



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110913916 A

(43)申请公布日 2020.03.24

(21)申请号 201880037028.9

(22)申请日 2018.04.27

(30)优先权数据

62/490,936 2017.04.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.12.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/029882 2018.04.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/201007 EN 2018.11.01

(71)申请人 约翰霍普金斯大学

地址 美国马里兰州

(72)发明人 K·兰格拉曼奴贾姆

S·P·坎布哈帕蒂 G·A·卢蒂

R·莎玛

(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 49/00(2006.01)

A61P 27/02(2006.01)

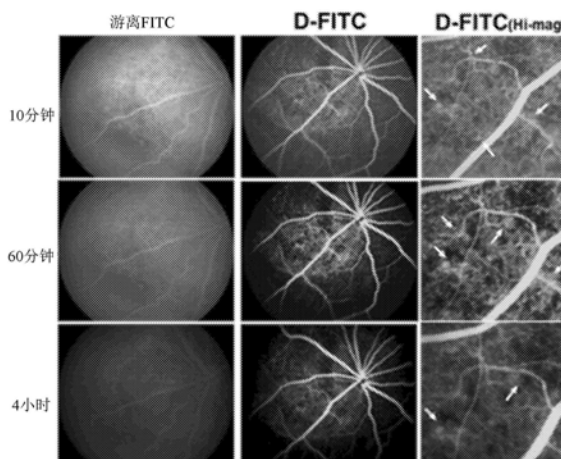
权利要求书4页 说明书17页 附图2页

(54)发明名称

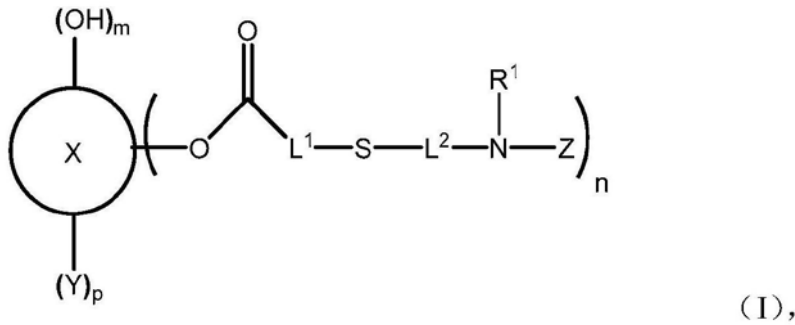
用于血管造影的树状聚合物组合物

(57)摘要

公开了用于进行与眼部疾病有关的血管造影的化合物、组合物、试剂盒和方法。



1. 一种式 (I) 的树状聚合物:



其中,

X是G2到G10的聚(酰胺胺)(PAMAM)树状聚合物;

L^1 和 L^2 各自独立地是 C_1 - C_{12} 亚烷基、 C_1 - C_{12} 亚烯基或 C_1 - C_{12} 亚炔基;

Z是荧光团;

Y是氧化应激探针;

R^1 是氢或烷基;

n是1到100的整数;

p是0到100的整数;并且

m是16到4000的整数。

2. 根据权利要求1所述的树状聚合物,其中

X是G2到G6的PAMAM树状聚合物;

L^1 和 L^2 各自独立地是 C_1 - C_6 亚烷基、 C_1 - C_6 亚烯基或 C_1 - C_6 亚炔基;

n是1到10的整数;

p是1到10的整数;并且

m是1到250的整数。

3. 根据权利要求1或2所述的树状聚合物,其中

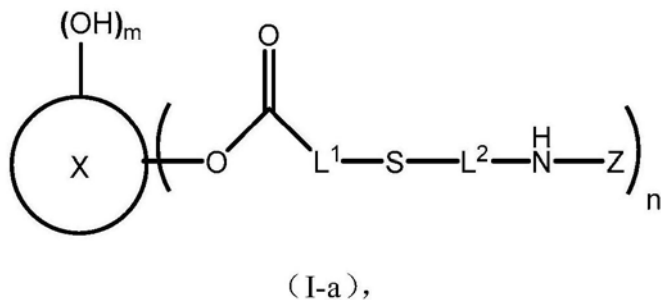
L^1 和 L^2 各自独立地是 C_1 - C_6 亚烷基;

n是1到5的整数;并且

p是1到5的整数。

4. 根据权利要求1到3中任一项所述的树状聚合物,其中Y在每次出现时独立地选自由以下组成的群组:7-乙基-10-羟基喜树碱、4-羟基-2-壬烯醛、硝基酪氨酸、8-羟基-2'-脱氧鸟苷、丙二醛、8-异前列腺素及其组合。

5. 根据权利要求1所述的树状聚合物,其具有式 (I-a):



其中,

X是G2到G10的聚(酰胺胺)(PAMAM)树状聚合物;
 L^1 和 L^2 各自独立地是 C_1 - C_{12} 亚烷基、 C_1 - C_{12} 亚烯基或 C_1 - C_{12} 亚炔基;
 Z是荧光团;
 n是1到100的整数;并且
 m是16到4000的整数。

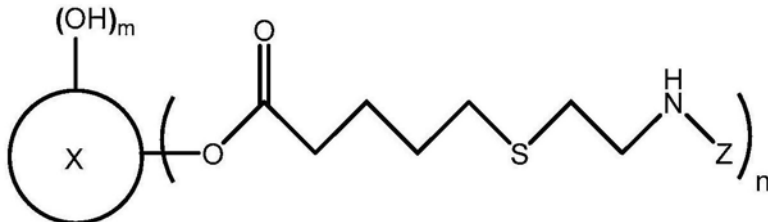
6. 根据权利要求5所述的树状聚合物,其中:

X是G2到G6的PAMAM树状聚合物;
 L^1 和 L^2 各自独立地是 C_1 - C_6 亚烷基、 C_1 - C_6 亚烯基或 C_1 - C_6 亚炔基;
 n是1到10的整数;并且
 m是1到250的整数。

7. 根据权利要求5或6所述的树状聚合物,其中:

L^1 和 L^2 各自独立地是 C_1 - C_6 亚烷基;并且
 n是1到5的整数。

8. 根据权利要求1所述的树状聚合物,其具有式(I-b):



(I-b),

其中,

X是G2到G10的PAMAM树状聚合物;
 Z是荧光团;
 n是1到100的整数;并且
 m是16到4000的整数。

9. 根据权利要求8所述的树状聚合物,其中

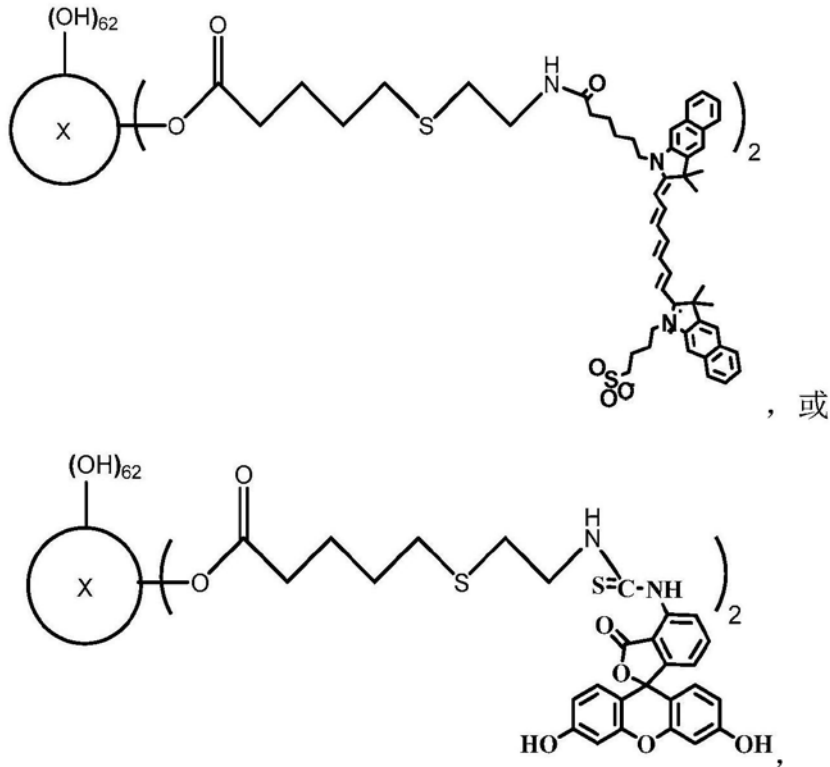
X是G2到G6的PAMAM树状聚合物;
 n是1到10的整数;并且
 m是1到250的整数。

10. 根据权利要求1到9中任一项所述的树状聚合物,其中

X是G4的PAMAM树状聚合物;
 n是2;并且
 m是62。

11. 根据权利要求1到10中任一项所述的树状聚合物,其中Z在每次出现时独立地选自由以下组成的群组: 吖啶菁绿、异硫氰酸荧光素、硼-二吡咯亚甲基、罗丹明、孟加拉玫瑰红及其组合。

12. 根据权利要求1到11中任一项所述的树状聚合物,其中所述树状聚合物是:



其中X是G4的PAMAM树状聚合物。

13. 根据权利要求1到12中任一项所述的树状聚合物,其中所述树状聚合物具有约1nm到约20nm的直径。

14. 根据权利要求1到13中任一项所述的树状聚合物,其中所述树状聚合物的约0.1%到约20%的末端基团共价连接到荧光团。

15. 一种用于对有需要的受试者进行血管造影的方法,所述方法包括:

向所述受试者施用组合物,所述组合物包括根据权利要求1到14中任一项所述的树状聚合物;和

观察和/或量化在所述受试者的眼脉管系统中发出的荧光。

16. 根据权利要求15的方法,其中所述受试者患有黄斑变性(AMD)、色素性视网膜炎、视神经炎、感染、葡萄膜炎、结节病、镰状细胞病、视网膜脱离、颞动脉炎、视网膜缺血、脉络膜缺血、脉络膜缺血、缺血性视神经病变、动脉硬化性视网膜病变、高血压性视网膜病变、视网膜动脉阻塞、视网膜静脉阻塞、低血压、糖尿病性视网膜病变、黄斑水肿、脉络膜新生血管或其组合。

17. 根据权利要求15或权利要求16所述的方法,其中所述组合物包括尺寸为约2nm到约8nm的第一组树状聚合物和尺寸为约12nm到约20nm的第二组树状聚合物。

18. 根据权利要求15到17中任一项所述的方法,其中施用所述组合物包含将所述组合物静脉内注射到所述受试者的所述脉管系统中。

19. 根据权利要求15到18中任一项所述的方法,其中所述组合物以约0.1mg/kg到约20mg/kg的剂量施用。

20. 根据权利要求15到19中任一项所述的方法,其中所述方法在约10秒到约28天的时间段内进行。

21. 根据权利要求15到20中任一项所述的方法,其中所述方法包括所述组合物的单一施用,并且进行至少21天。

22. 根据权利要求15到21中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括对所述受试者进行光学相干断层扫描(OCT)。

23. 根据权利要求15到22中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括鉴别患病的脉管系统。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述方法进一步包括鉴别所述患病的脉管系统的疾病阶段。

25. 根据权利要求15到24中任一项所述的方法,其中所述组合物进一步包括药学上可接受的载剂。

26. 根据权利要求15到25中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述受试者鉴别为需要治疗眼病。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述方法进一步包括向被鉴别为需要治疗眼病的所述受试者施用有效量的治疗剂。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述治疗剂包括曲安奈德、甲基泼尼松、地塞米松、COX-2抑制剂、金化合物抗炎剂、水杨酸盐抗炎剂、N-乙酰基半胱氨酸、米诺环素、阿柏西普、雷帕霉素、抗VEGF剂或其组合。

29. 一种药物组合物,其包括根据权利要求1到14中任一项所述的树状聚合物;和药学上可接受的载剂。

30. 一种血管造影试剂盒,其包括:

根据权利要求29所述的药物组合物;和

在血管造影中使用所述药物组合物的说明。

用于血管造影的树状聚合物组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

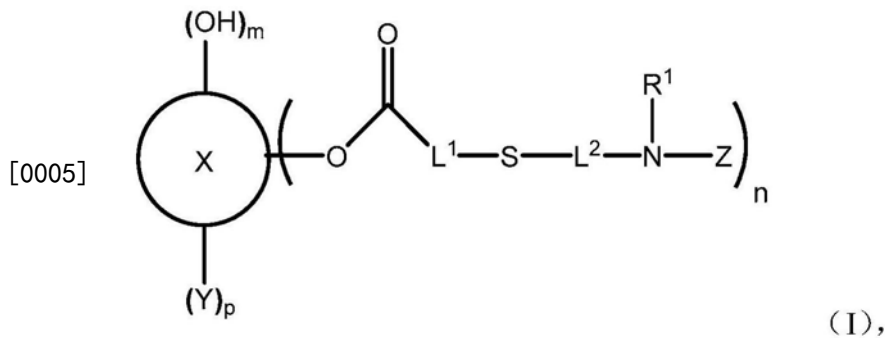
[0002] 本申请要求2017年4月27日提交的美国临时申请第62/490,936号的权益,其通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 荧光素血管造影 (FA) 和吲哚菁绿血管造影 (ICGA) 在糖尿病性视网膜病变 (DR) 的背景下广泛用于验证和定位渗漏,并且在新生血管性年龄相关性黄斑变性 (AMD) 的背景下用于评估血管健康、新生血管并鉴别可治疗的病灶。尽管荧光素和吲哚菁绿均已获得临床批准,但它们均不能为血管造影应用提供理想的灵敏度和信号分析。

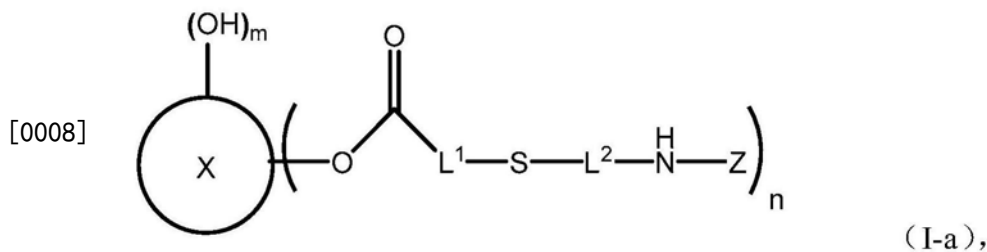
发明内容

[0004] 在一些方面,本公开提供了一种式 (I) 的化合物:



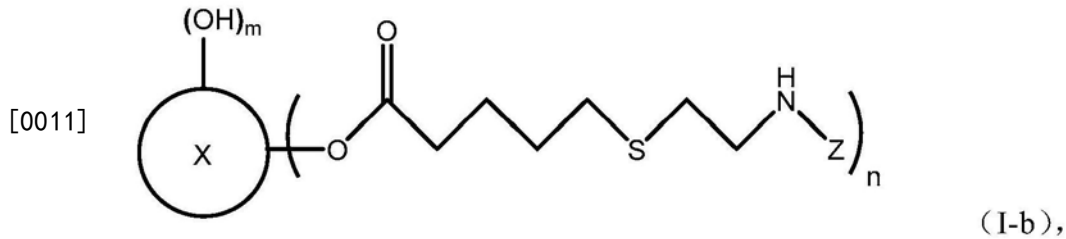
[0006] 其中X是G2到G10的聚(酰胺胺) (PAMAM) 树状聚合物;L¹和L²各自独立地是C₁-C₁₂亚烷基、C₁-C₁₂亚烯基或C₁-C₁₂亚炔基;Z是荧光团;Y是氧化应激探针;R¹是氢或烷基;n是1到100的整数;p是0到100的整数;并且m是16到4000的整数。

[0007] 在其它方面,本公开提供了一种式 (I-a) 的化合物:



[0009] 其中X是G2到G10的PAMAM树状聚合物;L¹和L²各自独立地是C₁-C₁₂亚烷基、C₁-C₁₂亚烯基或C₁-C₁₂亚炔基;Z是荧光团;n是1到100的整数;并且m是16到4000的整数。

[0010] 在某些方面,本公开提供了一种式 (I-b) 的化合物:



[0012] 其中X是G2到G10的PAMAM树状聚合物；Z是荧光团；n是1到100的整数；并且m是16到4000的整数。

[0013] 在其它方面，本公开提供了一种用于对有需要的受试者进行血管造影的方法，所述方法包括向所述受试者施用组合物，所述组合物包括式(I)、(I-a)和/或(I-b)的树状聚合物；和观察和/或量化受试者的眼脉管系统中发出的荧光。

[0014] 在其它方面，本公开提供了包含式(I)、(I-a)和/或(I-b)的树状聚合物的药物组合物和试剂盒。

[0015] 上文已经陈述了当前公开的主题的某些方面，这些方面全部或部分地由当前公开的主题来解决，当结合下面最佳描述的所附实例和附图进行描述时，其它方面将变得显而易见。

附图说明

[0016] 已经以此方式概括地描述了当前公开的主题，现在将参考附图，这些附图不一定按比例绘制，并且其中：

[0017] 图1A、图1B和图1C示出了在施用树状聚合物-Cy[®]5 (D-Cy5) 后的脉络膜新生血管大鼠模型中的大鼠视网膜平铺的共焦图像。图1A示出了视网膜的共焦图像的合并。图1B示出了小胶质细胞的共焦图像的合并。图1C示出了视网膜色素上皮(RPE)的共焦图像的合并。D-Cy5: 红色；小胶质细胞/巨噬细胞: 绿色；凝集素: 蓝色；白圈: 炎症区域；和白色箭头: 共定位。比例尺为500 μ m。

[0018] 图2示出了在注射后的不同时间点(10分钟、60分钟和4小时)对游离FITC和树状聚合物-FITC (D-FITC) 的眼底荧光血管造影片分析。白色箭头指示由D-FITC纳米颗粒鉴别的视网膜渗漏的精确位置。

[0019] 专利或申请文件含有至少一张彩色附图。专利局(the Office)将根据要求以及必要费用的支付来提供具有彩色附图的本专利或专利申请公开的副本。

具体实施方式

[0020] 现在将在下文中参考附图更全面地描述当前公开的主题，在附图中示出了当前公开的主题的一些但并非全部实施例。当前公开的主题可以以许多不同的形式来体现，并且不应该被解释为限于本文阐述的实施例；相反，提供这些实施例是为了使本公开满足适用的法律要求。实际上，本文所阐述的当前公开的主题的许多修改和其它实施例将由受益于先前描述和相关附图中提出的教导的当前公开的主题所属领域的技术人员想到。因此，应当理解，当前公开的主题不限于所公开的具体实施例，并且修改和其它实施例旨在包含在所附权利要求的范围内。

[0021] I. 用于进行血管造影的化合物、组合物和方法

[0022] 血-视网膜屏障 (BRB) 功能障碍/视网膜血管通透性导致黄斑水肿是AMD和DR中视力丧失的主要原因。BRB功能障碍的中枢机制是视网膜血管内皮细胞通透性的改变。如在动物模型和患者中所示,促炎变化在本机制和DR的发病机理中起主要作用。眼部炎症的全身性靶向可以为应对这一挑战提供机会。

[0023] 树状聚合物(例如,球状纳米结构的聚合物)正在成为靶向药物和基因递送的有希望的候选者。小尺寸、高密度的可调节表面官能团可以在眼部应用中提供显著的优势。本文公开的PAMAM树状聚合物是无毒的,并且可以取决于尺寸通过肾脏或肝脏完整清除。所公开的没有靶向配体的树状聚合物可以选择性地定位在与视网膜和大脑中的神经炎症相关的细胞中。例如,在大鼠CNV模型中,所公开的树状聚合物能够靶向脉络膜和视网膜炎症。所公开的树状聚合物具有临床转化的潜力。因此,将ICG(已被批准用于人类)与树状聚合物一起使用,可以使得所公开的用于成像/诊断的树状聚合物-ICG缀合物更容易被批准。

[0024] 本公开描述了以下新颖方式:(a)对眼部中的异常血管进行成像(血管造影),(b)对细胞特异性炎症和氧化应激的纵向测量进行成像/量化,和(c)提供用于图像引导治疗的方法。当静脉内施用,荧光团标记的树状聚合物可以特异性地渗入眼部的患病部位,从而显著提高血管造影的对比度和灵敏度。与当前的最新技术(例如,游离ICG和荧光素)相比,本特性可以最终实现更好的对新生血管区域的区域鉴别。因此,可以利用树状聚合物定位到涉及新生血管的患病区域中的能力来改善血管造影和图像引导治疗方法。

[0025] A.式(I)的树状聚合物

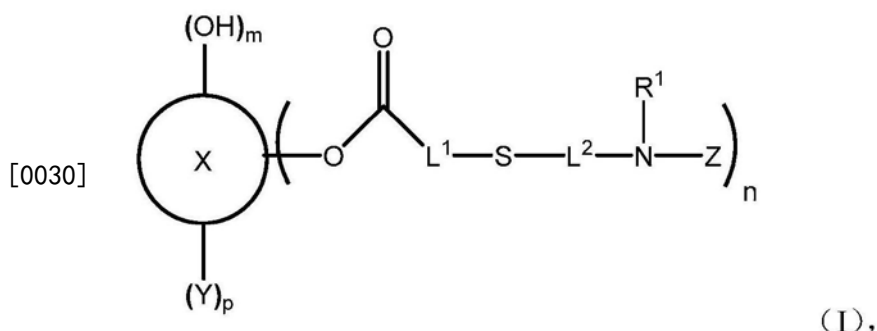
[0026] 术语“树状聚合物”是指重复支化的纳米尺寸的聚合物,其特征是(并且)在一些实施例中是非对称的)轮廓分明的三维形状。树状聚合物通过将支化分子的壳加入到中心核而三维地生长。核很宽广,各种化学单元可以附接到中心核芯外部的点上。树状聚合物已被广泛地描述(Tomalia(1994),《先进材料(Advanced Materials)》,6:529-539; Donald A.Tomalia,Adel M.Naylor,William A.Goddard III(1990),《应用化学英语国际版(Angew,Chem.Int.Ed.Engl.)》,29:138-175;通过引用整体并入本文)。树状聚合物可以合成为直径通常为1到20纳米的球形结构。在某些实施例中,本文提供的树状聚合物的直径为约1nm到约20nm,例如约1nm到约8nm或约12nm到约20nm。在某些实施例中,树状聚合物的直径小于或等于20nm,小于或等于19nm,小于或等于18nm,小于或等于17nm,小于或等于16nm,或小于或等于15nm。直径可以通过本领域已知的方法来测量,例如(但不限于)动态光散射和电子显微镜。

[0027] 树状聚合物通过代数(Gn)进行鉴别,并且每个全合成反应都会产生新的树状聚合物代。分子量和末端(例如,表面)基团的数量随树状聚合物的代数(例如,层数)而呈指数增加。树状聚合物的进一步描述可以在美国专利9,345,781、W02009/046446和美国专利申请公开第2017/0043027号中找到,其全部通过引用整体并入本文。

[0028] 如本文使用,术语“PAMAM树状聚合物”是指聚(酰胺胺)树状聚合物,其可以含有具有酰胺胺结构单元的不同核。制备它们的方法是本领域技术人员已知的,并且通常涉及在中心引发剂核周围产生树状β-丙氨酸单元的同心壳(各代)的两步迭代反应序列。本PAMAM核-壳架构的直径随加入的壳(各代)而线性增长。同时,表面基团在每一代根据树状支化数学呈指数增长。所公开的树状聚合物的示例性表面基团是-OH基团,例如以下式(I)、(I-a)和(I-b)中所描绘。树状聚合物可以是具有5种不同核类型和10种功能性表面基团的G1-10

代。树状聚合物的范围可以是G2到G10,例如G2到G6或G4到G5,也可以是不同G水平的混合物。在某些实施例中,PAMAM树状聚合物是具有羟基表面基团的G4树状聚合物。在某些实施例中,树状聚合物不包含靶向配体,例如适体、抗体或蛋白质(或其片段)。

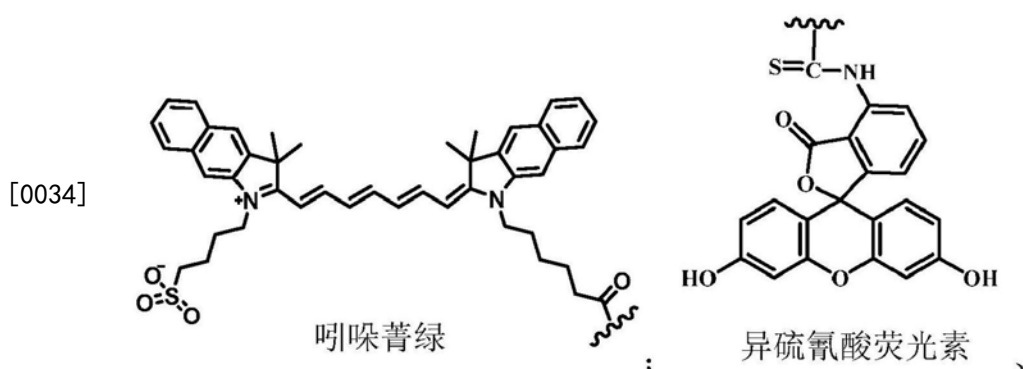
[0029] 在某些实施例中,当前公开的主题提供了式(I)的树状聚合物:

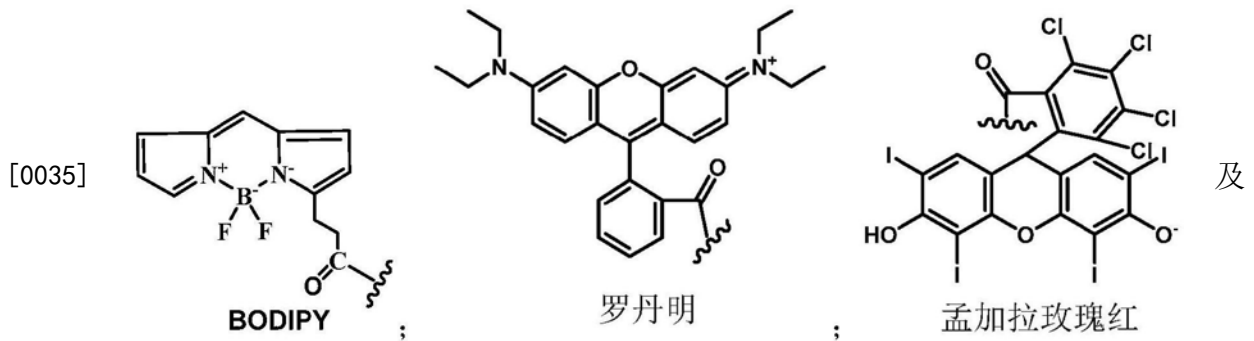


[0031] 其中X是G2到G10的聚(酰胺胺)(PAMAM)树状聚合物; L^1 和 L^2 各自独立地是 C_1 - C_{12} 亚烷基、 C_1 - C_{12} 亚烯基或 C_1 - C_{12} 亚炔基;Z是荧光团;Y是氧化应激探针; R^1 是氢或烷基;n是1到100;p是0到100;并且m是16到4000。

[0032] 本文公开的树状聚合物包含荧光团。荧光团可以通过PAMAM树状聚合物的末端(例如,通过存在于树状聚合物表面上的多个羟基基团)共价连接。这种类型的键在式(I)、(I-a)和(I-b)中被描绘为共价附接到树状聚合物的酯键。在某些实施例中,树状聚合物的约0.1%到约20%(例如,约1%到约20%、约1%到约10%或约0.1%到约5%)的末端基团共价连接到荧光团。

[0033] 羟基封端PAMAM树状聚合物的结合和荧光团的包含使得所公开的树状聚合物可用于血管造影应用,特别是视网膜血管造影。任何合适的荧光团均可以用于本文公开的树状聚合物中,只要它仍提供对于血管造影应用有用的树状聚合物即可。荧光团的实例包含但不限于吲哚菁绿、荧光素(例如,异硫氰酸荧光素)、硼-二吡咯亚甲基、罗丹明和孟加拉玫瑰红。这些染料可以用于各种眼科成像目的,例如荧光血管造影和角膜炎症(特别是干眼症)分级。树状聚合物可以包含一个以上的荧光团,并且可以包含一种以上的荧光团。在某些实施例中,树状聚合物包含选自由以下组成的群组的荧光团(例如,Z):





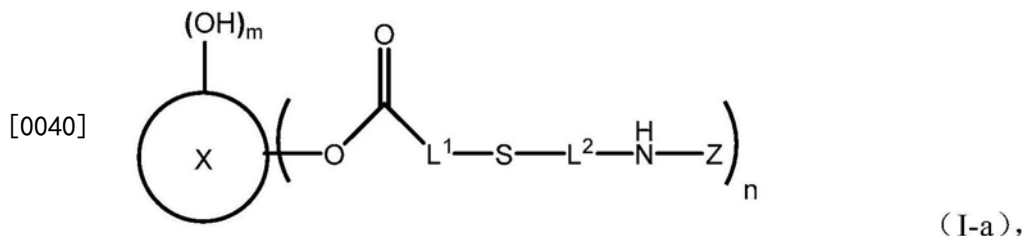
其组合。

[0036] 树状聚合物可以包含氧化应激探针。如本文使用，术语“氧化应激探针”是指由于氧化应激的存在而可以发荧光的荧光剂。例如，氧化应激探针可以是指由于由活性氧物种（例如，过氧化物（例如，过氧化氢）、超氧化物、羟基自由基和/或单线态氧）的存在而引起的氧化应激而可以发荧光的荧光剂。由于氧化应激在炎性细胞中很明显，因此在稍后的时间点对这些区域进行成像可以为临床医生提供有关疾病阶段和/或可能发生潜在在新生血管的确切位置的有用信息。本信息可以帮助临床医生引导激光治疗以进行光凝固或光动力治疗。因此，通过将适当的显像剂（用于评估细胞水平炎症和氧化应激）附接到树状聚合物，可以在疾病进展中对眼脉管系统（例如，视网膜、脉络膜等）进行纵向成像和量化。另外，通过将光敏感或辐射敏感试剂附接到树状聚合物，可以通过外部刺激（例如，辐射、光动力治疗）来操纵具体细胞。已经鉴别出许多氧化应激探针，包含但不限于4-硝基酪氨酸、丙二醛、8-异前列腺素、7-乙基-10-羟基喜树碱、4-羟基-2-壬烯醛等，它们可以在存在H₂O₂的情况下在氧化应激下的细胞中发荧光。这些染料可以共价缀合（例如，通过羟基基团）到树状聚合物表面，作为经由荧光血管造影对炎症和氧化应激进行成像的另外的探针。树状聚合物可以包含一个以上的氧化应激探针，并且可以包含一种以上的氧化应激探针。在某些实施例中，氧化应激探针（例如，Y）选自由以下组成的群组：7-乙基-10-羟基喜树碱、4-羟基-2-壬烯醛、硝基酪氨酸、8-羟基-2'-脱氧鸟苷、丙二醛、8-异前列腺素及其组合。

[0037] 在式(I)的树状聚合物的某些实施例中，X是G₂到G₆的PAMAM树状聚合物；L¹和L²各自独立地是C₁-C₆亚烷基、C₁-C₆亚烯基或C₁-C₆亚炔基；n是1到10的整数；p是1到10的整数；并且m是1到250的整数。

[0038] 在式(I)的树状聚合物的某些实施例中，L¹和L²各自独立地是C₁-C₆亚烷基；n是1到5的整数；并且p是1到5的整数。

[0039] 在某些实施例中，树状聚合物具有式(I-a)：



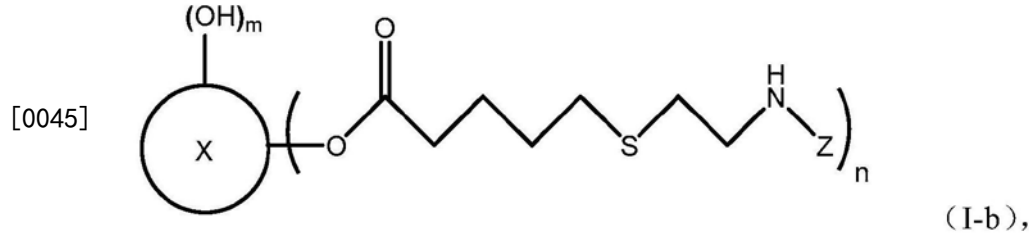
[0041] 其中X是G₂到G₁₀的PAMAM树状聚合物；L¹和L²各自独立地是C₁-C₁₂亚烷基、C₁-C₁₂亚烯基或C₁-C₁₂亚炔基；Z是荧光团；n是1到100的整数；并且m是16到4000的整数。

[0042] 在式(I-a)的树状聚合物的某些实施例中，X是G₂到G₆的PAMAM树状聚合物；L¹和L²

各自独立地是C₁-C₆亚烷基、C₁-C₆亚烯基或C₁-C₆亚炔基；n是1到10的整数；并且m是1到250的整数。

[0043] 在式(I-a)的树状聚合物的某些实施例中，L¹和L²各自独立地是C₁-C₆亚烷基；并且n是1到5的整数。

[0044] 在某些实施例中，树状聚合物具有式(I-b)：

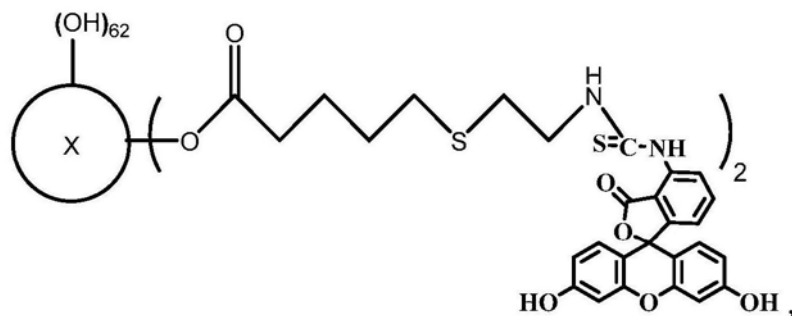
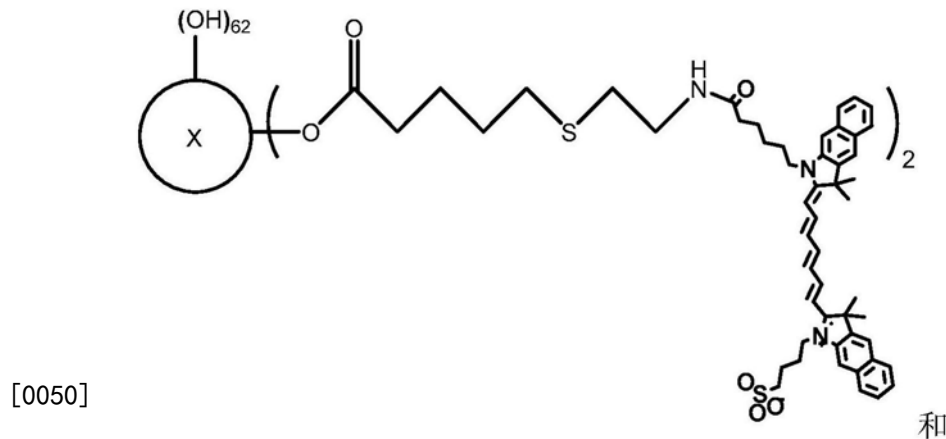


[0046] 其中X是G₂到G₁₀的PAMAM树状聚合物；Z是荧光团；n是1到100的整数；并且m是16到4000的整数。

[0047] 在式(I-b)的树状聚合物的某些实施例中，X是G₂到G₆的PAMAM树状聚合物；n是1到10的整数；并且m是1到250的整数。

[0048] 在式(I)、(I-a)和/或(I-b)的树状聚合物的某些实施例中，X是G₄的PAMAM树状聚合物；n是2；并且m是62

[0049] 在某些实施例中，式(I)、(I-a)和/或(I-b)的树状聚合物选自由以下组成的群组：



[0051] 其中X是G₄的PAMAM树状聚合物。

[0052] B. 进行血管造影的方法

[0053] 在另一方面，公开了进行血管造影(特别是视网膜血管造影)的方法。视网膜血管造影是一种可以用于使用荧光染料并且通常使用专业血管造影照相机来检查眼脉管系统(例如，视网膜和脉络膜(例如，眼底的部分)的循环)的技术。视网膜血管造影涉及将荧光染

料施用到受试者的体循环中,然后分析从观察区域(例如,视网膜)发出的荧光。在某些实施例中,可以通过经由专业血管造影照相机获得血管造影片来进行分析。

[0054] 血管造影在DME中被广泛用于验证和定位渗漏,并且在其它情况下用于评估血管健康和可治疗的病灶。荧光素和ICG在DME和AMD中被用于验证渗漏并提供对渗漏位置的见解,并且在其它情况下用于评估血管健康和可治疗的病灶。在大约10mg/kg染料的典型静脉内剂量下,它们与一些副作用(包含恶心和低血压)相关,并且可以与其它药物相互作用。荧光素和ICG均通过肝脏或肾脏代谢,这对于显像剂而言并不理想。

[0055] 如上所详述,当前的方法依赖于荧光素和ICG染料,它们具有相关的缺点(快速清除,低灵敏度等)。所公开的具有共价连接的荧光团的树状聚合物可以能够通过以下方式克服与上述游离染料相关的问题:1)对患病/受损区域具有选择性,使得可以清楚地勾画出患病区域;2)提供增强的对比度(相对于游离染料);和3)改善灵敏度,这可以量化不同患者之间不同眼病(例如,DR或AMD)的程度差异。由于树状聚合物的优势,它们可以提供对跨大面积(甚至远离渗漏血管)的空间促炎分布有价值的见解以及对炎症程度的见解(纵向),从而用于监测对治疗的反应。还可以跨视网膜的不同区域对它们进行分析和量化,从而提供对不同的局部炎症、水肿、血管损伤和/或微动脉瘤有价值的见解。

[0056] 所公开的对(有需要的)受试者进行血管造影的方法包含向受试者施用组合物,其中所述组合物包括如本文公开的树状聚合物。所述方法进一步包含观察和/或量化在受试者的眼脉管系统中发出的荧光。在某些实施例中,所述方法包含观察和/或量化在受试者的眼视网膜、脉络膜或两者中发出的荧光。

[0057] 在某些实施例中,所述组合物包括共价连接到荧光团的羟基封端聚(酰胺胺)(PAMAM)树状聚合物。在某些实施例中,荧光团包括吡啶菁绿、荧光素或其组合。在某些实施例中,所述组合物包括如上所述的具有式(I)、(I-a)和/或(I-b)的树状聚合物。

[0058] 所述组合物可以包含不同直径的树状聚合物,树状聚合物可以部分地由于其尺寸而定位于不同的脉管系统位置。所述组合物可以包含2、3或4组不同的树状聚合物,每组独立地具有具体的直径尺寸范围。例如,所述组合物可以包含尺寸为约1nm到约8nm(包含1、2、3、4、5、6、7和8nm)的第一组树状聚合物和尺寸为约12nm到约20nm(包含12、13、14、15、16、17、18、19和20nm)的第二组树状聚合物。另外,所述组合物可以包含结合有不同荧光团的树状聚合物。例如,所述组合物可以包含具有某一尺寸并具有第一荧光团的第一组树状聚合物和具有与第一组不同的尺寸并具有也不同于第一荧光团的第二荧光团的第二组树状聚合物。因此,至少可以使用树状聚合物的尺寸和结合的荧光团来在血管造影期间提供眼脉管系统的更详细的信息。

[0059] 除了树状聚合物外,所述组合物还可以包含其它组分。例如,所述组合物可以进一步包含药学上可接受的载剂,例如下文所述的那些。在某些实施例中,所述组合物是如下所述的药物组合物。

[0060] 可以取决于受试者、疾病等在不同的时间施用所述组合物。例如,可以以任何合适的间隔每天施用所述组合物1到4次,持续28天的时间段。还可以在28天的时间段内以对受试者进行准确分析的任何合适的间隔施用所述组合物1到10次(总计)。从组合物的施用开始,所述方法可以在约10秒到约28天的时间段内进行,例如约10秒到约21天,约10秒到约1小时,约1分钟到约30分钟,或约1天到约21天。在某些实施例中,所述方法包含组合物的

单一施用,并且进行至少21天。在进行所述方法的时间范围内,可以以任何合适的次数进行观察和/或量化在受试者的视网膜中发出的荧光的步骤。例如,在进行所述方法至少21天的实施例中,观察和/或量化在受试者的视网膜中发出的荧光的步骤可以每天进行一次,每天进行两次,每2天进行一次,每3天进行一次等。

[0061] 所述组合物可以取决于受试者、疾病等以不同剂量施用。所述组合物可以约0.1mg/kg到约20mg/kg(例如,约1mg/kg到约15mg/kg、或约5mg/kg到约10mg/kg)的剂量施用。在某些实施例中,所述组合物以小于或等于20mg/kg、小于或等于18mg/kg、小于或等于16mg/kg、小于或等于14mg/kg、小于或等于12mg/kg、小于或等于10mg/kg、小于或等于8mg/kg、小于或等于6mg/kg、或小于或等于4mg/kg的剂量施用。在某些实施例中,所述组合物可以以大于或等于0.1mg/kg、大于或等于1mg/kg、大于或等于2mg/kg、大于或等于4mg/kg、大于或等于6mg/kg、大于或等于8mg/kg、或大于或等于10mg/kg的剂量施用。

[0062] 视网膜血管造影可以用于分析多种眼病中的眼脉管系统(例如,血屏障完整性)。可以通过观察树状聚合物从受试者血管中的逸出来检测和量化受试者中的血屏障功能障碍。树状聚合物可以检测和诊断血屏障功能障碍的程度。因此,在血屏障外部检测到的标记的类型以及(在某些实施例中的)浓度有助于此诊断。

[0063] 为了量化此功能障碍,可以基于在眼脉管系统中分析的荧光来分配数值。例如,如果基本没有检测到树状聚合物逸出,则血屏障可以被鉴别为具有0级或没有功能障碍的血屏障。如果非常小的树状聚合物或非常少量的树状聚合物从血管中逸出,则血屏障可以被鉴别为具有1级或轻度功能障碍的血屏障。如果稍大的树状聚合物或稍大量的树状聚合物从血管中逸出,则血屏障可以被鉴别为具有2级或中度功能障碍的血屏障。如果再稍大的树状聚合物或再稍大量的树状聚合物从血管中逸出,则血屏障可以被鉴别为具有3级或较严重功能障碍的血屏障。如果更大的树状聚合物或更大量的树状聚合物从血管中逸出,则血屏障可以被鉴别为具有4级或极严重功能障碍的血屏障,等等。

[0064] 血屏障功能障碍(眼部中)的实例包含但不限于糖尿病性视网膜病变、黄斑变性、巨细胞病毒(CMV)眼感染、视网膜炎、脉络膜缺血、急性扇形脉络膜缺血和缺血性视神经病变。例如,在某些实施例中,受试者患有与年龄相关性黄斑变性(AMD)、色素性视网膜炎、视神经炎、感染(例如,CMV感染)、葡萄膜炎、结节病、镰状细胞病、视网膜脱离、颞动脉炎、视网膜缺血、脉络膜缺血、缺血性视神经病变、动脉硬化性视网膜病变、高血压性视网膜病变、视网膜动脉阻塞、视网膜静脉阻塞、低血压、糖尿病性视网膜病变、黄斑水肿、脉络膜新生血管或其组合。在某些实施例中,受试者患有AMD和/或糖尿病性视网膜病变。

[0065] 因此,本文公开的树状聚合物和方法可以用于鉴别视网膜中的患病脉管系统,包含发炎和/或渗漏(例如,水肿)脉管系统。另外,树状聚合物和方法可以能够鉴别上述疾病处于哪个阶段。如上所述,包含氧化应激标志物的树状聚合物可以在纵向时间点观察和/或量化,并且可以为临床医生提供有关疾病阶段和/或潜在新生血管发生的确切位置的更深刻的信息。例如,所述方法可以包含鉴别受试者的眼病处于早期还是晚期。

[0066] 所述方法还可以与本领域已知的用于表征眼脉管系统的其它方法(例如,光学相干断层扫描(OCT))相结合。例如,所述方法可以进一步包含对受试者进行OCT。

[0067] 所述方法提供的疾病状态的鉴别和表征可以允许临床医生随后鉴别需要对其进行治疗的受试者。例如,所述方法可以进一步包括将受试者鉴别为患有疾病,从而将受试者

鉴别为需要对其所述疾病进行治疗的受试者。因此,所述方法可以进一步包括将受试者鉴别为需要对眼病进行治疗的受试者。另外,所述方法可以进一步包括向受试者(被鉴别为需要对眼病进行治疗)施用对于所述受试者有效的量的治疗剂。

[0068] 治疗剂可以是改善以上所鉴别疾病的任何合适的试剂。治疗剂可以减少、抑制、减弱、降低、阻止或稳定宿主生物体中的疾病、病症或病状的发展或进展。例如,治疗剂是可以治疗炎性和/或血管生成性疾病或氧化应激相关性疾病的试剂。可以在本公开的方法中使用的治疗剂的非限制性实例包含非类固醇抗炎药物类别(NSAID)中的药物。在本发明的方法中使用的NSAID的实例包含甲芬那酸、阿司匹林、二氟尼柳、双水杨酯、布洛芬、萘普生、非诺洛芬、酮洛芬、脱乙酰基酮洛芬、氟比洛芬、奥沙普嗪、洛索洛芬、吲哚美辛、舒林酸、依托度酸、酮咯酸、双氯芬酸、萘丁美酮、吡罗昔康、美洛昔康、替诺昔康、屈恶昔康、氯诺昔康、伊索昔康、甲氯芬那酸、氟芬那酸、托芬那酸、塞来昔布、罗非昔布、伐地昔布、帕瑞昔布、罗美昔布、依托昔布、非罗昔布、磺酰苯胺、尼美舒利、尼氟酸和利克飞龙。其它抗炎剂包含类固醇,例如甲基泼尼松、地塞米松、非类固醇抗炎剂(包含COX-2抑制剂、皮质类固醇抗炎剂、金化合物抗炎剂、免疫抑制性抗炎和抗血管生成剂、水杨酸盐抗炎剂、兰尼单抗、米诺环素)、抗VEGF剂(包含阿柏西普和雷帕霉素)。所述治疗剂还可以包含抗体(例如,达克珠单抗、贝伐单抗(avastin®)、兰尼单抗(Lucentis®)、巴利昔单抗、兰尼单抗和哌加他尼钠或肽(例如,SN50))和NF κ B拮抗剂。另外,所述治疗剂可以包含抗氧化剂,例如N-乙酰基半胱氨酸、 ω -3脂肪酸衍生物(例如,消退素和神经保护素-D1(NPD1))。

[0069] 治疗剂的术语“有效量”(例如,在“治疗有效量”中)是指引发期望的生物反应所必需的试剂量。如本领域普通技术人员将理解,试剂的有效量可以取决于诸如期望的生物学终点、待递送的试剂、药物组合物的组成、靶组织或细胞等因素而不同。更特别地,术语“有效量”是指足以产生所需作用(例如,减少或改善疾病、病症或病状(例如,与眼脉管系统相关的疾病、病症或病状)或其一种或多种症状的严重程度、持续时间、进展或发作;防止疾病、病症或病状的发展,使疾病、病症或病状消退;防止与疾病、病症或病状相关的症状的复发、发展、发作或进展,或增强或改善另一种疗法的预防或治疗作用)的量。

[0070] 如本文使用,术语“施用”是指使受试者与包括所公开的树状聚合物的组合物接触。可以取决于受试者和所研究的特定疾病、病症或病状,使用本领域已知的多种方法来施用组合物。可以通过例如静脉内输注;静脉内、腹膜内、肌内、眼内或动脉内注射来执行施用。在某些实施例中,施用组合物包含将组合物静脉内注射到受试者的脉管系统中。

[0071] 组合物的施用可以是全身性施用。如本文使用,短语“全身性施用(systemic administration/administered systemically)”是指化合物、药物或其它物质的施用并非直接进入眼脉管系统,使得它进入患者身体并因此进行新陈代谢和其它类似的过程,例如皮下施用。

[0072] 所公开的方法的受试者在其多个实施例中期望是人类受试者,但应当理解,本文描述的方法对于所有脊椎动物物种都是有效的,所有脊椎动物物种都旨在包含在术语“受试者”中。因此,“受试者”可以包含出于医学目的的人类受试者。合适的动物受试者包含哺乳动物,包含但不限于灵长类动物,例如人、猴、猿、长臂猿、黑猩猩、红毛猩猩、猕猴等;牛科动物,例如家牛、公牛等;绵羊属动物,例如绵羊等;山羊属动物,例如山羊等;猪科动物,例如家猪、野猪等;马科动物,例如马、驴、斑马等;猫科动物,包含野猫和家猫;犬科动物,包含

狗;兔科动物,包含穴兔、野兔等;和啮齿类动物,包含小鼠、大鼠、豚鼠等。动物可以是转基因动物。在一些实施例中,受试者是人类,包含但不限于胎儿、新生儿、婴儿、少年和成人受试者。此外,“受试者”可以包含患有或疑似患有疾病、病症或病状的患者。因此,术语“受试者”和“患者”在本文可互换使用。

[0073] C. 药物组合物

[0074] 在另一方面,公开了与药学上可接受的载剂混合的式(I)、(I-a)和/或(I-b)的树状聚合物的药物组合物。可以以本文公开的进行血管造影的方法将药物组合物施用于受试者(例如,人类受试者)。如本文使用,“药学上可接受的载剂”是指生理学上可接受的稀释剂,包含但不限于水、磷酸盐缓冲盐水或盐水,并且在某些实施例中可以包含佐剂。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在使用的剂量和浓度下对受体无毒,并且可以包含缓冲液,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包含抗坏血酸、BHA和BHT;低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮,氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包含葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖醇,例如甘露糖醇或山梨糖醇;成盐抗衡离子,例如钠;和/或非离子表面活性剂,例如吐温、普郎尼克或PEG。

[0075] 用于体内施用的组合物必须是无菌的,这可以通过在冻干和重构之前或之后通过无菌滤膜过滤来实现。可以将治疗组合物放入具有无菌入口的容器中,例如静脉内溶液袋或具有可由皮下注射针刺穿的塞子的小瓶。

[0076] 所公开的药物组合物可以以本领域已知的方式制造,例如借助常规的混合、溶解、制粒、糖衣丸制作、悬浮、乳化、包封、包埋或冻干工艺。

[0077] 用于全身性施用的药物组合物包含树状聚合物的水溶液。对于注射而言,当前公开的药物组合物可以在水溶液中调配,例如在一些实施例中,在生理相容的缓冲液(例如,汉克氏溶液、林格氏溶液或生理缓冲盐水)中。水性注射混悬液可以含有增加混悬液粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。另外,树状聚合物的混悬液可以包含脂肪油(例如,芝麻油)或合成脂肪酸酯(例如,油酸乙酯或甘油三酯)或脂质体。任选地,混悬液还可以含有合适的稳定剂或增加化合物溶解度的试剂,以允许制备高浓度的溶液。

[0078] 在一些实施例中,药物组合物可以是冻干粉,其任选地包含添加剂,例如在使用之前与缓冲液组合的pH范围为4.5到5.5的1mM-50mM组氨酸、0.1%-2%蔗糖、2%-7%甘露糖醇。

[0079] 可以改变当前公开的药物组合物中的树状聚合物的实际剂量水平,以便获得在对受试者无毒的情况下有效实现特定受试者视网膜的所需表征的树状聚合物的量。选择的剂量水平取决于多种因素,包含所用特定树状聚合物的活性,施用途径,施用时间,所用特定树状聚合物的排泄速率,治疗持续时间,与所用特定树状聚合物结合使用的其它药物、化合物和/或材料,所治疗受试者的年龄、性别、体重、状态、一般健康和既往病史,以及医学领域所熟知的类似因素。

[0080] 具有本领域普通技术的医师或兽医可以容易地确定并开出进行血管造影所需的药物组合物的量。例如,医师或兽医可以将药物组合物中使用的式(I)、(I-a)和/或(I-b)的树状聚合物的剂量以低于达到期望作用所需的水平开始,并逐渐增加剂量直至达到期望作用。因此,施用剂量范围将由医师根据需要进行调整。应当理解,在一种疾病中实现期望的

血管造影分析所需的化合物的量可以与另一种疾病所需的树状聚合物的量不同。

[0081] 通常,以上参考进行血管造影的方法列出的剂量和施用方案也可以应用于药物组合物。

[0082] D. 试剂盒

[0083] 可以将当前公开的树状聚合物和药物组合物组装成用于血管造影方法(特别是视网膜血管造影)的试剂盒。在某些实施例中,当前公开的试剂盒包含药物组合物,所述药物组合物包含式(I)、(I-a)和/或(I-b)的树状聚合物。在特定实施例中,式(I)、(I-a)和/或(I-b)的树状聚合物为单位剂型。在另外的实施例中,式(I)、(I-a)和/或(I-b)的树状聚合物可以与本文所述的药学上可接受的溶剂、载剂、赋形剂等一起存在。

[0084] 在某些实施例中,所公开的试剂盒包括一个或多个容器,包括但不限于小瓶、管、安瓿、瓶等,用于容纳包含树状聚合物的药物组合物或树状聚合物。树状聚合物可以以混悬或粉末形式溶剂化存在。然后,树状聚合物可以在药学上可接受的载剂中重构以提供药物组合物。一个或多个容器也可以承载在合适的载体(例如,盒子、纸箱、管等)内。这些容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或其它适合于容纳药物的材料制成。

[0085] 在某些实施例中,容器可以容纳药物组合物并且可以具有无菌入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可由皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。可替代地或另外地,所述制品可以进一步包含第二(或第三)容器,其包含药学上可接受的缓冲液,例如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。从商业和用户的角度来看,它可以进一步包含其它材料,包含其它缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0086] 所公开的试剂盒还可以包含使用树状聚合物和药物组合物进行血管造影(特别是视网膜血管造影)的相关说明。在某些实施例中,说明包含以下中的一项或多项:树状聚合物的描述;进行视网膜血管造影的剂量方案和施用;注意事项;警告;适应症;禁忌;过量信息;不良反应;动物药理学;临床研究;和参考文献。说明可以直接印刷在容器上(如果有的话),作为贴在容器上的标签,或者作为在容器内或随容器提供的单独的纸片、小册子、卡片或折叠式印刷品。

[0087] E. 定义

[0088] 尽管本文采用了具体的术语,但是它们仅在一般性和描述性意义上使用,而不是出于限制的目的。除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本当前描述的主题所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0089] 本文所使用,术语“包括”、“包含”、“具有(having/has)”、“可以”、“含有”及其变体旨在是开放式的过渡性短语、术语或单词,不排除另外的动作或结构的可能性。除非上下文另外明确指出,否则单数形式“一个/一种”和“所述”包含复数形式。无论是否明确阐述,本公开还考虑了“包括”本文提出的实施例或元件、“由其组成”和“基本由其组成”的其它实施例。

[0090] 如本文使用,术语“烷基”是指含有1到10个碳原子(包含1、2、3、4、5、6、7、8、9和10个碳原子)的直链或支链饱和烃链。术语“低级烷基”或“C₁-C₆烷基”是指含有1到6个碳原子(包含1、2、3、4、5和6个碳原子)的直链或支链烃。术语“C₁-C₃烷基”是指含有1到3个碳原子(包含1、2和3个碳原子)的直链或支链烃。烷基的代表性实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、3-甲基己基、


2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、正庚基、正辛基、正壬基和正癸基。

[0091] 如本文使用,术语“亚烷基”是指衍生自具有1到50个(包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49和50个)碳原子的直链或支链烃的二价基团,例如具有1到5个碳原子(包含1、2、3、4和5个碳原子)。亚烷基的代表性实例包含但不限于 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 。

[0092] 如本文使用,术语“亚烯基”是指衍生自具有2到50个碳原子(包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49和50个碳原子)的直链或支链烃的二价基团,其中至少一个碳-碳键为双键。亚烯基的代表性实例包含但不限于 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ 。

[0093] 如本文使用,术语“亚炔基”是指衍生自具有2到50个碳原子(2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49和50个碳原子)的直链或支链烃的二价基团,其中至少一个碳-碳键为三键。亚炔基的代表性实例包含但不限于 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、 $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$ 。

[0094] 当使用术语“独立地选择”时,所涉及的取代基(例如,R基团,例如基团 R_1 、 R_2 等,或变量,例如“m”和“n”)可以相同或不同。例如, R_1 和 R_2 都可以是取代的烷基,或者 R_1 可以是氢并且 R_2 可以是取代的烷基等。

[0095] 符号()表示分子的某一部分与其余部分的附接点。

[0096] 本公开的化合物的描述受本领域技术人员已知的化学键合原理的限制。因此,在一个基团可以被多个取代基中的一个或多个取代的情况下,选择这些取代基以符合化学键合的原理,并产生并非固有不稳定的和/或本领域普通技术人员已知的可能在环境条件下(例如,水性、中性和几种已知生理条件下)不稳定的化合物。例如,根据本领域技术人员已知的化学键合原理,杂环烷基或杂芳基经由环杂原子附接到分子的其余部分,从而避免了固有不稳定的化合物。

[0097] 为了本说明书和所附权利要求的目的,除非另有说明,否则表达量、尺寸、维度、比例、形状、调配、参数、百分比、数量、特性的所有数字以及说明书和权利要求书中使用的其它数值均应理解为在所有情况下被术语“约”修饰,即使术语“约”可能没有明确地与值、量或范围一起出现。因此,除非有相反的指示,否则以下说明书和所附权利要求中阐述的数值参数不是也不需要是精确值,而是根据需要可以是近似值和/或较大值或较小值,这取决于当前公开的主题所寻求获得的期望性质而反映了公差、转换因数、舍入、测量误差等以及本领域技术人员已知的其它因素。例如,术语“约”在涉及一个值时,可以是指涵盖在相对于指定量的一些实施例中的 $\pm 100\%$ 、一些实施例中的 $\pm 50\%$ 、一些实施例中的 $\pm 20\%$ 、一些实施例中的 $\pm 10\%$ 、一些实施例中的 $\pm 5\%$ 、一些实施例中的 $\pm 1\%$ 、一些实施例中的 $\pm 0.5\%$ 和一些实施例中的 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为此些变化适于进行所公开的方法或采用所公开的组合物。

[0098] 此外,术语“约”当与一个或多个数字或数值范围结合使用时,应理解为是指所有此些数字(包含某一范围内的所有数字)并通过扩展所阐述数值之上和之下的边界来修饰

所述范围。用端点表示的数值范围的叙述包含归入所述范围内的所有数字(例如,整数,包含其分数)(例如,1到5的叙述包含1、2、3、4和5以及其分数(例如1.5、2.25、3.75、4.1等)和所述范围内的任何范围。

[0099] 实例

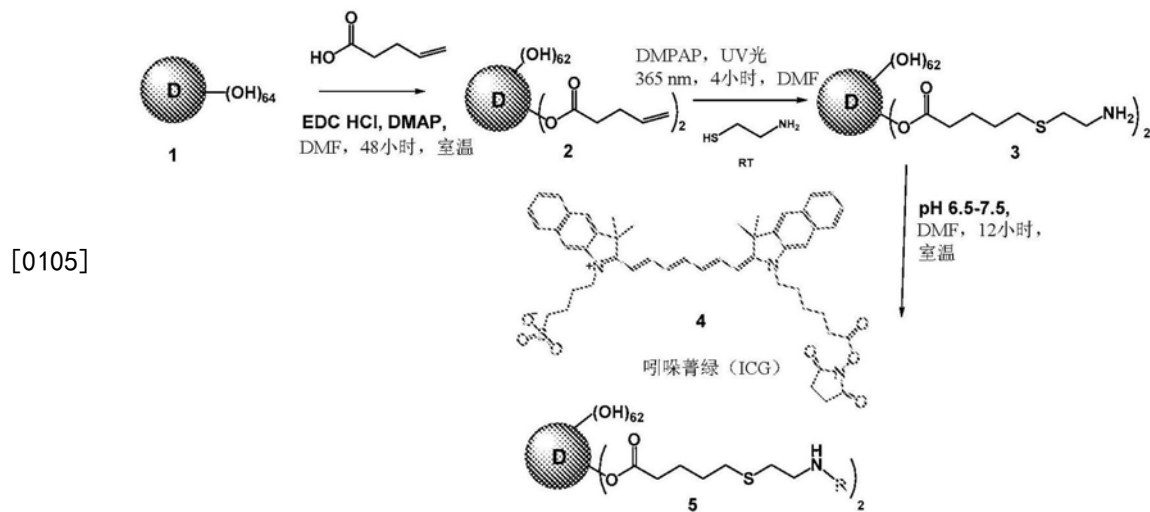
[0100] 已包含以下实例以向本领域普通技术人员提供指导以实践当前公开的主题的代表性实施例。鉴于本公开和本领域技术人员的一般水平,本领域技术人员可以理解,以下实施例仅旨在是示例性的,并且在不脱离当前公开的主题的范围的情况下可以采用多种改变、修改和变更。以下的合成描述和具体实例仅旨在用于说明的目的,并且不应被解释为以任何方式限制通过其它方法制备本公开的化合物。

[0101] 实例1

[0102] 树状聚合物-荧光探针的合成

[0103] D-ICG缀合物是使用硫醇-烯点击化学合成的。缀合物使用2步反应工艺合成(参见方案1)。在第一步中,使用酯化反应合成双官能树状聚合物,从而用2到3个伯胺(例如,-NH₂)基团对树状聚合物表面进行部分改性。在第二步中,使用点击使吲哚菁绿(ICG)与树状聚合物表面反应,从而形成D-ICG缀合物。使用透析纯化缀合物,并使用¹H-NMR对其进行表征,这证实了缀合物的形成。HPLC表征证实了缀合物是纯的。荧光光谱表征证实了D-ICG的荧光与游离ICG的荧光相似。

[0104] 方案1:树状聚合物-荧光探针的合成



[0106] 可以使用方案1合成其它树状聚合物-荧光探针,如上所列出。例如,Cy5标记的树状聚合物和FITC标记的树状聚合物可以通过如上列出的类似方法合成。

[0107] 实例2

[0108] 树状聚合物-荧光探针在脉络膜新生血管(CNV)大鼠模型中的使用

[0109] 在本模型中,进行脂质的视网膜下注射以实验性诱导CNV,并将其与显著的炎症和氧化应激相关。在第3天(脂质注射后),将Cy5标记的树状聚合物(D-Cy5)静脉内施用于大鼠。在施用树状聚合物后7天(例如,第10天)对巨噬细胞活化和D-Cy5定位进行成像。与健康对照眼部相比,在CNV区域,巨噬细胞显著增加。这些研究表明:(1)所公开的树状聚合物选择性地位于CNV区域,活化的小胶质细胞/巨噬细胞(mi/ma)中,并且保留至少21天。(2)在对照健康眼部中,可见mi/ma中的最小摄取。通过相较于游离NAC和PBS治疗对照显著抑制炎性

细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1),应用树状聚合物-N-乙酰基半胱氨酸(D-NAC)缀合物(20mg/kg)的全身性树状聚合物治疗实现了大约78%的CNV降低和大约63%的巨噬细胞聚积降低。

[0110] D-Cy5在视网膜中的定位可见图1。更特别地,图1示出了大鼠视网膜平铺的共焦图像(第0天视网膜下脂质注射,第3天D-Cy5全身施用和第10天成像)。发现D-Cy5(红色)共定位于活化的小胶质细胞(绿色,白色箭头)中并且肥大性RPE共定位于炎症区域(白色圆圈)中。血管用凝集素(蓝色)染色;小胶质细胞/巨噬细胞用离子化钙结合蛋白1分子(Iba-1)(绿色)染色。

[0111] 实例3

[0112] 树状聚合物-荧光探针在视网膜炎症和氧化应激的纵向成像中的使用

[0113] 研究了树状聚合物荧光探针在视网膜炎症和氧化应激的纵向成像中的应用。本实例展现了与脂质注射大鼠CNV模型中的游离FITC(荧光素)相比,树状聚合物-FITC(D-FITC)利用另外的关于渗漏血管的信息产生了更好的分辨率。在第0天经由视网膜下注射在棕色挪威大鼠中注射脂质,并在第21天进行荧光血管造影片成像。将大鼠麻醉并施用荧光素钠或D-FITC(5mg/kg),并在不同时间点(10分钟、1小时和4小时)使用488滤镜在Micron-3眼底显微镜下对大鼠进行成像。D-FITC眼底血管造影片显示出树状聚合物与游离FITC相比生物分布不同。游离FITC灌注射视网膜并在1小时内快速从视网膜中清除。在注射后的早期时间点(10分钟),从炎症区域中的视网膜血管渗漏的游离FITC(图2,白色箭头)形成荧光背景,使得渗漏血管的确切位置不清楚。另一方面,D-FITC血管造影片展现了空间分辨率,其示出了仅来自渗漏血管的灌注。有趣的是,本作用持续4小时或更长时间,而游离FITC注射导致非特异性灌注和清除。

[0114] 使用ICG或荧光素的下一代血管造影,例如所公开的树状聚合物,可以在许多方面改善血管造影,例如:(1)在无需代谢的情况下从循环中完整清除ICG/FA;(2)使它们对受损区域具有选择性,使得可以清楚地勾画出患病区域;(3)提供显著的对比度;(4)改善灵敏度,从而实现不同患者之间DR或AMD的程度差异的量化。本文公开的树状聚合物是树状的生物相容性纳米结构聚合物,其可以特异性地定位于脉络膜和视网膜的受损区域,不受体循环的影响,同时易于通过肾脏从靶器官中清除。在存在病理的情况下,游离FITC/ICG和D-FITC/D-ICG的眼部差异分布可以显著增强DR和AMD所有阶段的血管造影。将FITC/ICG与树状聚合物缀合可以改善基于FA和ICGA的成像方法的分辨率和量化。

[0115] 还研究了基于树状聚合物的荧光探针对视网膜炎症和氧化应激的纵向成像,因为(i)由于基于树状聚合物的血管造影提供了对视网膜新生血管和病理区域的清晰见解及其确切位置,并且(ii)全身性施用的树状聚合物靶向炎症区域中的活化的小胶质细胞并定位于其中。因此,不希望受限于任何一种特定理论,认为所公开的树状聚合物探针可以用于视网膜炎症和氧化应激的纵向成像。

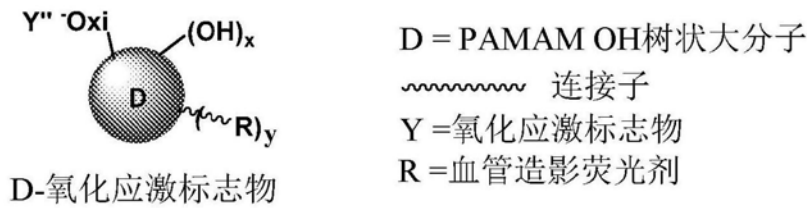
[0116] 对于所公开的树状聚合物,可以使用多价(例如,树状聚合物表面上的多个-OH基团)来缀合可以在氧化应激环境中发荧光的荧光剂。由于氧化应激在炎性细胞中很明显,因此通过在稍后的时间点对这些区域进行成像,可以为临床医生提供有关所研究疾病的阶段、可能发生潜在新生血管的确切坐标的更深刻信息。本信息可以帮助临床医生在光凝固或光动力治疗应用中引导激光。例如,临床医生可以能够在视网膜内以改善的对比度鉴别

新生血管和炎症区域,这可以量化不同级别的新生血管。

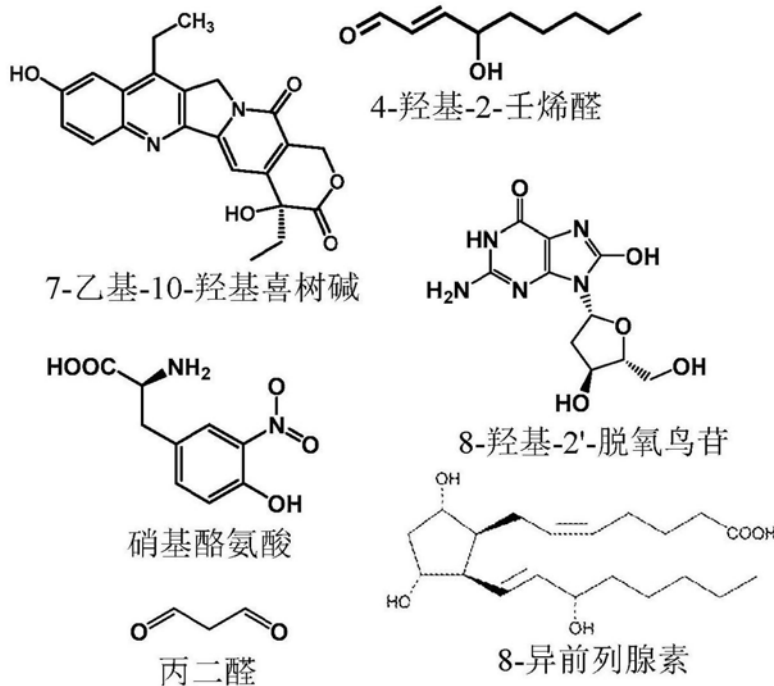
[0117] 已经鉴别出许多探针,例如4-硝基酪氨酸、丙二醛、8-异前列腺素、7-乙基-10-羟基喜树碱、4-羟基-2-壬烯醛等,它们在存在H₂O₂的情况下在氧化应激下的细胞中发荧光。这些染料可以共价缀合到树状聚合物表面,作为经由荧光血管造影对炎症和氧化应激进行成像的另外的探针。方案2(如下所示)展现了用于对氧化应激和炎症进行成像的各种荧光探针。

[0118] 在存在病理的情况下,游离FITC/ICG和D-FITC/D-ICG的眼部差异部分可以显著增强DR和AMD所有阶段的血管造影。将FITC/ICG与树状聚合物缀合可以改善基于FA和ICGA的成像方法的分辨率和量化。

[0119] 方案2:树状聚合物-荧光探针与氧化应激/炎症标志物缀合



[0120]



[0121] 参考文献

[0122] 说明书中提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献指示了当前公开的主题所属领域的技术人员的水平。所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献都以相同的程度通过引用并入本文,就如同每个单独的出版物、专利申请、专利和其它参考文献都被具体地和单独地指出以通过引用并入一样。应该理解,尽管本文提及了许多专利申请、专利和其它参考文献,但是这些参考文献并不意味着承认这些文件中的任何文件构成了本领域公知常识的一部分。在本说明书与任何并入的参考文献之间发生冲突的情况下,以本说明书(包含其任何修正,可能基于并入的参考文献)为准。除非另有说明,否则本文使用的是术语的标准的本领域接受的含义。本文使用了各个术语的标准缩写。

- [0123] Keane PA, Sadda SR, 《对脉络膜视网膜血管疾病进行成像 (Imaging chorio-retinal vascular disease) 》, 《眼部 (Eye) 》, 2010; 24 (3) : 422-7。
- [0124] Owens SL, 《吲哚菁绿血管造影 (Indocyanine green angiography) 》, 《英国眼科学期刊 (The British journal of ophthalmology) 》, 1996; 80 (3) : 263。
- [0125] Klaassen I, Van Noorden CJ, Schlingemann RO, 《内血-视网膜屏障的分子基础及其在糖尿病性黄斑水肿和其它病理状态中的破坏 (Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions) 》, 《视网膜与眼部研究进展 (Progress in retinal and eye research) 》, 2013; 31; 34: 19-48。
- [0126] Zhang X, Wang N, Schachat AP, Bao S, Gillies MC, 《糖皮质激素: 在糖尿病性视网膜病变和糖尿病性黄斑水肿治疗中的结构、信号转导和分子机制 (Glucocorticoids: structure, signaling and molecular mechanisms in the treatment of diabetic retinopathy and diabetic macular edema) 》, 《现代分子医学 (Curr Mol Med) 》, 2014; 14 (3) : 376-84。
- [0127] Tang J, Kem TS, 《糖尿病性视网膜病变中的炎症 (Inflammation in diabetic retinopathy) 》, 《视网膜与眼部研究进展 (Prog Retin Eye Res) 》, 2011; 30 (5) : 343-58。
- [0128] Menjoge AR, Kannan RM, Tomalia DA, 《基于树状聚合物的药物和成像缀合物: 纳米医学应用的设计考虑因素 (Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications) 》, 《当代药物发现 (Drug Discov Today) 》, 2010; 15 (5-6) : 171-185。
- [0129] Mishra MK, Beaty CA, Lesniak WG, Kambhampati SP, Zhang F, Wilson MA, Blue ME, Troncoso JC, Kannan S, Johnston MV, Baumgartner WA, Kannan RM, 《低温停循环大型动物模型中的树状聚合物脑摄取以及脑损伤的靶向治疗 (Dendrimer brain uptake and targeted therapy for brain injury in a large animal model of hypothermic circulatory arrest) 》, 《美国化学学会-纳米材料 (ACS Nano) 》, 2014; 8 (3) : 2134-47。
- [0130] Kannan S, Dai H, Navath RS, Balakrishnan B, Jyoti A, Janisse J, Romero R, Kannan RM, 《兔模型中的神经炎症和脑性瘫痪的基于树状聚合物的产后治疗 (Dendrimer-based postnatal therapy for neuroinflammation and cerebral palsy in a rabbit model) 》, 《科学转化医学 (Sci Transl Med) 》, 2012; 4 (130) : 130ra46。
- [0131] Iezzi R, Guru BR, Glybina IV, Mishra MK, Kennedy A, Kannan RM, 《用于持续减轻视网膜变性中的神经炎症的基于树状聚合物的靶向玻璃体内治疗 (Dendrimer-based targeted intravitreal therapy for sustained attenuation of neuroinflammation in retinal degeneration) 》, 《生物材料 (Biomaterials) 》, 2012; 33 (3) : 979-88。
- [0132] Sim DA, Chu CJ, Selvam S, Powner MB, Liyanage S, Copland DA, Keane PA, Tufail A, Egan CA, Bainbridge JW, Lee RW, 《一种使用吲哚菁绿染料对小鼠视网膜中的浸润白细胞进行体内标记的简单方法 (A simple method for in vivo labelling of infiltrating leukocytes in the mouse retina using indocyanine green dye) 》, 《疾病模型与机制 (Disease Models and Mechanisms) 》, 2015; 8 (11) : 1479-87。
- [0133] Zheng C, Zheng M, Gong P, Jia D, Zhang P, Shi B, Sheng Z, Ma Y, Cai L, 《用于体

外和体内成像的加载吲哚菁绿的可生物降解肿瘤靶向纳米探针 (Indocyanine green-loaded biodegradable tumor targeting nanoprobe for in vitro and in vivo imaging)》,《生物材料 (Biomaterials)》,2012;33 (22) :5603-9。

[0134] Desmettre T、Devoisselle JM、Mordon S,《与血管造影相关的吲哚菁绿 (ICG) 的荧光性质和代谢特征 (Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography)》,《眼科学概况 (Survey of ophthalmology)》,2000;45 (1) :15-27。

[0135] Sevick-Muraca EM、Houston JP、Gurfinkel M,《使用造影剂的荧光增强近红外诊断成像 (Fluorescence-enhanced, near infrared diagnostic imaging with contrast agents)》,《化学生物学现状 (Current opinion in chemical biology)》,2002;6 (5) :642-50。

[0136] Baba T、Bhutto IA、Merges C、Grebe R、Emmert D、McLeod DS、Armstrong D、Lutty GA,《使用视网膜下脂质过氧化氢注射的脉络膜新生血管大鼠模型 (A rat model for choroidal neovascularization using subretinal lipid hydroperoxide injection)》,《美国病理学杂志 (Am J Pathol)》,2010;176 (6) :3085-3097。

[0137] Kambhampati SP、Clunies-Ross AJ、Bhutto I、Mishra MK、Edwards M、McLeod DS、Kannan RM、Lutty G,《缺血/再灌注小鼠视网膜小胶质细胞对树状聚合物的摄取中的树状聚合物向活化的小胶质细胞/巨噬细胞的全身性和玻璃体内递送 (Systemic and Intravitreal Delivery of Dendrimers to Activated Microglia/Macrophage in Ischemia/Reperfusion Mouse Retinal Microglia Uptake of Dendrimers)》,《眼科与视觉科学研究 (Investigative ophthalmology&visual science)》,2015年7月1日;56 (8) :4413-24。

[0138] 尽管已出于清楚理解的目的通过说明和实例的方式详细地描述了前述主题,但是本领域技术人员将理解,可以在所附权利要求的范围内进行某些改变和修改。

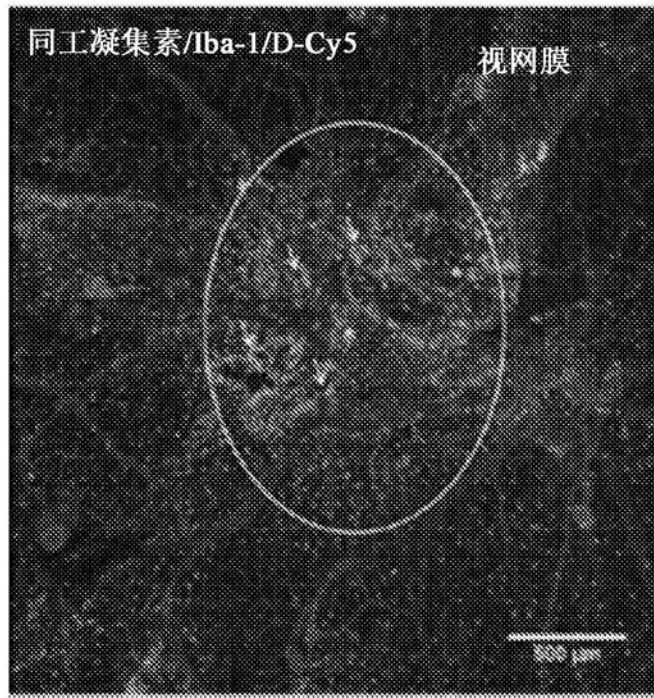


图1A

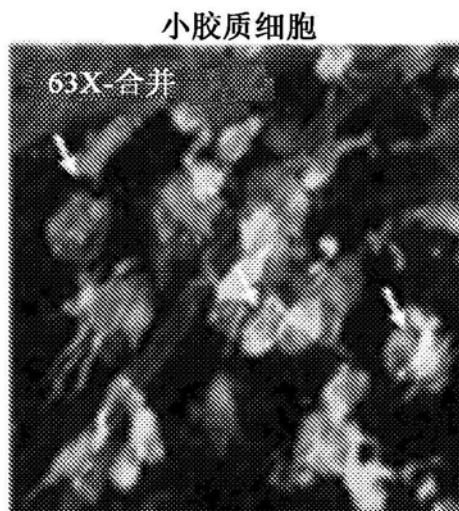


图1B

RPE

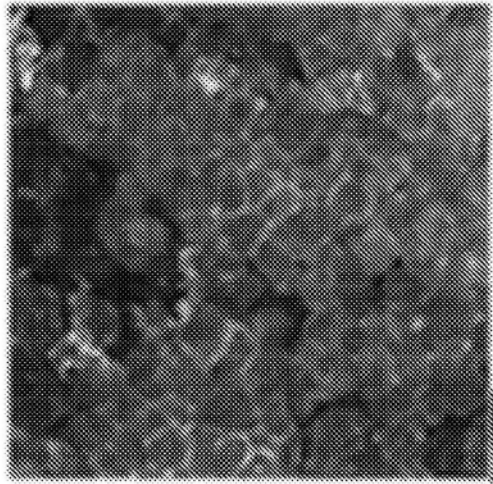


图1C

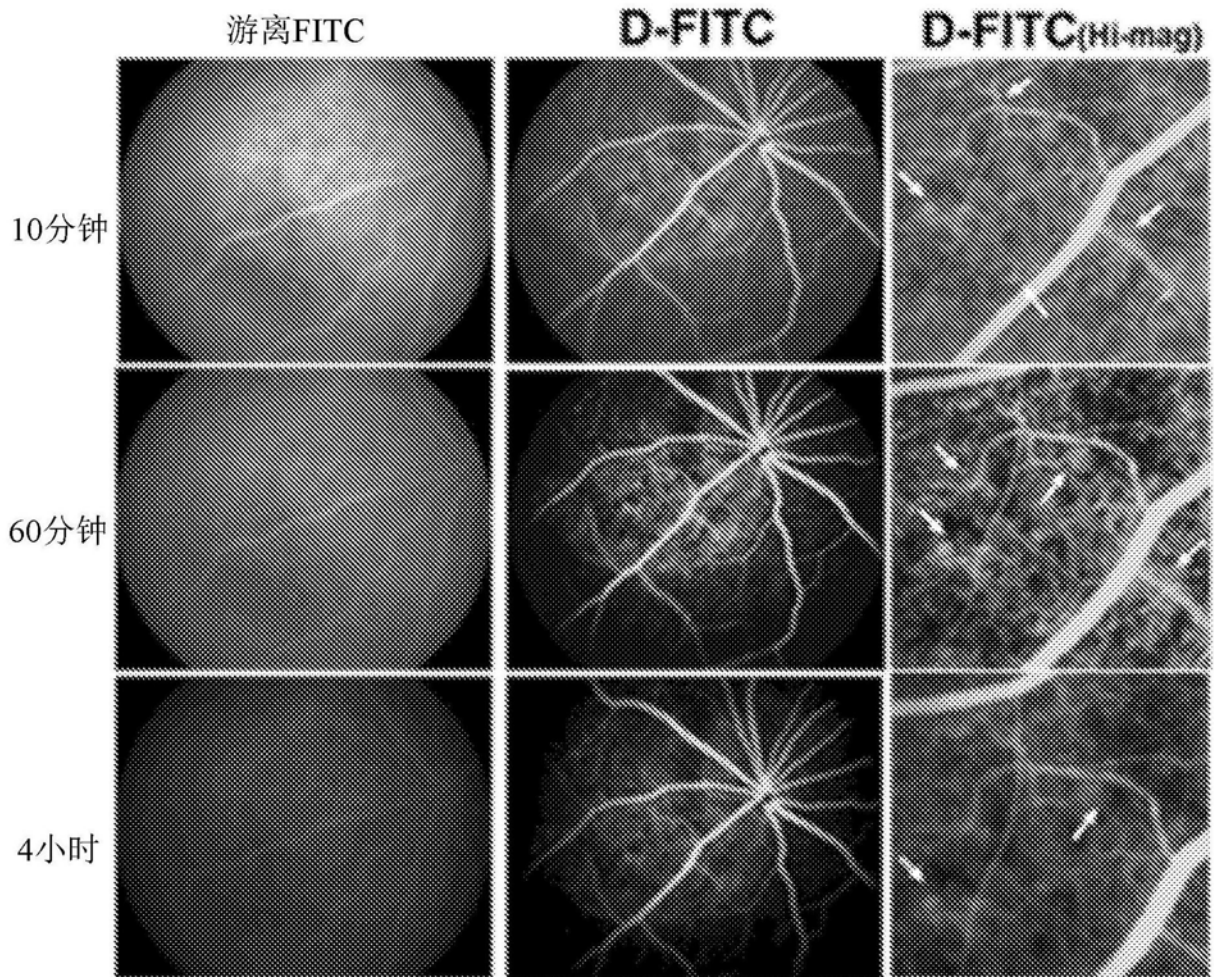


图2