



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111491982 A

(43)申请公布日 2020.08.04

(21)申请号 201880080277.6

(22)申请日 2018.11.14

(30)优先权数据

62/586,404 2017.11.15 US

62/737,603 2018.09.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.06.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/061061 2018.11.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/099525 EN 2019.05.23

(71)申请人 北卡罗来纳大学查佩尔希尔分校

地址 美国北卡罗来纳州

(72)发明人 M·H·舍恩菲施 杨磊 H·金

(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

代理人 康健 王思琪

(51)Int.Cl.

C08G 83/00(2006.01)

A61K 31/74(2006.01)

A61K 31/785(2006.01)

C08G 73/02(2006.01)

C12N 15/00(2006.01)

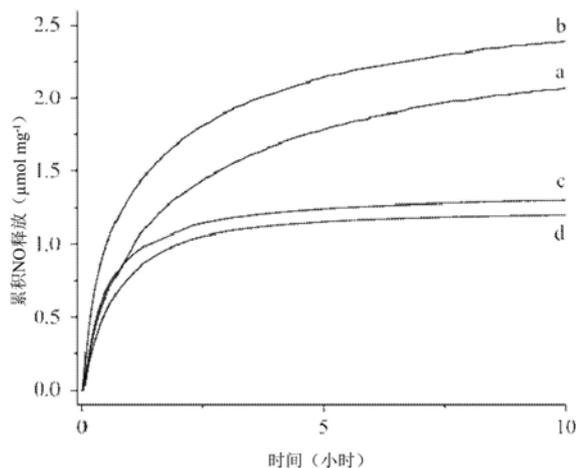
权利要求书12页 说明书59页 附图24页

(54)发明名称

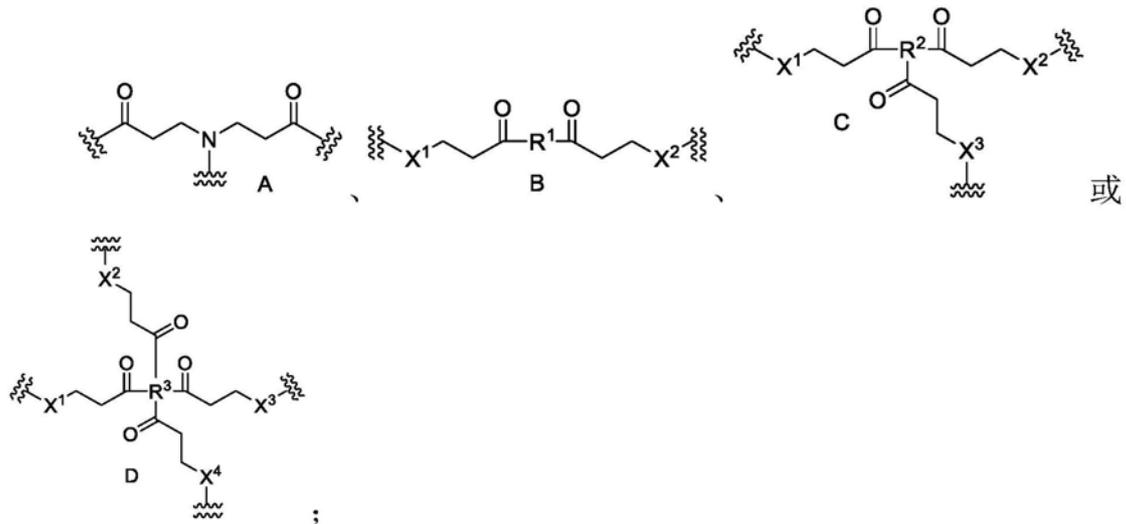
作为抗菌支架的一氧化氮释放型超支化化合物及其相关方法

(57)摘要

公开了超支化结构的若干实施例。在一些实施例中,对所述超支化结构进行共价修饰以储存和释放一氧化氮。一些实施例涉及制备超支化结构的方法以及所述超支化结构的用途。经过共价修饰的超支化结构可以被定制成以受控方式释放一氧化氮,并且可用于根除革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌以及其它微生物。



1. 一种超支化的供一氧化氮 (NO) 化合物, 其包括:
连接基团, 所述连接基团包括式A、B、C或D中的任何一个或多个:



其中,

“”表示与所述超支化供NO化合物的另一部分的附接;

X¹、X²、X³和X⁴独立地选自由-NH-、-N(R_a)-、-O-和-S-组成的组;

其中R_a的每个实例选自供NO部分、-H、任选经取代的C₁-C₆烷基或具有1到6个重复单元的任选经取代的聚醚;

R¹、R²和R³独立地选自由-R_bN(R_c)R_d- (N(R_c))_n-R_b-、-R_b(OR_d)_nO-R_b-和C₁-C₆烷基组成的组;

其中R_c的每个实例独立地选自供NO部分、-H、任选经取代的C₁-C₆烷基或具有1到6个重复单元的任选经取代的聚醚;

其中R_b是单键或任选经取代的C₁-C₆亚烷基;

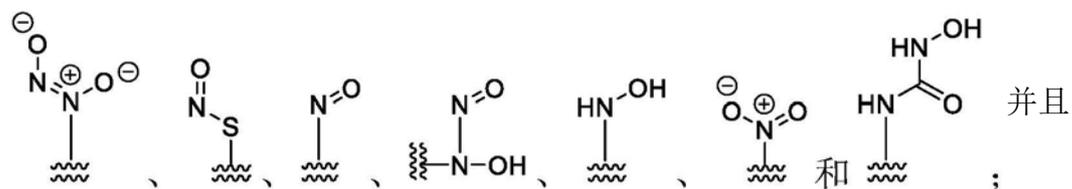
其中R_d是任选经取代的C₁-C₆亚烷基;

其中n是选自0、1、2、3、4、5或6的整数;

其中, 在存在R²的情况下, R_d的至少一个实例包括-C(O)-(CH₂)₂-X³-基团;

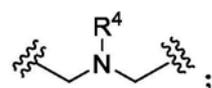
其中, 在存在R³的情况下, R_d的至少一个实例包括-C(O)-(CH₂)₂-X³-基团, 并且R_d的至少一个实例包括-C(O)-(CH₂)₂-X⁴-基团;

其中所述超支化化合物包括以下供NO部分中的至少一个:



其中所述超支化化合物不包括氨基糖苷或糖苷单元。

2. 根据权利要求1所述的超支化供NO化合物, 其进一步包括以下结构的至少一个实例:



其中R⁴是-N⁺(=N-O⁻)O⁻。

3. 根据权利要求2所述的超支化供NO化合物,其中所述连接基团包括式A。
 4. 根据权利要求1所述的超支化供NO化合物,其中所述连接基团包括式B,其中:

R^1 是 $-R_bN(R_c)R_d-(N(R_c))_n-R_b-$;

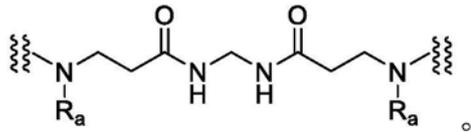
n 是1;

R_d 是 $-CH_2-$;

R_b 是单键;并且

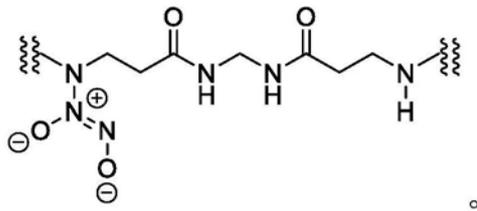
每个 R_c 是H。

5. 根据权利要求4所述的超支化供NO化合物,其中式B的连接基团由以下结构表示:

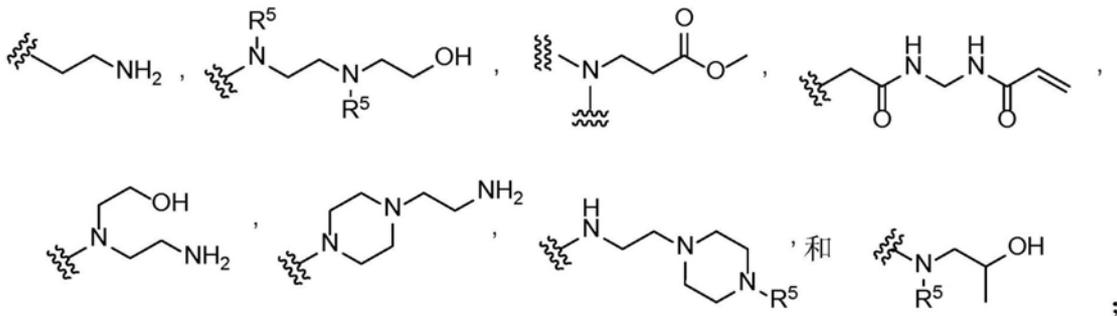


6. 根据权利要求5所述的超支化供NO化合物,其中 R_a 的每个实例为供NO部分或-H。

7. 根据权利要求6所述的超支化供NO化合物,其中式A的连接基团由以下结构表示:

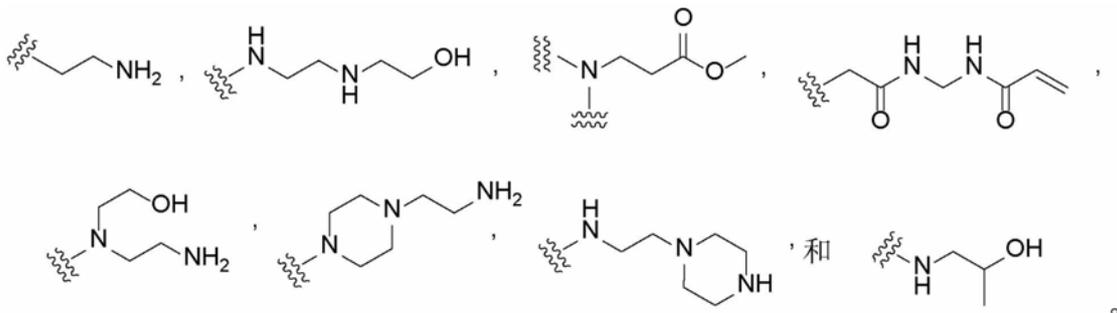


8. 根据权利要求1所述的超支化供NO化合物,其进一步包括选自由以下组成的组的端基:

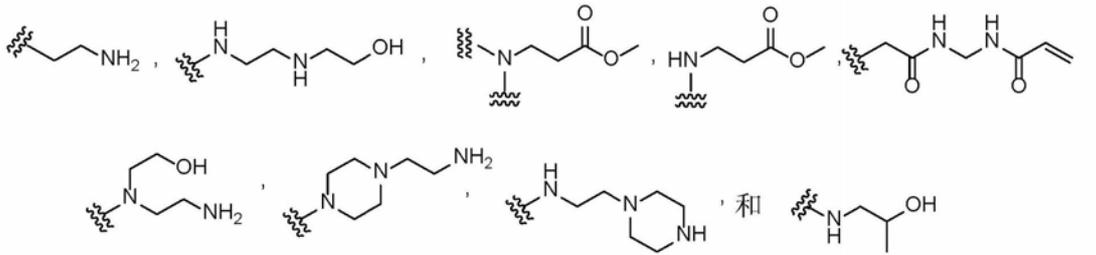


其中 R^5 的每个实例为H或 $-N^+(=N-O^-)O^-$ 。

9. 根据权利要求1所述的超支化供NO化合物,其进一步包括选自由以下组成的组的端基:



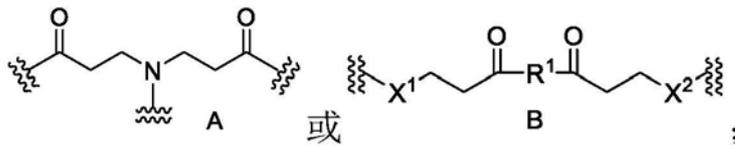
10. 根据权利要求1所述的超支化结构,其进一步包括以下基团中的一个或多个:



11. 根据权利要求1所述的超支化结构,其中所述超支化结构缺乏具有任何对称树突的树枝状核心。

12. 根据权利要求1所述的超支化化合物,其中任选的取代基的每个实例选自C₁-C₆烷基或-OH。

13. 一种超支化的供一氧化氮(NO)化合物,其包括:
式A或式B的连接基团:



其中,

“”表示与所述超支化供NO化合物的另一部分的附接;

X¹和X²独立地选自由-NH-、-N(R_a)-、-O-和-S-组成的组;

其中R_a的每个实例选自供NO部分或-H;

R¹独立地选自由-N(R_c)R_d-N(R_c)-、-R_b(OR_d)_n-R_b-和C₁-C₆烷基组成的组;

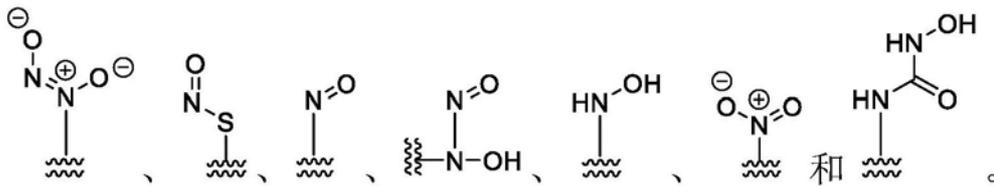
其中R_c的每个实例独立地选自供NO部分或-H、任选经取代的C₁-C₆烷基或具有1到6个重复单元的任选经取代的聚醚;

其中R_b是单键或任选经取代的C₁-C₆亚烷基;

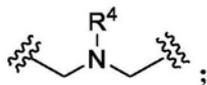
其中R_d是-CH₂-或-CH₂-CH₂-;

其中n是选自0、1、2、3、4、5或6的整数;并且

其中所述超支化化合物包括以下供NO部分中的至少一个:



14. 根据权利要求13所述的超支化供NO化合物,其进一步包括以下结构的至少一个实例:



其中R⁴是-N⁺(=N-O⁻)O⁻。

15. 根据权利要求13所述的超支化供NO化合物,其包括式A。

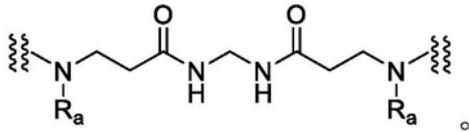
16. 根据权利要求13所述的超支化供NO化合物,其包括式B,其中:

R¹是-N(R_c)R_d-N(R_c)-;

R_d是-CH₂-;并且

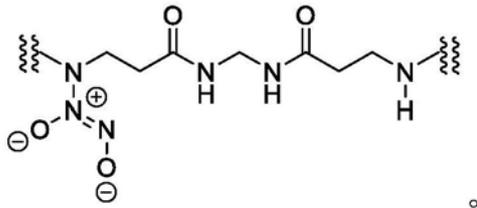
每个R_c是H。

17. 根据权利要求13所述的超支化供NO化合物,其包括由以下结构表示的连接基团:

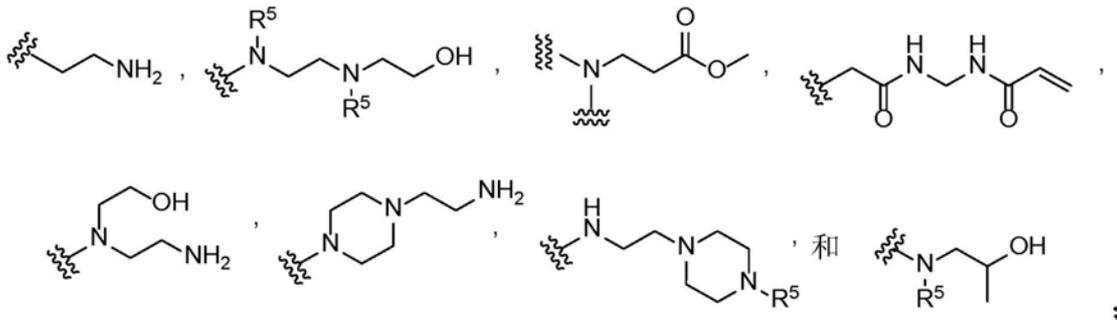


18. 根据权利要求17所述的超支化供NO化合物,其中R_a的每个实例为供NO部分或-H。

19. 根据权利要求18所述的超支化供NO化合物,其中式A的连接基团由以下结构表示:

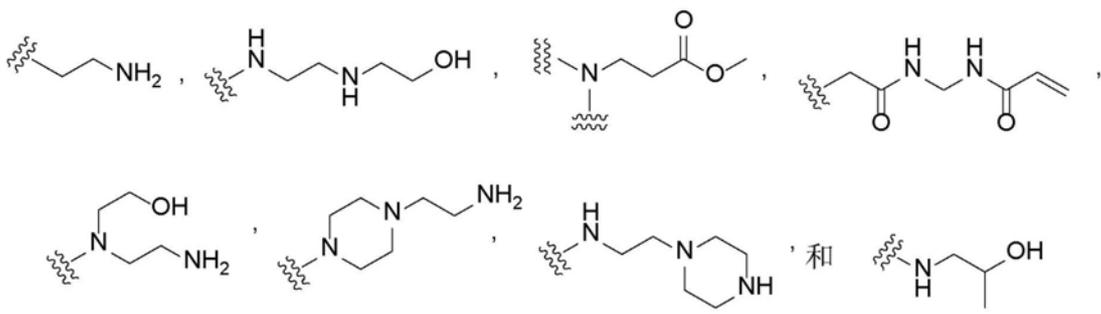


20. 根据权利要求13所述的超支化供NO化合物,其进一步包括选自自由以下组成的组的端基:

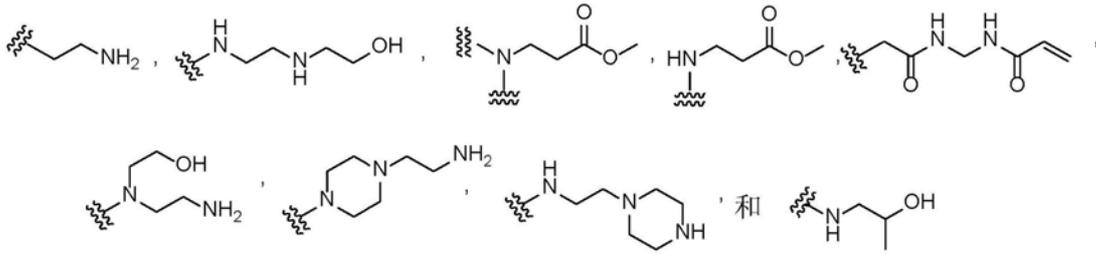


其中R⁵的每个实例为H或-N⁺(=N-O⁻)O⁻。

21. 根据权利要求13所述的超支化供NO化合物,其进一步包括选自自由以下组成的组的端基:



22. 根据权利要求13所述的超支化供NO化合物,其进一步包括以下基团中的一个或多个:



23. 根据权利要求13所述的超支化供NO化合物,其中所述超支化结构缺乏具有任何对称树突的树枝状核心。

24. 根据权利要求13所述的超支化供NO化合物,其中所述超支化化合物不包括氨基糖苷或糖苷单元。

25. 根据权利要求13所述的超支化供NO化合物,其中任选的取代基的每个实例选自C₁-C₆烷基或-OH。

26. 根据权利要求1所述的超支化供NO化合物,其中所述超支化化合物包含树枝状单元、线性单元和末端单元,所述树枝状单元包括叔胺,所述线性单元包括仲胺,并且所述末端单元包括伯胺。

27. 根据权利要求1所述的超支化供NO化合物,其中所述N-二醇二氮烯鎓表现出与所述末端单元的所述伯胺的分子内氢键合。

28. 根据权利要求1所述的超支化供NO化合物,其中所述胺中被所述N-二醇二氮烯鎓部分修饰的所述部分是仲胺。

29. 根据权利要求1所述的超支化供NO化合物,其中所述化合物包括至少约2%重量的NO。

30. 根据权利要求1所述的超支化供NO化合物,其中如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时NO释放所测量的,所述组合物包括每mg化合物至少约1 μ mol的NO。

31. 根据权利要求1所述的超支化供NO化合物,其中如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时NO释放所测量的,所述化合物包括每mg化合物至少约2 μ mol的NO。

32. 根据权利要求1所述的超支化供NO化合物,其中如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时NO释放所测量的,所述组合物包括每mg共聚物大于约2 μ mol的NO。

33. 根据权利要求1所述的超支化供NO化合物,其中所述化合物包含羟基部分。

34. 根据权利要求33所述的超支化供NO化合物,其中所述羟基部分通过烷基部分连接到胺部分,使得所述胺部分为仲胺。

35. 根据权利要求1所述的超支化供NO化合物,其中如使用多角度光散射 (SEC-MALS) 检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的,所述超支化化合物具有介于约 $2 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ 与约 $15 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ 之间的重均分子量 (MW)。

36. 根据权利要求1所述的超支化供NO化合物,其中如使用多角度光散射 (SEC-MALS) 检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的,所述超支化化合物具有介于约 $3 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ 与约 $10 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ 之间的重均分子量 (MW)。

37. 根据权利要求1所述的超支化供NO化合物,其中如使用多角度光散射 (SEC-MALS) 检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的,所述超支化化合物具有介于约 $3 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ 与约 $6 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ 之间的重均分子量 (MW)。

38. 一种用于制备根据权利要求1所述的超支化供NO化合物的方法,所述方法包括:
使丙烯酸酯与亲核试剂接触以形成超支化化合物。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述丙烯酸酯是单丙烯酸酯、二丙烯酸酯、三丙烯酸酯或四丙烯酸酯。

40. 根据权利要求38所述的方法,其中所述亲核试剂是双功能分子、三功能分子或四功能分子。

41. 根据权利要求38所述的方法,其中所述亲核试剂包括 $H-R_hN(R_e)R_f-(N(R_e))_n-(R_gO)-_mR_h-H$;

其中 R_e 的每个实例独立地为 $-H$ 、任选经取代的 C_1-C_6 烷基或具有1到6个重复单元的任选经取代的聚醚;

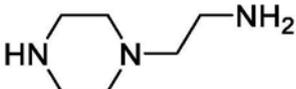
其中 R_h 的每个实例是单键或任选经取代的 C_1-C_6 亚烷基;并且

其中 R_f 和 R_g 独立地为任选经取代的 C_1-C_6 亚烷基。

42. 根据权利要求38所述的方法,其中所述亲核试剂包括 $H_2N-((CH_2)_aNH)_b-H$ 、 $H_2N-((CH_2)_aNH)_b-(CH_2)_cH$ 、 $H_2N-((CH_2)_aX^5)_b-(CH_2)_cH$ 和 $HX^5-((CH_2)_aX^6)_b((CH_2)_cX^7)_d-(CH_2)_eH$ 中的一个或多个;

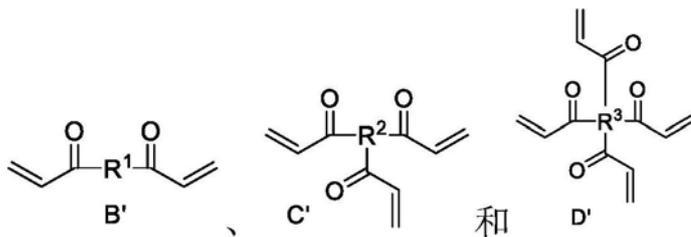
其中 a 、 b 、 c 、 d 或 e 的每个实例独立地选自从0到10的整数;并且

其中 X^5 、 X^6 和 X^7 的每个实例独立地选自 O 、 S 或 NH 。

43. 根据权利要求38所述的方法,其中所述亲核试剂包括 $H_2NCH_2CH_2NHCH_2CH_2NH_2$ 、 $H_2NCH_2CH_2NHCH_2CH_2OH$ 和  中的一个或多个。

44. 根据权利要求38所述的方法,其中所述丙烯酸酯包括以下中的一个或多个: N,N' -亚甲基双(丙烯酰胺)、乙二醇二丙烯酸酯、丙二醇二丙烯酸酯、丁二醇二丙烯酸酯、三羟甲基丙烷三丙烯酸酯、季戊四醇三丙烯酸酯、季戊四醇三丙烯酸酯、甘油丙氧化物(1PO/OH)三丙烯酸酯或三羟甲基丙烷丙氧基化物三丙烯酸酯。

45. 根据权利要求38所述的方法,其中所述丙烯酸酯包括以下结构中的一个或多个:



其中 R^1 、 R^2 和 R^3 独立地选自由 $-R_bN(R_c)R_d-(N(R_c))_n-R_b-$ 、 $-R_b(OR_d)_nO-R_b-$ 和 C_1-C_6 烷基组成的组;

其中 R_c 的每个实例独立地选自供NO部分、 $-H$ 、任选经取代的 C_1-C_6 烷基或具有1到6个重复单元的任选经取代的聚醚;

其中 R_b 是单键或任选经取代的 C_1-C_6 亚烷基;

其中 R_d 是任选经取代的 C_1-C_6 亚烷基;

其中 n 是选自0、1、2、3、4、5或6的整数;

其中,在存在 R^2 的情况下, R_d 的至少一个实例包括 $-C(O)-CH=CH_2$ 基团;

其中,在存在R³的情况下,R_a的碳的至少一个实例包括-C(O)-CH=CH₂基团。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述丙烯酸酯是N,N'-亚甲基双(丙烯酰胺)。

47. 根据权利要求38所述的方法,其进一步包括使所述超支化化合物暴露于NO源,以提供所述超支化供NO化合物。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中在碱性条件下进行所述NO暴露步骤。

49. 根据权利要求38所述的方法,其中亲核体与丙烯酸酯的摩尔比介于约2:1与约5:1之间。

50. 根据权利要求38所述的方法,其中胺与丙烯酸酯的摩尔比介于约3:1与约4:1之间。

51. 一种减少微生物污染的方法,其包括,

使被多种微生物污染的表面与包括以下的化合物接触:

根据权利要求1所述的超支化供NO化合物;

其中所述一氧化氮供体产生一氧化氮并诱发对所述微生物的膜和/或DNA的损伤,从而减少可存活微生物的数量。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述多种微生物包括以下中的一种或多种:病毒、革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、耐药细菌、霉菌、酵母、真菌及其组合。

53. 根据权利要求51所述的方法,其中所述表面是有机表面。

54. 根据权利要求51所述的方法,其中所述表面是人类皮肤或动物皮肤。

55. 根据权利要求51所述的方法,其中所述表面位于口腔中。

56. 根据权利要求51所述的方法,其中所述施加未诱发皮肤刺激。

57. 根据权利要求51所述的方法,其中所述表面是无机表面。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中所述无机表面是医疗装置的外表面或内表面。

59. 根据权利要求58所述的方法,其中所述装置的应用是牙科装置。

60. 根据权利要求51所述的方法,其中所述微生物负荷包括耐药细菌。

61. 根据权利要求51所述的方法,其中所述微生物负荷包括一种或多种牙科病原体。

62. 根据权利要求51所述的方法,其中所述微生物负荷包括以下中的一种或多种:铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)、牙龈卟啉单胞菌(*P.gingivalis*)、放线共生放线杆菌(*A.actinomycetemcomitans*)、粘性放线菌(*A.viscosus*)和/或变形链球菌(*S.mutans*)。

63. 一种治疗和/或预防龋齿的方法,所述方法包括:

使被一种或多种牙科病原体污染的患者口腔表面与根据权利要求1所述的化合物的接触:

其中所述一氧化氮供体产生一氧化氮并诱发对所述病原体的膜和/或DNA的损伤,从而减少可存活病原体的数量。

64. 根据权利要求63所述的方法,其中所述微生物负荷包括以下中的一种或多种:铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、牙龈卟啉单胞菌、放线共生放线杆菌、粘性放线菌和/或变形链球菌。

65. 一种根据权利要求1所述的化合物在制备用于减少微生物污染的药物中的用途,所述化合物包括,

一氧化氮释放型超支化聚氨基糖苷;

其中所述一氧化氮供体产生一氧化氮并诱发对所述微生物的膜和/或DNA的损伤,从而减少可存活微生物的数量。

66. 根据权利要求65所述的用途,其中所述化合物被配制成治疗多种微生物,所述多种微生物包括以下中的一种或多种:病毒、革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、耐药细菌、霉菌、酵母、真菌及其组合。

67. 根据权利要求65所述的用途,其中所述化合物被配制成递送至有机表面。

68. 根据权利要求65所述的用途,其中所述化合物被配制成递送至人类皮肤或动物皮肤。

69. 根据权利要求68所述的用途,其中所述表面位于口腔中。

70. 根据权利要求65所述的用途,其中所述化合物被配制成递送至无机表面。

71. 根据权利要求70所述的用途,其中所述表面是医疗装置的外表面或内表面。

72. 根据权利要求71所述的用途,其中所述装置是牙科装置。

73. 一种聚酰胺胺组合物,其包括:

胺和丙烯酸酯的超支化共聚物,其中所述胺的至少一部分被N-二醇二氮烯鎓部分修饰。

74. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中所述超支化共聚物包含树枝状单元、线性单元和末端单元,所述树枝状单元包括叔胺,所述线性单元包括仲胺,并且所述末端单元包括伯胺。

75. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中所述N-二醇二氮烯鎓表现出与所述末端单元的所述伯胺的分子内氢键合。

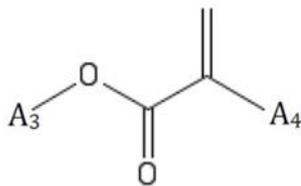
76. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中所述胺中被所述N-二醇二氮烯鎓部分修饰的所述部分是仲胺。

77. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中所述胺衍生自具有以下结构的多官能胺单体:



其中A₁和A₂独立地选自烷基部分或氢。

78. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中所述丙烯酸酯衍生自以下单体:



其中A₃和A₄独立地选自烷基部分或氢。

79. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中所述组合物包括至少约2%重量的NO。

80. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时NO释放所测量的,所述组合物包括每mg化共聚物至少约1μmol的NO。

81. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时NO释放所测量的,所述组合物包括每mg化共聚物至少约2μmol的NO。

82. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的

实时NO释放所测量的,所述组合物包括每mg共聚物大于约2 μmol 的NO。

83. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中所述共聚物进一步包含羟基部分。

84. 根据权利要求83所述的聚酰胺胺组合物,其中所述羟基部分通过烷基部分连接到胺部分,使得所述胺部分为仲胺。

85. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中胺与丙烯酸酯的摩尔比介于约2:1与约5:1之间。

86. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中胺与丙烯酸酯的摩尔比介于约3:1与约4:1之间。

87. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中如使用多角度光散射(SEC-MALS)检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的,所述超支化共聚物具有介于约 $2 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ 与约 $15 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ 之间的重均分子量(MW)。

88. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中如使用多角度光散射(SEC-MALS)检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的,所述超支化共聚物具有介于约 $3 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ 与约 $10 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ 之间的重均分子量(MW)。

89. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中如使用多角度光散射(SEC-MALS)检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的,所述超支化共聚物具有介于约 $3 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ 与约 $6 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ 之间的重均分子量(MW)。

90. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中多官能胺和丙烯酸酯的超支化共聚物以大于约1mg/mL、约10mg/mL、约20mg/mL、约50mg/mL或约100mg/mL的水平溶于水中。

91. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中所述丙烯酸酯衍生自选自以下的单体:丙烯酸及其衍生物的盐、酯和共轭碱。

92. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中所述丙烯酸酯衍生自单体甲基丙烯酸酯。

93. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中所述丙烯酸酯衍生自选自自由以下组成的组的单体:丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸甲酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酸乙酯、2-氯乙基乙烯基醚、丙烯酸2-乙基己酯、甲基丙烯酸羟乙酯、丙烯酸羟乙酯、丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸丁酯、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺、N-(3-氨丙基)甲基丙烯酰胺盐酸盐、N-(3-BOC-氨丙基)甲基丙烯酰胺、甲基丙烯酸2-氨乙酯盐酸盐、甲基丙烯酸2-(叔丁基氨基)乙酯、n-异丙基丙烯酰胺、丙烯酸2-甲氧基乙酯、n-乙基甲基丙烯酰胺、n-乙基乙酰胺、丙烯酸2-N-吗啉代乙酯、甲基丙烯酰基-L-赖氨酸、丙烯酸2-(甲基氨基)乙酯和甲基丙烯酸2-(甲基氨基)乙酯。

94. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中所述丙烯酸酯衍生自二丙烯酸酯。

95. 根据权利要求94所述的聚酰胺胺组合物,其中所述二丙烯酸酯选自自由以下组成的组:乙二醇二丙烯酸酯、三乙二醇二丙烯酸酯、四乙二醇二丙烯酸酯、聚乙二醇二丙烯酸酯、三环癸二甲醇二丙烯酸酯、N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺、双[2-(甲基丙烯酰氧基)乙基]磷酸酯、二丙烯酰胺和N,N'-亚甲基双丙烯酰胺。

96. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中所述胺衍生自二亚乙基三胺。

97. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物,其中所述胺衍生自选自自由以下组成的组的单体:乙二胺、二亚乙基三胺、三亚乙基四胺、四亚乙基五胺、五亚乙基六胺、聚醚胺(例

如, JEFFAMINE®) 和双(六亚甲基)三胺。

98. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述超支化共聚物在释放NO时显示出与以下特性一致的特性: $^1\text{H NMR}$: (400MHz, CD_3OD , δ): 2.22-2.90 (COCH_2 、 NHCH_2 和 NH_2CH_2), 3.15-3.58 (CONCH_2), 3.60 (CH_3O)。 ^{13}C (600MHz, CD_3OD , δ): 30-60 (CH_2 和 CH_3), 170-175 ($\text{C}=\text{O}$)。 FTIR (cm^{-1}): 3308 (NH_2), 2957 (CH_2), 2848 (CH_2), 1647 ($\text{C}=\text{O}$) 和1556 (NH)。

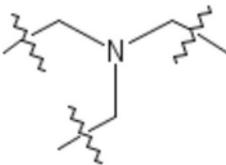
99. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述超支化共聚物具有大于约1.1的多分散指数(PDI)。

100. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述超支化共聚物的多分散指数(PDI)介于1.1与2之间。

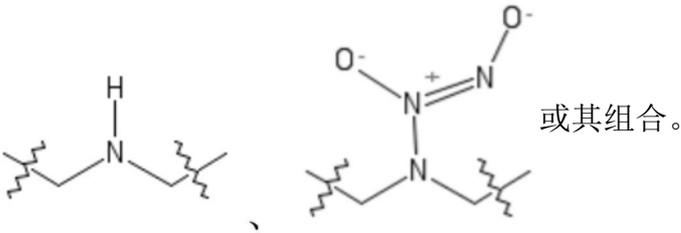
101. 根据权利要求73所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述超支化共聚物的多分散指数(PDI)介于1.5与1.9之间。

102. 一种聚酰胺胺超支化共聚物, 其包括一个或多个包括一个或多个叔胺的树枝状单元、多个包括多个伯胺的末端单元和多个包括多个仲胺的线性单元, 其中所述多个仲胺中的至少一部分与多个N-二醇二氮烯鎓部分结合。

103. 根据权利要求102所述的聚酰胺胺超支化共聚物, 其中所述树枝状单元中的至少一部分包含以下结构:



并且所述多个线性单元中的至少一部分包含选自以下结构的基团:



104. 根据权利要求102所述的聚酰胺胺超支化共聚物, 其中通过所述N-二醇二氮烯鎓部分的氧与所述多个伯胺中的至少一个伯胺的氢之间的氢键合来稳定所述多个N-二醇二氮烯鎓部分的至少一部分。

105. 一种向受试者递送一氧化氮的方法, 其包括:

向所述受试者施用有效量的根据权利要求73所述的超支化化合物或聚酰胺胺组合物。

106. 一种治疗疾病状态的方法, 其包括:

向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1所述的超支化化合物或聚酰胺胺组合物, 其中所述疾病状态选自由以下组成的组: 牙龈炎、癌症、心血管疾病、微生物感染、由血液暴露于医疗装置而引起的血小板聚集和血小板粘附、由异常细胞增殖造成的病理状况、移植排斥、自身免疫性疾病、炎症、血管疾病、瘢痕组织、伤口收缩、再狭窄、疼痛、发烧、胃肠道疾病、呼吸系统疾病、性功能障碍和性传播疾病。

107. 一种制备聚酰胺胺组合物方法, 其包括:

将多官能胺与丙烯酸酯单体在适当的溶剂中混合, 从而形成反应混合物; 将所述反应

混合物混合足够长的时间,以使很大一部分所述多官能胺与所述丙烯酸酯单体反应,从而形成超支化共聚物;加热所述反应混合物,以完成聚合并除去未反应的单体,从而形成基础聚酰胺胺组合物;以及在碱性条件下将所述基础聚酰胺胺组合物与高压下的气态NO混合足够长的时间,以在所述聚酰胺胺组合物上产生N-二醇二氮烯鎓部分。

108. 根据权利要求107所述的方法,其中足以使所述很大一部分所述多官能胺反应的时间大于约6小时、介于约6小时与约2周之间、介于约6小时与1周之间、介于约12小时与5天之间或介于约1天与约3天之间。

109. 根据权利要求107所述的方法,其中所述加热所述反应混合物以完成聚合并除去未反应的单体包含在低于大气压的压力下加热。

110. 根据权利要求107所述的方法,其中所述加热所述反应混合物以完成聚合并除去未反应的单体包含:加热至约50°C到约70°C的第一温度,持续约30分钟到约2小时的第一时间;加热至约90°C到约110°C的第二温度,持续约30分钟到约4小时的第二时间;加热至约120°C到约150°C的第三温度,持续约30分钟到约4小时的第三时间。

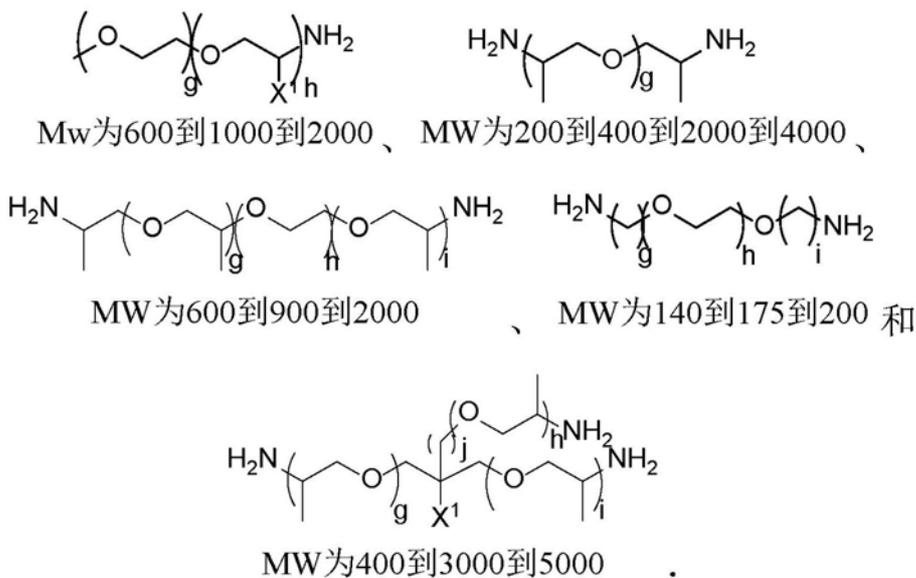
111. 根据权利要求107所述的方法,其中所述加热所述反应混合物以完成聚合并除去未反应的单体包含:加热至约60°C到约60°C的第一温度,持续约1小时的第一时间;加热至约100°C的第二温度,持续约2小时的第二时间;加热至约140°C的第三温度,持续约2小时的第三时间。

112. 根据权利要求107所述的方法,其中所述多官能胺选自由以下组成的组:乙二胺、二亚乙基三胺、三亚乙基四胺、四亚乙基五胺、五亚乙基六胺、聚醚胺和双(六亚甲基)三胺。

113. 根据权利要求112所述的方法,其中所述聚醚胺是 JEFFAMINE®。

114. 根据权利要求113所述的方法,其中所述 JEFFAMINE® 选自由以下组成的组:M-600、M-2005、M-1000、M-2070、D-230、D-400、D-2000、D-4000、ED-600胺、ED-900胺、ED-2003胺、EDR-148胺、EDR-176胺、T-403胺、T-3000胺、T-5000胺、THF-100胺、THF-170胺、XTJ568、XTA801、RFD-270和XTJ-616。

115. 根据权利要求112或113所述的方法,其中所述聚醚胺包括以下结构中的一个:



其中g、h、i和j独立地为从1到100的整数;并且

其中X¹如本文其它地方所定义或为任选经取代的C₁₋₆烷基。

116. 根据权利要求107所述的方法,其中所述丙烯酸酯单体选自由以下组成的组:丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸甲酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酸乙酯、2-氯乙基乙烯基醚、丙烯酸2-乙基己酯、甲基丙烯酸羟乙酯、丙烯酸羟乙酯、丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸丁酯、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺、N-(3-氨丙基)甲基丙烯酰胺盐酸盐、N-(3-BOC-氨丙基)甲基丙烯酰胺、甲基丙烯酸2-氨乙酯盐酸盐、甲基丙烯酸2-(叔丁基氨基)乙酯、n-异丙基丙烯酰胺、丙烯酸2-甲氧基乙酯、n-乙基甲基丙烯酰胺、n-乙基乙酰胺、丙烯酸2-N-吗啉代乙酯、甲基丙烯酰基-L-赖氨酸、丙烯酸2-(甲基氨基)乙酯和甲基丙烯酸2-(甲基氨基)乙酯。

117. 根据权利要求107所述的方法,其中所述适当的溶剂是醇或醇的混合物。

118. 根据权利要求107所述的方法,其进一步包括通过将所述聚酰胺胺组合物与含羟基的化合物混合,用羟基部分修饰所述聚酰胺胺组合物。

119. 根据权利要求118所述的方法,其中所述含羟基的化合物是环氧化物。

120. 根据权利要求118所述的方法,其中所述环氧化物是环氧丙烷。

121. 根据权利要求107所述的方法,其中将所述多官能胺与所述丙烯酸酯单体混合包含介于约2:1与约5:1之间的胺与丙烯酸酯的摩尔比。

122. 根据权利要求107所述的方法,其中将所述多官能胺与所述丙烯酸酯单体混合包含介于约3:1与约4:1之间的胺与丙烯酸酯的摩尔比。

123. 根据权利要求107所述的方法,其中所述方法形成超支化化合物或聚酰胺胺组合物。

作为抗菌支架的一氧化氮释放型超支化化合物及其相关方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年11月15日提交的美国临时专利申请第62/586,404号和于2018年9月27日提交的美国临时专利申请第62/737,603号的权益和优先权,所述美国临时专利申请的全部内容通过引用并入本文。

[0003] 政府支持

[0004] 本发明是根据美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予的授权号DE025207在政府支持下完成的。政府拥有本发明中的某些权利。

技术领域

[0005] 本公开的主题总体上涉及一氧化氮释放型超支化结构,所述超支化结构具有以受控方式储存和/或释放一氧化氮的单元。另外公开了合成所述超支化结构的方法以及所述超支化结构在方法中作为抗菌剂的用途。

背景技术

[0006] 在社区和医院环境中,细菌感染对人类健康提出了巨大挑战。生物膜是由胞外多糖 (EPS) 基质包裹的细菌的协作群落,所述胞外多糖基质保护细菌免受宿主免疫反应和抗生素的影响。

发明内容

[0007] 一氧化氮 (NO) 作为信号传导分子发挥多种生理作用,并且如本文所公开的,在治疗或改善病理生理学方面也可以发挥重要作用,例如作为治疗剂。迄今为止,至少部分地基于治疗组合物的有限的NO有效负荷、比期望的释放速率更快的NO释放速率以及缺乏靶向的NO递送,尚未充分利用NO作为治疗剂。本文提供了超支化的NO释放型构建体、产生此类构建体的方法以及使用此类构建体来治疗各种病理生理学的方法,此类构建体利用增强的NO释放特性并利用NO释放型药理学化合物的巨大潜力。具体地说,本文提供了作为抗微生物剂高度有效的化合物。

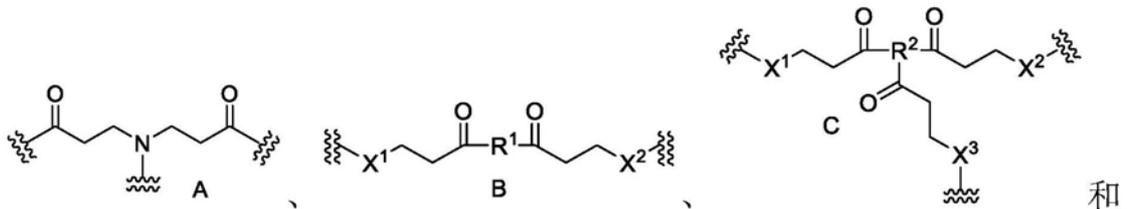
[0008] 例如,在若干实施例中,提供了一个或多个释放NO并显示出有效抗微生物特性的超支化化合物。在若干实施例中,所述超支化化合物是官能化的超支化聚(酰胺基胺) (PAMAM)。在一些实施例中,超支化聚(酰胺基胺)是在单个步骤中提供的结构,在所述步骤中,混合丙烯酸酯和含胺的原料,从而提供包括酰胺键(例如,通过胺原料与丙烯酸酯的酯或羧酸酯的反应)、仲胺键(例如,通过原料胺与丙烯酸酯的迈克尔加成 (Michael Addition) 反应) 和/或叔胺键(例如,通过原料胺与多个丙烯酸酯的迈克尔加成反应)的结构。在若干实施例中,所述超支化化合物是官能化的超支化的羟基封端的聚(酰胺基胺)。

[0009] 在若干实施例中,至少所述超支化化合物中的仲胺包括NO供体。在若干实施例中,至少所述超支化化合物中的仲胺包括N-二醇二氮烯鎓类NO供体。在若干实施例中,所述超支化构建体包括与NO供体共价键合的含胺基团。在一些实施例中,所述超支化构建体的NO

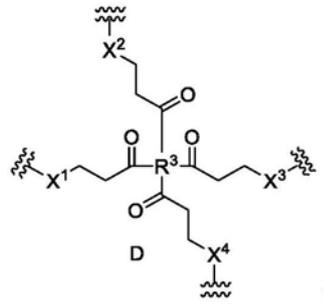
供体产生NO并诱发对微生物的膜和/或DNA的损伤,从而减少可存活微生物的数量。

[0010] 一些实施例涉及一种减少微生物污染的方法。在所述方法的一些实施例中,所述方法包括使被多种微生物污染的表面与包括NO释放型超支化化合物的化合物接触。在所述方法的一些实施例中,所述NO供体产生NO并诱发对微生物的膜和/或DNA的损伤,从而减少可存活微生物的数量。在若干实施例中,所述表面包括有机表面。在所述方法的一些实施例中,所述表面是人类皮肤或动物皮肤。在所述方法的一些实施例中,所述表面位于口腔或周围组织(例如,嘴唇、鼻孔、牙齿、牙龈等)中。在若干实施例中,所述表面包括口腔粘膜。有利地,在所述方法的一些实施例中,施加步骤未诱发皮肤或组织刺激。在一些实施例中,所述多种微生物包括以下中的一种或多种:病毒、革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、耐药细菌、霉菌、酵母、真菌及其组合。

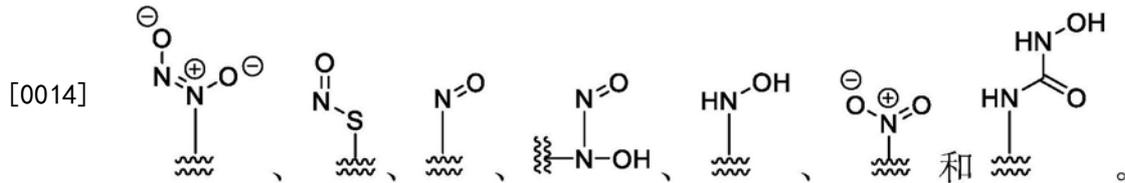
[0011] 在若干实施例中,所述超支化供NO化合物是超支化的PAMAM。在若干实施例中,所述超支化供NO化合物包括一个或多个连接基团。在若干实施例中,所述连接基团包括式A、B、C或D中的任何一个或多个:



[0012]

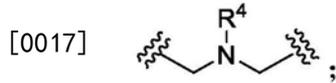


[0013] 在若干实施例中,“”表示与所述超支化供NO化合物的另一部分的附接。在若干实施例中, X^1 、 X^2 、 X^3 和 X^4 独立地选自-NH-、-N(R_a)-、-O-和-S-组成的组。在若干实施例中, R_a 的每个实例选自供NO部分、-H、任选经取代的 C_1 - C_6 烷基或具有1到6个重复单元的任选经取代的聚醚。在若干实施例中, R^1 、 R^2 和 R^3 独立地选自自由- R_b N(R_c) R_d -、-N(R_c) $_n$ - R_b -、- R_b (OR_d) $_n$ - R_b -和 C_1 - C_6 烷基组成的组。在若干实施例中, R_c 的每个实例独立地选自供NO部分、-H、任选经取代的 C_1 - C_6 烷基或具有1到6个重复单元的任选经取代的聚醚。在若干实施例中, R_b 是单键或任选经取代的 C_1 - C_6 亚烷基。在若干实施例中, R_d 是任选经取代的 C_1 - C_6 亚烷基。在若干实施例中, n 是选自0、1、2、3、4、5或6的整数。在若干实施例中,在存在 R^2 的情况下, R_d 的至少一个实例包括- $C(O)-(CH_2)_2-X^3$ -基团。在若干实施例中,在存在 R^3 的情况下, R_d 的至少一个实例包括- $C(O)-(CH_2)_2-X^3$ -基团,并且 R_d 的至少一个实例包括- $C(O)-(CH_2)_2-X^4$ -基团。在若干实施例中,所述超支化化合物包括以下供NO部分中的至少一个:



[0015] 在若干实施例中,所述超支化化合物不包括氨基糖苷或糖苷单元。

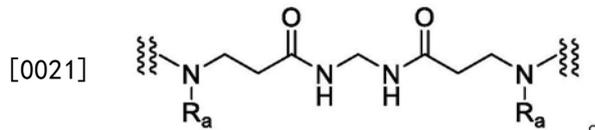
[0016] 在若干实施例中,所述超支化供NO化合物包括以下结构的至少一个实例:



[0018] 其中R⁴是-N⁺(=N-O⁻)O⁻。

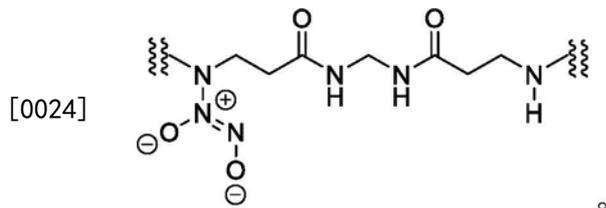
[0019] 在若干实施例中,所述连接基团包括式A。在若干实施例中,所述连接基团包括式B,其中:R¹如本文其它地方所公开和/或为-R_bN(R_c)R_d-(N(R_c))_n-R_b-;n如本文其它地方所公开和/或为1;R_d如本文其它地方所公开和/或为-CH₂-;R_b如本文其它地方所公开和/或为单键;并且每个R_c如本文其它地方所公开和/或为H。

[0020] 在若干实施例中,式B的连接基团由以下结构表示:

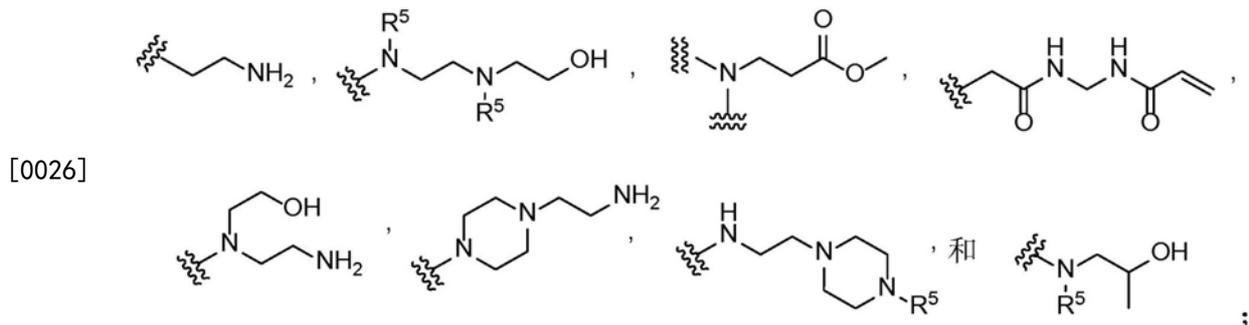


[0022] 在若干实施例中,R_a的每个实例为供NO部分或-H。

[0023] 在若干实施例中,式A的连接基团由以下结构表示:

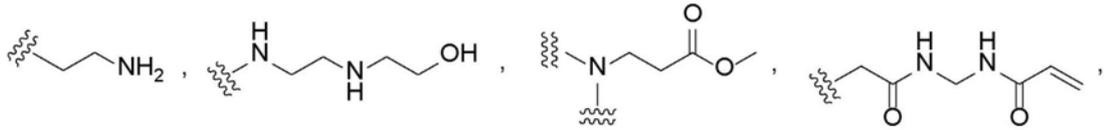


[0025] 在若干实施例中,所述超支化供NO化合物进一步包括选自由以下组成的组的端基:

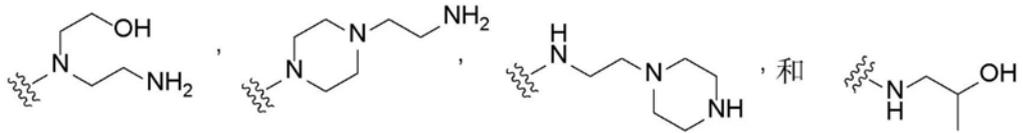


[0027] 其中R⁵的每个实例为H或-N⁺(=N-O⁻)O⁻。

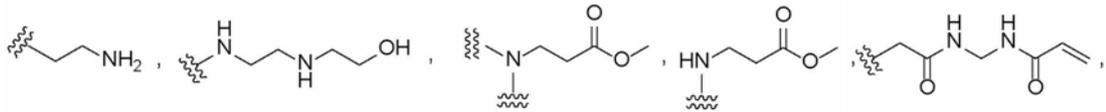
[0028] 在若干实施例中,所述超支化供NO化合物进一步包括选自由以下组成的组的端基:



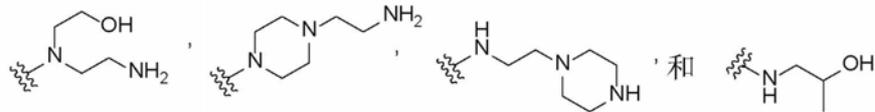
[0029]



[0030] 在若干实施例中,所述超支化供NO化合物进一步包括以下基团中的一个或多个:



[0031]

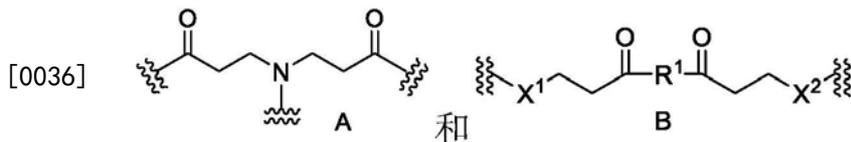


[0032] 在若干实施例中,所述超支化结构缺乏具有任何对称树突的树枝状核心。

[0033] 在若干实施例中,任选的取代基的每个实例选自C₁-C₆烷基或-OH。

[0034] 若干实施例涉及一种超支化的供一氧化氮(NO)化合物,其包括:

[0035] 式A或式B的连接基团:

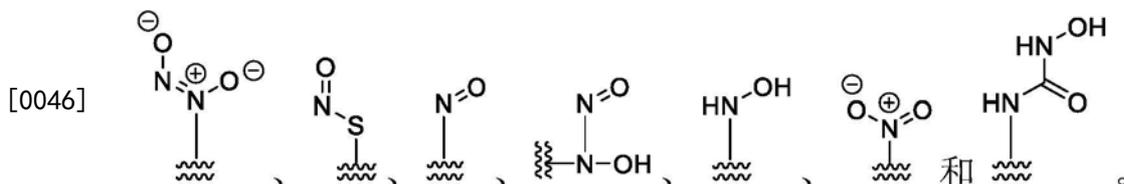


[0037] 在若干实施例中,“”表示与所述超支化供NO化合物的另一部分的附接。

[0038] 在若干实施例中,X¹和X²如本文其它地方所公开和/或独立地选自由-NH-、-N(R_a)-、-O-和-S-组成的组。[0039] 在若干实施例中,R_a的每个实例如本文其它地方所公开和/或选自供NO部分或-H。[0040] 在若干实施例中,R¹如本文其它地方所公开和/或独立地选自由-N(R_c)R_d-N(R_c)-、-R_b(OR_d)_nO-R_b-和C₁-C₆烷基组成的组。[0041] 在若干实施例中,R_c的每个实例如本文其它地方所公开和/或独立地选自供NO部分或-H、任选经取代的C₁-C₆烷基或具有1到6个重复单元的任选经取代的聚醚。[0042] 在若干实施例中,R_b如本文其它地方所公开和/或为单键或任选经取代的C₁-C₆亚烷基。[0043] 在若干实施例中,R_d如本文其它地方所公开和/或为-CH₂-或-CH₂-CH₂-。

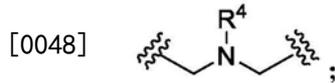
[0044] 在若干实施例中,n如本文其它地方所公开和/或为选自0、1、2、3、4、5或6的整数。

[0045] 在若干实施例中,所述超支化化合物包括以下供NO部分中的至少一个:



[0046]

[0047] 在若干实施例中,所述超支化供NO化合物进一步包括以下结构的至少一个实例:

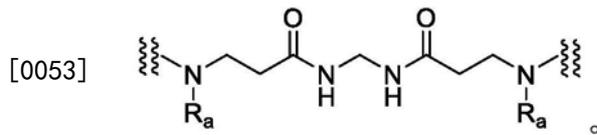


[0049] 在若干实施例中, R^4 是 $-N^+(=N-O^-)O^-$ 。

[0050] 在若干实施例中,所述超支化供NO化合物包括式A。

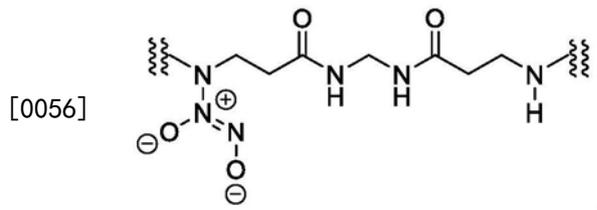
[0051] 在若干实施例中,所述超支化供NO化合物包括式B,其中: R^1 如本文其它地方所公开和/或为 $-N(R_c)R_d-N(R_c)-$; R_d 如本文其它地方所公开和/或为 $-CH_2-$; 并且每个 R_c 如本文其它地方所公开和/或为H。

[0052] 在若干实施例中,所述超支化供NO化合物进一步包括由以下结构表示的连接基团:

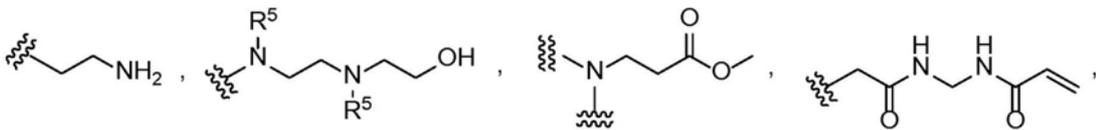


[0054] 在若干实施例中, R_a 的每个实例为供NO部分或-H。

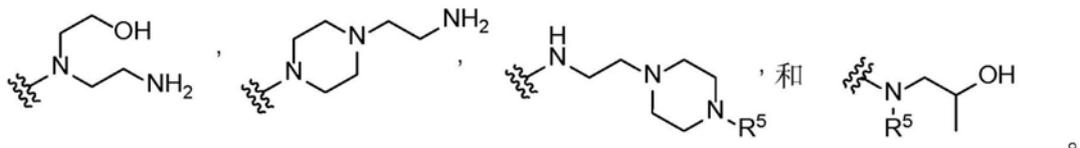
[0055] 在若干实施例中,所述连接基团包括式A并由以下结构表示:



[0057] 在若干实施例中,所述超支化供NO化合物进一步包括选自由以下组成的组的端基:

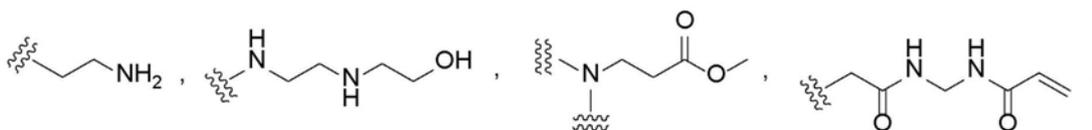


[0058]

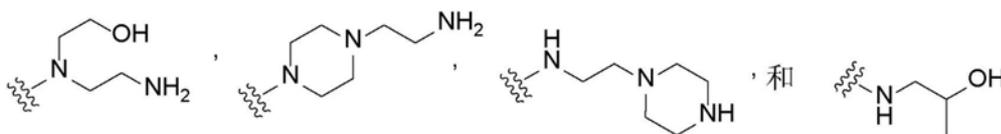


[0059] 在若干实施例中, R^5 的每个实例为H或 $-N^+(=N-O^-)O^-$ 。

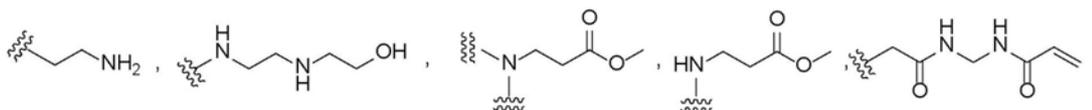
[0060] 在若干实施例中,所述超支化供NO化合物进一步包括选自由以下组成的组的端基:



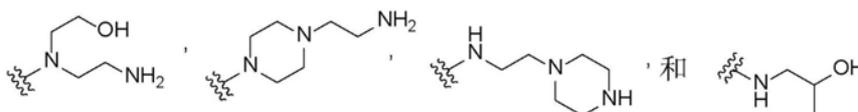
[0061]



[0062] 在若干实施例中,所述超支化供NO化合物进一步包括以下基团中的一个或多个:



[0063]



[0064] 在若干实施例中,所述超支化供NO化合物缺乏具有任何对称树突的树枝状核心。

[0065] 在若干实施例中,所述超支化供NO化合物不包括氨基糖苷或糖苷单元

[0066] 在若干实施例中,任选的取代基的每个实例选自C₁-C₆烷基或-OH,或如本文其它地方所公开。

[0067] 在若干实施例中,所述超支化供NO化合物包含树枝状单元、线性单元和/或末端单元,所述树枝状单元包括叔胺,所述线性单元包括仲胺,并且所述末端单元包括伯胺。

[0068] 在若干实施例中,所述超支化供NO化合物N-二醇二氮烯鎓表现出与所述末端单元的所述伯胺的分子内氢键合。在若干实施例中,所述胺中被N-二醇二氮烯鎓部分修饰的一部分是仲胺。

[0069] 在若干实施例中,所述超支化供NO化合物包括至少约2%重量的NO。在若干实施例中,如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时NO释放所测量的,所述超支化供NO化合物包括每mg化合物至少约1 μ mol的NO。在若干实施例中,如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时NO释放所测量的,所述超支化供NO化合物包括每mg化合物至少约2 μ mol的NO。在若干实施例中,如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时NO释放所测量的,所述超支化供NO化合物包括每mg共聚物大于约2 μ mol的NO。

[0070] 在若干实施例中,所述超支化供NO化合物包括羟基部分。在若干实施例中,所述羟基部分通过烷基部分连接到胺部分,使得所述胺部分为仲胺。

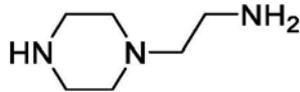
[0071] 在若干实施例中,如使用多角度光散射 (SEC-MALS) 检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的,所述超支化化合物具有介于约2 $\times 10^3$ g mol⁻¹与约15 $\times 10^3$ g mol⁻¹之间的重均分子量(MW)。在若干实施例中,如使用多角度光散射 (SEC-MALS) 检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的,所述超支化化合物具有介于约3 $\times 10^3$ g mol⁻¹与约10 $\times 10^3$ g mol⁻¹之间的重均分子量(MW)。在若干实施例中,如使用多角度光散射 (SEC-MALS) 检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的,所述超支化化合物具有介于约3 $\times 10^3$ g mol⁻¹与约6 $\times 10^3$ g mol⁻¹之间的重均分子量(MW)。

[0072] 若干实施例涉及一种用于制备如本文公开的超支化供NO化合物的方法。在若干实

施例中,使丙烯酸酯与亲核试剂接触以形成超支化化合物。

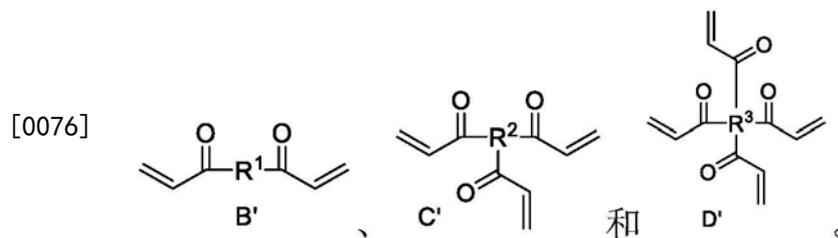
[0073] 在若干实施例中,所述丙烯酸酯是单丙烯酸酯、二丙烯酸酯、三丙烯酸酯或四丙烯酸酯。在若干实施例中,所述亲核试剂是双功能分子、三功能分子或四功能分子。在若干实施例中,所述亲核试剂包括 $H-R_h(N(R_e)R_f-(N(R_e))_n-(R_gO)_mR_h-H$,其中 R_e 的每个实例独立地为 $-H$ 、任选经取代的 C_1-C_6 烷基、具有1到6个重复单元的任选经取代的聚醚和/或如本文其它地方所公开任选地经取代。在若干实施例中, R_h 的每个实例是单键或任选经取代的 C_1-C_6 亚烷基。在若干实施例中, R_f 和 R_g 独立地为任选经取代的 C_1-C_6 亚烷基。在若干实施例中,所述亲核试剂包括 $H_2N-((CH_2)_aNH)_b-H$ 、 $H_2N-((CH_2)_aNH)_b-(CH_2)_cH$ 、 $H_2N-((CH_2)_aX^5)_b-(CH_2)_cH$ 和 $HX^5-((CH_2)_aX^6)_b((CH_2)_cX^7)_d-(CH_2)_eH$ 中的一个或多个。在若干实施例中, a 、 b 、 c 、 d 或 e 的每个实例独立地选自从0到10的整数。在若干实施例中, X^5 、 X^6 和 X^7 的每个实例独立地选自 O 、 S 或 NH 。

[0074] 在若干实施例中,所述亲核试剂包括 $H_2NCH_2CH_2NHCH_2CH_2NH_2$ 、 $H_2NCH_2CH_2NHCH_2CH_2OH$ 和



中的一个或多个。在若干实施例中,所述丙烯酸酯包括以下中的一个或多个: N,N' -亚甲基双(丙烯酰胺)、乙二醇二丙烯酸酯、丙二醇二丙烯酸酯、丁二醇二丙烯酸酯、三羟甲基丙烷三丙烯酸酯、季戊四醇三丙烯酸酯、季戊四醇三丙烯酸酯、甘油丙氧化物(1PO/OH)三丙烯酸酯或三羟甲基丙烷丙氧基化物三丙烯酸酯。

[0075] 在若干实施例中,所述丙烯酸酯包括以下结构中的一个或多个:



[0077] 在若干实施例中, R^1 、 R^2 和 R^3 独立地选自由 $-R_bN(R_c)R_d-(N(R_c))_n-R_b-$ 、 $-R_b(OR_d)_nO-$ 、 R_b- 和 C_1-C_6 烷基组成的组。在若干实施例中, R_c 的每个实例独立地选自供NO部分、 $-H$ 、任选经取代的 C_1-C_6 烷基或具有1到6个重复单元的任选经取代的聚醚。在若干实施例中, R_b 是单键或任选经取代的 C_1-C_6 亚烷基。在若干实施例中, R_d 是任选经取代的 C_1-C_6 亚烷基。在若干实施例中, n 是选自0、1、2、3、4、5或6的整数。在若干实施例中,在存在 R^2 的情况下, R_d 的至少一个实例包括 $-C(O)-CH=CH_2$ 基团。在若干实施例中,在存在 R^3 的情况下, R_d 的碳的至少一个实例包括 $-C(O)-CH=CH_2$ 基团。在若干实施例中,所述丙烯酸酯是 N,N' -亚甲基双(丙烯酰胺)。

[0078] 在若干实施例中,使所述超支化化合物暴露于NO源,以提供所述超支化供NO化合物。在若干实施例中,在碱性条件下进行所述NO暴露步骤。

[0079] 在若干实施例中,使用介于约2:1与约5:1之间的亲核体与丙烯酸酯的摩尔比。在某些实施例中,使用介于约3:1与约4:1之间的胺与丙烯酸酯的摩尔比。

[0080] 若干实施例涉及一种减少微生物污染的方法。在若干实施例中,使被多种微生物污染的表面与如本文所公开的超支化供NO化合物接触。在若干实施例中,所述NO供体产生一氧化氮并诱发对所述微生物的膜和/或DNA的损伤,从而减少可存活微生物的数量。

[0081] 在若干实施例中,所述多种微生物包括以下中的一种或多种:病毒、革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、耐药细菌、霉菌、酵母、真菌及其组合。

[0082] 在若干实施例中,所述表面是有机表面。在若干实施例中,所述表面是人类皮肤或动物皮肤。在若干实施例中,所述表面位于口腔中。在若干实施例中,所述施加未诱发皮肤刺激。

[0083] 在若干实施例中,所述表面是无机表面。在若干实施例中,所述无机表面是医疗装置的外表面或内表面。在若干实施例中,所述装置是牙科装置。

[0084] 在若干实施例中,所述微生物负荷包括耐药细菌。在若干实施例中,所述微生物负荷包括一种或多种牙科病原体。在若干实施例中,所述微生物负荷包括以下中的一种或多种:铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)、牙龈卟啉单胞菌(*P.gingivalis*)、放线共生放线杆菌(*A.actinomycetemcomitans*)、粘性放线菌(*A.viscosus*)和/或变形链球菌(*S.mutans*)。

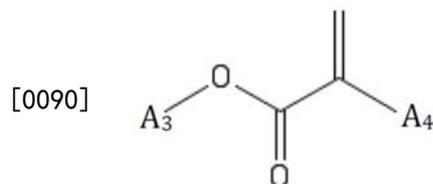
[0085] 若干实施例涉及一种治疗和/或预防龋齿的方法。在若干实施例中,使被一种或多种牙科病原体污染的患者口腔表面与如本文其它地方所公开的超支化供NO化合物接触。在若干实施例中,所述超支化供NO化合物产生一氧化氮并诱发对病原体的膜和/或DNA的损伤,从而减少可存活病原体的数量。在若干实施例中,所述微生物负荷包括以下中的一种或多种:铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、牙龈卟啉单胞菌、放线共生放线杆菌、粘性放线菌和/或变形链球菌。

[0086] 若干实施例涉及一种如本文其它地方所公开的超支化供NO化合物在制备用于减少微生物污染的药物中的用途。在若干实施例中,所述超支化供NO化合物产生一氧化氮并诱发对微生物的膜和/或DNA的损伤,从而减少可存活微生物的数量。在若干实施例中,所述化合物被配制成治疗多种微生物,所述多种微生物包括以下中的一种或多种:病毒、革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、耐药细菌、霉菌、酵母、真菌及其组合。

[0087] 在若干实施例中,所述化合物被配制成递送至有机表面。在若干实施例中,所述化合物被配制成递送至人类皮肤或动物皮肤。在若干实施例中,所述表面位于口腔中。在若干实施例中,所述化合物被配制成递送至无机表面。在若干实施例中,所述表面是医疗装置的外表面或内表面。在若干实施例中,所述装置是牙科装置。

[0088] 一些实施例涉及一种聚酰胺胺PAMAM组合物,其包括胺和丙烯酸酯的超支化共聚物,其中所述胺的至少一部分被N-二醇二氮烯鎓部分修饰。在若干实施例中,所述超支化共聚物包含树枝状单元、线性单元和末端单元,所述树枝状单元包括叔胺,所述线性单元包括仲胺,并且所述末端单元包括伯胺。

[0089] 在若干实施例中,所述N-二醇二氮烯鎓表现出与所述末端单元的所述伯胺的分子内氢键合。在若干实施例中,所述胺中被所述N-二醇二氮烯鎓部分修饰的所述部分是仲胺。



[0091] 在若干实施例中,所述胺衍生自具有以下结构的多官能胺单体: $H_2N-A_1-(NH)-A_2-NH_2$ 。在若干实施例中, A_1 和 A_2 独立地选自烷基部分或氢。在若干实施例中,所述丙烯酸酯衍生自以下单体:

[0092] 其中 A_3 和 A_4 独立地选自烷基部分或氢。

[0093] 在若干实施例中,所述组合物包括至少约2%重量的NO。在若干实施例中,如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时NO释放所测量的,组合物包括每mg共聚物至少约1 μ mol的NO。在若干实施例中,如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时NO释放所测量的,组合物包括每mg共聚物至少约2 μ mol的NO。在若干实施例中,如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时NO释放所测量的,所述组合物包括每mg共聚物大于约2 μ mol的NO。

[0094] 在若干实施例中,所述共聚物进一步包含羟基部分。在若干实施例中,所述羟基部分通过烷基部分连接到胺部分,使得所述胺部分为仲胺。

[0095] 在某些实施例中,胺与丙烯酸酯的摩尔比介于约2:1与约5:1之间。在某些实施例中,胺与丙烯酸酯的摩尔比介于约3:1与约4:1之间。

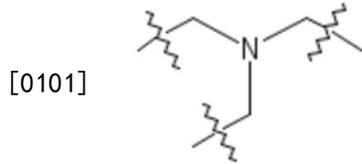
[0096] 在若干实施例中,如使用多角度光散射 (SEC-MALS) 检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的,所述超支化共聚物具有介于约 $2 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 与约 $15 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 之间的重均分子量(MW)。在若干实施例中,如使用多角度光散射 (SEC-MALS) 检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的,所述超支化共聚物具有介于约 $3 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 与约 $10 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 之间的重均分子量(MW)。在若干实施例中,如使用多角度光散射 (SEC-MALS) 检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的,所述超支化共聚物具有介于约 $3 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 与约 $6 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 之间的重均分子量(MW)。

[0097] 在若干实施例中,多官能胺和丙烯酸酯的超支化共聚物以大于约1mg/mL、约10mg/mL、约20mg/mL、约50mg/mL或约100mg/mL的水平溶于水中。在若干实施例中,所述丙烯酸酯衍生自选自以下的单体:丙烯酸及其衍生物的盐、酯和共轭碱。在若干实施例中,所述丙烯酸酯衍生自单体甲基丙烯酸酯。在若干实施例中,所述丙烯酸酯衍生自选自自由以下组成的组的单体:丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸甲酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酸乙酯、2-氯乙基乙烯基醚、丙烯酸2-乙基己酯、甲基丙烯酸羟乙酯、丙烯酸羟乙酯、丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸丁酯、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺、N-(3-氨丙基)甲基丙烯酰胺盐酸盐、N-(3-BOC-氨丙基)甲基丙烯酰胺、甲基丙烯酸2-氨乙酯盐酸盐、甲基丙烯酸2-(叔丁基氨基)乙酯、n-异丙基丙烯酰胺、丙烯酸2-甲氧基乙酯、n-乙基甲基丙烯酰胺、n-乙基乙酰胺、丙烯酸2-N-吗啉代乙酯、甲基丙烯酰基-L-赖氨酸、丙烯酸2-(甲基氨基)乙酯和甲基丙烯酸2-(甲基氨基)乙酯。在若干实施例中,所述丙烯酸酯衍生自二丙烯酸酯。在若干实施例中,二丙烯酸酯选自自由以下组成的组:乙二醇二丙烯酸酯、三乙二醇二丙烯酸酯、四乙二醇二丙烯酸酯、聚乙二醇二丙烯酸酯、三环癸二醇二丙烯酸酯、N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺、双[2-(甲基丙烯酰氧基)乙基]磷酸酯、二丙烯酰胺和N,N'-亚甲基双丙烯酰胺。

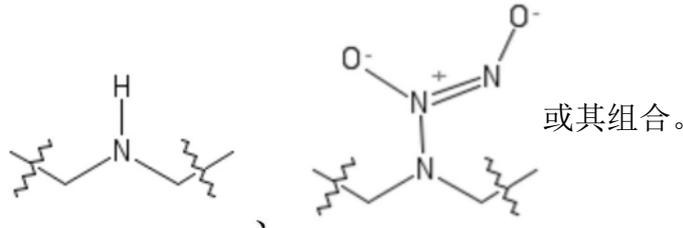
[0098] 在若干实施例中,所述胺衍生自二亚乙基三胺。在若干实施例中,所述胺衍生自选自自由以下组成的组的单体:乙二胺、二亚乙基三胺、三亚乙基四胺、四亚乙基五胺、五亚乙基六胺、聚醚胺和双(六亚甲基)三胺。在若干实施例中,所述超支化共聚物在释放NO时显示出与以下特性一致的特性: $^1\text{H NMR}$: (400MHz, CD_3OD , δ): 2.22-2.90 (COCH_2 、 NHCH_2 和 NH_2CH_2), 3.15-3.58 (CONCH_2), 3.60 (CH_3O)。 ^{13}C (600MHz, CD_3OD , δ): 30-60 (CH_2 和 CH_3), 170-175 ($\text{C}=\text{O}$)。 FTIR (cm^{-1}): 3308 (NH_2), 2957 (CH_2), 2848 (CH_2), 1647 ($\text{C}=\text{O}$) 和1556 (NH)。

[0099] 在若干实施例中,所述超支化的PAMAM共聚物具有大于约1.1的多分散指数(PDI)。在若干实施例中,所述超支化共聚物的多分散指数(PDI)介于1.1与2之间。在若干实施例中,所述超支化共聚物的多分散指数(PDI)介于1.5与1.9之间。

[0100] 若干实施例涉及一种PAMAM超支化共聚物,其包括一个或多个包括一个或多个叔胺的树枝状单元、多个包括多个伯胺的末端单元和多个包括多个仲胺的线性单元,其中所述多个仲胺中的至少一部分与多个N-二醇二氮烯鎓部分结合。在若干实施例中,所述树枝状单元中的至少一部分包含以下结构:



[0102] 并且所述多个线性单元中的至少一部分包含选自以下结构的基团:



[0103] 在若干实施例中,通过所述N-二醇二氮烯鎓部分的氧与所述多个伯胺中的至少一个伯胺的氢之间的氢键合来稳定所述多个N-二醇二氮烯鎓部分的至少一部分。

[0104] 若干实施例一种涉及将一氧化氮递送至受试者的方法。在若干实施例中,将有效量的本文公开的超支化化合物或聚酰胺胺组合物施用于受试者。

[0105] 若干实施例涉及一种治疗疾病状态的方法。在若干实施例中,将有效量的本文公开的超支化化合物或聚酰胺胺组合物施用于有需要的受试者。在若干实施例中,所述疾病状态选自由以下组成的组:牙龈炎、癌症、心血管疾病、微生物感染、由血液暴露于医疗装置而引起的血小板聚集和血小板粘附、由异常细胞增殖造成的病理状况、移植排斥、自身免疫性疾病、炎症、血管疾病、瘢痕组织、伤口收缩、再狭窄、疼痛、发烧、胃肠道疾病、呼吸系统疾病、性功能障碍和性传播疾病。

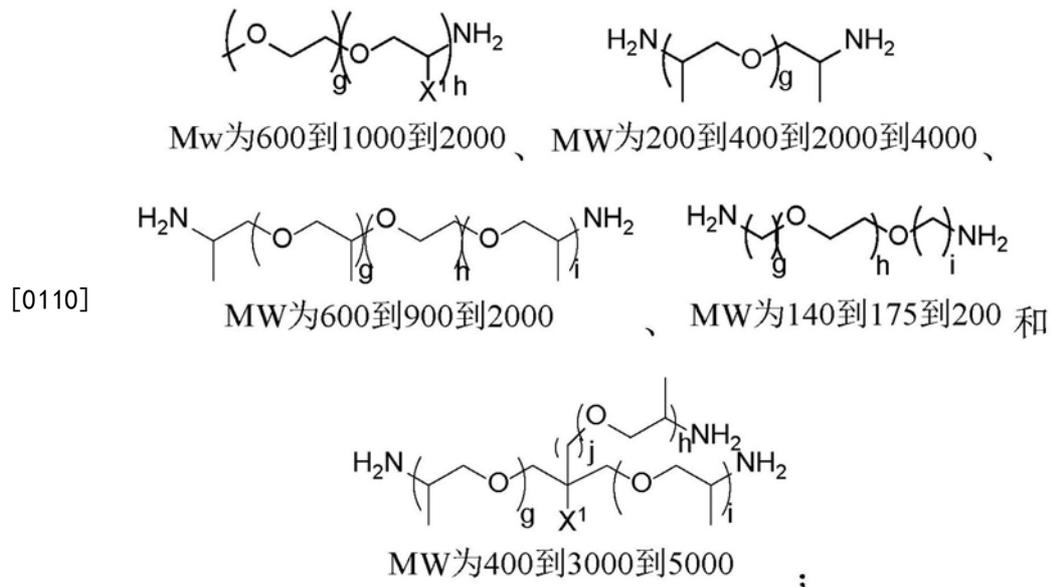
[0106] 若干实施例涉及一种制备聚酰胺胺组合物的方法。在若干实施例中,将多官能胺(例如,具有2个、3个、4个、5个或更多个胺)与丙烯酸酯单体在适当的溶剂中混合,从而形成反应混合物。在一些实施例中,将所述反应混合物混合足够长的时间,以使很大一部分多官能胺与丙烯酸酯单体反应,从而形成超支化共聚物。在若干实施例中,加热所述反应混合物,以完成聚合并除去未反应的单体,从而形成基础聚酰胺胺组合物。在若干实施例中,在碱性条件下将所述超支化结构与高压下的气态NO混合足够长的时间,以在所述聚酰胺胺组合物上产生N-二醇二氮烯鎓部分。所述混合时间大于约6小时、介于约6小时与约2周之间、介于约6小时与1周之间、介于约12小时与5天之间或介于约1天与约3天之间。

[0107] 在若干实施例中,加热所述反应混合物以完成聚合并除去未反应的单体包含在低于大气压的压力下加热。在若干实施例中,加热所述反应混合物以完成聚合并除去未反应的单体包含:加热至约50°C到约70°C的第一温度,持续约30分钟到约2小时的第一时间;加热至约90°C到约110°C的第二温度,持续约30分钟到约4小时的第二时间;加热至约120°C到约150°C的第三温度,持续约30分钟到约4小时的第三时间。在若干实施例中,加热所述反应混合物以完成聚合并除去未反应的单体包含:加热至约60°C到约60°C的第一温度,持续约1小时的第一时间;加热至约100°C的第二温度,持续约2小时的第二时间;加热至约140°C的

第三温度,持续约2小时的第三时间。

[0108] 在若干实施例中,所述多官能胺选自由以下组成的组:乙二胺、二亚乙基三胺、三亚乙基四胺、四亚乙基五胺、五亚乙基六胺、聚醚胺(例如,Jeffamine,聚醚胺是基于PTMEG[聚(四亚甲基醚二醇)]的平均分子量约为1700的胺,基于PTMEG[聚(四亚甲基醚二醇)]/PPG(聚丙二醇)共聚物的分子量约为1000的二胺)和双(六亚甲基)三胺。

[0109] 在若干实施例中,所述聚醚胺是JEFFAMINE®。在若干实施例中,所述JEFFAMINE®选自M-600、M-2005、M-1000、M-2070、D-230、D-400、D-2000、D-4000、ED-600胺、ED-900胺、ED-2003胺、EDR-148胺、EDR-176胺、T-403胺、T-3000胺、T-5000胺、THF-100胺、THF-170胺、XTJ568、XTA801、RFD-270和XTJ-616。在若干实施例中,所述聚醚胺包括以下结构之一:



[0111] 其中g、h、i和j独立地为从1到100的整数;并且

[0112] 其中X¹如本文其它地方所定义或为任选经取代的C₁₋₆烷基。

[0113] 在若干实施例中,所述丙烯酸酯单体选自由以下组成的组:丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、2-氯乙基乙烯基醚、丙烯酸2-乙基己酯、甲基丙烯酸羟乙酯、丙烯酸羟乙酯、丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸丁酯、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺、N-(3-氨丙基)甲基丙烯酰胺盐酸盐、N-(3-BOC-氨丙基)甲基丙烯酰胺、甲基丙烯酸2-氨乙酯盐酸盐、甲基丙烯酸2-(叔丁基氨基)乙酯、n-异丙基丙烯酰胺、丙烯酸2-甲氧基乙酯、n-乙基甲基丙烯酰胺、n-乙基乙烯基乙酰胺、丙烯酸2-N-吗啉代乙酯、甲基丙烯酰基-L-赖氨酸、丙烯酸2-(甲基氨基)乙酯和甲基丙烯酸2-(甲基氨基)乙酯。

[0114] 在若干实施例中,所述溶剂是醇或醇的混合物。在若干实施例中,通过将聚酰胺胺组合物与含羟基的化合物或形成羟基的化合物(例如,环氧化物)混合,用羟基部分修饰所述聚酰胺胺组合物。在若干实施例中,所述含羟基的化合物是环氧化物。在若干实施例中,所述环氧化物是环氧丙烷。在若干实施例中,将所述多官能胺与所述丙烯酸酯单体以介于约2:1与约5:1之间的胺与丙烯酸酯的摩尔比混合。在若干实施例中,将所述多官能胺与所述丙烯酸酯单体以介于约3:1与约4:1之间的胺与丙烯酸酯的摩尔比混合。

[0115] 在若干实施例中,形成如本文其它地方所公开的超支化化合物或聚酰胺胺组合

物。在若干实施例中,所述超支化化合物的NO储存能力大于或等于0.4 $\mu\text{mol NO}/\text{mg}$ 超支化化合物。在若干实施例中,针对铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、牙龈卟啉单胞菌、放线共生放线杆菌、粘性放线菌和/或变形链球菌中的一种或多种,所述超支化化合物提供的细菌生存力的细菌减少大于或等于90% (例如,90%、95%、97%、98%、99%或100%)。在若干实施例中,这种减少是在小于或等于2mg/mL的超支化化合物的浓度下实现的。

附图说明

[0116] 图1是经N-二醇二氮烯鎓NO供体修饰的超支化PAMAM的非限制性实施例的部分的结构性表示。

[0117] 图2a是具有和不具有羟基末端的超支化PAMAM的结构非限制性实施例的示意图。图2(b)-(d)提供了代表性 ^1H NMR光谱:图2b h-PAMAM;

[0118] 图2c h-PAMAM-PO-1;图2d h-PAMAM-PO-2。图2e是h-PAMAM的 ^{13}C NMR,而图2f是h-PAMAM的FTIR。

[0119] 图3a示出了代表性UV-Vis光谱;图3b示出了针对以下的FTIR光谱:h-PAMAM-PO-2/NO和h-PAMAM-PO-2。

[0120] 图4是根据本文公开的若干实施例的在x轴上显示时间并在y轴上显示来自NO释放型化合物的累积NO释放的图。其分别示出了PBS (10mM, pH 7.4, 37 $^{\circ}\text{C}$) 中来自 (a) h-PAMAM/NO; (b) h-PAMAM-PO-1/NO; (c) h-PAMAM-PO-2/NO; (d) G3-PAMAM-PO/NO的NO释放。

[0121] 图5a和图5b示出了与变形链球菌细胞缔合的经RITC修饰的PAMAM支架(100 $\mu\text{g mL}^{-1}$)的共聚焦荧光图像和明场图像的重叠,图5a h-PAMAM-PO-2;图5b G3-PAMAM-PO。

[0122] 图6a和图6b是条形图,其示出了根据本文公开的实施例的在暴露于图6a的对照(未用NO进行官能化)和图6b的NO释放型PAMAM支架2小时后人牙龈成纤维细胞(HGF-1)的生存力(%)。

[0123] 图7a和图7b是条形图,其示出了根据本文公开的实施例的在暴露于图7a的对照(未用NO进行官能化)和图7b的NO释放型PAMAM支架24小时后人牙龈成纤维细胞(HGF-1)的生存力(%)。

[0124] 图8a至图8g示出了通过NMR监测的聚合过程。单体的 ^1H NMR光谱:图8a HEDA和图8b MBA。相同摩尔比的MBA与HEDA之间在75 $^{\circ}\text{C}$ 下持续不同时间的聚合反应的 ^1H NMR光谱:图8c 10分钟,图8d 2小时,图8e 6小时,图8f 12小时和图8g 24小时。溶剂: D_2O 。

[0125] 图9示出了通过MBA与HEDA的迈克尔加成聚合反应的羟基封端的HBPMH,以及大分子主链中可能的结构链段。

[0126] 图10a和图10b示出了如本文其它地方所公开的HBPMH的表征数据。图10a提供了羟基封端的HBPMH的 ^1H NMR光谱。溶剂:DMSO。图10b是羟基封端的HBPMH的 ^{13}C NMR光谱。溶剂:DMSO。图10c是羟基封端的HBPMH的 ^{13}C 、 ^1H -HSQC NMR光谱。溶剂:DMSO。图10d是羟基封端的HBPMH的 ^1H 、 ^1H -COSY NMR光谱。溶剂:DMSO。

[0127] 图11a至图11d示出了HBPMH/NO的N-二醇二氮烯鎓NO供体的表征数据。图11a是HBPMH/NO的合成路线;图11b示出了HBPMH(实线)和HBPMH/NO(虚线)的UV-Vis光谱;图11c示出了HBPMH(顶部)和HBPMH/NO(底部)的 ^1H NMR光谱;图11(d)示出了HBPMH(顶部)和HBPMH/NO(底部)的FTIR光谱。

[0128] 图12a、图12b、图12c和图12d示出了HBPMH的大分子主链中的四个不同的N-二醇二氮烯鎓单元。

[0129] 图13示出了水洗脱液中HBPMH(最右边的曲线)和NO释放型HBPMH/NO(最左边的曲线)二者的GPC曲线的重叠。

[0130] 图14a至图14c示出了HBPMH/NO的表征数据。图14a示出了针对N-二醇二氮烯鎓HBPMH/NO的分解所提出的机理。图14b示出了NO释放型HBPMH/NO的实时NO释放曲线。图14c示出了NO释放型HBPMH/NO的 $t[NO]$ 对时间的实时关系图。

[0131] 图15a和图15b示出了在4小时的孵育过程中,NO释放型羟基封端的HBPMH对浮游细菌的杀菌功效。图15a针对铜绿假单胞菌,而图15b针对金黄色葡萄球菌。NO释放型HBPMH/NO是底部曲线,而非NO释放型对照是顶部曲线。误差条表示平均生存力的标准误差(CFU/mL)。对于所有测量, $n=3$ 个或更多个合并的实验。

[0132] 图16a和图16b示出了某些HBPMH实施例的体外细胞毒性。图16a示出了在4小时的孵育过程中,L929小鼠成纤维细胞暴露于不同浓度的HBPMH和NO释放型HBPMH/NO下的细胞生存力(%)。每个值表示至少三个测定值的平均标准偏差。图16b示出了在4小时的孵育过程中,L929小鼠成纤维细胞暴露于不同浓度的HBPMH和NO释放型HBPMH/NO下的细胞生存力(%)。每个值表示至少三个测定值的平均标准偏差。

[0133] 图17示出了通过MBA与AP的迈克尔加成聚合的伯胺封端的HBPMA的聚合路线的非限制性实例,以及大分子主链中的代表性结构链段。

[0134] 图18a和图18b使用 1H NMR(图18a)和定量性 ^{13}C NMR光谱(图18b)示出了HBPMA的表征数据。

[0135] 图19a至图19c示意性地(图19a)并且用 1H NMR光谱学地(图19b)示出了具有N-二醇二氮烯鎓的HBPMA的官能化;HBPMA(顶部)和HBPMA/NO(底部)的 1H NMR光谱和UV-Vis(图19c);HBPMA(实线)和HBPMA/NO(虚线)。

[0136] 图20a至图20c示出了NO释放型HBPMA/NO的解离的表征。图20a示出了针对N-二醇二氮烯鎓HBPMA/NO的分解所提出的机理。图20b示出了NO释放型HBPMA/NO的实时NO释放曲线。图20c示出了NO释放型HBPMA/NO的 $t[NO]$ 对时间的实时关系图。

具体实施方式

[0137] 本文公开的若干实施例提供了经N-二醇二氮烯鎓NO供体修饰的超支化结构的合成和表征。在若干实施例中,超支化结构是超支化PAMAM(h-PAMAM)聚合物。在若干实施例中,h-PAMAM被部分或基本上羟基化(例如,用环氧化物),从而提供可以充当NO供体的另外的仲胺。在若干实施例中,超支化的PAMAM支架可以释放具有或不具有羟基(例如环氧丙烷(PO))修饰的NO。在若干实施例中,例如,化合物(下文描述的h-PAMAM-PO-2/NO)能够有效降低具有低和/或最小毒性天然组织的微生物(例如,选择口腔病原体)和哺乳动物细胞(例如,人牙龈成纤维细胞)的生存力和/或根除所述微生物和哺乳动物细胞。在若干实施例中,尽管存在结构缺陷(在树状大分子中基本上不存在并且存在于超支化结构中),但是所公开的超支化结构是抗微生物的。在若干实施例中,本文公开的超支化结构受益于相对于纯树枝状化合物的结构缺陷。在若干实施例中,超支化结构(例如,h-PAMAM-PO-2/NO)的抗菌活性相对于树状大分子(例如,G3-PAMAM-PO/NO)是相当的和/或提高的。在这方面,所公开的

超支化结构(例如, h-PAMAM-PO-2/NO)是潜在可扩展的治疗剂。在若干实施例中,如本文所公开的超支化结构不是树状大分子或树突,并且缺乏树状大分子和/或树突的一个或多个特性。

[0138] 现在将在下文中更全面地描述当前公开的主题。然而,受益于前述描述中呈现的教导,当前公开的主题所涉及的领域的技术人员将想到本文所阐述的当前公开的主题的许多修改和其它实施例。因此,应当理解的是,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被包含在所附权利要求的范围内。换句话说,本文描述的主题涵盖所有替代、修改和等同形式。如果所结合的文献、专利和类似材料中的一个或多个与本申请不同或相矛盾,包含但不限于所定义的术语、术语用法、所描述的技术等,则以本申请为准。除非另有定义,否则本文所使用的所有技术术语和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献均通过引用整体并入本文。

[0139] 如本文所使用的,“和/或”是指并且涵盖相关所列项中的一个或多个项的任何和所有可能的组合,以及当以替代形式(“或”)解释时组合的缺乏。

[0140] 如本文所使用的,“一/一个(a/an)”或“所述(the)”可以表示一个或多于一个。例如,“一个”NO释放部分可以表示单个或多个。

[0141] 如本文所使用的,当提及如当前主题的化合物或药剂的量、剂量、时间、温度、杀菌功效等可测量的值时,术语“约”意指涵盖所指定量的 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 或甚至 $\pm 0.1\%$ 的变化。

[0142] 如本文所使用的,术语“树状大分子”是指源自核心并在树突中向外辐射的重复分支的分子。树状大分子的特征在于其完美或接近完美的对称性。树状大分子通常围绕核心对称或基本上对称。树状大分子的特征在于借助其逐步合成的重复性结构单元。

[0143] 如本文所使用的,术语“树突”是指源自焦点并向外辐射的重复分支的分子。树突的特征在于其完美的或接近完美的重复单元。树突的特征在于借助其逐步合成的源自焦点的重复性结构单元。

[0144] 如本文所使用的,术语“超支化”是指并非是对称或围绕核心的树状大分子的支链化合物或结构(例如,具有对称或基本上对称的树突)和缺乏树突的支链化合物或结构。当超支化是树枝状时,如本文所使用的,“官能化的超支化”结构可以具有或不具有附接的一氧化氮供体部分。可以通过一锅合成法产生超支化结构。

[0145] 如本文所使用的,术语“治疗有效量”或“有效量”是指所述化合物对患有障碍、疾病或病症的受试者产生调节作用的量,所述调节作用例如可以是有益的作用,包含改善受试者的病状(例如,一种或多种症状)、延迟或减少病状进展、预防或延迟障碍发作和/或改变临床参数、疾病或病症等,如本领域中众所周知的。例如,有效量可以指使受试者的病状改善至少5%(例如至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少100%)的组合物、化合物或药剂的量。在一些实施例中,病状的改善可以是感染的减少。在一些实施例中,改善可以是表面上或受试者中的细菌负荷(例如,生物负荷)的减少。可以改变当前公开的主题的活性组合物中的活性成分的实际剂量水平,以便施用有效地针对特定受试者和/或应用实现期望响应的一个或多个活性

化合物的量。选择的剂量水平将取决于多种因素,包括但不限于组合物的活性、调配物、施用途径、与其它药物或治疗的组合、所治疗的疾病的严重程度以及所治疗的受试者的身体状况和先前病史。在一些实施例中,施用最小剂量,并且在不存在剂量限制性毒性的情况下将剂量逐步增加至最小有效量。本文设想了对有效剂量的确定和调整,以及对何时和如何进行这种调整的评估。

[0146] “治疗(Treat/treating/treatment)”是指对患有障碍、疾病或病症的受试者产生调节作用的任何类型的作用,所述调节作用例如可以是有益的作用,包含改善受试者的病状(例如,一种或多种症状)、延迟或减少病状进展和/或改变临床参数、疾病或病症、治愈病症等。

[0147] 术语“破坏”和“根除”是指当前公开的超支化结构对抗生物膜的能力。生物膜可以被部分根除或破坏,这意味着细胞不再彼此附接或附着于表面。生物膜可以被完全根除,这意味着生物膜在很大程度上不再是相互连接的、凝聚的或连续的细胞网络。

[0148] 术语“一氧化氮供体”或“NO供体”是指在体内提供、释放和/或直接或间接地转移一氧化氮物质和/或刺激体内一氧化氮的内源性产生和/或提高体内一氧化氮的内源性水平,使得一氧化氮物质的生物活性在预期的作用位点处表达的物质和/或分子。

[0149] 术语“释放一氧化氮”或“提供一氧化氮”是指提供、释放和/或直接或间接地转移一氧化氮的三种氧化还原形式(NO^+ 、 NO^- 、 NO (例如, NO))的任何一种(或两种或更多种)形式的物质和/或提供、释放和/或直接或间接地转移一氧化氮的三种氧化还原形式(NO^+ 、 NO^- 、 NO)中的任何一种(或两种或多种)形式的方法。在一些实施例中,完成一氧化氮的释放,使得一氧化氮物质的生物活性在预期的作用位点处表达。

[0150] 如本文所使用的,术语“微生物感染”是指细菌感染、真菌感染、病毒感染、酵母感染以及其它微生物感染及其组合。

[0151] 在一些实施例中,本文所公开的“患者”或“受试者”是人类患者,但是应当理解的是,当前公开的主题的原理表明,当前公开的主题对于旨在被包含在术语“受试者”和“患者”中的所有脊椎动物物种(包含哺乳动物)都是有效的。合适的受试者通常是哺乳动物受试者。本文描述的主题可用于研究以及兽医应用和医学应用中。如本文所使用的,术语“哺乳动物”包含但不限于人类、非人类灵长类、牛、绵羊、山羊、猪、马、猫、狗、兔子、啮齿动物(例如,大鼠或小鼠)、猴子等。人类受试者包含新生儿、婴儿、青少年、成人和老年受试者。所述受试者可以是“需要”本文公开的方法的受试者,可以是正经历疾病状态和/或预期会经历疾病状态的受试者,并且本发明的方法和组合物用于治疗性和/或预防性治疗。

[0152] 对于本文提供的通用化学式,如果未指出取代基,则本领域普通技术人员将理解,取代基为氢。未连接至原子但被示出的键表明该取代基的位置是可变的。穿过键或在键末端绘制的锯齿线、波浪线、两条波浪线表明所述位置与一些另外的结构键合。对于本文公开但结构中未明确示出的大量另外的单体,聚合物领域的技术人员应理解,可以添加这些单体以改变所得聚合物材料的物理性质,即使在元素分析不能表明预期会有这种区别的情况下。此类物理性质包含溶解度、电荷、稳定性、交联、二级和三级结构等。此外,如果没有指出具有一个或多个手性中心的化合物的立体化学,则包含所有对映异构体和非对映异构体。类似地,对于脂肪族基团或烷基的列举,也包含其所有结构异构体。除非另有说明,否则本文提供的通式中显示为 A_1 至 A_n 的基团和本文中被称为烷基的基团独立地选自烷基或脂肪族

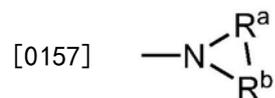
基团,具体地说,具有20个或更少碳原子的烷基,并且甚至更通常地,具有10个或更少原子的烷基(如甲基、乙基、丙基、异丙基和丁基)。烷基可以是任选经取代的(例如,经取代的或未经取代的,如本文其它地方所公开)。烷基可以是经取代的烷基,如烷基卤化物(例如—CX₃,其中X是卤化物,及其在链中的组合或与其键合的组合)、醇(即脂肪族羟基或烷基羟基,具体地说,低级烷基羟基)或其它类似经取代的部分(如氨基-、氨基酸-、芳基-、烷基芳基-、烷基酯-、醚-、酮-、硝基-、巯基-、磺酰基-、亚砷修饰的烷基)。

[0153] 术语“氨基”和“胺”是指含氮的基团,如NR₃、NH₃、NHR₂和NH₂R,其中R可以如本文其它地方所述。因此,如本文所使用的,“氨基”可以指伯胺、仲胺或叔胺。在一些实施例中,氨基的一个R可以是二醇二氮烯鎓(即,NONO)。

[0154] 每当基团被描述为“任选经取代的”时,所述基团可以未经取代或经一个或多个所指示的取代基取代。同样地,当基团被描述为“未经取代的或经取代的”(或“经取代的或未经取代的”)时,如果所述基团经取代,则一个或多个取代基可以选自一个或多个所指示的取代基。如果没有指示取代基,则意指所示“任选经取代的”或“经取代的”基团可以被一个或多个基团取代,所述一个或多个基团单独且独立地选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、芳基(烷基)、环烷基(烷基)、杂芳基(烷基)、杂环基(烷基)、羟基、烷氧基、酰基、氰基、卤素、硫代羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰胺基、N-酰胺基、S-磺酰胺基、N-磺酰胺基、C-羧基、O-羧基、硝基、亚磺酰基(sulfenyl)、亚磺酰基(sulfinyl)、磺酰基、卤代烷基、卤代烷氧基、氨基、单-取代的胺基、双-取代的胺基、单-取代的胺(烷基)、双-取代的胺(烷基)、二氨基、聚氨基、二醚基和聚醚-。

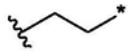
[0155] 如本文所使用的,“C_a到C_b”是指基团中的碳原子数,其中“a”和“b”是整数。所指示的基团可以含有“a”到“b”(包括端点)个碳原子。因此,例如,“C₁到C₄烷基”或“C₁-C₄烷基”是指具有1到4个碳的所有烷基,即,CH₃-、CH₃CH₂-、CH₃CH₂CH₂-、(CH₃)₂CH-、CH₃CH₂CH₂CH₂-、CH₃CH₂CH(CH₃)-和(CH₃)₃C-。如果未指定“a”和“b”,则假定为这些定义中描述的最宽范围。

[0156] 如果将两个“R”基团描述为“结合在一起”,则R基团及其所附接的原子可以形成环烷基、环烯基、芳基、杂芳基或杂环。例如但不限于,如果NR^aR^b基团的R^a和R^b被指示为“结合在一起”,则表示二者彼此共价键合以形成环:



[0158] 如本文所使用的,术语“烷基”是指完全饱和的脂肪族烃基。烷基部分可以是支链或直链。支链烷基的实例包含但不限于异丙基、仲丁基、叔丁基等。直链烷基的实例包含但不限于甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基、正庚基等。烷基可以具有1到30个碳原子(每当在本文中出現时,如“1到30”等数值范围是指在给定范围内的每个整数;例如,“1到30个碳原子”意味着烷基可以由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个或30个碳原子组成,但是在未指定数值范围的情况下,本定义还涵盖术语“烷基”的存在)。烷基还可以是具有1到12个碳原子的中等大小烷基。烷基还可以是具有1到6个碳原子的低级烷基。烷基可以是经取代的或未经取代的。仅通过举例的方式,“C₁-C₅烷基”表明烷基链中有一到五个碳原子,即烷基链选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、

叔丁基、戊基(支链的和直链的)等。典型的烷基包含但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基和己基。

[0159] 如本文所使用的,术语“亚烷基”是指二价的完全饱和的直链脂肪族烃基。亚烷基的实例包含但不限于亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、亚戊基、亚己基、亚庚基和亚辛基。亚烷基可以用  来表示,然后是碳原子数,接着是“*”。例如,  用于表示乙烯。亚烷基可以具有1到30个碳原子(每当在本文中出现的,如“1到30”等数值范围是指在给定范围内的每个整数;例如,“1到30个碳原子”意味着烷基可以由1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子等(多达且包含30个碳原子)组成,但是在未指定数值范围的情况下,本定义还涵盖术语“亚烷基”的存在)。亚烷基还可以是具有1到12个碳原子的中等大小烷基。亚烷基还可以是具有1到6个碳原子的低级烷基。亚烷基可以是经取代的或未经取代的。例如,可以通过置换

低级亚烷基的一个或多个氢和/或通过用C₃₋₆单环环烷基(例如, ) 取代相同碳上的两个氢来取代低级亚烷基。

[0160] 本文所使用的术语“烯基”是指含有一个或多个碳双键的具有二到二十个碳原子的单价直链或支链自由基,包含但不限于1-丙烯基、2-丙烯基、2-甲基-1-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基等。烯基可以是未经取代的或经取代的。

[0161] 本文所使用的术语“炔基”是指含有一个或多个碳三键的具有二到二十个碳原子的单价直链或支链自由基,包含但不限于1-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基等。炔基可以是未经取代的或经取代的。

[0162] 如本文所使用的,“环烷基”是指完全饱和(无双键或三键)的单环或多环(如双环)烃环系统。当由两个或更多个环构成时,所述环可以以稠合、桥接或螺接的方式连接在一起。如本文所使用的,术语“稠合”是指具有共有的两个原子和一个键的两个环。如本文所使用的,术语“桥接环烷基”是指环烷基含有连接非相邻原子的一个或多个原子的键的化合物。如本文所使用的,术语“螺接”是指具有共有的一个原子的两个环并且这两个环不通过桥进行连接。环烷基可以在一个或多个环中含有3到30个原子、在一个或多个环中含有3到20个原子、在一个或多个环中含有3到10个原子、在一个或多个环中含有3到8个原子或在一个或多个环中含有3到6个原子。环烷基可以是未经取代的或经取代的。单环烷基的实例包含但不局限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。稠合环烷基的实例是十氢萘基、十二氢-1H-非那烯基和十四氢蒎基;桥接环烷基的实例是双环[1.1.1]戊基、金刚烷基和原菠烷基(norbornanyl);并且螺环烷基的实例包含螺[3.3]庚烷和螺[4.5]癸烷。

[0163] 如本文所使用的,“环烯基”是指在至少一个环中含有一个或多个双键的单环或多环(如双环)烃环系统;但是,如果双键多于一个,则双键无法在所有环中形成完全离域π电子系统(否则如本文所定义的,所述基团将会是“芳基”)。环烯基可以在一个或多个环中含有3到10个原子、在一个或多个环中含有3到8个原子或在一个或多个环中含有3到6个原子。当由两个或更多个环构成时,所述环可以以稠合、桥接或螺接的方式连接在一起。环烯基可以是未经取代的或经取代的。

[0164] 如本文所使用的,“芳基”是指所有环中具有完全离域π电子系统的碳环(全碳)单环或多环(如双环)芳香族环系统(包含两个碳环共享化学键的稠合环系统)。芳基中的碳

原子数可以变化。例如,芳基可以是C₆-C₁₄芳基、C₆-C₁₀芳基或C₆芳基。芳基的实例包含但不限于苯、萘和蒽。芳基可以是经取代的或未经取代的。如本文所使用的,“杂芳基”是指含有一个或多个杂原子(例如,1个、2个或3个杂原子)的单环或多环(如双环)芳香族环系统(具有完全离域π电子系统的环系统),即,除碳以外的元素,包含但不限于氮、氧和硫。杂芳基的一个或多个环中的原子数可以变化。例如,杂芳基可以在一个或多个环中含有4到14个原子、在一个或多个环中含有5到10个原子或在一个或多个环中含有5到6个原子,如九个碳原子和一个杂原子;八个碳原子和两个杂原子;七个碳原子和三个杂原子;八个碳原子和一个杂原子;七个碳原子和两个杂原子;六个碳原子和三个杂原子;五个碳原子和四个杂原子;五个碳原子和一个杂原子;四个碳原子和两个杂原子;三个碳原子和三个杂原子;四个碳原子和一个杂原子;三个碳原子和两个杂原子;或者两个碳原子和三个杂原子。此外,术语“杂芳基”包含稠合环系统,在所述稠合环系统中,两个环(如至少一个芳基环和至少一个杂芳基环或至少两个杂芳基环)共享至少一个化学键。杂芳基环的实例包含但不限于呋喃、咪唑、噻吩、苯并噻吩、酞嗪、吡咯、噁唑、苯并噁唑、1,2,3-噁二唑、1,2,4-噁二唑、噻唑、1,2,3-噻二唑、1,2,4-噻二唑、苯并噻唑、咪唑、苯并咪唑、吡啶、吡唑、吡嗪、苯并吡唑、异噁唑、苯并异噁唑、异噻唑、三唑、苯并三唑、噻二唑、四唑、吡啶、哒嗪、嘧啶、吡嗪、嘌呤、蝶啶、喹啉、异喹啉、喹唑啉、喹喔啉、噌啉和三嗪。杂芳基可以是经取代的或未经取代的。

[0165] 如本文所使用的,“杂环基”或“杂脂环基”是指三元、四元、五元、六元、七元、八元、九元、十元、多达18元的单环、双环和三环环系统,其中碳原子与1到5个杂原子一起构成所述环系统。然而,杂环可以任选地含有以这样的方式定位使得在所有环中不存在完全离域π电子系统的一个或多个不饱和键。一个或多个杂原子是除碳之外的元素,包含但不限于氧、硫和氮。杂环可以进一步含有一个或多个羰基官能团或硫代羰基官能团,以使定义包含氧代系统和硫代系统,如内酰胺、内酯、环状酰亚胺、环状硫代酰亚胺和环状氨基甲酸酯。当由两个或更多个环构成时,所述环可以以稠合、桥接或螺接的方式连接在一起。如本文所使用的,术语“稠合”是指具有共有的两个原子和一个键的两个环。如本文所使用的,术语“桥接杂环基”或“桥接杂脂环基”是指杂环基或杂脂环基含有连接非相邻原子的一个或多个原子的键的化合物。如本文所使用的,术语“螺接”是指具有共有的一个原子的两个环并且这两个环不通过桥进行连接。杂环基和杂脂环基可以在一个或多个环中含有3到30个原子、在一个或多个环中含有3到20个原子、在一个或多个环中含有3到10个原子、在一个或多个环中含有3到8个原子或在一个或多个环中含有3到6个原子。例如,五个碳原子和一个杂原子;四个碳原子和两个杂原子;三个碳原子和三个杂原子;四个碳原子和一个杂原子;三个碳原子和两个杂原子;两个碳原子和三个杂原子;一个碳原子和四个杂原子;三个碳原子和一个杂原子;或者两个碳原子和一个杂原子。另外,杂脂环中的任何氮可以被季铵化。杂环基和杂脂环基可以是未经取代的或经取代的。这种“杂环基”或“杂脂环基”的实例包含但不限于1,3-二噁英、1,3-二噁烷、1,4-二噁烷、1,2-二氧戊环、1,3-二氧戊环、1,4-二氧戊环、1,3-氧硫杂环己烷、1,4-氧硫杂环己二烯、1,3-氧硫杂环戊烷、1,3-二硫杂环戊二烯、1,3-二硫杂环戊环、1,4-氧硫杂环己烷、四氢-1,4-噻嗪、2H-1,2-噁嗪、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、巴比妥酸、硫代巴比妥酸、二氧化哌嗪、乙内酰脲、二氢尿嘧啶、三噁烷、六氢-1,3,5-三嗪、咪唑啉、咪唑烷、异噁唑啉、异噁唑烷、噁唑啉、噁唑烷、噁唑烷酮、噻唑啉、噻唑烷、吗啉、环氧乙烷、哌啶N-氧化物、哌啶、哌嗪、吡咯烷、氮杂环庚烷、吡咯烷酮、吡咯烷酮、4-哌啶酮、吡唑啉、吡

唑烷、2-氧代吡咯烷、四氢吡喃、4H-吡喃、四氢噻喃、硫代吗啉、硫代吗啉亚砷、硫代吗啉砷以及其苯并稠合的类似物(例如,苯并咪唑烷酮、四氢喹啉和/或3,4-亚甲二氧基苯基)。螺杂环基的实例包含2-氮杂螺[3.3]庚烷、2-氧杂螺[3.3]庚烷、2-氧杂-6-氮杂螺[3.3]庚烷、2,6-二氮杂螺[3.3]庚烷、2-氧杂螺[3.4]辛烷和2-氮杂螺[3.4]辛烷。

[0166] 如本文所使用的,“芳烷基”和“芳基(烷基)”是指作为取代基经由低级亚烷基连接的芳基。芳烷基的低级亚烷基和芳基可以是经取代的或未经取代的。实例包含但不限于苄基、2-苯基烷基、3-苯基烷基和萘基烷基。

[0167] 如本文所使用的,“环烷基(烷基)”是指作为取代基经由低级亚烷基连接的环烷基。环烷基(烷基)的低级亚烷基和环烷基可以是经取代的或未经取代的。

[0168] 如本文所使用的,“杂芳烷基”和“杂芳基(烷基)”是指作为取代基经由低级亚烷基连接的杂芳基。杂芳烷基的低级亚烷基和杂芳基可以是经取代的或未经取代的。实例包含但不限于2-噁吩基烷基、3-噁吩基烷基、呋喃基烷基、噻吩基烷基、吡咯基烷基、吡啶基烷基,异噻唑基烷基和咪唑基烷基以及其苯并稠合的类似物。

[0169] “杂脂环基(烷基)”和“杂环基(烷基)”是指作为取代基经由低级亚烷基连接的杂环基或杂脂环基。(杂脂环基)烷基的低级亚烷基和杂环基可以是经取代的或未经取代的。实例包含但不限于四氢-2H-吡喃-4-基(甲基)、哌啶-4-基(乙基)、哌啶-4-基(丙基)、四氢-2H-噻喃-4-基(甲基)和1,3-噻嗪烷-4-基(甲基)。

[0170] 如本文所使用,术语“羟基”是指-OH基团。

[0171] 如本文所使用的,“烷氧基”是指式-OR,其中R是如本文所定义的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基(烷基)、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基)。烷氧基的非限制性列表为甲氧基、乙氧基、正丙氧基、1-甲基乙氧基(异丙氧基)、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、苯氧基和苯甲酰氧基。烷氧基可以是经取代的或未经取代的。

[0172] 如本文所使用的,“酰基”是指作为取代基经由羰基连接的氢、烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、杂环基、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)和杂环基(烷基)。实例包含甲酰基、乙酰基、丙酰基、苯甲酰基和丙烯酰基。酰基可以是经取代的或未经取代的。

[0173] 如本文所使用的,“氰基”是指“-CN”基团。

[0174] 如本文所使用的,术语“卤素原子”或“卤素”意指元素周期表第7列的放射稳定原子中的任何一个原子,如氟、氯、溴和碘。

[0175] “硫代羰基”是指“-C(=S)”基团,其中R可以与关于O-羰基所定义的相同。硫代羰基可以是经取代的或未经取代的。“O-氨基甲酰基”是指“-OC(=O)N(R_AR_B)”基团,其中R_A和R_B可以独立地为氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基(烷基)、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基)。O-氨基甲酰基可以是经取代的或未经取代的。

[0176] “N-氨基甲酰基”是指“ROC(=O)N(R_A)-”基团,其中R和R_A可以独立地为氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基(烷基)、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基)。N-氨基甲酰基可以是经取代的或未经取代的。

[0177] “O-硫代氨基甲酰基”是指“-OC(=S)-N(R_AR_B)”基团,其中R_A和R_B可以独立地为氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基(烷基)、芳基(烷基)、杂芳

基(烷基)或杂环基(烷基)。O-硫代氨基甲酰基可以是经取代的或未经取代的。

[0178] “N-硫代氨基甲酰基”是指“ $\text{ROC}(=\text{S})\text{N}(\text{R}_\text{A})-$ ”基团,其中R和 R_A 可以独立地为氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基(烷基)、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基)。N-硫代氨基甲酰基可以是经取代的或未经取代的。

[0179] “C-酰胺基”是指“ $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}_\text{A}\text{R}_\text{B})$ ”基团,其中 R_A 和 R_B 可以独立地为氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基(烷基)、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基)。C-酰胺基可以是经取代的或未经取代的。

[0180] “N-酰胺基”是指“ $\text{RC}(=\text{O})\text{N}(\text{R}_\text{A})-$ ”基团,其中R和 R_A 可以独立地为氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基(烷基)、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基)。N-酰胺基可以是经取代的或未经取代的。

[0181] “S-磺酰胺基”是指“ $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}_\text{A}\text{R}_\text{B})$ ”基团,其中 R_A 和 R_B 可以独立地为氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基(烷基)、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基)。S-磺酰胺基可以是经取代的或未经取代的。

[0182] “N-磺酰胺基”是指“ $\text{RSO}_2\text{N}(\text{R}_\text{A})-$ ”基团,其中R和 R_A 可以独立地为氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基(烷基)、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基)。N-磺酰胺基可以是经取代的或未经取代的。

[0183] “O-羧基”是指“ $\text{RC}(=\text{O})\text{O}-$ ”基团,其中R可以为如本文所定义的氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基(烷基)、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基)。O-羧基可以是经取代的或未经取代的。

[0184] 术语“酯”和“C-羧基”是指“ $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}$ ”基团,其中R可以与关于O-羧基所定义的相同。酯和C-羧基可以是经取代的或未经取代的。

[0185] “硝基”指“ $-\text{NO}_2$ ”基团。

[0186] “亚磺酰基”是指“ $-\text{SR}$ ”基团,其中R可以为氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基(烷基)、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基)。亚磺酰基可以是经取代的或未经取代的。

[0187] “亚硫酸基”是指“ $-\text{S}(=\text{O})-\text{R}$ ”基团,其中R可以与关于亚磺酰基所定义的相同。亚硫酸基可以是经取代的或未经取代的。

[0188] “磺酰基”是指“ SO_2R ”基团,其中R可以与关于亚磺酰基所定义的相同。磺酰基可以是经取代的或未经取代的。

[0189] 如本文所使用的,“卤代烷基”是指氢原子中的一个或多个被卤素取代的烷基(例如,单卤代烷基、二卤代烷基、三卤代烷基和多卤代烷基)。此类基团包含但不限于氯甲基、氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、1-氯-2-氟甲基、2-氟异丁基和五氟乙基。卤代烷基可以是经取代的或未经取代的。

[0190] 如本文所使用的,“卤代烷氧基”是指氢原子中的一个或多个被卤素取代的烷氧基(例如,单卤代烷氧基、二卤代烷氧基和三卤代烷氧基)。此类基团包含但不限于氯甲氧基、氟甲氧基、二氟甲氧基、三氟甲氧基、1-氯-2-氟甲氧基和2-氟异丁氧基。卤代烷氧基可以是经取代的或未经取代的。

[0191] 如本文所使用的,术语“氨基”和“未经取代的氨基”是指 $-\text{NH}_2$ 基团。

[0192] “单-取代的胺基”是指“ $-\text{NHR}_\text{A}$ ”基团,其中 R_A 可以为烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯

基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基(烷基)、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基)。R_A可以是经取代的或未经取代的。单-取代的胺基可以包含例如单-烷基胺基、单-C₁-C₆烷基胺基、单-芳胺基、单-C₆-C₁₀芳胺基等。单-取代的胺基的实例包含但不限于-NH(甲基)、-NH(苯基)等。

[0193] “二-取代的胺基”是指“-NR_AR_B”基团,其中R_A和R_B可以独立地为烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基(烷基)、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基)。R_A和R_B可以独立地为经取代的或未经取代的。二-取代的胺基可以包含例如二-烷基胺基、二-C₁-C₆烷基胺基、二-芳胺基、二-C₆-C₁₀芳胺基等。二-取代的胺基的实例包含但不限于-N(甲基)₂、-N(苯基)(甲基)、-N(乙基)(甲基)等。

[0194] 如本文所使用的,“单-取代的胺基(烷基)”是指作为取代基经由低级亚烷基连接的本文提供的单-取代的胺。单-取代的胺基(烷基)可以是经取代的或未经取代的。单-取代的胺基(烷基)可以包含例如单-烷基胺基(烷基)、单-C₁-C₆烷基胺基(C₁-C₆烷基)、单-芳胺基(烷基)、单-C₆-C₁₀芳胺基(C₁-C₆烷基)等。单-取代的胺基(烷基)的实例包含但不限于-CH₂NH(甲基)、-CH₂NH(苯基)、-CH₂CH₂NH(甲基)、-CH₂CH₂NH(苯基)等。

[0195] 如本文所使用的,“二-取代的胺基(烷基)”是指作为取代基经由低级亚烷基连接的本文提供的二-取代的胺。二-取代的胺基(烷基)可以是经取代的或未经取代的。二-取代的胺基(烷基)可以包含例如二-烷基胺基(烷基)、二-C₁-C₆烷基胺基(C₁-C₆烷基)、二-芳胺基(烷基)、二-C₆-C₁₀芳胺基(C₁-C₆烷基)等。二-取代的胺基(烷基)的实例包含但不限于-CH₂N(甲基)₂、-CH₂N(苯基)(甲基)、-CH₂N(乙基)(甲基)、-CH₂CH₂N(甲基)₂、-CH₂CH₂N(苯基)(甲基)、-NCH₂CH₂(乙基)(甲基)等。

[0196] 如本文所使用的,术语“二氨基-”表示“-N(R_A)R_B-N(R_C)(R_D)”基团,其中R_A、R_C和R_D可以独立地为如本文所定义的氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基(烷基)、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基),并且其中R_B连接两个“N”基团并且可以是(独立于R_A、R_C和R_D)经取代的或未经取代的亚烷基。R_A、R_B和R_C和R_D可以进一步独立地为经取代的或未经取代的。

[0197] 如本文所使用的,术语“聚氨基”表示“-N(R_A)R_B-_n-N(R_C)(R_D)”。为了说明,术语聚氨基可以包括-N(R_A)烷基-N(R_A)烷基-N(R_A)烷基-N(R_A)烷基-H。在一些实施例中,聚氨基的烷基如本文其它地方所公开。虽然这个实例仅具有4个重复单元,但是术语“聚氨基”可以由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个重复单元组成。R_A、R_C和R_D可以独立地为如本文所定义的氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基(烷基)、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基),并且其中R_B连接两个“N”基团并且可以是(独立于R_A、R_C和R_D)经取代的或未经取代的亚烷基。R_A、R_C和R_D可以进一步独立地为经取代的或未经取代的。如本文所指出的,聚氨基包括具有插入烷基的胺基(其中烷基如本文其它地方所定义)。

[0198] 如本文所使用的,术语“二醚-”表示“-OR_BO-R_A”基团,其中R_A可以为如本文所定义的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基(烷基)、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基),并且其中R_B连接两个“O”基团并且可以是经取代的或未经取代的亚烷基。R_A可以进一步独立地为经取代的或未经取代的。

[0199] 如本文所使用的,术语“聚醚”表示重复性-(OR_B-)_nOR_A基团。为了说明,术语聚醚可

以包括-O烷基-O烷基-O烷基-O烷基-OR_A。在一些实施例中,聚醚的烷基如本文其它地方所公开。虽然这个实例仅具有4个重复单元,但是术语“聚醚”可以由1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个重复单元组成。R_A可以为如本文所定义的氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、环烷基(烷基)、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基)。R_B可以是经取代或未经取代的亚烷基。R_A可以进一步独立地为经取代的或未经取代的。如本文所指出的,聚醚包括具有插入烷基的醚基(其中烷基如本文其它地方所定义并且可以任选地经取代)。

[0200] 在未指定取代基的数量(例如卤代烷基)的情况下,可以存在一个或多个取代基。例如,“卤代烷基”可以包含一个或多个相同或不同的卤素。作为另一实例,“C₁-C₃烷氧基苯基”可以包含一个或多个相同或不同的烷氧基,所述烷氧基含有一个、两个或三个原子。

[0201] 如本文所使用的,基团表示具有单个不成对电子的物质,使得含有所述基团的物质可以与另一种物质共价键合。因此,在这种情况下,基团不一定是自由基。相反,基团表示较大分子的特定部分。术语“基团(radical)”可以与术语“基团(group)”互换使用。

[0202] 当给定整数的范围时,范围包含落入所述范围内的任何数字和定义所述范围的末端的数字。例如,当使用术语“从1到20的整数”时,范围中包含的整数为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10等(多达且包含20)。

[0203] 此外,如本文所使用的,“和/或”是指并且涵盖相关所列项中的一个或多个项的任何和所有可能的组合,以及当以替代形式(“或”)解释时组合的缺乏。

[0204] 此外,如本文所使用的,当提及如本发明化合物或药剂的量、剂量、时间、温度等可测量的值时,术语“约”意指涵盖所指定量的20%、±10%、±5%、±1%、±0.5%或甚至±0.1%的变化。术语“基本上由……组成”(和语法变体)应被赋予其通常的含义,并且还意指所提及的组合物或方法可以含有另外的组分,只要所述另外的组分不会实质性地改变所述组合物或方法即可。术语“由...组成”(和语法变体)应被赋予其通常的含义,并且还意指所提及的组合物或方法不含另外的组分。术语“包括”(和语法变体)应被赋予其通常的含义,并且还意指所提及的组合物或方法开放地含有另外的分。

[0205] 一氧化氮(NO)是内源产生的介导血管生成的双原子自由基。其具有相对短的生物半衰期(秒),并且具有自然反应性。如本文所公开的,能够控制NO储存和释放的支架的合成对于利用NO在生理学中的作用和开发基于NO的治疗剂是重要的。除了上述公开的NO的作用外,NO也是一种有效的抗菌剂,其通过亚硝化和氧化应激作用于细菌。NO是一种广谱抗菌剂,并且在一些实施例中,递送NO的支架能够根除细菌和生物膜,这主要是通过形成对微生物DNA和/或膜结构造成氧化和亚硝化损害的反应性NO副产物(例如,过氧亚硝酸盐和三氧化二氮)来进行的。有利地,NO发挥其抗菌作用的广泛机制降低了细菌产生耐药性的风险。因此,NO释放型材料可以是抵抗细菌感染的良好靶标。NO释放型材料的抗菌功效可能取决于NO有效负荷和相关的释放动力学。

[0206] 一氧化氮(一种内源产生的双原子自由基)与许多生物学过程有关,所述生物学过程包含血小板聚集和粘附、血管舒张、伤口修复、免疫应答和致癌作用。NO的缺乏会导致与NO相关的生理系统出现某种程度的故障。外源NO递送可能是解决从心血管疾病到抗菌和抗癌疗法等生物医学疗法的有效策略。然而,在调节用于治疗的气态NO方面的困难保证了使用各种合成的NO供体(例如,N-二乙醇二氮烯鎓、S-亚硝基硫醇、亚硝酰基金属、有机硝酸盐)

来控制NO的递送。N-二醇二氮烯鎓 (NONOates) 由于其良好的稳定性和在生理条件下进行质子触发的NO递送的能力而可用作NO供体。在一些情况下,高NO含量是有效评估良好支架的储存能力的重要参数。另外,高密度的仲胺基团使某些供体具有高的NO储存能力。但是,过快的NO释放和高NO储存可能导致对哺乳动物细胞的不期望的毒性。因此,在制备具有高NO储存和低细胞毒性的NO释放型生物可相容材料方面存在挑战,并且根据本文公开的若干实施例解决了此类挑战和其它挑战。本发明的若干实施例具有以下优点中的一个或多个:有效且独特的合成路线以及超支化构建体的所得化学组成。可以提供可控制量的仲胺和各种外部末端基团(例如,羟基、甲基、羟甲基和伯胺)。可以针对特定应用调整所产生的一氧化氮释放型支架的NO储存和NO释放动力学。在若干实施例中,通过改变本文公开的式的官能化单体的类型和/或数量来实现所述调整。在若干实施例中,例如通过具有不同组成的化合物对所产生的一氧化氮释放型支架中的胺进行另外的官能化进一步实现了对NO释放动力学的控制。在一些实施例中,仲胺基团直接影响N-二醇二氮烯鎓(或其它NO载体基团)的稳定性,从而允许对NO的储存和释放动力学两者进行控制。

[0207] 一氧化氮(一种内源产生的双原子自由基)不仅在几个重要的生物学过程中起基本作用,而且还表现出作为抗菌剂或抗癌剂的新兴功能。各种NO供体(例如,N-二醇二氮烯鎓、S-亚硝基硫醇、亚硝酰基金属、有机硝酸盐)可用于受控的外源NO递送。递送剂是有益的,因为难以调节气态NO。N-结合的二醇二氮烯鎓 (NONOates) 尤其有吸引力,因为其具有良好的稳定性和易储存性,在生理条件下,质子触发自发解离以再生NO基团。在发现经N-二醇二氮烯鎓修饰的生物可相容支架方面取得了进展,所述支架包含线性和树枝状聚合物、硅酮纳米粒子、壳聚糖、脂质体、金属有机框架等。

[0208] 在超支化材料中,树状大分子是具有理论上完美的支链结构和明确定义的分子量的球形大分子家族,由于可用于进一步修饰和NO负载的高密度外部官能团而具有吸引力。如本文所公开的NO释放型树状大分子和超支化结构的特征在于大的NO有效负荷和对多种病原细菌(包含铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌)的抗菌活性。NO释放型第1代(G1)-聚酰胺胺(PAMAM)树状大分子可能对某些牙周病原体(例如,牙龈卟啉单胞菌和放线共生放线杆菌)有效。不幸的是,这些树状大分子可能对致龋菌(例如,变形链球菌和血液链球菌)显示出不良的杀生物作用。虽然可以用长烷基链对这些PAMAM树状大分子进行修饰,以通过膜破坏和与NO相关的应激促进对致龋菌的抗菌活性,但使用这些双重作用的树状大分子会对人牙龈成纤维细胞产生毒性,从而限制了所述树状大分子的临床应用。更高代数的NO释放型PAMAM树状大分子可以促进对病原体的增强的抗菌活性,而不会损害哺乳动物细胞的生存力。不幸的是,由于多步纯化,合成更高代数的PAMAM树状大分子很困难,既费时又费力。这些合成挑战限制了这些药剂的扩大规模和潜在的临床应用。树状大分子的重复的生长或纯化步骤以及仲胺的修饰导致繁琐的工作、不期望的费用成本和高合成技能,这进一步阻碍了其商业应用。另外,用于合成必要的仲胺以储存N-二醇二氮烯鎓的残留伯胺基团也导致了意想不到的细胞毒性。降低细胞毒性的一种有效策略是使具有聚乙二醇化外表面的树状大分子官能化,但是这个策略伴随着一些缺点,包含繁琐的修饰路线和降低的NO储存能力。本文公开的一些实施例解决了这些或其它问题,并且在一些实施例中,提供了用于外源NO递送的低成本且生物可相容的大分子支架。

[0209] 在一些实施例中,超支化聚合物(HBP)是树枝状聚合物的类别,但是具有不规则的

三维高度支化的结构。在一些实施例中,与树状大分子不同,HBP由随机分散在大分子主链中的树枝状单元、线性单元和末端单元组成。在一些实施例中,可以有利地使用“一锅法”聚合来合成HBP,从而极大地减少了聚合步骤以及时间或材料的消耗。得益于独特的物理和化学性质以及容易的聚合,HBP可能使其在多个领域(如生物医学领域)中具有吸引力。

[0210] 在一些实施例中,可以通过多官能胺(例如,二胺、三胺、四胺等)单体与二丙烯酸酰胺/二丙烯酸酯/二乙烯基砜单体之间的迈克尔加成缩聚来聚合超支化聚合物,从而为生物医学应用提供有前景的生物可相容材料。例如,阳离子超支化聚(酰胺基胺)(HBPA)。在一些实施例中,由于大分子主链中存在许多仲胺,HBP(如HBPA)可以用作递送N-二醇二氮烯鎓NO供体的生物可相容支架。本文公开的一些实施例涉及供NO氮的超支化聚合物结构。在一些实施例中,这些超支化聚合物结构是低成本且有效的“一锅法”聚合。在一些实施例中,可以进行本文公开的合成次序以产生羟基封端的超支化聚合物结构(例如,超支化的聚(亚甲基双丙烯酸酰胺-羟乙基乙二胺)(HBPMH))。在一些实施例中,可以使所得的富含仲胺的超支化聚合物结构与NO气体反应,从而在聚合物主链中形成N-二醇二氮烯鎓。在一些实施例中,评估了超支化聚合物结构对革兰氏阴性细菌(例如,铜绿假单胞菌等)和/或革兰氏阳性细菌(例如,铜绿葡萄球菌等)的抗菌性。在一些实施例中,超支化结构在体外和体内对哺乳动物细胞(例如,L929小鼠成纤维细胞等)具有低细胞毒性。

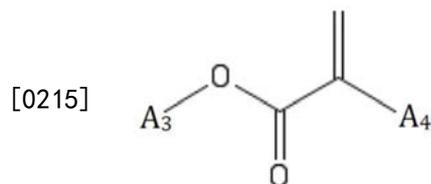
[0211] 龋齿(例如,蛀牙)影响了大多数工业化国家60%-70%的学龄儿童和大多数成年人。在世界范围内,总人口中有11%的人患有严重的牙周炎,这会导致牙齿脱落和如冠状动脉疾病、心血管疾病、中风和不良妊娠结局等系统性疾病。在口腔中的>700种微生物中,致龋菌(例如,变形链球菌(*Streptococcus mutans*)、粘性放线菌(*Actinomyces viscosus*))和牙周病原体(例如,牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、放线共生放线杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*))在口腔疾病的引发和进展方面起主要作用。口腔疾病是人类面临的最普遍的健康问题。革兰氏阳性致龋菌(例如,变形链球菌、粘性放线菌)和革兰氏阴性牙周细菌(例如,牙龈卟啉单胞菌、放线共生放线杆菌)分别代表与龋齿和牙周病的进化和进展相关的主要加重因素。不幸的是,目前对抗这些病原体的治疗具有不良的副作用。例如,抗生素的全身使用可能导致胃肠道紊乱并增强细菌抵抗力。洗必泰(Chlorhexidine)是一种常见的口腔杀菌剂,其可能改变味道,弄脏牙齿和舌头,并刺激颊粘膜。高分子NO递送媒剂(例如,二氧化硅纳米颗粒、金等)会杀死革兰氏阴性牙周病原体。然而,尚未证明这些材料以安全浓度(例如,杀菌但对哺乳动物细胞无毒的浓度)杀死革兰氏阳性致龋菌。类似于所述纳米材料,二氧化硅纳米颗粒缺乏生物降解性并且具有潜在的细胞毒性也阻碍了其在生物医学应用方面的前景。目前的研究还集中在利用包含银、金、锌和铜的纳米材料作为培养细菌耐药性的传统抗生素的替代品。然而,这些纳米材料可能在体内积累,并可能引起累积毒性,从而限制了其在某些应用方面的前景。开发能够杀死所述致病细菌的口腔治疗剂对于维持口腔健康而言很重要。本文公开的超支化结构(例如,携带NO的HBP)解决了这些问题或其它问题中的一个或多个。有利的是,如本文所公开的超支化结构易于合成,提供独特的三维树枝形状并且可以具有低细胞毒性。

[0212] 如本文所公开的,超支化聚合物是化合物的重要子类。在一些实施例中,超支化聚合物具有与树枝状聚合物相似的性质,但是有利的是,所述超支化聚合物易于通过一锅法反应以最少的纯化大量制备。与基本上无结构缺陷的树状大分子对应物(其包括源自树状

大分子的共同核心的相同树突)相比,超支化聚合物的结构是不规则的。然而,如本文所公开的,在一些实施例中,超支化聚合物仍保留高密度的外部官能团。

[0213] 尽管两者均具有球状结构,但树状大分子和超支化聚合物的结构不同。例如,树状大分子具有两种类型的结构单元:表面上的末端单元和球形结构内部的树枝状单元。除缺陷外,树状大分子具有一致且明确的结构。与这种明确的结构相反,超支化聚合物具有三种类型的结构单元:树枝状单元、线性单元和末端单元,三者跨给定的群体不一致地定向。当超支化结构的末端单元定位在末端时,树枝状单元和线性单元分布在整个大分子框架中,从而导致不规则的结构。结构差异与不同的形成机制有关,并且可以进一步与其不同的合成方法有关。树状大分子是通过逐步迭代来合成的,最通常是通过从多功能核心开始的发散过程来合成的。在一些实施例中,超支化聚合物可以通过聚合反应一步合成。例如,在一些实施例中,可以按与G3-PAMAM树状大分子相似的单元结构和分子量来合成超支化聚酰胺胺(h-PAMAM)。在一些实施例中,超支化结构引起对哺乳动物细胞的低毒性。

[0214] 在一些实施例中,提供了包含胺和丙烯酸酯的超支化共聚物的聚酰胺胺组合物。在一些实施例中,胺的至少一部分被N-二醇二氮烯鎓部分修饰。在一些实施例中,超支化共聚物包含树枝状单元、线性单元和末端单元,所述树枝状单元包括叔胺,所述线性单元包括仲胺,并且所述末端单元包括伯胺。在一个实施例中,N-二醇二氮烯鎓部分可以通过仲胺结合,并表现出与末端单元的伯胺的分子内氢键合。在一个实施例中,胺衍生自具有以下结构的多官能胺单体: $H_2N-A_1-(NH)-A_2-NH_2$,其中 A_1 和 A_2 是独立选择的烷基部分。在另外的实施例中,丙烯酸酯衍生自以下单体:



[0216] 其中 A_3 和 A_4 是独立选择的烷基部分或氢。

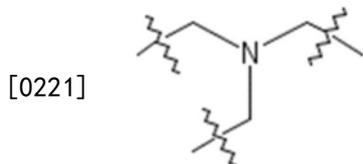
[0217] 在另外的实施例中,聚酰胺胺组合物已经被进一步修饰为包含羟基部分。羟基部分可以通过烷基部分连接到胺部分,使得所述胺部分为仲胺。在若干实施例中,聚酰胺胺组合物可以包含介于约2:1与约5:1之间的胺与丙烯酸酯的摩尔比。在若干实施例中,胺与丙烯酸酯的摩尔比介于约3:1与约4:1之间。在若干实施例中,使用介于所列出的比率之间的比率。

[0218] 在若干实施例中,超支化共聚物中的丙烯酸酯残基衍生自选自以下的单体:丙烯酸及其衍生物的盐、酯和共轭碱。在若干实施例中,所述丙烯酸酯衍生自单体甲基丙烯酸酯。在若干实施例中,所述丙烯酸酯衍生自选自以下中的一个或多个的单体:丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸甲酯、丙烯酸胺、甲基丙烯酸乙酯、2-氯乙基乙基醚、丙烯酸2-乙基己酯、甲基丙烯酸羟乙酯、丙烯酸羟乙酯、丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸丁酯、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺、N-(3-氨丙基)甲基丙烯酰胺盐酸盐、N-(3-BOC-氨丙基)甲基丙烯酰胺、甲基丙烯酸2-氨乙酯盐酸盐、甲基丙烯酸2-(叔丁基氨基)乙酯、n-异丙基丙烯酰胺、丙烯酸2-甲氧基乙酯、n-乙基甲基丙烯酰胺、n-乙基乙酰胺、丙烯酸2-N-吗啉代乙酯、甲基丙烯酰基-L-赖氨酸、丙烯酸2-(甲基氨基)乙酯和甲基丙烯酸2-(甲基氨基)乙酯。在另一个实施例中,所述丙烯酸酯衍生自二丙烯酸酯。例如,二丙烯酸酯可以是乙二醇二丙烯酸酯、三乙二醇二丙

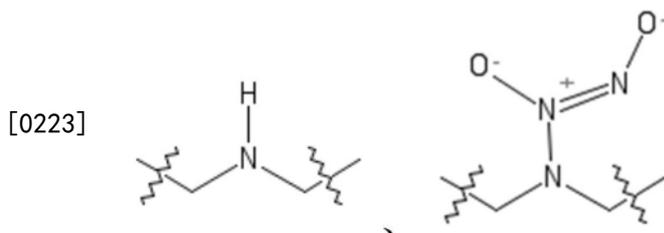
烯酸酯、四乙二醇二丙烯酸酯、聚乙二醇二丙烯酸酯、三环癸二甲醇二丙烯酸酯、N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺、双[2-(甲基丙烯酰氧基)乙基]磷酸酯、二丙烯酰胺和N,N'-亚甲基双丙烯酰胺。

[0219] 在若干实施例中,胺残基衍生自二亚乙基三胺(例如,使用二亚乙基三胺合成)。在若干实施例中,胺残基衍生自以下中的一个或多个(例如,使用以下中的一个或多个合成):乙二胺、二亚乙基三胺、三亚乙基四胺、四亚乙基五胺、五亚乙基六胺、聚醚胺和双(六亚甲基)三胺。

[0220] 在若干实施例中,聚酰胺胺超支化共聚物包含一个或多个包含叔胺的树枝状单元、多个包含伯胺的末端单元和多个包含仲胺的线性单元。N-二醇二氮烯鎓部分可以与线性单元中存在的仲胺可逆地结合。在一个实施例中,聚酰胺胺超支化共聚物具有树枝状单元,所述树枝状单元包含以下结构:



[0222] 并且所述多个线性单元中的至少一部分包含选自以下结构的基团:



[0224] 或其组合。在若干实施例中,胺残基衍生自聚酰胺胺超支化共聚物(例如,使用聚酰胺胺超支化共聚物合成),所述聚酰胺胺超支化共聚物并入了高水平的N-二醇二氮烯鎓部分,因为所述N-二醇二氮烯鎓部分是通过所述N-二醇二氮烯鎓部分的氧与所述多个伯胺中的至少一个伯胺的氢之间的氢键合来稳定的。

[0225] 在若干实施例中,通过二亚乙基三胺(DETA)与丙烯酸甲酯(MA)的聚合合成超支化聚酰胺胺(h-PAMAM)。在若干实施例中,通过将本文其它地方所公开的任何亲核胺化合物与一个或多个丙烯酸酯进行加成来合成超支化结构。

[0226] 在若干实施例中,可以使用尺寸排阻色谱法(SEC)测量本文公开的超支化结构的分子量。在若干实施例中,使用多角度光散射(SEC-MALS)检测器。在若干实施例中,本文公开的超支化结构的重均分子量(M_w)大于或等于约:2,500g/mol、5,000g/mol、6,000g/mol、7,000g/mol、8,000g/mol、10000g/mol、15,000g/mol或包含和/或跨越上述值的范围。在若干实施例中,本文公开的超支化结构的 M_w 大于或等于约 6.39×10^3 g/mol。在若干实施例中,本文公开的超支化结构的数均分子量(M_n)大于或等于约:2,500g/mol、5,000g/mol、6,000g/mol、7,000g/mol、8,000g/mol、10000g/mol、15,000g/mol或包含和/或跨越上述值的范围。在若干实施例中,本文公开的超支化结构的 M_n 或等于约 6.39×10^3 g/mol。如使用多角度光散射(SEC-MALS)检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的,超支化共聚物的大小可以被描述为介于约 2×10^3 g mol⁻¹与约 15×10^3 g mol⁻¹之间的重均分子量(MW)。具有这种大小的此类化合物可以被称为低聚物。在其它实施例中,超支化共聚物的大小可以被描述为介于约3

$\times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 与约 $10 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 之间的重均分子量(MW)。在另一个实施例中,大小可以介于约 $3 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 与约 $6 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 之间。超支化共聚物可以包含一群具有不同形状和大小的分子。例如,超支化共聚物可以具有大于约1.1的多分散指数(PDI)。在另一个实施例中,超支化共聚物的PDI介于1.1与2之间。在另一个实施例中,PDI可以介于1.5与1.9之间。

[0227] 在若干实施例中,可以使用超支化结构的多分散指数来表征超支化结构。多分散指数(PDI)是给定聚合物样本中的分子量分布的量度。可以通过将重均分子量和数均分子量相除来计算PDI。在若干实施例中,超支化结构的PDI大于或等于约:1.05、1.1、1.2、1.3、1.5、1.7、1.8、1.9、2.0或包含和/或跨越上述值的范围。在若干实施例中,超支化结构的PDI大于或等于约1.89。在若干实施例中,超支化结构的多分散度(PDI)大于树状大分子的多分散度。在若干实施例中,如本文其它地方所公开的,还制备了第三代PAMAM(G3-PAMAM;理论分子量为 6909g mol^{-1})树状大分子,以独立于分子量研究结构对PAMAM支架性质的影响。测得的G3-PAMAM树状大分子的 M_w 为 $7.19 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$,PDI为1.04。

[0228] 在若干实施例中,相对于树状大分子并且在大约相同的分子量下,本文公开的超支化结构(例如,聚合物)含有更少的末端基团(例如,伯胺)。在若干实施例中,每 1000g/mol 分子量的超支化分子,所述超支化分子上的末端基团的数量小于或等于约:0.5、1、2、3、5或包含和/或跨越上述值的范围。在若干实施例中,相对于G3-PAMAM树状大分子(即,每个支架32个伯胺,约 $7,200 \text{g/mol}$),h-PAMAM聚合物含有更少的伯胺基团(每个支架~8个伯胺,约 $6,400 \text{g/mol}$)。这一结果基于两种材料之间的结构差异。如图1所示,h-PAMAM聚合物由树枝状单元、线性单元和末端单元构成。在若干实施例中,线性单元在聚合物结构中引起结构缺陷。在若干实施例中,线性单元的引入减少了外部伯胺的数量,同时增加了沿聚合物主链的仲胺。相反,在理论上应该是结构完美的树状大分子(例如,G3-PAMAM树状大分子)仅由树枝状单元和末端单元组成。因此,G3-PAMAM树状大分子没有线性单元,在本文所示的实例中,所述线性单元含有最适合用于结合N-二醇二氮烯鎓部分的仲胺。在若干实施例中,仲胺官能度对于形成稳定的N-二醇二氮烯鎓一氧化氮(NO)供体是必需的。与需要进行后续反应以在NO负载之前产生仲胺的PAMAM树状大分子不同,h-PAMAM聚合物能够与NO气体直接反应形成N-二醇二氮烯鎓,因为仲胺存在于沿聚合物主链的线性单元上。

[0229] 在一些实施例中,通过进一步修饰末端伯胺单元,甚至可以在超支化结构上进一步提高NO有效负荷。在一些实施例中,用一摩尔当量的含羟基化合物修饰h-PAMAM聚合物的伯胺(对于示例性h-PAMAM聚合物,每个支架具有~8个伯胺)。所使用的一种示例性化合物是环氧丙烷(PO),其是一种环氧化物,所述环氧化物在开环反应之后产生羟基官能团,从而产生本文所述的化合物h-PAMAM-PO-1。为了进行比较研究,相对于G3-PAMAM树状大分子(每个支架具有32个伯胺)的伯胺,用一摩尔当量的PO修饰了h-PAMAM聚合物和G3-PAMAM树状大分子,从而分别产生h-PAMAM-PO-2和G3-PAMAM-PO。以这种方式,可以控制外部修饰对h-PAMAM聚合物的NO释放性质(例如,有效负荷和释放动力学)的影响。

[0230] 若干实施例涉及一种向受试者递送一氧化氮的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的超支化结构。在若干实施例中,公开了一种治疗疾病状态的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的超支化结构,其中所述疾病状态选自由以下组成的组:牙龈炎、癌症、心血管疾病、微生物感染、由血液暴露于医疗装置而引起的血小板聚集和血小板粘附、由异常细胞增殖造成的病理状况、移植排斥、自身免疫性疾病、炎症、血管疾病、

瘢痕组织、伤口收缩、再狭窄、疼痛、发烧、胃肠道疾病、呼吸系统疾病、性功能障碍和性传播疾病。

[0231] 在一些实施例中,在治疗患者的方法和/或杀死细菌的方法中采用了本文公开的超支化结构(例如,作为抗微生物剂)。本文还提供了用于向受试者递送一氧化氮的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文公开的任何一种官能化的超支化结构。本文还提供了治疗疾病状态的方法,在若干实施例中,所述方法包括向需要治疗的受试者施用有效量的本文公开的任何一种官能化的超支化结构,其中所述疾病状态选自由以下组成的组:癌症、心血管疾病、微生物感染;由血液暴露于医疗装置而引起的血小板聚集和血小板粘附;由细胞增殖异常造成的病理状况;移植排斥、自身免疫性疾病、炎症、血管疾病;瘢痕组织;伤口收缩、再狭窄、疼痛、发热、胃肠道病症、呼吸系统病症、性功能障碍和性传播疾病。在若干实施例中,疾病状态是微生物感染。在若干实施例中,疾病状态是龋齿或另一种口腔疾病(牙龈炎、牙周炎等)。

[0232] 在若干实施例中,本文提供了一种减少表面上的微生物负荷的方法,所述方法包括将化合物施加到被多种微生物污染的表面,其中所述化合物包括释放一氧化氮(NO)的超支化结构,所述官能化的超支化结构包括NO供体,其中所述NO供体产生NO并诱发对微生物DNA和膜结构的氧化和/或亚硝化损伤,从而减少微生物负荷,并且其中所述多种微生物包括以下中的两种或更多种:革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、真菌、酵母和病毒。在若干实施例中,所述表面是有机表面。在若干实施例中,所述表面是人类皮肤或黏膜表面。在若干实施例中,施加所述化合物未诱发皮肤刺激或黏膜刺激。在若干实施例中,所述表面是动物皮肤。在若干实施例中,所述表面位于人或动物的口腔或周围组织中。在若干实施例中,施加所述化合物未诱发皮肤刺激或口腔或周围组织刺激。在若干实施例中,所述表面是人气道组织。在若干实施例中,施加所述化合物(例如,吸入)未诱发光道上皮细胞刺激。在若干实施例中,所述表面是无机表面。在若干实施例中,所述无机表面是医疗装置的外表面或内表面。在若干实施例中,所述医疗装置是牙科工具。在若干实施例中,施用所述化合物在医疗装置的外表面或内表面上生成抗微生物涂层。在若干实施例中,所述医疗装置包括内窥镜、牙钻或其它牙科装置、牙科植入物或牙科固定器。

[0233] 在若干实施例中,待减少和/或消除的微生物负荷包括耐药细菌。在若干实施例中,所述耐药细菌包括耐碳青霉烯(carbapenem)的肠杆菌科(Enterobacteriaceae)。在若干实施例中,所述耐药细菌包括耐甲氧西林(Methicillin)的金黄色葡萄球菌。在若干实施例中,微生物包括人免疫缺陷病毒、单纯疱疹病毒、乳头状瘤病毒、副流感病毒、流感、肝炎、柯萨奇病毒(Coxsackie Virus)、带状疱疹、麻疹、腮腺炎、风疹、狂犬病、肺炎、出血性病毒性发热、H1N1等、朊病毒、寄生虫、真菌、霉菌、酵母和细菌(革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌两者),除其它之外,所述细菌包含白色念珠菌(*Candida albicans*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、大肠杆菌(*E.coli*)、铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)以及金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)、A组链球菌(Group A streptococci)、肺炎链球菌(*S.pneumoniae*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、志贺氏杆菌(*Shigella*)、牙龈卟啉单胞菌、放线共生放线杆菌、粘性放线菌和/或变形链球菌以及各种耐药细菌。术语微生物(microorganism)和微生物(microbe)应当可互换地使用。微生物可以包含野生型生物、基因工程化生物或经过修饰的

生物。在若干实施例中，本文公开的调配物和方法用于如口腔黏膜等表面的局部使用或治疗。

[0234] 在若干实施例中，提供了一种治疗和/或预防微生物感染和/或增殖的方法，所述方法包括使表面（所述表面被多种微生物感染或易受感染，例如，口腔）与包括释放一氧化氮（NO）的超支化结构的化合物接触，所述官能化的超支化结构包括NO供体，其中所述NO供体产生NO并诱发对微生物的膜和/或DNA的损伤，从而减少可存活微生物的数量并治疗和/或预防感染或入侵，并且其中所述多种微生物包括以下中的一种或多种：病毒、革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、耐药细菌、霉菌、酵母、真菌及其组合。

[0235] 在若干实施例中，所述方法和用途采用了本文公开的化合物，所述化合物被调配用于经由局部途径、口腔施用、口腔-局部（例如，口腔灌洗剂、漱口水、液体、固体、凝胶、糊剂等）、经由冲洗（如牙科冲洗）、经由注射、经由喷雾、经由固体长效剂、经由摄入或经由吸入进行施用。在若干实施例中，使用条带或其它底物来施用调配物。在一些实施例中，条带由聚合物制成，所述聚合物包含但不限于聚乙烯。在若干实施例中，途径是局部的，并且NO释放型超支化结构的方法和用途用于治疗牙科病原体（例如，牙龈卟啉单胞菌、放线共生放线杆菌、变形链球菌和粘性放线菌中的一种或多种）。在若干实施例中，NO释放型超支化结构基本上不损害人细胞，包含牙龈成纤维细胞、口腔黏膜上皮细胞或口腔中或口腔周围的其它细胞。

[0236] 在若干实施例中，所述方法涉及施用包括本文公开的超支化结构的组合物。在若干实施例中，用于所公开的方法的组合物可以采取如油性或水性媒剂中的悬浮液、溶液或乳液等形式，并且可以含有调配剂，如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。可替代地，活性成分可以呈粉末形式，用于在使用之前与合适的媒剂（例如，无菌的无热原水）一起配制。

[0237] 举例来说，超支化共聚物可以是水溶性的，例如，超支化共聚物可以以大于约1mg/mL、约10mg/mL、约20mg/mL、约50mg/mL或约100mg/mL的水平溶于水中。

[0238] 在若干实施例中，治疗组合物可以存在于单位剂量或多剂量容器（例如密封的安瓿瓶和小瓶）中，并且可以在仅需要在使用前立即添加无菌液体载剂的冷冻干燥（冻干）条件下储存。

[0239] 在若干实施例中，对于口腔施用，组合物可以采取例如片剂或胶囊剂的形式，所述片剂或胶囊剂通过常规技术用药学上可接受的赋形剂（如粘合剂（例如，预糊化的玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素）；填充剂（例如，乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙）；润滑剂（例如，硬脂酸镁、滑石粉或二氧化硅）；崩解剂（例如，马铃薯淀粉或羟乙酸淀粉钠）；或润湿剂（例如，月桂基硫酸钠））制备。可以通过本领域已知的方法将片剂包衣。例如，可以将治疗剂与氢氯噻嗪组合配制，并制成具有肠溶或延迟释放包衣的pH稳定核，所述肠溶或延迟释放包衣可保护治疗剂直至其到达靶标器官。

[0240] 在若干实施例中，用于口腔施用的液体调配物可以采用例如溶液、糖浆或悬浮液的形式，或者所述液体调配物可以作为干燥产品存在，用于在使用之前与水或其它合适的载剂一起配制。此类液体调配物可以通过常规技术用药学上可接受的添加剂（如助悬剂（例如，山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪）；乳化剂（例如，卵磷脂或阿拉伯胶）；非水性媒剂（例如，杏仁油、油性酯、乙醇或分馏的植物油）；和防腐剂（例如，对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸））制备。所述调配物还可以适当地含有缓冲盐、调味剂、着

色剂和甜味剂。可以适当地配制用于口腔施用的调配物以实现活性化合物的受控释放。对于经颊施用,组合物可以采取以常规方式配制的片剂或锭剂的形式。

[0241] 在若干实施例中,也可以将所公开的化合物配制成用于植入或注射的调配物。因此,例如,可以用合适的聚合或疏水材料(例如,作为可接受的油中的乳液)或离子交换树脂来配制化合物,或将化合物配制为微溶的衍生物(例如,作为微溶的盐)。还可以将化合物配制成直肠用组合物(例如,含有常规栓剂基质(如可可脂或其它甘油酯)的栓剂或保留灌肠剂)、乳膏剂或洗剂或透皮贴剂。

[0242] 还提供了适于通过吸入以气雾剂形式施用的药物调配物。在若干实施例中,本文所述的超支化结构被配制成溶液和/或气雾剂的形式。在若干实施例中,这些调配物包括本文所述的NO释放型超支化结构(例如,聚酰胺胺)的溶液或悬浮液。在若干实施例中,可以将期望的调配物置于小室中并雾化。可以通过压缩空气或通过超声能完成雾化,从而形成包括NO释放型超支化聚酰胺胺的多个液滴或固体颗粒。例如,可以通过吸入施用当前公开的NO释放型超支化聚酰胺胺,以治疗与囊性纤维化有关的细菌感染。与囊性纤维化相关的细菌感染包含但不限于嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas*)、鸟胞内分支杆菌(*Mycobacterium avium intracellulare*)和脓肿分枝杆菌(*M. abscessus*)、洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)以及铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)感染。

[0243] 在若干实施例中,本文公开的超支化结构由沿超支化结构的链长或臂和/或位于超支化结构的链长或臂内的树枝状单元、线性单元和末端单元构成(如图1所示)。在一些实施例中,沿超支化结构的线性单元和/或链提供仲胺作为用于添加NO供体部分的潜在反应性位点。N-二醇二氮烯鎓NO供体。

[0244] 在一些实施例中,供NO超支化结构包括例如在超支化结构内沿链长或臂装饰超支化结构的供NO取代基,如图1所示。

[0245] 在另外的实施例中,本公开内容描述了一种制备聚酰胺胺组合物的方法,所述方法包括以下步骤中的一个或多个步骤:将多官能胺与丙烯酸酯单体混合(例如,在适当的溶剂中混合,从而形成反应混合物);将所述反应混合物混合足够长的时间,以使很大一部分多官能胺与丙烯酸酯单体反应,从而形成超支化共聚物;加热所述反应混合物,以完成聚合并除去未反应的单体,从而形成基础聚酰胺胺组合物;以及在碱性条件下将所述基础聚酰胺胺组合物与高压下的气态NO混合足够长的时间,以在所述聚酰胺胺组合物上产生N-二醇二氮烯鎓部分。在若干实施例中,足以使很大一部分多官能胺反应的时间大于或等于约:6小时、12小时、1天、3天、5天、1周、2周或包含和/或跨越上述值的范围。

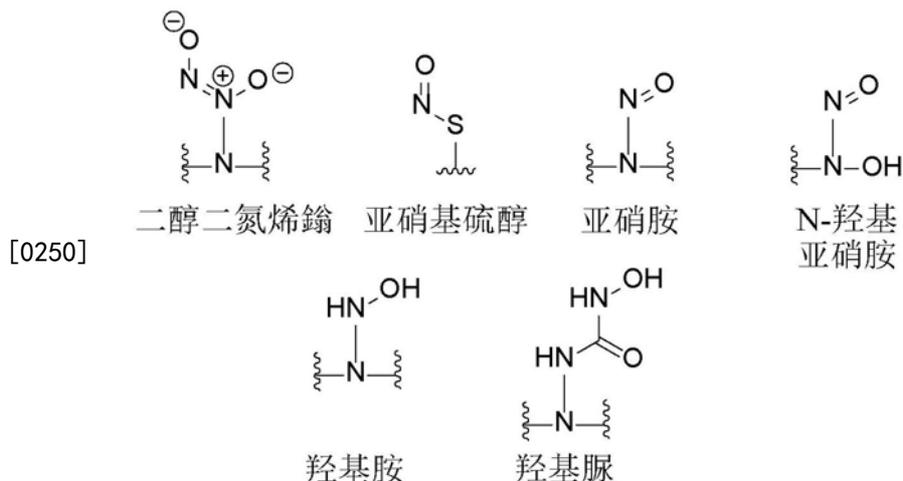
[0246] 在若干实施例中,加热所述反应以完成聚合并除去未反应的单体包含在低于大气压的压力下加热。在另一个实施例中,加热所述反应混合物以完成聚合并除去未反应的单体包含:加热至约50°C到约70°C的第一温度,持续约30分钟到约2小时的第一时间;加热至约90°C到约110°C的第二温度,持续约30分钟到约4小时的第二时间;加热至约120°C到约150°C的第三温度,持续约30分钟到约4小时的第三时间。在又一个实施例中,加热所述反应混合物以完成聚合并除去未反应的单体包含:加热至约60°C到约60°C的第一温度,持续约1小时的第一时间;加热至约100°C的第二温度,持续约2小时的第二时间;加热至约140°C的第三温度,持续约2小时的第三时间。

[0247] 在一些实施例中,使用亲电子聚合剂来制备超支化结构。在一些实施例中,所述亲

电子试剂包括充当亲电体的一种或多种迈克尔受体(例如, α,β 不饱和羰基化合物、烯醇盐等)。在一些实施例中,聚合剂包括一个或多个丙烯酸酯官能团。在一些实施例中,迈克尔受体是丙烯酸酯。在一些实施例中,聚合剂是二丙烯酸酯(例如, N,N' -亚甲基双(丙烯酰胺)、乙二醇二丙烯酸酯、丙二醇二丙烯酸酯、丁二醇二丙烯酸酯等)、三丙烯酸酯(例如,三羟甲基丙烷三丙烯酸酯、季戊四醇三丙烯酸酯、季戊四醇三丙烯酸酯、甘油丙氧基化物(1PO/OH)三丙烯酸酯、三羟甲基丙烷丙氧基化物三丙烯酸酯等)、四丙烯酸酯或具有多个丙烯酸酯基团(例如,5个、6个、7个或更多个)的另一种丙烯酸酯。

[0248] 在一些实施例中,在与亲核体单元聚合后,一个或多个超支化结构可以包括未反应的末端基团。在一些实施例中,使用开环以提供羟基的环氧化物对末端基团进行封端。在一些实施例中,封端剂是以下中的一种或多种:环氧乙烷、缩水甘油、环氧丙烷、2,3-环氧丙酸乙酯、2-甲基缩水甘油酸甲酯、乙基缩水甘油醚等。在一些实施例中,所得的末端基团包括任选经取代的单-烷基胺基。在一些实施例中,任选经取代的单-烷基胺基是 $-NH(C_1-C_6$ 烷基),其中 C_1-C_6 烷基在沿烷基链的任何地方被至少一个 $-OH$ 取代(由环氧开环导致),并且任选地被 C_1-C_6 烷基或聚醚取代。在一些实施例中,可以通过使超支化结构与胺封端剂进一步反应来对所述末端基团进行封端。在一些实施例中,封端剂包括以下中的一个或多个: $H_2N-((CH_2)_aNH)_b-H$ 、 $H_2N-((CH_2)_aNH)_b-(CH_2)_cH$ 、 $H_2N-((CH_2)_aX^a)_b-(CH_2)_cH$ 、 $HX^a-((CH_2)_aX^b)_b((CH_2)_cX^c)_d(CH_2)_eH$ 、 $-((CH_2)_aNH)_b-$ 、 $-((CH_2)_aNH)_b-(CH_2)_cX^a$ 、 $-((CH_2)_aX^a)_b-(CH_2)_cX^b$ 和 $-((CH_2)_aX^a)_b((CH_2)_cX^b)_d-(CH_2)_e-X^c$,其中 a,b,c,d 或 e 的每个实例独立地选自0到10的整数(例如,0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10)。在若干实施例中, X^a,X^b 和 X^c 的每个实例独立地选自O、S或NH。在一些实施例中,封端剂是 $H_2NCH_2CH_2NH_2$ 和 $H_2NCH_2CH_2OH$ 中的一个或多个。在一些实施例中,封端剂产生选自以下中的一个或多个的取代基: $-NH-((CH_2)_aNH)_b-H$ 、 $-NH-((CH_2)_aNH)_b-(CH_2)_cH$ 、 $-NH-((CH_2)_aX^a)_b-(CH_2)_cH$ 、 $((CH_2)_aX^b)_b((CH_2)_cX^c)_d-(CH_2)_eH$ 、 $-((CH_2)_aNH)_b-$ 、 $-((CH_2)_aNH)_b-(CH_2)_cX^a$ 、 $-((CH_2)_aX^b)_b-(CH_2)_cX^b$ 和 $-((CH_2)_aX^a)_b((CH_2)_cX^b)_d-(CH_2)_e-X^c$ 。在一些实施例中,封端剂产生选自 $-NHCH_2CH_2NH_2$ 和 $-NHCH_2CH_2OH$ 中的一个或多个的取代基。

[0249] 在一些实施例中,NO供体包括以下一氧化氮释放部分中的任何一个:



[0251] 其中“ ξ ”表示与超支化结构内的其它原子(例如, $-H$ 、 $-CH_2-$ 、 $-CH-$ 等的任何实例)的附接。在一些实施例中,NO供体是N-二醇二氮烯鎓NO供体。在一些实施例中,NO供体沿着线性单元附接。

[0252] 在一些实施例中,在碱性(basic/alkaline)条件下进行超支化结构与NO的反应。在一些实施例中,碱性条件包含pH值等于或至少约为:7.5、8.0、9.0、10.0、12.0或包含和/或跨越上述值的范围的条件。

[0253] 在一些实施例中,本文公开的方法提供了NO释放型超支化结构,其NO储存容量(以 $\mu\text{mol NO/mg}$ 超支化结构计)大于或等于约:0.25、0.4、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0或包含和/或跨越上述值的范围。在一些实施例中,在如实例中所述添加到PBS缓冲溶液中的2小时内,所述NO释放型超支化结构按其结合的NO的总wt%计释放大于或等于约:25%、50%、75%、85%、90%、95%、100%或包含和/或跨越上述值的范围的NO。在若干实施例中,用于减少或消除生物膜的NO释放以相似的量发生,例如,按结合的NO的总wt%计,约20-25%、约30-50%、约60-75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、包含和/或跨越上述值的范围。

[0254] 在一些实施例中,NO释放可以在以下时间段内发生:约0.01小时、0.1小时、0.25小时、0.5小时、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、10小时、15小时、20小时、24小时、36小时、48小时或60小时。在一些实施例中,发生NO释放的时间段小于或等于约:0.01小时、0.1小时、0.25小时、0.5小时、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、10小时、15小时、20小时、24小时、36小时、48小时、60小时或包含和/或跨越上述值的范围。在一些实施例中,在NO释放期间不存在亚硝胺。如本文所用的,短语“不存在亚硝胺”是指如通过UV-vis光谱(或通过本领域中其它可接受的方法)所确定的不可检测的亚硝胺水平。

[0255] 在一些实施例中,所公开的官能化的NO释放型超支化结构具有抗微生物活性。在一些实施例中,在静态条件下进行的细菌生存力测定中,针对铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、牙龈卟啉单胞菌、放线共生放线杆菌、粘性放线菌和/或变形链球菌中的一种或多种,所公开的官能化的NO释放型超支化结构在2小时内提供了大于或等于90%的细菌减少,聚合物浓度等于或小于约:8mg/mL、6mg/mL、4mg/mL、2mg/mL、1mg/mL、0.5mg/mL或包含和/或跨越上述值的范围。在一些实施例中,在静态条件下进行的细菌生存力测定中,针对革兰氏阳性细菌,所公开的官能化的NO释放型超支化结构在2小时内提供了大于或等于99%的细菌减少,聚合物浓度等于或小于约:8mg/mL、6mg/mL、4mg/mL、2mg/mL、1mg/mL、0.5mg/mL或包含和/或跨越上述值的范围。在一些实施例中,在静态条件下进行的细菌生存力测定中,针对革兰氏阴性细菌,所公开的官能化的NO释放型超支化结构在2小时内提供了大于或等于99%的细菌减少,聚合物浓度等于或小于约:8mg/mL、6mg/mL、4mg/mL、2mg/mL、1mg/mL、0.5mg/mL或包含和/或跨越上述值的范围。在若干实施例中,细菌减少大于95%、大于98%或大于99%。

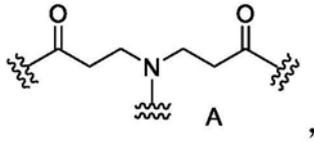
[0256] 一些实施例涉及通过向细菌和/或微生物施用供NO的超支化结构来杀死所述细菌和/或微生物的方法。在一些实施例中,细菌是牙科细菌。在一些实施例中,所公开的化合物可以用于预防蛀牙的方法。

[0257] 在一些实施例中,本文公开的超支化结构缺乏核心(例如,树突源自所述核心)。在一些实施例中,本文公开的超支化结构缺少乙二胺核心。在一些实施例中,本文公开的超支化结构缺乏鼓起一个或多个树突的乙二胺核心。在一些实施例中,本文公开的超支化结构缺乏完美的、接近完美的对称性,缺乏对称平面或轴和/或缺乏对称性。在一些实施例中,本文公开的超支化结构缺乏借助于逐步合成而产生的重复性结构单元。

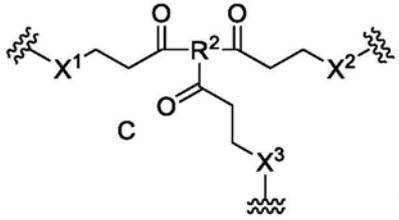
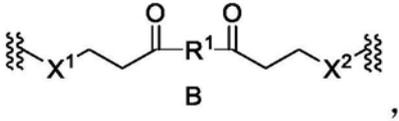
[0258] 本文描述的主题针对以下实施例:

[0259] 1. 一种超支化的供一氧化氮(NO)化合物,其包括:

[0260] 连接基团,所述连接基团包括式A、B、C或D中的任何一个或多个:

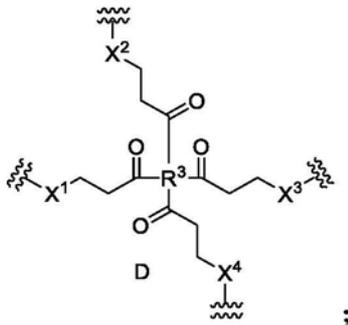


[0261]



或

[0262]



[0263] 其中,“”表示与所述超支化供NO化合物的另一部分的附接;

[0264] X^1 、 X^2 、 X^3 和 X^4 独立地选自-NH-、-N(R_a)-、-O-和-S-组成的组;

[0265] 其中 R_a 的每个实例选自供NO部分、-H、任选经取代的 C_1 - C_6 烷基或具有1到6个重复单元的任选经取代的聚醚;

[0266] R^1 、 R^2 和 R^3 独立地选自自由- R_b N(R_c) R_d - ($N(R_c)$) $_n$ - R_b -、- R_b (OR_d) $_n$ O- R_b -和 C_1 - C_6 烷基组成的组;

[0267] 其中 R_c 的每个实例独立地选自供NO部分、-H、任选经取代的 C_1 - C_6 烷基或具有1到6个重复单元的任选经取代的聚醚;

[0268] 其中 R_b 是单键或任选经取代的 C_1 - C_6 亚烷基;

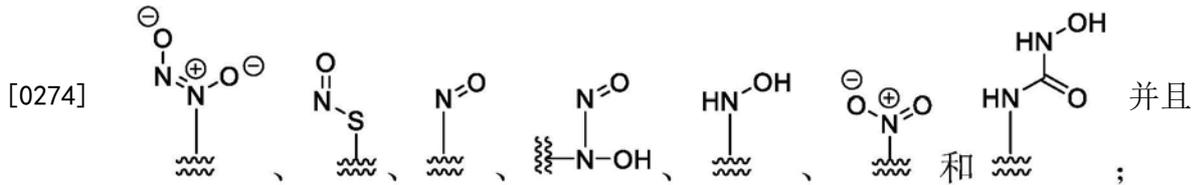
[0269] 其中 R_d 是任选经取代的 C_1 - C_6 亚烷基;

[0270] 其中n是选自0、1、2、3、4、5或6的整数;

[0271] 其中,在存在 R^2 的情况下, R_d 的至少一个实例包括-C(O)-(CH₂)₂- X^3 -基团;

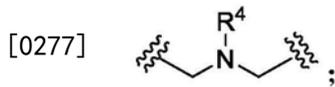
[0272] 其中,在存在 R^3 的情况下, R_d 的至少一个实例包括-C(O)-(CH₂)₂- X^3 -基团,并且 R_d 的至少一个实例包括-C(O)-(CH₂)₂- X^4 -基团;

[0273] 其中所述超支化化合物包括以下供NO部分中的至少一个:



[0275] 其中所述超支化化合物不包括氨基糖苷或糖苷单元。

[0276] 2. 根据实施例1所述的超支化供NO化合物,其进一步包括以下结构的至少一个实例:



[0278] 其中R⁴是-N⁺(=N-O)O⁻。

[0279] 3. 根据任何上述实施例所述的超支化供NO化合物,其中所述连接基团包括式A。

[0280] 4. 根据任何上述实施例所述的超支化供NO化合物,其中所述连接基团包括式B,其中:

[0281] R¹是-R_bN(R_c)R_d-(N(R_c))_n-R_b-;

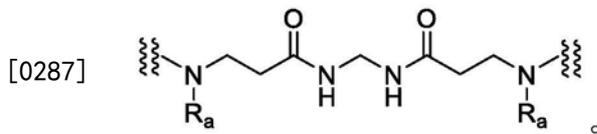
[0282] n是1;

[0283] R_d是-CH₂-;

[0284] R_b是单键;并且

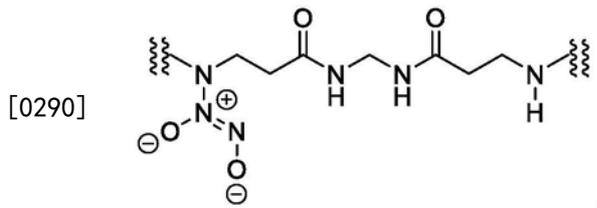
[0285] 每个R_c是H。

[0286] 5. 根据实施例4所述的超支化供NO化合物,其中式B的连接基团由以下结构表示:

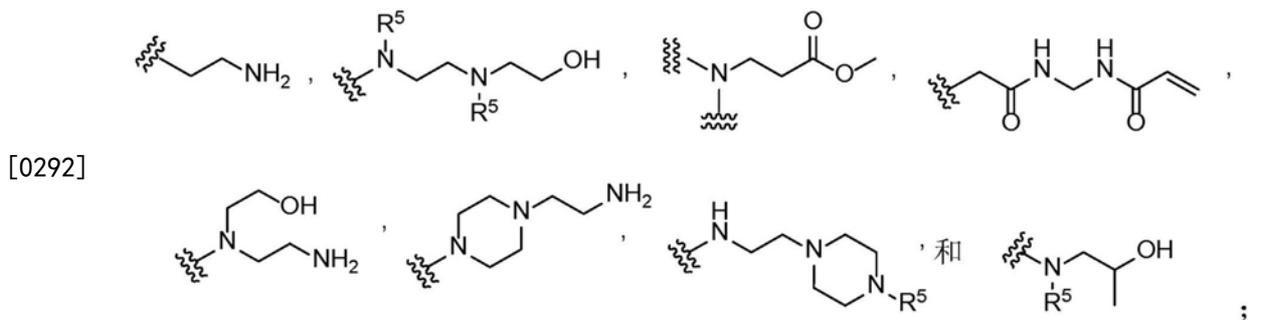


[0288] 6. 根据实施例5所述的超支化供NO化合物,其中R_a的每个实例为供NO部分或-H。

[0289] 7. 根据实施例6所述的超支化供NO化合物,其中式A的连接基团由以下结构表示:

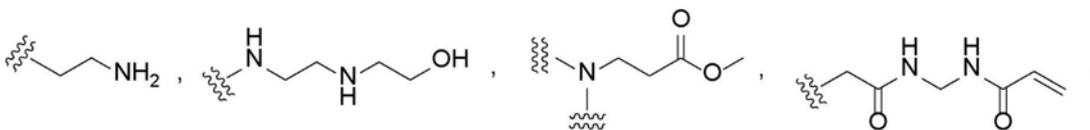


[0291] 8. 根据任何上述实施例所述的超支化供NO化合物,其进一步包括选自由以下组成的组的端基:

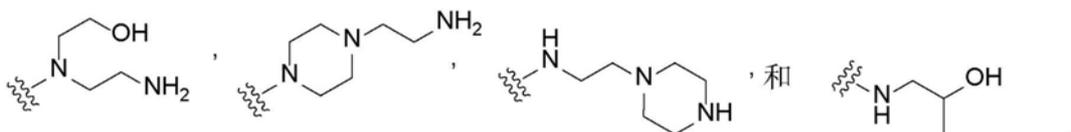


[0293] 其中R⁵的每个实例为H或-N⁺(=N-O⁻)O⁻。

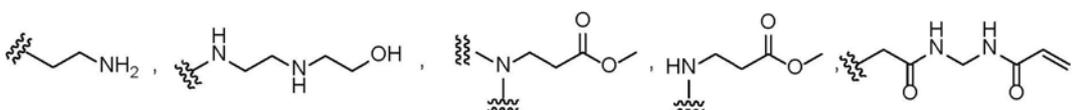
[0294] 9. 根据任何上述实施例所述的超支化供NO化合物,其进一步包括选自由以下组成的组的端基:



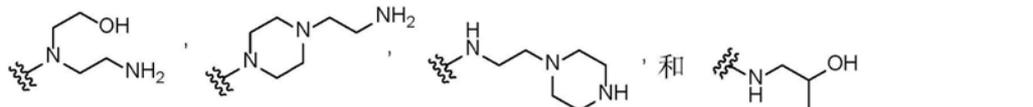
[0295]



[0296] 10. 根据任何上述实施例所述的超支化结构,其进一步包括以下基团中的一个或多个:



[0297]

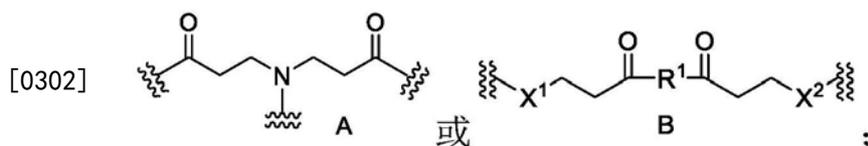


[0298] 11. 根据任何上述实施例所述的超支化结构,其中所述超支化结构缺乏具有任何对称树突的树枝状核心。

[0299] 12. 根据任何上述实施例所述的超支化结构,其中任选的取代基的每个实例选自C₁-C₆烷基或-OH。

[0300] 13. 一种超支化的供一氧化氮(NO)化合物,其包括:

[0301] 式A或式B的连接基团:



[0302] 其中

[0303] “”表示与所述超支化供NO化合物的另一部分的衔接;

[0304] X¹和X²独立地选自由-NH-、-N(R_a)-、-O-和-S-组成的组;

[0305] 其中R_a的每个实例选自供NO部分或-H;

[0306] R¹独立地选自由-N(R_c)R_d-N(R_c)-、-R_b(OR_d)_n-R_b-和C₁-C₆烷基组成的组;

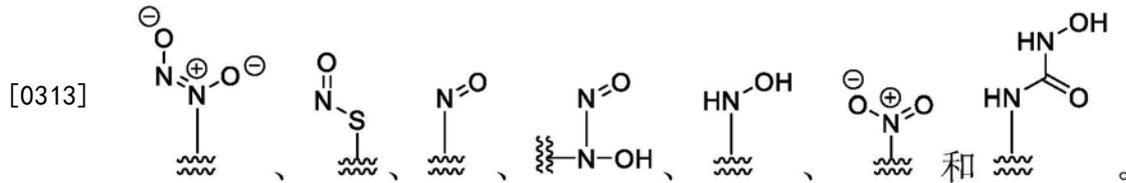
[0307] 其中R_c的每个实例独立地选自供NO部分或-H、任选经取代的C₁-C₆烷基或具有1到6个重复单元的任选经取代的聚醚;

[0308] 其中R_b是单键或任选经取代的C₁-C₆亚烷基;

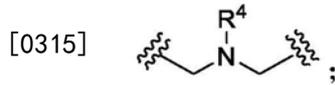
[0309] 其中R_d是-CH₂-或-CH₂-CH₂-;

[0310] 其中n是选自0、1、2、3、4、5或6的整数;并且

[0311] 其中所述超支化化合物包括以下供NO部分中的至少一个:



[0314] 14. 根据实施例13所述的超支化供NO化合物,其进一步包括以下结构的至少一个实例:



[0316] 其中R⁴是-N⁺(=N-O⁻)O⁻。

[0317] 15. 根据实施例13到14中任一项所述的超支化供NO化合物,其包括式A。

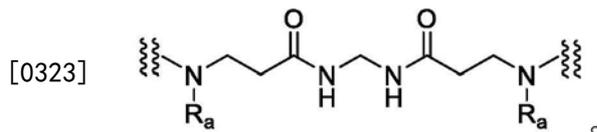
[0318] 16. 根据实施例13到15中任一项所述的超支化供NO化合物,其包括式B,其中:

[0319] R¹是-N(R_c)R_d-N(R_c)-;

[0320] R_d是-CH₂-;并且

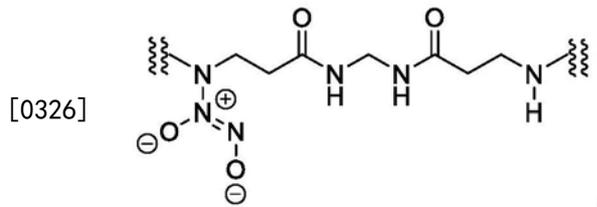
[0321] 每个R_c是H。

[0322] 17. 根据实施例13到16中任一项所述的超支化供NO化合物,其包括由以下结构表示的连接基团:

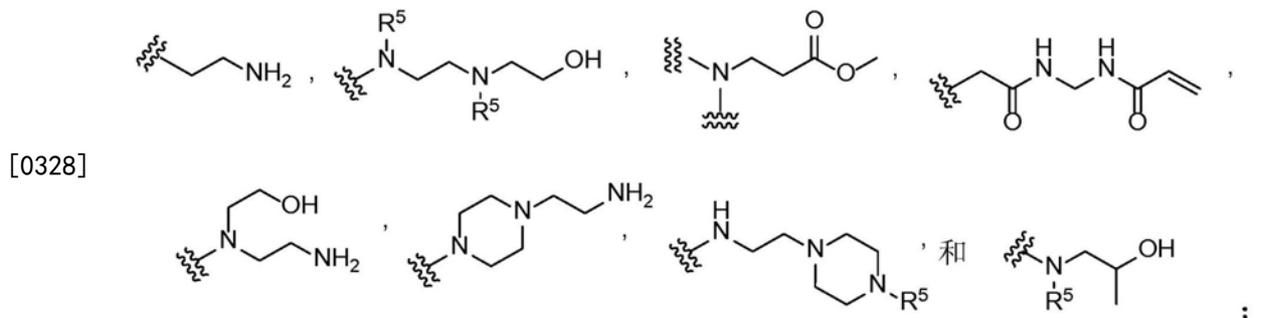


[0324] 18. 根据实施例17所述的超支化供NO化合物,其中R_a的每个实例为供NO部分或-H。

[0325] 19. 根据实施例18所述的超支化供NO化合物,其中式A的连接基团由以下结构表示:



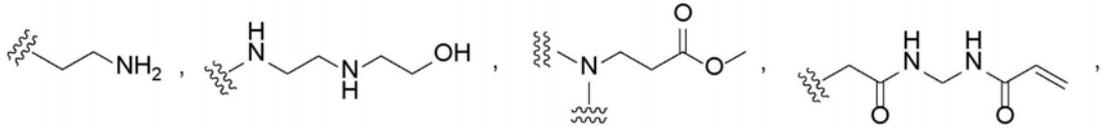
[0327] 20. 根据实施例13到19中任一项所述的超支化供NO化合物,其进一步包括选自由以下组成的组的端基:



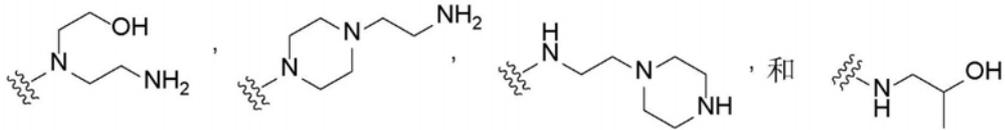
[0329] 其中R⁵的每个实例为H或-N⁺(=N-O⁻)O⁻。

[0330] 21. 根据实施例13到20中任一项所述的超支化供NO化合物,其进一步包括选自由

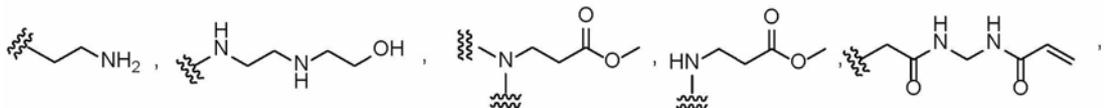
以下组成的组的端基：



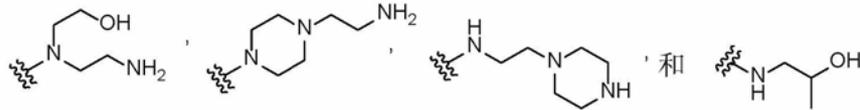
[0331]



[0332] 22. 根据实施例13到21中任一项所述的超支化供NO化合物,其进一步包括以下基团中的一个或多个:



[0333]



[0334] 23. 根据实施例13到22中任一项所述的超支化供NO化合物,其中所述超支化结构缺乏具有任何对称树突的树枝状核心。

[0335] 24. 根据实施例13到23中任一项所述的超支化供NO化合物,其中所述超支化化合物不包括氨基糖苷或糖苷单元。

[0336] 25. 根据实施例13到24中任一项所述的超支化供NO化合物,其中任选的取代基的每个实例选自C₁-C₆烷基或-OH。

[0337] 26. 根据实施例1到25中任一项所述的超支化供NO化合物,其中所述超支化化合物包含树枝状单元、线性单元和末端单元,所述树枝状单元包括叔胺,所述线性单元包括仲胺,并且所述末端单元包括伯胺。

[0338] 27. 根据实施例1到26中任一项所述的超支化供NO化合物,其中所述N-二醇二氮烯鎓表现出与所述末端单元的所述伯胺的分子内氢键合。

[0339] 28. 根据实施例1到27中任一项所述的超支化供NO化合物,其中所述胺中被所述N-二醇二氮烯鎓部分修饰的所述部分是仲胺。

[0340] 29. 根据实施例1到28中任一项所述的超支化供NO化合物,其中所述化合物包括至少约2%重量的NO。

[0341] 30. 根据实施例1到29中任一项所述的超支化供NO化合物,其中如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时NO释放所测量的,所述组合物包括每mg化合物至少约1 μ mol的NO。

[0342] 31. 根据实施例1到30中任一项所述的超支化供NO化合物,其中如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时NO释放所测量的,所述化合物包括每mg化合物至少约2 μ mol的NO。

[0343] 32. 根据实施例1到31中任一项所述的超支化供NO化合物,其中如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时NO释放所测量的,所述组合物包括每mg共聚物大于约2 μ mol的NO。

[0344] 33. 根据实施例1到32中任一项所述的超支化供NO化合物,其中所述化合物包含羟基部分。

[0345] 34. 根据实施例33所述的超支化供NO化合物,其中所述羟基部分通过烷基部分连接到胺部分,使得所述胺部分为仲胺。

[0346] 35. 根据实施例1到34中任一项所述的超支化供NO化合物,其中如使用多角度光散射(SEC-MALS)检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的,所述超支化化合物具有介于约 $2 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 与约 $15 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 之间的重均分子量(MW)。

[0347] 36. 根据实施例1到34中任一项所述的超支化供NO化合物,如使用多角度光散射(SEC-MALS)检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的,所述超支化化合物具有介于约 $3 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 与约 $10 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 之间的重均分子量(MW)。

[0348] 37. 根据实施例1到36中任一项所述的超支化供NO化合物,其中如使用多角度光散射(SEC-MALS)检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的,所述超支化化合物具有介于约 $3 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 与约 $6 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 之间的重均分子量(MW)。

[0349] 38. 一种用于制备根据实施例1到37中任一项所述的超支化供NO化合物的方法,所述方法包括:

[0350] 使丙烯酸酯与亲核试剂接触以形成超支化化合物。

[0351] 39. 根据实施例38所述的方法,其中所述丙烯酸酯是单丙烯酸酯、二丙烯酸酯、三丙烯酸酯或四丙烯酸酯。

[0352] 40. 根据实施例38或39所述的方法,其中所述亲核试剂是双功能分子、三功能分子或四功能分子。

[0353] 41. 根据实施例38到40中任一项所述的方法,其中所述亲核试剂包括 $\text{H-R}_h\text{N}(\text{R}_e)\text{R}_f\text{-(N}(\text{R}_e))_n\text{-(R}_g\text{O)-}_m\text{R}_h\text{-H}$;

[0354] 其中 R_e 的每个实例独立地为-H、任选经取代的 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基或具有1到6个重复单元的任选经取代的聚醚;

[0355] 其中 R_h 的每个实例是单键或任选经取代的 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 亚烷基;并且

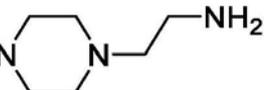
[0356] 其中 R_f 和 R_g 独立地为任选经取代的 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 亚烷基。

[0357] 42. 根据实施例38到41中任一项所述的方法,其中所述亲核试剂包括 $\text{H}_2\text{N-((CH}_2)_a\text{NH)}_b\text{-H}$ 、 $\text{H}_2\text{N-((CH}_2)_a\text{NH)}_b\text{-(CH}_2)_c\text{H}$ 、 $\text{H}_2\text{N-((CH}_2)_a\text{X}^5)_b\text{-(CH}_2)_c\text{H}$ 和 $\text{HX}^5\text{-((CH}_2)_a\text{X}^6)_b\text{((CH}_2)_c\text{X}^7)_d\text{-(CH}_2)_e\text{H}}$ 中的一个或多个;

[0358] 其中a、b、c、d或e的每个实例独立地选自从0到10的整数;并且

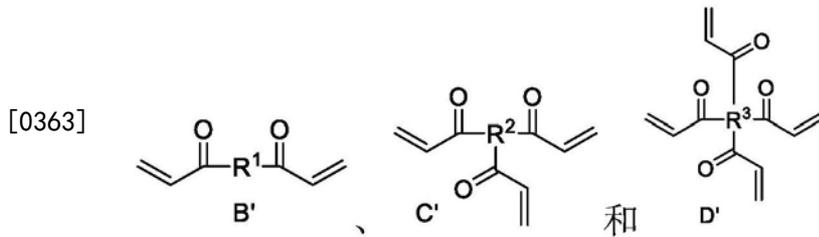
[0359] 其中 X^5 、 X^6 和 X^7 的每个实例独立地选自O、S或NH。

[0360] 43. 根据实施例38到42中任一项所述的方法,其中所述亲核试剂包括

$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 和  中的一个或多个。

[0361] 44. 根据实施例38到43中任一项所述的方法,其中所述丙烯酸酯包括以下中的一个或多个:N,N'-亚甲基双(丙烯酰胺)、乙二醇二丙烯酸酯、丙二醇二丙烯酸酯、丁二醇二丙烯酸酯、三羟甲基丙烷三丙烯酸酯、季戊四醇三丙烯酸酯、季戊四醇三丙烯酸酯、甘油丙氧基化物(1PO/OH)三丙烯酸酯或三羟甲基丙烷丙氧基化物三丙烯酸酯。

[0362] 45. 根据实施例38到44中任一项所述的方法,其中所述丙烯酸酯包括以下结构中的一个或多个:



[0364] 其中 R^1 、 R^2 和 R^3 独立地选自自由 $-R_bN(R_c)R_d-$ 、 $(N(R_c))_n-R_b-$ 、 $-R_b(OR_d)_nO-R_b-$ 和 C_1-C_6 烷基组成的组；

[0365] 其中 R_c 的每个实例独立地选自供NO部分、 $-H$ 、任选经取代的 C_1-C_6 烷基或具有1到6个重复单元的任选经取代的聚醚；

[0366] 其中 R_b 是单键或任选经取代的 C_1-C_6 亚烷基；

[0367] 其中 R_d 是任选经取代的 C_1-C_6 亚烷基；

[0368] 其中 n 是选自0、1、2、3、4、5或6的整数；

[0369] 其中，在存在 R^2 的情况下， R_d 的至少一个实例包括 $-C(O)-CH=CH_2$ 基团；

[0370] 其中，在存在 R^3 的情况下， R_d 的碳的至少一个实例包括 $-C(O)-CH=CH_2$ 基团。

[0371] 46. 根据实施例45所述的方法，其中所述丙烯酸酯是 N,N' -亚甲基双(丙烯酰胺)。

[0372] 47. 根据实施例38到46中任一项所述的方法，其进一步包括使所述超支化化合物暴露于NO源，以提供所述超支化供NO化合物。

[0373] 48. 根据实施例47所述的方法，其中在碱性条件下进行所述NO暴露步骤。

[0374] 49. 根据实施例38到48中任一项所述的方法，其中亲核体与丙烯酸酯的摩尔比介于约2:1与约5:1之间。

[0375] 50. 根据实施例38到48中任一项所述的方法，其中胺与丙烯酸酯的摩尔比介于约3:1与约4:1之间。

[0376] 51. 一种减少微生物污染的方法，其包括，

[0377] 使被多种微生物污染的表面与包括以下的化合物接触：

[0378] 根据实施例1到37中任一项所述的超支化供NO化合物；

[0379] 其中所述一氧化氮供体产生一氧化氮并诱发对所述微生物的膜和/或DNA的损伤，从而减少可存活微生物的数量。

[0380] 52. 根据实施例51所述的方法，其中所述多种微生物包括以下中的一种或多种：病毒、革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、耐药细菌、霉菌、酵母、真菌及其组合。

[0381] 53. 根据实施例51或52所述的方法，其中所述表面是有机表面。

[0382] 54. 根据实施例51到53中任一项所述的方法，其中所述表面是人类皮肤或动物皮肤。

[0383] 55. 根据实施例51到54中任一项所述的方法，其中所述表面位于口腔中。

[0384] 56. 根据实施例51到55中任一项所述的方法，其中所述施加未诱发皮肤刺激。

[0385] 57. 根据实施例51或52所述的方法，其中所述表面是无机表面。

[0386] 58. 根据实施例57所述的方法，其中所述无机表面是医疗装置的外表面或内表面。

[0387] 59. 根据实施例58所述的方法，其中所述装置的应用是牙科装置。

[0388] 60. 根据实施例51到59中任一项所述的方法，其中所述微生物负荷包括耐药细菌。

[0389] 61. 根据实施例51到60中任一项所述的方法，其中所述微生物负荷包括一种或多

种牙科病原体。

[0390] 62. 根据实施例51到61中任一项所述的方法,其中所述微生物负荷包括以下中的一种或多种:铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)、牙龈卟啉单胞菌(*P.gingivalis*)、放线共生放线杆菌(*A.actinomycetemcomitans*)、粘性放线菌(*A.viscosus*)和/或变形链球菌(*S.mutans*)。

[0391] 63. 一种治疗和/或预防龋齿的方法,所述方法包括:

[0392] 使被一种或多种牙科病原体污染的患者口腔表面与根据实施例1到37中任一项所述的化合物接触;

[0393] 其中所述一氧化氮供体产生一氧化氮并诱发对所述病原体的膜和/或DNA的损伤,从而减少可存活病原体的数量。

[0394] 64. 根据实施例63所述的方法,其中所述微生物负荷包括以下中的一种或多种:铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、牙龈卟啉单胞菌、放线共生放线杆菌、粘性放线菌和/或变形链球菌。

[0395] 65. 根据实施例1到37中任一项所述的化合物在制备用于减少微生物污染的药物中的用途,所述化合物包括,

[0396] 一氧化氮释放型超支化聚氨基糖苷;

[0397] 其中所述一氧化氮供体产生一氧化氮并诱发对所述微生物的膜和/或DNA的损伤,从而减少可存活微生物的数量。

[0398] 66. 根据实施例65所述的用途,其中所述化合物被配制成治疗多种微生物,所述多种微生物包括以下中的一种或多种:病毒、革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、耐药细菌、霉菌、酵母、真菌及其组合。

[0399] 67. 根据实施例65或66所述的用途,其中所述化合物被配制成递送至有机表面。

[0400] 68. 根据实施例65到67中任一项所述的用途,其中所述化合物被配制成递送至人类皮肤或动物皮肤。

[0401] 69. 根据实施例68所述的用途,其中所述表面位于口腔中。

[0402] 70. 根据实施例65到69中任一项所述的用途,其中所述化合物被配制成递送至无机表面。

[0403] 71. 根据实施例70所述的用途,其中所述表面是医疗装置的外表面或内表面。

[0404] 72. 根据实施例71所述的用途,其中所述装置是牙科装置。

[0405] 73. 一种聚酰胺胺组合物,其包括:

[0406] 胺和丙烯酸酯的超支化共聚物,其中所述胺的至少一部分被N-二醇二氮烯鎓部分修饰。

[0407] 74. 根据实施例73所述的聚酰胺胺组合物,其中所述超支化共聚物包含树枝状单元、线性单元和末端单元,所述树枝状单元包括叔胺,所述线性单元包括仲胺,并且所述末端单元包括伯胺。

[0408] 75. 根据实施例73或74所述的聚酰胺胺组合物,其中所述N-二醇二氮烯鎓表现出与所述末端单元的所述伯胺的分子内氢键合。

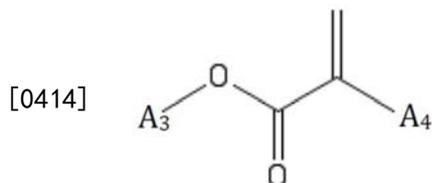
[0409] 76. 根据实施例73到75中任一项所述的聚酰胺胺组合物,其中所述胺中被所述N-二醇二氮烯鎓部分修饰的所述部分是仲胺。

[0410] 77. 根据实施例73到76中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述胺衍生自具有以下结构的多官能胺单体:

[0411] $\text{H}_2\text{N}-\text{A}_1-(\text{NH})-\text{A}_2-\text{NH}_2$

[0412] 其中 A_1 和 A_2 独立地选自烷基部分或氢。

[0413] 78. 根据实施例73到77中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述丙烯酸酯衍生自以下单体:



[0415] 其中 A_3 和 A_4 独立地选自烷基部分或氢。

[0416] 79. 根据实施例73到78中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述组合物包括至少约2%重量的NO。

[0417] 80. 根据实施例73到79中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时NO释放所测量的, 所述组合物包括每mg共聚物至少约 $1\mu\text{mol}$ 的NO。

[0418] 81. 根据实施例73到80中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时NO释放所测量的, 所述组合物包括每mg共聚物至少约 $2\mu\text{mol}$ 的NO。

[0419] 82. 根据实施例73到81中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时NO释放所测量的, 所述组合物包括每mg共聚物大于约 $2\mu\text{mol}$ 的NO。

[0420] 83. 根据实施例73到81中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述共聚物进一步包含羟基部分。

[0421] 84. 根据实施例83所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述羟基部分通过烷基部分连接到胺部分, 使得所述胺部分为仲胺。

[0422] 85. 根据实施例73到84中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中胺与丙烯酸酯的摩尔比介于约2:1与约5:1之间。

[0423] 86. 根据实施例73到85中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中胺与丙烯酸酯的摩尔比介于约3:1与约4:1之间。

[0424] 87. 根据实施例73到86中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中如使用多角度光散射 (SEC-MALS) 检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的, 所述超支化共聚物具有介于约 $2 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 与约 $15 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 之间的重均分子量 (MW)。

[0425] 88. 根据实施例73到87中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中如使用多角度光散射 (SEC-MALS) 检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的, 所述超支化共聚物具有介于约 $3 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 与约 $10 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 之间的重均分子量 (MW)。

[0426] 89. 根据实施例73到88中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中如使用多角度光散射 (SEC-MALS) 检测器通过尺寸排阻色谱法所确定的, 所述超支化共聚物具有介于约 $3 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 与约 $6 \times 10^3 \text{g mol}^{-1}$ 之间的重均分子量 (MW)。

[0427] 90. 根据实施例73到89中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中多官能胺和丙烯酸酯的超支化共聚物以大于约1mg/mL、约10mg/mL、约20mg/mL、约50mg/mL或约100mg/mL的水平溶于水中。

[0428] 91. 根据实施例73到90中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述丙烯酸酯衍生自选自以下的单体: 丙烯酸及其衍生物的盐、酯和共轭碱。

[0429] 92. 根据实施例73到91中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述丙烯酸酯衍生自单体甲基丙烯酸酯。

[0430] 93. 根据实施例73到92中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述丙烯酸酯衍生自选自自由以下组成的组的单体: 丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸甲酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酸乙酯、2-氯乙基乙烯基醚、丙烯酸2-乙基己酯、甲基丙烯酸羟乙酯、丙烯酸羟乙酯、丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸丁酯、N-(2-羟丙基) 甲基丙烯酰胺、N-(3-氨丙基) 甲基丙烯酰胺盐酸盐、N-(3-BOC-氨丙基) 甲基丙烯酰胺、甲基丙烯酸2-氨乙酯盐酸盐、甲基丙烯酸2-(叔丁基氨基) 乙酯、n-异丙基丙烯酰胺、丙烯酸2-甲氧基乙酯、n-乙基甲基丙烯酰胺、n-乙烯基乙酰胺、丙烯酸2-N-吗啉代乙酯、甲基丙烯酰基-L-赖氨酸、丙烯酸2-(甲基氨基) 乙酯和甲基丙烯酸2-(甲基氨基) 乙酯。

[0431] 94. 根据实施例73到93中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述丙烯酸酯衍生自二丙烯酸酯。

[0432] 95. 根据实施例94所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述二丙烯酸酯选自自由以下组成的组: 乙二醇二丙烯酸酯、三乙二醇二丙烯酸酯、四乙二醇二丙烯酸酯、聚乙二醇二丙烯酸酯、三环癸二甲醇二丙烯酸酯、N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺、N-(2-羟丙基) 甲基丙烯酰胺、双[2-(甲基丙烯酰氧基) 乙基] 磷酸酯、二丙烯酰胺和N,N'-亚甲基双丙烯酰胺。

[0433] 96. 根据实施例73到95中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述胺衍生自二亚乙基三胺。

[0434] 97. 根据实施例73到96中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述胺衍生自选自自由以下组成的组的单体: 乙二胺、二亚乙基三胺、三亚乙基四胺、四亚乙基五胺、五亚乙基六胺、聚醚胺(例如, JEFFAMINE®) 和双(六亚甲基) 三胺。

[0435] 98. 根据实施例73到97中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述超支化共聚物在释放NO时显示出与以下特性一致的特性: $^1\text{H NMR}$: (400MHz, CD_3OD , δ): 2.22-2.90 (COCH_2 、 NHCH_2 和 NH_2CH_2), 3.15-3.58 (CONCH_2), 3.60 (CH_3O)。 ^{13}C (600MHz, CD_3OD , δ): 30-60 (CH_2 和 CH_3), 170-175 ($\text{C}=\text{O}$)。 FTIR (cm^{-1}): 3308 (NH_2), 2957 (CH_2), 2848 (CH_2), 1647 ($\text{C}=\text{O}$) 和1556 (NH)。

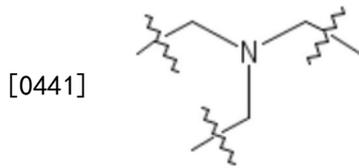
[0436] 99. 根据实施例73到98中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述超支化共聚物具有大于约1.1的多分散指数(PDI)。

[0437] 100. 根据实施例73到99中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述超支化共聚物的多分散指数(PDI) 介于1.1与2之间。

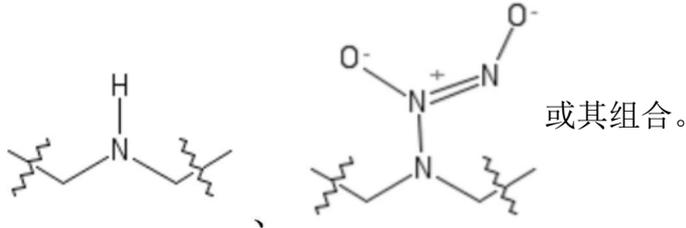
[0438] 101. 根据实施例73到100中任一项所述的聚酰胺胺组合物, 其中所述超支化共聚物的多分散指数(PDI) 介于1.5与1.9之间。

[0439] 102. 一种聚酰胺胺超支化共聚物, 其包括一个或多个包括一个或多个叔胺的树枝状单元、多个包括多个伯胺的末端单元和多个包括多个仲胺的线性单元, 其中所述多个仲胺中的至少一部分与多个N-二醇二氮烯鎓部分结合。

[0440] 103. 根据实施例102所述的聚酰胺胺超支化共聚物, 其中所述树枝状单元中的至少一部分包含以下结构:



[0442] 并且所述多个线性单元中的至少一部分包含选自以下结构的基团：



[0443] 104. 根据实施例102或103所述的聚酰胺胺超支化共聚物，其中通过所述N-二醇二氮烯鎓部分的氧与所述多个伯胺中的至少一个伯胺的氢之间的氢键合来稳定所述多个N-二醇二氮烯鎓部分的至少一部分。

[0444] 105. 一种向受试者递送一氧化氮的方法，其包括：

[0445] 向所述受试者施用有效量的根据前述权利要求中任一项所述的超支化化合物或聚酰胺胺组合物。

[0446] 106. 一种治疗疾病状态的方法，其包括：

[0447] 向有需要的受试者施用有效量的根据前述权利要求中任一项所述的超支化化合物或聚酰胺胺组合物，其中所述疾病状态选自由以下组成的组：牙龈炎、癌症、心血管疾病、微生物感染、由血液暴露于医疗装置而引起的血小板聚集和血小板粘附、由异常细胞增殖造成的病理状况、移植排斥、自身免疫性疾病、炎症、血管疾病、瘢痕组织、伤口收缩、再狭窄、疼痛、发烧、胃肠道疾病、呼吸系统疾病、性功能障碍和性传播疾病。

[0448] 107. 一种制备聚酰胺胺组合物的方法，其包括：

[0449] 将多官能胺与丙烯酸酯单体在适当的溶剂中混合，从而形成反应混合物；将所述反应混合物混合足够长的时间，以使很大一部分多官能胺与丙烯酸酯单体反应，从而形成超支化共聚物；加热所述反应混合物，以完成聚合并除去未反应的单体，从而形成基础聚酰胺胺组合物；以及在碱性条件下将所述基础聚酰胺胺组合物与高压下的气态NO混合足够长的时间，以在所述聚酰胺胺组合物上产生N-二醇二氮烯鎓部分。

[0450] 108. 根据实施例107所述的方法，其中足以使很大一部分多官能胺反应的时间大于约6小时、介于约6小时与约2周之间、介于约6小时与1周之间、介于约12小时与5天之间或介于约1天与约3天之间。

[0451] 109. 根据实施例107或108所述的方法，其中加热所述反应混合物以完成聚合并除去未反应的单体包含在低于大气压的压力下加热。

[0452] 110. 根据实施例107到109中任一项所述的方法，其中加热所述反应混合物以完成聚合并除去未反应的单体包含：加热至约50°C到约70°C的第一温度，持续约30分钟到约2小时的第一时间；加热至约90°C到约110°C的第二温度，持续约30分钟到约4小时的第二时间；加热至约120°C到约150°C的第三温度，持续约30分钟到约4小时的第三时间。

[0453] 111. 根据实施例107到110中任一项所述的方法，其中加热所述反应混合物以完成聚合并除去未反应的单体包含：加热至约60°C到约60°C的第一温度，持续约1小时的第一时

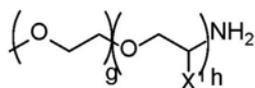
间;加热至约100℃的第二温度,持续约2小时的第二时间;加热至约140℃的第三温度,持续约2小时的第三时间。

[0454] 112. 根据实施例107到111中任一项所述的方法,其中所述多官能胺选自由以下组成的组:乙二胺、二亚乙基三胺、三亚乙基四胺、四亚乙基五胺、五亚乙基六胺、聚醚胺和双(六亚甲基)三胺。

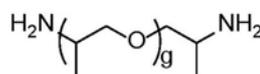
[0455] 113. 根据实施例112所述的方法,其中所述聚醚胺是 JEFFAMINE®。

[0456] 114. 根据实施例113所述的方法,其中所述 JEFFAMINE®选自M-600、M-2005、M-1000、M-2070、D-230、D-400、D-2000、D-4000、ED-600胺、ED-900胺、ED-2003胺、EDR-148胺、EDR-176胺、T-403胺、T-3000胺、T-5000胺、THF-100胺、THF-170胺、XTJ568、XTA801、RFD-270和XTJ-616。

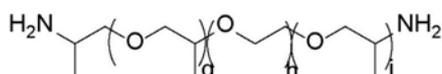
[0457] 115. 根据实施例112或113所述的方法,其中所述聚醚胺包括以下结构中的一个:



Mw为600到1000到2000

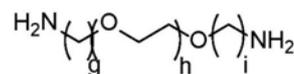


MW为200到400到2000到4000



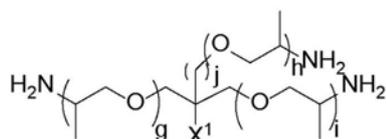
[0458]

MW为600到900到2000



MW为140到175到200

和



MW为400到3000到5000

[0459] 其中g、h、i和j独立地为从1到100的整数;并且

[0460] 其中X¹如本文其它地方所定义或为任选经取代的C₁₋₆烷基。

[0461] 116. 根据实施例107到115中任一项所述的方法,其中所述丙烯酸酯单体选自由以下组成的组:丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸甲酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酸乙酯、2-氯乙基乙烯基醚、丙烯酸2-乙基己酯、甲基丙烯酸羟乙酯、丙烯酸羟乙酯、丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸丁酯、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺、N-(3-氨丙基)甲基丙烯酰胺盐酸盐、N-(3-BOC-氨丙基)甲基丙烯酰胺、甲基丙烯酸2-氨乙酯盐酸盐、甲基丙烯酸2-(叔丁基氨基)乙酯、n-异丙基丙烯酰胺、丙烯酸2-甲氧基乙酯、n-乙基甲基丙烯酰胺、n-乙基乙酰胺、丙烯酸2-N-吗啉代乙酯、甲基丙烯酰基-L-赖氨酸、丙烯酸2-(甲基氨基)乙酯和甲基丙烯酸2-(甲基氨基)乙酯。

[0462] 117. 根据实施例107到116中任一项所述的方法,其中所述适当的溶剂是醇或醇的混合物。

[0463] 118. 根据实施例107到117中任一项所述的方法,其进一步包括通过将所述聚酰胺胺组合物与含羟基的化合物混合,用羟基部分修饰所述聚酰胺胺组合物。

[0464] 119. 根据实施例118所述的方法,其中所述含羟基的化合物是环氧化物。

[0465] 120. 根据实施例118所述的方法,其中所述环氧化物是环氧丙烷。

[0466] 121. 根据实施例107到120中任一项所述的方法,其中将所述多官能胺与所述丙烯

酸酯单体混合包含介于约2:1与约5:1之间的胺与丙烯酸酯的摩尔比。

[0467] 122. 根据实施例107到121中任一项所述的方法, 其中将所述多官能胺与所述丙烯酸酯单体混合包含介于约3:1与约4:1之间的胺与丙烯酸酯的摩尔比。

[0468] 123. 根据实施例107到122中任一项所述的方法, 其中所述方法形成根据前述权利要求中任一项所述的超支化化合物或聚酰胺胺组合物。

[0469] 在以下实例中进一步定义了本发明。应当理解的是, 尽管这些实例说明了本发明的优选实施例, 但是它们仅仅为了举例说明。

[0470] 实例

[0471] 根据化学修饰来评估h-PAMAM的NO释放性质(即, 有效负荷和释放动力学)。关于对常见牙齿病原体的抗菌活性和对人牙龈成纤维细胞的毒性, 评估了所述支架作为口腔治疗剂的潜力。可以理解的是, 在口腔健康的背景下研究革兰氏阴性和革兰氏阳性抗菌活性有助于这些化合物在更广泛的应用领域中的使用。最后, 就治疗潜力而言, 将h-PAMAM衍生物的性质与G3-PAMAM对应物进行了比较。

[0472] 实例1: 超支化聚酰胺胺的合成

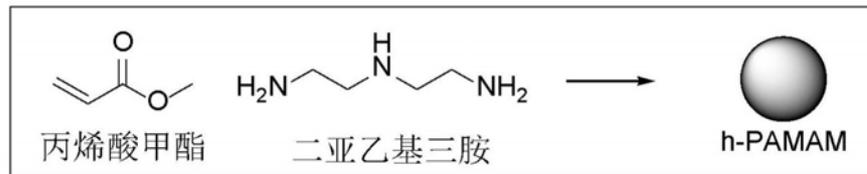
[0473] 使用一锅法反应和与第三代PAMAM (G3-PAMAM) 树状大分子相似的分子量制备超支化聚酰胺胺 (h-PAMAM), 然后用N-二醇二氮烯鎊一氧化氮 (NO) 供体进行官能化。

[0474] 材料和方法

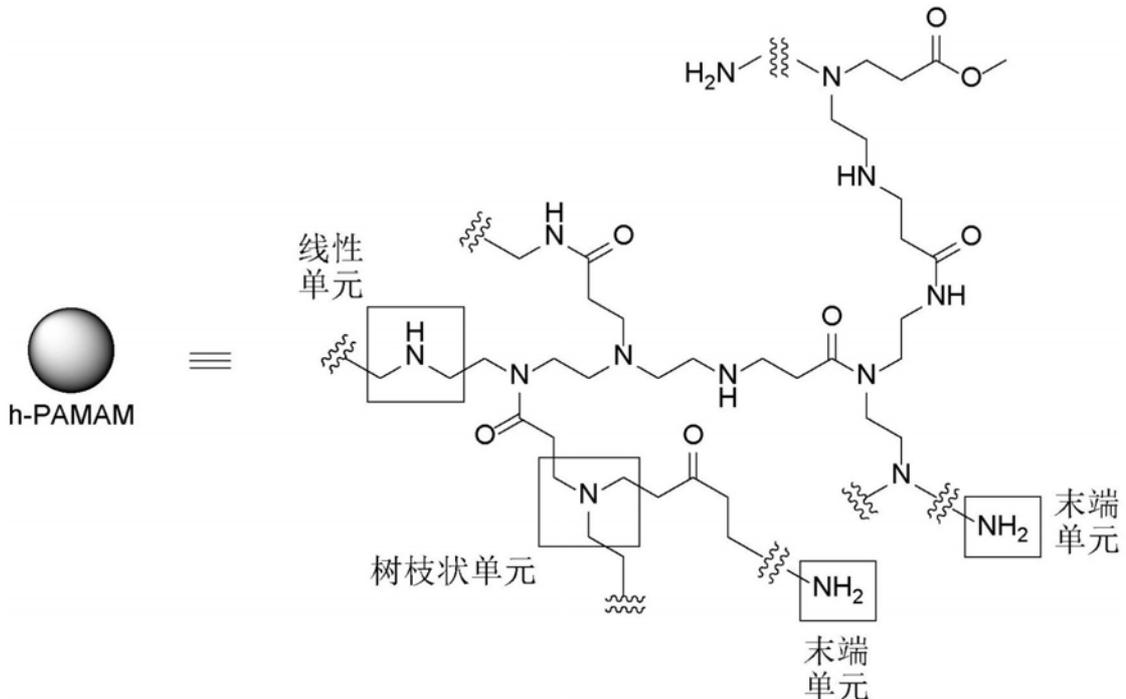
[0475] 乙二胺 (EDA)、二亚乙基三胺 (DETA)、丙烯酸甲酯 (MA)、环氧丙烷 (PO)、3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑内盐 (MTS) 和用于细胞培养的杜氏磷酸盐缓冲盐水 (DPBS) 购自西格玛奥德里奇 (Sigma-Aldrich) (密苏里州圣路易斯)。变形链球菌 (ATCC#25715)、粘性放线菌 (ATCC#15987) 和放线共生放线杆菌 (ATCC#43717) 购自美国典型培养物保藏中心 (美国弗吉尼亚州马纳萨斯)。牙龈卟啉单胞菌菌株 A7436 由北卡罗来纳州教堂山的 UNC 牙科学院提供。CDC 厌氧菌 5 体积% 的羊血琼脂、脑心浸液 (BHI) 肉汤和琼脂以及 GasPak™ EZ campy 容器系统小袋购自碧迪公司 (Becton, Dickinson, and Company) (新泽西州富兰克林湖)。Wilkins-Chalgren (W-C) 肉汤购自 Acumeda Neogen Corporation (密歇根州兰辛)。人牙龈成纤维细胞系和 FibroLife 成纤维细胞无血清培养基购自生命线细胞技术有限公司 (Lifeline Cell Technology LLC) (马里兰州弗雷德里克)。纯一氧化氮 (99.5%)、氩气、氮气和一氧化氮校准品 (25.87ppm, 于氮气中) 购自 Airgas (北卡罗莱纳州达勒姆)。常见的实验室盐和溶剂购自飞世尔科学世界公司 (Fisher Scientific) (宾夕法尼亚州匹兹堡)。使用 Millipore Milli-Q UV 梯度 A10 系统 (宾夕法尼亚州伯利恒) 将水纯化至最终电阻率为 18.2MΩ cm, 总有机物含量 ≤ 10ppb。通过使用来自 EDA 核心的 MA/EDA 单体进行重复的烷基化和酰胺化反应, 制备了第三代聚酰胺胺 (G3-PAMAM) 树状大分子。

[0476] 在 400MHz 布鲁克 (Bruker) 光谱仪上记录质子核磁共振 (¹H NMR) 光谱。在 600MHz 布鲁克仪器上收集碳核磁共振 (¹³C NMR) 光谱。使用具有多角度光散射的尺寸排阻色谱法 (SEC-MALS) 测定聚合物的分子量和多分散性。使洗脱液 (PBS, 0.01% 叠氮化物, pH 7.4) 通过与沃特世 (Waters) 2414 折射率检测器 (沃特世色谱法; 马萨诸塞州米尔福德) 相连的 miniDawn TREOS 多角度光散射检测器 (怀雅特技术公司 (Wyatt Technology); 加利福尼亚州圣塔芭芭拉)。

[0477] 超支化聚酰胺胺 (h-PAMAM) 的合成



[0478]



[0479] 通过二亚乙基三胺和丙烯酸甲酯的聚合合成超支化聚酰胺胺 (h-PAMAM) 聚合物。简而言之,将DETA (6.8mL;0.06mol) 和MA (6.8mL;0.072mol) 在甲醇 (10mL) 中混合,并搅拌2天。然后在旋转蒸发仪上将反应混合物加热至60℃持续1小时,100℃持续2小时,120℃持续2小时和140℃持续2小时,以完成聚合反应并除去未反应的单体。产物(即h-PAMAM)为黄色油。将h-PAMAM重新溶于100mg mL⁻¹的甲醇中,并储存在冰箱中直至将来使用。使用¹H NMR、¹³C NMR和FTIR对h-PAMAM进行表征,其峰如下。¹H NMR: (400MHz, CD₃OD, δ): 2.22-2.90 (COCH₂、NHCH₂和NH₂CH₂), 3.15-3.58 (CONCH₂), 3.60 (CH₃O)。¹³C (600MHz, CD₃OD, δ): 30-60 (CH₂和CH₃), 170-175 (C=O)。FTIR (cm⁻¹): 3308 (NH₂), 2957 (CH₂), 2848 (CH₂), 1647 (C=O) 和1556 (NH)。

[0480] 表征

[0481] 使用茚三酮测定法测定h-PAMAM的游离伯胺含量。简而言之,在使用前,通过将0.2g茚三酮溶于7.5mL DMSO和2.5mL 0.2M乙酸钠缓冲液 (pH 5.4) 的混合物中,新鲜制备2wt%的茚三酮储备溶液。对于实验,将2mg h-PAMAM溶解在1mL乙酸钠缓冲液中,并与0.5mL茚三酮储备溶液混合。将该溶液加热至100℃持续5分钟,冷却至室温,并用乙醇稀释10倍。使用UV-vis Lambda40分光光度计 (珀金埃尔默 (PerkinElmer); 马萨诸塞州沃尔瑟姆) 在570nm处测量吸光度,并将其与同样制备的G3-PAMAM标准溶液进行比较。还通过茚三酮测定法检查了二乙胺,以研究仲胺官能度的潜在影响。结果表明,仲胺与茚三酮试剂反应生成的亚胺盐在570nm处的吸光度可忽略不计,这表明h-PAMAM的仲胺的影响极小。

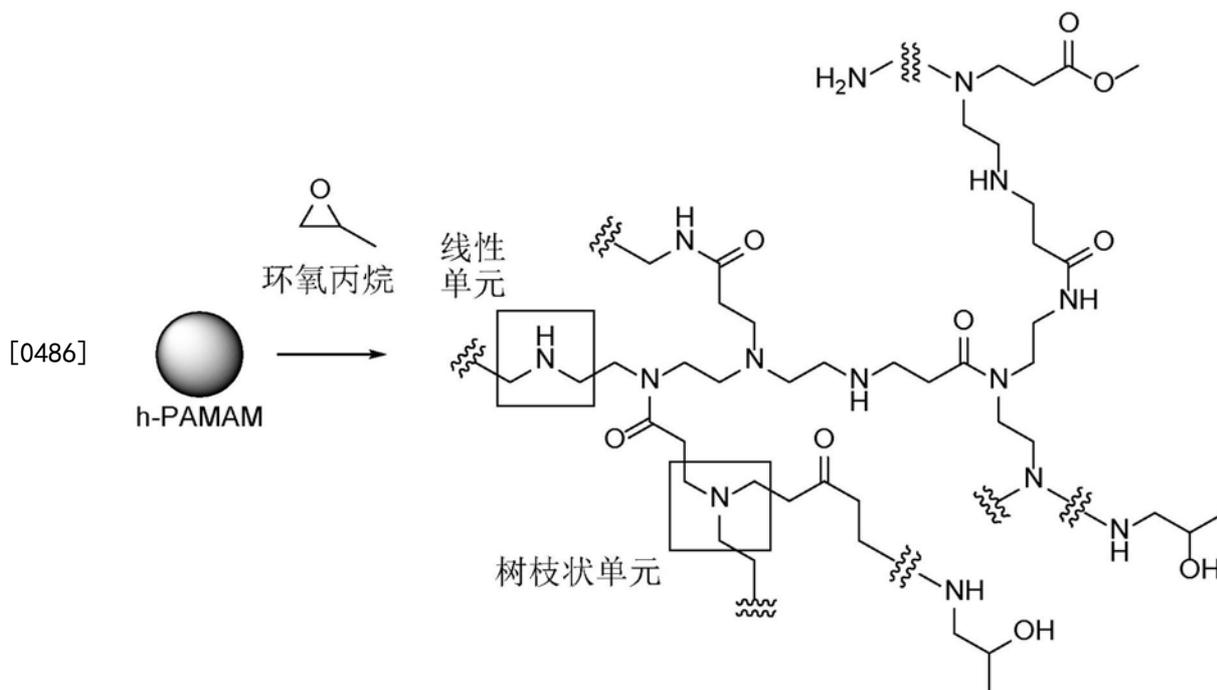
[0482] 具有多角度光散射 (SEC-MALS) 检测器的尺寸排阻色谱法表明,h-PAMAM聚合物的

重均分子量(MW)为 $6.39 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$, PDI为1.89。还制备了第三代PAMAM (G3-PAMAM; 理论分子量为 6909 g mol^{-1}) 树状大分子, 以独立于分子量研究结构对PAMAM支架性质的影响。测得的G3-PAMAM树状大分子的MW为 $7.19 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$, PDI为1.04。相对于G3-PAMAM树状大分子(即, 每个支架32个伯胺), h-PAMAM聚合物含有更少的伯胺基团(每个支架~8个伯胺)。如图1所指出的, h-PAMAM聚合物由树枝状单元、线性单元和末端单元构成。线性单元引起结构缺陷, 从而减少了外部伯胺的数量, 同时增加了沿聚合物主链的仲胺。相反, 结构完美的G3-PAMAM树状大分子(或基本无缺陷或基本上完美)由附接到核心的树枝状单元和末端单元组成。

[0483] 如图2(b)所示, ^1H NMR显示在2.22到2.90ppm处出现宽峰, 并在5.80ppm到6.60ppm处峰消失(未示出), 这表明反应过程中来自丙烯酸甲酯的乙烯基被消耗。图2(e)示出了超支化结构的 ^{13}C NMR, 并提供了在不同化学环境中形成酰胺键(170-180ppm)和 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 键(30-60ppm)的证据, 并证实了乙烯基的消失(120-140ppm; 未示出)。如图2(f)所示, FTIR光谱在 1647 cm^{-1} 和 1556 cm^{-1} 处显示分配给酰胺键的强峰, 这进一步证实了h-PAMAM的合成成功。

[0484] 实例2:h-PAMAM环氧丙烷官能化

[0485] 经环氧丙烷修饰的PAMAM支架的合成



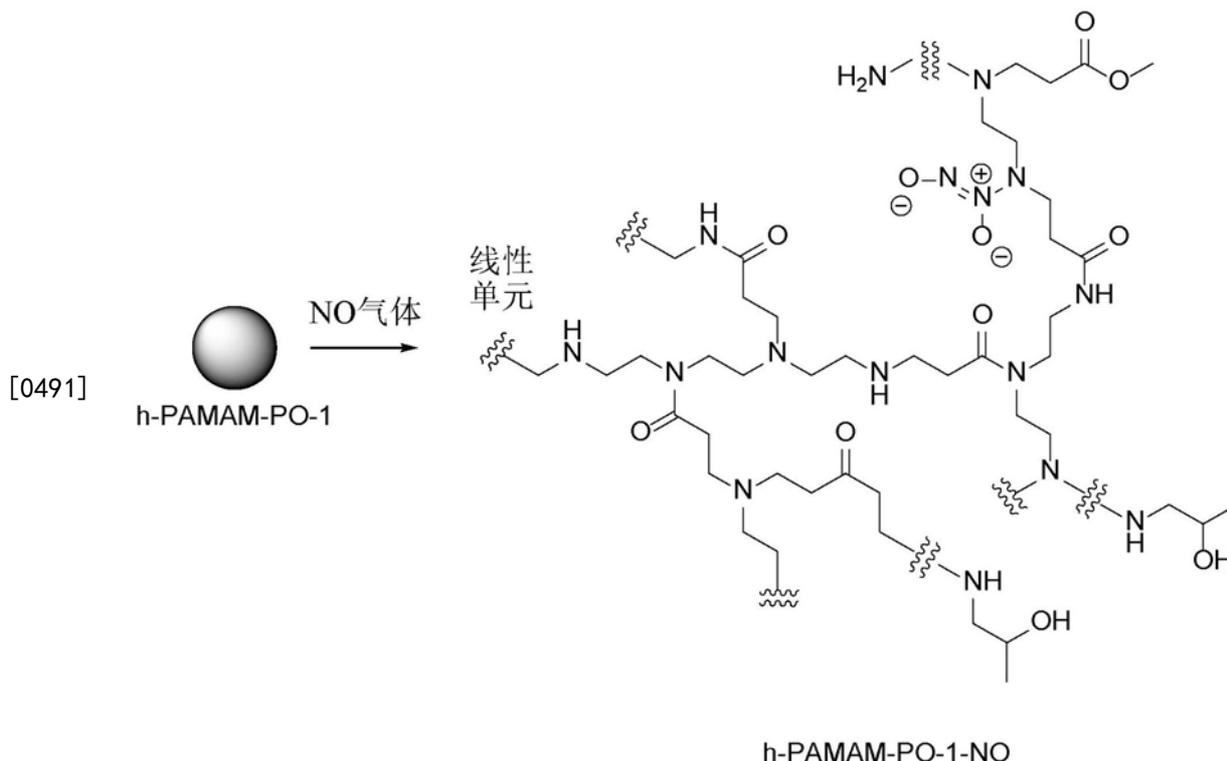
[0487] 如上所述合成了经仲胺修饰的PAMAM支架(包含h-PAMAM和G3-PAMAM)。为了增加NO有效负荷, 通过开环反应应用一摩尔当量的环氧丙烷(PO)修饰了h-PAMAM聚合物(每个支架~8个伯胺)的伯胺, 从而产生h-PAMAM-PO-1。为了进行比较研究, 相对于G3-PAMAM树状大分子(每个支架具有32个伯胺)的伯胺, 用一摩尔当量的PO修饰了h-PAMAM聚合物和G3-PAMAM树状大分子, 从而分别产生h-PAMAM-PO-2和G3-PAMAM-PO。以这种方式, 还可以研究外部修饰对h-PAMAM聚合物的NO释放性质(例如, 有效负荷和释放动力学)的影响。为了提供另外的仲胺, 使300mg h-PAMAM与24 μL 环氧丙烷(PO)(即, 相对于h-PAMAM的伯胺的摩尔量为1当量)反应, 从而产生h-PAMAM-PO-1。为了获得相当的NO释放性质, 使300mg h-PAMAM或G3-PAMAM与

97 μ L PO (即,相对于G3-PAMAM的伯胺的摩尔量为1当量)反应,从而产生h-PAMAM-PO-2或G3-PAMAM-PO。将试剂在6mL甲醇中混合,并搅拌3天。减压除去未反应的PO和溶剂。使用 ^1H NMR光谱验证PO的修饰。使用 ^1H NMR光谱验证PO的修饰。如图2(c)所示,在3.82ppm处出现了明显的峰,所述峰被分配给与产物(R_2CHOH)的羟基相邻的质子。

[0488] 基于每个单体2.5个活性氨基进行计算,并且通过使用 ^1H NMR中3.82ppm到2.2-3.60ppm处的质子的积分比,针对h-PAMAM-PO-1和h-PAMAM-PO-2估计的总氨基(伯胺和仲胺两者)的转化率分别为~11%和~49%。所得的经PO修饰的PAMAM支架的 ^1H NMR数据由以下峰组成:h-PAMAM-PO-1或h-PAMAM-PO-2 (400MHz, D_2O , δ): 1.05 ($\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$), 2.22-2.90 (COCH_2 , NHCH_2 , and NH_2CH_2), 3.15-3.58 (CONHCH_2), 3.60 (CH_3O) 和3.82 ($\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$)。G3-PAMAM-PO由以下峰组成 (400MHz, D_2O , δ): 1.05 ($\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$), 2.37 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO})_2$), 2.38-2.78 (NCH_2 , NHCH_2), 3.08-3.28 ($\text{CONHCH}_2\text{CH}_2$) 和3.82 ($\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$)。根据 ^1H NMR数据,估计h-PAMAM-PO-1、h-PAMAM-PO-2和G3-PAMAM-PO的转化效率分别为11%、49%和63%。

[0489] 实例3:h-PAMAM一氧化氮官能化

[0490] 经N-二醇二氮烯鎓一氧化氮供体修饰的超支化支架的合成



[0492] 在碱性条件下,使含有仲胺的支架暴露于气态NO的高压下,从而产生NO释放型PAMAM,其被称为h-PAMAM/NO、h-PAMAM-PO-1/NO、h-PAMAM-PO-2/NO和G3-PAMAM-PO/NO。具体地说,将50mg支架(h-PAMAM、h-PAMAM-PO-1、h-PAMAM-PO-2或G3-PAMAM-PO)与50 μ L NaOMe (5.4M,于MeOH中;相对于G3-PAMAM伯胺的摩尔量约为1.2当量)在1mL无水甲醇中混合。将溶液置于Parr氢化反应器中并连续搅拌。将反应器用氩气吹扫6次以除去氧气,然后用NO气体加压至10atm,持续3天,从而产生经NO供体修饰的系统(即,h-PAMAM/NO、h-PAMAM-PO-1/NO、h-PAMAM-PO-2/NO或G3-PAMAM-PO/NO)。然后将反应器用氩气吹扫以除去未反应的NO,并在减压下除去溶剂。PAMAM支架与NO气体在高压(10atm)和高pH(碱性条件)下(例如,在一些实施例中,pH值大于或等于约:8、9、10、11、12、13、14或跨越和/或包含上述值的范围)的反应

产生了NO释放型PAMAM,其被称为h-PAMAM/NO、h-PAMAM-PO-1/NO、h-PAMAM-PO-2/NO和G3-PAMAM-PO/NO。 $\sim 250\text{nm}$ 的特征性UV-vis峰的出现验证了N-二醇二氮烯鎓NO供体的形成(见图3a和图3b)。FT-IR光谱还指示O-N-N-O变形($1350\text{--}1370\text{cm}^{-1}$)和N-N拉伸($1230\text{--}1250\text{cm}^{-1}$)振动。

[0493] 将NO释放型材料重新溶解于无水MeOH(50mg mL^{-1})中,并储存在 -20°C 下直至以后使用。

[0494] 一氧化氮释放的表征

[0495] 通过改变环氧丙烷(PO)修饰的程度,获得了广泛的NO储存容量($\sim 1\text{--}2.50\mu\text{mol mg}^{-1}$)和NO释放动力学($t_{1/2}\sim 30\text{--}80$ 分钟)。在PBS(10mM , pH 7.4, 37°C)中测量实时NO释放数据。在 37°C 下,将 $20\mu\text{L}$ MeOH中的一氧化氮释放型PAMAM支架(1mg)添加到脱氧的 10mM 磷酸盐缓冲盐水(30mL , pH 7.4)中。将氮气以 70mL min^{-1} 的流速鼓泡通过该溶液,从而将释放出的NO输送到Sievers化学发光一氧化氮分析仪(科罗拉多州博尔德)中。向烧瓶中提供额外的氮气流,以匹配仪器的收集速率(200mL min^{-1})。记录实时NO释放曲线,直到观察到的NO水平降至 10ppb mg^{-1} 支架以下。

[0496] 如表1所示,h-PAMAM-PO-1/NO储存大量的NO($\sim 2.50\mu\text{mol mg}^{-1}$),其次是h-PAMAM/NO($\sim 2.16\mu\text{mol mg}^{-1}$)。这是由于通过PO修饰而获得的h-PAMAM-PO-1的大量仲胺基团导致的。实际上,在形成h-PAMAM-PO-1时,约有一半的h-PAMAM伯胺已转化为仲胺。 ^1H NMR光谱中明显看出,h-PAMAM的另外的PO修饰(即,h-PAMAM-PO-2)开始消耗沿聚合物主链的仲胺。较高的PO转化效率(h-PAMAM-PO-1和h-PAMAM-PO-2分别为11%和49%)实际上导致h-PAMAM-PO-2/NO的NO总量较低($\sim 1.33\mu\text{mol mg}^{-1}$)。PO修饰的程度也影响了NO释放动力学,更快的NO释放与PO修饰的程度相关(参见图4)。例如,h-PAMAM/NO(0%的PO修饰)表现出最久的NO释放($t_{1/2}\sim 80$ 分钟),而h-PAMAM-PO-2/NO(49%的PO修饰)释放NO最快($t_{1/2}\sim 30$ 分钟)。据信,N-二醇二氮烯鎓阴离子通过分子内氢键合被相邻的阳离子胺所稳定(图1),这些胺的PO修饰可能减弱了这种稳定作用,从而导致NO释放更快(即,半衰期较低)。

[0497] 表1. 经N-二醇二氮烯鎓NO供体修饰的PAMAM聚合物在生理缓冲液(PBS; 10mM , pH 7.4, 37°C)中的NO释放性质。^a

PAMAM 聚合物	$t[\text{NO}]^b$ ($\mu\text{mol mg}^{-1}$)	$t[\text{NO}]_{2\text{h}}^c$ ($\mu\text{mol mg}^{-1}$)	$t_{1/2}^d$ (分钟)
h-PAMAM/NO	2.16 ± 0.24	1.30 ± 0.24	78 ± 5
h-PAMAM-PO-1/NO	2.50 ± 0.39	1.62 ± 0.21	57 ± 5
h-PAMAM-PO-2/NO	1.33 ± 0.17	1.08 ± 0.17	31 ± 7
G3-PAMAM-PO/NO	1.10 ± 0.21	0.96 ± 0.17	30 ± 6

^a $n \geq 3$ 个独立的合成; ^b 每毫克支架的NO储存总量; ^c 最初2小时的NO释放量; ^d NO释放的半衰期。

[0499] h-PAMAM-PO-2/NO和G3-PAMAM/NO的释放性质几乎相同(参见图4,其示出了(a) h-PAMAM/NO; (b) h-PAMAM-PO-1/NO; (c) h-PAMAM-PO-2/NO; (d) G3-PAMAM-PO/NO在PBS(10mM , pH 7.4, 37°C)中的累积NO释放)。另外,与2小时杀菌测定期间递送的NO剂量相对应的2小时NO释放总量也是同当的,从而可以直接检查PAMAM聚合物结构(即,树状大分子与超支化分子)的杀菌作用(表1)。

[0500] 在说明性实施例中,聚酰胺胺组合物包括至少约2重量%的NO。在一个实施例中,如通过PBS(10mM , pH 7.4, 37°C)中的实时NO释放所测量的,聚酰胺胺组合物可以每mg共聚

物释放至少约 $1\mu\text{mol}$ 的 NO 。在另一个实施例中,如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时 NO 释放所测量的,组合物包括每mg共聚物至少约 $2\mu\text{mol}$ 的 NO 。在另一个实施例中,如通过PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中的实时 NO 释放所测量的,所述组合物包括每mg共聚物大于约 $2\mu\text{mol}$ 的 NO 。

[0501] 实例4:h-PAMAM结构的浮游杀菌测定

[0502] 浮游杀菌测定

[0503] 评价了PAMAM支架对革兰氏阴性牙周病原体(牙龈卟啉单胞菌和放线共生放线杆菌)和革兰氏阳性致龋菌(变形链球菌和粘性放线菌)的杀菌活性。在静态条件下在2小时内进行测定。使用最小杀菌浓度(MBC, mg mL^{-1}) (对应于细菌生存力降低了3个对数)来确定和比较材料对细菌的抗菌功效。通过将相应的MBC值乘以在2小时暴露时间内递送的 NO 量(如在PBS中通过NOA测量的)(即, $t[\text{NO}]_{2\text{h}} \times 30\text{g mol}^{-1}$)得出的 NO 杀菌剂量。

[0504] 将浮游细菌(即,牙龈卟啉单胞菌、放线共生放线杆菌、变形链球菌和粘性放线菌)在 -80°C 下储存在15体积%甘油PBS中。为了进行杀菌测定,将这种冷冻原液在BHI肉汤(牙龈卟啉单胞菌的W-C厌氧肉汤)中于 37°C 下孵育过夜。将该溶液的500 μL 等分试样添加到新鲜的肉汤中,并在 37°C 下孵育,直到细菌浓度达到每毫升 1×10^8 个菌落形成单位(CFU mL^{-1}),所述细菌浓度由光密度(OD, 600nm)确定。在5体积%的 CO_2 、10体积%的 H_2 和85体积%的 N_2 的气氛下厌氧培养牙龈卟啉单胞菌。在微需氧环境(6-16体积%的 O_2 和2-10体积%的 CO_2)下在GasPak EZ Campy容器系统(碧迪公司;新泽西州富兰克林湖)中培养放线共生放线杆菌和粘性放线菌。对变形链球菌进行有氧培养。在进行2小时浮游杀菌测定之前,将细菌于1体积%的BHI补充的PBS(牙龈卟啉单胞菌的W-C厌氧肉汤)中稀释至 10^6 CFU mL^{-1} 。然后在 37°C 下引入 NO 释放型材料或相应的对照材料。值得注意的是,肉汤的添加对 NO 释放总量的影响可忽略不计(即,在1体积%的肉汤补充的PBS中, NO 释放总量降低 $\leq 5\%$)。在2小时中,将细菌悬浮液稀释10倍和100倍,并使用BHI琼脂(牙龈卟啉单胞菌的CDC厌氧琼脂)进行螺旋平板接种。为了量化材料对浮游细菌的抗菌能力,确定最小杀菌浓度(例如,2小时后实现生存力降低3个对数所需的材料的最小浓度)。值得注意的是,板计数法的检出限为 2.5×10^3 CFU mL^{-1} 。

[0505] 由于伯胺和仲胺的高密度,h-PAMAM支架表现出一些杀菌性质。如表2所示,从较低的MBC可以看出,与革兰氏阳性病原体相比,所测试的革兰氏阴性病原体对h-PAMAM的治疗更敏感。这种行为可能归因于革兰氏阳性细菌的较厚的肽聚糖层,所述较厚的肽聚糖层可能会限制支架缔合并减轻膜降解。然后根据PO修饰评估h-PAMAM的抗菌作用。相对于h-PAMAM,观察到h-PAMAM-PO-1的抗菌作用减弱,这很可能是由于外源PO修饰将部分($\sim 50\%$)外部伯胺转化为效力较低的仲胺所导致的。也有可能来自PO的非离子羟基屏蔽了阳离子胺,从而抑制所述阳离子胺与细菌膜的相互作用。在h-PAMAM-PO-2的情况下,h-PAMAM的广泛PO修饰进一步减轻了抗菌作用,这是由于阳离子胺的消耗量更大和/或羟基具有屏蔽作用。在这项研究中,观察到革兰氏阳性细菌的抗菌作用降低最为明显。例如,即使在 16mg mL^{-1} 下,使用h-PAMAM-PO-2也不引起对变形链球菌的抗菌作用(最小3个对数的生存力降低)。据信,用如聚乙二醇($\text{MW}=685\text{g mol}^{-1}$)等中性官能团修饰PAMAM树状大分子将降低针对革兰氏阳性金黄色葡萄球菌的根除效力,而对革兰氏阴性铜绿假单胞菌的作用很小(即,效力丧失)。

[0506] 一氧化氮的释放有益于h-PAMAM-PO-2的杀菌作用(表2)。例如,根除变形链球菌所需的h-PAMAM-PO-2/NO浓度小于h-PAMAM-PO-2浓度的25%。与对照相比,h-PAMAM/NO和h-PAMAM-PO-1/NO均显示出较低的抗菌作用。N-二醇二氮烯鎓官能团的电荷(负)降低了与细菌缔合的能力,从而减少了针对h-PAMAM和h-PAMAM-PO-1观察到的胺定向接触杀伤。相对于h-PAMAM-PO-2/NO ($t_{1/2} \sim 30$ 分钟),h-PAMAM/NO和h-PAMAM-PO-1/NO ($t_{1/2} \sim 60-80$ 分钟)的NO释放速率延长支持了这一结果。增加的NO释放半衰期表明,在整个杀菌测定中,带负电荷的N-二醇二氮烯鎓对h-PAMAM/NO和h-PAMAM-PO-1/NO的作用延长。不论PO修饰的程度如何,都需要使用相似剂量的NO释放型支架来根除牙科病原体,这表明了相似的NO递送功效。与革兰氏阴性菌相比,此处评估的革兰氏阳性菌对NO治疗的抵抗力稍强。

[0507] 表2. 在PBS (10mM, pH 7.4, 37°C) 中暴露2小时后,浮游牙科病原体的细菌生存力降低3个对数所需的最小杀菌浓度(MBC_{2h}) 和NO杀菌剂量($\mu\text{g mL}^{-1}$)^a

支架	牙周病原体(革兰氏阴性)				致龋菌(革兰氏阳性)			
	<i>A. a</i> ^b		牙龈卟啉单胞菌		粘性放线菌		变形链球菌	
	MBC _{2h} (mg mL ⁻¹)	NO 剂量 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MBC _{2h} (mg mL ⁻¹)	NO 剂量 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MBC _{2h} (mg mL ⁻¹)	NO 剂量 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MBC _{2h} (mg mL ⁻¹)	NO 剂量 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
G3-PAMAM	0.10		0.50		1		8	
h-PAMAM	0.10		0.10		0.50		4	
h-PAMAM/NO	0.50	20	1	39	1	39	4	156
[0508] h-PAMAM-PO-1	0.25		0.25		1		8	
h-PAMAM-PO-1/ NO	0.50	24	0.50	24	1	49	4	194
h-PAMAM-PO-2	0.50		2		4		>16	
h-PAMAM-PO-2/ NO	0.25	8	1	32	1	32	4	130
G3-PAMAM- PO	0.50		4		4		>16	
G3-PAMAM- PO/NO	0.25	7	1	29	1	29	4	115

[0509] ^a $n \geq 3$ 次重复。^b A.a是放线共生放线杆菌的缩写。

[0510] 比较了h-PAMAM和G3-PAMAM系统的抗菌活性以阐明PAMAM结构对杀菌性质的影响。经PO修饰后,NO释放型支架和对照支架均实现了相当的抗菌活性(表2)。考虑到h-PAMAM-PO-2/NO和G3-PAMAM-PO/NO之间具有相同的NO释放有效负荷和动力学,这种等同的抗菌活性表明聚合物与细菌的缔合相当。值得注意的是,针对NO释放型超支化PAMAM和G3-PAMAM所确定的MBC值均低于较小的PAMAM树枝状大分子(即,G1-PAMAM-PO/NO)的MBC值,尤其是对于致龋菌(变形链球菌)而言。该结果表明,增加的尺寸可能会增强对牙科病原体的杀灭,这与其它浮游病原体的数据一致。总体而言,就杀菌功效而言,h-PAMAM-PO-2/NO等同于G3-PAMAM-PO/NO,但前者的合成成本低得多。

[0511] 如上所述,通过分别研究所述材料对常见牙科病原体和人牙龈成纤维细胞的抗菌活性和毒性来评估这些材料的治疗潜力。结果表明,NO释放和PO修饰的组合产生具有有效杀菌作用且不会引起不必要的细胞毒性的h-PAMAM材料。重要的是,NO释放型经PO修饰的h-PAMAM聚合物表现出与无缺陷的G3-PAMAM树状大分子相当的生物学性质(即,抗菌作用和细胞毒性),但前者的合成负担却低得多。结果还证实了尺寸在杀灭牙病原体中的重要性。总体而言,就杀菌功效而言,h-PAMAM-PO-2/NO等同于G3-PAMAM-PO/NO,但前者的合成成本低

得多。

[0512] 共焦显微镜

[0513] 制备了若丹明B异硫氰酸酯 (RITC) 修饰的h-PAMAM-PO-2和G3-PAMAM-PO材料,以便通过共焦荧光显微镜观察带有细菌(变形链球菌)的大分子支架。合成了罗丹明B异硫氰酸酯(RITC)标记的h-PAMAM-PO-2和G3-PAMAM-PO。如上所述培养变形链球菌,并用PBS将其稀释至 10^7 CFU mL⁻¹。将该细菌溶液(3mL)在玻璃底共焦培养皿中于37℃下孵育30分钟。使用具有543nm HeNe激发激光器(1.0mW,25.0%强度)和BP 560-615nm滤光片的Zeiss 510Meta倒置激光扫描共焦显微镜(卡尔蔡司(Carl Zeiss);纽约州索恩伍德)来获得经RITC修饰的PAMAM-PO的荧光图像。使用具有40倍物镜的N.A.1.2C-复消色差水浸透镜收集了明场图像和荧光图像。将RITC标记的PAMAM-PO添加到细菌溶液中,以达到100μg mL⁻¹的最终浓度。每10分钟收集一次图像,以使PAMAM-PO与细菌的缔合可视化。

[0514] 在每个时间点观察到几乎相同的荧光信号积累(图5(a)-(b)),这证实了关键的杀伤机制。这些树状大分子支架(例如,G1-PAMAM-PO)作为NO-释放剂可能具有优于其它大分子支架(例如,二氧化硅)的益处,因为其缔合性和杀菌功效增强。尽管超支化聚合物的结构特性不完善,但本文的研究证实了h-PAMAM-PO-2和G3-PAMAM-PO之间的等效行为。

[0515] 体外细胞毒性

[0516] 在暴露时间2小时和24小时后评估了PAMAM支架对人牙龈成纤维细胞(HGF-1)的毒性。将人牙龈成纤维细胞(HGF-1)在FibroLife成纤维细胞的无血清培养基中生长,并在37%的湿润条件下于5体积%的CO₂中孵育。在80%融合度下对细胞进行胰蛋白酶处理,并以 $\sim 10^4$ 个细胞/孔的密度接种到经组织培养处理的聚苯乙烯96孔板中。将板在37℃下再孵育24小时。吸出上清液,并用100μL含有不同浓度PAMAM支架的新鲜生长培养基来替换。在37℃下在两个孵育时间点(即2小时和24小时)后,吸出上清液,并用DPBS洗涤细胞。将100μL培养基/MTS/PMS(105/20/1,v/v/v)溶液添加到每个孔中,并在37℃下孵育3小时。使用Thermoscientific Multiskan EX读板仪(马萨诸塞州沃尔瑟姆)在490nm处对有色上清液的吸光度进行定量。还收集了未经处理的细胞(对照)和培养基/MTS/PMS混合物(空白)的测量值。将结果表达为相对细胞生存力的百分比,如下所示:

[0517] %细胞生存力 = $[(Abs_{490} - Abs_{blank}) / (Abs_{control} - Abs_{blank})] \times 100\%$ (等式1)

[0518] 通过绘制细胞生存力百分比与浓度(mg mL⁻¹)的关系图,构建了NO释放型PAMAM支架和对照PAMAM支架的杀菌曲线。

[0519] 选择2小时的孵育时间以对应于杀菌测定的暴露时间。如图6(a)和图6(b)3所示,h-PAMAM被证明对HGF-1最具毒性,这可能是由于阳离子胺破坏了细胞膜。h-PAMAM的毒性因胺含量降低和对非离子羟基的屏蔽而降低。NO的添加进一步减轻了h-PAMAM和h-PAMAM-PO-1的毒性(图6b),这是带负电荷的N-二醇二氮烯鎓官能团抑制HGF-1相互作用的结果。

[0520] 在24小时的孵育期(见图7(a)和图7(b))中,与h-PAMAM-PO-2(即,在4mg mL⁻¹下,生存力 $\geq 80\%$)相比,h-PAMAM和h-PAMAM-PO-1即使在低浓度下也表现出相当大的HGF-1毒性(即,在0.1mg mL⁻¹下,生存力 $\leq 30\%$)。这些结果表明,外部伯胺的部分PO修饰(即,h-PAMAM-PO-1)不足以长时期减轻大分子毒性。通过NO供体修饰向支架中添加NO释放(即h-PAMAM、h-PAMAM-PO-1和h-PAMAM-PO-2)会导致高浓度(> 0.5 mg mL⁻¹)下HGF-1细胞的生存力相对于对照降低,这表明高剂量的NO对哺乳动物细胞有毒。参见Worley等人。相反,与对照相比,低浓

度(0.1mg mL^{-1})下NO释放型h-PAMAM聚合物显示出较小的毒性,这表明低水平的NO是可以忍受的,并且甚至可能促进细胞增殖。h-PAMAM-PO-2/NO聚合物在 4mg mL^{-1} (最高有效杀菌浓度)下对HGF-1细胞产生某些毒性,这代表h-PAMAM-PO-2/NO比NO释放型大分子支架(二氧化硅纳米颗粒和G1-PAMAM树状大分子)更具优势。

[0521] 最后,使用HGF-1细胞比较了h-PAMAM聚合物和G3-PAMAM树状大分子之间的细胞毒性。尽管在浓度 $<2\text{mg mL}^{-1}$ 的情况下观察到未经修饰的G3-PAMAM树状大分子的毒性相对于h-PAMAM聚合物较低,但即使在 0.5mg mL^{-1} 下,仍观察到G3-PAMAM树状大分子具有明显的毒性。经PO修饰后,h-PAMAM聚合物和G3-PAMAM树状大分子(即,分别为h-PAMAM-PO-2和G3-PAMAM-PO系统)实现了相当的毒性。这些数据共同说明了h-PAMAM-PO-2/NO作为用于口腔抗菌治疗的安全抗菌剂的潜力。

[0522] 如上所述,提供了经N-二醇二氮烯鎓NO供体修饰的h-PAMAM聚合物的合成和表征。在一些实施例中,根据化学修饰来评估h-PAMAM的NO释放性质(即,有效负荷和释放动力学)。关于对常见牙齿病原体的抗菌活性和对人牙龈成纤维细胞的毒性,评估了所述支架作为口腔治疗剂的潜力。最后,就治疗潜力而言,将h-PAMAM结构的性质与G3-PAMAM对应物进行了比较,并给出了令人满意的结果。超支化PAMAM支架(h-PAMAM-PO-2/NO)上NO释放能力与环氧丙烷(PO)修饰的组合可有效根除对人牙龈成纤维细胞具有低/最小毒性的选择口腔病原体。尽管存在结构缺陷,但是h-PAMAM-PO-2/NO的抗菌活性与结构完美的G3-PAMAM-PO/NO的抗菌活性相当。在这方面,h-PAMAM-PO-2/NO显示出有望作为治疗剂的前景。在一些实施例中,h-PAMAM-PO-2/NO的抗菌作用可以用于临床相关的离体多物种牙科生物膜。在一些实施例中,所公开的NO释放型超支化聚合物可以用于口腔护理应用。在一些实施例中,所公开的NO释放型超支化聚合物可以用于口腔微生物组中的口腔护理应用。

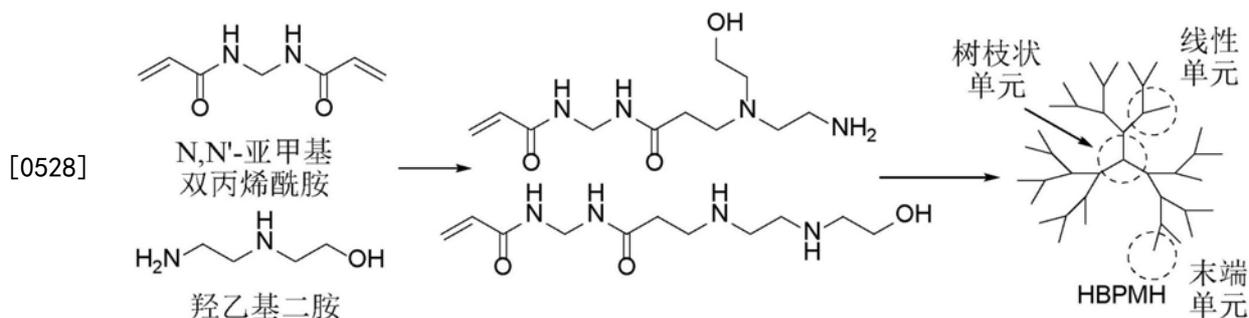
[0523] 实例5:羟基封端的超支化聚合物的合成

[0524] 材料和方法

[0525] N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(MBA)、N-(2-羟乙基)乙二胺(HEDA)、胎牛血清(FBS)、杜氏改良Eagle培养基(DMEM)、吩嗪硫酸甲酯(PMS)、3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺基苯基)-2H-四唑内盐(MTS)、胰蛋白酶、杜氏磷酸盐缓冲盐水(DPBS)和青霉素链霉素(PS)购自西格玛奥德里奇,无需进一步纯化即可使用。甲醇钠(5.4M溶液,于甲醇中)购自Acros Organics。一氧化氮(NO)气体(99.5%)购自普莱克斯(Praxair)。使用Millipore Milli-Q UV梯度A-10系统将蒸馏水纯化至最终电阻率为 $18.2\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$,总有机物含量 $\leq 6\text{ppb}$ 。铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*; ATCC#19143)和金黄色葡萄球菌(*S.aureus*; ATCC#29213)获自美国典型培养物保藏中心。胰蛋白酶大豆琼脂(TSA)和胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)购自碧迪公司。L929小鼠成纤维细胞(ATCC#CCL-1)获自北卡罗来纳大学组织培养设施。所有其它材料均购自商业渠道,无需进一步纯化即可使用。

[0526] 在布鲁克(400MHz)光谱仪上记录核磁共振(^1H NMR)光谱。在600MHz布鲁克仪器上记录定量性 ^{13}C 核磁共振谱(^{13}C NMR)和2D NMR技术。在PerkinElmer Lambda 40分光光度计上测量UV-Vis吸收光谱。在装有沃特世2414折射率检测器(马萨诸塞州米尔福德)的水性GPC-多角度光散射系统上进行凝胶渗透色谱法测量,所述沃特世2414折射率检测器与怀雅特miniDawn TREOS多角度光散射检测器(加利福尼亚州圣塔芭芭拉)相连。

[0527] 羟基封端的超支化聚合物(HBPMH)的合成



[0529] 迈克尔加成缩聚程序如下：将MBA (1.540g, 10mmol) 添加到HEDA (1.041g, 10mmol) 于15mL去离子水中的混合物中，然后在75℃下反应72小时，同时剧烈搅拌。将得到的溶液在冷丙酮中沉淀并离心，从而获得白色固体产物。将产物在室温下真空干燥3天。获得呈白色固体粉末的最终产物 (1.212g, 产率：47.0%)。通过N,N'-亚甲基双丙烯酰胺的A₂-单体与N-(2-羟乙基)乙二胺的三官能胺单体之间的迈克尔加成缩聚合成了超支化聚(亚甲基双丙烯酰胺-羟乙基乙二胺) (HBPMH)，在75℃下以相同的进料摩尔比持续3天。首先通过在不同反应时间下的¹H NMR光谱监测聚合过程(图8)。在聚合程序中，分配给MBA单体双键的5.70ppm和6.10ppm附近的两个峰逐渐减小。可以根据等式 $CR_v\% = (1 - S_{5.60\sim 6.20} / 3S_{4.40\sim 4.65}) * 100\%$ 计算乙烯基的转化效率(CR_v)，其中S_{5.60~6.20}是分配给双键的质子信号(5.60~6.20ppm)的积分，而S_{4.40~4.65}是分配给两个酰胺基团之间的亚甲基的质子信号(4.40~4.65ppm)的积分。10分钟的CE_v为31.6%，2小时和6小时的CE_v分别为74.1%和97.2%。结果表明，迈克尔加成聚合在初始阶段进行得非常快。反应10分钟后，还观察到了两个新的质子信号，分别在2.26~2.35ppm和2.41~2.47ppm范围内，所述质子信号被分配给与中间体I和中间体II中的酰胺基团相邻的新形成的亚甲基。信号(2.26~2.35ppm)的积分面积大于信号(2.41~2.47ppm)的积分面积，这表明伯胺比仲胺具有更高的反应性。12小时后，乙烯基的质子信号几乎消失。所有的尖峰都变成宽峰，这表明发生了聚合。在伯胺封端的超支化聚(酰胺基胺)的合成中也报告了类似的随时间变化的NMR迹线。值得注意的是，残留的双键(小于0.2%)保留在最终的大分子结构中。

[0530] 通常，超支化聚合物可以由树枝状单元、线性单元和末端单元组成，如图9所示。图9示出了新合成的HBPMH的六个可能的结构链段，其中D、L_a、L_b、T_a和T_b分别代表树枝状单元(D)、线性单元(L_a, L_b)和末端单元(T_a, T_b)的分数。进行¹H-¹³C HSQC、¹H-¹H COSY、¹H NMR、定量性¹³C NMR光谱，以详细确认HBPMH的3D拓扑结构(图10a-d)。在¹³C NMR光谱(图10b)中未观察到37~42ppm范围内的信号，这表明在HBPMH的大分子主链中未发现带有伯胺的末端单元T_c。然而，由于HBPMH的复杂结构，基于¹H NMR或定量性¹³C NMR的支化度(DB)具有挑战性。通过凝胶渗透色谱法(GPC)表征HBPMH的分子量及其多分散指数(PDI)。HBPMH的重均分子量(M_w)为6,368g/mol, PDI约为1.78。通过将HBPMH的M_w除以两个单体的总分子量(258g/mol)计算平均聚合度(DP_n)等于24.7。通过NMR确认图9中的每个基团，除了末端单元T_c。

[0531] 经N-二醇二氮烯鎓一氧化氮供体修饰的超支化支架的合成

[0532] 随后使富含仲胺的HBPMH与NO气体(10巴)在强碱性条件下反应，从而产生N-二醇二氮烯鎓NO供体(图11(a-d))。为了合成N-二醇二氮烯鎓官能化的HBPMH，将含仲胺的HBPMH添加到2.0mL无水甲醇(MeOH)中。在接下来的步骤中，将含1当量甲醇钠的甲醇(相对于聚合物主链中仲胺的摩尔量)添加到混合物中，然后涡旋，从而获得均质溶液。将混合物置于不

锈钢反应器中进行强磁力搅拌。用氩气将容器快速吹扫三次至7巴的压力,然后进行三个较长的氩气吹扫循环(10分钟),以从溶液中除去残留的氧气。然后将容器加压至10巴的NO气体,保持压力3天。用氩气对溶液进行三次短时间吹扫,然后再进行三次长时间吹扫(10分钟),以除去未反应的NO气体。将溶液在15mL的丙酮中沉淀1次,然后离心除去溶剂。将最终产物在真空干燥箱中在室温下干燥2小时。将得到的N-二醇二氮烯鎓官能化的HBPMH封膜,并储存在-20℃下以备将来使用。

[0533] 通过UV-Vis光谱、¹H NMR光谱和FTIR光谱表征了所获得的经N-二醇二氮烯鎓修饰的HBPMH(HBPMH/NO)。与HBPMH的UV-Vis光谱相比,在UV-Vis光谱(图11b)中出现了分配给N-二醇二氮烯鎓结构的强的典型吸收峰(~254nm附近),这表明HBPMH/NO的形成。此外,未观察到分配给致癌性N-亚硝胺物种的330~360nm附近的宽吸收峰,这表明在HBPMH/NO的最终NO供体中未形成N-亚硝胺。还通过¹H NMR(图11c)光谱表征了HBPMH/NO的形成。通过二醇二氮烯鎓化,对应于与仲胺键合的亚甲基的2.50~2.90ppm范围内的质子信号转变为2.95~3.20ppm范围内的高化学位移,这是由于新形成的二醇二氮烯鎓基团的吸电子作用。峰1(3.10~3.20ppm)对应于与接近羟基的仲胺连接的N-二醇二氮烯鎓(图12a和图12b);而峰2(2.95~3.10ppm)表示远离羟基的N-二醇二氮烯鎓(图12c和图12d)。可以通过等式 $CE_{SA}\% = (S_{1,2}/4) / (S_{4.50}/2) \times 100\%$ 计算仲胺向N-二醇二氮烯鎓的转化效率(CE_{SA}),其中 $S_{4.50}$ 和 $S_{1,2}$ 分别代表~4.50ppm附近的峰积分和峰1和2的总积分。所得的 CE_{SA} 等于27.3%。FTIR光谱(图11d)为HBPMH/NO的形成提供了另外的证据。与未官能化的HBPMH相比,FTIR光谱中出现了1361 cm^{-1} 处的一个增强FTIR谱带和945 cm^{-1} 处的一个新FTIR谱带,这些谱带已被分别分配给O-N-N-O不对称拉伸和面内N-N对称拉伸的特征峰。两条不同的FTIR谱带均表明N-二醇二氮烯鎓已被成功引入HBPMH主链。还采用了GPC证明HBPMH/NO的形成(图13)。通过二醇二氮烯鎓化,HBPMH/NO的 M_w 增加到6,973g/mol,而其PDI没有明显变化($PDI = 1.69$)。与HBPMH的 M_w 相比,分子量的显著增加(569g/mol)表明N-二醇二氮烯鎓NO供体链段(-N₂O₂Na)已被成功引入HBPMH的大分子主链中。

[0534] 一氧化氮释放的表征

[0535] 通过使用Sievers NOA 280i化学发光NO分析仪(NO_A,科罗拉多州博尔德)监测实时NO释放。在分析之前,用通过NO零过滤器(0ppm的NO)和25.87ppm标准NO气体的空气校准NO分析仪。在典型测量中,将1mg N-二醇二氮烯鎓官能化的HBPMH加入具有30mL脱氧PBS(pH 7.4,37℃)的样品容器中,以启动NO释放。用氮气以80mL/分钟的流速吹扫容器,从而将释放出的NO气体输送到NO_A分析仪中。向容器中提供额外的氮气流,以匹配仪器的收集速率(200mL/分钟)。当NO含量降至10ppb NO/mg N-二醇二氮烯鎓官能化的HBPMH以下时,终止NO分析。

[0536] N-二醇二氮烯鎓NO供体通过pH触发的NO释放过程进行。图14(a)显示了新的经N-二醇二氮烯鎓修饰的超支化聚合物支架的建议解离程序。如果将HBPMH/NO浸入生理条件(即,37℃,pH 7.4)中,则1摩尔N-二醇二氮烯鎓应与1摩尔质子反应,并再生1摩尔母体仲胺化合物和两摩尔NO基团。使用基于化学发光的一氧化氮分析仪(NO_A)实时检测NO基团,从而研究在生理温度(37℃)下PBS缓冲液(pH 7.43)中水溶性HBPMH/NO释放NO的总储存和解离动力学。表3提供了计算出的NO释放参数(例如,总NO储存、NO释放的半衰期、最大通量、达到最大通量的时间和转化率)。HBPMH/NO的代表性实时NO释放曲线如图14b和14c所示。通常,

HBPMH/NO表现出高NO储存能力(即,NO总量为 $\sim 2.01\mu\text{mol}/\text{mg}$)和快速的NO释放动力学(即,NO释放半衰期为 ~ 20 分钟)。羟基封端的HBPMH的吸水能力比经烷基链修饰的树状大分子更快,因此具有快速的NO释放动力学。另外的计算表明,HBPMH中仲胺向N-二醇二氮烯鎓的转化效率为25.9%,与NMR数据吻合良好。这可能归因于超支化聚合物的稠密拓扑结构的位阻以及带负电荷的N-二醇二氮烯鎓之间的排斥相互作用。

[0537] 表3. 在37°C下PBS (pH 7.4) 中HBPMH/NO的一氧化氮释放性质。

材料	$t[\text{NO}]^a$ ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	$t_{1/2}$ (分钟)	$[\text{NO}]_{\text{max}}$ (ppb/mg)	$t_{[\text{NO}]_{\text{max}}}$ (分钟)	$t_{4\text{h}}[\text{NO}]^b$ ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	转化效率 (%)
HBPMH	2.01 ± 0.07	20 ± 2	10896 ± 789	3.3 ± 0.5	1.81 ± 0.05	25.9 ± 0.6

[0539] (a) 总NO储存; (b) 每毫克HBPMH/NO在4小时内(μmol)释放的NO。对每个参数进行多次重复分析($n\geq 3$)。

[0540] 实例6: HBPMH超支化结构的浮游杀菌测定

[0541] 测试了NO是否是消除浮游细菌的有效抗菌剂。评估了羟基封端的HBPMH/NO对与严重疾病(例如,伤口)有关的革兰氏阴性铜绿假单胞菌和革兰氏阳性金黄色葡萄球菌的模型病原体的抗菌能力。在静态条件下进行浮游细菌生存力测定,以确认在4小时内消除3个对数的细菌生存力(即,99.9%杀灭率)所需的最小杀菌浓度($\text{MBC}_{4\text{h}}$),所述最小杀菌浓度是量化抗菌活性的常用参数。还计算了这段时间内由NO释放型HBPMH/NO释放的NO量,以定量评估杀菌活性中所需的NO剂量。

[0542] 将铜绿假单胞菌或金黄色葡萄球菌菌落在3mL的TSB中于37°C下培养过夜(约16小时)。将所得悬浮液的1000 μL 等分试样添加到15mL新鲜TSB中,并在37°C下再孵育2小时,以使浓度达到每mL 10^8 个菌落形成单位(CFU/mL,由OD600确认)。通过离心收集细菌,将其重悬于无菌PBS中,并稀释至 10^6 CFU/mL。在静态条件下于37°C下在4小时内评估了非NO释放型HBPMH和NO释放型HBPMH对浮游细菌的抗菌效果。在每个实验中孵育空白(未经处理的细胞),以确保细菌在4小时的测定中以 10^6 CFU/mL保持存活。移入空白、对照或经NO释放型HBPMH处理的细菌悬浮液的100 μL 等分试样,在无菌H₂O中稀释10倍,并使用Eddy Jet螺旋铺板机(IUL;纽约州法明代尔)平板接种在TSA板上,然后于37°C下孵育过夜。通过使用Flash&Go菌落计数器(IUL;纽约州法明代尔)计数TSA平板上的总菌落来评估细菌生存力。最小杀菌浓度($\text{MBC}_{4\text{h}}$)被指定为NO释放型HBPMH在4小时暴露中的最小浓度,与空白相比,所述浓度导致细菌生存力降低了3个对数。值得注意的是,这种选择的板计数方法的检出限为 2.5×10^3 CFU/mL。表4提供了MBC和所需的NO剂量。

[0543] 进行了对照羟基封端的HBPMH和NO释放型HBPMH/NO对浮游细菌的抗菌活性测定,以评估一氧化氮的功能。HBPMH表现出对铜绿假单胞菌的杀菌作用,其 $\text{MBC}_{4\text{h}}$ 值为500 $\mu\text{g}/\text{mL}$;而HBPMH在低于16000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下对金黄色葡萄球菌的放射效果不明显(图15a和图15b)。伯胺封端的G4PAMAM树状大分子对铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌的 $\text{MBC}_{4\text{h}}$ 值分别为30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (未示出)。不受特定机制的束缚,由于聚乙二醇化保护,HBPMH的 $\text{MBC}_{4\text{h}}$ 值增加表明羟基封端的HBPMH具有较低细胞毒性。然而,NO释放型HBPMH/NO对铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌均表现出良好的杀菌效果,其 $\text{MBC}_{4\text{h}}$ 值分别为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。 $\text{MBC}_{4\text{h}}$ 值的显著降低表明NO不能作为关键的抗菌剂,特别是对金黄色葡萄球菌。进一步检查 $\text{MBC}_{4\text{h}}$ 值和所需的NO剂量,表明HBPMH/NO对铜绿假单胞菌的清除效果更好。对铜绿假单胞菌的抗

菌活性的提高归因于HBPMH/NO与革兰氏阴性细菌膜的薄肽聚糖层之间的快速缔合以及由此产生的高效NO递送。

[0544] 表4. 浮游细菌生存力降低3个对数所需的NO释放型HBPMH/NO的最小杀菌浓度(MBC_{4h})和NO剂量

材料	铜绿假单胞菌		金黄色葡萄球菌	
	MBC _{4h} ($\mu\text{g/mL}$)	NO 剂量 ($\mu\text{mol/mL}$)	MBC _{4h} ($\mu\text{g/mL}$)	NO 剂量 ($\mu\text{mol/mL}$)
HBPMH	500		>16000	
HBPMH/NO	50	0.09	1000	1.81

[0545] 体外细胞毒性

[0547] 尽管具有有效的抗菌活性,但新型抗菌材料的实用性也与其对哺乳动物细胞的毒性有关。羟基封端的HBPMH的精心设计有效地降低了细胞毒性。

[0548] 将L929小鼠成纤维细胞在补充有10%v/v胎牛血清(FBS)和1wt%青霉素/链霉素的DMEM中培养,并在5%v/v CO₂中于37°C的湿润条件下孵育。达到融合度(80%)后,对细胞进行胰蛋白酶处理,以 1×10^4 个细胞/mL的密度接种到经组织培养处理的聚苯乙烯96孔板上,并在37°C下孵育24小时。然后吸出上清液,并用100 μL 含有不同浓度非NO释放型HBPMH和NO释放型HBPMH的新鲜生长培养基替换至每个孔。在37°C下孵育4小时,吸出上清液,并将100 μL DMEM/MTS/PMS混合物(105/20/1, v/v/v)添加到每个孔中。通过使用赛默飞世尔科技Multiskan Ex酶标仪(马萨诸塞州沃尔瑟姆)在490nm处对孵育3小时后所得的有色溶液的吸光度进行定量。DMEM/MTS/PMS和未经处理的细胞的混合物分别用作空白和对照。根据以下公式计算细胞生存力:

$$[0549] \quad \text{细胞生存力}(\%) = \frac{\text{吸光度}_{490} - \text{吸光度}_{\text{空白}}}{\text{吸光度}_{\text{对照}} - \text{吸光度}_{\text{空白}}} \times 100\%$$

[0550] 在0到16000 $\mu\text{g/mL}$ 的不同浓度下,评估了对照和NO释放型HBPMH/NO对小鼠成纤维细胞的细胞毒性。图16(a)-(b)中提供了在4小时的孵育中对照和NO释放型HBPMH/NO的归一化细胞生存力。羟基封端的HBPMH在浓度低于8000 $\mu\text{g/mL}$ 时对小鼠成纤维细胞表现出无毒性质(细胞生存力超过50%) (图16a和16b)。通过二醇二氮烯鎓化,NO释放型HBPMH/NO的50%以上的细胞生存力降至1000 $\mu\text{g/mL}$,因为大量的NO可能通过亚硝化应激或氧化应激导致细胞死亡。发现对照和NO释放型HBPMH/NO在其MBC_{4h}值下均对小鼠成纤维细胞无毒。总之,对浮游细菌的杀菌活性以及NO释放型HBPMH/NO的低细胞毒性表明,新的NO释放型HBPMH/NO可以用作伤口愈合或囊性纤维化的理想抗菌剂。

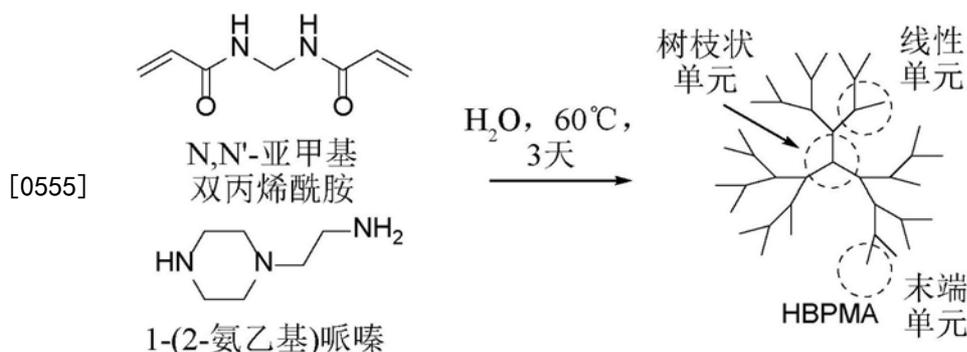
[0551] 通过迈克尔加成缩聚成功地合成了生物可相容的羟基封端的HBPMH。在这项研究中还报道了具有高NO总量和快速NO动力学的N-二醇二氮烯鎓官能化的HBPMH。通过抗菌和细胞毒性测定证明了NO释放型羟基封端的HBPMH作为新型抗菌剂的实用性。据信,本文公开的羟基封端的HBPMH和其它超支化结构可以用作其它生物医学应用(例如,基因递送或药物递送)的生物可相容支架。N-二醇二氮烯鎓官能化的HBPMH可以针对目标应用充当有效的NO释放型材料。

[0552] 总之,通过绿色、低成本且有效的迈克尔加成缩聚成功地合成了生物可相容的羟基封端的超支化聚(亚甲基双丙烯酰胺-羟乙基乙二胺)(HBPMH)。在碱性条件下,使所得的

含仲胺的HBPMH与一氧化氮(NO)气体反应,从而产生N-二醇二氮烯鎓官能化的HBPMH(HBPMH/NO)。HBPMH/NO的NO总量和半衰期分别为 $\sim 2.01\mu\text{mol}/\text{mg}$ 和 ~ 20 分钟。使用革兰氏阴性铜绿假单胞菌和革兰氏阳性铜绿葡萄球菌评估HBPMH/NO的抗菌活性,4小时孵育的最小杀菌浓度为 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 。另外,对照HBPMH和NO释放型HBPMH/NO在体外均对哺乳动物L929小鼠成纤维细胞显示出无毒性。

[0553] 实例7:超支化聚(亚甲基双丙烯酰胺-氨乙基哌嗪)的合成

[0554] 超支超支化聚合物(HBPMA)的合成



[0556] 通过N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(MBA)的 A_2 -单体与1-(2-氨乙基)哌嗪(AP)的三官能胺单体之间的迈克尔加成缩聚合成了超支化聚(亚甲基双丙烯酰胺-氨乙基哌嗪)(HBPMA),在 60°C 下以相同的进料摩尔比持续3天。HBPMA的一些可能的结构单元如图17所示。使用 ^1H NMR和定量性 ^{13}C NMR光谱对所获得的超支化聚合物进行表征(图18(a)和图(b))。结果与报道的文献相同。基于定量性 ^{13}C NMR光谱,可以根据以下公式 $\text{DB} = (\text{D} + \text{T}) / (\text{D} + \text{L} + \text{T})$ 计算HBPMA的支化度(DB),其中D、T和L表示代表支链单元、末端单元和线性单元的分率。计算出的DB等于40.0%。

[0557] 经N-二醇二氮烯鎓一氧化氮供体修饰的超支化支架的合成

[0558] 使富含仲胺的合成HBPMA与NO气体(10巴)在强碱性条件下反应,从而产生N-二醇二氮烯鎓NO供体(图19(a))。通过 ^1H NMR光谱和UV-Vis光谱表征了所获得的经N-二醇二氮烯鎓修饰的HBPMA(HBPMA/NO)。首先通过 ^1H NMR光谱(图19(b))表征了HBPMA/NO的形成。通过二醇二氮烯鎓化,对应于与仲胺键合的亚甲基的 $2.50\sim 2.85\text{ppm}$ 范围内的质子信号转变为 $2.95\sim 3.18\text{ppm}$ 范围内的高化学位移,这是由于新形成的二醇二氮烯鎓基团的吸电子作用。UV-Vis光谱(图19(c))为HBPMA/NO的形成提供了另外的证据。与HBPMH的UV-Vis光谱相比,在UV-Vis光谱(图19(c))中出现了分配给N-二醇二氮烯鎓结构的强的典型吸收峰($\sim 256\text{nm}$),这表明HBPMH/NO的形成。此外,未观察到分配给致癌性N-亚硝胺物种的 $330\sim 360\text{nm}$ 附近的宽吸收峰,这表明在HBPMH/NO的最终NO供体中未形成N-亚硝胺。

[0559] 一氧化氮释放的表征

[0560] 图20(a)显示了经N-二醇二氮烯鎓修饰的HBPMA的建议解离程序。在生理条件(即, 37°C , pH 7.4)下解离HBPMA/NO时,1摩尔N-二醇二氮烯鎓将与1摩尔质子反应,并再生1摩尔母体仲胺化合物和两摩尔NO基团。使用基于化学发光的一氧化氮分析仪(NOA)实时检测NO基团,从而研究在生理温度(37°C)下PBS缓冲液(pH 7.43)中水溶性HBPMH/NO释放NO的总储存和解离动力学。表5提供了计算出的NO释放参数(例如,总NO储存、NO释放的半衰期、最大通量、达到最大通量的时间和转化率)。HBPMH/NO的代表性实时NO释放曲线如图20(b)和20

(c) 所示。一般而言,与经烷基修饰的G3 PAMAM树状大分子(即,NO总量为 $\sim 1.0\mu\text{mol}/\text{mg}$ 且NO释放半衰期为 ~ 60 分钟)相比,HBPMH/NO表现出更高的NO储存能力(即,NO总量为 $\sim 2.08\mu\text{mol}/\text{mg}$)和类似的NO释放动力学(即,NO释放半衰期为 ~ 60 分钟)。HBPMA中仲胺到N-二醇二氮烯鎓的转化效率为29.4%。转化效率可能归因于超支化聚合物的稠密拓扑结构的位阻以及带负电荷的N-二醇二氮烯鎓之间的排斥相互作用。

[0561] 表1. 在 37°C 下PBS (pH 7.4) 中HBPMA/NO的一氧化氮释放性质

材料	$t[\text{NO}]^a$ ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	$t_{1/2}$ (分钟)	$[\text{NO}]_{\text{max}}$ (ppb/mg)	$t_{[\text{NO}]_{\text{max}}}$ (分钟)	$t_{4\text{h}}[\text{NO}]^b$ ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	转化效率 (%)
HBPMH	2.08 ± 0.10	60 ± 4	4541 ± 359	5.1 ± 1.0	1.73 ± 0.07	29.4 ± 1.4

[0563] (a) 总NO储存; (b) 每毫克HBPMH/NO在4小时内(μmol)释放的NO。对每个参数进行多次重复分析($n\geq 3$)。

[0564] 结论

[0565] 在本文中,提供了一种用于制备能够在宽范围内储存NO和释放动力学的NO释放型超支化结构的合成方案。有利的NO有效负荷、释放动力学、杀菌作用和细胞毒性表明,这些支架可用于口腔健康以外的许多治疗性应用。

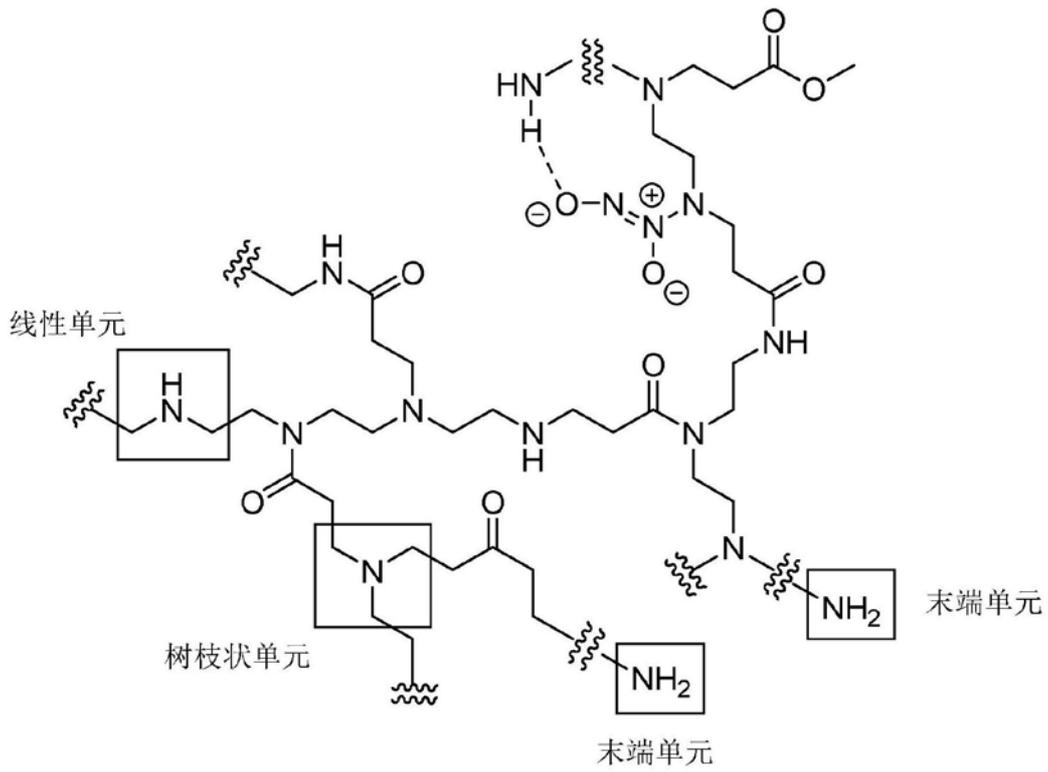


图1

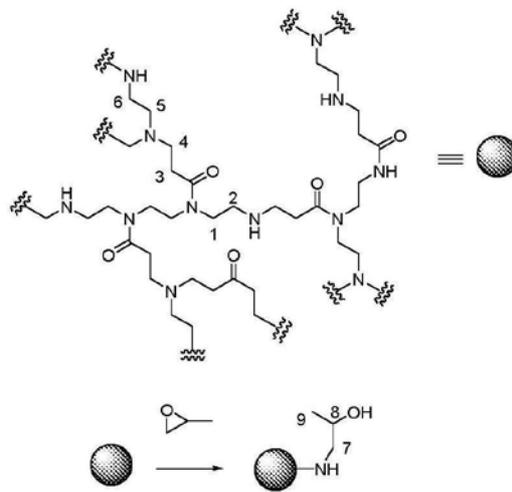


图2a

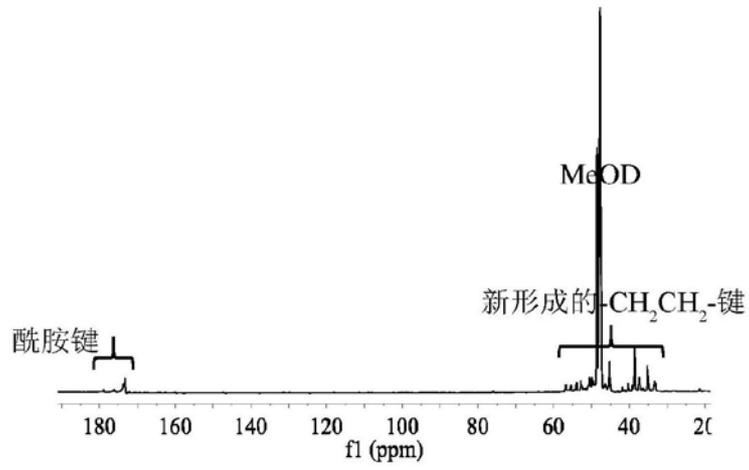
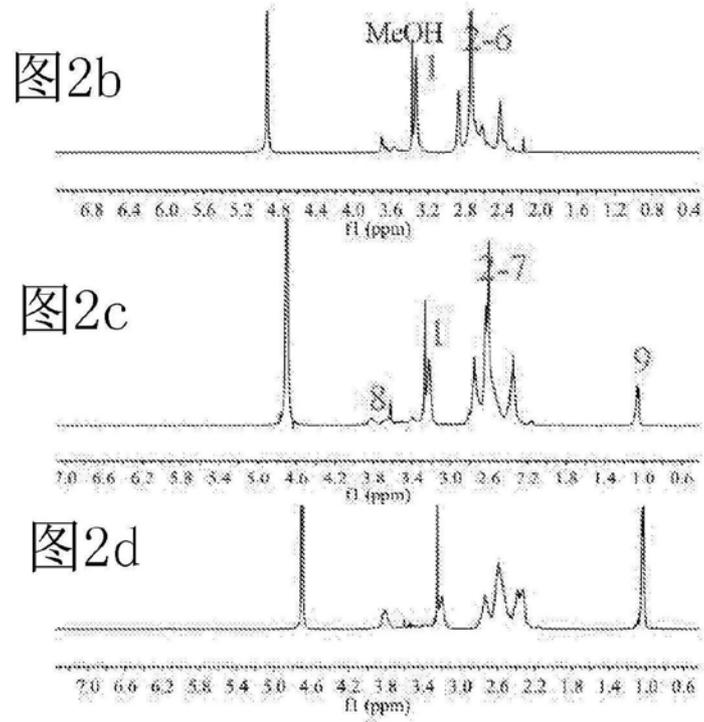


图2e

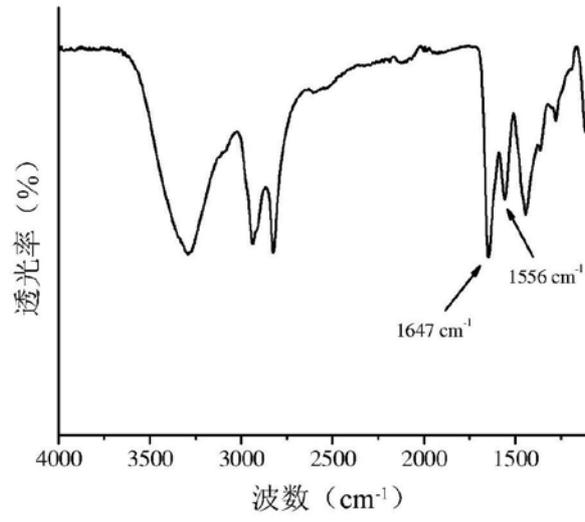


图2f

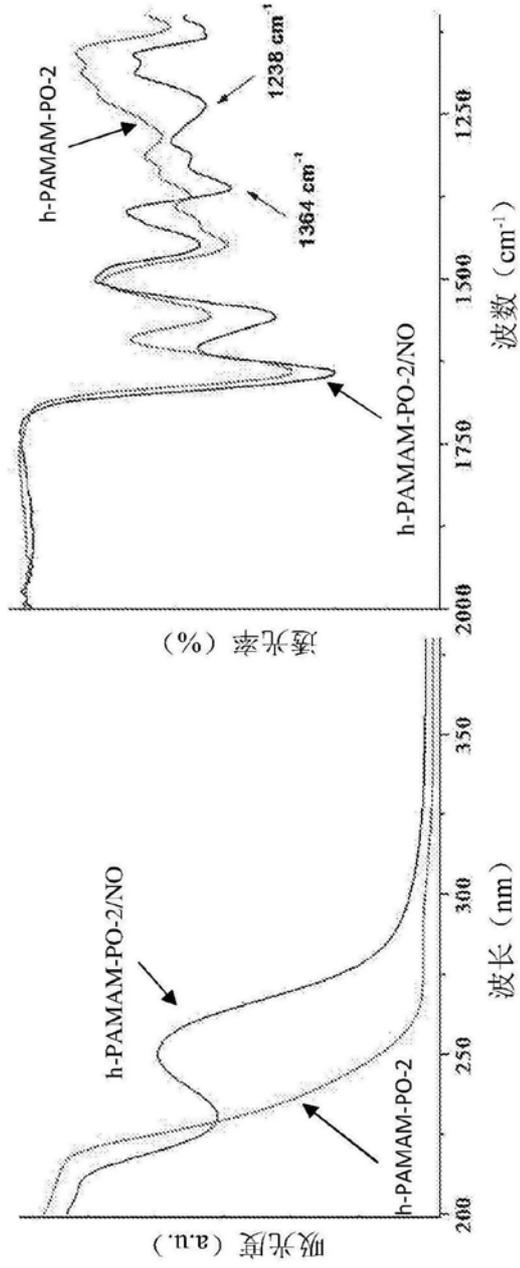


图3a

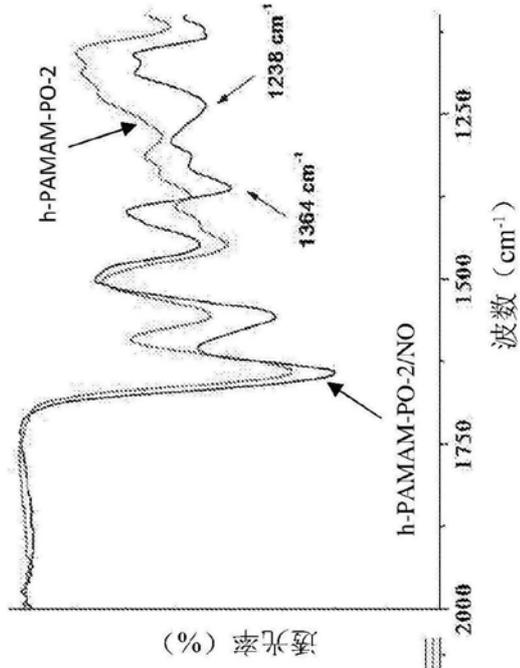


图3b

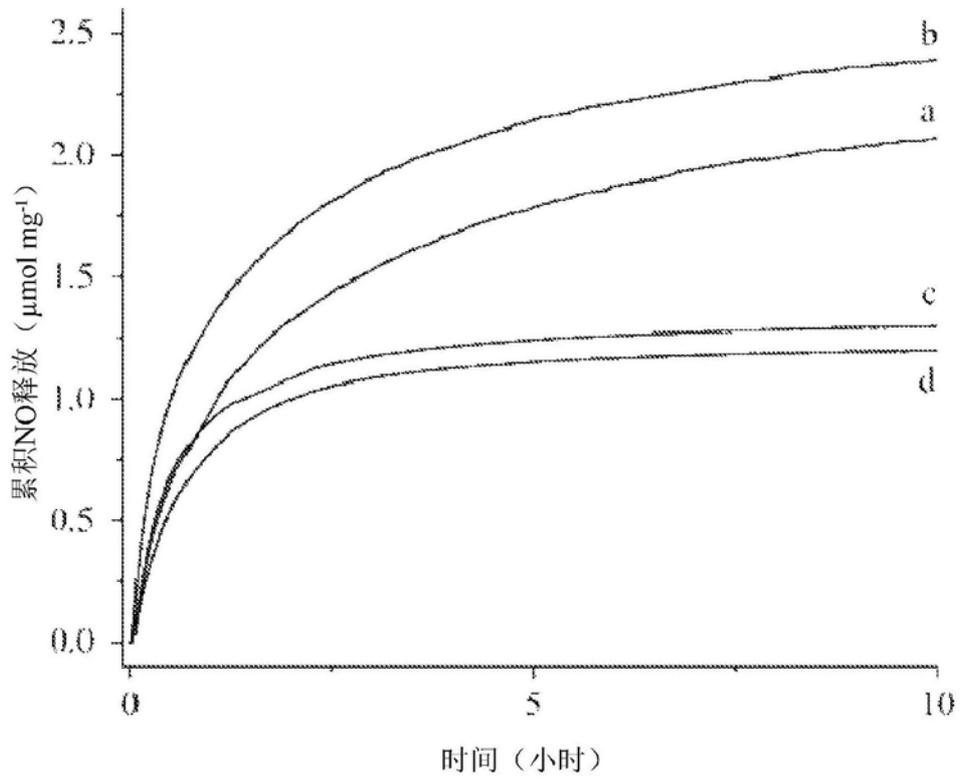


图4

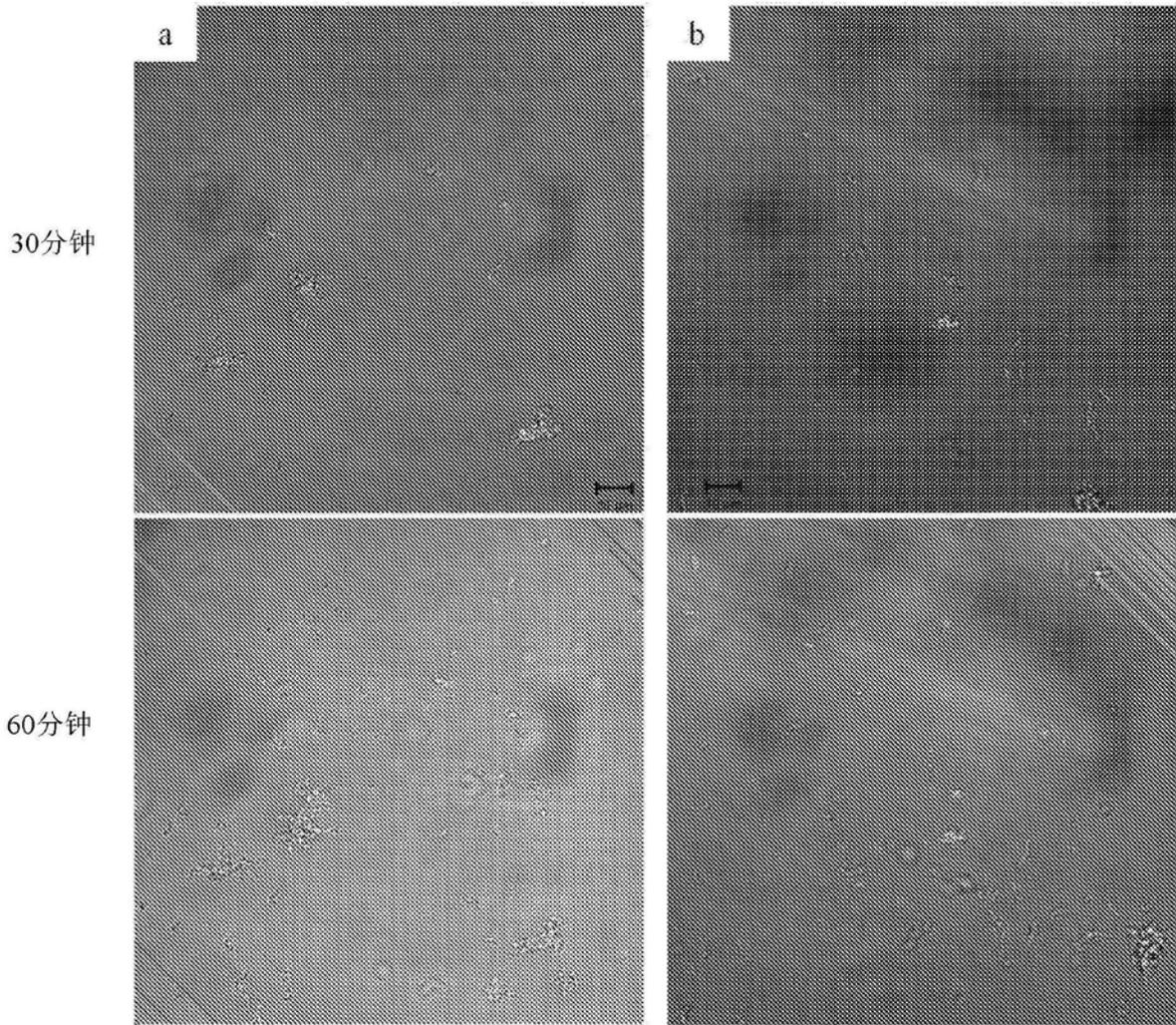


图5a

图5b

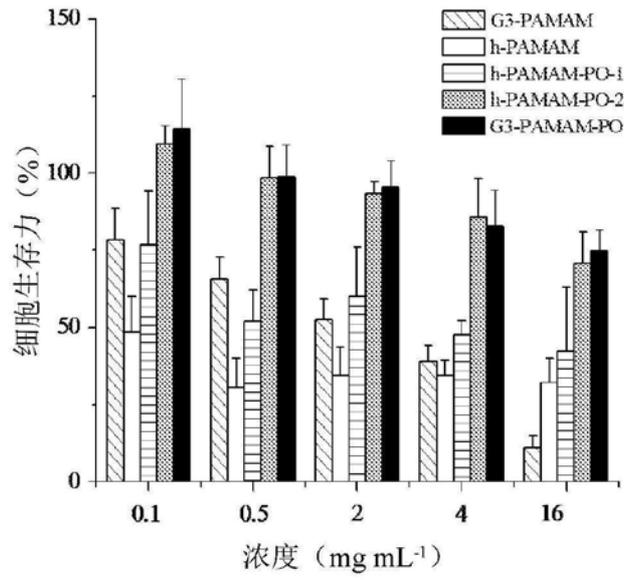


图6a

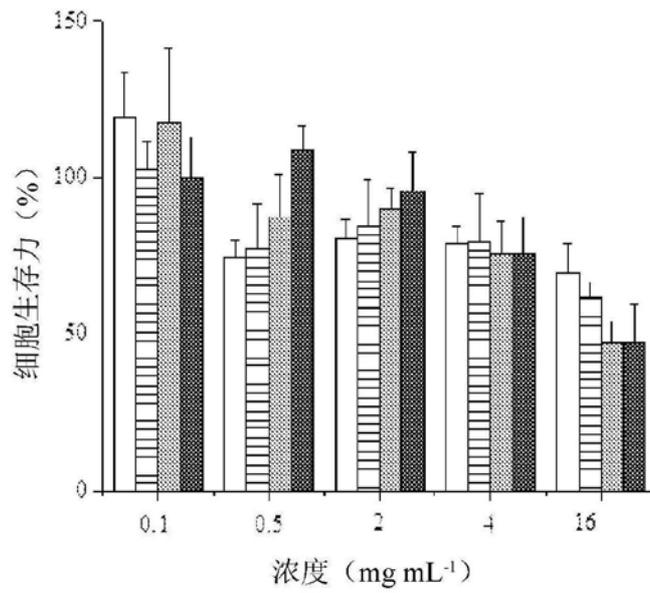


图6b

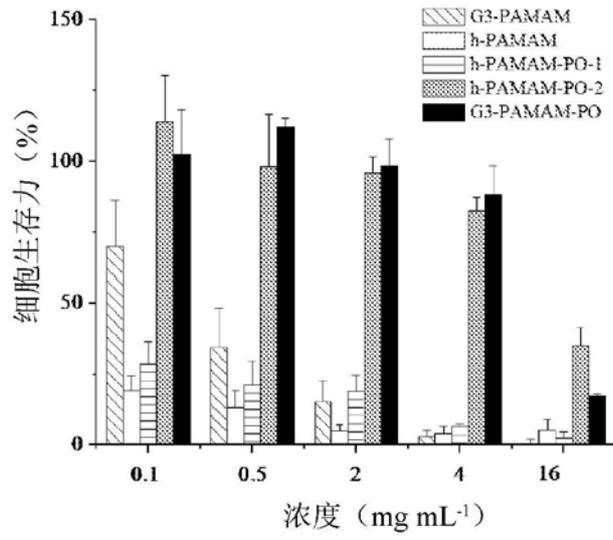


图7a

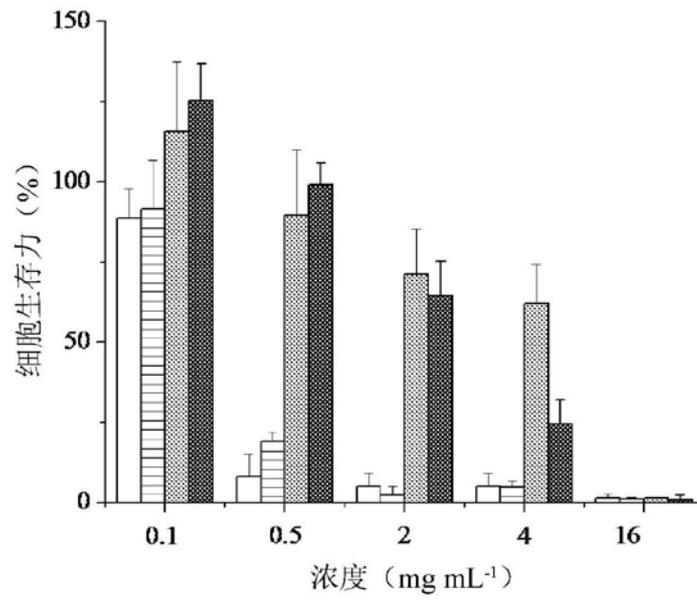


图7b

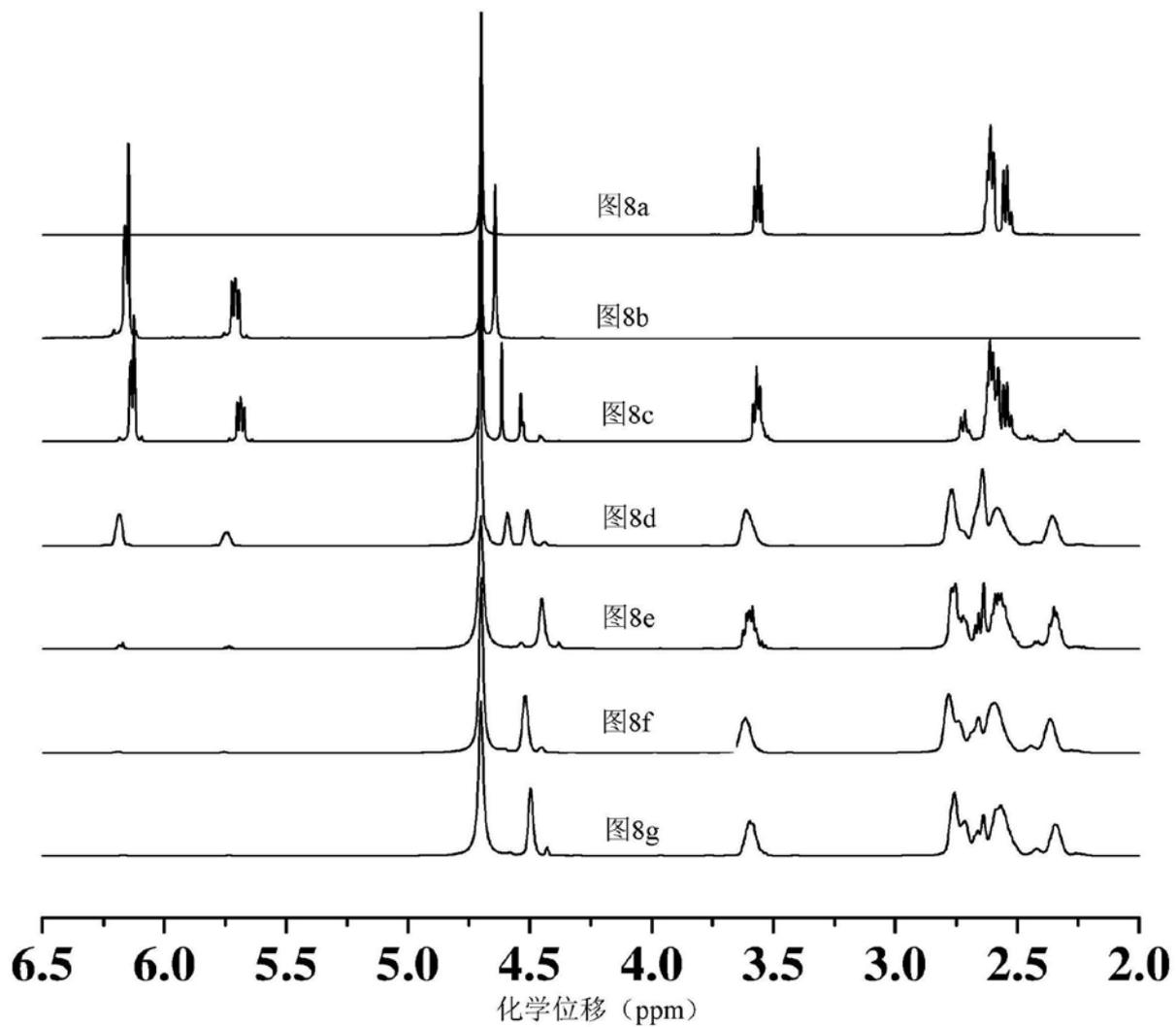


图8a-8g

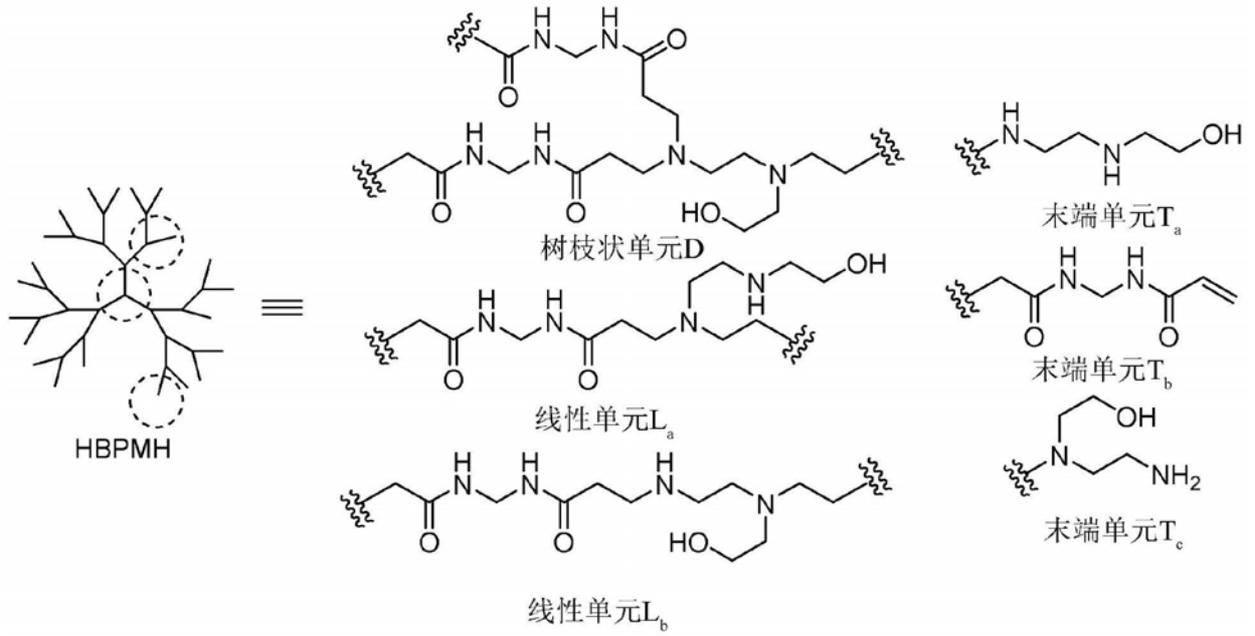


图9

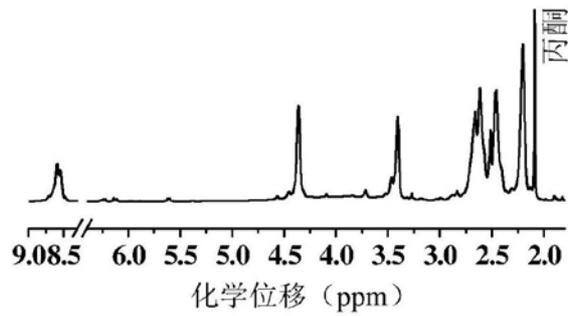


图10a

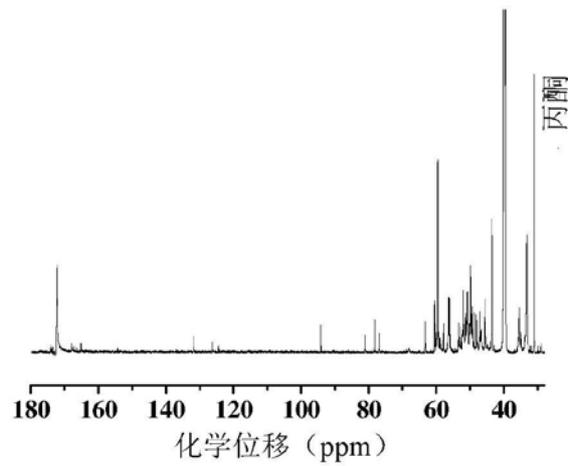


图10b

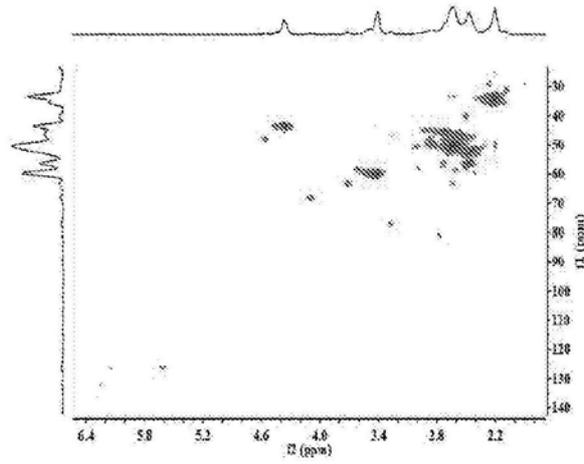


图10c

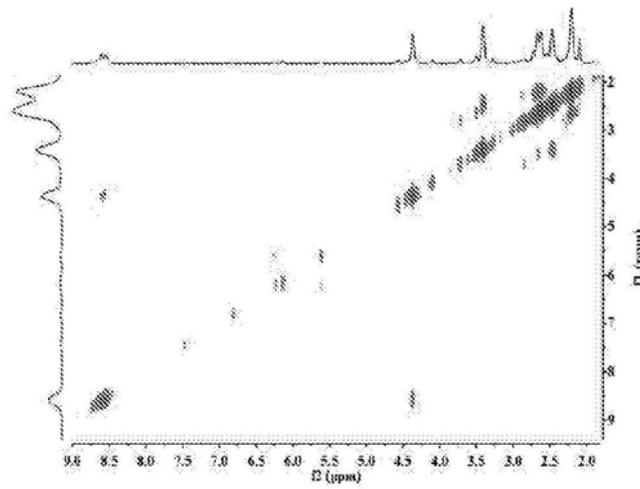


图10d

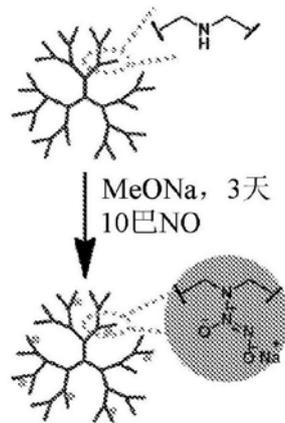


图11a

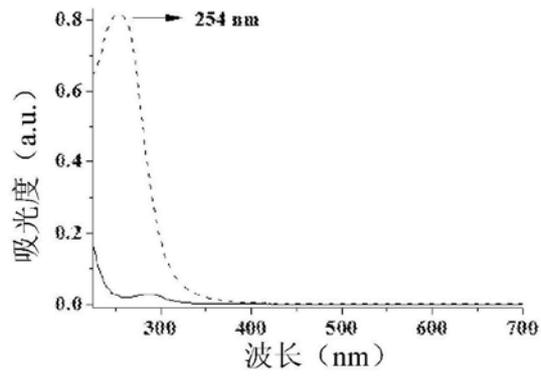


图11b

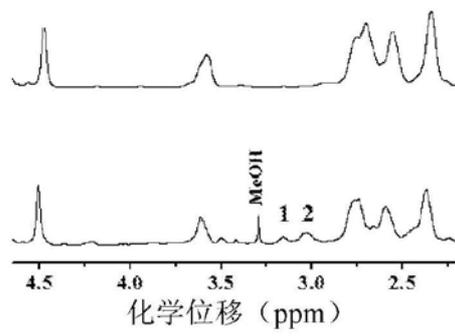


图11c

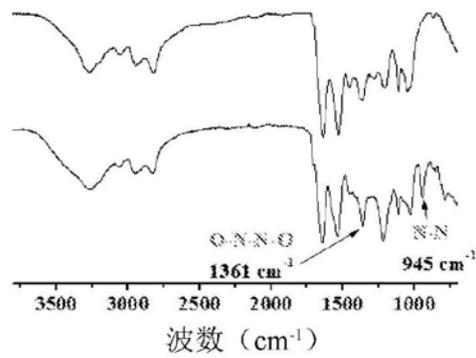


图11d

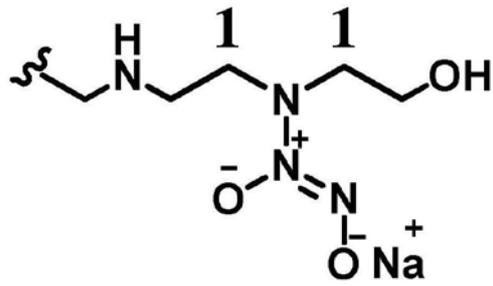


图12a

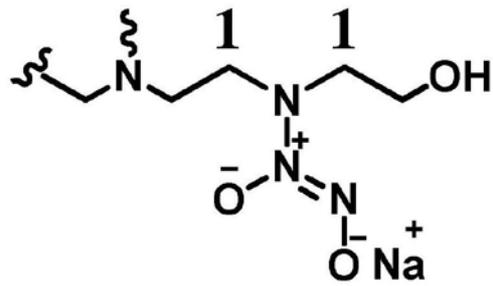


图12b

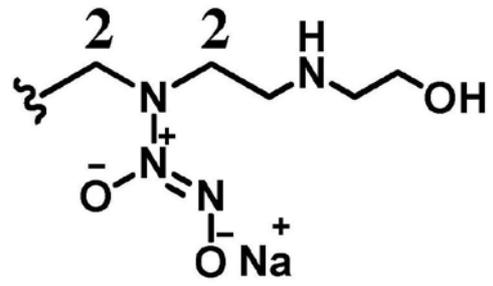


图12c

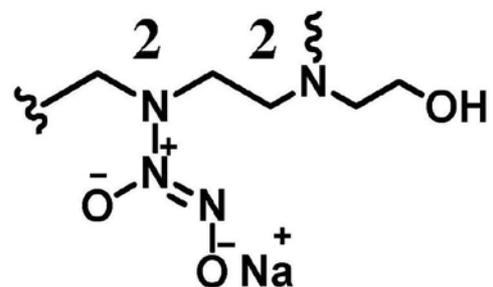


图12d

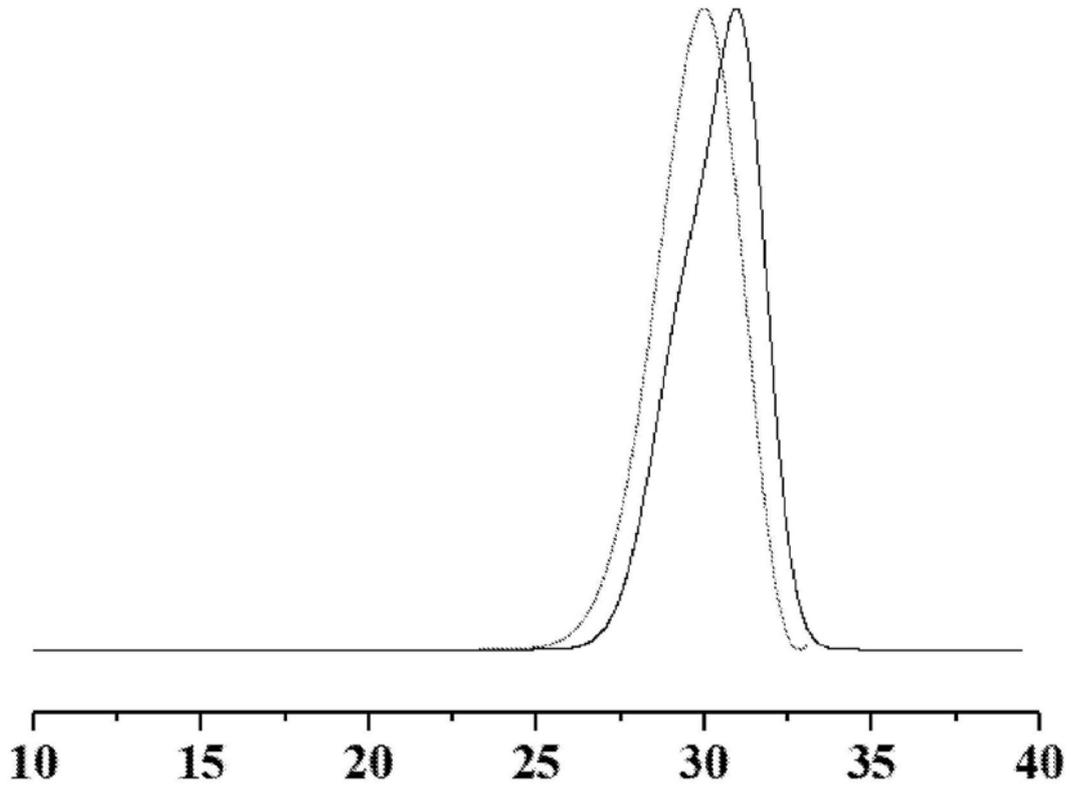


图13

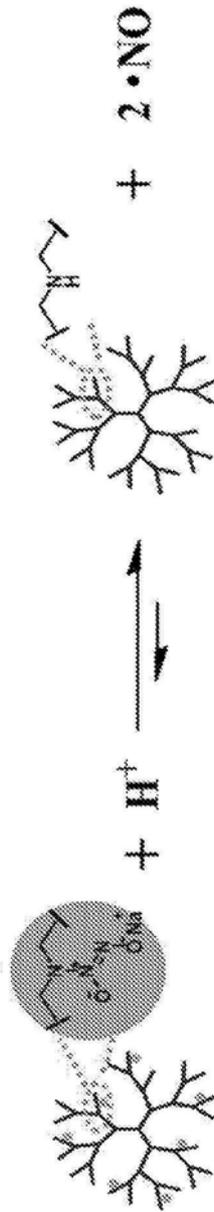


图14a

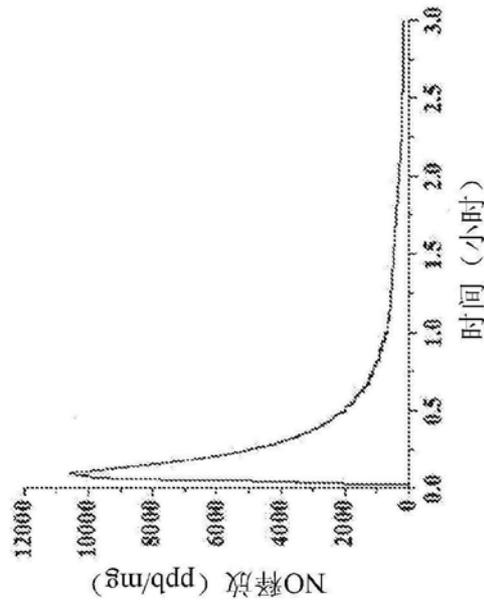


图14b

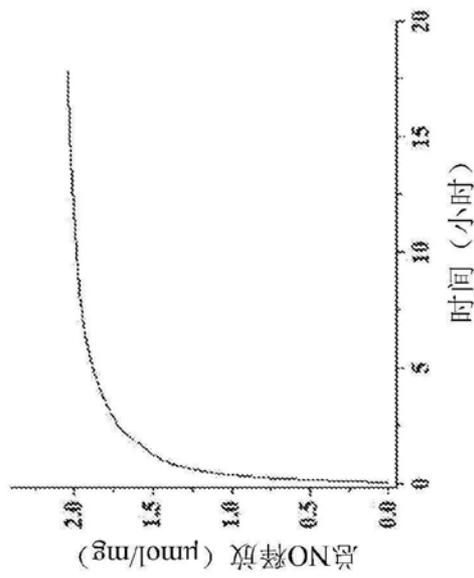


图14c

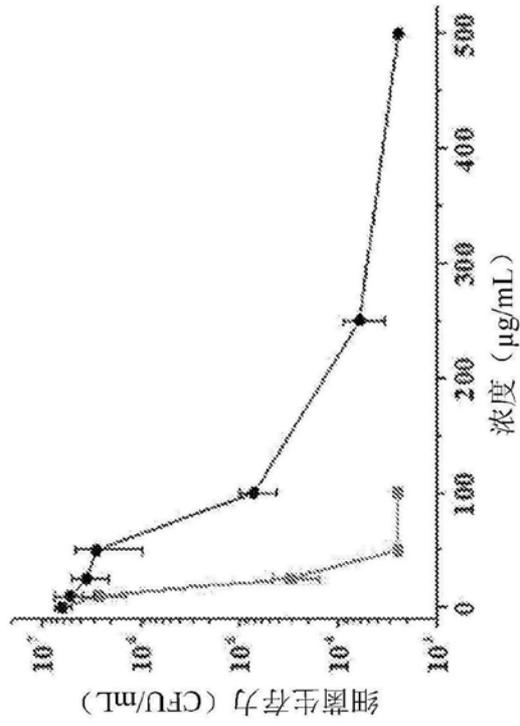


图15a

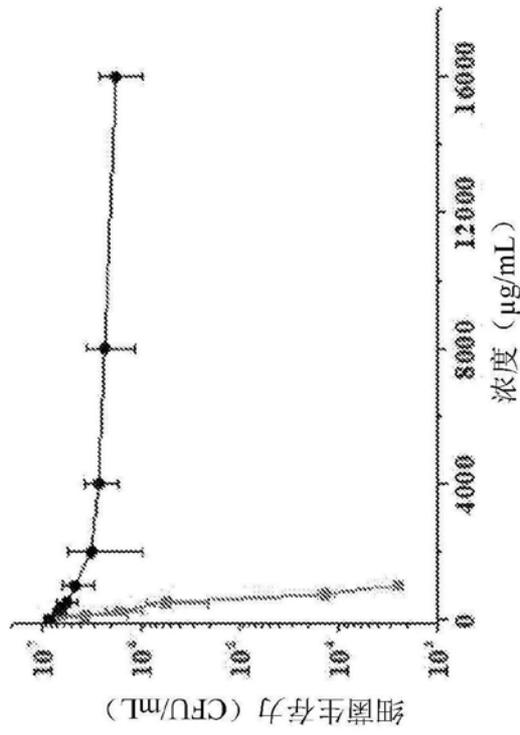


图15b

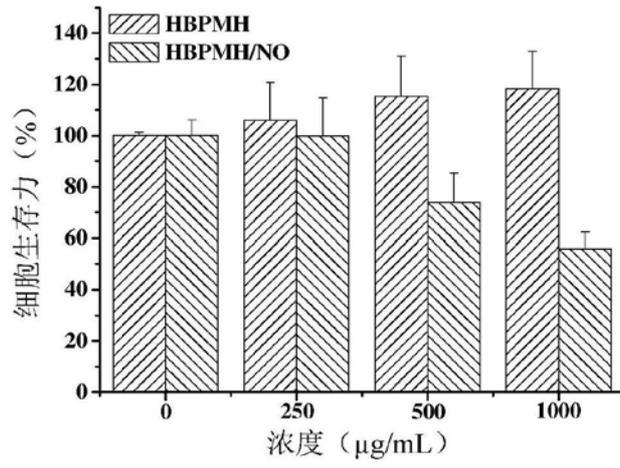


图16a

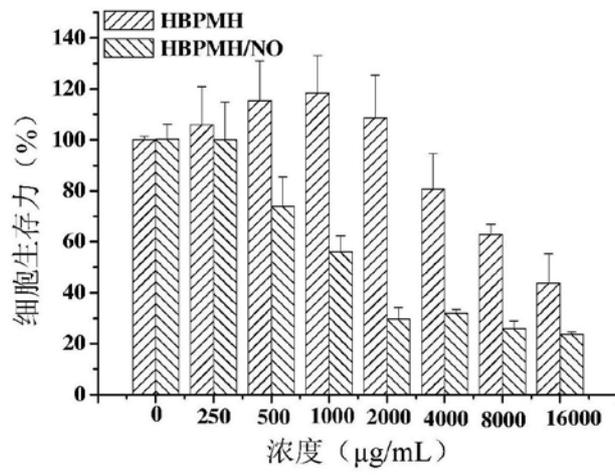


图16b

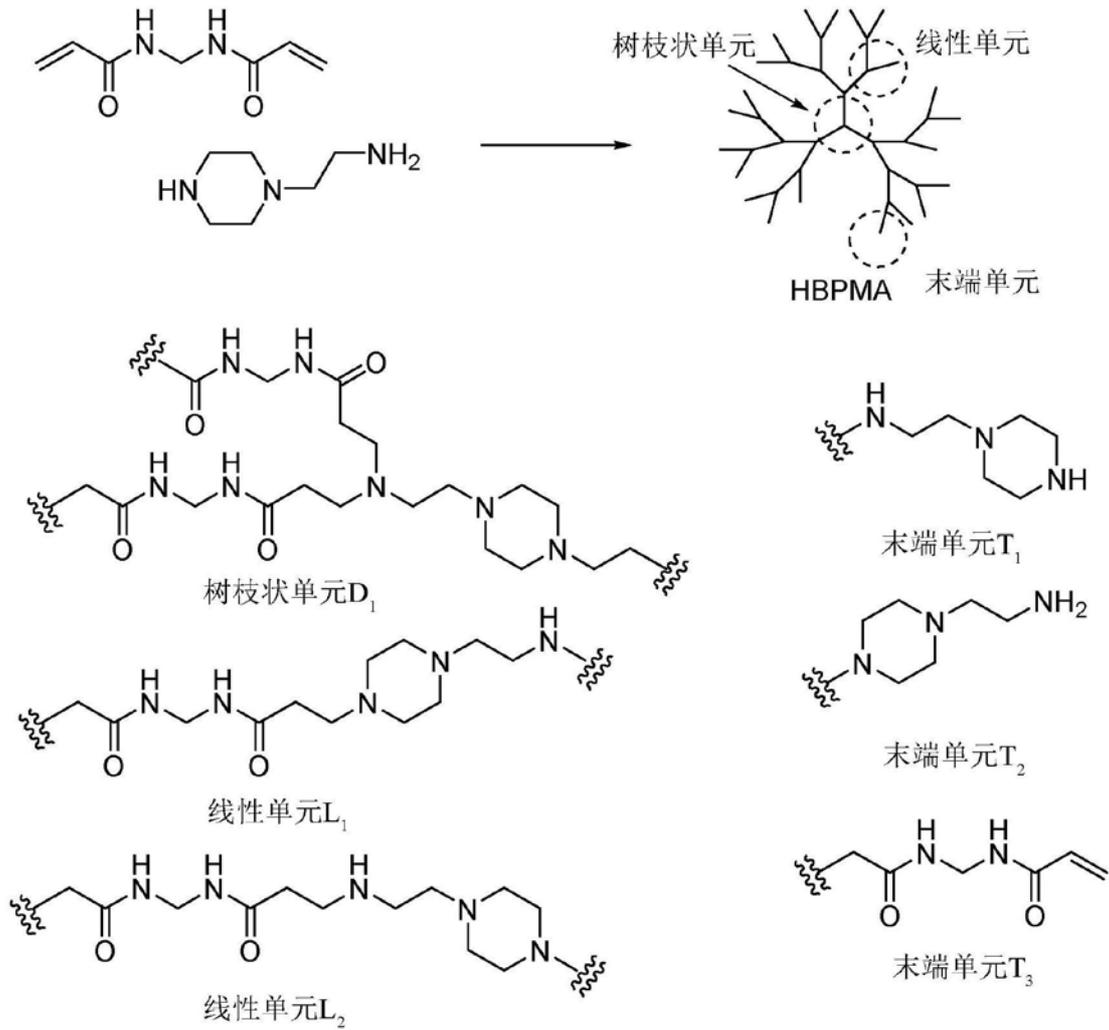


图17

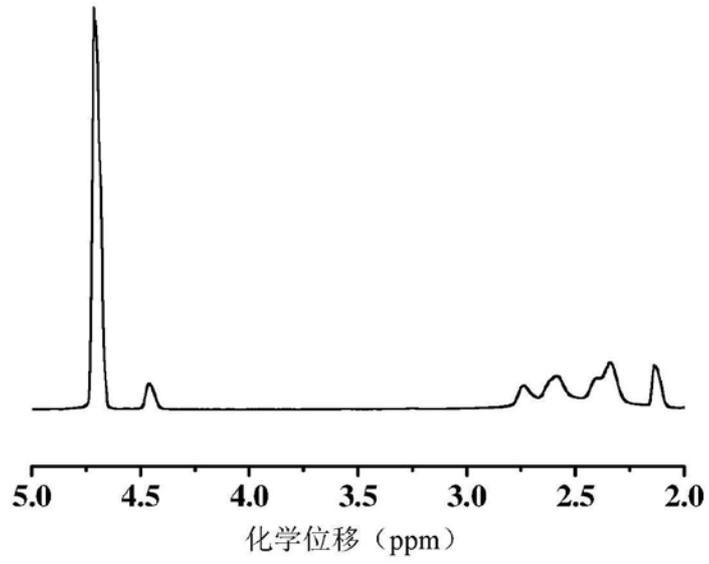


图18a

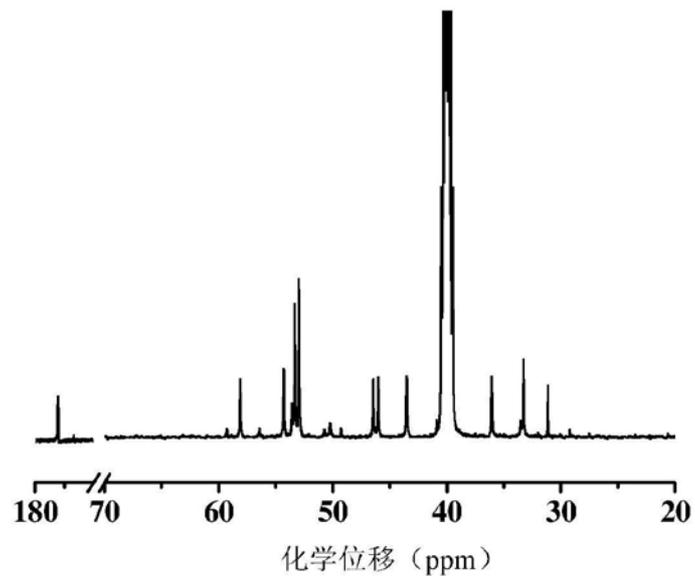


图18b

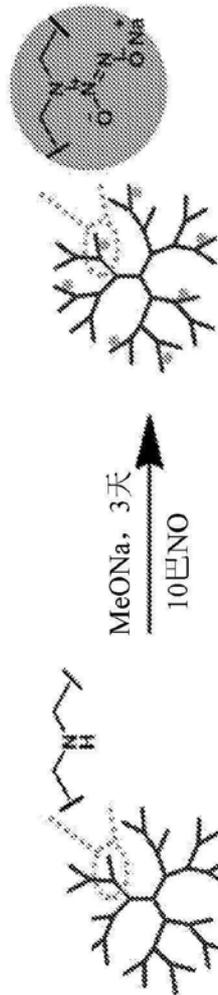


图19a

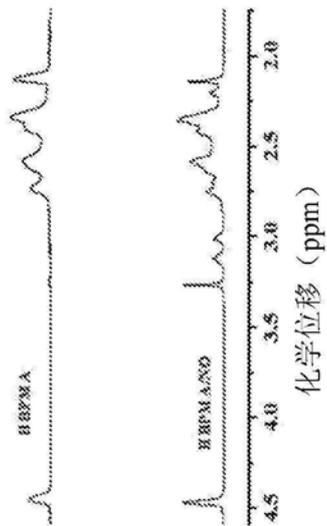


图19b

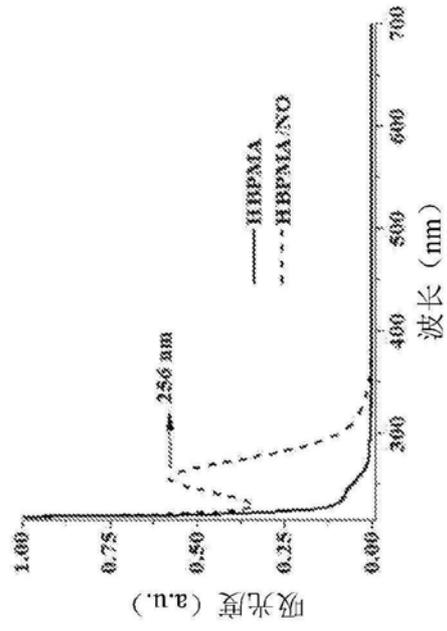


图19c



图20a

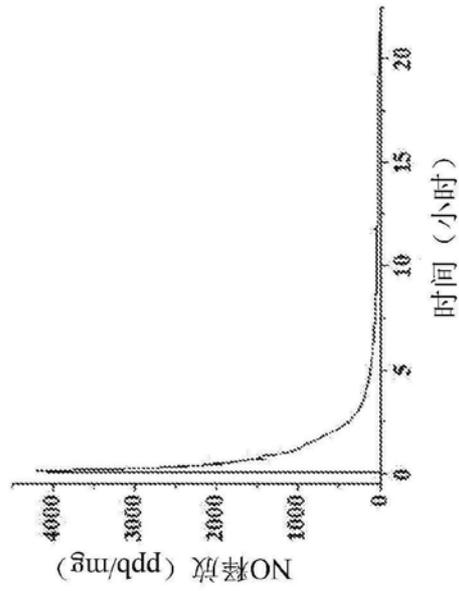


图20b

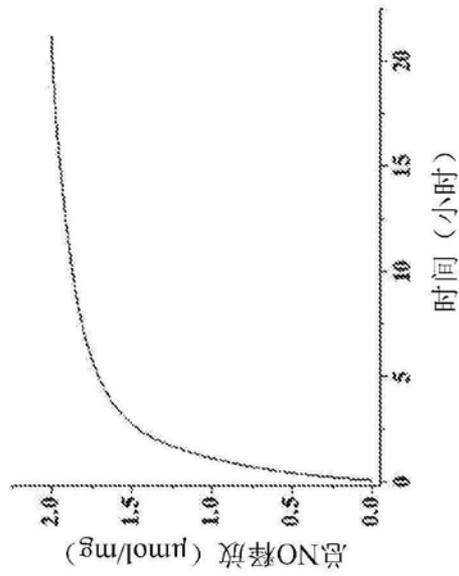


图20c