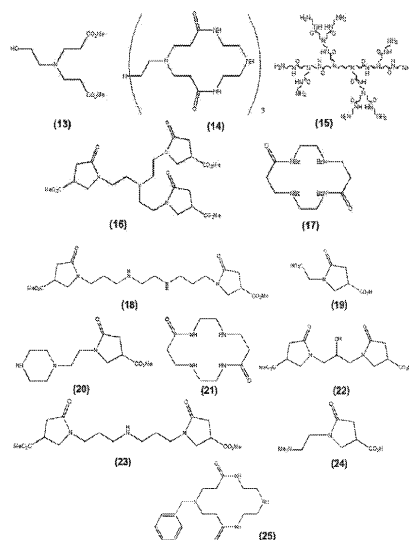


Figure 3 B

【 ㊦ 3 C 】

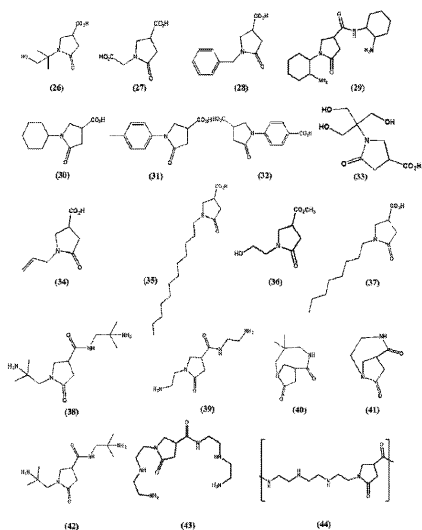


Figure 3 C

【 図 3 D 】

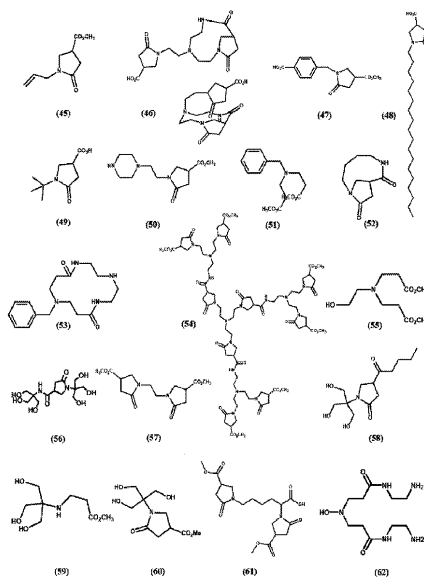


Figure 3D

【 図 4 】

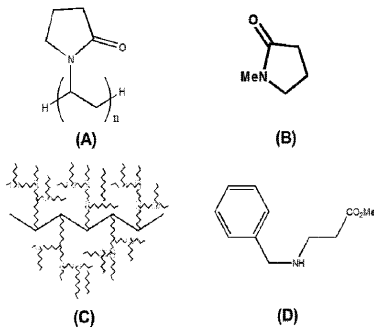
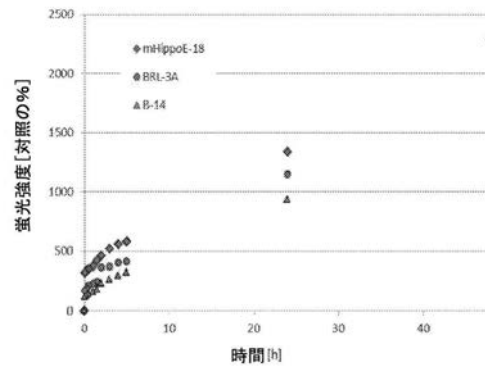


Figure 4

【 図 5 】



mHippoE-18 (青の菱形), BRL-3A (赤丸) 及び B-14 (緑の三角) 細胞

Figure 5

【 図 6 】

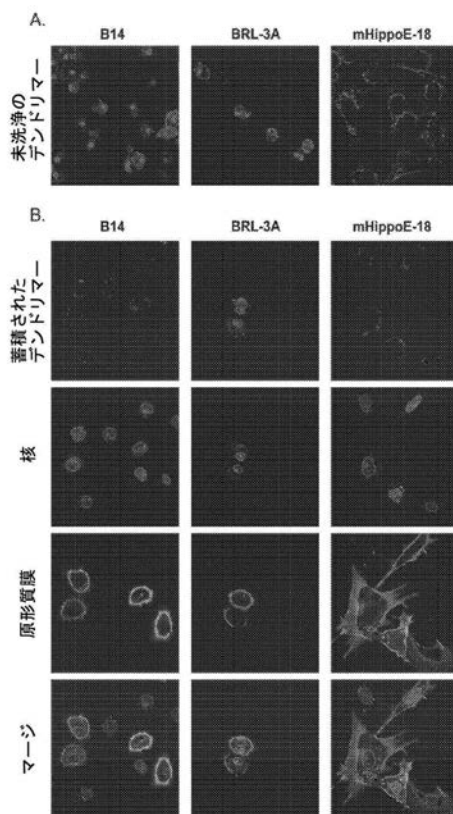
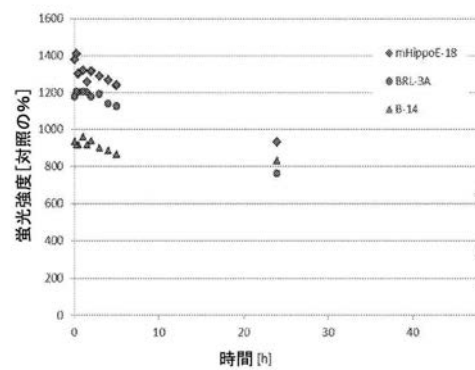


Figure 6

【 図 7 】



mHippoE-18 (青の菱形), BRL-3A (赤丸) 及び B-14 (緑の三角) 細胞

Figure 7

【 図 8 】

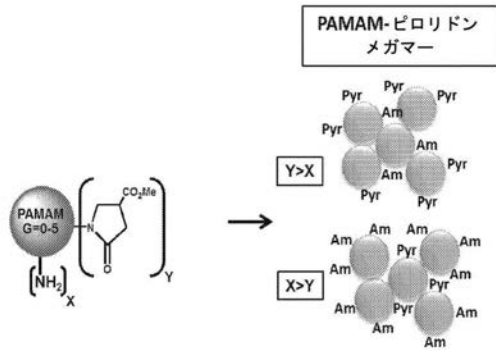


Figure 8

【 図 9 】

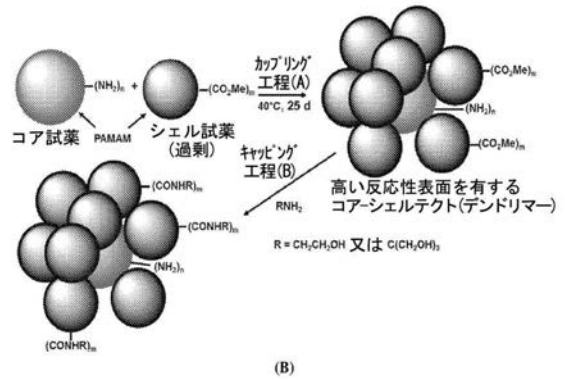
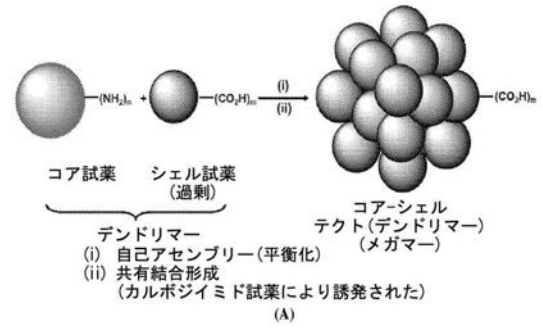


Figure 9

【 図 10 】

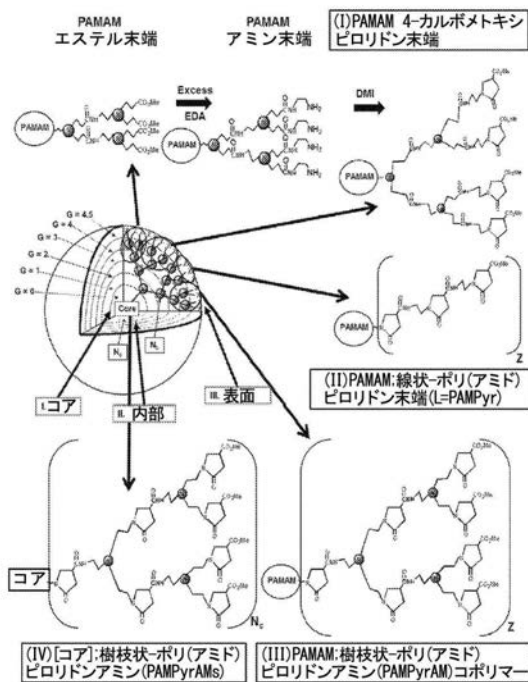


Figure 10

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/50062

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07D 207/28; C07D 207/277 (2015.01) CPC - C07D 207/28; C07D 207/277 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C07D 207/28; C07D 207/277 (2015.01) CPC: C07D 207/28; C07D 207/277 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 548/534; 548/531; 548/537 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Scholar, PubWEST pyrrolidone, primary amine, itaconic acid, dimethyl itaconate, polymer, protein delivery, fluorescence		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2006/0160988 A1 (TOMALIA et al.) 20 July 2006 (20.07.2006) Fig 4; Fig 5	1-2, 5-10, 12
Y	CIOLOKOWSKI et al. 'Surface modification of PAMAM dendrimer improves its biocompatibility', Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, Volume 8, Issue 6, August 2012, Pages 815-817. pg 816, Fig 1; Fig 2C; pg 816, col 2, para 2 to pg 817, col 1, para 1; pg 817, col 2, para 2	1-2, 5-10, 12
Y	US 2013/0217892 A1 (WACKER et al.) 22 August 2013 (22.08.2013) para [0008]-[0017], [0060], Example 4	9, 10
A	US 2007/0298006 A1 (TOMALIA et al.) 27 December 2007 (27.12.2007) Entire Document	1-2, 5-10, 12
A	KIM et al. 'Dendrimer Probes for Enhanced Photostability and Localization in Fluorescence Imaging', Biophysical Journal, April 2013, Vol.104, pp 1566-1575. Fig 1; Fig 2	1-2, 5-10, 12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 January 2016 (15.01.2016)		Date of mailing of the international search report 29 JAN 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/50062

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 11 and 13
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I: Claims 1-2, (5-6, 8-10) (in part), 7 and 12 directed to a fluorescent compound of Formula (I), that fluoresces at least 10 times the value of its base compound and to a method of tracing moieties and fluids in various systems, tests, plants or animals and humans by fluorescence, and monitoring or detecting the location of the moiety by fluorescence using a compound of Formula (I).

Group II: Claims 3-4, (5-6, 8-10) (in part) and 16 directed to a compound of Formula (IV) having a molecular weight not greater than 100 KDa and to a process of producing the same.

Group III: Claims 14-15 directed to a fluorescent macrocyclic amide compound of Formula (II), and to a method of tracing moieties and fluids in various systems, tests, plants or animals and humans by fluorescence, and monitoring or detecting the location of the moiety by fluorescence using a compound of Formula (II).
—Please see extra sheet—

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-2, (5-6, 8-10) (in part), 7 and 12

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/50062

Continuation of Box.No.III:

The groups of inventions listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Group I includes the technical feature of a pyrrolidone compound that fluoresces at least 10 times the value of its base compound, not required by Groups II and III.

Group II includes the technical feature of a pyrrolidone compound having a molecular weight not greater than 100 KDa, not required by Groups I and III.

Group III includes the technical feature of a macrocyclic compound having the structure of Formula (II), not required by Groups I and II.

Common technical features:

Groups I-III share the technical feature of a cyclic derivative of a primary amine.

Groups I and II further share the technical feature of a 4-carboxy-pyrrolidone derivative of a primary amine, optionally further derivatized as an ester or amide of the carboxyl.

These shared technical features, however, do not provide a contribution over the prior art, as being anticipated by US 2006/0160988 A1 to Tomalia et al. (hereinafter 'Tomalia') which discloses a 2-pyrrolidone derivative of a primary amine, having the structure of Formula (I), wherein Q is the primary amine; m is 1; W is (CH₂)_n, wherein n is 1 and R₂ is -C(O)OC1-alkyl (Figure 4, scheme). As said compound was known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features, that would otherwise unify the inventions of Groups I-III.

Groups I and III further share the technical feature of a fluorescent cyclic amide compound and of a method of tracing moieties and fluids in various systems, tests, plants or animals and humans by fluorescence, and monitoring or detecting the location of the moiety by fluorescence using said cyclic amide compound.

These shared technical features, however, do not provide a contribution over the prior art as being anticipated by the article entitled, 'Targeting Gelatinases with a Near-Infrared Fluorescent Cyclic His-Try-Gly-Phe Peptide', published in Mol Imaging Biol. 2009 ; 11(6): 424-433, by Wang et al. (hereinafter 'Wang') which discloses a fluorescent cyclic amide compound useful in in vitro or in vivo imaging applications for tracing moieties in animals (abstract; scheme 1; Fig 3; Fig 5). As said compound and use were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features, that would otherwise unify the inventions of Groups I and III.

The inventions of Groups I-III, therefore, lack unity under PCT Rule 13.

Note reg item 4: Claims 11 and 13 are unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). These claims are therefore, not included in the above analysis.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 0 7 C 229/16	(2006.01)	C 0 7 C 229/16	
C 0 7 C 239/18	(2006.01)	C 0 7 C 239/18	
C 0 8 G 73/06	(2006.01)	C 0 8 G 73/06	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74) 代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一

(74) 代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎

(74) 代理人 100134784
弁理士 中村 和美

(72) 発明者 ドナルド エー . トマリア
アメリカ合衆国, ミシガン 4 8 6 4 0 , ミッドランド , ウェスト チップワ リバー ロード
4 6 3

(72) 発明者 デイビッド エム . ヘッドストランド
アメリカ合衆国, ミシガン 4 8 6 4 0 , ミッドランド , ウェスト チップワ リバー ロード
5 0 6

(72) 発明者 リンダ エス . ニクソン
アメリカ合衆国, ミシガン 4 8 8 5 8 , マウント プレザント , サウス ルーミス ロード 1
2 2 5

F ターム (参考) 4C050 AA03 BB04 CC11 EE02 FF01 FF02 GG03 HH01
4C069 AA16 BB02 BB15 BC12 BD02 BD03
4C085 HH11 KA27 KB56
4H006 AA01 AB92
4J043 PA04 QB24 RA33 SA05 TA32 TA35 TB01 XB03 ZB60