



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108289872 B

(45) 授权公告日 2021.04.02

(21) 申请号 201680068854.0

(22) 申请日 2016.10.26

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108289872 A

(43) 申请公布日 2018.07.17

(30) 优先权数据
62/248,063 2015.10.29 US(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.05.24(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/058763 2016.10.26(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/074993 EN 2017.05.04(73) 专利权人 约翰霍普金斯大学
地址 美国马里兰州(72) 发明人 D·哈克姆 S·卡纳安
K·兰格拉曼奴贾姆 D·F·尼诺
(续)(74) 专利代理机构 上海德昭知识产权代理有限公司 31204
代理人 郁旦蓉

(51) Int.Cl.

A61K 31/19 (2006.01)

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01) (续)

(56) 对比文件

US 2003180250 ,2003.09.25

WO 2015038493 A,2015.03.19

NAVATH RAGHAVENDRA S ET AL.Dendrimer-
drug conjugates for tailored
intracellular drug release based on
glutathione levels.《BIOCONJUGATE
CHEMISTRY》.2008,第19卷(第12期),2446-2455.MISHRA MANOJ K ET AL.Dendrimer brain
uptake and targeted therapy for brain
injury in a large animal model of
hypothermic circulatory arrest.《ACS
NANO》.2014,第8卷(第3期),2134-2147.S. SADEKAR ET AL.Transepithelial
transport and toxicity of PAMAM
dendrimers: Implications for oral drug
delivery.《ADVANCED DRUG DELIVERY
REVIEWS》.2012,第64卷(第6期),571-588.TEO IAN ET AL.Preventing acute gut
wall damage in infectious diarrhoeas with
glycosylated dendrimers.《EMBO MOLECULAR
MEDICINE》.2012,第4卷(第9期),866-881.FANG MIN ET AL.Host-guest chemistry
of dendrimer-drug complexes: 7. Formation
of stable inclusions between acetylated
dendrimers and drugs bearing multiple
charges.《THE JOURNAL OF PHYSICAL
CHEMISTRY. B》.2012,第116卷(第10期),3075-
3082.

审查员 姜晖

权利要求书1页 说明书15页

(54) 发明名称

树枝状聚合物组合物和其在坏死性小肠结
肠炎和其它胃肠道病症治疗中的用途

(57) 摘要

已研发出树枝状聚合物调配物,如PAMAM树
枝状聚合物或多臂PEG聚合调配物用于口服给予
胃肠道,以治疗与感染或癌症相关的炎性疾病。在优选实施例,树枝状聚合物呈树枝状聚合物
纳米粒子形式,其包含共价连接于至少一种用于
治疗坏死性小肠结肠炎的一种或多种症状治疗
剂、预防剂或诊断剂的羟基封端的聚(酰胺基胺)
(PAMAM)树枝状聚合物。

[转续页]

[接上页]

(72) 发明人 张帆

A61P 35/00 (2006.01)

(51) Int.Cl.

A61K 9/08 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

1. 一种包含树枝状聚合物复合物的药学上可接受的组合物在制备治疗炎症性胃肠道病症和相关的中枢神经系统的炎症的药物中的应用,其中所述树枝状聚合物复合物由具有一种或多种消炎剂的羟基封端的聚(酰胺基胺)(PAMAM)树枝状聚合物组成,所述一种或多种消炎剂通过所述羟基终端结合于树枝状聚合物;

所述药物经口服向个体给药,所述一种或多种选自非类固醇消炎剂、皮质类固醇消炎剂、金化合物消炎剂、免疫抑制、水杨酸酯消炎及tol1样受体4的抑制剂组成的群组的消炎剂;

其中所述树枝状聚合物复合物通过血脑屏障,并选择性地由活化小胶质细胞吸收;

其中所述组合物以有效治疗与胃肠道疾病向关的神经的炎症的量存在。

2. 根据权利要求1所述的应用,其中所述PAMAM树枝状聚合物为G3、G4、G5或G6PAMAM树枝状聚合物。

3. 根据权利要求1所述的应用,其中所述PAMAM树枝状聚合物经由二硫键连接于所述一种或多种消炎剂。

4. 根据权利要求1所述的应用,其中所述一种或多种消炎剂经由一种或多种间隔子化合物连接于所述PAMAM树枝状聚合物,所述间隔子化合物选自基本上由以下组成的群组:SPDP、谷胱甘肽(GSH)、 γ -氨基丁酸(GABA)和其组合。

5. 根据权利要求1所述的应用,其中待治疗的所述病症是坏死性小肠结肠炎(NEC)。

6. 根据权利要求1所述的应用,其中所述消炎剂为N-乙酰基半胱氨酸。

7. 根据权利要求1所述的应用,其中所述消炎剂为tol1样受体4的抑制剂。

8. 根据权利要求7所述的应用,其中所述消炎剂为C34、其盐或类似物,所述C34为具有式 $C_{17}H_{27}NO_9$ 的2-乙酰胺基吡喃糖苷。

9. 根据权利要求1所述的应用,其中所述组合物进一步包含由结合于抗兴奋毒性剂或抗谷氨酸剂的树枝状聚合物组成的树枝状聚合物复合物。

10. 根据权利要求9所述的应用,其中所述抗兴奋毒性剂或所述抗谷氨酸剂选自由以下组成的群组:MK801、美金刚(Memantine)、氯胺酮(Ketamine)、1-MT。

11. 根据权利要求1所述的应用,其中所述组合物进一步包含与所述树枝状聚合物复合的抗感染剂。

12. 根据权利要求1所述的应用,其中所述组合物进一步包含结合于诊断剂的树枝状聚合物。

13. 根据权利要求1所述的应用,其中将所述树枝状聚合物调配成悬浮液、乳液、片剂、胶囊或灌洗物形式。

14. 根据权利要求1所述的应用,其中将所述树枝状聚合物调配成婴儿配方。

15. 根据权利要求1所述的应用,其中树枝状聚合物复合物以每千克所述个体的体重约0.01到约100mg的剂量给药。

树枝状聚合物组合物及其在坏死性小肠结肠炎和其它胃肠道病症治疗中的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年10月29日提交的U.S.S.N.62/248,063的优先权,其全部内容并入本文中。

[0003] 关于联邦赞助的研究或开发的声明

[0004] 本发明是根据美国国立卫生研究院(NIH-NICHD)分别授予给Kannan Rangaramanujam和Sujatha Kannan的合约1R01HD076901-01A1(KR)和1 R01 HD069562-01A1(SK)在政府支持下进行的。美国政府在本发明中享有一定权利。

技术领域

[0005] 本发明涉及用于治疗 and/或诊断炎性和/或感染性病症,如坏死性小肠结肠炎的聚(酰胺基胺)树枝状聚合物的口服调配物。

背景技术

[0006] 坏死性小肠结肠炎(Necrotizing enterocolitis;NEC)是一种影响早产婴儿胃肠道的严重炎性病状,并且特征在于突然出现肠道坏死,之后发生全身性败血症,并且在超过40%的病例中导致死亡。在NEC发病中存活下来的那些儿童中,有大约15%出现严重神经损伤,并且特征为严重认知障碍。全身性炎症及神经炎症是与NEC相关的主要已知后果。

[0007] 坏死性小肠结肠炎是一种主要发生于早产或患病新生儿的后天性疾病,并且特征为粘膜或甚至肠道更深处坏死。新生儿中GI急症是最常见的。症状及病征包括喂养不耐受、嗜睡、体温不稳定、肠梗阻、腹胀、胆汁性呕吐、便血、粪便中查见还原物质、呼吸暂停并且有时包括败血症病征。诊断为临床性的并通过成像研究加以确认。治疗主要给予支持治疗,并包括鼻胃管抽吸、肠胃外流体、TPN和抗生素。当前并不存在针对早产婴儿中NEC和其相关全身性炎症的有效治疗性或预防性方法。对于可能患有坏死性小肠结肠炎的婴儿的治疗包括停止常规喂养;通过胃插管释放肠道中的气体;提供静脉内流体和抗生素药物;利用腹部x射线、血液测试和血液气体测量监测病状。如果存在肠穿孔或腹壁炎症(腹膜炎),将需要对婴儿进行手术。使用手术来去除坏死肠道组织,并且可能会需要结肠造口术或回肠造口术,并且在肠道可再连接之前可能需要数周。

[0008] 因此本发明的一个目标在于提供对胃肠道的改善递送。

[0009] 本发明的另一个目标在于提供治疗胃肠道炎性和感染性病症,尤其小肠结肠炎的方法。

发明内容

[0010] 可口服给予包括递送治疗剂、预防剂和/或诊断剂的树枝状聚合物的医药组合物以到达胃肠道中的靶细胞以及大脑来治疗感染、炎症及癌症。如通过实例所展示,调配物有效治疗坏死性小肠结肠炎(NEC),其为影响早产婴儿胃肠道的严重炎性病状,并且特征在于

突然出现肠道坏死,之后发生全身性败血症,并且在超过40%的病例中导致死亡。NEC的发展需要活化肠上皮细胞上的细菌受体,toll样受体4(TLR4),其会引起大脑的主要免疫细胞,小胶质细胞的活化。小胶质细胞活化会引发炎症级联反应,使得前额皮质中的髓鞘缺失,并在小鼠中出现认知障碍。重要的是,如通过对尸检时获得的人类大脑的切片进行免疫染色所显示,小鼠中观察到的结构性和炎症变化与罹患这一疾病的人类中观察到的变化非常类似。

[0011] 口服给予聚(酰胺基胺)树枝状聚合物会靶向胃肠道(GI)以及中枢神经系统(CNS)中的炎症,并递送能够产生功能改善的药物。经口给予树枝状聚合物引起显著浓度的树枝状聚合物处于患有NEC的小鼠中的肠道和大脑的受损区域处,同时进一步选择性地定位在炎症细胞处。惊人地,使用树枝状聚合物口服给予消炎剂(N-乙酰基半胱氨酸)使得患有NEC的动物中的大脑损伤和肠道损伤得到显著改善。树枝状聚合物在受损肠道和大脑处的这一选择性定位表明,口服树枝状聚合物调配物应适用于保留肠道情况下的NEC的非手术治疗,以及包括导致大脑损伤的神经炎症的相关全身性炎症的治疗。另外,通过将经荧光团标记的树枝状聚合物选择性地定位在肠道和大脑中的炎症细胞处,这一技术也可代表用于灵敏检测NEC的诊断工具。

[0012] 在优选实施例中,树枝状聚合物用于将结合于树枝状聚合物的消炎剂和TLR4抑制剂递送到肠道和大脑。这提供了对患有NEC的早产新生儿的保留肠道的非手术选择和相关大脑损伤的预防/治疗,以预防或缓解胃肠道和大脑的损伤。通过共给予诊断剂,树枝状聚合物也可用于提供对NEC中的肠道和大脑中的炎症和损伤的无创、实时检测。树枝状聚合物纳米装置在与炎症相关的细胞中的选择性定位提供对NEC中的肠道和大脑中的炎症和损伤的无创、实时检测。优选的诊断剂为被批准用于人类用途的供用于无创检测的荧光团,如靛氰绿。

[0013] 优选的调配物包括具有结合有N-乙酰基半胱氨酸的PAMA树枝状聚合物(第4-6级)以及TLR4抑制剂。优选的TLR4抑制剂包括抑制TLR4信号传递的小分子抑制剂,尤其C34 {Neal, 2013科学公共图书馆综合卷(PLoS One). 2013;8(6):e65779.}。

具体实施方式

[0014] I. 定义

[0015] 术语“治疗剂”是指可以给予以预防或治疗疾病或病症的一种或多种症状的药剂。实例包括(但不限于)核酸、核酸类似物、小分子、肽模拟物、蛋白质、肽、碳水化合物或糖、脂质或表面活性剂或其组合。

[0016] 术语“治疗”是指预防或缓解疾病、病症或病状的一种或多种症状。治疗疾病或病状包括减轻特定疾病或病状的至少一种症状,即使潜在病理生理学未受影响;如通过给予镇痛剂来治疗个体疼痛,尽管此类药剂并不治疗该疼痛的病因。

[0017] 短语“药学上可接受”是指组合物、聚合物以及其它材料和/或剂型在合理医学判断的范围内,适用于与人类和动物的组织接触而不产生过量毒性、刺激、过敏反应或其它问题或并发症,与合理的益处/风险比相称。短语“药学上可接受的载剂”是指在将任何主题组合物从一个器官或身体部分运载或输送到另一个器官或身体部分中所涉及的药学上可接受的材料、组合物或媒剂,如液体或固体填充剂、稀释剂、溶剂或囊封材料。每种载剂在与主

题组合物的其它成分相容并且对患者无害的意义上必须是“可接受的”。

[0018] 短语“治疗有效量”是指以可适用于任何药物治疗的合理益处/风险比产生某种所需效果的治疗剂的量。有效量可以取决于例如以下因素而变化：待治疗的疾病或病状、待给予的特定靶向构建体、个体的体型或疾病或病状的严重程度。本领域的普通技术人员可以在不需要进行过多实验的情况下凭经验确定特定化合物的有效量。

[0019] II. 调配物

[0020] A. 树枝状聚合物

[0021] 如本文所用的术语“树枝状聚合物”包括(但不限于)以下分子架构,其具有内部核心、规则地附接到这一引发剂核心上的重复单元内部层(或“级”),以及附接到最外级上的端基外表面。树枝状聚合物的实例包括(但不限于)PAMAM、聚酯、聚赖氨酸和PPI。PAMAM树枝状聚合物可以具有羧酸、胺和羟基终端,并且可以是任何级的树枝状聚合物,包括(但不限于)1级PAMAM树枝状聚合物、2级PAMAM树枝状聚合物、3级PAMAM树枝状聚合物、4级PAMAM树枝状聚合物、5级PAMAM树枝状聚合物、6级PAMAM树枝状聚合物、7级PAMAM树枝状聚合物、8级PAMAM树枝状聚合物、9级PAMAM树枝状聚合物或10级PAMAM树枝状聚合物。适合一起使用的树枝状聚合物包括(但不限于)聚酰胺基胺(PAMAM)、聚丙胺(POPAM)、聚乙烯亚胺、聚赖氨酸、聚酯、萹(iptycene)、脂肪族聚(醚)和/或芳香族聚醚树枝状聚合物。树枝状聚合物复合物的每一树枝状聚合物都可以具有与其它树枝状聚合物类似或不同的化学性质(例如,第一树枝状聚合物可以包括PAMAM树枝状聚合物,而第二树枝状聚合物可以包含POPAM树枝状聚合物)。在一些实施例中,第一或第二树枝状聚合物可以进一步包括其它药剂。多臂PEG聚合物包括具有至少两个携带硫氢基或硫吡啶端基的分支的聚乙二醇;然而,本文所公开的实施例并不限于这一类别,并且可以使用携带其它端基(如丁二酰亚胺基或顺丁烯二酰亚胺终端)的PEG聚合物。可以使用分子量10kDa到80kDa的PEG聚合物。

[0022] 树枝状聚合物复合物包括多个树枝状聚合物。举例来说,树枝状聚合物复合物可以包括第三树枝状聚合物;其中该第三树枝状聚合物与至少一种其它树枝状聚合物复合。此外,第三药剂可以与第三树枝状聚合物复合。在另一个实施例中,第一和第二树枝状聚合物各自与第三树枝状聚合物复合,其中所述第一和第二树枝状聚合物是PAMAM树枝状聚合物,并且该第三树枝状聚合物是POPAM树枝状聚合物。可以在不脱离本发明精神的情况下并入其它树枝状聚合物。当利用多种树枝状聚合物时,也可以并入多种药剂,不受彼此复合的树枝状聚合物数目限制。

[0023] 如本文所用,术语“PAMAM树枝状聚合物”意指使用酰胺基胺建构嵌段的聚(酰胺基胺)树枝状聚合物,其可以含有不同核心。用于制造其的方法是所属领域的技术人员已知的,并且一般来说,涉及围绕中央引发剂核心产生树枝状 β -丙胺酸单元的同心壳层(级)的两步反复(iterative)反应程序。这一PAMAM核-壳架构随壳层(级)增加而在直径上线性生长。同时,表面基团在每一级根据树枝状分支数学以指数方式扩增。其可以具有5种不同核心类型和10种官能性表面基团的G0-10级形式获得。树枝状聚合物分支聚合物可以由聚酰胺基胺(PAMAM)、聚酯、聚醚、聚赖氨酸或聚乙二醇(PEG)、多肽树枝状聚合物组成。

[0024] 根据一些实施例,所用PAMAM树枝状聚合物可以是羟基附接到其表面官能团上的4级或更高级树枝状聚合物。多臂PEG聚合物包含具有2个和更多个携带硫氢基或硫吡啶端基的分支的聚乙二醇;然而,实施例并不限于这一类别,并且可以使用带有其它端基(诸如丁

二酰亚胺基或顺丁烯二酰亚胺终端)的PEG聚合物。可以使用分子量10kDa到80kDa的PEG聚合物。

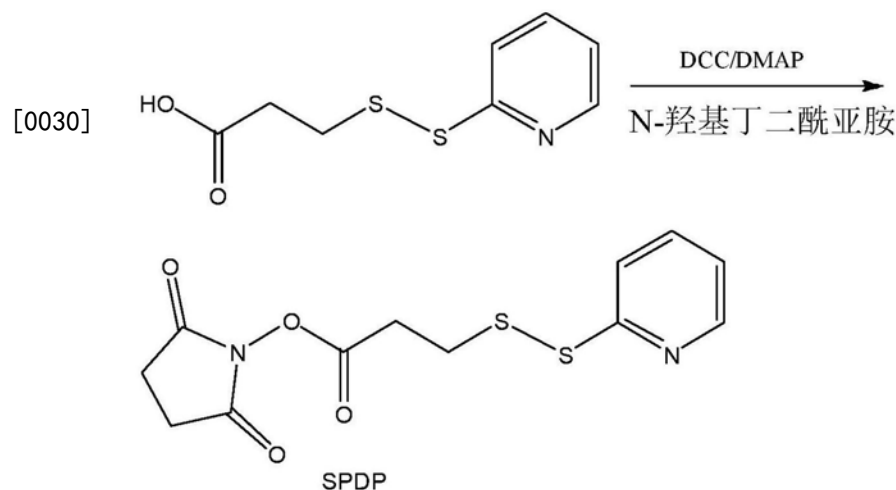
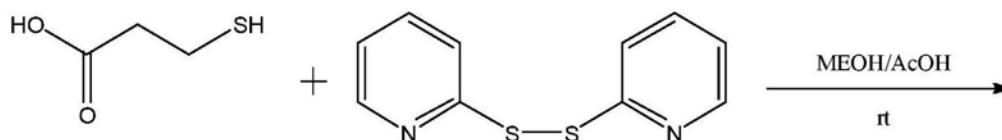
[0025] 在一些实施例中,树枝状聚合物呈纳米粒子形式,并且详细地描述于国际专利公开第W02009/046446号中。

[0026] PAMAM-NAC的制备

[0027] 下文是用于使N-乙酰基半胱氨酸结合到胺封端的第四级PAMAM树枝状聚合物(PAMAM-NH₂)上的合成方案,其使用3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二酰亚胺酯(N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate;SPDP)作为键联剂来进行。

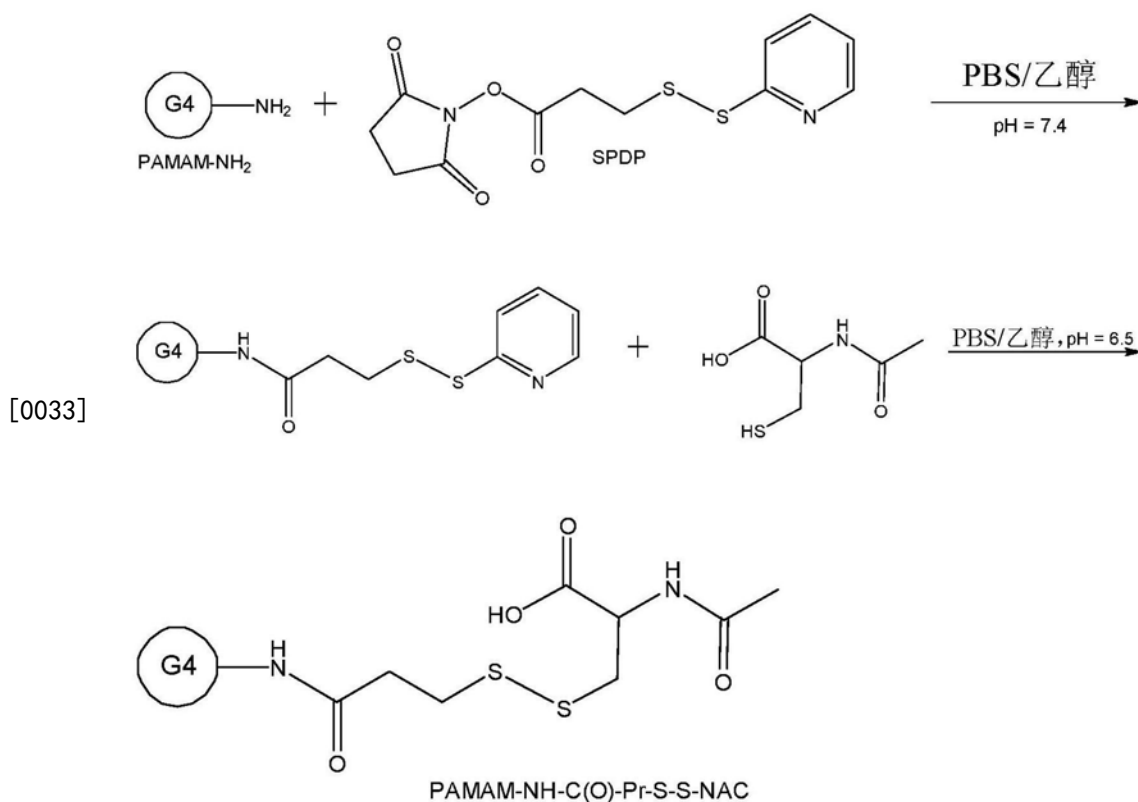
[0028] 3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二酰亚胺酯(SPDP)的合成通过两步程序来进行,方案1。首先,使3-巯基丙酸与2,2'-联吡啶二硫化物通过硫醇-二硫化物交换反应以得到2-羧基乙基2-吡啶基二硫化物。为了促进胺封端的树枝状聚合物与SPDP的连接,使丁二酰亚胺基团与2-羧基乙基2-吡啶基二硫化物反应以获得3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二酰亚胺酯,该反应通过使用N,N'-二环己基碳二亚胺和4-二甲氨基吡啶来与N-羟基丁二酰亚胺进行酯化来进行。

[0029] 方案1

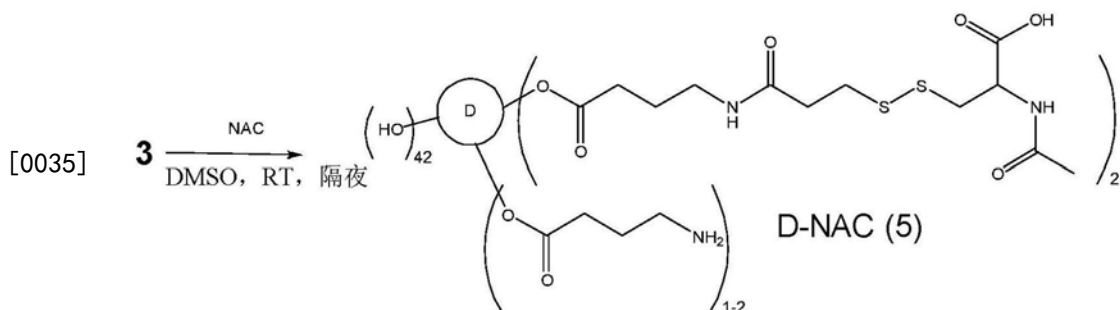


[0031] 为了引入巯基反应性基团,使PAMAM-NH₂树枝状聚合物与异双官能性交联剂SPDP反应,方案2。SPDP的N-丁二酰亚胺基活性酯与终端伯胺偶联以产生酰胺连接的2-吡啶基二硫基丙酰基(PDP),方案2。在与SPDP反应之后,可以使用RP-HPLC来分析PAMAM-NH-PDP以确定SPDP与树枝状聚合物已经反应的程度。

[0032] 方案2



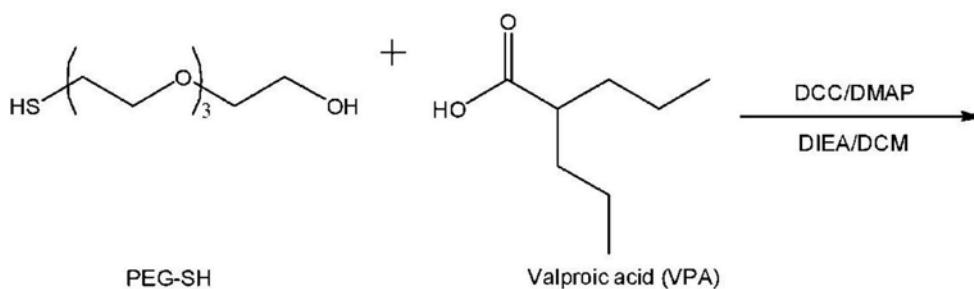
[0034] 在另一个实施例中,可以使用在下文方案4中所述的合成途径,以便合成D-NAC直到经吡啶基二硫基(PDP)官能化的树枝状聚合物3。随后在室温下使化合物3与NAC在DMSO中反应隔夜以获得D-NAC 5。



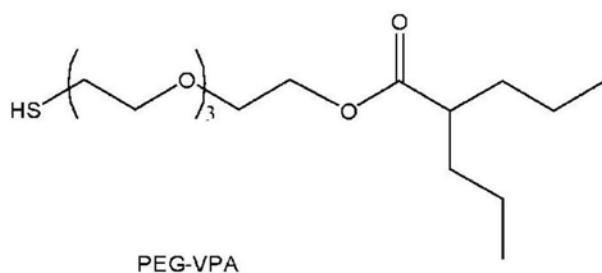
[0036] 树枝状聚合物-PEG-丙戊酸结合物(D-VPA)的制备

[0037] 最初,用硫醇反应性基团对丙戊酸进行官能化。如方案3中所示,使用DCC作为偶联试剂使具有三个(CH₂)₂O-重复单元的短链PEG-SH与丙戊酸反应。所获得的粗PEG-VPA通过柱色谱来纯化,并且通过质子NMR来表征。在NMR光谱中,存在邻近PEG OH基团的CH₂质子峰从3.65ppm下移到4.25ppm,证实PEG-VPA的形成。尽管硫醇基也可能易于与酸官能团反应,但NMR光谱并不指示属于与PEG硫醇基相邻的CH₂质子峰的任何下移。这表明硫醇基任意与具有硫醇反应性的经官能化的树枝状聚合物反应。

[0038] 方案3



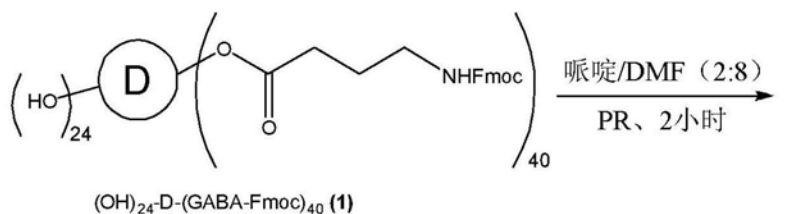
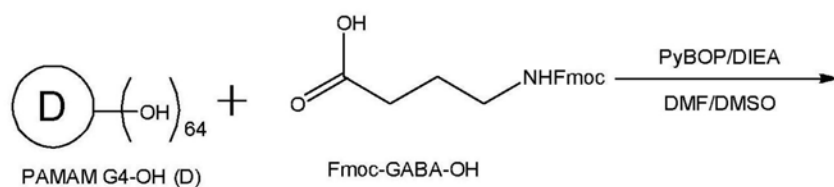
[0039]



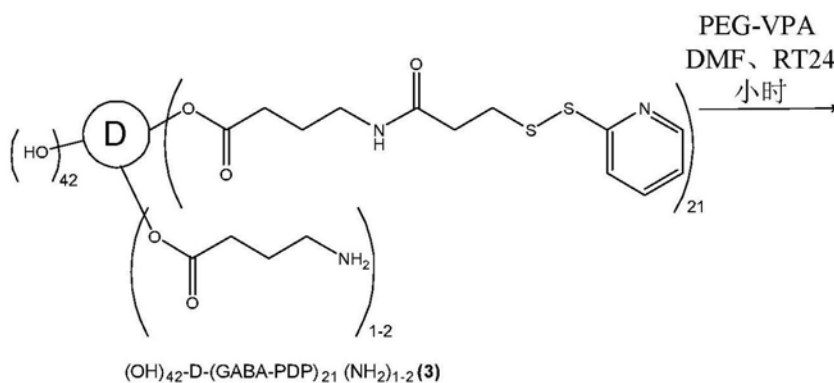
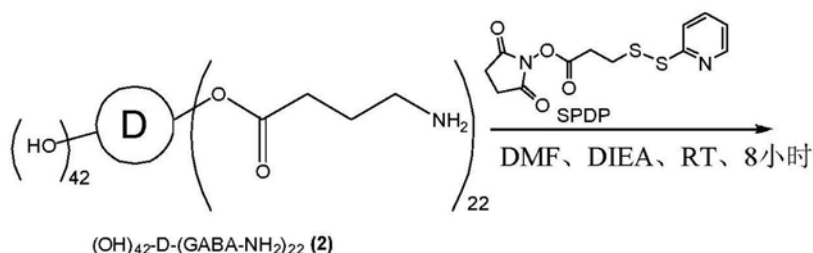
[0040] Valproic acid (VPA) 丙戊酸 (VPA)

[0041] 为了使PEG-VPA与PAMAM-OH结合,在树枝状聚合物与丙戊酸之间引入二硫键,方案4。首先,通过使树枝状聚合物与受苄基甲氧羰基(Fmoc)保护的 γ -氨基丁酸(GABA)反应来将树枝状聚合物转化成双官能树枝状聚合物1。PEG-VPA与双官能树枝状聚合物的结合涉及两步法:第一步骤是使经胺官能化的双官能树枝状聚合物1与3-(2-吡啶基二硫基)-丙酸N-丁二酰亚胺酯(SPDP)反应,并且第二步骤涉及使经硫醇官能化的丙戊酸结合。使SPDP在N,N-二异丙基乙胺(DIEA)存在下与中间物2反应以获得经吡啶基二硫基(PDP)官能化的树枝状聚合物3。

[0042] 方案4



[0043]



[0044] 尽管这是原位反应过程,但通过¹H NMR来确立结构。在光谱中,介于6.7与7.6ppm之间的吡啶基芳香族质子的新峰证实形成产物。证实吡啶基的数目与GABA连接子的数目相同,其指示大多数胺基与SPDP反应。因为这是使药物与树枝状聚合物结合的关键步骤,所以每个胺基使用的SPDP摩尔当量和反应所需的时间得到验证。最后,使PEG-VPA与经PDP官能化的树枝状聚合物原位反应以得到树枝状聚合物-PEG-丙戊酸(D-VPA)。通过¹H NMR来确认最终结合物的形成和VPA的负载量,并且通过逆相HPLC来评估结合物的纯度。在NMR光谱中,介于0.85与1.67ppm之间的VPA脂肪族质子的多重峰、介于3.53与3.66ppm之间的PEG CH₂质子的多重峰和吡啶基芳香族质子的不存在证实结合物形成。使用质子积分法来估计,VPA的

负载量是约21个分子,其表明1-2个胺基并未反应。在HPLC图中,D-VPA的洗脱时间(17.2min)与G4-OH的洗脱时间(9.5min)不同,证实结合物是纯的,不具有可测量的痕量VPA(23.4min)和PEG-VPA(39.2min)。VPA负载量与树枝状聚合物的百分比是约12%w/w,并且验证用于分三个不同批次制造克量的方法。

[0045] B. 偶联剂和间隔子

[0046] 树枝状聚合物复合物可以由结合或附接到树枝状聚合物或多臂PEG的治疗活性剂或化合物(在下文中称为“药剂”)形成。附接可以经由在药剂与树枝状聚合物之间提供二硫桥键的适当间隔子进行。在身体中所见的还原条件下,树枝状聚合物复合物能够通过硫醇交换反应来体内快速释放药剂。

[0047] 如本文所用的术语“间隔子”意图包括用于将治疗活性剂连接于树枝状聚合物的组合物。间隔子可以是单一化学实体或连接在一起以将聚合物与治疗剂或显影剂桥连的两种或更多种化学实体。间隔子可以包括具有硫氢基、硫吡啶、丁二酰亚胺基、顺丁烯二酰亚胺、乙烯基砜和碳酸酯终端的任何较小化学实体、肽或聚合物。

[0048] 间隔子可以选自用硫氢基、硫吡啶、丁二酰亚胺基、顺丁烯二酰亚胺、乙烯基砜和碳酸酯基团封端的一类化合物。间隔子可以包含硫吡啶封端的化合物,诸如二硫联吡啶、3-(2-吡啶基二硫基)-丙酸N-丁二酰亚胺酯(SPDP)、6-(3-[2-吡啶基二硫基]-丙酰基)己酸丁二酰亚胺酯LC-SPDP或磺基-LC-SPDP。间隔子也可以包括肽,其中所述肽是主要具有硫氢基的直链或环状肽,如谷胱甘肽、高半胱氨酸、半胱氨酸和其衍生物, arg-gly-asp-cys (RGDC)、环(Arg-Gly-Asp-d-Phe-Cys)(c(RGDfC))、环(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Cys)、环(Arg-Ala-Asp-d-Tyr-Cys)。间隔子可以是巯基酸衍生物,诸如3巯基丙酸、巯基乙酸、4巯基丁酸、硫杂环戊-2-酮、6巯基己酸、5巯基戊酸以及其它巯基衍生物,如2巯基乙醇和2巯基乙胺。间隔子可以是硫代水杨酸和其衍生物、(4-丁二酰亚胺基氧羰基-甲基- α -2-吡啶基硫基)甲苯、(3-[2-吡啶二硫基]丙酰基酰肼)。间隔子可以具有顺丁烯二酰亚胺终端,其中该间隔子包含聚合物或较小化学实体,如双-顺丁烯二酰亚胺基二乙二醇和双-顺丁烯二酰亚胺基三乙二醇、双-顺丁烯二酰亚胺基乙烷、双顺丁烯二酰亚胺基己烷。间隔子可以包含乙烯基砜,如1,6-己烷-双-乙烯基砜。间隔子可以包含硫代糖苷,例如硫代葡萄糖。间隔子可以是经还原的蛋白质,如牛血清白蛋白和人类血清白蛋白、能够形成二硫键的任何硫醇封端的化合物。间隔子可以包括具有顺丁烯二酰亚胺、丁二酰亚胺基和硫醇终端的聚乙二醇。

[0049] C. 治疗剂、预防剂和诊断剂

[0050] 如本文所用的术语“树枝状聚合物复合物”是指树枝状聚合物与治疗活性剂的组合。这些树枝状聚合物复合物包括附接或结合于PAMAM树枝状聚合物或多臂PEG的药剂,其能够在体内所见的还原条件下优先在细胞内释放药物。树枝状聚合物复合物在通过静脉内注射给予时可以仅在患病条件下并且不在正常条件下优先通过血脑屏障(BBB)。

[0051] 治疗活性剂、显影剂和/或靶向部分可共价附接或分子内分散或囊封。树枝状聚合物优选地是至多10级的具有羧酸、羟基或胺终端的PAMAM树枝状聚合物。PEG聚合物是具有2个或更多个臂并且分子量为10kDa到80kDa的星形聚合物。PEG聚合物具有硫氢基、硫吡啶、丁二酰亚胺基或顺丁烯二酰亚胺终端。树枝状聚合物经由以二硫键、酯键或酰胺键终止的间隔子连接于靶向部分、显影剂和/或治疗剂。

[0052] 代表性治疗剂(包括前药)、预防剂或诊断剂可以是肽、蛋白质、碳水化合物、核苷

酸或寡核苷酸、小分子或其组合。示范性治疗剂包括消炎性药物、抗增生剂、化学治疗剂、血管扩张剂和抗感染剂。

[0053] 抗生素包括 β -内酰胺,如青霉素 (penicillin) 和安比西林 (ampicillin); 头孢菌素,如头孢呋辛 (cefuroxime)、头孢克洛 (cefaclor)、头孢力新 (cephalexin)、头孢羟氨苄 (cephydroxil)、头孢泊肟 (cefodoxime) 和普塞酯 (proxetil); 四环素抗生素,如多西环素 (doxycycline) 和二甲胺四环素 (minocycline); 巨环内酯 (macrolide) 抗生素,如阿奇霉素 (azithromycin)、红霉素 (erythromycin)、雷帕霉素 (rapamycin) 和克拉霉素 (clarithromycin); 氟喹诺酮 (fluoroquinolone), 如环丙沙星 (ciprofloxacin)、恩氟沙星 (enrofloxacin)、氧氟沙星 (ofloxacin)、加替沙星 (gatifloxacin)、左氧氟沙星 (levofloxacin) 和诺氟沙星 (norfloxacin); 托普霉素 (tobramycin); 粘杆菌素 (colistin) 或氨曲南 (aztreonam), 以及已知具有消炎活性的抗生素,如红霉素、阿奇霉素或克拉霉素。优选的消炎剂是包括N-乙酰基半胱氨酸的抗氧化性药物。优选的NSAIDS包括甲芬那酸 (mefenamic acid)、阿司匹林 (aspirin)、二氟尼柳、双水杨酸酯、布洛芬 (Ibuprofen)、萘普生 (Naproxen)、非诺洛芬 (Fenoprofen)、酮洛芬 (Ketoprofen)、脱乙酰基酮洛芬 (Deacketoprofen)、氟比洛芬 (Flurbiprofen)、奥沙普嗪 (Oxaprozin)、洛索洛芬 (Loxoprofen)、吲哚美辛 (Indomethacin)、舒林酸 (Sulindac)、依托度酸 (Etodolac)、酮洛酸 (Ketorolac)、双氯芬酸 (Diclofenac)、萘丁美酮 (Nabumetone)、吡罗昔康 (Piroxicam)、美洛昔康 (Meloxicam)、替诺昔康 (Tenoxicam)、屈恶昔康 (Droxicam)、氯诺昔康 (Lornoxicam)、伊索昔康 (Isoxicam)、甲氯芬那酸 (Meclofenamic acid)、氟芬那酸 (Flufenamic acid)、托芬那酸 (Tolfenamic acid)、伊莱考昔 (elecoxib)、罗非考昔 (Rofecoxib)、伐地考昔 (Valdecocixib)、帕瑞考昔 (Parecoxib)、鲁米考昔 (Lumiracoxib)、依托考昔 (Etoricoxib)、非罗考昔 (Firocoxib)、磺苯胺 (Sulphonanilides)、尼美舒利 (Nimesulid)、氟尼酸 (Niflumic acid) 和利克飞龙 (Licofelone)。

[0054] 代表性小分子包括类固醇,如甲基泼尼松 (methyl prednisone)、地塞米松 (dexamethasone); 非类固醇消炎剂,包括COX-2抑制剂; 皮质类固醇消炎剂; 金化合物消炎剂; 免疫抑制、消炎和抗血管生成剂; 抗兴奋毒性剂,如丙戊酸、D-氨基膦酰基戊酸酯、D-氨基膦酰基庚酸酯; 谷氨酸酯形成/释放的抑制剂,如巴氯芬; NMDA受体拮抗剂; 水杨酸酯消炎剂; 兰比珠单抗 (ranibizumab); 抗VEGF剂,包括阿柏西普 (aflibercept) 和雷帕霉素。其它消炎性药物包括非类固醇药物,如吲哚美辛 (indomethacin)、阿司匹林、乙酰胺苯酚、双氯芬酸钠 (diclofenac sodium) 和布洛芬。皮质类固醇可以是氟新诺龙丙酮 (fluocinolone acetonide) 和甲基泼尼龙 (methylprednisolone)。肽药物可以是链激酶。

[0055] 多种炎性疾病可经由针对脂多糖 (LPS) 的受体, toll样受体4 (TLR4) 而与病理性升高的信号传递产生联系。因此TLR4抑制剂作为潜在消炎剂的发现受到了极大关注。近年来, 揭开了结合于抑制剂E5564的TLR4的结构, 使得能够设计和合成出靶向E5564结合域的新型TLR4抑制剂。这些描述在美国专利第8,889,101号中, 其内容以引用的方式并入。如通过 Neal等人, 科学公共图书馆综合卷. 2013; 8 (6) : e65779e所报告, 结合小分子库的受限筛分方法的相似性搜索演算法鉴别出结合于E5564位点并抑制TLR4的化合物。主导化合物C34为具有式C₁₇H₂₇N₉O₉的2-乙酰胺基吡喃糖苷 (MW 389), 其抑制体外肠细胞和巨噬细胞中的TLR4并减少内毒素血症和坏死性小肠结肠炎的小鼠模型中的全身性炎症。C34与TLR4辅助受体

MD-2的内部疏水袋的分子对接展现出紧密配合,将吡喃环深深地包埋于该袋内。惊人地,C34会在从患有坏死性小肠结肠炎的婴儿切除的人类回肠中抑制离体LPS信号传递。这些发现鉴别C34和 β -端基异构环己基类似物C35作为对TLR4介导的炎性疾病具有潜在治疗效益的小分子TLR4抑制剂的新颖先导物。

[0056] Wipf等人,四面体通讯(Tetrahedron Lett.) 2015 56 (23):3097-3100(“Wipf”)描述了C34的类似物,所述文献以引用的方式并入本文中。使用端基异构恶唑啉的铜(II)介导的溶剂分解和 β -葡糖胺和 β -半乳糖胺五乙酸的酸介导的转化来在端基异构碳处和吡喃糖环的C-4处产生C34的类似物。

[0057] 在经培养的肠细胞和单核细胞中针对这些化合物对TLR4介导的炎性信号传递的影响对其加以评估。使用NF- κ B荧光素酶报告基因小鼠确认其功效,由此在这一系列中确立第一结构-活性关系(SAR)研究并鉴别出更有效的异丙基2-乙酰胺基- α -半乳糖苷17。这些数据显示,C34、其类似物或其它TLR4抑制剂可结合到树枝状聚合物以供用于口服调配物中。

[0058] 树枝状聚合物复合物也可用于递送抗兴奋毒性及抗D-谷氨酸剂。优选候选物为:MK801、美金刚(Memantine)、氯胺酮(Ketamine)、1-MT。

[0059] 代表性寡核苷酸包括siRNA、微RNA、DNA和RNA。治疗剂可以是具有胺或羟基封端的PAMAM树枝状聚合物。

[0060] 连接于生物活性化合物或治疗活性剂的树枝状聚合物复合物可以用于发挥若干功能,包括靶向、在患病位点处定位、释放药物和成像目的。可以在存在或不存在靶向部分的情况下标记树枝状聚合物复合物,以使得在树枝状聚合物与药剂或成像剂之间的二硫键经由间隔子或连接分子形成。

[0061] D. 装置和调配物

[0062] 树枝状聚合物可以被肠内给予。本文所用的载剂或稀释剂可以是用于固体调配物的固体载剂或稀释剂、用于液体调配物的液体载剂或稀释剂或其混合物。

[0063] 对于液体调配物,药学上可接受的载剂可以是例如水性或非水性溶液、悬浮液、乳液或油。非水性溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇和可注射有机酯(如油酸乙酯)。水性载剂包括例如水、醇/水溶液、环糊精、乳液或悬浮液,包括生理盐水和缓冲介质。

[0064] 油的实例是石油、动物、植物或合成来源的油,例如花生油、大豆油、矿物油、橄榄油、葵花油、鱼肝油、芝麻油、棉籽油、玉米油、橄榄油、石蜡油和矿物油。适合用于肠胃外调配物中的脂肪酸包括例如油酸、硬脂酸和异硬脂酸。油酸乙酯和十四烷酸异丙酯是合适脂肪酸酯的实例。

[0065] 媒剂包括例如氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏溶液和非挥发性油。调配物包括例如水性和非水性等张无菌注射溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使得调配物与预期接受者的血液等张的溶质;以及可以包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂的水性和非水性无菌悬浮液。媒剂可包括例如流体和营养补充剂、电解质补充剂,如基于林格氏右旋糖的那些媒剂。一般来说,水、生理盐水、右旋糖水溶液和相关糖溶液为优选的液体载剂。这些还可与蛋白质、脂肪、糖类和婴儿调配物的其它组分一起调配。

[0066] III. 治疗方法

[0067] A. 待治疗的病症或疾病

[0068] 可给予调配物以治疗与感染、炎症或癌症相关的病症,尤其具有发展成至CNS的全身性炎症的那些病症。已认识到先天性免疫受体, *tol1*样受体4 (TLR4) 为针对细菌内毒素(脂多糖,“LPS”),以及针对在炎性或感染性病症期间释放的多种内源性分子的造血和非造血细胞上的受体。多种疾病已被归因于扩大的TLR4信号传递,包括感染性及非感染性过程。这些疾病包括坏死性小肠结肠炎(NEC)、腹部败血症、肺炎、关节炎、胰腺炎和动脉粥样硬化。在一个优选实施例中,待治疗的疾病为NEC。

[0069] 树枝状聚合物复合组合物,包括连接于治疗剂、预防剂或诊断剂的树枝状聚合物,可选择性地靶向小胶质细胞和星形胶质细胞,所述细胞在NEC的发病机理中起重要作用。已经充分探究和研究N-乙酰基半胱氨酸(“NAC”)。还探究与母体胎儿感染相关的神经炎症。然而,NAC由于高血浆蛋白结合而具有低生物可用性。树枝状聚合物复合组合物克服血浆蛋白结合而不影响NAC的活性。通过单一静脉内给药,G4 PAMAM-NAC的体内有效性可以是游离药物NAC的十到一百倍。游离药物NAC展现极高血浆蛋白结合,导致生物可用性降低。这种树枝状聚合物复合物的主要优点之一是,其通过限制不合需要的药物血浆蛋白质相互作用来增强生物可用性,并且选择性地引起药物在细胞内的快速释放以展现所需治疗作用。

[0070] G4 PAMAM-NAC中的药物NAC的高有效载荷需要极小量(10mg)的载剂、PAMAM树枝状聚合物,由此减少每日给予的量。药剂量的减少限制与该药剂相关的副作用。因为药剂的生物可用性保持较高,所以尽管给予较小量的药剂,但该药剂的积极效果未降低。包括树枝状聚合物-药物结合物的树枝状聚合物复合物限制其向组织和器官中的生物分布,并且优先在目标位点处递送药物,由此减少非所期望的副作用。

[0071] 树枝状聚合物复合物有效跨BBB输送,并且因此适用于在神经、神经发育性和神经退化性病症以及大脑损伤中进行靶向药物递送。G4-PAMAM-S--S-NAC结合物特异性地靶向神经炎症性病症中的活化小胶质细胞和星形胶质细胞:

[0072] 在用脂多糖(LPS)进行动物处理两天以在发育中的兔大脑中诱发白质损伤和髓鞘形成不良(大脑性麻痹的动物模型)之后,评估G4-PAMAM-S--S-NAC树枝状聚合物结合物的治疗效果。选择性地由G4-PAMAM-S--S-NAC树枝状聚合物复合物递送的NAC强有力地遏制促炎性细胞因子(TNF- α 、IL-6mRNA);炎性信号传递因子,包括NF- κ .B和硝基酪氨酸,并且增强GSH水平。与游离NAC相比较,发现G4-PAMAM-S--S-NAC的有效性是十到一百倍。这支持G4-PAMAM-S--S-NAC行进穿过BBB的结论。NAC从树枝状聚合物复合物向活化小胶质细胞中的靶向递送在大脑性麻痹的新生兔模型中改善运动缺陷和使得由LPS诱发的大脑损伤引起的恢复减弱。

[0073] 在给予G4-PAMAM-S--S-NAC树枝状聚合物复合物后,观察到促炎性细胞因子(TNF- α 、IL-6mRNA)的显著减少。当与用生理盐水处理的套组相比时,用NAC和G4-PAMAM-S--S-NAC处理的套组展示胎儿炎症反应减少以及运动缺陷改善。当与由于持续由G4-PAMAM-S--S-NAC结合物递送NAC而单独接受NAC的套组相比时,用G4-PAMAM-S--S-NAC结合物处理的套组的行为变化较小并且大脑中的小胶质细胞活化较低。结果指示G4-PAMAM-S--S-NAC结合物的效果比单独NAC更大,这是因为其优先由活化巨噬细胞和小胶质细胞吸收,降低发炎性和氧化性和亚硝基化效果。

[0074] 用G4-PAMAM-S--S-NAC树枝状聚合物复合物处理减少白质损伤和小胶质细胞活

化。当以G4-PAMAM-S--S-NAC形式给予以引起与对游离NAC所观察到的类似的反应时,观察到NAC剂量显著减少。浓度为100mg/kg的游离NAC和浓度为10mg/kg的G4-PAMAM-S--S-NAC 10mg都引起相同反应,展现在结合于树枝状聚合物后,实现剂量减少。相较于游离NAC,较低浓度的G4-PAMAM-S--S-NAC显示针对LPS诱发的大脑损伤的显著保护性作用,抑制TNF- α 并下调IL-6活性。树枝状聚合物-NAC结合物的这一活性可以归因于其干扰早期炎症反应的能力,该干扰通过阻断或修改信号转导因子NF- κ B和硝基酪氨酸,由此调节细胞活化来进行。6和8臂PEG-NAC结合物在2小时内以细胞内GSH浓度(2和10mM)释放74%的NAC。在介于0.008-0.8mM之间的浓度范围内,结合物对小胶质细胞无毒性。在等摩尔浓度的NAC(0.5mM)下,6臂PEG-S--S-NAC和8臂PEG-S--S-NAC在抑制GSH消耗中比游离NAC更高效。当与等摩尔浓度的游离NAC相比时,各自为0.5mM和5mM浓度的6臂和8臂PEG-S--S-NAC结合物都在ROS产生中展示显著抑制。研究展现,与游离NAC相比,结合物在抑制NO产生中较优越。在最高浓度(5mM)下,游离药物使H₂O₂水平和亚硝酸酯水平降低30%-40%,而结合物使H₂O₂和亚硝酸酯水平降低超过70%。这展示结合物能够将药物运到细胞内侧,并且释放游离形式的药物,并且比游离药物显著地更有效。在5mM浓度下,当与等浓度的NAC(Pb0.05)相比时,6臂PEG-S--S-NAC结合物(1)展示显著抑制TNF- α 产生(70%)。在5mM下,当与等浓度的NAC(Pb0.05和Pb0.01)相比时,8臂PEG-S--S-NAC结合物(3)展示显著抑制TNF- α 产生(70%)。PEG化NAC是具有医药行业效用的树枝状聚合物复合物,因为批准PEG用于人类用途并且这一装置解决NAC的限制并提供更大功效。

[0075] B. 剂量

[0076] 通常,主治医生将在考虑到多种因素,例如年龄、体重、总体健康、饮食、性别、待给予的化合物、给药途径和所治疗病状的严重程度的情况下决定用于治疗每一个别个体的组合物剂量。组合物的剂量可以是每千克待治疗个体的体重约0.0001到约1000mg、每千克体重约0.01到约100mg、约0.1mg/kg到约10mg/kg和每千克体重约0.5mg到约5mg。

[0077] 一般来说,将调节给药的时间安排和频率以使既定治疗或诊断时程的功效与既定递送系统的副作用平衡。示例性给药频率包括连续输注;单次和多次给药,如每小时、每日、每周、每月或每年给药。

[0078] 所属领域的技术人员应理解,本发明方法中所用的给药方案可呈足够治疗个体病症的任何时长。如本文所用的术语“慢性”意指给药方案的时长可以是数小时、数天、数周、数月或可能数年。

[0079] 树枝状聚合物复合物可以与一种或多种其它治疗活性剂组合给予,已知所述治疗活性剂能够治疗上文所论述的病状或疾病。

[0080] 将通过参考以下非限制性实例进一步理解本发明。

[0081] 实例1:坏死性小肠结肠炎的治疗

[0082] NEC的发展需要活化肠上皮细胞上的细菌受体,toll样受体4(TLR4),因为缺乏TLR4的小鼠经保护而免于患有NEC,而患有NEC的人类在肠道中展现增加的TLR4活化。肠上皮细胞上TLR4的活化引起小胶质细胞的活化,导致前额皮质中的髓鞘缺失,并且小鼠中出现的认知障碍与人类中所观察到的疾病极度相似。

[0083] 聚(酰胺基胺)树枝状聚合物靶向CNS中的炎症并递送药物以产生功能改善。如通过以下实例所展示,口服给予树枝状聚合物引起树枝状聚合物在患有NEC的小鼠中的肠道

和大脑的受损区域处显著积聚,同时进一步选择性地定位于炎性细胞处。惊人地,使用树枝状聚合物口服给予消炎剂(N-乙酰基半胱氨酸)使得患有NEC的动物中的大脑损伤和肠道损伤得到显著改善。树枝状聚合物在受损肠道和大脑中的这一选择性定位对于保留肠道情况下的NEC的非手术治疗,以及包括导致大脑损伤的神经炎症的相关全身性炎症的治疗具有意义。经荧光团标记的树枝状聚合物在肠道中的炎性细胞处的选择性定位也可用作灵敏检测NEC的诊断工具。

[0084] 物质和方法

[0085] 树枝状聚合物.在下文实验中所用的详细材料和方法(包括用于制造树枝状聚合物-Cy5和树枝状聚合物-药物结合物的方案)已经由Kannan S等人科学转化医学(Sci.Transl.Med.),4:130ra46(2012)并在美国专利案第8,889,101号中加以描述。

[0086] 树枝状聚合物结合物的结合.使用先前报告的方法(Kannan等人,科学转化医学(2012年4月))来进行树枝状聚合物与Cy5的结合。对于药物实验,使树枝状聚合物结合于N-乙酰基-半胱氨酸,并且在不同时间点以介于2-20mg/kg范围内的剂量给予。

[0087] 统计分析.使用斯图登氏t测试(Student's t-test)分析数据的再现性以确定两组之间的显著性。等于或小于0.05的p值视为显著的。

[0088] NEC的动物模型.使新生小鼠(产后6-11天)暴露于良好建立的坏死性小肠结肠炎(NEC)的模型。简单来说,经由管饲以五次/天用补充有由人类NEC分离的细菌的配方喂养幼鼠并在低氧腔室中以每日两次持续4天使其经历低氧(5%O₂,95%N₂)持续10min。

[0089] 两个实验方案用于测定NEC对大脑的急性作用与长期作用。为了测定急性作用,在完成NEC方案(产后11天)之后立即收集大脑样品,之后对髓鞘形成和小胶质细胞活化进行免疫组织化学评估。在完成NEC方案(产后32-46天)之后3周使用Morris水迷宫和新物体识别测试测定面临NEC的行为影响。

[0090] 树枝状聚合物-NAC疗法.在NEC方案的第2天和第3天(即产后8天和9天),通过经口管饲在NAC基础上以18mg/kg(在D-NAC结合物基础上,100mg/kg)的临床相关剂量递送经N-乙酰基-半胱氨酸结合的树枝状聚合物(D-NAC)。

[0091] 对于成像,在NEC方案的第3天,在上一D-NAC剂量之后延迟数小时,通过经口管饲以100mg/kg递送经Cy5标记的树枝状聚合物(D-Cy5)。

[0092] 高效液相色谱(HPLC)分析.使用与Empower软件介接的配备有沃特世(Waters)线上脱气装置、二元泵、光电二极管阵列(PDA)检测器、多元荧光λ检测器和自动取样器(维持在4℃下)的沃特世HPLC仪器(马萨诸塞州米尔福德的沃特世公司(Waters Corporation, Milford, Massachusetts))来分析树枝状聚合物-Cy5结合物(D-Cy5)的纯度。同时使用沃特世2998 PDA检测器对树枝状聚合物监测HPLC色谱图中210nm处吸收并且对Cy5监测650nm处吸收,并使用沃特世2475荧光检测器监测HPLC色谱图中645nm处激发和662nm处发射的荧光。水/乙腈(0.1%w/w TFA)经过新鲜制备、过滤、脱气,并且用作流动相。使用与TSK-Gel 保护柱连接的TSK-Gel ODS-80 Ts(250×4.6mm,25cm长,5μm粒度)。使用以下梯度流:初始条件为90:10(H₂O/ACN),并且接着以1ml/min的流动速率在30分钟内逐渐增加乙腈浓度达到10:90(H₂O/ACN),并且在60分钟内恢复到原始初始条件90:10(H₂O/ACN)。

[0093] 免疫组织化学和共聚焦显微镜检查.将大脑切片固定在含2%多聚甲醛(PFA)的PBS中。以1:2比率分别使用含干冰的异戊烷将大脑在具有最优切割温度化合物(OCT)的

20%蔗糖(加利福尼亚州托兰斯的樱花优越技术美国公司(Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA))中冷冻。将低温块储存在-80℃下直到切片为止。使用低温恒温器从冷冻块切割8μm切片。在兔抗离子化钙结合衔接子1分子(Iba-1)(美国和光化学品公司(Wako chemicals, USA))(其是小胶质细胞标记物)中培育切片,并且施用山羊抗兔Cy3二级抗体。在蔡司(Zeiss)510共聚焦显微镜上分析切片。激发和发射波长以及激光设定与分析IV注射动物中的所有组织相同。取得Z形堆叠的切片并且收缩,以得到穿过完整切片深度的图像。

[0094] 结果

[0095] 通过Morris水迷宫中的受损工作记忆和空间学习以及新物体识别行为测试所证明,面临NEC的幼畜显示显著认知缺陷。这些结果与髓鞘形成和小胶质细胞活化的组织病理学评估相关。当与对照动物相比时,面临NEC的动物具有缺陷的髓鞘形成型样,其通过中脑和胼胝体中下降的髓鞘碱性蛋白(MBP)表达而特别明显。此外,与对照物相比,经NEC处理的动物显示在胼胝体、海马体和中脑水平下小胶质细胞活化增加。

[0096] 口服给予的树枝状聚合物易于通过肠道吸收,并展现病变相关生物分布。看到树枝状聚合物大多积聚在大脑皮质,尤其顶叶皮质和运动皮质处。还看到D-Cy5积聚在丘脑、丘脑核处。

[0097] 与未经处理的NEC小鼠相比,在NEC期间给予D-NAC会引起对大脑的保护作用,如通过D-Cy5吸收量下降(指示较低水平的炎症、小胶质细胞活化减少和正常髓鞘形成型样所证明。不管动物通过组织病理学和qRT-PCR评估显示坏死性小肠结肠炎的明显证据这一事实,观察到D-NAC的保护作用。

[0098] 在用经Cy5标记的树枝状聚合物(D-Cy5)投配的所有小鼠群中,积聚在肠道中,由肠道绒毛中的上皮细胞吸收的树枝状聚合物表明D-Cy5被吸收于胃肠道中,并且被分配于全身循环中。

[0099] 在经配方喂养的小鼠(NEC)中,看到大多经Cy5标记的树枝状聚合物(D-Cy5)积聚在大脑皮质,尤其顶叶皮质和运动皮质处(图2)。还看到D-Cy5积聚在丘脑、丘脑核处。

[0100] 为了进一步鉴别相关区域处D-Cy5的细胞共定位,在较高放大倍数下检查顶骨区域处的躯体感觉皮质。在躯体感觉皮质处,大多数D-Cy5定位似乎处于皮质的第2层-第5层处,并形成细胞吸收型样。

[0101] 在丘脑和丘脑核处,D-Cy5明显地显示出细胞共定位,其中占主导的细胞由未经标记的细胞吸收,并且一些细胞由活化的小胶质细胞/巨噬细胞吸收。

[0102] 另外,D-NAC处理显著降低NEC相关的小胶质细胞活化、脑室周围区域处的D-Cy5积聚,并显著促进经配方喂养的小鼠的大脑中的髓鞘形成。D-NAC处理降低经配方喂养的小鼠中的大脑的脑室周围区域处的D-Cy5积聚。在经母乳喂养的小鼠(健康阳性对照)中,仅在脉络丛处看到D-Cy5。在经配方喂养的小鼠(NEC阴性对照)中,D-Cy5以极大量积聚在脑室周围区域处并可能由于细胞吸收而形成分散型样。对经配方喂养的小鼠进行D-NAC处理(NEC,经树枝状聚合物-NAC处理)之后,D-Cy5在脑室周围区域附近的积聚显著降低,同时仅在心室外层处观察到极少D-Cy5。由于大脑中所吸收的树枝状聚合物已显示与炎症程度成比例,因此这表明口服D-NAC处理会减少神经炎症。

[0103] D-NAC处理会降低NEC相关的小胶质细胞活化。在经母乳喂养和配方喂养+D-NAC处理的小鼠中,小胶质细胞具有相似数目,具有小细胞体,表明小胶质细胞呈'静息状态

(resting state)’.对比之下,在经配方喂养的小鼠(对照)中,小胶质细胞数目显著增加,具有增大细胞体,表明小胶质细胞活化。

[0104] D-NAC处理在经配方喂养的小鼠的大脑中针对与NEC相关的髓鞘形成缺陷进行保护。相较于仅经配方喂养的小鼠(NEC,未经处理),经母乳喂养(健康对照)和配方喂养+D-NAC处理(NEC,经D-NAC处理)的小鼠在大脑中具有较高程度的髓鞘形成,表明配方喂养+D-NAC处理组中炎症的减少益于神经修复。

[0105] 已使用仔猪模型获得类似结果,其由Good等人美国生理学杂志:胃肠与肝生理学(Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.) 2014 306(11):G1021-32.doi:10.1152/ajpgi.00452.2013.电子版2014年4月17日加以描述。

[0106] 本文中所引用的全部参考文献,包括公开、专利申请和专利通过引用并入本文中,其引用程度就像每一参考文献单独地并且特定地通过引用并入本文中整体阐述一般。