

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 51/00 (2006.01)

A61M 36/14 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780045874.7

[43] 公开日 2009年11月4日

[11] 公开号 CN 101573143A

[22] 申请日 2007.12.11

[21] 申请号 200780045874.7

[30] 优先权

[32] 2006.12.11 [33] US [31] 60/869,472

[86] 国际申请 PCT/US2007/025403 2007.12.11

[87] 国际公布 WO2008/073458 英 2008.6.19

[85] 进入国家阶段日期 2009.6.11

[71] 申请人 伯拉考成像股份公司

地址 意大利米兰

[72] 发明人 P·布塞 B·拉米

E·R·马里奈利 S·珀雄

宋波 R·E·斯文森

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 罗菊华

权利要求书 8 页 说明书 168 页 附图 11 页

[54] 发明名称

纤维蛋白结合肽及其缀合体

[57] 摘要

本发明提供一种与目前已知的纤维蛋白结合肽相比、具有高结合亲和性和优异的物理特性的纤维蛋白结合肽。这些纤维蛋白结合肽可以与可检测标记物或治疗试剂缀合，并且用于检测和帮助治疗与纤维蛋白的存在有关的病理学状况，例如血栓、血管生成和肿瘤状况。所述的这些肽可以用于诸如MRI、超声成像和核医疗成像(例如PET、闪烁扫描成像等)之类的成像过程中。所述的肽还可以以治疗方式使用。本发明还提供了用于制备所述肽及其缀合体的过程和方法、以及使用所述肽及其缀合体的过程和方法。

1. 一种经分离的纤维蛋白结合肽，其包含选自 Seq005 和 Seq014-057 中的氨基酸序列。
2. 一种经分离的纤维蛋白结合肽，其包含选自 Seq005-P, Seq005-P2 和 Seq005-P3 中的氨基酸序列。
3. 一种药物组合物，其包含权利要求 1 的纤维蛋白结合肽或其可药用的盐。
4. 权利要求 3 所述的药物组合物，其进一步包含可药用的组分、赋形剂、载体、辅料或媒介物。
5. 一种包含至少一种权利要求 1 所述的纤维蛋白结合肽的诊断成像试剂，其中所述的纤维蛋白结合肽任选地通过连接体或间隔体与可检测标记物连接。
6. 权利要求 5 所述的诊断成像试剂，其中所述的试剂适用于一定的模式，所述的模式选自：磁共振成像、核成像、超声成像、X 射线成像和光学成像。
7. 权利要求 6 所述的诊断成像试剂，其中所述的试剂适用于光学成像。
8. 权利要求 7 所述的诊断成像试剂，其中所述的可检测标记物选自：染料分子、荧光分子、磷光分子、在 UV 光谱中进行吸收的分子、量子点、在近红外辐射或远红外辐射中能够进行吸收的分子。

9. 权利要求 8 所述的诊断成像试剂，其进一步包含连接体。

10. 权利要求 8 所述的诊断试剂，其中所述的可检测连接体为在近红外辐射中能够进行吸收的分子，该分子选自：Cy5.5、IRDye800、吲哚菁蓝绿(ICG)、四磺酸取代的吲哚菁蓝绿(TS-ICG)以及它们的组合。

11. 权利要求 8 所述的诊断试剂，其中所述的可检测标记物为染料分子，该染料分子选自具有大量的离域环体系和的吸收或发射范围为 400-1500 nm 的有机发色团和荧光团。

12. 权利要求 8 所述的诊断成像试剂，其中所述的可检测标记物为荧光分子。

13. 权利要求 4 所述的诊断成像试剂，其中所述的试剂适用于超声成像。

14. 权利要求 4 所述的诊断成像试剂，其中所述的试剂包含填充有气体的微泡。

15. 权利要求 5 所述的诊断成像试剂，其中所述的微泡包含填充有气体的微气泡。

16. 一种肽-磷脂缀合体，其包含权利要求 1 所述的纤维蛋白结合肽和磷脂。

17. 权利要求 16 所述的肽-磷脂缀合体，其中所述的磷脂选自：DSPE 和 DPPE。

18. 权利要求 16 所述的肽-磷脂缀合体，其中所述的磷脂为聚乙二

醇化的。

19. 权利要求 18 所述的肽-磷脂缀合体, 其中所述的聚乙二醇化的磷脂选自: DSPE-PEG2000 和 DPPE-PEG2000。

20. 权利要求 16 所述的肽-磷脂缀合体, 其中所述的肽和磷脂通过连接基团结合。

21. 权利要求 19 所述的肽-磷脂缀合体, 其中所述的连接基团包含选自亲水性聚合物和氨基酸链的部分。

22. 权利要求 21 所述的肽-磷脂缀合体, 其中所述的亲水性聚合物为聚乙二醇。

23. 权利要求 21 所述的肽-磷脂缀合体, 其中所述的氨基酸链包含脯氨酸。

24. 一种超声造影剂, 其包含权利要求 16 所述的肽-磷脂缀合体。

25. 权利要求 24 所述的超声造影剂, 其中所述的造影剂包含填充有气体的微泡。

26. 权利要求 25 所述的超声造影剂, 其中所述的填充有气体的微泡包含磷脂。

27. 权利要求 25 所述的超声造影剂, 其中所述的磷脂选自: DSPC、DPPG、DPPE、DSPG 和 DSPA。

28. 权利要求 27 所述的超声造影剂, 其中所述的磷脂包含 DSPC 和

DPPG。

29. 权利要求 27 所述的超声造影剂，其中所述的磷脂包含 DPPE 和 DPPG。

30. 权利要求 27 所述的超声造影剂，其中所述的磷脂包含 DSPC 和 DSPG。

31. 权利要求 27 所述的超声造影剂，其中所述的磷脂包含 DSPC 和 DSPA。

32. 权利要求 25 所述的超声造影剂，其中所述的填充有气体的微泡包含两种或多种成分，这些成分选自：DSPC、DPPG、DPPA、DSPA、DPPE、DSPG、DSPE-PEG1000、DSPE-PEG2000、棕榈酸和硬脂酸。

33. 权利要求 26 所述的超声造影剂，其中所述的气体选自：空气、氮气、氧气、CO₂、氢气、一氧化二氮、稀有或惰性气体、放射性气体、超极化的稀有气体、氟化气体、低分子量的烃、环烷烃、烯烃、炔烃、醚、酮、酯、卤化气体和/或它们的混合物。

34. 权利要求 33 所述的超声造影剂，其中所述的气体包含氟化气体。

35. 权利要求 34 所述的超声造影剂，其中所述的气体为 C₄F₁₀ 和氮气的混合物。

36. 权利要求 26 所述的超声造影剂，其进一步包含治疗试剂。

37. 一种超声造影剂，其包含至少一种权利要求 1 所述的纤维蛋白

结合肽。

38. 权利要求 37 所述的超声造影剂，其中所述的造影剂包含填充有气体的微泡。

39. 权利要求 38 所述的超声造影剂，其中所述的填充有气体的微泡包含磷脂。

40. 权利要求 39 所述的超声造影剂，其中所述的磷脂选自：二月桂酰-磷脂酰胆碱(“DLPC”)，二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(“DMPC”)，二棕榈酰-磷脂酰胆碱(“DPPC”)，二花生酰磷脂酰胆碱(“DAPC”)，二硬脂酰-磷脂酰胆碱(“DSPC”)，1-肉豆蔻酰-2-棕榈酰磷脂酰胆碱(“MPPC”)，1-棕榈酰-2-肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(“PMPC”)，1-棕榈酰-2-硬脂酰磷脂酰胆碱(“PSPC”)，1-硬脂酰-2-棕榈酰-磷脂酰胆碱(“SPPC”)，二油酰磷脂酰胆碱(“DOPC”)，1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(Ethyl-DSPC)，二月桂酰-磷脂酰甘油(“DLPG”)及其碱金属盐，二花生酰磷脂酰甘油(“DAPG”)及其碱金属盐，二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(“DMPG”)及其碱金属盐，二棕榈酰-磷脂酰甘油(“DPPG”)及其碱金属盐，二硬脂酰磷脂酰甘油(“DSPG”)及其碱金属盐，二油酰磷脂酰甘油(“DOPG”)及其碱金属盐，二肉豆蔻酰磷脂酸(“DMPA”)及其碱金属盐，二棕榈酰磷脂酸(“DPPA”)及其碱金属盐，二硬脂酰磷脂酸(“DSPA”)，二花生酰磷脂酸(“DAPA”)及其碱金属盐，二肉豆蔻酰磷脂酰-乙醇胺(“DMPE”)，二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(“DPPE”)，二硬脂酰磷脂酰-乙醇胺(“DSPE”)，二肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸(“DMPS”)，二花生酰磷脂酰丝氨酸(“DAPS”)，二棕榈酰磷脂酰丝氨酸(“DPPS”)，二硬脂酰磷脂酰丝氨酸(“DSPS”)，二油酰磷脂酰丝氨酸(“DOPS”)，二棕榈酰鞘磷脂(“DPSP”)，以及二硬脂酰鞘磷脂(“DSSP”)。

41. 权利要求 39 所述的超声造影剂，其中所述的磷脂选自：DSPC、

DPPG、DPPE、DSPG 和 DSPA。

42. 权利要求 38 所述的超声造影剂，其中所述的填充有气体的微泡包含两种或多种成分，这些成分选自：DSPC、DPPG、DPPA、DSPA、DPPE、DPPG、DSPE-PEG1000、DSPE-PEG2000、棕榈酸和硬脂酸。

43. 权利要求 38 所述的超声造影剂，其中所述的气体选自：空气、氮气、氧气、CO₂、氢气、一氧化二氮、稀有或惰性气体、放射性气体、超极化的稀有气体、氟化气体、低分子量的烃、环烷烃、烯烃、炔烃、醚、酮、酯、卤化气体和/或它们的混合物。

44. 权利要求 38 所述的超声造影剂，其中所述的气体包含氟化气体。

45. 权利要求 44 所述的超声造影剂，其中所述的气体为 C₄F₁₀ 和氮气的混合物。

46. 权利要求 38 所述的超声造影剂，其进一步包含治疗试剂。

47. 一种组合物，其包含至少一种权利要求 1 所述的纤维蛋白结合肽和治疗试剂。

48. 一种诊断或治疗方法，该方法包括向哺乳动物施用一种组合物，该组合物包含至少一种权利要求 1 所述的纤维蛋白结合肽。

49. 权利要求 48 所述的诊断或治疗方法，其中所述的组合物进一步包含可检测标记物或治疗试剂。

50. 权利要求 48 所述的诊断或治疗方法，其中所述的可检测标记

物包含光学成像试剂。

51. 权利要求 48 所述的诊断或治疗方法，其中所述的可检测标记物包含超声造影剂。

52. 权利要求 48 所述的诊断或治疗方法，其中所述的组合物包含治疗试剂，该治疗试剂选自：能够使凝块溶解的抗凝血-溶解血栓试剂或纤维蛋白溶解试剂、抗血管生成试剂、细胞毒性试剂、化疗试剂、肿瘤杀灭试剂和放射性治疗试剂。

53. 一种用于诊断或治疗与纤维蛋白沉积相关的病理学状况的方法，该方法包括向哺乳动物施用一种组合物，该组合物包含至少一种权利要求 1 所述的纤维蛋白结合肽。

54. 权利要求 53 所述的方法，其中所述的病理学状况选自：凝块、血栓栓塞性疾病、炎症性疾病、肿瘤和转移过程。

55. 权利要求 54 所述的方法，其中所述的组合物进一步包含可检测标记物或治疗试剂。

56. 权利要求 55 所述的方法，其中所述的可检测标记物包含光学成像试剂。

57. 权利要求 55 所述的诊断或治疗方法，其中所述的可检测标记物包含超声造影剂。

58. 权利要求 55 所述的诊断或治疗方法，其中所述的组合物包含治疗试剂，该治疗试剂选自：能够使凝块溶解的抗凝血-溶解血栓试剂或纤维蛋白溶解试剂、抗血管生成试剂、细胞毒性试剂、化疗试剂、肿

瘤杀灭试剂和放射性治疗试剂。

59. 一种用于对哺乳动物中含纤维蛋白的组织进行成像的方法，该方法包括向哺乳动物施用有效量的权利要求 5、7、14 或 25 中任一项所述的组合物，以及对所述的哺乳动物进行成像。

60. 一种用于对哺乳动物中含纤维蛋白的组织进行成像和/或治疗的方法，该方法包括向哺乳动物施用有效量的权利要求 5、7、14、25、36 或 46 中任一项所述的组合物，以及对所述的哺乳动物进行超声扫描从而对所述的含纤维蛋白的组织进行成像和/或治疗。

纤维蛋白结合肽及其缀合体

相关申请

本申请要求在 2006 年 12 月 11 日提交的美国临时申请 No. 60/869,472 的优先权和权益,该临时申请的内容在此以引用方式全文并入本文。

技术领域

本发明涉及用于检测和治疗与纤维蛋白沉积或聚集相关的病理学状况(例如血管内血栓)以及与血管生成过程相关的状况的纤维蛋白结合肽、多肽以及组合物。本发明包括用于诊断和/或治疗用途的、包含纤维蛋白结合肽的化合物。本发明还包括制备和使用这种肽、化合物和组合物的方法。

背景技术

血栓相关疾病是由于存在凝块而发展形成的血管状况。这些疾病是造成死亡率的主要原因,并因此开发血栓特异性诊断、治疗和检测方法以及试剂具有巨大的临床重要性。肺栓塞(PE)、深静脉血栓形成(DVT)、中风以及动脉硬化症是血栓相关疾病的实例。

DVT 是在腿和腹股沟的深血管中形成血块的状况。这些凝块能够阻断血液由腿流回到心脏。有时,一块凝块被分离,并由血流携带通过心脏到达血管,在此,凝块临时停留并减少或阻断血液向维管组织的流动。这种情况被称为栓塞。如果这些凝块临时停留在肺部血管中,则可以致命。

单单在美国,每年估计有 600,000 名患者患上 PE。这些患者中大约 378,000 名,PE 未被检测发现,并且这些患者中大约 114,000 名随后死于与该疾病有关的并发症。在许多情况下,这种高死亡率部分是

由于缺乏临床症状，并且还由于明显有限的现在可利用的研究和检测方法。

纤维蛋白还与各种癌症有关。在多种类型的肿瘤中发生异质模式的纤维蛋白/纤维蛋白原沉积是由大量相关和间接的证据所支持的观点，其中所述的证据表明纤维蛋白/纤维蛋白原在肿瘤基质（stroma）形成中是重要的（例如参见：Costantini V, Zacharski LR. Fibrin and cancer. *Thromb Haemost.* 1993; 69: 406; Dvorak HF. Thrombosis and cancer. *Hum Pathol.* 1987; 18: 275; Dvorak HF, Nagy JA, Berse B, et al. Vascular permeability factor, fibrin, and the pathogenesis of tumor stroma formation, *Ann N Y Acad Sci.* 1992; 667: 101; Cavanagh PG, Sloane BF, Honn KV. Role of the coagulation system in tumor-cell-induced platelet aggregation and metastasis. *Hemostasis.* 1988; 18: 37 和 Bardos H, Molnar P, Csecsei G, Adany R. Fibrin deposition in primary and metastatic human brain tumours. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1996; 7: 536)。事实上，已经描述了癌症患者中的许多明显的止血异常，包括弥散性血管内凝结、出血事件和游走性血栓性静脉炎。止血并发症是造成癌症患者死亡的常见原因。许多肿瘤细胞具有强的促凝血活性，这种活性促进了凝血系统的局部激活。已经显示肿瘤介导的凝血级联活性涉及肿瘤基质的形成和血行转移的促进。此外，已知纤维蛋白基质促进了大量不同种类细胞（包括转化细胞、巨噬细胞和成纤维细胞）的迁移。特别是，与伤口愈合中非常类似，纤维蛋白/纤维蛋白原与其他粘附性糖蛋白一起沉积到细胞内基质（ECM）中已经显示出起到了支持生长因子结合的支架的作用、并且在血管形成和肿瘤细胞生长中促进了粘附、增殖和转移的细胞应答（例如参见：Dvorak HF, Nagy JA, Berse B, et al. Vascular permeability factor, fibrin, and the pathogenesis of tumor stroma formation, *Ann N Y Acad Sci.* 1992; 667: 101; Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM. Tissue Factor, Thrombin, and Cancer. *Chest.* 2003; 124: 58S-68S;

Brown HF, Van der Water L, Hervey VS, Dvorak HF. Fibrinogen influx and accumulation of cross-linked fibrin in healing wounds and in tumor stroma. *Am J Pathol.* 1988; 130:4559; Dvorak HF, Hervey VS, Estrella P, Brown LF, Mc-Donagh J, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis: implication for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest.* 1987; 57:673 和 Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM. Tissue Factor, Thrombin and Cancer. *Cest.* 2003; 124:58S-68S)。人的大多数实体肿瘤中都得包含相当多的交联纤维蛋白，这表明其在肿瘤基质形成中是重要的。研究表明，纤维蛋白原和纤维蛋白位于肿瘤宿主细胞的界面上（例如参见：Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM. Tissue Factor, Thrombin and Cancer. *Cest.* 2003; 124:58S-68S; Costantini V, Zacharski LR, Memoli VA et al. Fibrinogen deposition without thrombin generation in primary human breast cancer. *Cancer Res.* 1991; 51: 349-353 和 Simpson-Haidaris PJ and Rybarczyky B. Tumors and Fibrinogen: The Role of Fibrinogen as an Extracellular Matrix Protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2001 936(1): 406 - 425)。纤维蛋白基质促进了新血管的形成，这支持了这样的观点：纤维蛋白可能通过与伤口修复相类似的机制来促进肿瘤基质的形成。

此外，在血浆纤维蛋白原的水平与肿瘤的尺寸、肿瘤侵入的深度和肿瘤转移之间似乎存在相关性（例如参见：Lee JH, Ryu KW, Kim S, Bae JM. Preoperative plasma fibrinogen levels in gastric cancer patients correlate with extent of tumor. *Hepatogastroenterology* 2004; 51:1860 - 3)。此外，已知纤维蛋白/血小板涉及保护肿瘤细胞免于由人免疫系统提供的、循环中的自然杀伤单元的作用，由此改善了循环中的肿瘤的存活（例如参见：Palumbo JS, et al. platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination

of tumor cells. *Blood*, 2005; 105:178)。这暗示了例如使用靶向肿瘤的抗体的传统肿瘤治疗方法可能不会有效地治疗含有纤维蛋白的肿瘤，因为这些肿瘤受到了纤维蛋白的保护。

因此，使纤维蛋白沉积显现并且靶向抑制/破坏已经形成的脉管系统和凝结的纤维蛋白被认为是对抗恶性疾病进程的重要工具。因此，仍需要用于敏感地诊断和特异性地治疗与纤维蛋白沉积有关的病理学状况以及特别是实体肿瘤中的、经改善的纤维蛋白结合化合物。

此外，纤维蛋白还涉及血管生成过程。在发育中的胚胎中，初级血管网络是通过在被称为血小管形成的过程中中胚层细胞的原位分化而形成的。在胚胎血小管形成后，据信，在胚胎或成年人中，在血管生成中所有新血管的随后的形成受到了新毛细管的萌发或分裂的控制，其中所述的新毛细管得自预先存在的脉管系统(Pepper, M. et al., 1996. *Enzyme Protein*, 49:138-162; Risau, W., 1997. *Nature*, 386:671-674)。血管生成不仅涉及胚胎的发育、以及正常组织的生长和修复，其还涉及雌性的生殖周期、怀孕的确立和保持、以及伤口和骨折的修复。

除了正常的血管生成过程以外，血管生成事件还涉及大量重要的病理过程，特别是肿瘤生长和转移，以及其中血管增殖被增加的其他状况，例如糖尿病视网膜病、银屑病、关节病和风湿性关节炎。事实上，在肿瘤由增生向肿瘤式生长过渡的过程中，血管生成是如此重要，使得抑制血管生成显示出作为癌症治疗的希望(Kim, K. et al., 1993. *Nature*, 362:841-844)。在这些病理过程中，纤维蛋白提供了形成新血管所必须的结构网。

因此，仍需要检测纤维蛋白和纤维蛋白原相关疾病的存在，敏感且有效的测定法。更具体地说，仍需要可以特异性地结合纤维蛋白的，并且可以用于检测病理凝血状况以及与病理血管生成过程相关状况的非侵入性试剂。

发明概述

响应对用于检测、定位、测量和治疗纤维蛋白凝块以及与纤维蛋白相关病理过程的，经改善的材料和方法的需要，我们现在已经出人意料地发现了若干种非天然形成的多肽，这些多肽表现出另人意想不到的高度的纤维蛋白特异性结合。与之前已知的肽相比，这些多肽能够优异地与纤维蛋白特异性结合，并且具有改善的物理性质（例如溶解性）。

本发明的另一方面涉及通过与可检测标记物缀合对上述肽的修饰从而提供纤维蛋白特异性成像剂。例如，其中纤维蛋白结合肽与放射性标记物、酶标记物、可通过磁共振成像(MRI)的标记物（例如MR顺磁螯合剂或微粒）缀合的化合物，其中纤维蛋白结合肽与超声造影剂（例如填充有气体的微泡（例如微气泡、微粒、微球、乳剂或脂质体））缀合或者被引入到超声造影剂中的化合物，或者其中纤维蛋白结合肽与光学成像剂（包括光学染料）缀合的化合物。根据本发明的结合部分可用于其中结合、检测或分离纤维蛋白或其片段是有利的任何应用中。

本发明还涉及通过与治疗剂缀合对上述肽的修饰从而提供纤维蛋白特异性治疗。此类试剂可以包括例如化疗试剂、细胞毒性试剂、放射性治疗试剂、肿瘤杀灭试剂或溶解血栓试剂。在优选的实施方案中，通过与放射性治疗试剂（包括治疗性放射性核素）缀合而修饰肽。

本发明所公开的结合部分的特别有利的用途为在体内对血栓以及纤维蛋白相关的病理过程进行成像的方法。这些过程包括例如肺栓塞(PE)、深静脉血栓形成(DVT)、中风、动脉硬化症和癌症（特别是实体肿瘤）。所述的方法使根据本发明的纤维蛋白特异性结合部分用于检测血栓或纤维蛋白相关病理过程的用途，其中所述的结合部分已经被可检测地标记以用作成像剂，包括磁共振成像(MRI)造影剂、X射线成像剂、放射性药物成像剂、超声成像剂和光学成像剂。

此外，新发现的纤维蛋白结合剂还可以有利地用于检测其中纤维蛋白起作用的多种其他病理生理学。在这些情况中，纤维蛋白成像剂可以是有用的直接或替代标志物，以用于诊断或治疗监控。例如，在

外科手术或发炎过程后经常发生腹膜粘附，并且腹膜粘附由纤维蛋白网络、成纤维细胞、巨噬细胞和新血管构成。患有风湿性关节炎、狼疮或化脓性关节炎的患者在其关节的滑液中通常具有大量的被称为米粒样小体的含纤维蛋白组织。在血栓性血小板减少性紫癜（一种贫血症）中，细动脉中纤维蛋白的沉积会导致汹涌的血流，从而导致红细胞的应激和破坏。本发明的纤维蛋白结合部分可以用于检测和诊断这种纤维蛋白相关的紊乱。

所述纤维蛋白特异性试剂还可以用于检测其他状况，包括但不限于心脏、肝脏、肺、脑或其他器官的氧不足或缺血，以及用于检测肿瘤、糖尿病视网膜病、早期或高风险动脉硬化症、以及其他自体免疫和炎性紊乱。纤维蛋白特异性试剂还可以提供疾病模型的直接或替代标志物，所述疾病模型中认为氧不足和血管生成起到一定的作用。例如，在氧不足状况中，纤维蛋白（纤维蛋白原）在氧不足诱导因子 1 (HIF-1) 的控制下表达。

本发明的纤维蛋白结合肽还可以用于治疗性地治疗其中纤维蛋白起一定作用的病理生理学，其中包括但不限于纤维蛋白凝块、肿瘤、各种器官的氧不足或缺血、与血管生成有关的病理过程、腹膜粘附、风湿性关节炎、狼疮、化脓性关节炎和血栓性血小板减少性紫癜。例如，所述的纤维蛋白结合肽可以与合适的治疗性放射性核素缀合，并且可以用于放射性治疗中，特别是用于治疗肿瘤。而且，所述的纤维蛋白结合肽可以与合适的治疗试剂缀合。

通过参照以下发明详述，将使本发明的这些和其他方面变得显而易见。

附图说明

图 1 示出了用于制备根据本发明的代表性连接体-功能化肽的方法。

图 2 示出了用于制备根据本发明的代表性 5-羧基荧光素标记的肽的方法。

图 3 示出了用于制备根据本发明的代表性 DSPE-PEG200 肽缀合体的方法。

图 4 示出了用于制备根据本发明的代表性 DSPE-PG4-Glut 肽缀合体的方法。

图 5 示出了用于制备根据本发明的代表性 DPPE-Glut-PG2-JJ 肽缀合体的方法。

图 6a、6b 和 6c 示出了用于 ^{111}In 和镧系元素（例如顺磁性 Gd^{3+} ）或放射性镧系元素（如 ^{177}Lu 、 ^{90}Y 、 ^{153}Sm 和 ^{166}Ho ）的优选整合剂的实例。

图 7a 和 7b 示出了放射性金属离子（例如 $^{90\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{186}Re 和 ^{188}Re ）的优选整合剂的实例。

图 8 涉及在注射（25 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 的络合体）螯合络合体 1（底部）和参照化合物（顶部）后 4h 得到的 T1 加权 MRI 图像（连续的切片），如实施例 26 所述。

定义

如本文所用，除非另作说明，否则术语“多肽”用于指两个或多个氨基酸通过肽酰胺键（ $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ）而与主链（与侧链相对）连接的化合物。在本文中，术语“肽”可以与“多肽”互换使用，但是“肽”通常用于指氨基酸少于 25 个的多肽。

术语“纤维蛋白衍生的多肽”是指与纤维蛋白具有免疫交叉反应性的纤维蛋白或纤维蛋白片段的任何亚成分，包括所述蛋白质的免疫反应性片段。

术语“结合”是指通过标准测定法（包括本文所述的那些）的测定结合多肽识别给定的靶标，并与该靶标可逆地结合。这些标准测定法包括但不限于平衡透析、凝胶过滤、以及对由于结合而导致的光谱变化的监控。

术语“特异性”是指结合多肽对一种靶标比对另一种靶标具有更高的结合亲和性。术语“纤维蛋白特异性”是指纤维蛋白结合部分对纤维蛋白比对不相关的靶标具有更高的亲和性。结合特异性可以通过

两种测试靶标材料的解离平衡常数 (K_D) 或结合平衡常数 (K_A) 来表征, 或者可以为相对结合强度的任意测定值。

如本文所用, 术语“结合部分”是指能够与另一种分子形成结合络合体的任何分子。“纤维蛋白结合部分”为能够与凝块、可溶或不可溶的纤维蛋白、或者可溶或不可溶的纤维蛋白片段形成络合体的结合部分, 其中所述的纤维蛋白片段具有纤维蛋白而非纤维蛋白原所表现出的结构或特征。被定义为“纤维蛋白衍生”多肽的片段也包括在纤维蛋白的可溶或不可溶的片段中。就本发明的目的而言, 纤维蛋白衍生多肽可以用作本文所述的 DD、DD 二聚体、和 DD(E) 多肽的集合术语。这种纤维蛋白衍生多肽通常是通过对接联的纤维蛋白进行蛋白水解处理、但使其仍保持纤维蛋白的独特的结构特征来产生。

特异性的纤维蛋白结合肽在本文中有描述 (例如包括在表 1 和 2 中所包括的那些), 并且杂交肽和嵌合肽都被并入到所述的肽中。

除了本文进一步描述的可检测标记物以外, 所述的结合多肽可以与治疗试剂连接或缀合, 其中所述的治疗试剂包括放射治疗试剂、细胞毒性试剂、肿瘤杀灭试剂或酶、溶解血栓试剂或酶 (例如 tPA, 血纤蛋白溶酶原, 链激酶, 尿激酶, 水蛭素)、脂质体 (例如装载有治疗试剂 (如溶解血栓的试剂、合适的超声气体、或这二者) 的脂质体)。此外, 本发明的结合多肽可以与固体支持物、孔、板、珠子、管子、载玻片、过滤器或盘结合或连接。此外, 所有这种经修饰的纤维蛋白结合部分都被认为是纤维蛋白结合部分, 只要它们保持了与纤维蛋白或纤维蛋白衍生多肽结合的能力。

如本文所用, “标记基因”或“可检测标记物”是能够产生可检测信号的基因或部分。特别是, 标记基因或诊断标记物可以产生用于诊断成像 (例如磁共振成像、放射性成像、超声成像、X 射线成像、光成像) 的信号, 或者带有诸如放射性金属或其他可以用于放射性治疗或其他形式的治疗的实体的部分。

术语“治疗试剂”或“治疗剂”是指在体内具有有利的治疗性或细胞毒性作用的化合物或试剂。治疗试剂包括被称为例如生物活性试

剂、细胞毒性试剂、药品、化疗试剂、放射性治疗试剂、遗传材料等的那些组合物。

如本文所用，术语“患者”是指任何哺乳动物，特别指人。

术语“可药用”的载体或赋形剂是指可以与本发明的化合物一起向患者施用、但不会破坏所述化合物的生物或药物活性的非毒性载体或赋形剂。

以下常用的缩写将在本说明书的全文中使用：Ac₂O - 乙酸酐，CAN - 乙腈，Ac - 乙酰基，API-ES - 大气压离子化电喷射，BOP - 苯并三唑-1-基氧基-三(二甲基氨基)-磷鎓六氟磷酸，Bn - 苄基，Cbz - 苄氧基羰基，CF5-NHS - 5-羧基荧光素，琥珀酰亚胺酯(单异构体)，Cha - 2-环己基-L-丙氨酸，DCC - 二环己基碳二亚胺，DCM - 二氯甲烷，Ddhh - 12,26-二氨基-1,11-二氧-3,6,9,16,19,22-hexaoxahexacosanoyl，Dga - diglycolyl，3-oxapentan-1,5-di-oyl，DIC - N,N'-二异丙基碳二亚胺，DIEA - N,N-二异丙基乙胺，DMA - 二甲基乙酰胺，DMF - 二甲基甲酰胺，DMSO - 二甲基亚砷，DPPE - 1,2-二棕榈酰-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺(通常还称为二棕榈酰磷脂酰乙醇胺)，DPPG - 1,2-二棕榈酰-*sn*-甘油-3-[磷酸-*rac*-(1-甘油)]钠盐(通常还称为二棕榈酰磷脂酰甘油)，DPPS - 1,2-二棕榈酰-*sn*-甘油-磷酸-L-丝氨酸(通常还称为二棕榈酰磷脂酰丝氨酸)，DSPA - 1,2-二硬脂酰-*sn*-甘油-磷酸钠盐(通常还称为二硬脂酰磷脂酸)，DSPE - 1,2-二硬脂酰-*sn*-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(通常还称为二硬脂酰磷脂酰乙醇胺)，DSPE-PG4-NH₂ - {1,2-二硬脂酰-*sn*-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)2000]}，DPPE-PG4-NH₂ - {1,2-二棕榈酰-*sn*-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)2000]}，DSPE-PEG1000 - 二硬脂酰-甘油-磷脂酰乙醇胺-N-甲氧基(聚乙二醇)1000，DSPS - 1,2-二硬脂酰-*sn*-甘油-3-(磷酸-L-丝氨酸)(通常还被称为二硬脂酰磷脂酰丝氨酸)，DSG - 二琥珀酰亚胺戊二酸，EDAC - 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 HCl，EtOH - 乙醇，Et₂O - 二乙醚，EtOAc - 乙酸乙酯，Fmoc - 9-氟芞基甲氧基氧基羰基，Ffe4 - L-4-氟苯丙氨酸，F34fe - L-3,4-二氟苯

基丙氨酸, Glut - 戊二酰, 戊-1,5-二-醇, HOAc - 乙酸, HOAt - 1-羟基-7-氮杂苯并三唑, HPLC - 高效液相色谱, Hypt4 - 反式-4-羟基-L-脯氨酸, Fmoc-J 或 Fmoc-Adoa - Fmoc-8-氨基-3,6-二氧杂辛酸, HATU - N-((二甲基氨基)-1H-1,2,3-三唑(4,5-b)吡啶-1-基亚甲基)-N-亚甲基甜菜碱六氟磷酸-N-氧化物, HBTU - 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯, HOBt - N-羟基苯并三唑, ivDde - (4,4-二甲基-2,6-二氧环己-1-基)-3-甲基丁基, MALDI - 基质辅助激光解吸附电离, Neg. ion - 阴离子, MeOH - 甲醇, MS - 质谱, NHS - N-羟基琥珀酰亚胺, NMM - N-甲基吗啉, NMP - N-甲基吡咯烷酮, PEG - 聚乙二醇(如果后面跟有数字,例如 PEG4000, 则其表明了多分散性 PEG 聚合物的大约平均分子量, 即, 在上述实例中位大约 4000 道尔顿), PFE - 全氟乙醇, Pip - 哌啶, Pd/C - 碳钯催化剂, Pd(PPh₃)₄ - 四(三苯基-膦)钯(0), Pos. ion - 阳离子, PyBOP - 六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷磷鎓, Pyr - 吡啶, t_r - 停滞时间(分钟), 试剂 B (TFA:H₂O:苯酚:三异丙基硅烷, 88:5:5:2), SATA - S-乙酰基硫代乙酰基, S(Galnac) - 0-(2-乙酰氨基-2-脱氧- α -D-吡喃半乳糖基)-L-丝氨酸, SPPS - 固相肽合成, 硬脂酸盐 - 硬脂酸钠, Su - 琥珀酰亚胺, SuO - 氧化琥珀酰亚胺, t-Bu - 叔丁基, TEA - 三乙胺, Thf2ca - 四氢呋喃-2-羧酸, TFA - 三氟乙酸, TIPS - 三异丙基硅烷, 9-氟炔基甲基氧基羰基 (fmoc 或 Fmoc), Ttda - 4,7,10-三氧杂十三烷-1,13-二氨基, Tuda - 3,6,9-三氧杂十一烷-1,11-二醇, Alloc - 烯丙氧基羰基, Boc - 叔丁氧基羰基, DSG - 二-N-羟基琥珀酰亚胺-戊二酸, PEG3400-NHS - 聚乙二醇 3400-N-羟基琥珀酰亚胺酯, Pmc - 2,2,5,7,8-戊甲基克罗曼铬镍基合金-6-磺酰基, Trt - 三苯甲基, DMAC - 二甲基乙酰胺。

氨基酸的缩写:

氨基酸	3-字母	1-字母	氨基酸	3-字母	1-字母
丙氨酸	ala	A	亮氨酸	leu	L
精氨酸	arg	R	赖氨酸	lys	K
天冬酰胺	asn	N	甲硫氨酸	met	M
天冬氨酸	asp	D	苯丙氨酸	phe	F
半胱氨酸	cys	C	脯氨酸	pro	P
谷氨酸	glu	E	丝氨酸	ser	S
谷氨酰胺	gln	Q	苏氨酸	thr	T
甘氨酸	gly	G	色氨酸	trp	W
组氨酸	his	H	酪氨酸	tyr	Y
异亮氨酸	ile	I	缬氨酸	val	V

发明详述

本发明提供了针对纤维蛋白的新鲜结合部分。这种结合部分可以在包含纤维蛋白或纤维衍生多肽的溶液或系统中对纤维蛋白或纤维衍生肽进行有效的检测，成像和定位。特别是，当将本发明的结合部分被适当标记后，该结合部分可用于检测、成像和定位含纤维蛋白的血栓或其他纤维蛋白特异性病理生理学，并由此可以用于形成多种诊断和治疗试剂，而这些诊断和治疗试剂可用于诊断和治疗与例如血管生成、血栓症和癌症（特别是实体肿瘤）相关的病理学状况。与已知的抗纤维蛋白抗体及其他纤维蛋白结合蛋白质相比，本发明的优选的结合部分以高亲和性（即，在低生理学相关浓度下起作用）与纤维蛋白和/或纤维蛋白衍生多肽结合，并且代表了优于目前已知的纤维蛋白结合部分的改进。

使用下文所述的技术（包括在实施例部分中描述的技术），出乎意料地发现，与目前已知的肽相比，表1和表2中所述的多肽具有优异的纤维蛋白特异性结合性质以及优异的物理性质。特别是，在目前已知的肽（Ac-WQPC*PWESWTFC*WDPGGGK-NH₂ (SEQ ID NO. 122)）中，位置6处的Ala被Trp所取代得到改善的效力且更加亲水的肽，这可

通过 HPLC 来证明。这种取代所产生的改善的性质是不可预见的，这是因为所述肽中其他任何 Trp 残基的取代导致纤维蛋白不可结合或者纤维蛋白结合减少。

用于修饰所述肽 Ac-WQPC*PWESWTF*CWDPPGGGK-NH₂ (SEQ ID NO. 122) 的另一种方法为在 N-末端或 C-末端连接氨基酸。通常，在 C-末端连接氨基酸不会剧烈地改变所述肽的效力。但是当将极性氨基酸(例如 Arg) 加入到 N-末端时，可以观察到结合情况的改善。考虑到位置 1 处 Trp 的重要性，以产生有利效果的方式来引入极性是不可预计的。

可以使效力发生改善的另一种修饰为在位置 11 处引入非常见氨基酸环己基丙氨酸(Cha)来替代 Phe。考虑到取代的苯丙氨酸衍生物会导致较弱的结合情况，不可预计的是改变成体积更大、更低级的芳香残基会改善效力。这三种修饰的结合会进一步使效力得到改善。

下表 1 提供了本发明的每一种纤维蛋白结合肽，其序列，所制备和经测试的纤维蛋白结合部分的序列，这些肽的分析数据(包括 HPLC 数据和质谱数据)，以及对于大多数的肽而言的、与目前已知的纤维蛋白结合肽(其具有序列 Ac-WQPC*PWESWTF*CWDPPGGGK-NH₂, (SEQ ID NO. 122) (相对 IC₅₀ =1)) 相比的结合亲和性测定值。小于 1 的相对 IC₅₀ 表明结合情况优于对照肽。

注意，所制备的并经测试的纤维蛋白结合部分包括位于 C 末端的连接体 GGGK，并且在某些情况下包括位于 N 末端的 Ac 基团。本发明涵盖了具有或不具有 GGGK 连接体和/或 Ac 基团的纤维蛋白结合部分，以及具有不同或其他连接体的这种部分(例如本文所述的那些)。注意，Seq005 肽用其他连接体来制备：Ac-WQPCPAESWTF*CWDPPGSAGSK-NH₂ (Seq005-P2) (SEQ ID NO. 134) [HPLC 数据：系统 D, t_R 3.53; 质谱数据：Neg. 离子：[M-H]: 2377.8, [M-2H]/2: 1188.4] (包括连接体 GSAGSK (SEQ ID NO. 137)) 和 Ac-WQPC*PAESWTF*CWDPPGAGSGK-NH₂ (Seq005-P3) (SEQ ID NO. 135) [HPLC 数据：系统 D, t_R 3.54; 质谱数据：Neg. 离子：[M-H]: 2348.1, [M-2H]/2: 1173.4] (包括连接体 GAGSGK (SEQ ID NO. 138))。如实

施例 21 所示，备选连接体不会使具有 Seq005 的靶向微泡结合纤维蛋白的能力劣化。

表 1. 纤维蛋白结合肽

序列编号	序列	制备的序列	制备的序列 ID	HPLC 数据 (系统, t_R)	质谱数据 (模式: 离子)	Rel IC_{50} (n=2, 竞争性 FP 测试)
Seq005	WQPC*PAE SWTFC*WDP P (SEQ ID NO. 1)	Ac-WQPC*PAES WTFC*WDPGGGK -NH ₂ (SEQ ID NO. 2)	Seq005-P	B, 4.93	阴离子: [M-H]: 2189.6 ; [M-2H]/2: 1094.4	0.875
Seq014	GPPGWQPC *PWESWTF C*WDP (SEQ ID NO. 3)	Ac-GPPGWQPC* PWESWTFC*WDP GGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 4)	Seq014-P	A, 4.70	阴离子: [M+Na-2H]: 2636.8; [M-2H]/2: 1306.2	0.235
Seq015	GGRGWQPC *PWESWTF C*WDP (SEQ ID NO. 5)	Ac-GGRGWQPC* PWESWTFC*WDP GGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 6)	Seq015-P	A, 4.44	阳离子: [2M+3H]/3: 1756.9; [M+2H]/2: 1317.3; [M+3H]/3: 876.1	0.370
Seq016	GWQPC*PW ESWTFC*WDP (SEQ ID NO. 7)	Ac-GWQPC*PWE SWTFC*WDPGGG K-NH ₂ (SEQ ID NO. 8)	Seq016-P	B, 4.08	阴离子: [M-H]: 2160.2; [M-2H]/2: 1180.5; [M-3H]/3: 786.8	1.04
Seq017	SGSGJWQP C*PWESWTF FC*WDP (SEQ ID NO. 9)	Ac-SGSGJWQPC *PWESWTFC*WDP PGGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 10)	Seq017-P	B, 3.96	阴离子: [M-H]: 2738.7; [M-2H]/2: 1369.1	0.714

Seq01 8	WQPC*PWE SWT- <u>Cha</u> - C*WDP (SEQ ID NO. 11)	Ac-WQPC*PWES WT- <u>Cha</u> -C*WDP GGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 12)	Seq018-P	B, 4.27	阴离子 : [M-H]: 2311.8; [M-2H]/2: 1154.8	0.494
Seq01 9	WQPC*PWE SWT- <u>Ffe4</u> -C*WDP (SEQ ID NO. 13)	Ac-WQPC*PWES WT- <u>Ffe4</u> -C*WD PGGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 14)	Seq019-P	B, 4.26	阴离子 : [M-H]: 2322.6; [M-2H]/2: 1160.4	0.601
Seq02 0	WQPC*PWE SWT- <u>F34f</u> <u>e</u> -C*WDP (SEQ ID NO. 15)	Ac-WQPC*PWES WT- <u>F34fe</u> -C*W DPGGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 16)	Seq020-P	B, 4.33	阴离子 : [M-H]: 2341.2; [M-2H]/2: 1169.8	0.428
Seq02 1	<u>GW</u> QPC*PW ESWTFC*W DP (SEQ ID NO. 17)	<u>GW</u> QPC*PWESWT FC*WDPGGGK-N H ₂ (SEQ ID NO. 18)	Seq021-P	B, 3.94	阴离子 : [M-H]: 2319.6; [M-2H]/2: 1159.3	0.622
Seq02 2	<u>RG</u> WQPC*P WESWTFC* WDP (SEQ ID NO. 19)	<u>RG</u> WQPC*PWESW TFC*WDPGGGK- NH ₂ (SEQ ID NO. 20)	Seq022-P	B, 3.79	阳离子 [M+2H]/2: 1239.3; [M+3H]/3: 826.8	0.511
Seq02 3	<u>RW</u> QPC*PW ESWTFC*W DP (SEQ ID NO. 21)	<u>RW</u> QPC*PWESWT FC*WDPGGGK-N H ₂ (SEQ ID NO. 22)	Seq023-P	B, 3.77	阳离子 [M+2H]/2: 1211.6; [M+3H]/3: 807.6	0.47
Seq02 4	<u>SGSGSGSG</u> WQPC*PWE SWTFC*WD P (SEQ ID NO. 23)	Ac- <u>SGSGSGSG</u> WQPC*PWESWTFC *WDPGGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 24)	Seq024-P	B, 3.89	阴离子 : [M-2H]/2: 1439.8	0.527

Seq02 5	<u>KKGWQPC*</u> PWESWTFC *WDP (SEQ ID NO. 25)	Ac- <u>KKGWQPC*P</u> WESWTFC*WDPG GGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 26)	Seq025-P	A, 4.26	阴离子: [M-H]: 2618.8; [M-2H]/2: 1308.1	0.357
Seq02 6	<u>KGKKGWQ</u> PC*PWESW TFC*WDP (SEQ ID NO. 27)	Ac- <u>KGKKGWQP</u> C*PWESWTFC*W DPGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 28)	Seq026-P	A, 4.11	阴离子: [M-H]: 2860.5; [M-2H]/2: 1429.6	0.595
Seq02 7	<u>S(Galnac</u>) <u>-WQPC*P</u> WESWTFC* WDP (SEQ ID NO. 29)	Ac- <u>S(Galnac)</u> <u>-WQPC*PWESWT</u> FC*WDPGGK-N H ₂ (SEQ ID NO. 30)	Seq027-P	B, 3.95	阴离子: [M-H]: 2595.5; [M-2H]/2: 1297.0	0.5595
Seq02 8	<u>Thf2ca-W</u> QPC*PWES WTFC*WDP (SEQ ID NO. 31)	<u>Thf2ca-WQPC*</u> PWESWTFC*WDP GGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 32)	Seq028-P	B, 4.23	阴离子: [M-H]: 2416.8; [M-2H]/2: 1208.6	0.616
Seq02 9	<u>RRGGWQPC</u> *PWESWTF C*WDP (SEQ ID NO. 33)	Ac- <u>RRGGWQPC*</u> PWESWTFC*WDP GGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 34)	Seq029-P	A, 4.32	阳离子 [M+2H]/2: 1366.4; [M+3H]/3: 911.8; [M+3H+Na]/ 4: 689.8	0.125
Seq03 1	<u>S(Galnac</u>) <u>-JWQPC*</u> PWESWTFC *WDP (SEQ ID NO. 35)	Ac- <u>S(Galnac)</u> <u>-JWQPC*PWESW</u> TFC*WDPGGK- NH ₂ (SEQ ID NO. 36)	Seq031-P	B, 3.95	阴离子: [M-H]: 2740.4; [M-2H]/2: 1369.3	1.15

Seq03 2	WQPC*-Hy pt4-WESW TFC*WDP (SEQ ID NO. 37)	Ac-WQPC*-Hyp t4-WESWTFC*W DPGGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 38)	Seq032-P	B, 4.12	模式: 阴离 子 : [M-H]: 2320 . 7; [M-2H]/2: 1159.4	0.55
Seq03 4	GPPGWQPC *PAESWTF C*WDP (SEQ ID NO. 39)	Ac-GPPGWQPC* PAESWTFC*WDP GGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 40)	Seq034-P	D, 3.49	阴离子 - § [M-H]: 2498.9, [M-2H]/2: 1248.4	
Seq03 5	GGRGWQPC *PAESWTF C*WDP (SEQ ID NO. 41)	Ac-GGRGWQPC* PAESWTFC*WDP GGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 42)	Seq035-P	D, 3.29	阴离子 - § [M-H]: 2516.7, [M+ TFA-2H]/2: 1314.7, [M-2H]/2: 1257.9	
Seq03 6	KKGWQPC* PAESWTFC * WDP (SEQ ID NO. 43)	Ac-KKGWQPC*P AESWTFC*WDPG GGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 44)	Seq036-P	D, 4.91	阴离子 - § [M-H]: 2916.4, [2M-3H]/3: 1943.6, [M-2H]/2: 1457.6	
Seq03 7	KGKGKGWQ PC*PAESW TFC*WDP (SEQ ID NO. 45)	Ac-KGKGKGWQ C*PAESWTFC*W DPGGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 46)	Seq037-P	D, 5.26	阴离子 - § [2M-3H]/3: 2242.8, 2225.4, [M-2H]/2: 1681.2	
Seq03 8	GWQPC*PA ESWTFC*W DP (SEQ ID NO. 47)	GWQPC*PAESWT FC*WDPGGGK-N H ₂ (SEQ ID NO. 48)	Seq038-P	D, 3.76	阴离子 - § [M-H]: 2288.6, [M-2H]/2: 1143.9	
Seq03 9	GWQPC*PA ESWTFC*W DP (SEQ	Ac-GWQPC*PAE SWTFC*WDPGGG K-NH ₂ (SEQ ID	Seq039-P	D, 3.44	阴离子 - § [M-H]: 2247.9,	

	ID NO. 49)	NO. 50)			[M-2H]/2: 1122.9	
Seq04 0	<u>SGSGSGSG</u> WQPC*PAE SWTFC*WD P (SEQ ID NO. 51)	Ac- <u>SGSGSGSGW</u> QPC*PAESWTFC *WDPGGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 52)	Seq040-P	D, 3.25	阴离子 - [2M-3H]/3: 1844.3, [M-2H]/2: 1382.8	§
Seq04 1	WQPC*PAE SWT- <u>Ffe4</u> -C*WDP (SEQ ID NO. 53)	Ac-WQPC*PAES WT- <u>Ffe4</u> -C*WD PGGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 54)	Seq041-P	D, 3.65	阴离子 - [M-H]: 2207.7, [M-2H]/2: 1103.4	§
Seq04 2	WQPC*PAE SWT- <u>Cha</u> - C*WDP (SEQ ID NO. 55)	Ac-WQPC*PAES WT- <u>Cha</u> -C*WDP GGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 56)	Seq042-P	D, 3.69	阴离子 - [M-H]: 2195.7, [M-2H]/2: 1097.4	§
Seq04 3	WQPC*PAE SWT- <u>F34f</u> e-C*WDP (SEQ ID NO. 57)	Ac-WQPC*PAES WT- <u>F34fe</u> -C*W DPGGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 58)	Seq043-P	D, 3.73	阴离子 - [M-H]: 2225.4, [M-2H]/2: 1111.9	§
Seq04 4	<u>Thf2ca</u> -W QPC*PAES WTFC*WDP (SEQ ID NO. 59)	<u>Thf2ca</u> -WQPC* PAESWTFC*WDP GGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 60)	Seq044-P	D, 3.71	阴离子 - [M-H]: 2245.6, [M-2H]/2: 1122.3.	§
Seq04 5	<u>SGSGJWQP</u> C*PAESWT FC*WDP (SEQ ID NO. 61)	Ac- <u>SGSGJWQPC</u> *PAESWTFC*WD PGGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 62)	Seq045-P	D, 3.34	阴离子 - [M-2H]/2: 1311.3	§
Seq04 6	<u>RRGGWQPC</u> *PAESWTF C*WDP (SEQ ID NO. 63)	Ac- <u>RRGGWQPC</u> * PAESWTFC*WDP GGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 64)	Seq046-P	D, 3.12	阳离子 - [2M+3H]/3: 1745.4, [M+2H]/2: 1309.5, [M+3H]/3: 873.3	§

Seq04 7	<u>RRGGWQPC</u> *- <u>Hypt4-</u> WESWTFC* WDP (SEQ ID NO. 65)	Ac- <u>RRGGWQPC</u> * - <u>Hypt4-</u> WESWT FC*WDPGGGK-N H ₂ (SEQ ID NO. 66)	Seq047-P	G, 4.5	模式: 阳离子 ; [M+2H]/2: 1375.0, [M+3H]/3: 917.3. [M+Na+3H]/ 4: 693.8, [M+2Na+3H] /5: 558.9	0.75
Seq04 8	<u>RWQPC*PW</u> ESWTFC*W DP (SEQ ID NO. 67)	Ac- <u>RWQPC*PWE</u> SWTFC*WDPGGG K-NH ₂ (SEQ ID NO. 68)	Seq048-P	B, 3.72	阴离子 : [M-H]: 2461.8, [M-2H]/2: 1230.0, [M+TFA-2H] /2: 1286.8	§
Seq04 9	<u>RWQPC*PA</u> ESWT- <u>Cha</u> -C*WDP (SEQ ID NO. 69)	Ac- <u>RWQPC*PAE</u> SWT- <u>Cha</u> -C*WD PGGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 70)	Seq049-P	D, 3.43	阴离子 : [M-H]: 2352.9, [M-2H]/2: 1175.4, [M+TFA-2H] /2: 1232.2	§
Seq05 0	<u>GWQPC*PA</u> ESWT- <u>Cha</u> -C*WDP (SEQ ID NO. 71)	<u>GWQPC*PAESWT</u> - <u>Cha</u> -C*WDPGG GK-NH ₂ (SEQ ID NO. 72)	Seq050-P	D, 3.92	阴离子 : [M-H]: 2294.7, [M-2H]/2: 1146.9 (as Aloc peptide)	§
Seq05 1	<u>RGWQPC*P</u> WESWTFC* WDP (SEQ ID NO. 73)	Ac- <u>RGWQPC*PW</u> ESWTFC*WDPGG GK-NH ₂ (SEQ ID NO. 74)	Seq051-P	D, 3.64	阴离子 : [M-H]: 2517.9, [M-2H]/2: 1258.8, [M+TFA-2H] /2: 1315.5	§
Seq05	<u>RGWQPC*P</u>	Ac- <u>RGWQPC*PA</u>	Seq052-P	D, 3.46	阴离子 :	§

2	<u>A</u> ESWTF <u>C</u> * WDP (SEQ ID NO. 75)	ESWTF <u>C</u> *WDP <u>G</u> GK-NH ₂ (SEQ ID NO. 76)			[M-H]: 2403.3, [M-2H]/2: 1200.9	
Seq05 3	<u>R</u> GWQPC* <u>P</u> <u>A</u> BSW <u>T</u> - <u>C</u> <u>h</u> <u>a</u> -C*WDP (SEQ ID NO. 77)	Ac- <u>R</u> GWQPC* <u>P</u> <u>A</u> ESW <u>T</u> - <u>C</u> <u>h</u> <u>a</u> -C*W DPGGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 78)	Seq053-P	D, 3.48	阴离子 : [M-H]: 2409.0, [M-2H]/2: 1204.1, [M+TFA-2H] /2: 1261.1	§
Seq05 4	<u>R</u> GWQPC* <u>P</u> <u>A</u> BSW <u>T</u> - <u>C</u> <u>h</u> <u>a</u> -C*WDP (SEQ ID NO. 79)	<u>R</u> GWQPC* <u>P</u> <u>A</u> ESW T- <u>C</u> <u>h</u> <u>a</u> -C*WDP GGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 80)	Seq054-P	D, 3.91	阴离子 : [M-H]: 2451.0, [M-2H]/2: 1224.7, [M+TFA-2H] /2: 1282.2 (as Aloc peptide)	§
Seq05 5	<u>G</u> WQPC* <u>P</u> <u>A</u> ESW <u>T</u> - <u>C</u> <u>h</u> <u>a</u> -C*WDP (SEQ ID NO. 81)	Ac- <u>G</u> WQPC* <u>P</u> <u>A</u> E SWT- <u>C</u> <u>h</u> <u>a</u> -C*W PGGGK-NH ₂ (SEQ ID NO. 82)	Seq055-P	D, 3.59	阴离子 : [[M-H]: 2253.1, [M-2H]/2: 1125.9	§
Seq05 6	<u>R</u> WQPC* <u>P</u> <u>A</u> ESWTF <u>C</u> * <u>W</u> DP (SEQ ID NO. 83)	<u>R</u> WQPC* <u>P</u> <u>A</u> ESW FC*WDPGGGK-N H ₂ (SEQ ID NO. 84)	Seq056-P	D, 3.71	阴离子 : [M-H]: 2388.0, [M-2H]/2: 1193.4, [M+TFA-2H] /2: 1250.8 (as Aloc peptide)	§
Seq05 7	<u>R</u> WQPC* <u>P</u> <u>A</u> ESW <u>T</u> - <u>C</u> <u>h</u> <u>a</u> -C*WDP (SEQ ID NO. 85)	<u>R</u> WQPC* <u>P</u> <u>A</u> ESW - <u>C</u> <u>h</u> <u>a</u> -C*WDP GK-NH ₂ (SEQ ID NO. 86)	Seq057-P	D, 3.71	阴离子 : [M-H]: 2394.0, [M-2H]/2: 1196.4,	§

					[M+TFA-2H] /2: 1252.9 (as Aloc peptide)	
--	--	--	--	--	--	--

=其为针对除了 C 末端赖氨酸之外, 所述肽的所有赖氨酸基团的 N^o上都带有 ivDde 基团的肽所报道的分析数据。

=其为针对 N 末端 Aloc-保护的肽所报道的分析数据。

§ = 其为使用 CF5 标记的肽所进行的直接结合测定法, 参见表 2。

所采用的 HPLC 系统的详细情况在实施例部分中列出。纤维蛋白结合测定法的详细情况在实施例部分中列出。

由已知肽 (Ac-WQPC*PWESWTFC*WDPGGGK-NH₂ (SEQ ID NO. 122), 本文中也称为 Seq000) 发生的变化处用下划线标记, 但是该序列中的省略 (例如起始 Ac 等) 则未加以突出显示。因此, 例如, 在编码为 Seq005 的本发明的肽中, 其中定义为 “A” 的氨基酸在相同的位置处替代了现有肽 Seq000 中的相应氨基酸 “W”。

如表 1 和本文其他处所用, 标记 “C*” 是指有助于形成二硫键的半胱氨酸残基。

如表 1 所示, 与对照肽相比, 本文所述的所有的肽都具有等价的或优异得多的结合。

下表 2 提供本文所包括的每一种 5-羧基荧光素标记的纤维蛋白结合肽, 其序列, HPLC 数据, 质谱数据, 以及对于大多数的肽而言的、与先前已知的纤维蛋白结合肽 (其具有序列 Ac-WQPC*PWESWTFC*WDPGGGK-NH₂ (Seq000) (SEQ ID NO. 122)) 相比的结合亲和性测定值。

表 2. 纤维蛋白结合肽-5-羧基荧光素标记的肽

序列编号	序列	HPLC 数据 (系统, t _R)	质谱数据 (模式; 离子)	K _D (M) 直接结合 (n=2)
Seq000-CF5	Ac-WQPC*PWES WTFC*WDPGGGK (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 87)	F, 14.78	阴离子; [M-2H]/2: 1330.9; [M-3H]/3: 886.9; [M-4H]/4: 665.0	0.39

Seq014-CF5	Ac-GPPGWQPC* PWESWTFC*WDP GGGK (CF5) -NH ₂ (SEQ ID NO. 88)	D, 4.31	阴离子; [M-2H]/2: 1485.2, [2M-3]/3: 1981.8	0.25
Seq015-CF5	Ac-GGRGWQPC* PWESWTFC*WDP GGGK (CF5) -NH ₂ (SEQ ID NO. 89)	D, 4.10	阴离子: [M-2H]/2: 1494.9, [2M-3H]/3: 1993.5, [3M+Na-5H]/4: 2249.1	0.29
Seq016-CF5	Ac-GWQPC*PWE SWTFC*WDPGGG K (CF5) -NH ₂ (SEQ ID NO. 90)	D, 4.35	阴离子; [M-2H]/2: 1359.4, [2M-3H]/3: 1812.9	0.23
Seq017-CF5	Ac-SGSGJWQPC *PWESWTFC*WD PGGGK (CF5) -N H ₂ (SEQ ID NO. 91)	D, 4.15	阴离子; [M-2H]/2: 1547.8	0.45
Seq018-CF5	Ac-WQPC*PWES WT-Cha-C*WDP GGGK (CF5) -NH ₂ (SEQ ID NO. 92)	D, 4.49	阴离子; [M-H]: 2670.3, [M-2H]/2: 1333.9, [M-3H]/3: 888.7	0.20
Seq019-CF5	Ac-WQPC*PWES WT-Ffe4-C*WD PGGGK (CF5) -N H ₂ (SEQ ID NO. 93)	D, 4.50	阴离子; [M-2H]/2: 1339.8	1.02
Seq020-CF5	Ac-WQPC*PWES WT-F34fe-C*W DPGGGK (CF5) - NH ₂ (SEQ ID NO. 94)	D, 4.56	阴离子; [2M-3]/3: 1798.5; [M-2H]/2: 1348.7	0.70
Seq021-CF5	GWQPC*PWESWT FC*WDPGGGK (C F5) -NH ₂ (SEQ ID NO. 95)	D, 4.31	阴离子; [M-2H]/2: 1338.9, [M-3H]/3: 892.0	N/D

Seq022-CF5	RGWQPC*PWESW TFC*WDPGGGK (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 96)	D, 3.99	阴离子; [2M-3H]/3: 1889.3, [M-2H]/2: 1416.4, [M-3H]/3: 944.0	0.28
Seq023-CF5	RWQPC*PWESWT FC*WDPGGGK (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 97)	D, 4.00	阴离子; [M-2H]/2: 1387.9, [M-3H]/3: 925.0	0.11
Seq024-CF5	Ac-SGSGSGSGW QPC*PWESWTFC*WDPGGGK (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 98)	D, 4.11	阴离子; [M-2H]/2: 1619.1, [2M-3H]/3: 2158.5	0.47
Seq025-CF5	Ac-KKGWQPC*PWESWTFC*WDPGGGK (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 99)	D, 3.94	阴离子; [M-2H]/2: 1487.7, [2M-3H]/3: 1984.5	0.71
Seq026-CF5	Ac-KGKGKGWQPC*PWESWTFC*WDPGGGK (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 100)	D, 3.79	阴离子; [M-2H]/2: 1608.6, [2M-3H]/3: 2145.1	0.76
Seq027-CF5	Ac-S(Galnac)-WQPC*PWESWTFC*WDPGGGK (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 101)	D, 4.16	阴离子; [M-2H]/2: 1476.4, [2M-3H]/3: 1968.6, [2M-6H]/6: 984.5	0.50
Seq028-CF5	Thf2ca-WQPC*PWESWTFC*WDPGGGK (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 102)	D, 4.13	阴离子; [M+Na-2H]: 2740.2; [M+Na-3H]/2: 1370.1, [M-2H]/2: 1359.0, [M-3H]/3: 905.4	1.21
Seq029-CF5	Ac-RRGGWQPC*PWESWTFC*WDPGGGK (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 103)	D, 4.15	阴离子; [M-2H]/2: 1543.7, [2M-3H]/3: 2059.8, [M-3H]/3: 1029.0	N/D
Seq034-CF5	Ac-GPPGWQPC*	D, 3.45	阴离子; [M-H]:	0.31

	PAESWTFC*WDP GGGK (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 104)		2857.4; [M-2H]/2: 1228.0	
Seq035-CF5	Ac-GGRGWQPC* PAESWTFC*WDP GGGK (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 105)	D, 3.88	阴离子; [2M-3H]/3: 1916.3, [M-2H]/2: 1437.4	0.52
Seq038-CF5	GWQPC*PAESWT FC*WDPGGGK (C F5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 106)	D, 3.87	阴离子; [M-2H]/2: 1280.8	0.24
Seq039-CF5	Ac-GWQPC*PAE SWTFC*WDPGGG K (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 107)	D, 4.04	阴离子; [M-2H]/2: 1302.7	0.24
Seq040-CF5	Ac-SGSGSGSGW QPC*PAESWTFC *WDPGGGK (CF5) -NH ₂ (SEQ ID NO. 108)	D, 3.82	阴离子; [2M-3H]/3: 2083.1, [M-2H]/2: 1561.8, [M-3H]/: 1040.7	0.53
Seq042-CF5	Ac-WQPC*PAES WT-Cha-C*WDP GGGK (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 109)	D, 4.29	阴离子; [M-H]: 2554.6, [M-2H]/2: 1276.9	0.17
Seq045-CF5	Ac-SGSGJWQPC *PAESWTFC*WD PGGGK (CF5)-N H ₂ (SEQ ID NO. 110)	D, 3.90	阴离子; [M-H]: 2982.0, [M-2H]/2: 1489.9	0.57
Seq046-CF5	Ac-RRGGWQPC* PAESWTFC*WDP GGGK (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 111)	D, 3.50	阳离子; [M+2H]/2: 1488.9, [M+3H]/3: 992.7	0.22
Seq048-CF5	Ac-RWQPC*PWE	D, 4.26	阴离子; [M-2H]/2:	0.11

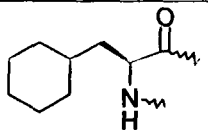
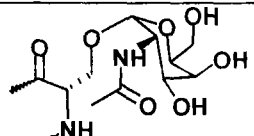
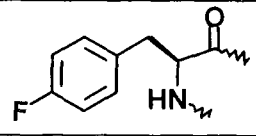
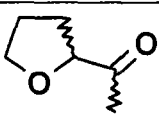
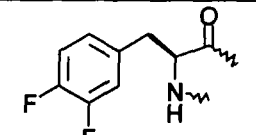
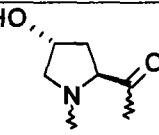
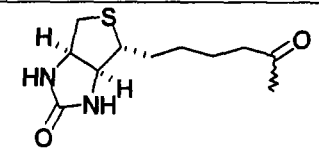
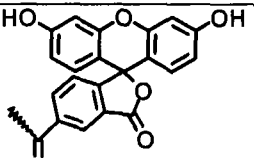
	SWTFC*WDPGGG K (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 112)		1409.1, [2M-3H]/3: 1879.1	
Seq049-CF5	Ac-RWQPC*PAE SWTFC*WDPGGG K (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 113)	D, 3.94	阴离子; [M-H]: 2704.5, [2M-3H]/3: 1802.6, [M-2H]/2: 1351.3	0.21
Seq050-CF5	Ac-RWQPC*PAE SWT-Cha-C*WD PGGGK (CF5)-N H ₂ (SEQ ID NO. 114)	D, 4.04	阴离子; [M-H]: 2710.9, [2M-3H]/3: 1806.4, [M-2H]/2: 1354.5	0.08
Seq051-CF5	GWQPC*PAESWT -Cha-C*WDPGG GK (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 115)	D, 4.03	阴离子; [M-H]: 2569.5, [M-2H]/2: 1283.8, [2M-3H]/3: 1712.1	0.06
Seq052-CF5	Ac-RGWQPC*PW ESWTFC*WDPGG GK (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 116)	D, 4.17	阴离子; [3M-4H]/4: 2157.7, [2M-3H]/3: 1917.3, [M-2H]/2: 1437.9	0.53
Seq053-CF5	Ac-RGWQPC*PA ESWT-Cha-C*W DPGGGK (CF5)- NH ₂ (SEQ ID NO. 117)	D, 4.04	阴离子; [M-H]: 2767.5, [2M-3H]/3: 1844.1, [M-2H]/2: 1383.0	0.10
Seq054-CF5	RGWQPC*PAESW T-Cha-C*WDPG GGK (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO. 118)	D, 3.91	阴离子; [M-H]: 2726.1, [2M-3H]/3: 1816.9, [M-2H]/2: 1362.0	0.05
Seq055-CF5	Ac-GWQPC*PAE SWT-Cha-C*WD PGGGK (CF5)-N H ₂ (SEQ ID NO. 119)	D, 4.20	阴离子; [M-H]: 2611.6, [M-2H]/2: 1304.8, [2M-3H]/3: 1740.2	0.08

Seq056-CF5	RWQPC*PAESWT FC*WDPGGGK (C F5)-NH ₂ (SEQ ID NO.120)	D, 3.81	阴离子 ; [M-H]: 2663.1, [2M-3H]/3: 1774.2, [M-2H]/2: 1330.3	0.06
Seq057-CF5	RWQPC*PAESWT -Cha-C*WDPGG GK (CF5)-NH ₂ (SEQ ID NO.121)	D, 3.91	阴离子 ; [M-H]: 2668.2, [M-2H]/2: 1333.3	0.03

所使用的 HPLC 系统的详细情况在实施例部分中列出。纤维蛋白结合测定法的详细情况同样在实施例部分中列出。

如表 2 所示, 与对照肽相比, 本文所述的所有 5-羧基荧光素标记的纤维蛋白结合肽都具有等价的或优异得多的结合。

下表 3 提供了上表 1 和表 2 所提及的残基的缩写, 以及一部分常用残基的相应结构。

残基缩写	结构	残基缩写	结构
Cha		S (Galnac)	
Ffe4		Thf2ca	
F34fe		Hypt4	
Btn		CF5	

本发明的纤维蛋白结合肽的直接合成可以采用常规的技术来完

成,所述的技术包括固相肽合成、溶液相合成等。固相合成是优选的。参见 Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis* (W. H. Freeman Co., San Francisco, 1989); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963); Bodanszky and Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis* (Springer-Verlag, New York, 1984), 这些文献以引用方式并入本文。

一旦根据本发明的纤维蛋白结合肽经分离或合成之后,其优选的是经过纯化的。就纯化而言,有许多标准的方法可以采用,包括使用了烷基化的二氧化硅柱(例如 C₄-, C₈-或 C₁₈-二氧化硅)的反相高效液相色谱(RP-HPLC)。通常采用有机含量逐渐增加的梯度流动相来进行纯化,例如处于水性缓冲剂中的乙腈,其通常含有少量的三氟乙酸。此外,还可以根据肽的电荷来采用离子交换色谱对肽进行分离。多肽的纯度可以通过多种方法来测定,包括鉴定 HPLC 上的主要大峰。在 HPLC 柱上,产生占至少 95%的输入材料的单一峰的多肽是优选的。甚至更优选的是,在 HPLC 柱上,产生占输入材料的至少 97%、至少 98%、至少 99%、或者甚至 99.5%或更多地单一峰的多肽。

为了确保所得到的纤维蛋白结合肽是用于本发明组合物的理想肽,可以对所述的肽组合物进行分析。可以采用高分辨率质谱法来对所述的组合物进行分析,从而测定所述肽的分子量。备选地,可以通过在水性酸中水解所述的肽,并采用 HPLC 或氨基酸分析仪来对所述混合物的成分进行分离、鉴定和定量,从而证实所述肽的氨基酸含量。此外,还可以使用蛋白质测序仪来明确地测定所述肽的序列,其中所述的测序仪顺序地降解所述的肽,并依次测定氨基酸。

可以通过在本发明的纤维蛋白结合多肽序列中的两个半胱氨酸残基之间的二硫键来从构造上限制所述的多肽。这种构造限制确保了所述的肽具有这样的结合机构,该结构有利于所述肽对纤维蛋白的亲合性、以及对纤维蛋白而超过纤维蛋白原的特异性。用于限制肽(其保持了相似的构造、以及所述肽针对纤维蛋白的特异性)的其他方法已经在本领域中有所描述,并在本发明中使用。

结合多肽的修饰或优化

纤维蛋白结合多肽的修饰或优化也在本发明的范围内。具体而言，可以对本发明的多肽序列进行进一步的修饰，从而最优化其效力、药物动力学行为、稳定性和/或其他生物学、物理学和化学性质得到。

氨基酸残基的取代

相同类别内的氨基酸取代（例如一种碱性氨基酸取代另一种碱性氨基酸）是本领域公知的。例如，可以在亲本多肽序列中产生以下所述的等排性（isosteric）和/或保守性氨基酸变化，预计所得的多肽具有与上文所述的性质相似或改善的特征。

烷基取代的疏水性氨基酸的取代：包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、正亮氨酸、S-2-氨基丁酸、S-环己基丙氨酸、以及被1-10个碳的脂肪族侧链取代的其他简单的 α 氨基酸，其中所述的脂肪族侧链包括分支的、环状的和直链的烷基、烯基或炔基取代基。

芳香族取代的疏水性氨基酸的取代：包括苯丙氨酸，色氨酸，酪氨酸，双苯丙氨酸，1-萘基苯丙氨酸，2-萘基苯丙氨酸，2-苯并噻吩基苯丙氨酸，3-苯并噻吩基苯丙氨酸，组氨酸，之前列出的芳香族氨基酸的氨基、烷基氨基、二烷基氨基、氮杂、卤化（氟代、氯代、溴代或碘代）或烷氧基（ C_1-C_4 ）取代形式，其示意性的实例为：2-, 3-或4-氨基苯丙氨酸；2-, 3-或4-氯代苯丙氨酸；2-, 3-或4-甲基苯丙氨酸；2-, 3-或4-甲氧基苯丙氨酸；5-氨基-, 5-氯-, 5-甲基-或5-甲氧基色氨酸；2'-, 3'-或4'-氨基-, 2'-, 3'-或4'-氯-, 2, 3或4-二苯丙氨酸；2'-, 3'-或4'-甲基-2-, 3-或4-二苯丙氨酸；以及2-或3-吡啶基丙氨酸。

含有碱性官能团的氨基酸的取代：包括精氨酸，赖氨酸，组氨酸，鸟氨酸，2,3-二氨基丙酸，高精氨酸，上述氨基酸的烷基、烯基或炔基（ C_1-C_{10} 的分支的、线性或环状的）取代的衍生物，并且其中与所述取代基是否在杂原子（例如 α -氮、或远端的一个或多个氮）或者在 α -碳（例如在 pro-R 位置上）上无关。示意性实例的化合物包括：N- ϵ -异丙基-赖氨酸，3-(4-四氢吡啶)-甘氨酸，3-(4-四氢吡啶)-丙氨

酸, N, N- γ , γ' -二乙基-高精氨酸。此外, 还包括在内的化合物例如有: α -甲基精氨酸, α -甲基 2, 3-二氨基丙酸, α -甲基组氨酸, α -甲基鸟氨酸, 其中烷基占据了 α -碳的 pro-R 位置。此外, 也包括由氨基、芳香族、杂芳香族(其中杂芳香族基团具有一个或多个氮、氧或硫原子(单一形式或结合形式))羧酸形成的酰胺、或者许多公知的活化衍生物中的任一种(例如酸性氯化物、活性酯、活性 azolide 和相关的衍生物、赖氨酸、鸟氨酸或 2, 3-二氨基丙酸)。

酸性氨基酸的取代: 包括天冬氨酸, 谷氨酸, 高谷氨酸, 酪氨酸, 2, 3-二氨基丙酸的烷基、芳基、芳烷基和杂芳基磺胺药物, 鸟氨酸或赖氨酸, 和四唑取代的烷基氨基酸。

侧链酰胺残基的取代: 包括天冬酰胺, 谷氨酰胺, 天冬酰胺或谷氨酰胺的烷基或芳香族取代衍生物。

含羟基氨基酸的取代: 包括丝氨酸, 苏氨酸, 高丝氨酸, 2, 3-二氨基丙酸, 以及丝氨酸和苏氨酸的烷基或芳香族取代的衍生物。

此外, 应该理解的是, 在上文列出的各种种类中的氨基酸可以被另一种同类的基团所取代。

酰胺化学键的取代

本发明范围内的另一种修饰是对结合多肽的主链内的酰胺键的取代。例如, 为了减少或消除所不需要的蛋白质水解、或者会降低血清稳定性从而导致生物学活性降低或破坏的其他降解途径, 或者为了限制或增加构象挠性, 通常取代所述肽主链内的酰胺的化学键, 使其具有模仿现存构象或者以所需方式改变所述构造的官能度。这种修饰可以产生增大的结合亲和性或改善的药物动力学行为。应该理解, 肽合成领域中的这些知识可以针对连接两个氨基酸的任何酰胺键来形成以下所述的酰胺键的改变, 并且预计所得的肽具有相同或改善的活性, 其中所述酰胺键的改变为: 插入 α -N-甲基酰胺或肽酰胺主链硫代酰胺, 除去羰基从而得到同类的次级胺, 用氮杂-氨基酸替代一种氨基酸从而产生缩氨基脒衍生物, 以及使用 E-石蜡和取代的 E-石蜡作为酰胺化学键的替代物。

D-氨基酸的引入

在本发明范围内的另一种方法是在不稳定肽键的远端或近端引入D-丙氨酸，或者另一种D-氨基酸。在这种情况下，本领域技术人员还应该理解的是可以，并且有时必需使用这样的D-氨基酸来进行D-氨基酸的取代，其中所述的D-氨基酸的侧链并非是对所替换的L-氨基酸侧链的保守性替代。这是由于在手性方面存在差异，由此使得侧链的取向也存在差异，这种差异可以导致靶标结合位点中之前未查明区域的进入，而其中所述的区域具有不同于替换L-氨基酸的侧链所具有的电荷、疏水性、空间排位需要等。

为了改善药物动力学性质或药效性质所进行的修饰

此外，应该理解的是可以在具体应用中使用本发明的结合部分使得对所述的肽进行的修饰或者对所述的肽进行制剂（formulation），从而改善药物动力学和药效行为成为必要。预计，所述肽的性质可以通过连接多个部分来改变，其中预计所述的部分会产生所需的物理或化学性质。可以将这些影响药物动力学和药效行为的部分附加到所述的肽上，其中使用酸或胺通过酰胺键或脲键将所述的部分分别附加到所述肽的N-或C-末端，或者附加到在所述肽中合适定位的赖氨酸或赖氨酸衍生物、二氨基丙酸、鸟氨酸或其他氨基酸的悬垂氨基上，其中所述的肽具有悬垂的氨基基团、或者悬垂的烷氧基氨基或胍基。引入的部分可以为亲水性基团、碱性基团、非极性烷基或芳香族基团，这取决于目的肽以及对性质修改的现有需求。

氨基酸残基的糖基化

在本发明范围内的另一种修饰为使用单独的、或者是与结合部分或连接体部分或这二者相结合的糖基化的氨基酸残基（例如丝氨酸、苏氨酸或精氨酸残基）。可以采用糖基化（其可以用标准的条件来实施）来增强稳定性、改变药物动力学和药效、或者增强通过特异性或非特异性相互作用（涉及糖苷部分）而产生的结合能力。在另一种方法中，可以在人工或自动化的固相肽合成、或者人工或自动化的溶液相肽合成过程中将糖基化的氨基酸（例如O-(2-乙酰氨基-2-脱氧

-3, 4, 6-三-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖) 丝氨酸或类似的苏氨酸衍生物(D-或 L-氨基酸)) 引入到所述的肽中。类似地, 可以使用 D-或 L-N-(2-乙酰氨基-2-脱氧-3, 4, 6-三-O-乙酰基-β-D-吡喃葡萄糖)-天冬酰胺。预计可以使用通过合适的官能化和活化的碳水化合物部分(可以在糖基化中使用) 作为媒介在悬垂的氧、氮或硫官能团上糖基化的氨基酸。这种碳水化合物官能团可以为单糖、二糖或者甚至更大的多糖的组装体 (Kihlberg, Jan. (2000) Glycopeptide synthesis. In: Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis A Practical Approach (Chan, W.C. and White, P.D. Eds) Oxford University Press, New York, NY Chap. 8, pp195-213))。

除了糖基化以外, 还可以预计的是在异头碳上通过活化离去基团来将碳水化合物官能团添加到氨基酸上。氨基酸与糖苷之间的连接不限于与碳水化合物官能团的异头碳形成的化学键。而且, 碳水化合物部分与氨基酸之间的连接可以采用本领域已知的用于形成 C-杂原子、C-C、或杂原子-杂原子 (其实例为 S-S, O-N, N-N, P-O, P-N) 化学键的方法通过碳水化合物官能团的任何合适的、且具有足够的反应性的氧原子、氮原子、碳原子或其他悬垂原子来形成。

盐的形成

此外, 在本发明范围内的是形成不同的盐, 这些盐可以增大所述肽的水溶性以及形成所述肽的简易性。所述的盐可以包括但不限于 N-甲基葡糖胺 (甲葡胺)、醋酸盐、草酸盐、抗坏血酸盐等。

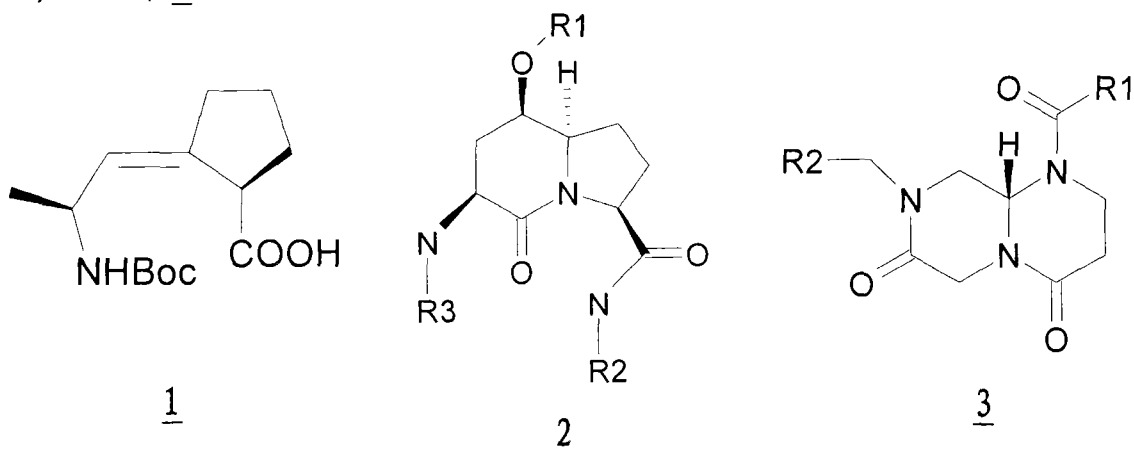
保持结构特征的结构修饰

在本发明范围内的另一种修饰为环状多肽的切断。本发明的许多多肽的环状特征限定了所述肽序列可利用的构造空间, 特别是在所述的环内。由此, 通过所述环远端或甚至近端的一个或多个残基在 N 末端区域或 C 末端区域将所述的肽切断, 可以提供具有相似或改善的生物学活性的经切断的肽。如 RGD 肽中所注明的那样, 可以鉴定产生结合活性的氨基酸的独特序列 (甚至小至 3 个氨基酸)。例如参见 E.F. Plow et al., Blood (1987), 70(1), 110-5; A. Oldberg et al.,

Journal of Biological Chemistry (1988), 263(36), 19433-19436; R. Taub et al., Journal of Biological Chemistry (1989 Jan. 5), 264(1), 259-65; A. Andrieux et al., Journal of Biological Chemistry (1989 Jun. 5), 264(16), 9258-65; 以及美国专利号. 5,773,412 和 5,759,996, 这些文献中的每一份文献都以引用方式全文并入本文。

而且, 在所述的文献中已经表明大型的肽环可以大体上被缩小, 从而除去了无关的氨基酸, 但是基本包含了重要的结合残基。参见美国专利号 5,556,939, 该专利文献以引用方式全文并入本文。可以使用二硫键、或者合适定位的羧酸基团和氨基的酰胺化学键来形成缩小的环状肽。

此外, 可以将 D-氨基酸加入到所述的肽序列中, 从而稳定转角特征 (特别是在甘氨酸的情况下)。在另一种方法中, 可以采用 α , β , γ , 或 δ 二肽或转角模拟物 (例如 α , β , γ , 或 δ 转角模拟物) (其中的一部分示于以下结构 1、2 和 3 中) 来模仿肽中的结构基元和转角特征, 同时还提供了免于蛋白质水解的稳定性, 并增强了其他性质 (例如构造稳定性和溶解性) (结构 1: Hart et al., *J. Org. Chem.*, 64, 2998-2999(1999); 结构 2: Hanessian et al., "Synthesis of a Versatile Peptidomimetic Scaffold" in Methods in Molecular Medicine, Vol. 23: Peptidomimetics Protocols, W.M. Kazmierski Ed. (Humana Press Inc. Totowa N.J. 1999), Chapter 10, pp. 161-174; 结构 3: WO 01/16135)。

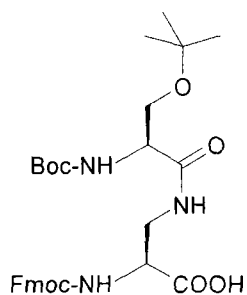


二硫化物模拟物的取代

此外，在本发明的结合多肽中，针对二硫键的二硫化物模拟物的取代也被包含在本发明的范围内。对于本发明的含有二硫键的肽而言，必需替代二硫键从而避免有时由于二硫键的存在而造成的某些难题。例如，当使用本发明的结合肽来形成^{99m}Tc（或其他放射性核素）-基放射性药剂或某些其他构建体时，二硫键的存在可以成为明显的问题。在计划通过依赖高锝酸盐离子的减少以及将减少的 Tc 随后引入到带有与 Tc 相容的螯合基团的物质中的途径、来引入^{99m}Tc 的过程中，二硫键的整体性难以保持。这是因为二硫键可以相当容易地由试剂盒中常用的还原剂还原，其中所述的试剂盒是针对放射性药剂的一步制备法设计而成的。因此，要在 Tc 螯合过程中可以容易地还原二硫键，则需要用二硫键的模拟物来取代。因此，在本发明范围内的另一种修饰为采用本文所或本领域的技术人员已知的方法用模拟物来取代二硫键部分，同时保持本发明所用的结合部分的活性和其他所需的性质。

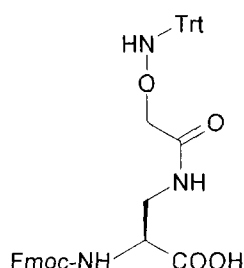
脞连接体

在大量的文献中，脞部分都已经被研究者用作连接体。其中，Wahl, F and Mutter, M, *Tetrahedron Lett.* (1996) 37, 6861-6864) 的著作是最受关注的。将含有氨基醇官能团(4)和含义烷氧基氨基官能团(5)的氨基酸引入到所述的肽链中，但并非必须在所述肽链的末端。在形成所述的肽之后，除去侧链保护基团。醛基是暴露的，并形成脞键。



Fmoc-Dap(Boc-Ser(t-Bu))-OH

4



Fmoc-Dap(Trt-Aoa)-OH

5

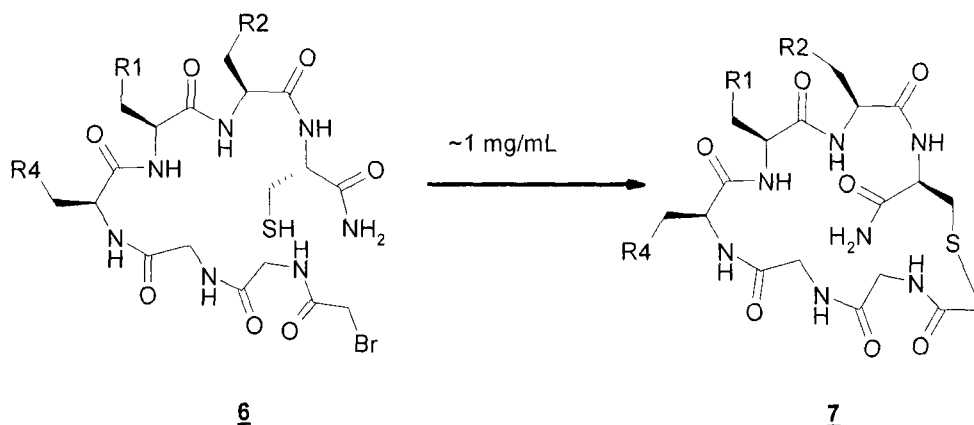
羊毛硫氨酸连接体

羊毛硫氨酸为环状硫化物，其中所述的二硫键(S-S)被(C-S)键所替代。因此，发生还原的易变性相当低，该键对氯化亚锡是稳定的。羊毛硫氨酸可以通过多种方法来制备。

使用溴乙酰化的肽来制备羊毛硫氨酸

使用已知的方法可以容易地制备羊毛硫氨酸。例如参见 Robey *et al.* (Robey, F.A. and Fields, R.L. *Anal. Biochem.* (1989) 177, 373-377) and Inman, *et al.* (Inman, J.K.; Highet, P.F.; Kolodny, N.; and Robey, F.A. *Bioconjugate Chem.* (1991) 2, 458-463; Ploinsky, A. Cooney, M.C. Toy-Palmer, A. Osapay, G. and Goodman, M. J. *Med. Chem.* (1992) 35, 4185-4194; Mayer, J.P.; Zhang, J.; and Liu, C.F. in : Tam, J.P. and Kaumaya, P.T.P. (eds), "Peptides, Frontiers of Peptide Science," Proceedings of the 15th American Peptide Symposium, June 14-19 Nashville, Tenn. Klumer Academic Pub. Boston. pp 291-292;. Wakao, Norihiro; Hino, Yoichi; Ishikawa, Ryuichi. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* (1995), 7 pp. JP 07300452 A2 19951114 Heisei; JP 95-49692 19950309; JP 94-41458 19940311, 这些文献都已经在本领域出版公开。采用 Boc 自动化的肽合成方法、然后将所述的肽的末端与溴乙酸偶联来制备肽，从而得到高产量的溴乙酰化的肽。所述肽的裂解和去保护是使用 HF/苯甲醚来完成的。如果所述的肽含有半胱氨酸基团，则其反应性可以采用低 pH 来控制。如果将介质的 pH 升高至 6-7，所述的肽就会发生聚合或环化。高浓度(100 mg/mL)对聚合是有利的，但是在低浓度(1 mg/mL)下环化是有利的，例如在下述方案 1 中，6 环化形成 7。

方案 1—使用悬垂的溴乙酰胺官能团环化半胱氨酸的



Inman 等人证明了 N^α -(Boc)- N^ϵ -[N-(溴乙酰基)- β -丙氨酰基]-L-赖氨酸作为溴乙酰基载体的用途，其中所述的载体可以用于 Boc 肽合成中，从而允许在序列中的任何位置放置带有溴乙酰基的部分。在初步试验中，他们发现将溴乙酰基-赖氨酸衍生物与半胱氨酸分开并具有 4-6 个氨基酸的肽倾向于环化，从而表明所述策略的潜在用途。

通过半胱氨酸硫醇加至丙烯酸胺来制备羊毛硫氨酸

可以实施上述策略的多种变体。可以采用溴化作用-脱溴化氢作用-硫醇加入的顺序，或者采用使用二琥珀酰亚胺碳酸酯脱水然后加入硫醇的方法，来在树脂上用与树脂结合的丝氨酸制备羊毛硫氨酸。参见 Ploinsky et al., *M. J. Med. Chem.*, 35: 4185-4194 (1992); Mayer et al., "Peptides, Frontiers of Peptide Science", in *Proceedings of the 15th American Peptide Symposium*, Tam & Kaumaya (eds), June 14-19, 1995, Nashville, Tenn. (Kluwer Academic Pub. Boston) pp. 291-292. 此外，已经详细地证明了硫醇缀合加至丙烯酸胺，并提供了关于 2-巯基乙醇加至丙烯酸胺的文献。参见 Wakao et al., *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, JP 07300452 A2 (1995)。

二芳基醚或二芳香胺键

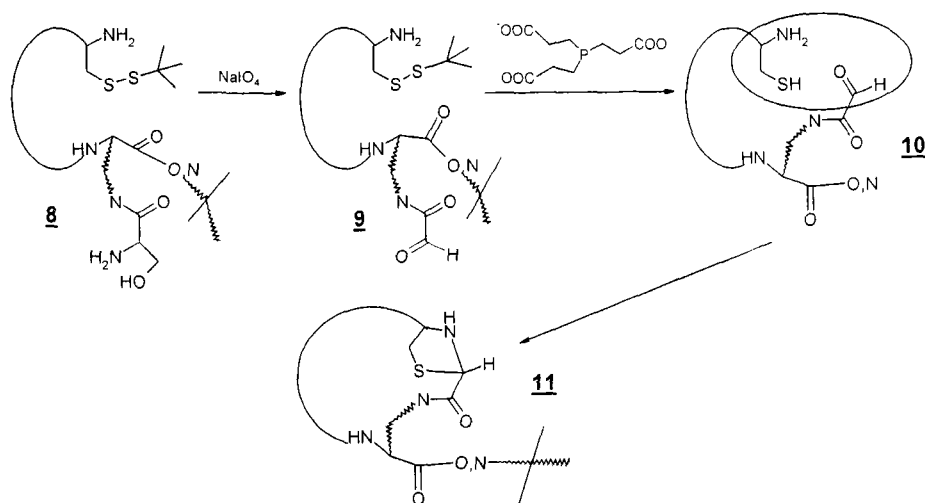
从芳基硼酸与酪氨酸的分子内环化得到的二芳基醚键

已经报道了这样的反应，在空气中，在环境温度下，使用吡啶或

三乙胺作为碱，使芳基硼酸与苯酚、胺和杂环胺在溶于二氯甲烷的乙酸铜存在下发生反应，从而得到高产量(高达 98%)的非对称二芳基醚和相关的胺。参见 Evans et al., *Tetrahedron Lett.*, 39:2937-2940 (1998); Chan et al., *Tetrahedron Lett.*, 39:2933-2936 (1998); Lam et al., *Tetrahedron Lett.*, 39:2941-2944 (1998)。在将 N-保护的酪氨酸衍生物作为苯酚成分的情况下，产量同样高达 98%。这证明，可以预计氨基酸酰胺(肽)对所述的转化是稳定的，并且产量高。考虑到基于 S_NAr 反应、以及在高稀释条件下或树脂上分子内环化反应的一般性而使得肽与内酰胺容易地发生分子内环化以及容易地形成分子内二芳基醚，存在分子内反应的先例，其中假稀释效应模拟了高稀释条件。

使用内酰胺键通过分子内自然化学连接而形成环状肽

方案 2—使用噻唑烷键通过肽醛与半胱氨酸部分的分子内反应来形成环状肽



可以使用的另一种方法涉及合适定位的、邻近的氨基硫醇官能团(例如，通常由在线性序列末端放置半胱氨酸而衍生得到，或者通过赖氨酸的侧链氮而被连接(tether)到所述的序列中)和醛官能团发生的分子内环化，从而提供噻唑烷，该噻唑烷导致形成二环肽，其中的一个环是通过主链上的残基形成的，而第二个环为噻唑烷环。上文的方案 2 提供了实例。所需的醛官能团可以由合适定位的、邻近的氨基硫醇官能团通过高碘酸钠的裂解作用来形成，其中所述的氨基硫醇官能

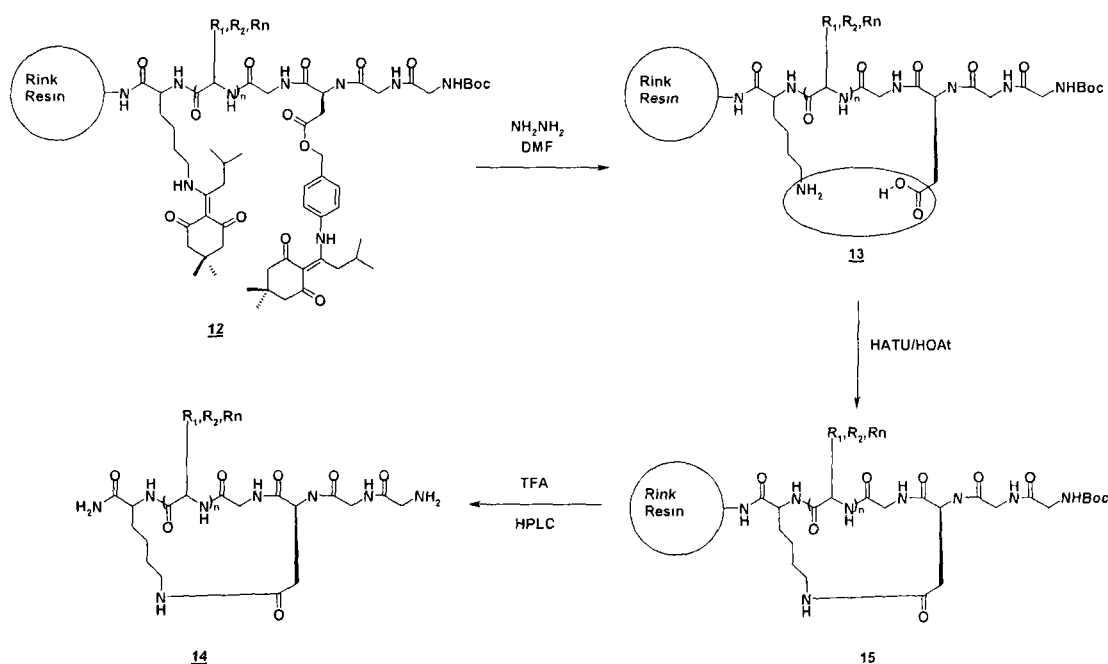
团可以以去保护的丝氨酸形式存在，所述的丝氨酸通过添加到赖氨酸部分的侧链氨基上而与所述的链相连。在某些情况下，所需的醛官能团是通过使在所述链的 C 末端或 N 末端处的、受保护的醛衍生物暴露而形成的。这种策略的实例可以在 Botti, P.; Pallin, T. D. and Tam, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, *118*, 10018-10034 中找到。

基于在树脂上悬垂的氨基与羧基的分子内环化的内酰胺

大环肽可以通过以头尾环化或者以悬垂基团环化的方式形成内酰胺来制备。基本策略是制备完全保护的肽，其中可以选择性地除去氨基保护基团和羧基保护基团。已经研发出正交保护 (orthogonal protecting) 方案。在这些已经研究出来的方案中，最多使用的是烯丙基、三苯甲基和 Dde 方法。参见 Mellor *et al.*, "Synthesis of Modified Peptides," in Fmoc Solid Phase Synthesis: A Practical Approach, White and Chan (eds) ([Oxford University Press, New York, 2000]), Chapt. 6, pp. 169-178。Dde 方法是受到关注的，这是因为该方法对羧酸官能团 (Dmab 酯) 和氨基 (Dde 基团) 使用了相似的保护基团。这二者的保护基团均使用溶于 DMF 中的 2-10% 肼在环境温度下除去。备选地，对于氨基可以使用 Dde，而对于羧基可以使用烯丙基。

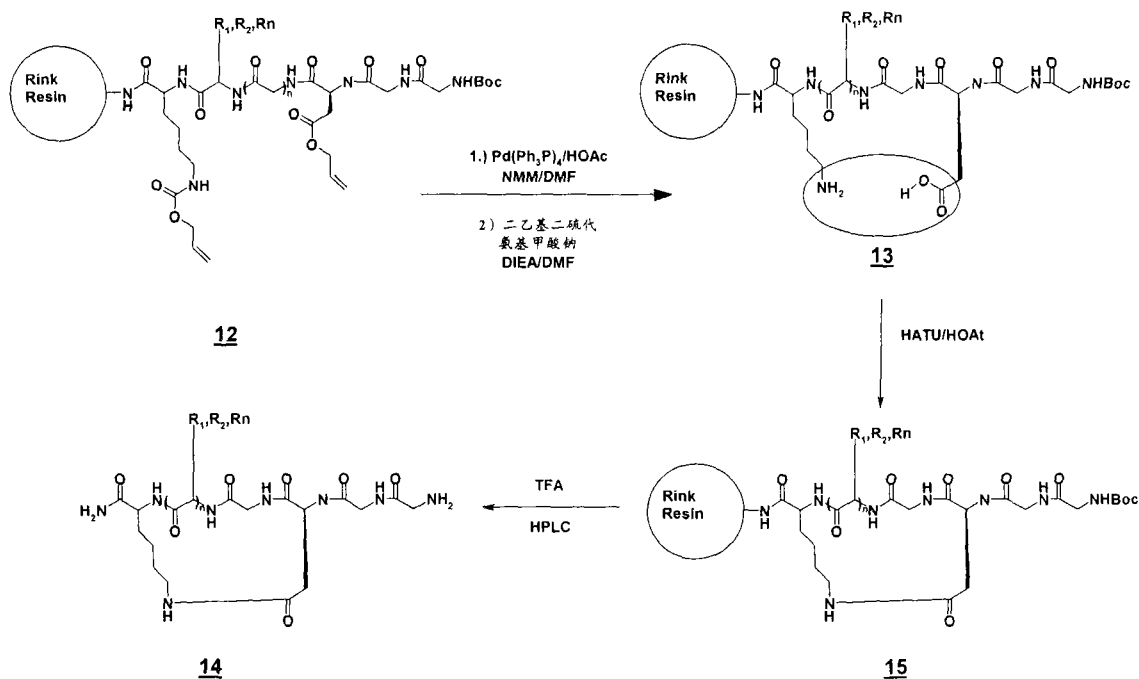
内酰胺官能团 (使用标准的肽偶联试剂 (例如 HATU, PyBOP 等) 通过分子内偶联可得) 可以作为二硫键的替代物起作用。Dde/Dmab 方法示于以下方案 3a 中。

方案 3a—通过 Lys 和 Asp 的拟正交去保护以及随后在树脂上的环化和从树脂上裂解的过程而形成替代二硫键的内酰胺



因此，可以在 Tentagel-based Rink 酰胺树脂上以低负载 (~0.1-0.2 mmol/g) 来制备含有例如 Dde-保护的赖氨酸和 Dmab 酯的线性序列。使用胍对两种官能团去保护，然后在树脂上环化，从而得到所需的产物。

方案 3b—通过使用基于烯丙基的保护基团对 Lys 和 Asp 进行拟正交去保护以及随后在树脂上的环化和从树脂上裂解的过程而形成替代二硫键的内酰胺



-sheet peptide assemblies, Clark *et al.*, *Chem. Eur. J.*, 5(2):782-792 (1999); Highly efficient synthesis of covalently cross-linked peptide helices by ring-closing metathesis, Blackwell *et al.*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 37(23):3281-3284 (1998); Synthesis of novel cyclic protease inhibitors using Grubbs olefin metathesis, Ripka *et al.*, *Med. Chem. Lett.*, 8(4):357-360 (1998); Application of Ring-Closing Metathesis to the Synthesis of Rigidified Amino Acids and Peptides, Miller *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 118(40):9606-9614 (1996); Supramolecular Design by Covalent Capture, Design of a Peptide Cylinder via Hydrogen-Bond-Promoted Intermolecular Olefin Metathesis, Clark *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 117(49):12364-12365 (1995); Synthesis of Conformationally Restricted Amino Acids and Peptides Employing Olefin Metathesis, Miller *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 117(21):5855-5856 (1995)。可以制备 C-烯丙基化的氨基酸或者可能地制备 N-烯丙基化的氨基酸, 并将其应用在上述反应中, 从而制备作为含有二硫键的肽的替代物的碳桥环状肽。

还可以制备具有烯烃基团的新型化合物。使用含烯烃的连系物 (tether) 将酪氨酸的羟基官能化是一种选择。赖氨酸的 ϵ -氨基为另一种选择, 其中例如添加含烯烃的单元作为酰化部分的一部分。如果赖氨酸的侧链氨基被含烯烃的连系物烷基化, 则其还可以起到用于报告剂的连接点的作用。使用 5-戊烯酸作为用于赖氨酸、鸟氨酸或二氨基丙酸侧链的氨基的酰化试剂是另一种可行的方法。含烯烃的连系物的长度是可以变化的, 从而可以探索结构活性的关系。

肽序列的处理

在本发明范围内的其他修饰包括对可以预计到能够产生具有相似或改善的生物学性质的肽的肽序列进行处理。这些处理包括氨基酸易位 (序列中氨基酸的交换), 逆反肽替换初始序列或经修饰的初始序

列、拟肽 (peptoid)、逆反拟肽序列和合成肽的应用。此外还包括了这样的结构，其中特异性的残基为拟肽，而非肽，这可以形成既非完全的肽又非完全的拟肽的杂交分子。

本发明的肽或缀合体可以在任何合适的氨基或羧基上、或者在其他合适的官能团上包含一个或多个保护基团。除非另作说明，否则术语“保护基团”是指适用于保护其所结合的官能团的特征性化学功能的保护性基团。例如，保护基团可以用于保护氨基或羧基官能团，并且可以包括例如 Fmoc、苯甲基、苯甲氧基羰基、烷基酯或者常用于保护所述的官能团的其他基团。其他保护基团在例如 T.W. Green, *Protective Groups in Organic Synthesis* (Wiley, NY 1981) 中有所公开。

在合适的环境下，本发明的肽或缀合体还可以包括“失活基团”，其是指这样的化学基团，该基团能够与(例如)肽单元的 N 末端 (-NH₂) 或 C 末端 (-COOH) 基团发生化学反应，从而通过化学反应将其转化为合适的衍生物，该衍生物保持了相应肽部分对纤维蛋白的特异性，但是所述衍生物不能分别与不同部分上的羧基或氨基官能团发生化学反应，因此不可能参与到甲酰胺反应中。所述的基团可以包括：乙酰基(也称为 CH₃(CO)-或 Ac)、氨基及其衍生物(例如 -NH₂, -NH(CH₃), H₂NOC-CH₂-NH-)。

包含本发明的纤维蛋白结合肽的多聚体 (multimeric) 构建体可以用已知的连接体和技术来制备，所述的连接体和技术在例如共同未决的 U.S.S.N. (US 2005/0147555) 中列出，所述的文献以引用方式全文并入本文。在优选的实施方案中，可以制备包含纤维蛋白结合肽的同型二聚体。这种二聚体化合物具有增大的亲和力，因此表现出对纤维蛋白更好的结合。

在本发明的实施中，纤维蛋白结合部分与纤维蛋白(相对于纤维蛋白原)的亲和性测定值是有用的量度，其被称为纤维蛋白的特异性。用于定量结合和测定亲和性的标准测定法包括平衡透析、平衡结合、凝胶过滤或者对可以由结合部分及其靶标之间的相互作用而导致的大

量光谱变化（例如荧光偏振方面的变化）进行监控。这些技术测定了结合配体以及游离配体的浓度，作为配体（或蛋白质）浓度的函数。结合多肽（[结合]）的浓度与游离多肽（[游离]）的浓度、以及对于所述多肽（即，在纤维蛋白（N）上）的结合位点的浓度有关，如以下等式所述：

$$[\text{结合}] = N \times [\text{游离}] / ((1/K_a) + [\text{游离}])$$

由上述等式解答出的数据得到了结合常数 K_a ，其为结合亲和性的定量量度。结合常数 K_a 与解离常数 K_D 互为倒数。在亲和性的测量中更多的是报道 K_D 。对纤维蛋白原的 K_D 是对纤维蛋白的 K_D 的 1.5 倍的肽被认为是特异性较低的纤维蛋白结合剂。对纤维蛋白原的 K_D 是对纤维蛋白的 K_D 的 10 倍的肽是特异性适中的纤维蛋白结合剂，而对纤维蛋白原的 K_D 是对纤维蛋白的 K_D 的 100 倍或更高的肽被认为对纤维蛋白具有高度的特异性。优选的是，本发明的肽和试剂对纤维蛋白原的 K_D 要比对纤维蛋白的 K_D 高至少 1.5 倍，更优选的是高至少 10 倍，甚至更优选的是高至少 100 倍，最优选的是高至少 1000 倍。优选的纤维蛋白结合多肽对纤维蛋白的 K_D 在 1 纳摩尔（nM）至 100 纳摩尔（ μ M）的范围内，包括 K_D 值为至少 10 nM，至少 20 nM，至少 40 nM，至少 60 nM，至少 80 nM，至少 1 μ M，至少 5 μ M，至少 10 μ M，至少 20 μ M，至少 40 μ M，至少 60 μ M 和至少 80 μ M。

在将纤维蛋白结合部分用作成像试剂的情况下，结合特异性的其他方面将变得更重要。成像试剂在动态系统（dynamic system）中起作用在于在成像过程中，成像试剂与靶标的结合并非处于稳定的平衡状态下。例如，当最初注入成像试剂时，成像试剂的浓度以及试剂-靶标络合体的浓度快速增加。但是，在注入片刻后，循环（游离）的成像试剂开始清除出整个肾脏或肝脏中，并且成像试剂的血浆浓度开始下降。这种血浆中游离成像试剂浓度的下降最终导致试剂-靶标络合体发生解离。成像试剂的有用性取决于试剂-靶标解离的速率相对于试剂的清除速率间的差异。理想的是，与清除速率相比，解离的速率较慢，从而形成较长的成像时间，在其中，血浆中的试剂-靶标络合体的浓度较高，而游离成像试剂的浓度（背景信号）较低。所述络合体的

解离速率受到了解离速率常数 k_{off} 的控制。由于较高的 k_{off} 值与较快的解离速率相对应，所以优选的是获得低 k_{off} 的结合肽，用作成像试剂。

根据本发明的纤维蛋白结合部分特别适用于在体外或体内检测和/或成像纤维蛋白，并且特别适用于检测和/或成像纤维蛋白凝块和病理学血管生成过程。可以使用任何合适的检验或成像纤维蛋白的方法。

就检测溶液中的纤维蛋白或纤维蛋白衍生多肽而言，可以以可检测的方式标记根据本发明的结合部分，例如荧光标记、放射性标记或酶标记，然后将所述的结合部分与所述的溶液接触，其后检测在所述的结合部分与所述的纤维蛋白靶标之间形成的络合物。例如，荧光标记的纤维蛋白结合肽可以用于体外纤维蛋白的检测测定法中，其中在允许发生结合的条件下，将所述的肽加入到待测试纤维蛋白的溶液中。可以通过测定由纤维蛋白结合肽所产生的荧光偏振相对于游离肽的荧光偏振的增大情况，来检测荧光标记的纤维蛋白结合肽与纤维蛋白之间的络合物，并对其定量。

备选地，可以采用夹心型 ELISA 测定法，其中纤维蛋白结合部分被固定在固体支持物（例如塑料管或孔）上，然后将怀疑含有纤维蛋白或纤维蛋白衍生多肽的溶液与固定化的结合部分接触，洗去未结合的材料，并使用合适的检测试剂（例如识别纤维蛋白的单克隆抗体）检测络合的多肽。所述的单克隆抗体是通过本领域中已知的传统方法可检测的，所述的方法包括以可检测的方式标记（例如放射性标记），与酶（例如辣根过氧化物酶等）缀合，或者是荧光标记。

就溶液中或得自溶液中的可溶性纤维蛋白或纤维蛋白衍生多肽的检测或纯化而言，可以将本发明的结合部分固定在固体基底（例如层析支持物或其他多孔材料）上，然后可以在适于形成结合部分/纤维蛋白络合物的条件下使固定化的结合剂负载或者与溶液接触。可以除去溶液中未结合的部分，并采用例如抗纤维蛋白或抗结合部分的抗体来检测所述的络合物，或者在合适的洗提条件下从所述的结合部分上释放出纤维蛋白靶标。

根据本发明多肽的特别优选的用途是生成血栓和病理学血管生成过程的可目测图像，从而帮助诊断、监控和治疗所述的紊乱。可以通过与适用于诊断检测的、具有标记物的多肽缀合，将本文所公开的纤维蛋白结合多肽转化为用于检测血栓的成像试剂。被称为例如可检测标记物或者可有效诊断的任何部分的所述标记物包括可以通过成像过程来检测的任何部分，也就是说当与所述的技术结合使用时，能够提供、改善、或者以任何方式有利地修改通过诊断成像技术来检测的信号的任何部分，从而能够记录具有诊断用途（优选为形成对比）的图像，其中所述的诊断成像技术包括例如磁共振成像，放射性成像，X射线成像，光成像，超声成像。根据本发明的可检测标记物或有效诊断部分的实例包括例如螯合的 γ 射线或者正电子发射放射性核素；螯合的或多螯合的络合物形式的顺磁金属离子；X射线吸收试剂，其包括原子序数大于20的原子；超声造影剂，包括例如填充有气体的微泡；染料分子；荧光分子；磷光分子；在UV光谱中吸收的分子；量子点；在近红外辐射或远红外辐射中能够进行吸收的分子；以及通常产生可检测物质的所有部分。

优选的是，表现出强的纤维蛋白结合能力的、本发明的肽与适用于待使用的检测方法的标记物缀合或连接（直接或通过连接体）。例如，可以将纤维蛋白结合剂与适用于磁共振成像(MRI)的顺磁螯合剂缀合，与适用于X射线成像的放射性标记物缀合，与适用于超声检测的超声微球或脂质体缀合，或者与光学成像染料缀合。

备选地，表现出强的纤维蛋白结合能力的、本发明的肽与治疗试剂缀合或连接（直接或通过连接体）。所述的化合物可用于治疗或减轻与纤维蛋白有关的疾病。

在本发明范围内的其他修饰包括在纤维蛋白结合肽的靶向序列与可检测标记物或治疗试剂之间引入连接体或间隔体。使用这些连接体/间隔体可以改善结合肽的相关性质（例如改善结合能力、增加血清稳定性、调节疏水性或亲水性、提供改善的药物动力学和药效性质等）。事实上，使用合适的连接体和/或间隔体可以在纤维蛋白结合肽与可检

测标记物或治疗试剂之间提供最佳的距离，这种最佳距离反之可以改善本发明化合物的靶向能力。这些连接体可以包括但不限于取代的或未取代的、饱和的或不饱和的、直链的或分支的烷基链；衍生的或非衍生的聚乙二醇，聚氧乙烯或聚乙烯吡啶链；一个或多个氨基酸（优选为3或多个氨基酸，最优选为至少4个或6个氨基酸）；由支链、分支或环状氨基酸形成的肽，糖，或者本领域普通的脂肪族或芳香族间隔体，取代的或未取代的聚酰胺链；衍生的或非衍生的聚胺，聚酯，聚乙烯亚胺，聚丙烯酸酯，聚（乙烯醇），聚甘油，或多糖（例如右旋糖苷）链；糖基化的氨基酸残基，交替的嵌段共聚物（alternating block copolymer），丙二酸，琥珀酸，戊二酸，脂肪酸和庚二酸；己酸；简单的二胺和二醇；本文所公开的任何其他连接体，以及本领域已知的任何其他简单的聚合物连接体，例如在 WO 98/18497 和 WO 98/18496 中所描述的那些。

此外，与上文所述的部分相结合的连接体还可以用于赋予所述的多肽以特别的益处。所述的连接体可以为线性的或分支的，并且优选地至少为二价的连接部分。“二价的连接部分”是指包含两个官能团的链，该链允许在其一侧上与肽缀合，而在另一侧上与可检测标记物或治疗试剂缀合。优选的是，二价连接部分允许与所述肽的末端氨基或羧基缀合，以及与可检测标记物或治疗试剂上的合适的官能团缀合。

“官能团”是指在分子或部分中的特定的原子基团，这些基团负责了所述分子或部分的特征性的化学反应，并且可以包括例如肽的 $-NH_2$ 或 $-COOH$ 基团，以及可检测标记物或治疗试剂的其他活性基团（例如氨基、巯基或羧基）。

所述的连接体还可以是多官能连接部分或多官能连接体，其是指包含至少3个官能团的线性或分支的链，其中的1个官能团将所述的连接部分与所述的肽连接，而其余的官能团将所述的连接部分与至少2个可检测标记物和/或治疗试剂连接。所述的多官能连接部分可以包括例如：N分支的赖氨酸体系（参见 *f. i.*, Veprek, P et al., *J. Pept. Sci.* 5, 5 (1999); 5, 203 (1999)）；多羧基化合物及其合适的衍

生物，其中所述的羧基处于适当激活或保护的形式下；聚胺化的化合物及其合适的衍生物，其中所述的氨基处于适当激活或保护的形式下；以及氨基酸和聚氨基酸，例如聚鸟氨酸、聚精氨酸、聚谷氨酸、聚天冬氨酸。

可以结合具有连接体的脂质分子，从而可以形成超声气泡、脂质体或者其他基于积聚而形成的构建体。这种构建体可以用作用于靶向和递送诊断报告剂、治疗试剂（例如用于治疗化学“弹头”）或者他们的组合的试剂。

在本发明中，特别优选的连接体为GGGK。此外，连接体GSAGSK (SEQ ID NO. 137)和GAGSGK (SEQ ID NO. 138)也是优选的。

通常，使用可检测标记的纤维蛋白结合部分的技术是基于这样的前提，即，所述的标记物产生在患者体外可检测的信号。当将可检测标记的纤维蛋白结合部分施用至怀疑患有纤维蛋白相关紊乱（例如血栓或病理学血管生成过程）的患者时，所述的纤维蛋白结合部分对纤维蛋白的高亲和性使得所述的结合部分与纤维蛋白结合，并在目的位点处积聚标记物。使用扫描装置检测由标记的肽所产生的信号，其中所述的装置将根据所采用的标记物的种类而变化，然后所述的信号被转换成所述区域的图像。

磁共振成像

本发明的纤维蛋白结合部分可以有利地与MRI可检测的部分缀合，从而形成用于MRI的造影剂，其中所述的MRI可检测部分例如为顺磁金属螯合剂或离子颗粒（例如超顺磁FeO颗粒）。优选的顺磁金属离子的原子序数为21-31、39、42、43、44、49或57-83。这些金属离子包括过渡金属或镧系金属的离子，这些金属具有1个或多个，更优选的是具有5个或多个未配对的电子，以及至少1.7Bohr磁子的磁矩。优选的顺磁金属选自：Fe(2+)、Fe(3+)、Cu(2+)、Ni(2+)、Rh(2+)、Co(2+)、Cr(3+)、Gd(3+)、Eu(3+)、Dy(3+)、Tb(3+)、Pm(3+)、Nd(3+)、Tm(3+)、Ce(3+)、Y(3+)、Ho(3+)、Er(3+)、La(3+)、Yb(3+)、Mn(3+)、

Mn(2+)。Gd(3+) (也称为 Gd(III)) 特别优选地用于 MRI, 这是因为其具有高的弛豫和低的毒性, 并且仅有一种生物可用的氧化状态可以利用。从 1988 年开始, 已经将 Gd(III) 螯合剂用于临床和辐射学 MR 用途中, 并且目前大约 30% 的 MR 检验使用了基于钆的造影剂。此外, 本发明的纤维蛋白结合部分还可以与其他 MRI 可检测的部分 (例如一种或多种超顺磁颗粒) 缀合。

从业者可以根据检测血栓所需的剂量并考虑诸如金属对受试者的毒性之类的其他因素来选择金属。参见 Tweedle et al., *Magnetic Resonance Imaging* (2nd ed.), vol. 1, Partain et al., eds. (W. B. Saunders Co. 1988), pp. 796-7。通常, 单种金属的所需剂量与其弛豫成比例, 并根据金属的生物学分布、药物动力学和代谢来修改。三价阳离子 Gd^{3+} 特别优选地用于 MRI 造影剂, 这是因为其具有高的弛豫和低的毒性, 以及其他优点 (其仅有一种生物可用的氧化状态, 这使患者所不需要的金属代谢最小化)。另一种有用的金属为 Cr^{3+} , 其是相对便宜的。

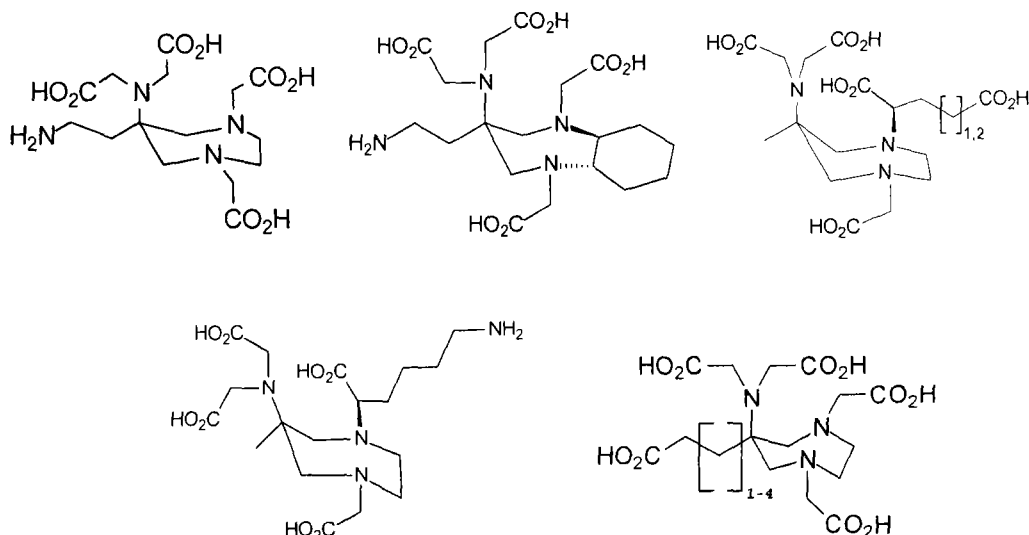
螯合剂 (也称为螯合配体或螯合试剂) 为这样的化学部分、试剂、化合物或分子, 其具有一个或多个可以作为顺磁金属的配合体以及与顺磁金属形成络合体的极性基团。合适的螯合剂是本领域中已知的, 并且包括: 具有亚甲基磷酸基团的酸, 具有亚甲基 carbohydroxamine 酸基团的酸, 具有羧乙撑基团的酸, 或者具有羧甲基基团的酸。在优选的实施方案中, 所述的螯合剂包括环状或线性的聚氨基聚羧酸或聚磷酸, 并且包含至少 1 个氨基、巯基或羧基。螯合剂的实例包括但不限于聚氨基聚羧酸及其衍生物, 包括例如: 二乙撑三胺五乙酸 (DTPA) 及其衍生物, 例如苯并-DTPA, 二苯并-DTPA, 苯基-DTPA, 二苯基-DTPA, 苄基-DTPA, 二苄基-DTPA; *N,N*-二[2-[(羧甲基)[(甲基氨基甲酰基)甲基]氨基]乙基]-甘氨酸 (DTPA-BMA); *N*-[2-[[二(羧甲基)氨基]-3-(4-乙氧基苯基)丙基]]-*N*-[2-[[二(羧甲基)氨基]乙基]甘氨酸 (EOB-DTPA); 4-羧基-5, 8, 11-三(羧基甲基)-1-苯基-2-氧杂-5, 8, 11-三氮杂十三-13-酸 (BOPTA); *N,N*-二[2-[[二[2-(1, 1-二甲基乙氧

基)-2-氧代乙基]氨基]乙基]-L-谷氨酸 1-(1,1-二甲基乙基)酯 N,N-二[2-[二(羧甲基)氨基]乙基]L-谷氨酸(DTPA-GLU);与赖氨酸缀合的DTPA(DTPA-Lys);乙二胺四乙酸(EDTA);1,4,7,10-四氮杂环十二烷1,4,7-三乙酸(DO3A)及其衍生物,包括例如[10-(2-羟基丙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷1,4,7-三乙酸(HPDO3A);1,4,7-三氮杂环壬烷N,N',N''-三乙酸(NOTA);2-甲基-1,4,7,10-四氮杂环十四烷-1,4,7,10-四乙酸(MCTA);6-[二(羧甲基)氨基]四氢-6-甲基-1H-1,4-二氮杂草-1,4(5H)-二乙酸(AAZTA),其由W003008390申请所提供,该文献以引用方式并入本文;1,4,7,10-四氮杂环十四烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)及其衍生物,包括例如苯并-DOTA、二苯并-DOTA、($\alpha, \alpha', \alpha'', \alpha'''$)-四甲基-1,4,7,10-四氮杂环十四烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTMA);或1,4,8,11-四氮杂环十四烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(TETA);或者其中一个或多个羧基被磷酸和/或磷酸基团所替换的相应的化合物,包括例如N,N'-二-(吡哆醛-5-磷酸)亚乙基二胺-N,N'-二酸(DPDP);亚乙基二次氨基四(甲基磷酸)(EDTP);1,4,7,10-四氮杂环十四烷-1,4,7,10-四(亚甲基磷酸)(DOTP);例如在US5362476和US5,409,689中公开的磷酰基烷基-多氮杂大环化合物以及在US6509324中公开的线性磷酰基烷基衍生物;或者大环螯合掩蔽剂,例如texaphirine、卟啉、酞花青。

其他螯合配体为亚乙基二-(2-羟基-苯基甘氨酸)(EHPG)及其衍生物,包括5-C1-EHPG、5Br-EHPG、5-Me-EHPG、5t-Bu-EHPG和5sec-Bu-EHPG;二-(2-羟基苄基)-亚乙基-二氨基二乙酸(HBED)及其衍生物;1,3-亚丙基二胺四乙酸(PDTA)和三亚乙基四氨基六乙酸(TTHA)的衍生物;1,5,10-N,N',N''-三(2,3-二羟基苯基)-tricatecholate(LICAM)和1,3,5-N,N',N''-三(2,3-二羟基苯基)氨基甲基苯(MECAM)的衍生物。本发明所包括的代表性螯合剂和螯合基团的实例在例如W098/18496、W086/06605、W091/03200、W095/28179、W096/23526、W097/36619、PCT/US98/01473、PCT/US98/20182和U.S. 4,899,755中有所公开,所有这些文献均以引用方式并入本文。

根据本发明的优选的配体在图 6a 至 6c 中列出，同时还列出了关于所述配体制备的合适的书录文献。

特别优选的是：DTPA、DTPA-GLU、DTPA-Lys、DOTA、AAZTA 和如下 AAZTA 衍生物：



根据本发明，MRI 造影剂的螯合剂直接或者通过连接体与所述的纤维蛋白结合肽偶联。应该对螯合剂的位置加以选择，以使其不会干扰纤维蛋白结合部分的结合亲和性和特异性。优选的是，将所述的螯合剂添加到 N 末端或 C 末端，但是还可以将所述的螯合剂结合到序列内的任何位置处。在优选的实施方案中，具有游离的中心羧酸基团的螯合剂（例如 DTPA-Asp(β -COOH)-OtBu）使得其容易地通过形成酰胺化学键而结合在所述肽的 N 末端上。所述的螯合剂还可以在连接体的帮助下而结合在 C 末端处。备选地，作为将带有合适的异硫氰基的 DTPA 与所述肽序列中任何位置处的游离氨基相连的方式，可以采用异硫氰酸酯缀合化学法。

通常，所述的纤维蛋白结合部分可以直接地或者共价地与所述的金属螯合剂（或其他可检测标记物）结合，或者所述的纤维蛋白结合部分可以使用连接体与所述的金属螯合剂偶联或缀合，其中所述的连接体可以是但不限于酰胺、脲、乙缩醛、缩酮、双酯、羰基、氨基甲酸酯、硫脲、砜、硫酯、酯、醚、二硫化物、内酯、亚胺、磷酰基或磷酸二酯键；取代的或未取代的、饱和或非饱和的烷基链；单一一种氨基酸或不同氨基酸的线性、分支或环状氨基酸链（例如纤维蛋白结

合部分的 N 末端或 C 末端的延伸物)；衍生或非衍生的聚乙二醇、聚氧乙烯或聚乙烯吡啶链；取代的或未取代的聚酰胺链；衍生或非衍生的聚胺、聚酯、聚乙烯亚胺、聚丙烯酸酯、聚(乙烯醇)、聚甘油或寡糖(例如右旋糖苷)链；交替的嵌段共聚物；丙二酸、琥珀酸、戊二酸、脂肪酸和庚二酸；己酸；简单的二胺和二醇；以及本领域已知的其他简单的聚合物连接体(例如参见 WO 98/18497, WO 98/18496)或本文所讨论的其他连接体。优选的是，所述连接体的分子量是可以严格控制的。所述分子量的大小可以在小于 100 至大于 1000 的范围内。优选的是，所述连接体的分子量小于 100。此外，理想的是使用在体内可生物降解的连接体，从而为本发明的成像试剂提供有效的排泄途径。根据在所述连接体内的位置，所述的可生物降解的官能团可以包括酯、双酯、酰胺、磷酸脂、醚、乙缩醛和缩酮官能团。

通常，可以采用已知的方法使用所述的连接体使金属螯合剂与纤维蛋白结合部分偶联。例如参见 WO 95/28967、WO 98/18496、WO 98/18497 以及本文的论述。所述的纤维蛋白结合部分可以通过例如酰胺键在其 N 末端或 C 末端与金属螯合剂的金属配位主链氮或者金属螯合剂本身的乙酸酯臂连接。本发明还包括在任何位置上的螯合剂的连接，前体条件所述的金属螯合剂保持了与所述金属紧密结合的能力以使毒性最小。类似地，可以修饰或延长所述的纤维蛋白结合部分，以便形成用于结合金属螯合剂的位点，前体条件是这样的修饰或延长不会消除所述部分结合纤维蛋白的能力。

可以按照与传统的 MRI 造影剂相同的方式来使用本发明公开所制备的 MRI 造影剂。当对血栓进行成像时，某些 MR 技术和脉冲序列可以优选用于增强血栓与背景血液和组织的对比。这些技术包括但不限于例如寻求是血液变暗的黑血血管造影术序列，例如快速自旋回波序列(例如参见 Alexander et al., *Magnetic Resonance in Medicine*, 40(2): 298-310 (1998)) 和涡流梯度回波序列(flow-spoiled gradient echo sequence)(例如参见 Edelman et al., *Radiology*, 177(1): 45-50 (1990))。这些方法还包括不依赖流动的技术，由于

通过对比而得到增强的血栓、与血液和组织之间的 T_1 的差异，而使得所述的技术增强了对比差异，例如反转恢复制备的序列或饱和恢复制备的序列，他们会增强血栓与背景组织之间的对比。此外，由于本发明没有明显地改变 T_2 ，所以 T_2 制备方法还可以证明是有用的（例如参见 Gronas et al., *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 7(4): 637-643 (1997)）。最终，磁化转移制备还可以改善所述试剂的对比（例如参见 Goodrich et al., *Investigative Radiology*, 31(6): 323-32 (1996)）。

可以将经标记的试剂以可注射组合物的形式向患者施用。施用 MRI 造影剂的方法优选的是肠胃外施用，其是指静脉内施用、动脉内施用、鞘内施用、间质施用或腔内施用（intracavitarily）。对于血栓成像，静脉内施用或动脉内施用是优选的。对于 MRI，包括受试者接受足以使血栓位点处的 MR 信号增强至少 10% 的剂量的造影剂。在注射含有纤维蛋白结合部分的 MRI 试剂之后，在 MRI 仪器中对患者进行扫描，从而测定任何血栓的位置。在治疗设置方面，如果需要的话，可以在对血栓进行定位时立即施用溶解血栓的试剂，并随后对患者进行扫描，从而显现血栓的降解情况。

超声成像

当超声通过某种物质传播时，该物质的声学性质将取决于传播的速率和物质的密度。声学性质的改变在不同物质（固体、液体、气体）的界面处是最明显的。超声造影剂是强烈的声波反射剂，这是因为在含液体（例如血液）和含气体的微泡（例如其中分散的微泡或微气球、脂质体或微球）之间存在声学差异。由于超声微泡、脂质体、微球等的尺寸，所以在注射之后，超声微泡、脂质体、微球等在血流中保持的时间比其他可检测部分保持的时间更长；因此，靶向纤维蛋白特异性超声试剂可以证实优异的血栓成像情况以及血管生成的位点。

在本发明的这一方面，可以将所述的纤维蛋白结合部分与可用于超声成像的材料连接。所述的材料可用于形成含有液体或气体的微泡

(例如脂质体、微泡、微球或乳液), 其中所述的液体或气体起到可检测标记物(例如超声波生成气体、或者能够产生超声波生成气体的材料)的作用。用于制备所述微泡的材料包括两性化合物, 例如表面活性剂、脂质、鞘脂、低聚脂(oligolipid)、磷脂、蛋白质、多肽、碳水化合物以及合成或天然的聚合物材料。关于合适的材料和方法的进一步描述, 参见 WO 98/53857、WO 98/18498、WO 98/18495、WO 98/18497、WO 98/18496 和 WO 98/18501, 这些文献以引用方式全文并入本文。

对于包含由稳定微泡构成的悬浮液的造影剂(优选的实施方案), 两性成分是优选的。合适的两性成分包括: 磷脂; 溶血磷脂; 脂肪酸, 例如棕榈酸、硬脂酸、花生四烯酸或油酸; 带有聚合物的脂质, 例如壳多糖、透明质酸、聚乙烯吡咯烷酮或聚乙二醇(PEG)(也称为“聚乙二醇化的脂质”); 带有磺酸化的单-、二-、寡或多糖的脂质; 胆固醇、胆固醇硫酸酯或胆固醇半琥珀酸酯; 生育酚半琥珀酸酯; 具有与醚或与酯相连的脂肪酸的脂质; 聚合的脂质; 二乙酰基磷酸酯; 二十六烷基磷酸酯; 神经酰胺; 聚氧乙烯脂肪酸酯(例如聚氧乙烯脂肪酸硬脂酸酯)、聚氧乙烯脂肪醇、聚氧乙烯脂肪醇酯、聚氧乙烯化的山梨糖醇酐脂肪酸酯、甘油聚乙二醇蓖麻醇酸酯、乙氧基化的大豆固醇、乙氧基化的蓖麻油、或环氧乙烷(EO)和环氧丙烷(PO)的嵌段共聚物; 固醇脂肪酸酯, 包括胆固醇丁酸酯、胆固醇异丁酸酯、胆固醇棕榈酸酯、胆固醇硬脂酸酯、羊毛甾醇乙酸酯、麦角固醇棕榈酸酯或植物甾醇正丁酸酯; 糖酸的固醇酯, 包括胆固醇葡萄糖苷酸、羊毛甾醇葡萄糖苷酸、7-脱氢胆固醇葡萄糖苷酸、麦角固醇葡萄糖苷酸、胆固醇葡萄糖酸酯、羊毛甾醇葡萄糖酸酯或麦角固醇葡萄糖酸酯; 糖酸与醇形成的酯, 包括月桂基葡萄糖苷酸、硬脂酰葡萄糖苷酸、肉豆蔻酰葡萄糖苷酸、月桂基葡萄糖酸酯、肉豆蔻酰葡萄糖酸酯或硬脂酰葡萄糖酸酯; 糖与脂肪酸形成的酯, 包括蔗糖月桂酸酯、果糖月桂酸酯、蔗糖棕榈酸酯、蔗糖硬脂酸酯、葡萄糖醛酸、葡萄糖酸或聚糖醛酸; 皂苷, 包括萨尔萨皂苷元(sarsasapogenin)、菝葜皂苷元(smilagenin)、

常春藤皂苷元、齐墩果酸或洋地黄毒苷元；甘油或甘油酯，包括甘油三棕榈酸酯、甘油二硬脂酸酯、甘油三硬脂酸酯、甘油二肉豆蔻酸酯、甘油三肉豆蔻酸酯、甘油二月桂酸酯、甘油三月桂酸酯、甘油二棕榈酸酯；长链醇，包括正癸醇、月桂醇、肉豆蔻醇、十六烷醇或正十八烷醇；6-(5-胆甾烯-3 β -基氧基)-1-硫代- β -D-吡喃半乳糖苷；二半乳糖基二脂酰甘油酯；6-(5-胆甾烯-3 β -基氧基)己基-6-氨基-6-脱氧-1-硫代- β -D-吡喃半乳糖苷；6-(5-胆甾烯-3 β -基氧基)己基-6-氨基-6-脱氧-1-硫代- β -D-吡喃甘露糖苷；12-(((7'-二乙胺豆香素-3-基)羧基)甲基氨基)十八烷酸；N-[12-(((7'-二乙基氨基豆香素-3-基)羧基)甲基氨基)十八酰基]-2-氨基棕榈酸；N-琥珀酰二油醇磷脂酰乙醇胺；1,2-二油醇-*sn*-甘油；1,2-二棕榈酰-*sn*-3-琥珀酰甘油；1,3-二棕榈酰-2-琥珀酰甘油；1-十六烷基-2-棕榈酰基甘油磷酸乙醇胺或棕榈酰基高半胱氨酸；烷基胺或烷基铵盐，其包含至少一个(C₁₀-C₂₀)、优选为(C₁₄-C₁₈)的烷基链，例如N-硬脂酰胺、N,N'-二硬脂酰胺、N-十六烷基胺、N,N'-二十六烷基胺、N-硬脂酰氯化铵、N,N'-二硬脂酰氯化铵、N-十六烷基氯化铵、N,N'-二十六烷基氯化铵、二甲基二十八烷基溴化铵(DDAB)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)；叔铵盐或季铵盐，其包含1个或优选2个(C₁₀-C₂₀)、优选(C₁₄-C₁₈)的酰基链，该酰基链通过(C₃-C₆)亚烷基桥与N-原子相连，所述的叔铵盐或季铵盐例如是1,2-二硬脂酰-3-三甲基铵-丙烷(DSTAP)、1,2-二棕榈酰-3-三甲基铵-丙烷(DPTAP)、1,2-油酰-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)、1,2-二硬脂酰-3-二甲基铵-丙烷(DSDAP)、以及它们的混合物或组合物。

根据优选的实施方案，至少一种形成微泡包膜的化合物为磷脂，其任选地与上文所述的任何的其他材料混合。根据本说明书，术语“磷脂”意指涵盖了任何的两性磷脂化合物，该磷脂化合物的分子能够在最终的微泡悬浮液中，在气体-水边界的界面处形成稳定的材料膜（通常为单分子层形式）。因此，这些材料在本领域中还被称为“形成膜的磷脂”。

两性磷脂化合物通常包含至少 1 个磷酸基团，以及至少 1 个、优选 2 个亲脂性长链烃基。

合适磷脂的实例包括甘油与 1 个或者优选的 2 个脂肪酸残基（相同或不同）、以及磷酸形成的酯，其中所述的磷酸残基反过来与亲水性基团结合，所述的亲水性基团例如有：胆碱（磷脂酰胆碱-PC），丝氨酸（磷脂酰丝氨酸-PS），肌醇（磷脂酰肌醇），甘油（磷脂酰甘油-PG），乙醇胺（磷脂酰乙醇胺-PE）等基团。由仅具有 1 个脂肪酸残基的磷脂形成的酯在本领域中通常被称为“溶血”形式的磷脂或者溶血磷脂。通常，磷脂中存在的脂肪酸通常为含有 12 至 24 个碳原子、优选含有 14 至 22 个碳原子的长链脂肪族酸，所述的脂肪族链可以含有 1 个或多个不饱和部分，或者优选为完全不饱和的。所述磷脂中所包含的合适脂肪酸的实例包括例如月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、山萘酸、油酸、亚油酸和亚麻酸。优选的是，使用诸如肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸和花生酸之类的饱和脂肪酸。

磷脂的其他实例为：磷脂酰酸，即，甘油磷酸与脂肪酸形成的二酯；鞘脂，例如鞘磷脂，即，其中具有脂肪酸的甘油二酯的残基被神经酰胺链所替代的那些磷脂酰胆碱类似物；心磷脂，即，1,3-二磷脂酰甘油与脂肪酸形成的酯；糖脂（glycolipid），例如神经节苷脂、脑苷脂等；糖脂（glucolipid）；硫脂和鞘糖脂。如本文所用，术语“磷脂”包括天然形成的、半合成或合成的制备产物，其可以以单独使用，或者以混合物的形式使用。天然形成的磷脂的实例为天然卵磷脂（磷脂酰胆碱(PC)的衍生物），通常例如大豆或蛋黄卵磷脂。

半合成磷脂的实例为天然形成的卵磷脂的部分或全部氢化的衍生物。

优选实施方案的合成磷脂的实例为例如：二月桂酰-磷脂酰胆碱（“DLPC”），二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱（“DMPC”），二棕榈酰-磷脂酰胆碱（“DPPC”），二花生酰磷脂酰胆碱（“DAPC”），二硬脂酰-磷脂酰胆碱（“DSPC”），1-肉豆蔻酰-2-棕榈酰磷脂酰胆碱（“MPPC”），1-棕榈酰-2-肉豆蔻酰磷脂酰胆碱（“PMPC”），1-棕榈酰-2-硬脂酰磷脂

酰胆碱(“PSPC”), 1-硬脂酰-2-棕榈酰-磷脂酰胆碱(“SPPC”), 二油酰磷脂酰胆碱(“DOPC”), 1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(Ethyl-DSPC), 二月桂酰-磷脂酰甘油(“DLPG”)及其碱金属盐, 二花生酰磷脂酰甘油(“DAPG”)及其碱金属盐, 二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(“DMPG”)及其碱金属盐, 二棕榈酰-磷脂酰甘油(“DPPG”)及其碱金属盐, 二硬脂酰磷脂酰甘油(“DSPG”)及其碱金属盐, 二油酰磷脂酰甘油(“DOPG”)及其碱金属盐, 二肉豆蔻酰磷脂酸(“DMPA”)及其碱金属盐, 二棕榈酰磷脂酸(“DPPA”)及其碱金属盐, 二硬脂酰磷脂酸(“DSPA”), 二花生酰磷脂酸(“DAPA”)及其碱金属, 二肉豆蔻酰磷脂酰-乙醇胺(“DMPE”), 二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(“DPPE”), 二硬脂酰磷脂酰-乙醇胺(“DSPE”), 二肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸(“DMPS”), 二花生酰磷脂酰丝氨酸(“DAPS”), 二棕榈酰磷脂酰丝氨酸(“DPPS”), 二硬脂酰磷脂酰丝氨酸(“DSPS”), 二油酰磷脂酰丝氨酸(“DOPS”), 二棕榈酰鞘磷脂(“DPSP”), 以及二硬脂酰鞘磷脂(“DSSP”)。

优选的磷脂为磷脂酰胆碱、乙基磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇或鞘磷脂的脂肪酸二酯。特别优选的磷脂为 DAPC、DSPC、DPPA、DSPA、DMPS、DPPS、DSPS 和乙基-DSPC。最优选的是 DPPS 或 DSPC。还可以使用磷脂的混合物, 例如 DSPE、DPPE、DPPC、DSPC 和/或 DAPC 与 DSPS、DPPS、DSPA、DPPA、DSPG、DPPG、乙基-DSPC 和/或乙基-DPPC 形成的混合物。

合适的磷脂还包括通过连接亲水性聚合物(例如 PEG 或聚丙二醇(PPG))而修饰的磷脂。通过连接 PEG 而修饰的磷脂在本文中可以被称为聚乙二醇化的磷脂。经修饰的磷脂的实例为使用聚乙二醇(PEG)修饰的磷脂酰乙醇胺(PE)(“PE-PEG”), 即, 其中亲水性乙醇胺部分与分子量变化(例如 300 至 5000 道尔顿)的 PEG 分子相连的磷脂酰乙醇胺, 例如 DPPE-PEG、DSPE-PEG、DMPE-PEG 或 DAPE-PEG(其中 DAPE 为 1,2-二花生酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)。所述的组合物还可以包含其他亲水性化合物, 包括例如: 脂肪酸, 如棕榈酸、硬脂酸、花生四烯酸或油酸; 固醇, 例如胆固醇、或者胆固醇与脂肪酸或与糖酸形成的

酯；甘油或甘油酯，包括甘油三棕榈酸酯、甘油二硬脂酸酯、甘油三硬脂酸酯、甘油二肉豆蔻酸酯、甘油三肉豆蔻酸酯、甘油二月桂酸酯、甘油三月桂酸酯、甘油二棕榈酸酯；烷基叔铵盐或烷基季铵盐，例如1,2-二硬脂酰-3-三甲基铵-丙烷(DSTAP)、1,2-二棕榈酰-3-三甲基铵-丙烷(DPTAP)，以及它们的混合物或组合物。

优选的是，所述的配制物（特别是微泡包膜）至少在带有全部净电荷的成分上包含例如带电的两性材料，优选为脂质或磷脂。带有总负电荷的磷脂的实例为：磷脂酰丝氨酸的衍生物，特别为脂肪酸二酯衍生物，例如DMPS、DPPS、DSPS；磷脂酸的衍生物，例如DMPA、DPPA、DSPA；磷脂酰甘油的衍生物，例如DMPG、DPPG和DSPG；或者磷脂酰肌醇的衍生物，例如DMPI、DPPI或DPPI。此外，经修饰的磷脂，特别是经PEG修饰的磷脂酰乙醇胺（例如DPPE-PEG或DSPE-PEG）可以用作带负电的分子。此外，溶血形式的上文所述的磷脂，例如溶血磷脂酰丝氨酸衍生物（例如溶血-DMPS、-DPPS或-DSPS），溶血磷脂酰酸衍生物（例如溶血-DMPA、-DPPA或-DSPA）和溶血磷脂酰甘油衍生物（例如溶血-DMPG、-DPPG或-DSPG）可以有利地用作带负电的化合物。带负电的化合物的其他实例为：胆汁酸盐，例如胆酸盐、脱氧胆酸盐或甘油胆酸盐；以及(C₁₂-C₂₄)、优选为(C₁₄-C₂₂)的脂肪酸盐，例如棕榈酸盐、硬脂酸盐、1,2-二棕榈酰-*sn*-3-琥珀酰甘油盐或1,3-二棕榈酰-2-琥珀酰甘油盐。

优选的是，带负电的化合物选自：DPPA、DPPS、DSPG、DSPE-PEG2000、DSPE-PEG5000或它们的混合物。

带负电的成分通常与相应的带正电的反荷离子相关，所述的带正电的反荷离子可以为单价（例如碱金属或铵）、二价（例如碱土金属）或三价（例如铝）的。优选地，反荷离子选自如Li⁺、Na⁺或K⁺（更优选的是Na⁺）的碱金属阳离子。

带有总正电荷的磷脂的实例为：乙基磷脂酰胆碱的衍生物，特别是乙基磷脂酰胆碱与脂肪酸形成的二酯，例如1,2-二硬脂酰-*sn*-甘油-3-乙基磷酸胆碱(Ethyl-DSPC或DSEPC)，1,2-二棕榈酰-*sn*-甘油-3-

乙基磷酸胆碱 (Ethyl-DPPC 或 DPEPC)。带负电的反荷离子优选为卤化物离子，特别是氯离子或溴离子。可以被引入到微泡包膜中的带正电荷的化合物的实例为具有卤素反荷离子（例如氯化物或溴化物）的单、二、三或四的烷基铵盐，其中该烷基铵盐包含至少 1 个 (C_{10} - C_{20})、优选为 (C_{14} - C_{18}) 的烷基链，所述的烷基铵盐例如有单或二硬脂酰基氯化铵、单或二-十六烷基氯化铵、二甲基二十八烷基溴化铵 (DDAB) 或十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)。可以被引入到微泡的包膜中的、带正电荷的化合物的其他实例为具有卤化物反荷离子（例如氯化物或溴化物）的叔铵盐或季铵盐，其中该叔铵盐或季铵盐包含 1 个或者优选 2 个、通过例如 (C_3 - C_6) 亚烷基桥而与 N 原子连接的 (C_{10} - C_{20})，优选为 (C_{14} - C_{18}) 酰基链，所述的叔铵盐或季铵盐例如是 1, 2-二硬脂酰基-3-三甲基铵-丙烷 (DSTAP)、1, 2-二棕榈酰-3-三甲基铵-丙烷 (DPTAP)、1, 2-油酰-3-三甲基铵-丙烷 (DOTAP) 或者 1, 2-二硬脂酰-3-二甲基铵-丙烷 (DSDAP)。

在所述的微泡包膜中，DSEPC、DPEPC 和/或 DSTAP 优选地被用作带正电荷的化合物。

带正电荷的成分通常与相应的带负电的反荷离子相连，所述的带负电的反荷离子可以为单价（例如卤化物）、二价（例如硫酸盐）或三价（例如磷酸盐）的。优选的是，所述的反荷离子选自如 F^- （氟）、 Cl^- （氯）或 Br^- （溴）之类的卤化物离子。

中性和带电化合物的混合物（特别是磷脂和/或脂质）可以令人满意地用于形成微泡包膜。带电脂质或磷脂的量可以相对于脂质和磷脂的总量在大约 95 摩尔%至约 1 摩尔%的范围内变化，优选为 80 摩尔%至 20 摩尔%。

中性磷脂、以及带电脂质或磷脂的优选混合物例如是 DPPG/DSPC、DSTAP/DAPC、DPPS/DSPC、DPPS/DAPC、DPPE/DPPG、DSPA/DAPC、DSPA/DSPC 和 DSPG/DSPC。

在优选的实施方案中，所述的磷脂为稳定微泡包膜的主要成分，其量为形成填充有气体的微泡的包膜多种成分的总量的至少

50% (w/w)。在某些优选的实施方案中，基本上全部的包膜（至少 90 重量%至 100 重量%）都可以由磷脂形成。

可以使用本文所公开的、或者本领域的技术人员已知的任何气体；但是诸如 SF₆ 或全氟化碳（例如 CF₄、C₃F₈ 和 C₄F₁₀）之类的惰性气体是优选的，这些气体任选地与其他气体（例如空气、氮气、氧气或二氧化碳）混合。

可以使用已知的方法来制备本发明的优选的微泡悬浮液，所述的方法例如有将溶于合适溶剂中的磷脂粗品溶液进行冷冻干燥或者喷雾干燥，或者在 EP 554213；美国专利号 5,413,774；美国专利号 5,578,292；EP 744962；EP 682530；美国专利号 5,556,610；美国专利号 5,846,518；美国专利号 6,183,725；EP 474833；美国专利号 5,271,928；美国专利号 5,380,519；美国专利号 5,531,980；美国专利号 5,567,414；美国专利号 5,658,551；美国专利号 5,643,553；美国专利号 5,911,972；美国专利号 6,110,443；美国专利号 6,136,293；EP 619743；美国专利号 5,445,813；美国专利号 5,597,549；美国专利号 5,686,060；美国专利号 6,187,288；and 美国专利号 5,908,610 中列出的方法，所述的文献均以引用方式全文并入本文。优选的是，所述的磷脂被溶解于有机溶剂中，并将所得的溶液在未经过脂质体形成阶段的条件下干燥。这可以通过将所述的磷脂与亲水性稳定剂物质或可溶于有机溶剂和水的化合物一起溶解于合适的有机溶剂中，再对所得溶液进行冷冻干燥或喷雾干燥来实现。在这个实施方案中，用于选择亲水性稳定剂的标准为其在所选择的有机溶剂中的溶解性。可溶解于水和有机溶剂中的亲水性稳定剂化合物的实例为例如聚合物（如聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、聚乙烯醇 (PVA)、聚乙二醇 (PEG) 等）、苹果酸、乙醇酸、麦芽酚等。这种亲水性化合物还有助于均化微泡的尺寸分布，并增强储存稳定性。任何合适的有机溶剂都可以使用，只要其沸点足够低、并且其熔点高到足以有利于随后的干燥即可。典型的有机溶剂包括例如二噁烷、环己醇、叔丁醇、四氯二氟乙烯 (C₂Cl₄F₂) 或 2-甲基-2-丁醇。2-甲基-2-丁醇和 C₂Cl₄F₂ 是优选的。

在通过分散于水性载体中来形成微泡悬浮液之前，将冷冻干燥或喷雾干燥的磷脂粉末与空气或其他气体接触。当将结构已经被破坏的粉末状磷脂与水性载体接触时，所述的粉末状磷脂将形成稳定其中所分散的气体微泡的、分片的 (lamellarized) 或分层 (laminarized) 的节段。上述方法可以产生这样的微泡悬浮液，该悬浮液甚至在长时间储存后仍是稳定的，并且可以通过简单地溶解干态分层的磷脂 (其被储存在理想的气体中)、而无需摇动或任何强烈的搅拌即可得到。

备选地，如在 WO 97/29783 中所公开的那样，可以通过在高速搅拌下使气体悬浮在水性溶液中来制备微泡以及特别是微泡。优选的是，如国际专利申请 WO 04/069284 中公开的那样，可以制备这样的微乳剂，该微乳剂含有与溶血保护试剂 (例如碳水化合物、糖醇、聚乙二醇及其混合物，其在下文中详细说明) 以及任选的其他亲水性材料 (例如硬脂酸) 混合的磷脂 (例如 DSPC 和/或 DSPA)，其分散于水以及水不溶性的有机溶解乳液中。优选的有机溶剂是在水中的溶解度为 1.0g/l 或更低、优选低于约 0.01g/l 的那些，例如包括：戊烷，己烷，庚烷，辛烷，壬烷，癸烷，1-戊烯，2-戊烯，1-辛烯，环戊烷，环己烷，环辛烷，1-甲基-环己烷，苯，甲苯，乙苯，1,2-二甲基苯，1,3-二甲基苯，二丁醚和二异丙酮，氯仿，四氯化碳，2-氯-1-(二氟甲氧基)-1,1,2-三氟乙烷 (恩氟烷)，2-氯-2-(二氟甲氧基)-1,1,1-三氟乙烷 (异氟烷)，四氯-1,1-二氟乙烷，全氟戊烷，全氟己烷，全氟庚烷，全氟壬烷，全氟苯，全氟萘烷，甲基全氟丁醚，甲基全氟异丁醚，乙基全氟丁醚，乙基全氟异丁醚以及它们的混合物。可以将与磷脂缀合的本发明的纤维蛋白结合肽 (例如本文所述的脂肽) 与形成微泡包膜的磷脂一起混合在所述的微乳剂中。优选的是，先制备纤维蛋白结合肽-磷脂缀合体和 PE-PEG (例如 DSPE-PEG2000) 的水性悬浮液，然后将所述的悬浮液与包含磷脂和溶血保护试剂的水性有机乳液一起混合。优选的是，所述的混合在加热条件 (例如 40°C 至 80°C) 下实施。

其他赋形剂或添加剂可以以微泡的干态配制物的形式存在，或者与用于重新构建的水性载体一起加入并且无需涉及 (或者仅部分涉及)

形成微泡的稳定包膜。所述的赋形剂或添加剂包括 pH 调节剂、摩尔渗透压调节剂、增粘剂、乳化剂、膨胀剂等，并且可以以常规用量使用。例如，可以使用诸如聚氧化丙烯二醇和聚氧化乙烯二醇、以及它们的共聚物之类的化合物。增粘剂或稳定剂的实例为选自线性和交联的聚和寡糖、糖和亲水性聚合物（例如聚乙二醇）中的化合物。

当制备填充有气体的微泡涉及冷冻干燥或喷雾干燥步骤时，可以有利的是在所述的配制物中包含：冻干添加剂（例如具有防冷冻和/或冻干保护作用的试剂）和/或膨胀剂（例如氨基酸，如甘氨酸）；碳水化合物，例如糖，如蔗糖、甘露糖、麦芽糖、海藻糖、葡萄糖、乳糖或环糊精、或者多糖（例如右旋糖苷）；或者聚烷氧化亚烷基二醇，例如聚乙二醇。

在超声应用中，可以施用由磷脂稳定的微泡形成的造影剂，其剂量为（例如）使得所注射的磷脂的量在 0.1 至 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重的范围内，优选为约 0.1 至 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重的范围内。

其他含有气体的悬浮液包括本文所公开的那些，例如美国专利号 5,798,091、WO 97/29783 以及 EP 881 915，这些文献以引用方式全文并入本文。这些试剂可以按照在美国专利号 5,798,091 或 WO97/29783 中描述的方法制备。

另一种优选的超声造影剂包括“微球”或“微囊”形式的超声造影剂。术语“微球”或“微囊”（在本文中可以交换使用）是指具有材料边界或包膜的气体填充体。关于微球制备物及其制备方法的更详细的情况可以在 EP 324 938（美国专利号 4,844,882）；美国专利号 5,711,933；美国专利号 5,840,275；美国专利号 5,863,520；美国专利号 6,123,922；美国专利号 6,200,548；美国专利号 4,900,540；美国专利号 5,123,414；美国专利号 5,230,882；美国专利号 5,469,854；美国专利号 5,585,112；美国专利号 4,718,433；美国专利号 4,774,958；WO 95/01187；美国专利号 5,529,766；美国专利号 5,536,490；和美国专利号 5,990,263 中找到，这些文献的内容以引用方式并入本文。

优选的微球具有包含可生物降解的生理相容性聚合物或可生物降解的固体脂质的包膜。用于制备本发明的微球的聚合物可以选自可生物降解的生理学相容性聚合物，例如在以下任何专利中所描述的任何聚合物：EP 458745，美国专利号 5,711,933，美国专利号 5,840,275，EP 554213，美国专利号 5,413,774 和美国专利号 5,578,292，这些文献的全部内容均以引用方式并入本文。具体而言，所述的聚合物可以选自可生物降解的生理学相容性聚合物，例如低水溶性的多糖、聚交酯和聚乙交酯以及它们的共聚物、丙交酯和内酯的共聚物，例如 ϵ -己内酯、 γ -戊内酯和多肽。其他合适的聚合物包括：聚(正)酯(例如参见美国专利号 4,093,709；美国专利号 4,131,648；美国专利号 4,138,344；美国专利号 4,180,646)；聚乳酸和聚乙醇酸以及它们的共聚物，例如 DEXON(参见 J. Heller, *Biomaterials* 1 (1980), 51；聚(DL-丙交酯-co- ϵ -己内酯)，聚(DL-丙交酯-co- γ -戊内酯)，聚(DL-丙交酯-co- γ -丁内酯)，聚烷基氰基丙烯酸酯；聚酰胺，聚羧基丁酯；聚二噁烷酮；聚- β -氨基酮(A. S. Angeloni, P. Ferruti, M. Tramontini and M. Casolaro. *The Mannich bases in polymer synthesis: 3. Reduction of poly(beta-aminoketone(s)) to poly(gamma-aminoalcohol(s)) and their N-alkylation to poly(gamma-hydroxyquaternary ammonium salt(s))*, polymer 23, pp 1693-1697, 1982.)；聚磷嗪(Allcock, Harry R. *polyphosphazenes: new polymers with inorganic backbone atoms* (*Science* 193:1214-19 (1976))和聚酞。本发明的微球还可以根据 WO-A-96/15815 中所述的方法来制备，所述文献以引用方式并入本文，其中所述的微球由可生物降解的膜形成，所述的可生物降解的膜包含可生物降解的脂质，该脂质优选选自：单-、二-、三-甘油酯，脂肪酸，固醇，蜡以及它们的混合物。优选的脂质为二-或三-甘油酯，例如二-或三-甘油三肉豆蔻酸酯，二-或三-甘油棕榈酸酯，或二-或三-甘油硬脂酸酯，特别是三棕榈酸甘油酯或三硬脂酸甘油酯。所述的微球可以使用本领域的技术人员已知的、本文所公开的任何气体；但是诸如氟化气体之类的情性气

体是优选的。可以将所述的微球与本领域中普通的技术人员已知的、任选的添加剂，以及稳定剂一起悬浮在可药用的液体载体中。

其他含气体的造影剂配制物包括这样的微粒（特别是微粒的积聚体），该微粒中具有包含于其中或者以其他方式相连（例如被吸附在其表面上和/或包含在其内的孔隙、腔或孔中）的气体。用于制备所述试剂的方法在 EP 0122624；EP 0123235；EP 0365467；美国专利号 5,558,857；美国专利号 5,607,661；美国专利号 5,637,289；美国专利号 5,558,856；美国专利号 5,137,928；WO 95/21631 或 WO 93/13809 中有所描述，这些文献均以引用方式并入本文。

此外，所述的任何一种超声组合物都应该尽可能与血液是等渗的。因此，在注射前，可以将少量的等渗剂加入到任何上文所述的超声造影剂悬浮液中。所述的等渗剂为医疗中常用的生理溶液，并且它们都包含水性盐水溶液（0.9% NaCl）、2.6%的甘油溶液、5%右旋糖溶液等。此外，所述的超声组合物可以包含标准的可药用添加剂，例如包括乳化剂、粘度调节剂、冷冻保护剂、冻干防护剂、膨胀剂等。

在本发明的超声造影剂中可以使用任何生物相容性气体。如本文所用，术语“气体”包括在正常的人体温度下基本为气体形式的任何物质（包括混合物）。因此，所述的气体可以包括例如空气、氮气、氧气、CO₂、氢气、一氧化二氮、稀有或惰性气体（例如氦气、氖气、氩气或氙气）、放射性气体（例如 Xe¹³³ 或 Kr⁸¹）、超极化的稀有气体（例如超极化的氦气、氖气或氩气）、氟化气体（例如包括全氟化碳、SF₆、SeF₆）、低分子量的烃（例如包含 1 至 7 个碳原子，例如：烷烃，如甲烷、乙烷、丙烷、丁烷、异丁烷、异戊烷或戊烷；环烷烃，如环丁烷或环戊烷；烯烃，如丙烯、丙二烯或丁烯；或炔烃，如乙炔）、醚、酮、酯、卤化气体（例如卤化、氟化或全氟化的低分子量烃（例如含有至多 7 个碳原子））、和/或它们的混合物。

氟化气体是优选的，特别是全氟化的气体。氟化气体包括含有至少一个氟原子的材料，例如 SF₆、氟利昂（含有一个或多个碳原子和氟的有机化合物，即，CF₄、C₂F₆、C₃F₈、C₄F₈、C₄F₁₀、CBrF₃、CCl₂F₂、C₂ClF₅

和 CBrClF_2)、氟化烃、氟化酮(例如全氟丙酮)、氟化醚(例如全氟二乙基醚)和全氟化碳。术语全氟化碳是指仅含有碳原子和氟原子的化合物,具体而言包括饱和的、不饱和的、以及环状的全氟化碳。通常优选的饱和全氟化碳具有以下式: C_nF_{n+2} , 其中 n 为 1 至 12, 优选为 2 至 10, 最优选为 3 至 8, 甚至更优选为 3 至 6。生物相容性的、生理性可接受的全氟化碳的实例为: 全氟烷烃, 例如全氟甲烷、全氟乙烷、全氟丙烷、全氟丁烷(例如全氟正丁烷, 其任选地与诸如全氟异丁烷之类的其他异构体混合)、全氟戊烷、全氟己烷或全氟庚烷; 全氟烯烃, 例如全氟丙烯、全氟丁烯(例如全氟 2-丁烯)或全氟丁二烯; 以及全氟环烷烃(例如全氟环丁烷、全氟甲基环丁烷、全氟二甲基环丁烷、全氟三甲基环丁烷、全氟环戊烷、全氟甲基环戊烷、全氟二甲基环戊烷、全氟环己烷、全氟甲基环己烷和全氟环庚烷)。优选的饱和全氟化碳包括例如 CF_4 、 C_2F_6 、 C_3F_8 、 C_4F_{10} 、 C_5F_{12} 和 C_6F_{14} 。最优选的气体或气体混合物包括 SF_6 , 或者选自 C_3F_8 、 C_4F_{10} 、 C_5F_{12} 、 C_6F_{14} 、 C_7F_{16} 、 C_8F_{18} 的全氟化碳, 并且 C_4F_{10} 是特别优选的。还可参见 WO 97/29783、WO 98/53857、WO 98/18498、WO 98/18495、WO 98/18496、WO 98/18497、WO 98/18501、WO 98/05364、WO 98/17324。

在某些环境下, 理想的是包含气态物质的前体(例如能够在体内被转化形成气体的材料, 通常也成为“气体前体”)。优选的是, 所述的气体前体及其所产生的气体是生理学可接受的。所述的气体前体可以使 pH 活化的、光致活化的、温度活化的, 等等。例如, 某些全氟化碳可以被用作温度活化的气体前体。这些全氟化碳(例如全氟戊烷)具有高于室温(或者是所述试剂被制造和/或储存的温度)、但低于体温的液相/气相转变温度; 因此, 这些试剂发生相变, 并在体内转变成气体。

如上文所述, 所述的气体可以包括气体的混合物。所述的混合物可以包含任何比例的任何上述气体。在优选的实施方案中, 所述的混合物可以包含普通气体, 例如氮气、空气或二氧化碳, 以及氟化气体。合适的气体混合物的实例可以在 WO 94/09829 中找到, 该文献以引用

方式并入本文。以下组合是特别优选的气体混合物：气体(A)和(B)的混合物，其中气体(B)中的至少一种气体以0.5-41体积%的量存在，其分子量大于80道尔顿，并且为氟化气体；而(A)选自空气、氧气、氮气、二氧化碳和它们的混合物，所述混合物的平衡用气体A实现。

就在MRI中的应用而言，所述的微泡优选的是包含超极化的稀有气体，例如超极化的氙气、超极化的氦气、超极化的氩气或它们的混合物，这些气体任选地与空气、CO₂、氧气、氮气、氦气、氩气或者上文所述的任何卤化的碳氢化合物混合。

就闪烁扫描法中的应用而言，所述的微泡优选地包含放射性气体，例如Xe¹³³、Kr⁸¹或它们的混合物，这些气体任选地与空气、CO₂、氧气、氮气、氦气、氩气或者上文所述的任何卤化的碳氢化合物混合。

由于超声微泡可以大于本文所述的其他可检测标记物，所以在在一个优选的实施方案中，所述的微泡可以与多个纤维蛋白结合多肽连接或缀合，从而增强所述试剂的靶向效率。根据上文所述，上文所述的（或本领域的技术人员已知的）超声造影剂的结合可以通过在所述的纤维蛋白结合多肽与用于制备所述微泡的材料之间的直接共价键、或者通过连接体来实现。例如，参见WO 98/53857，该文献总体上描述了肽与双官能PEG连接体的结合，其中所述的肽随后与脂质体组合物反应。此外，参见Lanza et al., *Ultrasound in Med. & Bio.*, 23(6): 863-870 (1997)。

可以采用多种方法来制备与纤维蛋白结合多肽缀合的微泡的悬浮液。例如，可以通过在所述的磷脂配制物中掺入5%(w/w)的N-MPB-PE(1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸-乙醇胺-4-(p-马来酰亚胺-苯基丁酰胺) (Avanti Polar-Lipids, Inc)来制备马来酰亚胺衍生的微泡。然后，将巯基乙酰化的纤维蛋白结合肽(10 mg/mL, 溶于DMF)的溶液（该溶液在脱乙酰溶液(50 mM 磷酸钠, 25 mM EDTA, 0.5 M 羧胺.HCl, pH 7.5)中温育)加入到马来酰亚胺活化的微泡悬浮液中。在黑暗条件下温育（处于温和的搅拌下）后，可以通过离心来纯化与微泡缀合的肽。

可以用于衍生微泡、特别是微气泡的化合物通常包含以下成分：

(a) 疏水部分，其与形成微气泡或微球包膜的材料相容，从而可以有效地将所述的化合物引入到所述微泡的包膜中；该部分通常由脂质部分（二棕榈精、二硬脂酰）来代表；(b) 间隔体（其通常为不同分子量的 PEG，氨基酸链等），该间隔体在某些情况（例如如果间隔体太长，则微气泡可能呈现例如难以冷冻干燥的问题）下是任选的，而在其他情况（例如当将肽用短的间隔体与微球缀合时，所述肽的活性较低）下是优选的；(c) 能够与待缀合的肽上的相应反应部分发生反应的反应性基团（例如与半胱氨酸的-SH 基团发生反应的马来酰亚胺）。

备选地，可以使用生物素/抗生物素蛋白来制备与纤维蛋白结合肽缀合的微气泡。例如，可以使用马来酰亚胺活化的磷脂微气泡来制备与抗生物素蛋白缀合的微气泡，其中马来酰亚胺活化的磷脂微气泡是根据上文所述制备的，其被加入到了巯基乙酰化-抗生物素蛋白（该抗生物素蛋白与脱乙酰溶液一起温育）中。然后，将生物素化的纤维素结合肽加入到与抗生物素蛋白缀合的微气泡的悬浮液中，从而形成与纤维蛋白结合肽缀合的微气泡的悬浮液。

此外，纤维结合肽可以与磷脂缀合，然后，将这些脂肽用于制备填充有气体的微泡超声造影剂。优选的是，所述的磷脂可以选自：磷脂酰乙醇胺和经修饰的磷脂酰乙醇胺。所述的肽和磷脂可以直接缀合，或者通过连接体缀合，其中所述的连接体例如有亲水性聚合物、氨基酸链等。特别优选的磷脂包括通过在其上连接亲水性聚合物而修饰形成的磷脂酰乙醇胺。经修饰的磷脂酰乙醇胺的实例是使用聚乙二醇 (PEG) 修饰的磷脂酰乙醇胺 (PE)，简称为“PE-PEG”，即，其中亲水性乙醇胺部分与分子量变化（例如 300 至 5000 道尔顿）的 PEG 分子相连的磷脂酰乙醇胺，例如 DPPE-PEG、DSPE-PEG、DMPE-PEG 或 DAPE-PEG。DSPE-PEG2000、DSPE-PEG3400、DPPE-PEG2000 和 DPPE-PEG3400 是优选的，而 DSPE-PEG2000 是特别优选的。注意，可以使用磷脂的盐形式，例如三甲基铵盐、四甲基铵盐、三乙基铵盐、钠盐等。制备所述脂肽的方法在实施例中列出。

制备具有与磷脂缀合的纤维蛋白结合多肽的、靶向微泡的一些优选的方法包括在实施例 中。

除非冻干的残余物包含超极化的气体（已知这种气体需要特殊的储存条件），否则所述的残余物可以在无需对其环境进行温度控制的条件下进行储存和运输，特别是所述的残余物可以现场配制成即用型可施用悬浮液来提供给医院和医生，而无须这些使用者具有特定的储存设备。优选的是，在所述的情况下，所述的残余物可以以双组份试剂盒的形式提供，所述的试剂盒可以包括两个分开的容器或者双室的容器。在所述试剂盒包含两个分开的容器的情况下，优选的是，所述的容器为传统的隔膜密封的小瓶，其中装有步骤 b) 的冻干残余物的小瓶被隔膜所密封，这样可以使使用任选的预填充注射器将载体液体注射通过所述的隔膜。在这种情况下，还可以使用被作为第二组分的容器的注射器来注射造影剂。在所述试剂盒包含双室的容器的情况下，优选的是所述的双室的容器为双室注射器，并且一旦所述的冻干物质被重新构成，并随后再经过适当的混合或温和的震动，则所述的容器可直接用于注射造影剂。在上述两种情况下，均提供指导或允许足够形成泡沫的能量被施加到所述容器的内容物中的手段。但是，按照上文所述，在根据本发明的稳定的造影剂中，气体微气泡的尺寸基本上与施加到重新构成的干燥产品中的搅拌能量的大小无关。因此，通常仅需要温和的手动震动，就可以得到具有一致微气泡尺寸的可重复生产的产品。

本领域的任一普通技术人员可以理解的是，能够将干态粉末与水性溶液以无菌方式组合的其他两室重新构建系统也都包括在本发明的范围内。在这些系统中，如果水相可以被设置在水不溶性气体与所述的所述环境之间是特别有利的，从而增加了所述产品的货架期。在形成造影剂所必须的材料（例如在重新构建过程中待与磷脂相连的靶向配体）尚未存在于所述的容器中的情况下，可以将其与所述试剂盒的其他组分一起包装，优选地以有利于与所述试剂盒的其他组分相结合的形式、或者在适于与所述试剂盒的其他组分相结合的容器中。

不需要特殊的容器、小瓶或连接系统，本发明可以使用常规的容器、小瓶和适配器。唯一的需要是在阻塞器与容器之间有良好的密封。因此，密封的质量成为主要关注的问题，密封完整性的任何劣化都使得所不需要的物质进入小瓶中。除了确保无菌之外，保持真空是产品阻塞在环境或降低的压力下以确保安全和恰当重新构建所需要的。所述的阻塞器可以为基于弹性体（例如聚（异丁烯）或丁基橡胶）的化合物或多成分配制剂。

根据本发明可以使用的超声成像技术包括已知的技术，例如彩色多普勒成像技术、能量多普勒成像技术、多普勒信号比幅技术、激发声成像技术、以及二维或三维成像技术。可以以谐波（共振频率）模式或基协模式进行成像，并且第二谐波模式是优选的。

在超声应用中，由磷脂稳定的微气泡形成的造影剂可以例如以一定的剂量进行施用，使得所注射的磷脂的量在 0.1 至 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重，优选的是约 0.1 至 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重。含有微球的造影剂通常以一定的剂量进行施用，使得形成壁的聚合物或脂质的量为约 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 20 mg/kg 体重。

在优选的实施方案中，本文所述的造影剂与一个或多个纤维蛋白结合部分缀合。如实施例所示，这些靶向的超声造影剂定位于含有纤维蛋白的血液凝块、含有纤维蛋白的组织或者血管生成的位置处，并且可以用于对凝块、癌症或血管生成组织进行成像。

本发明的超声造影剂可以进一步用于多种治疗成像方法中。术语治疗成像在其含义中包括用于治疗患者疾病的任何方法，该方法包括造影剂的使用（例如将治疗试剂递送至所选择的受体或组织），并且能够在体外和/或体内赋予或者负责赋予生物学作用。有利的是，治疗成像与通过例如在高声压（通常高于在非破坏性诊断成像方法中常用的压力）下的超声爆破而对填充有气体的微泡的受控且局部的方式发生破裂相关。这种受控的破坏可以任选地与合适治疗试剂的局部释放相结合来用于例如处理血液凝块（还称为溶栓的技术）。备选地，所述的治疗成像可以包括将治疗试剂递送至细胞中，其是由微泡的局部

爆破而诱导的细胞水平的瞬时膜透化作用对结果。这种技术可以用于例如有效地将遗传材料递送至细胞中；任选地，可以将药品与遗传材料一起进行局部递送，由此可以对患者（例如在肿瘤治疗的情况下）进行组合药物/遗传治疗。

术语“治疗试剂”在其含义中包括可以在任何治疗应用（例如用于治疗患者疾病的方法）中使用的任何物质、组合物或颗粒，以及能够在体外和/或体内赋予或负责赋予生物学作用的任何物质。因此，治疗试剂包括能够用于治疗（包括诊断、预防、减轻、缓解疼痛或治愈）患者任何病理状态（包括病症（malady）、痛苦、疾病病变或损伤）的任何化合物或材料。治疗试剂的实例包括在本文中所讨论的那些，例如药品、药物、生物活性试剂、细胞毒性试剂、化疗试剂、放射性治疗试剂、蛋白质、天然或合成的肽（包括寡肽和多肽）、维生素、类固醇和遗传材料（包括核苷、核苷酸、寡核苷酸、多核苷酸和质粒）。在优选的实施方案中，所述的治疗试剂是用于治疗癌症、血栓紊或血管生成紊的药品。

光学成像、声致发光成像或光声成像

在另一个实施方案中，本发明的纤维蛋白结合部分可以与光学、声致发光或光声标记物缀合（直接或通过连接体）。在优选的实施方案中，本发明的纤维蛋白结合部分与光学活性成像部分缀合（直接或通过连接体）。光学活性成像部分的合适的实例包括例如：光学染料（包括有机发色团或荧光团），其具有大量的离域环体系（delocalized ring system），并且其最大的吸收或发射范围是 400-1500 nm；荧光分子，例如荧光素；磷光分子；在 UV 光谱内进行吸收的分子；量子点；或者在近红外辐射或远红外辐射中能够进行吸收的分子。一种优选的光学活性部分为 5-羧基荧光素 (CF5)。

根据本发明，在向受试者注射光学标记的纤维蛋白结合部分之后，可以使用大量的光学参数来测定具有体内光成像的纤维蛋白的位置。在准备图像的过程中，待测定的光学参数可以包括：穿透辐射、吸收、

荧光或磷光发射、光反射、吸收振幅的变化或最大、以及弹性散射。例如，对于近红外(NIR)波长为650-1000nm的光而言，生物组织是相对透明的。NIR辐射能够穿透组织至多达几厘米，从而可以将本发明的纤维蛋白结合部分用于体内纤维蛋白的光学成像。

近红外染料可以包括菁蓝或吲哚菁蓝衍生物，例如Cy5.5、IRDye800、吲哚菁蓝绿(ICG)、吲哚菁蓝绿衍生物(包括四磺酸取代的吲哚菁蓝绿(TS-ICG))、以及它们的组合。

所述的纤维蛋白结合部分可以与光标记物缀合，所述的光标记物例如有光学染料(包括有机发色团或荧光团)，其具有大量的离域环体系和最大的吸收或发射范围为400-1500 nm。所述的纤维蛋白结合部分可以备选地由生物发光分子衍生得到。光标记物最大的吸收或发射的优选范围为600至1000nm，从而使由血红素产生的信号所造成的干扰最小化。优选的是，当荧光光学染料具有高的量子产率时，光吸收标记物具有大的摩尔吸收率，例如 $>10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 。光学染料的实例包括但不限于在WO 98/18497、WO 98/18496、WO 98/18495、WO 98/18498、WO 98/53857、WO 96/17628、WO 97/18841、WO 96/23524、WO 98/47538以及其中所引用的参考文献中所描述的那些。如上文所述，所述的光标记物可以以共价方式直接与纤维蛋白结合部分连接，或者可以通过连接体与所述的纤维蛋白结合部分连接。

在注射光学标记的纤维蛋白结合部分之后，使用一个或多个光源(例如激光)，在适于在所述试剂中使用的光标记物的波长范围内对患者进行扫描。所用的光可以为单色或多色的，连续的或脉冲式的。使用被调节成单波长或多波长的光电探测器来检测透射光、散射光或反射光，从而测定受试者中纤维蛋白的位置。可以在一定的时间内监控光学参数的变化，从而检测光学标记的试剂在血栓位点处的积聚情况。可以将标准的图像处理 and 检测装置与本发明的光学成像试剂联合使用。

上文所述的光学成像试剂还可以用于使用光学标记的成像试剂所进行的声光或声致冷光(sonoluminescent)成像(参见美国专利号

5,171,298, WO 98/57666, 以及其中的参考文献)。在声光成像中, 超声波辐射可以用于受试者中, 并影响透射光、发射光或反射光的光学参数。在声致冷光成像中, 所使用的超声波实际上能够产生可检测的光。使用这些技术的合适的成像方法在 WO 98/57666 中有所描述。

此外, 本发明的纤维蛋白结合部分可以与酶底物连接, 其中所述的酶底物与光成像报告剂和光成像淬灭剂连接。所述的纤维蛋白结合部分发挥作用将所述的构建体定位到目的具有纤维蛋白的组织(例如肿瘤)中, 在此, 酶对酶底物进行酶切, 从而释放出光成像淬灭剂, 并使得具有纤维蛋白的目的组织进行光成像。

核成像(放射性核素成像)以及放射性疗法

纤维蛋白结合部分还可以与适用于闪烁扫描法、SPECT 或 PET 成像的放射性核素报告剂缀合, 和/或与适用于放射性疗法的放射性核素缀合。其中纤维蛋白结合部分既与用于诊断成像的放射性核素的螯合剂缀合、又与用于放射性疗法的螯合剂缀合的构建体也在本发明的范围内。

就作为 PET 试剂的用途而言, 肽与多种正电子发射金属离子中的任一种络合, 其中所述的正电子发射金属离子例如有 ^{51}Mn 、 ^{52}Fe 、 ^{60}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 或 ^{110}In 。本发明的结合部分还可以使用放射性核素通过卤化过程来进行标记, 其中所述的放射性核素例如有 ^{18}F 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{77}Br 和 ^{76}Br 。用于闪烁扫描法或放射性疗法的优选金属放射性核素包括 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{51}Cr 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{47}Sc 、 ^{51}Cr 、 ^{167}Tm 、 ^{141}Ce 、 ^{111}In 、 ^{168}Yb 、 ^{175}Yb 、 ^{140}La 、 ^{90}Y 、 ^{88}Y 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{165}Dy 、 ^{166}Dy 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{203}Pb 、 ^{211}Bi 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{214}Bi 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 ^{149}Pm 、 ^{161}Tb 、 ^{177}Lu 、 ^{198}Au 和 ^{199}Au 。根据所需的治疗或诊断用途来决定对金属的选择。例如, 就诊断目的而言, 优选的放射性核素包括 ^{64}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 和 ^{111}In 。就治疗目的而言, 优选的放射性核素包括 ^{64}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{105}Rh 、 ^{111}In 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Lu 、 $^{186-188}\text{Re}$ 、和 ^{199}Au 。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 特别优选地用于诊断应用中, 这是因为其成本低、实用、成像性和高度的特异活性。 Tc-99m 的核和放射性性

质使得其同位素成为理想的闪烁照相试剂。该同位素的单光子能为 140keV, 放射性半衰期为约 6 小时, 并且可以容易地由 a. ^{99}Mo - ^{99}mTc 发生器得到。

所述的金属放射性核素可以被螯合剂所螯合。合适的螯合剂包括上文所述的那些, 以及例如线性大环三联吡啶、以及 N_3S 、 N_2S_2 或 N_4 螯合剂, 包括在例如中美国专利号 5,367,080, 美国专利号 5,364,613, 美国专利号 5,021,556, 美国专利号 5,075,099 和美国专利号 5,886,142 所公开的配体; 以及本领域已知的其他螯合剂, 包括但不限于 HYNIC, 和二氨基二巯基 (BAT) 螯合剂 (还可以参见美国专利号 5,720,934)。例如, N_4 螯合剂在美国专利号 6,143,274; 美国专利号 6,093,382; 美国专利号 5,608,110; 美国专利号 5,665,329; 美国专利号 5,656,254; 和美国专利号 5,688,487 中有所描述。某些 N_3S 螯合剂在 PCT/CA94/00395, PCT/CA94/00479, PCT/CA95/00249 以及在美国专利号 5,662,885; 美国专利号 5,976,495; 和美国专利号 5,780,006 中有所描述。所述的螯合剂还可以包括螯合配体巯基-乙酰基-乙酰基-甘氨酸-甘氨酸 (MAG3) 的衍生物, 该衍生物包含 N_3S 和 N_2S_2 体系 (例如 MAMA (单酰胺一元胺二硫醇), DADS (N_2S 二胺二硫醇), CODADS 等)。这些配体体系以及多种其他的配体体系在 Liu and Edwards, Chem Rev., 99:2235-2268 (1999) 中以及其中所引用的文献中有所描述。

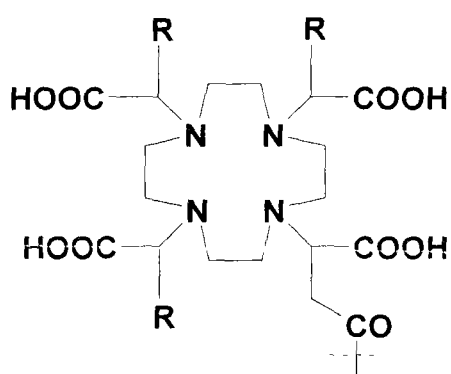
所述的螯合剂还可以包括这样的络合体, 该络合体含有在四配位基阵列中不会被提供给所述金属的配体原子。这些络合体包括锆及铈的二氧化物 (dioxime) 与硼酸形成的加成物, 例如在美国专利号 5,183,653; 美国专利号 5,387,409; 和美国专利号 5,118,797 中所描述的那些, 所述的文献均以引用方式全文并入本文。

在另一个实施方案中, 本发明的纤维蛋白结合多肽的二硫键被用于螯合放射性核素 (例如 ^{99}mTc) 的两个配基。在这种情况下, 所述的肽环通过引入 Tc (肽-S--S-肽被变成肽-S--Tc--S-肽) 而被增大。这已经在文献 (Chen et al., J. Nucl. Med., 42:1847-1855 (2001))

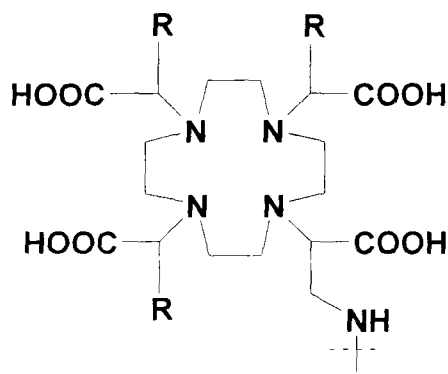
中在其他含义二硫键的肽中使用，并同时保持了生物学活性。可以通过主链的酰胺氮、另一个半胱氨酸或氨基酸的其他修饰来提供用于 Tc 的其他螯合基团。

特别优选的金属螯合剂包括以下列出的式 1、2 和 3 所表示的那些（用于 ^{111}In 和镧系元素（例如顺磁 Gd^{3+} ）和放射性镧系元素（例如 ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{153}Sm , 和 ^{166}Ho ）），以及式 4、5 和 6 所表示的那些（用于放射性 $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{186}Re , 和 ^{188}Re ）。

这些以及其他金属螯合基团在美国专利号 6,093,382 和 5,608,110 中有所描述，这些文献均以引用方式全文并入本文。此外，式 3 所表示的螯合基团在例如美国专利号 6,143,274 中有所描述；式 5 所表示的螯合基团在例如美国专利号 5,627,286 和 6,093,382 中有所描述；而式 6 所表示的螯合基团在例如美国专利号 5,662,885；5,780,006；和 5,976,495 中有所描述。

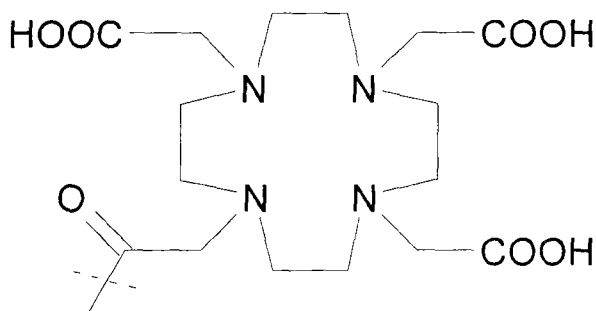


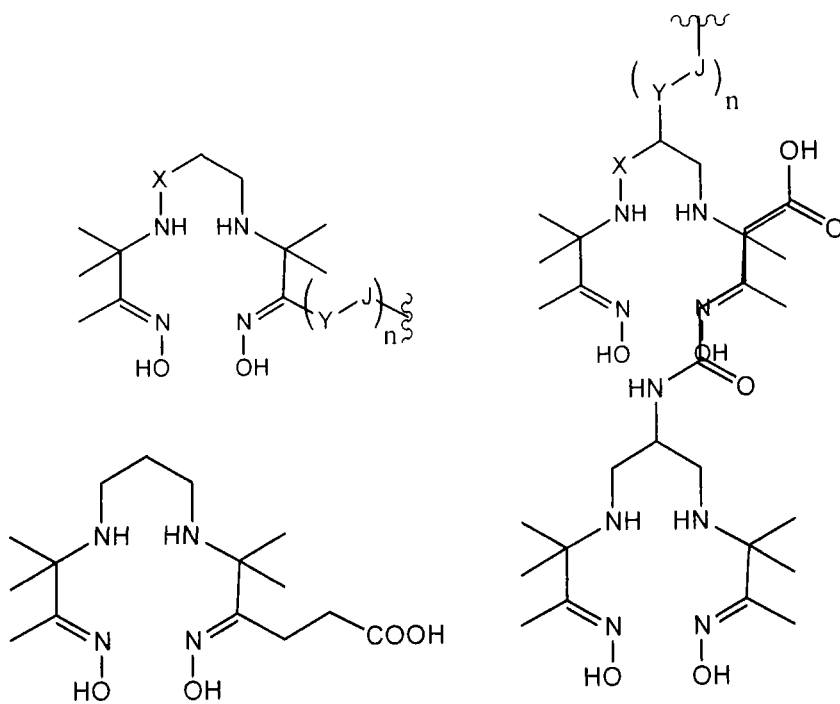
(1)



(2)

(3)



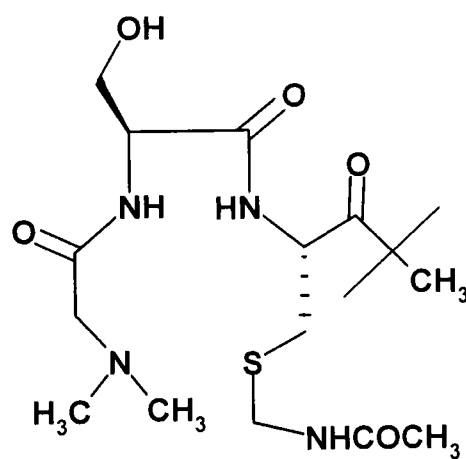


(4a)

(4b)

(5a)

(5b)



(6)

在上述式 1 和 2 中, R 为烷基, 优选为甲基。在上述式 5 中, X 为 CH_2 或 O, Y 为 C_1 - C_{10} 分支或不分支的烷基; Y 为芳基、芳氧基、芳基氨基、芳基氨基酰基; Y 为芳基烷基—在这种情况下, 与芳基连接的一种或多种烷基基团为 C_1 - C_{10} 分支或不分支的烷基基团, C_1 - C_{10} 分支或不分支的羟基或聚羟基烷基或聚烷氧基烷基或聚羟基-聚烷氧基烷基; J 为 $>\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{OC}(=\text{O})-$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{NC}(=\text{O})-$, $-\text{NC}(=\text{S})-$, $-\text{N}(\text{Y})-$, $-\text{NC}(=\text{NCH}_3)-$, $-\text{NC}(=\text{NH})-$, $-\text{N}=\text{N}-$, 由合成或天然形成的氨基酸衍生得到的同聚酰胺或异聚酰胺; 所有的基团中, n 均为 1-100。这些结构的变体在例如美国专利号 6, 093, 382 中有所描述。上述专利、申请和参考文献的公开内容均以引用方式全文并入本文。

如上文所述, 螯合剂可以以共价键的方式直接与纤维蛋白结合部分连接, 或者通过连接体与纤维蛋白结合多肽连接, 然后直接用所选择的放射性金属标记(参见 WO 98/52618, 美国专利号 5, 879, 658, 和美国专利号 5, 849, 261)。

对用于特定放射性治疗应用中的合适的放射性核素的选择取决于多种因素, 包括:

a. 物理半衰期—其应该足够长, 从而可以由放射性金属和缀合体合成并纯化放射性治疗构建体, 并将所述的构建体递送至注射位点, 而且在注射前没有发生明显的放射性衰变。优选的是, 所述的放射性核素的物理半衰期应该为约 0.5 至 8 天。

b. 放射性核素所放射的能量—作为粒子发射器(例如 α 发射器, β 发射器和 Auger 电子发射器)的放射性核素是特别有用的, 这是因为它们会放射高能量的粒子, 这些粒子在较短的距离内沉积它们的能量, 从而产生高的局部损害。 β 发射粒子的放射性核素是特别优选的, 这是因为由所述同位素放射的 β 粒子的能量会在 5 至约 150 个细胞直径内沉积。由这些核素制备的放射性治疗试剂能够杀死它们定位位点相对附近的患病细胞, 但是不能传播较长的距离而损坏相邻的正常组织(例如骨髓)。

c. 特异活性(即, 单位质量放射性核素的放射活性)—具有高特

异活性的放射性核素（发生器所产生的 ^{90}Y , ^{111}In , ^{177}Lu ）是特别优选的。放射性核素的特异活性可通过其产生的方法、所针对产生的特定靶物以及所讨论的同位素的性质来测定。

许多镧系（lanthanide）和类镧系元素（lanthanoid）包括这样的放射性同位素，其具有使得它们适用于放射性治疗试剂的核性质，因为该同位素发射 β 粒子。一部分所述的同位素列于下表中。

表 4

同位素	半衰期(天)	最大 b-能量 (MeV)	γ 能量 (keV)	b-粒子的大致范围 (细胞直径)
$^{49}\text{-Pm}$	2.21	1.1	286	60
$^{53}\text{-Sm}$	1.93	0.69	103	30
$^{66}\text{-Dy}$	3.40	0.40	82.5	15
$^{66}\text{-Ho}$	1.12	1.8	80.6	117
$^{75}\text{-Yb}$	4.19	0.47	396	17
$^{77}\text{-Lu}$	6.71	0.50	208	20
$^0\text{-Y}$	2.67	2.28	-	150
$^{11}\text{-In}$	2.810	Auger 电子发射器	173, 247	< 5* μm

其中：Pm 为钷，Sm 为钐，Dy 为镝，Ho 为钬，Yb 为镱，Lu 为镥，Y 为钇，In 为铟。

作为上述镧系元素和类镧系元素的另一种备选物，使用放射性铼同位素是本领域公知的，并且包括在本发明的范围内。

特别是，已经证明 $^{186/188}\text{Re}$ 同位素在核医药领域中特别受到关注，其在放射性药物治疗方法中有大量的应用。

因此，在优选的实施方案中，本发明包括新型放射性治疗试剂，其中本发明的纤维蛋白结合部分与发射致电离辐射（例如 β 粒子、 α 粒子以及 Auger 或 Coster-Kroning 电子）的合适的螯合放射性核素缀合。更优选的是，本发明的纤维蛋白结合部分由镧系元素所标记，其中所述的镧系元素选自 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{175}Yb 、和 ^{177}Lu 。合适的螯合配体的实例可以选自图 6a 至 6c 中的那些。

由治疗性放射性核素标记的本发明的化合物可以作为放射性药物

(其在治疗诸如癌症之类的疾病中可以被用作一线疗法), 或者以结合疗法的方式来应用, 其中, 本发明的放射性治疗试剂可以与辅助化疗结合使用(例如与本文所公开的其他治疗试剂中的一种结合使用), 或者作为配对治疗试剂中的治疗试剂部分使用。

事实上, 本发明的放射性治疗试剂的肽部分能够将整合放射性同位素定位于病理纤维蛋白沉积处, 例如定位于血栓/凝块、动脉硬化瘢痕以及多发性硬化症有关的基于炎症的损伤处。因此, 由局部放射性同位素放射的致电离辐射所产生的细胞毒性的量能够引起病理学组织的细胞死亡。

放射性铈所形成的络合物特别用于诊断成像中, 并且放射性铈所形成的络合物特别用于放射性疗法中。在放射性铈与本发明的试剂形成络合物的过程中, 放射性铈优选的是 Tc-99m 高铈酸盐在还原试剂存在下与所述的试剂发生反应。优选的还原试剂为联二亚硫酸盐、亚锡和亚铁离子; 最优选的还原试剂为氯化亚锡。用于制备所述络合物的手段可以方便地以试剂盒的形式提供, 其中所述的试剂盒包括: 装有预定量的本发明待标记试剂的密封小瓶, 以及足量的用于使用 Tc-99m 标记所述试剂的还原试剂。

备选地, 所述的络合物可以通过使与合适螯合剂缀合的本发明的肽与预形成的不稳定的络合物发生反应来形成, 其中所述的不稳定的络合物由铈和作为转移配体的另一种已知的化合物形成。该过程已知为配体交换过程, 并且是本领域的技术人员所公知的。可以使用诸如酒石酸盐、柠檬酸盐、葡萄糖酸盐、或甘露醇之类的转移配体来形成不稳定的络合物。诸如钠盐、铵盐或低级烷基铵盐的碱性金属盐也包括在用于本发明的 Tc-99m 高铈酸盐中。

其中所述金属为反应性铈的本发明络合物的制备可以使用 +5 或 +7 氧化状态下的铈起始材料来完成。其中铈为 Re(VII) 状态的化合物的实例为 NH_4ReO_4 或 KReO_4 。Re(V) 可以以例如 $[\text{ReOC}_4](\text{NBu}_4)$, $[\text{ReOC}_4](\text{AsPh}_4)$, $\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2$ 以及 $\text{ReO}_2(\text{pyridine})^{4+}$ 形式使用, 其中 Ph 为苯基, Bu 为正丁基。此外, 还可以使用能够形成铈络合物的

其他镱试剂。

本发明所提供的放射性标记的闪烁照相试剂可以以具有适量放射性的形式提供。在形成 Tc-99m 放射性络合物中，通常优选的是在放射性浓度为约 0.01mCi/mL 至 100mCi/mL 的溶液中形成放射性络合物。

通常，待施用的单位剂量的放射性为约 0.01mCi 至约 100mCi，优选的是 1mCi 至 20mCi。待注射的单位剂量的溶液为约 0.01mL 至约 10mL。

就成年人而言，根据本发明的放射性核素标记的纤维蛋白结合成像试剂的典型剂量为 10-20mCi。在向患者注射纤维蛋白特异性放射性核素成像试剂后，使用经校准用于所述核素（被引入到成像试剂中）的 γ 射线能量的 γ 照相机来对吸收所述试剂的区域进行成像，并对该位点处所存在的放射性进行定量。可以在几分钟内对体内所述位点进行成像。但是，在将放射性标记的肽注射到患者体内后，如果需要的话，可以进行若干小时或者甚至更长时间的成像。在大多数情况下，在大约 0.1 小时内，足量的施用剂量便可以在待成像的区域内累积，从而可以形成闪烁照相图。

用于本发明放射性治疗化合物的合适剂量时间表是本领域的技术人员所公知的。可以采用许多方法来施用所述的化合物，其中所述的方法包括但不限于采用一定量的放射性来进行单次或多次 IV 或 IP 注射，所述的放射性足以破坏或消除含有纤维蛋白的靶向组织，但未高到引起对非靶物（正常组织）的实质性损坏。对不同的构建体而言，所需的量和剂量是不同的，这取决于所用同位素的能量和半衰期、吸收的程度、所述试剂在体内的清除以及肿瘤的质量。总体而言，对成年人来说，所述的剂量为约 30-50mCi 的单次剂量到多至约 3 居里的累积剂量。

本发明的放射性治疗组合物可以包含生理学可接受的缓冲剂，并且需要放射稳定剂，从而防止在注射之前对所述的化合物造成辐射分解损害。放射稳定剂是本领域的技术人员所公知的，并且可以包括例如对氨基苯甲酸、抗坏血酸、龙胆酸等。

除了放射性核素之外，包含制备本发明络合体所需的所有成分的单瓶或多瓶试剂盒是本发明的组成部分。

单瓶试剂盒优选地包含螯合配体、亚锡盐来源或者其他可药用的还原剂（如果需要的话），并且使用可药用的酸或碱进行适当地缓冲，从而将 pH 调节至约 3 至约 9。所用的还原剂的量和类型主要取决于待形成的交换络合体的性质。合适的条件是本领域的技术人员所公知的。优选的是所述试剂盒的内容物为冻干形式。这种单瓶试剂盒可以任选地包含诸如葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、甘露醇、苹果酸盐、柠檬酸或酒石酸之类的不稳定或交换配体，并且还可以包含起到改善终产物的放射化学纯度和稳定性作用的反应调节剂，例如二乙烯三胺-五乙酸 (DPTA)，乙二胺四乙酸 (EDTA)，或者 α 、 β 或 γ 环式糊精。所述的试剂盒还可以包含稳定剂、膨胀剂（例如甘露醇），其被设计用于帮助冷冻干燥过程，以及本领域的技术人员所公知的其他添加剂。

多瓶试剂盒优选地包含的相同的共同成分，但是在重新构建放射性药物中使用了一个以上的小瓶。例如，就加入高锝酸盐（例如亚锡来源或其他还原剂）而言，一个小瓶中可以包含形成不稳定 Tc(V) 络合体所需的所有组分。将高锝酸盐加入上述小瓶中，并且在等待合适的时间后，将该小瓶中的内容物加入到装有所述配体、以及缓冲剂（其适用于将 pH 调节至其最佳值）的第二个小瓶中。在反应约 5 至 60 分钟的时间之后，形成本发明的络合体。有利的是所述多瓶试剂盒的所有小瓶中的内容物都是冷冻的。如上文所述，反应调节剂、交换配体、稳定剂、膨胀剂等可以存在于任一个小瓶中，或者存在于两个小瓶中。

治疗应用

在本发明的另一个实施方案中，本发明的纤维蛋白结合部分与治疗试剂（也称为治疗活性试剂或部分）缀合。

除非另作说明，否则本文所用的术语“治疗”包括至少部分地减轻给定状况的症状。治疗活性试剂不必须有效地完全减轻所述的症状。例如，个体治疗可以使肿瘤的尺寸、疾病区域或血块减小，或者甚至可以抑制肿瘤或患病区域尺寸的增大，以及部分地减轻其他症状。备

选地，治疗还可以使目的区域中的血管数量减少，或者可以抑制血管数量的增多。治疗还可以抑制或减少主要肿瘤恶性生长的数量或尺寸。

根据本发明的治疗试剂的合适的实例包括：能够使凝块溶解的抗凝血-溶解血栓试剂或纤维蛋白溶解试剂、抗血管生成试剂、细胞毒性试剂（包括用于选择性地杀死和/或抑制癌细胞生长的化疗试剂或肿瘤杀灭试剂，特别是放射性治疗试剂）。

在一个实施方案中，所述的治疗试剂为溶解血栓试剂或纤维蛋白溶解试剂。本发明的纤维蛋白结合肽可以通过改善溶解血栓试剂和血管生成试剂对纤维蛋白的亲合性以及它们在纤维蛋白凝块处或在病理学血管生成活性位点处的停留时间来用于改善溶解血栓试剂和抗血管生成试剂的活性。在本发明的这一方面中，杂合溶解血栓试剂可以通过使根据本发明的纤维蛋白结合多肽与溶解血栓试剂缀合来提供。类似地，抗血管生成试剂可以通过使根据本发明的纤维蛋白结合多肽与抗血管生成试剂缀合来提供。所述缀合体的纤维蛋白结合多肽部分使得所述的溶解血栓试剂“归巢”到纤维蛋白凝块位点或抗血管生成位点处，并使得溶解血栓试剂改善了所述缀合体对所述位点的亲合性，从而使得所述缀合体的溶解血栓活性或抗血管生成活性更加定位或集中于目的位点处。

所述的缀合体可以特别用于治疗血栓相关疾病，特别是哺乳动物（包括人）的急性心肌梗塞、中风和肺栓塞，其方法包括向有此需要的哺乳动物施用有效量的与溶解血栓试剂缀合的、根据本发明的纤维蛋白结合部分。本发明还提供了所述缀合体在制备用于治疗哺乳动物（包括人）血栓相关疾病的药剂中的用途。用于本发明上述方面中的合适的溶解血栓试剂包括纤溶酶，包括血纤蛋白溶酶原激活剂。术语血纤蛋白溶酶原激活剂包括但不限于链激酶、人组织血纤蛋白溶酶原激活剂（tPA）和尿激酶（单链和双链形式）。所述的酶可以得自天然来源或组织，或者可以通过重组产生。其他合适的溶解血栓试剂包括：纤溶酶活性杂合蛋白质（例如参见 EP-A-155 387），该蛋白质包含与不同的 2-链蛋白酶的一条链相连的 2-链蛋白酶的一条链，其中杂合蛋

白质中至少一条链由纤溶酶活性蛋白酶衍生得到；溶解血栓蛋白酶缀合体（例如参见 EP-A-152 736），例如与可逆性阻断血纤蛋白溶酶原相连的尿激酶；纤溶酶的衍生物，其中造成纤溶酶活性的所述酶上的催化位点可以被通过可逆性连接基团连接其上的人蛋白质所阻断，例如与人血纤蛋白溶酶原的活性中心发生可逆性连接的尿激酶；遗传改造的衍生物，例如天然形成的血纤蛋白溶酶原激活剂的突变蛋白；杂合分子（例如参见 EP-A-297 882）；可逆性阻断的体内纤溶酶，例如链激酶和血纤蛋白溶酶原之间的二元络合体，最优选的是未经过内部键酶切的对甲氧苯酰链激酶/血纤蛋白溶酶原络合体（Anistreplase（阿尼普酶），如美国专利号 4,808,405 中所述）；等等。

可以使用上文所述的相同类型的连接体，采用已知的方法将溶解血栓试剂与纤维蛋白结合部分连接或融合。优选的连接体可以为取代的或未取代的烷基链、氨基酸链、聚乙二醇链、以及本领域已知的其他简单的聚合物连接体。更优选的是，如果溶解血栓试剂本身是蛋白质，其编码 DNA 序列是已知的，则溶解血栓的蛋白质和纤维蛋白结合多肽可以由相同的合成基因（采用重组 DNA 技术创建）共表达。纤维蛋白结合多肽的编码序列可以与溶解血栓蛋白质的编码序列是读框内融合的，使得所述的蛋白质在溶解血栓蛋白质的氨基或羧基末端表达，或者在两个末端之间的位置处（如果确定该位置不会破坏溶解血栓蛋白质或纤维蛋白结合多肽的所需的生物学功能）表达。该普通方法的一个特别的优点在于多个的串联体，串连排列的纤维蛋白结合多肽是可行的，因此增大了与各溶解血栓蛋白质有关的纤维蛋白结合位点的数量和浓度。以这样的方式，增加了纤维蛋白结合亲和力，预计其会改善重组治疗蛋白质的效力。

除了溶解血栓的试剂以外，根据本发明的纤维蛋白结合肽可以用于在体内或体外将其他活性试剂递送至纤维蛋白位点处。例如，小分子的治疗试剂或其他治疗试剂可以与一个或多个纤维蛋白结合肽连接，并将缀合体施用至受试者或引入到含纤维蛋白的溶液中，则所述

缀合体的纤维蛋白结合性质会在纤维蛋白积聚的位点处浓缩所述的小分子或治疗试剂。在特别优选的方面中，本发明的纤维蛋白结合肽可以用于递送在显微蛋白存在下具有活性的试剂，例如血管生成促进剂（例如成纤维细胞生长因子）。所述的纤维蛋白结合肽还可以通过使所述的化合物或药品积聚在纤维蛋白凝块处（从此处所述的化合物或药品被缓慢释放），而用于增加该化合物或药品的血液清除半衰期。

本发明的纤维蛋白结合多肽还可以用于将遗传材料靶向特定的细胞。例如，本发明的结合肽可以用于将遗传材料定位于含有纤维蛋白的细胞或组织中。因此，这种构建体可以用于基因治疗中。所述的遗传材料可以包括天然或合成来源的核酸，例如 RNA 或 DNA，包括重组 RNA 和 DNA、以及反义 RNA 和 DNA。可以使用的遗传材料的种类包括例如表达载体上所携带的基因，其中所述的表达载体例如有质粒、噬粒、粘粒、酵母人工染色体 (YAC)、缺陷型或“辅助型”病毒、抗原核酸、单链和双链的 RNA 和 DNA 及其类似物（例如硫代磷酸寡脱氧核苷酸和二硫代磷酸寡脱氧核苷酸）。此外，所述的遗传材料可以与例如脂质、蛋白质或其他聚合物结合。遗传材料的递送媒介物可以包括例如病毒颗粒、逆转录或其他基因治疗载体、脂质体、脂质（特别是阳离子脂质）与遗传材料的络合物、右旋糖苷衍生物与遗传材料的络合物等。

在优选的实施方案中，本发明的结合多肽可以在用于治疗血管生成相关疾病的基因治疗中使用。在该实施方案中，遗传材料、或者一种或多种含有遗传材料的递送媒介物（例如可用于治疗血管生成相关疾病）可以与本发明的一种或多种纤维蛋白结合肽缀合，并被施用至患者。

在上述治疗方法中，所述的化合物可以通过对于溶解血栓试剂或治疗试剂惯用的任何常规途径来进行施用，例如肠胃外施用、肠内施用或鼻内施用，并且优选的是通过输注或推注途径施用，或者通过储库或缓释配制物途径施用。在优选的实施方案中，所述的组合物可以按照适用于向人静脉内施用的药物组合物的常规方法来配制形成。通常，用于静脉内施用的组合物为处于无菌等渗水性缓冲剂中的溶液。

在需要时，所述的组合物还可以包含增溶剂和局部麻醉剂（例如利多卡因），从而减轻注射位点的疼痛。通常，所述的多种组分可以以分开的方式或者以一起混合在单位剂型中的方式（例如冻干粉末或无水浓缩物处于紧密密封的容器（例如安瓿或小袋）中，其中所述的容器以活性单位指示活性试剂的量）来提供。在所述组合物将通过输注方式进行施用时，其可以被分散在含有无菌药物级的“注射用水”或盐水的输注瓶中。在所述组合物将通过注射方式进行施用时，可以提供注射无菌水或盐水的安瓿，使得多种组分在施用之前混合。

施用材料的量将取决于血栓性状况的严重程度以及凝块的位置和尺寸。待使用的精确剂量和施用模式必须由指导治疗医师根据条件决定的不适的性质来进行。通常，纤维蛋白结合剂/溶解血栓试剂的缀合体的剂量遵循单独使用溶解血栓试剂的常规剂量，但是通过加入纤维蛋白结合剂而使得对纤维蛋白的亲水性得到改善可以允许标准的溶解血栓剂量有一定程度的降低。所包括的用于所述治疗中的具体的溶解血栓试剂（参见施用剂量和施用方法的实施例）如下：

在30分钟至3小时内，1链激酶1.0-3.0百万单位，阿尼普酶30单位；2-5分钟注射tPA（野生型）50-150mg；在至多6小时内输注双链尿激酶40-100mg；在至多6小时内输注单链尿激酶30-100mg（3-12百万单位）；在至多5小时内输注杂合血纤蛋白溶酶原20-100mg；注射或输注血纤蛋白溶酶原的激活剂和衍生物突变蛋白10-100mg；注射或输注激活剂。

在优选的特征中，所述的纤维蛋白结合部分通过包含酶切位点的连接体与溶解血栓的试剂连接，其中所述的酶切位点例如为在凝结级联过程中通常由酶进行切割的酶切位点，例如因子Xa、凝血酶或血纤蛋白溶酶原的酶切位点等。优选的是，直到溶解血栓的试剂在凝块位点处从纤维蛋白结合部分上切割下来后，所述的试剂才被激活。由于溶解血栓试剂的切割是在凝块的位点处发生的，所以在远离凝块的位点处，发生所不需要的流血事件的风险最小。

备选地，治疗性溶解血栓试剂可以被加载超声小泡上，在该小泡

的表面上已经衍生有本发明的纤维蛋白结合部分。所述小泡还可以填充有超声高效气体，例如但不限于全氟丙烷或全氟丁烷。一旦纤维蛋白特异性小泡归巢到血栓的位点处（通过超声进行监控），则可以改变所给予的超声波的频率和能量，从而导致在血栓的位点处控释所述的溶解血栓试剂（例如参见 WO 93/25241）。

如上文所述，本发明的纤维蛋白结合肽还可以通过归巢到发生血管生成的区域中来改善治疗试剂（例如抗血管生成试剂或肿瘤杀灭试剂）对抗所不需要的血管生成（例如在发生赘生性肿瘤时）的活性，从而使得治疗活性可以更加局限于和集中在血管生成的位点处。

在本发明的这一方面中，杂合试剂（hebrid agent）可以通过将根据本发明的纤维蛋白结合多肽与治疗试剂缀合来提供。所述的治疗试剂可以为上文所述的放射性治疗试剂、药品、化疗或肿瘤杀灭试剂、遗传材料或基因递送媒介物等。所述的缀合体可以用于治疗哺乳动物（包括人）中与血管生成相关的疾病，特别是赘生性肿瘤的生长和转移，其所采用的方法包括向有此需要的哺乳动物施用有效量的与治疗试剂缀合的根据本发明的纤维蛋白结合多肽。本发明还提供了这种缀合体在制备用于治疗哺乳动物（包括人）中血管生成相关疾病的药剂的用途。

用于本发明上述方面中的合适的治疗试剂包括但不限于：抗肿瘤试剂，例如铂化合物（例如螺铂、顺铂和卡铂）、甲氨蝶呤、阿霉素、丝裂霉素、安丝菌素、博来霉素、胞嘧啶、阿拉伯糖苷、阿糖腺苷、巯基多熔素、长春新碱、白消安、苯丁酸氮芥、美法仑（例如 PAM, L-PAM, 或苯基丙氨酸芥末）、巯基嘌呤、米托坦、盐酸甲基苄肼、更生霉素（放线菌素 D）、盐酸柔红霉素、盐酸多柔比星、泰素、丝裂霉素、普卡霉素（光辉霉素）、氨苯乙哌啶酮、雌莫司汀磷酸钠、氟他胺、醋酸亮丙瑞林、醋酸甲地孕酮、枸橼酸他莫昔芬、睾内酯（testoiactone）、曲洛司坦、安吡啶（m-AMSA）、天冬酰胺酶（L-天冬酰胺酶）、Erwina 天冬酰胺酶、依托泊甙（VP-16）、干扰素 cx-2a、干扰素 cx-2b、替尼泊甙（VM-26）、硫酸长春碱（VLB）、硫酸长春新碱、

硫酸博莱霉素、阿霉素和阿糖胞苷；抗血管生成试剂，例如酪氨酸激酶抑制剂（其具有针对血管生成和/或肿瘤生长中重要的信号传导分子（例如 SU5416 和 SU6668）的活性（Sugen/Pharmacia & Upjohn））、内皮抑素（EntreMed）、血管抑素（EntreMed）、Combrestatin（Oxigene）、环孢霉素、5-氟尿嘧啶、长春碱、多柔比星、紫杉醇、柔红霉素、抗毒素；凝血因子；抗病毒剂，例如无环鸟苷、金刚烷胺齐多夫定（AZT 或 Zidovudine）、利巴韦林、阿糖腺嘌呤一水合物（阿糖腺苷，ara-A）；抗生素、抗疟药、抗原虫药（例如氯喹、羟化氯喹、甲硝唑、奎宁和葡甲胺锍酸盐）；抗炎试剂，例如二氟尼柳、异丁苯丙酸、消炎痛、甲氧灭酸盐、甲灭酸、甲氧萘丙酸、羟基保泰松、苯基丁氮酮、吡罗昔康、舒林酸、托尔米丁、阿司匹林和水杨酸盐。

如本文所用，术语“治疗的”包括至少部分地减轻给定状况的症状。本发明的纤维蛋白结合肽和缀合体不必须有效地完全缓解所述的症状。例如，单种治疗可以使肿瘤的尺寸、疾病区域或血块减小，或者可以抑制肿瘤或患病区域尺寸的增大，以及部分地减轻其他症状。所述治疗可以使目的区域的血管的数量减少，或者可以抑制目的区域的血管的数量增多。所述治疗还可以抑制或减少转移生长的主要肿瘤的数量或尺寸。

药用应用

无论所述的纤维蛋白结合部分在患者中是用于检测或诊断，还是用于帮助治疗，这些用途都需要它们作为药物试剂使用。本发明的药物组合物包含本发明的化合物及其可药用的盐中的任意一种，以及可药用的组分、赋形剂、载体、辅料或媒介物。

可以与其他诊断或治疗试剂相似的方法向包括人在内的哺乳动物施用本发明的药物组合物。待施用的剂量以及施用的模式取决于多种因素，包括年龄、重量、性别、患者的状况以及遗传因素，并且最终由主治医师或兽医确定。通常，诊断灵敏性或治疗效力所需的剂量为约 0.001 至 50,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 宿主体重，更通常的是 0.01 至 25.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 宿主体重。

可用于本发明的药物组合物的可药用的载体、辅料和媒介物包括但不限于：离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白（例如人血清蛋白）、缓冲剂物质（例如磷酸盐）、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解液（例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、硅胶、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂）。

本发明的药物组合物可以通过多种途径或模式进行施用。这些途径或模式包括但不限于：口服施用、呼吸道内施用、舌下施用、肺部施用、局部施用、直肠施用、鼻内施用、口腔施用、阴道施用、肠胃外施用、或者通过植入的储存库施用。植入的储存库可以通过机械、渗透或其他手段起作用。如本文所用，术语肠胃外包括：腹膜内、脊椎旁、关节周围、骨膜、皮下、皮内、静脉内、动脉内、肌肉内、关节内、滑膜腔内、胸骨内、脑脊髓膜内、病灶内和颅骨内注射或输注技术。

所述的组合物优选地被配制用于肠胃外施用，并且最优选地用于静脉内或动脉内施用。通常，并且特别是在静脉内或动脉内施用时，所述的药物组合物可以以推注、每次分开的两个或多个剂量、或者恒定的或非线性的流动性输注的方法给予。

关于剂量、剂型、施用模式、组合物等的详细情况在标准的制药课本（例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Alfonso R. Gennaro, ed. (Mack Publishing Co., Easton, Pa. 1990), 该文献以引用方式并入本文）中有进一步的描述。

如上文所述，本发明的一个实施方案涉及新型化合物，该化合物包含与至少一个诊断或治疗活性部分缀合的纤维蛋白结合部分。

具体而言，本发明的优选实施方案包括式(I)的化合物及其可药用的盐，所述式为：



其中

A 为包含氨基酸序列的纤维蛋白结合肽部分，其中所述的氨基酸序列选自表 1 或表 2 所提供的序列；

Y 为将 A 与至少一个 T 连接起来的合适的连接部分；当 s 为 2 时，单元 Y 彼此相同或不同；

T 在各种情况下均独立地为诊断或治疗活性部分；

S 为 1 或 2；

r 在各种情况下独立地为整数 1 至 8。

除非另作说明，否则短语“纤维蛋白结合肽部分”或者简称“肽部分”可以在本文中交换使用，其是指本文所公开序列的相应纤维蛋白结合肽的合适衍生物，其中所述肽的 N 末端(-NH₂)和 C 末端(-COOH)基团中的一者或二者通过与 Y 形成甲酰胺键而被官能化。如果所述的 C 末端或 N 末端基团没有被官能化，则其可以适当地被保护或失活。因此，“纤维蛋白结合肽部分”是指由所述纤维蛋白结合肽的原始氨基酸序列在经过所述的任意的保护/失活、并形成所述的甲酰胺键后而形成的部分。

通常，例如，在所述的纤维蛋白结合肽具有如表 1 所示的 Seq005 氨基酸序列 (H₂N-WQPCPAESWTFCWDP-COOH (SEQ ID NO. 1)) 的情况下，相应的纤维蛋白结合肽部分包括例如：

-HN-WQPCPAESWTFCWDP-CO-

Pg-HN-WQPCPAESWTFCWDP-CO-， 以及

-HN-WQPCPAESWTFCWDP-CO-Pg

其中 Pg 为合适的保护/失活基团。

在本发明中，除非另作说明，否则短语“保护基团”指定为适用于保护其所结合的官能团的功能的保护基团。具体而言，保护基团用于保护氨基官能团或羧基官能团。合适的保护基团可以包括例如苄基、苄氧基羰基、烷基或苄基酯、或常用于保护所述官能团的其他取代基，这些取代基是本领域的技术人员所公知的，例如 Fmoc 以及在常规手册（例如 T. W. Green, Protective Groups in Organic Synthesis

(Wiley, N. Y. 1981)) 中所述的保护基团。

除非另作说明, 否则如本文所用, 短语“失活基团”是指能够与肽单元的 N 末端 ($-\text{NH}_2$) 或 C 末端 ($-\text{COOH}$) 基团发生反应的化学基团, 其中通过化学反应所述的肽单元转化为其合适的衍生物, 该衍生物保持了相应肽部分对纤维蛋白的特异性, 但是不能分别与不同部分上的 ($-\text{COOH}$) 或 ($-\text{NH}_2$) 官能团发生化学反应, 因此不涉及甲酰胺交联反应。

失活基团的合适的实例包括 Ac, 其中 Ac 为 $\text{CH}_3(\text{CO})-$, 例如, 当使用该基团时, 其会使所述肽链的 ($-\text{NH}_2$) 末端基团失活, 从而形成相应的非反应性 AcHN 基团。另一方面, $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{NH}(\text{CH}_3)$ 可以通过提供相应的 $-\text{CONH}_2$ 或 $-\text{CONH}(\text{CH}_3)$ 非反应性酰胺而用于将末端 $-\text{COOH}$ 基团失活。

根据本发明的优选方面, 在式 (I) 的化合物中, A 为包含如表 1 所示的 Seq005 氨基酸序列 ($\text{H}_2\text{N}-\text{WQPCPAESWTFCWDP}-\text{COOH}$ (SEQ ID NO. 1)) 的纤维蛋白结合肽部分, 其中当根据单字母密码来定义氨基酸时, W, Q, P, C, A, E, S, T, F 和 D 均具有常规采用的含义, 并且其中位置 4 和 12 的 C 氨基酸通过二硫键 ($-\text{S}-\text{S}-$) 而彼此结合。

根据本发明的另一个优选的方面, 在式 (I) 的化合物中, s 为 1。其中 $s=1$ 的本发明的化合物在各种情况下都独立地包含一个或多个诊断或治疗活性部分 T, 该部分 T 通过合适的连接部分 Y 而与所述肽部分的 N 末端 ($-\text{NH}_2$) 或相反的 C 末端 ($-\text{COOH}$) 基团缀合, 从而得到式 (I) 的化合物, 其中所述肽部分 A 仅在其 N 末端或 C 末端基团中的一个基团上官能化。

根据本发明的另一个优选的方面, 在式 (I) 的化合物中, s 为 2。其中 $s=2$ 的本发明的化合物在各种情况下都独立地包含一个或多个诊断或治疗活性部分 T, 该部分 T 通过合适的连接部分 Y 而与所述肽部分 A 的每一个 N 末端 ($-\text{NH}_2$) 和 C 末端 ($-\text{COOH}$) 基团缀合, 从而得到式 (I) 的化合物, 其中所述肽部分在 N 末端和 C 末端基团上均官能化。

根据本发明的另一个优选的方面, 在式 (I) 的化合物中, r 为整数 1 至 5。

在本发明的一个优选的实施方案中, Y 为线性或分支的二价连接

部分。短语“二价连接部分”（或“二价连接体”，在本文中可交换使用）是指包括具有官能团和第二官能团的链，其中所述的官能团可以使连接部分与 A 的 N 末端或 C 末端基团缀合，所述的第二官能团可以与有效诊断或治疗的部分 T 缀合。

除非另作说明，否则如本文所用的术语“官能团”是指在分子或部分中的特定原子基团，其中所述的特定原子基团负责该分子或部分的特征性化学反应。在本发明的上下文中，所述的官能团包括在肽部分、连接部分以及诊断或治疗活性部分中，特定的、经适当保护或适当激活的 $-NH_2$ 末端或 $-COOH$ 末端基团。此外，所述的官能团可以包括在所述的用于连接的诊断或治疗活性部分上以游离基团或者以任选的活化反应性基团形式存在的任何其他氨基、巯基、羧基，因此可以进行其他交联或偶联反应。在本发明的优选的方面中，所述的官能团是适当保护或适当激活的 $-NH_2$ 或 $-COOH$ 基团，从而通过形成甲酰胺键 $(-NHCO-)$ 和 $(-CONH-)$ 来进行交联反应。

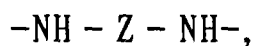
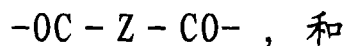
优选的是，所述的二价连接部分为线性的 C_1-C_{100} ，更优选的是 C_1-C_{50} ，最优选的是 C_1-C_{35} 烷基链，该烷基链任选地被选自 $-O-$ 、 $-CONH-$ 、 $-CO-$ 、 $-NR_1-$ 和 $-NHCO-$ 中的一个或多个基团所中断，并且任选地被一个或多个 $-R_2$ 基团所取代，其中 R_1 为 H 或 C_1-C_5 烷基，而 R_2 为 $-CONH_2$ 基团或 (C_1-C_5) 烷基，其任选地反之被 $-CONH_2$ 基团或任选取代的苯环所取代。如上文所述，所述的二价连接体包含分别将其与 A 和与 T 连接的两个官能团。

除非另作说明，否则如本文所用的术语“ (C_1-C_5) 烷基”是指包含 1 至 5 个碳原子的线性或分支的、饱和或非饱和的烷基取代基，例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、叔丁基、戊基等，其中甲基、乙基和丙基是优选的。更优选的是，所述的二价连接部分 Y 包含一个或多个亚单元，该亚单元选自例如同型双功能和异型双功能单元以及它们合适的组合。

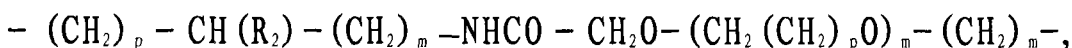
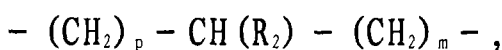
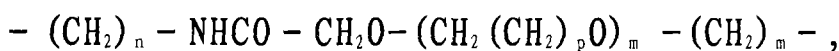
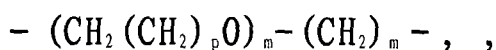
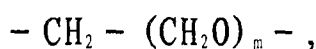
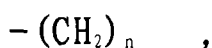
除非另作说明，否则术语“同型双功能”单元或部分是指具有至少两个相同的反应性官能团的单元或部分。

除非另作说明，否则术语“异型双功能”单元或部分是指具有至少两个不同的反应性基团的单元或部分。

同型双功能单元的合适的实例包括例如分别具有下式的二羧基部分和二胺部分，

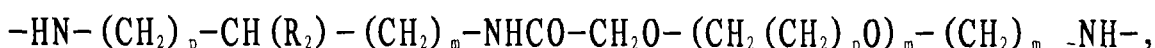
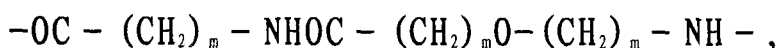
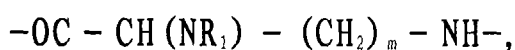
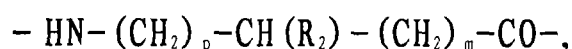
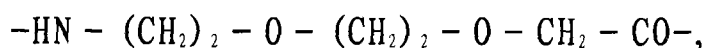
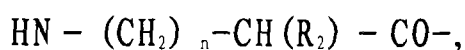
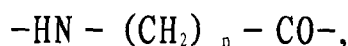


其中 Z 为优选选自以下的链及其衍生物：



其中 $n=1-10$ ， $m=1-5$ 和 $p=0-5$ ，其中羧基和氨基为适当激活或适当保护的形式。

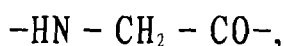
异型双功能单元的合适的实例包括例如：

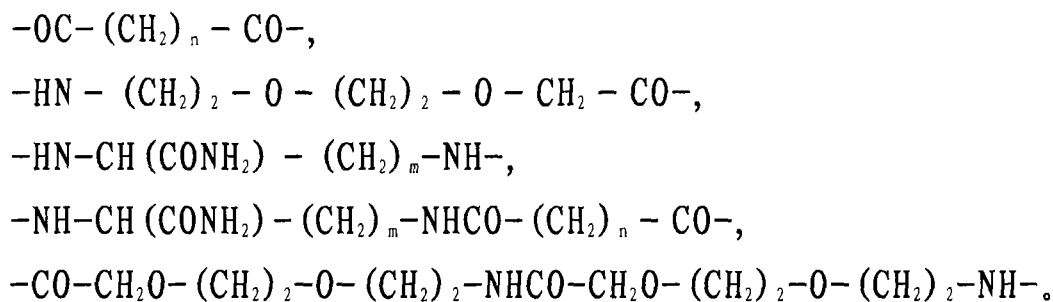


以及它们的组合，

其中 n ， m 和 p 如上文所定义的那样。

更优选的是，本发明的二价连接部分 Y 包含以下单元中的一个，或者它们适当的重复和/或组合，其中所述的单元为：





在本发明特别优选的方面中，所述的二价连接部分 Y 为或者包含单元 Gly-Gly-Gly-Lys，其也称为 GGGK，其中 Gly 为甘氨酸，Lys 为赖氨酸。

在本发明不同的实施方案中，Y 为线性或分支的多官能连接部分。除非另作说明，否则“多官能连接部分”和“多官能连接体”可以交换使用，其是指含有至少 3 个、优选 3 至 8 个、更优选为 3 至 5 个官能团的线性或分支的链，其中所述官能团中的一个官能团将所述的多官能团部分与 A 的 N 末端 (-NH₂) 或 C 末端 (-COOH) 基团连接，而其他的官能团将所述的多官能团部分与至少 2 个、优选 2 至 7 个、更优选的是 2 至 5 个同等的或不同的有效诊断或治疗部分连接。

优选的是，所述的多官能连接体 Y 为线性或分支的 C₁-C₁₅₀，更优选的是 C₁-C₁₀₀，最优选的是 C₁-C₇₅ 烷基链，该烷基链任选地被选自 -O-、-CONH-、-CO-、-NHCO- 和 -NR₃ 中的一个或多个基团所中断，并且任选地被一个或多个 -R₄ 基团所取代，其中 R₃ 为 H 或者任选地被 -COOH 或 -NH₂ 取代的 C₁-C₅ 烷基，而 R₄ 可以为选自 -NH₂、-COOH 或它们的衍生物中的基团，例如低级烷基酯或 -CONH₂ 酰胺，其中 (C₁-C₅) 烷基任选地被选自 -COOH、-CONH₂ 和 -NHR₃ 中的基团所取代或者被任选取代的苯环所取代，所述的链进一步包含将所述的多官能部分与 A 连接的至少三个官能团，以及每个其余官能团具有有效诊断或治疗部分 T。

所述的多官能连接部分的合适的实例可以包括例如：

(a) N-分支的赖氨酸体系(参见 f. i., Veprek, P et al., J. Pept. Sci. 5, 5 (1999); 5, 203 (1999),

(b) 多羧基化合物及其合适的衍生物，其中所述的羧基为适当激活或保护的形式，

(c) 多胺化的化合物及其合适的衍生物，其中所述的氨基为适当激活或保护的形式，

(d) 氨基酸和聚氨基酸，例如聚鸟氨酸、聚精氨酸、聚谷氨酸、聚天冬氨酸。

在本发明优选的方面中，所述的多官能连接部分 Y 包含：选自上述同型双官能和异型双官能单元的一个或多个亚单元、以及选自以下的一个或多个亚单元：

- HN-(CH₂)_n-CH(NR₃)-CO-
- OC-CH(NR₃)-(CH₂)_n-NH-
- OC-(CH₂)_m-NR₃-(CH₂)_m-CO-
- HN-CH(R₄)-(CH₂)_m-CO-
- HN-CH(R₄)-(CH₂)_n-NH-
- HN-(CH₂)_p-((CH₂)_p-CH(R₄))-(CH₂)_m-NH-
- OC-(CH₂)_p-((CH₂)_p-CH(NR₃))-(CH₂)_m-NH-

其中 n, m, p, R₃ 和 R₄ 具有上文所定义的含义。

在特别优选的方面中，所述的多官能 Y 部分包含一个以下所示的亚单元或其适当的重复或组合，所述的亚单元为：

- Gly-Gly-Gly-Lys,
- OC-(CH₂)_p-((CH₂)_p-CH(NH₂))-(CH₂)_m-NH-
- HN-CH(CONH₂)-(CH₂)_m-NHCO-CH₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-NH-
- OC-CH(NH₂)-(CH₂)_m-NHCO-CH(NH₂)-(CH₂)₂-NH-
- OC-(CH₂)_m-CO-
- HN-CH(COOH)-(CH₂)_n-NH-
- HN-CH₂-CO-
- OC-(CH₂)_n-CO-
- HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-
- OC-CH₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-NH-

其中所述亚单元的每一个 H₂N-和 HOOC-基团均可以发生甲酰胺的交联反应，从而可以延长连接部分和/或使连接部分形成分枝。

根据本发明的任何中间体化合物构成了本发明的另一目的，其中所述的化合物包含例如与合适的、任选保护的 Y 部分、或者与合适的、任选保护的 Y 部分的亚单元缀合的肽部分 A。这种中间体及其制备在例如本说明书的试验部分中有详细的描述。

作为非限定性实例，图 1 包括了制备本发明连接体官能化的肽部分 (Seq005-P) 的合成过程，其中所述的肽部分为包含表 1 所示的 Seq005 的氨基酸序列的肽，并且所述的缀合的连接部分为 -GGGKJJ- (SEQ ID NO. 139) (其中 J 为 Fmoc-8-氨基-3,6-二氧杂辛酸；参见 Aldrich Neosystem and Peptides International catalogue)。

所述的这些新型中间体作为制备式 (I) 所示化合物的中间体具有一定的用途，其中所述的新型中间体包含与合适的连接单元或其合适的亚单元缀合的肽部分。

根据本发明的优选的方面中，在式 (I) 的化合物中，T 为有效诊断的部分或者放射性治疗的部分。

短语“有效诊断的部分”或“有效成像的部分”在本文中可以交换使用，其是指可以通过成像诊断方法检测的任何部分，换言之，其是指能够提供、改善、或者以任何方式有利地修改通过成像诊断技术（包括例如磁共振成像、放射性成像、X 射线成像、光成像）检测的信号的任何部分，由此，当所述的部分与所述的技术结合使用时，能够记录到具有诊断用途的、优选为形成对比的图像。

根据本发明的有效诊断部分的实例包括例如螯合的 γ 射线或正电子发射放射性核素；螯合的或多螯合的络合体形式的顺磁金属离子；包括原子序数高于 20 的原子的 X 射线吸收试剂；染料分子；荧光分子；磷光分子；在 UV 光谱中进行吸收的分子；量子点；在近红外辐射或远红外辐射中能够进行吸收的分子；可通过超声波检测的部分；以及总体而言，能够产生可检测物质的所有部分。本领域的技术人员公知的是，所采用的成像模式必需根据本发明的诊断化合物所包含的成像检测部分来进行选择。

MRI 造影剂

在本发明特别优选的实施方案中,在式(I)的化合物中,T为可MRI检测的部分。

其中T为可MRI检测的部分的式(I)的化合物优选用作MRI造影剂。

因此,在一个优选的方面中,本发明涉及式(I)的新型MRI造影剂,其中T为可MRI检测的部分。

优选的是,所述的MRI可检测部分包含使用顺磁金属元素标记的螯合配体的残基,其中所述的顺磁金属元素可通过磁共振成像(MRI)技术来检测。

优选的顺磁金属元素为原子序数在20至31、39、42、43、44、49之间的、以及57至83之间的那些。更优选的顺磁金属元素选自 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Rh^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Gd^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Dy^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Pm^{3+} 、 Nd^{3+} 、 Tm^{3+} 、 Ce^{3+} 、 Y^{3+} 、 Ho^{3+} 、 Er^{3+} 、 La^{3+} 、 Yb^{3+} 、 Mn^{3+} 、 Mn^{2+} ; 其中 Gd^{3+} 为最优选的。

短语“造影成像剂”或“造影剂”是指任何这样的可检测实体,当所述的可检测实体与合适的诊断成像技术联合使用时,所述的可检测实体在体外可以用于显现或检测在生物元件中或在生物元件上的纤维蛋白单元或纤维蛋白沉积,其中所述的生物元件包括来源于活哺乳动物患者、优选得自人类患者的细胞、生物学流体和生物学组织,并且所述的可检测实体可以用于对在哺乳动物、优选的是人体器官、区域或组织中,或者在哺乳动物、优选的是人体器官、区域或组织上的纤维蛋白和纤维蛋白沉积进行体内鉴定和定位。

短语“螯合剂”、“螯合配体”或“螯合试剂”在本文中可交换使用,其是指特征在于存在的极性基团的化学部分、试剂、化合物或分子,所述的极性基团能够形成包含多于1个的、与过渡金属或另一种金属实体形成的配位键的络合物。在本发明优选的方面中,所述的螯合配体包括环状或线性的聚氨基聚羧酸或磷酸,并且含有至少1个以游离的、任选的活化官能团形式存在的氨基、巯基、羧基,其中所述的官能团适用于与间隔体链Y的官能团发生缀合反应。

表述“螯合试剂的残基”或“螯合配体的残基”在本文中可交换使用，其是指在经过上文所述的缀合后得以保留的螯合配体的部分。优选的是，所述的缀合过程是来自螯合配体或其衍生物上的酸性基团与连接部分 Y 的氨基(-NH₂)，或者备选地，在所述螯合配体的合适的反应性氨基(-NH₂)与 Y 部分末端羧基(-COOH)之间，从而形成甲酰胺键。对交联反应中所涉及的螯合配体的酸性或反应性氨基加以适当地选择，以便不减小或改变所述配体残基的螯合能力。

在“用金属元素标记的螯合配体”语句中使用的术语“标记的”或“络合的”是指在金属和螯合配体之间形成的螯合体或配体络合体。

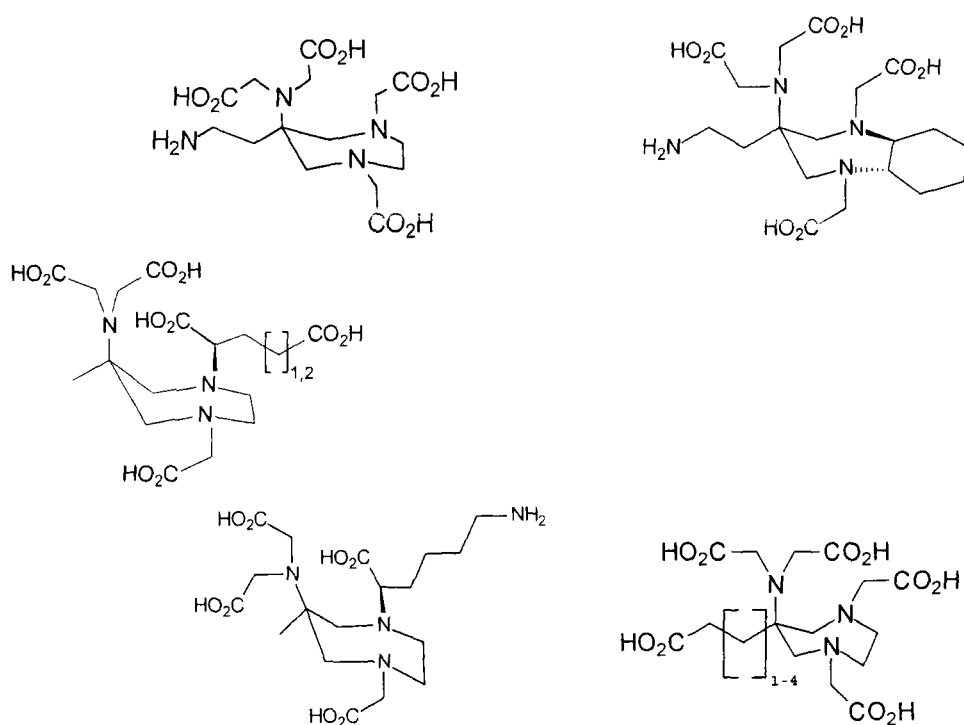
术语“金属实体”是指可以通过成像技术检测的金属离子。这种金属实体具体包括可通过诸如磁共振成像(MRI)之类的成像技术来检测的顺磁金属离子，或者通过诸如闪烁照相、单光子发射型计算机断层成像(SPECT)和正电子放射层扫描术(PET)之类的成像技术来检测的金属离子(例如放射性核素)，或者甚至用于治疗放射性核素。

合适的螯合配体包括本文所述的那些，具体而言为选自以下的螯合配体：聚氨基聚羧酸及其衍生物，包括例如：二乙撑三胺五乙酸(DTPA)及其衍生物，例如苯并-DTPA，二苯并-DTPA，苯基-DTPA，二苯基-DTPA，苄基-DTPA，联苄基-DTPA；N,N-二[2-[(羧甲基)[(甲基氨基甲酰基)甲基]氨基]乙基]-甘氨酸(DTPA-BMA)；N-[2-[二(羧甲基)氨基]-3-(4-乙氧基苯基)丙基]]-N-[2-[二(羧甲基)氨基]乙基]甘氨酸(EOB-DTPA)；4-羧基-5,8,11-三(羧基甲基)-1-苯基-2-氧杂-5,8,11-三氮杂十三-13-酸(BOPTA)；N,N-二[2-[二[2-(1,1-二甲基乙氧基)-2-氧代乙基]氨基]乙基]-L-谷氨酸 1-(1,1-二甲基乙基)酯 N,N-二[2-[二(羧甲基)氨基]乙基]L-谷氨酸(DTPA-GLU)；与赖氨酸缀合的DTPA(DTPA-Lys)；乙二胺四乙酸(EDTA)；1,4,7,10-四氮杂环十二烷 1,4,7-三乙酸(DO3A)；1,4,7,10-四氮杂十四烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)；[10-(2-羟丙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷 1,4,7-三乙酸(HPDO3A)；W003008390 申请中所提及的 6-[二(羧甲基)氨基]四氢-6-甲基-1H-1,4-二氮杂草-1,4(5H)-二乙酸(AAZTA)及其衍生物，所述文

献以引用方式并入本文；2-甲基-1,4,7,10-四氮杂环十四烷-1,4,7,10-四乙酸(MCTA)；($\alpha, \alpha', \alpha'', \alpha'''$)-四甲基-1,4,7,10-四氮杂环十四烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTMA)；或多氨基磷酸配体或其衍生物，具体为N,N'-二-(吡哆醛-5-磷酸)乙二胺-N,N'-二乙酸(DPDP)、乙二胺四(甲基磷酸)(EDTP)；或多氨基磷酸配体及其衍生物，或者多氨基磷酸及其衍生物，具体为1,4,7,10-四氮杂环十四烷-1,4,7,10-四[甲基磷酸]和1,4,7,10-四氮杂环十四烷-1,4,7,10-四[亚甲基-(甲基磷酸)]；或大环整合剂，例如texaphirine、卟啉、酞花青。

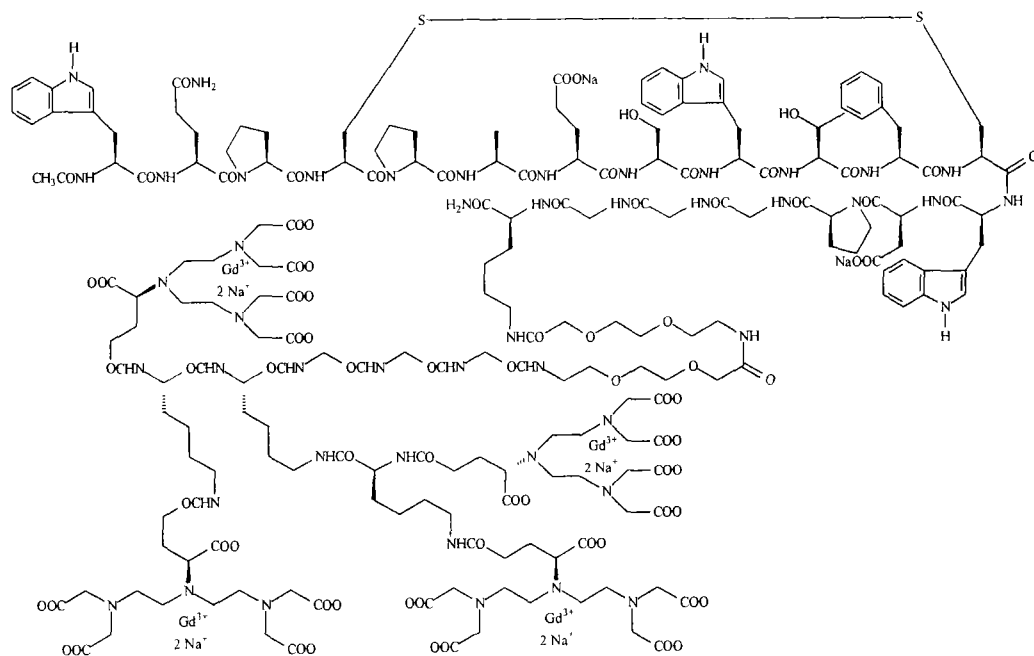
根据本发明的优选的配体包括图6a至6c所示的那些，其还包括了关于这些配体的制备的、合适的参考文献。

特别优选的是：DTPA、DTPA-GLU、DTPA-Lys、DOTA、AAZTA及其下列衍生物：

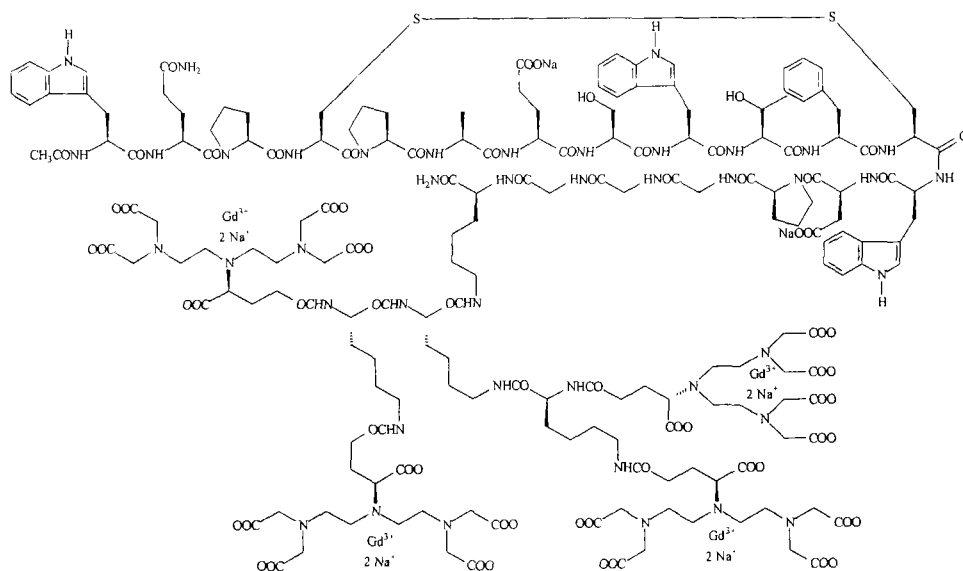


本发明特别优选的MRI造影剂的实例包括：

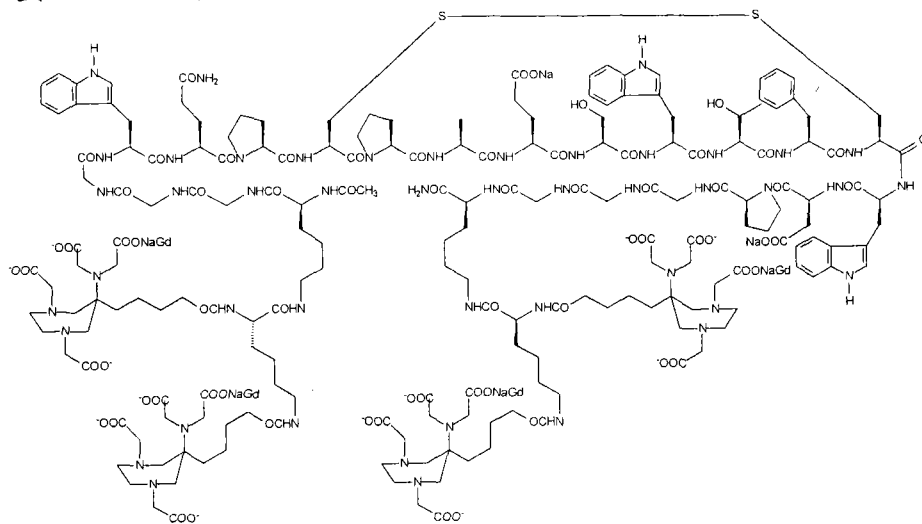
螯合络合物 1



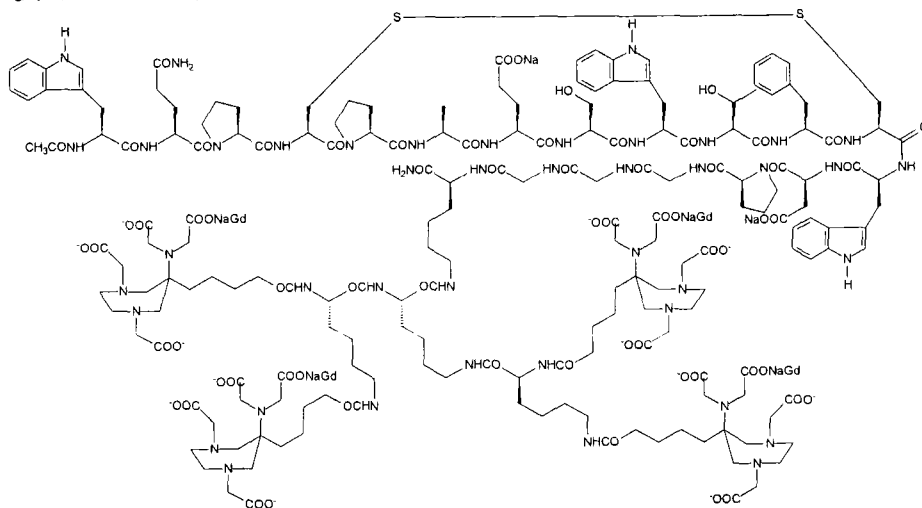
螯合络合物 2



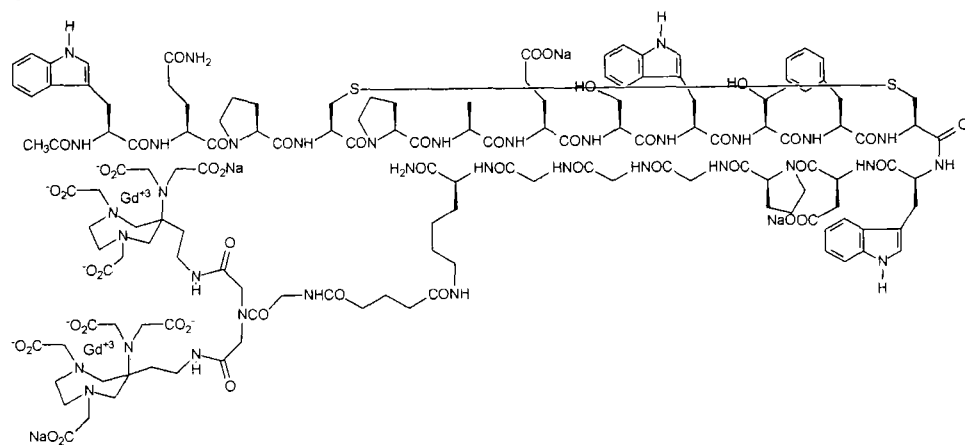
螯合络合物 3



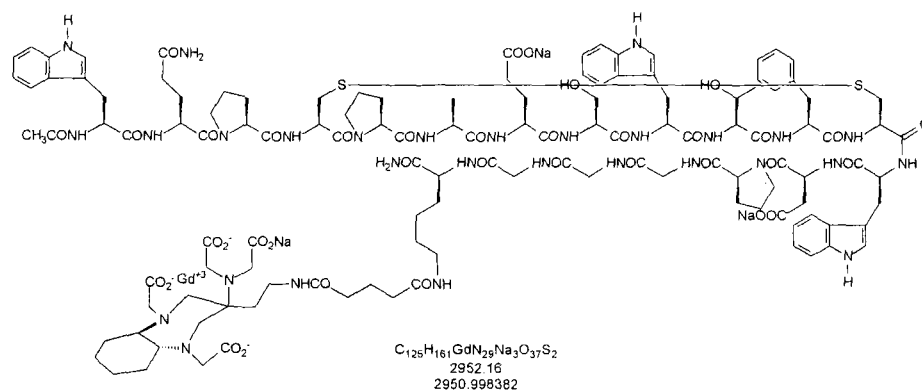
螯合络合物 4



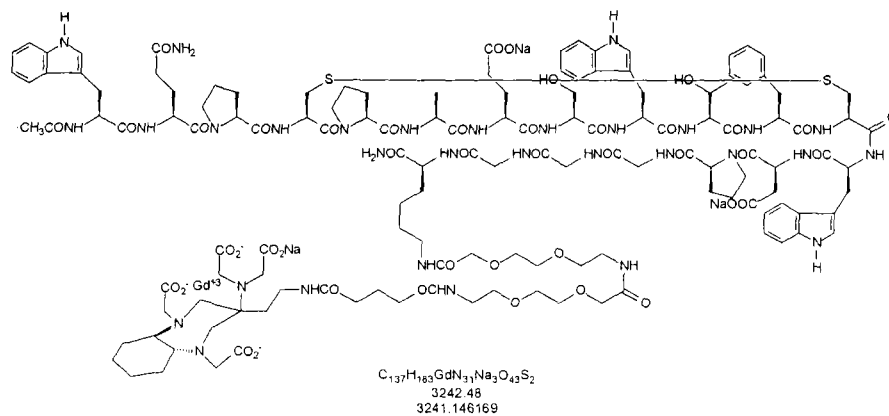
螯合络合物 5



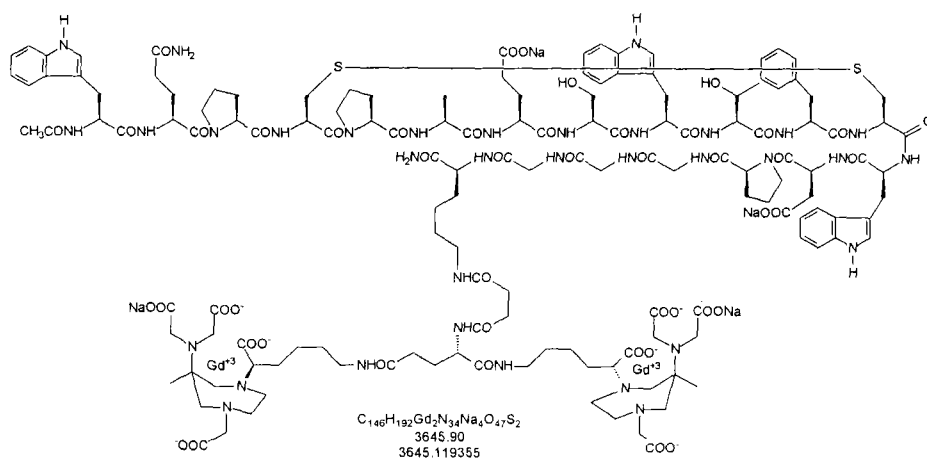
螯合络合物 6



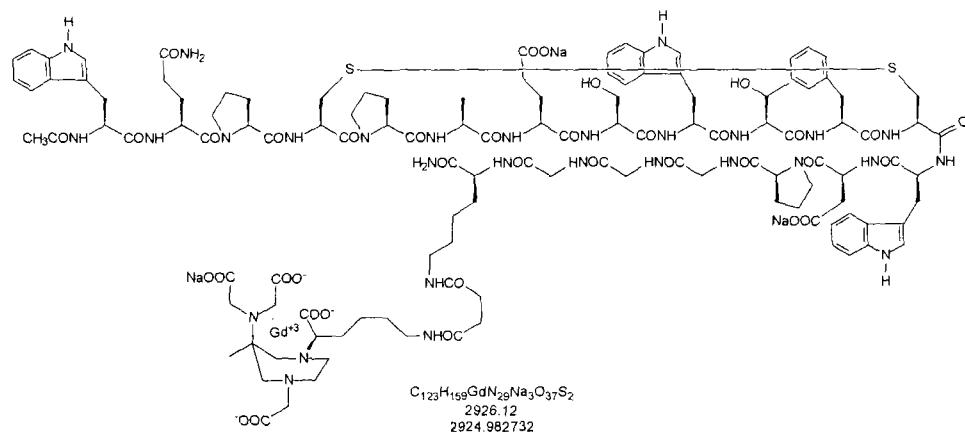
螯合络合物 7



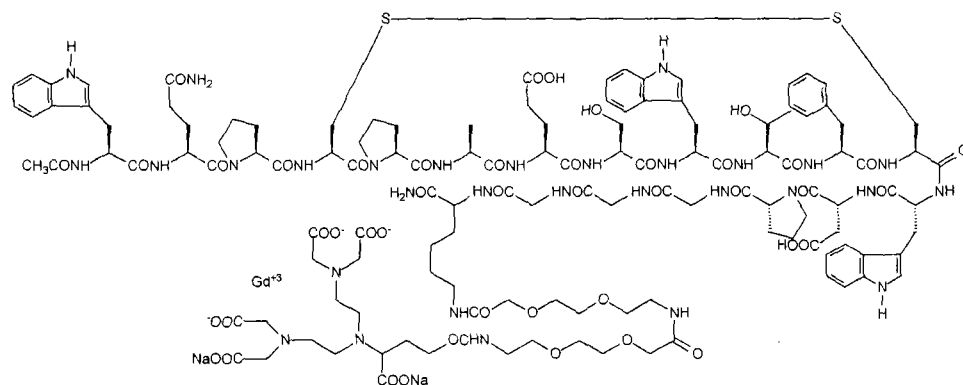
螯合络合物 8



螯合络合物 9



螯合络合物 10



核成像（放射性核素成像）以及放射性疗法

在本发明的另一个优选的实施方案中，在式(I)的化合物中，T为放射性成像可检测的部分或放射性治疗的部分。

其中 T 为放射性成像可检测部分的式(I)的化合物优选用作放射线造影剂。

因此，在另一个优选的实施方案中，本发明进一步涉及其中 T 为放射性成像可检测部分的式(I)的新型放射线造影剂。

“放射性成像可检测部分”是指可以通过诸如闪烁照相、单光子发射型计算机断层成像(SPECT)和正电子放射层扫描术(PET)之类的成像技术来检测的部分。

优选的是，所述的放射性成像可检测部分包含螯合试剂的残基，其中所述的螯合试剂由可通过闪烁照相、SPECT 或 PET 成像技术检测的放射性核素所标记。

当 T 为放射性治疗部分时,其优选地包含治疗有效的放射性核素。在优选的实施方案中,所述的放射性治疗部分可以包含由具有治疗活性的放射性核素所标记的螯合配体的残基。

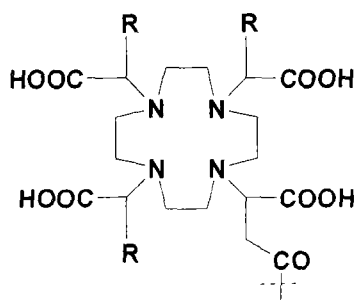
同上文所述的螯合配体一起,用于放射性核素的螯合配体的合适的实例可以选自:线性、大环的三联吡啶(terpyridine); N_3S 、 N_2S_2 或 N_4 螯合剂(此外参见例如 U.S. 5,367,080, U.S. 5,364,613, U.S. 5,021,556, U.S. 5,075,099, U.S. 5,886,142 中公开的配体);以及本领域已知的其他螯合配体,包括但不限于 HYNIC、TETA 和二氨基二巯基(BAT)螯合剂(还可参见 U.S. 5,720,934)。例如, N_4 螯合配体在美国专利号 6,143,274; 6,093,382; 5,608,110; 5,665,329; 5,656,254; 和 5,688,487 中有所描述。某些 N_3S 螯合剂在 PCT/CA94/00395, PCT/CA94/00479, PCT/CA95/00249 以及美国专利号 5,662,885; 5,976,495; 和 5,780,006 中有所描述。所述的螯合剂还可以包括螯合配体巯基-乙酰基-乙酰基-甘氨酸-甘氨酸(MAG3)的衍生物,该衍生物包含诸如 MAMA(单酰胺一元胺二硫醇), DADS(N_2S 二胺二硫醇)、CODADS 之类的 N_3S 和 N_2S_2 体系。这些配体体系以及多种其他的配体体系在 Liu and Edwards, Chem Rev., 99:2235-2268 (1999) 中以及其中所引用的文献中有所描述。

所述的螯合剂还可以包括这样的络合物,该络合物含有在四配位基阵列中不会被提供给金属的配体原子。这些络合物包括铈及镱的二氧化物的硼酸加成物,例如在美国专利号 5,183,653; 美国专利号 5,387,409; 和 5,118,797 中所描述的那些,所述的文献均以引用方式全文并入本文。

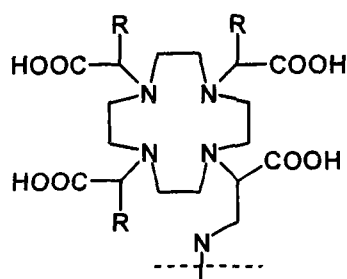
根据本发明的优选的放射性核素包括 ^{99m}Tc 、 ^{51}Cr 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{47}Sc 、 ^{167}Tm 、 ^{141}Ce 、 ^{111}In 、 ^{113}In 、 ^{168}Yb 、 ^{175}Yb 、 ^{140}La 、 ^{90}Y 、 ^{88}Y 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{165}Dy 、 ^{166}Dy 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{203}Pb 、 ^{211}Bi 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{214}Bi 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{117m}Sn 、 ^{149}Pm 、 ^{161}Tb 、 ^{177}Lu 、 ^{198}Au 、 ^{111}Ag 、 ^{199}Au 、 ^{51}Mn 、 ^{52m}Mn 、 ^{52}Fe 、 ^{60}Cu 、 ^{72}As 、 ^{94m}Tc 、 ^{110}In 、 ^{142}Pr 和 ^{159}Gd 。

合适配体残基的选择取决于用于配体标记的放射性核素。因此,

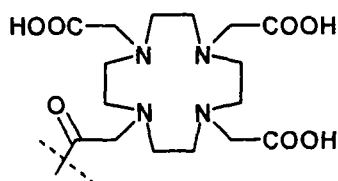
螯合配体的优选的残基包括图 6a 至 6c 中所示的那些 (用于 ^{111}In 、镧系元素和放射性镧系元素, 例如包括 ^{177}Lu 、 ^{90}Y 、 ^{153}Sm 和 ^{166}Ho , 或者用于 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 或 ^{67}Cu)、以及图 7a 至 7b 中所示的那些 (用于放射性 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{186}Re 和 ^{188}Re)。特别是, 就包括 ^{111}In 、镧系元素和放射性镧系元素的金属实体而言, 特别优选的是以下的配体残基。



(7)



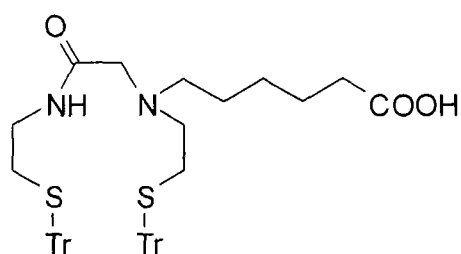
(8)



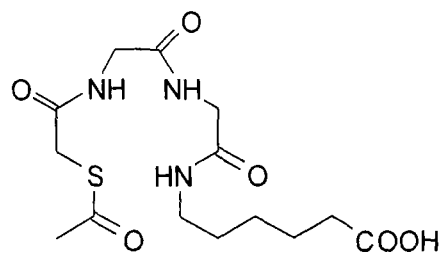
(9)

在上述式 7 和 8 中, R 为烷基, 优选为甲基。

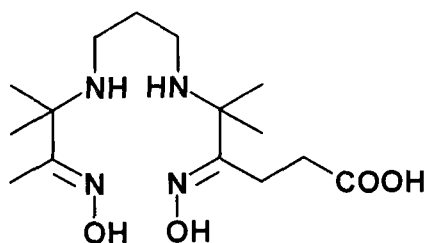
对于 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{186}Re 和 ^{188}Re 放射性核素而言, 特别优选的是以下配体:



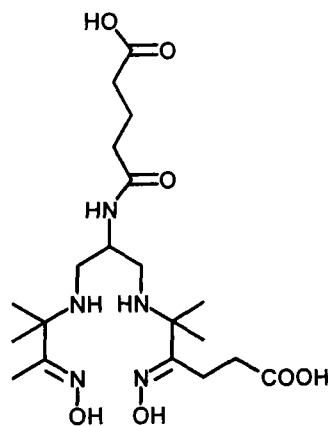
(10)



(11)

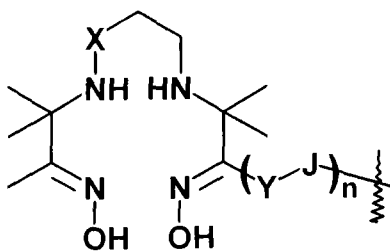


(12)

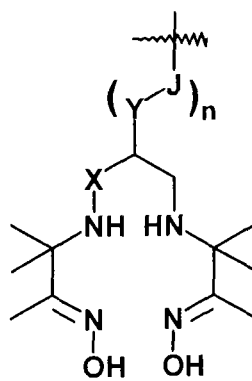


(13)

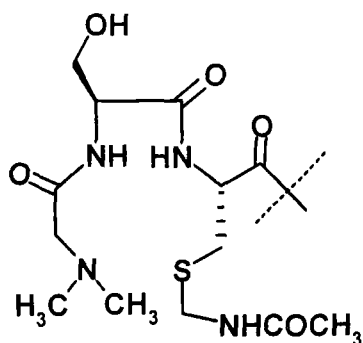
以及以下配体残基:



(14)



(15)



(16)

这些以及其他的金属整合基团在美国专利号 6,093,382 和 5,608,110, 美国专利号 6,143,274、5,627,286 和 6,093,382, 美国专利号 5,662,885、5,780,006 和 5,976,495 中有所描述, 这些文献均以引用方式全文并入本文。此外, 式 9 所示的上述整合基团在例如

美国专利号 6,143,274 中有所描述; 上述式 14 和 15 所示的螯合基团在美国专利号 5,627,286 和 6,093,382 中有所描述; 式 16 所示的螯合基团在例如美国专利号 5,662,885、5,780,006 和 5,976,495 中有所描述。

在式 14 和 15 中, X 为 CH_2 或 O, Y 为 C_1 - C_{10} 分支或不分支的烷基; Y 为芳基、芳氧基、芳基氨基、芳基氨基酰基; Y 为芳基烷基, 在这种情况下, 与芳基连接的一个或多个烷基基团为 C_1 - C_{10} 分支或不分支的烷基, C_1 - C_{10} 分支或不分支的羟基或聚羟基烷基或聚烷氧基烷基或聚羟基-聚烷氧基烷基; J 为 $>\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{OC}(=\text{O})-$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{NC}(=\text{O})-$, $-\text{NC}(=\text{S})-$, $-\text{N}(\text{Y})-$, $-\text{NC}(=\text{NCH}_3)-$, $-\text{NC}(=\text{NH})-$, $-\text{N}=\text{N}-$, 由合成或天然形成的氨基酸衍生得到的同聚酰胺或异聚酰胺; 所有的基团中, n 均为 1-100。这些结构的其他变体在例如美国专利号 6,093,382 中有所描述。上述专利、申请和参考文献的公开内容均以引用方式全文并入本文。

根据所需的治疗或诊断用途来决定所选的放射性核素。就放射性治疗或放射性诊断用途而言, 优选的放射性核素为 ^{203}Pb 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{111}In 、 ^{113}In 、 ^{90}Y 、 ^{97}Ru 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{52}Fe 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{149}Pm 、 ^{177}Lu 、 ^{142}Pr 、 ^{159}Gd 、 ^{212}Bi 、 ^{47}Sc 、 ^{149}Pm 、 ^{67}Cu 、 ^{111}Ag 、 ^{199}Au 、 ^{161}Tb 、 ^{51}Cr 、 ^{167}Tm 、 ^{141}Ce 、 ^{168}Yb 、 ^{88}Y 、 ^{165}Dy 、 ^{166}Dy 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{211}Bi 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{214}Bi 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 ^{177}Sn 和 ^{199}Au , 以及它们的氧化物和氮化物。例如, 就治疗目的(例如提供用于原发性肿瘤和转移肿瘤的放射性治疗)而言, 优选的放射性核素包括 ^{64}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{105}Rh 、 ^{111}In 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Lu 、 $^{186/188}\text{Re}$ 和 ^{199}Au , 并且 ^{177}Lu 和 ^{90}Y 是特别优选的。就诊断目的(在例如原发性肿瘤和转移肿瘤中诊断和监控治疗过程)而言, 优选的放射性核素包括 ^{64}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 和 ^{111}In 。

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ 可特别优选地用于诊断应用中, 这是因为其成本低、实用、成像性和高度的特异活性。 Tc-99m 的核和放射性使得该同位素成为理想的闪烁照相试剂。该同位素的单光子能为 140keV, 放射性半衰期为

约 6 小时, 并且可以容易地由 ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 发生器得到。

用于 PET 成像的优选的金属放射性核素为正电子发射金属离子, 例如 ^{51}Mn 、 ^{52}Fe 、 ^{60}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 或 ^{110}In 。

优选用于闪烁应用中的是式 (I) 的放射性诊断造影剂, 其中 T 为图 7a 至 7b 所示的整合配体的残基, 该残基由选自 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 和 $^{186/188}\text{Re}$ 的放射性核素所标记。更优选的是这样的物质, 其中 T 为式 22 至 33 所示的整合配体的残基。特别优选地用于闪烁应用中的是式 (I) 的造影剂, 其中 T 为式 22 至 33 所示的由 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记的配体残基。

用于放射性治疗的优选放射性核素包括 ^{64}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{105}Rh 、 ^{111}In 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{175}Yb 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 $^{186/188}\text{Re}$ 和 ^{199}Au , 其中 ^{177}Lu 和 ^{90}Y 是特别优选的。

PET 成像

在本发明的其他实施方案中, 在式 (I) 的化合物中, 当在 PET 成像中 T 被标记的时, T 为任选标记的糖部分来进行使用。

因此, 在另一个优选的方面中, 本发明涉及其中 T 为适当标记的糖部分的、式 (I) 的化合物。

在本发明优选的实施方案中, T 包括由具有放射性核素的卤素 (例如 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{77}Br 、 ^{76}Br 和 ^{18}F , 其中 ^{18}F 是特别优选的) 所标记的糖部分。

有效治疗的试剂

在本发明的另一个实施方案中, 在式 (I) 的化合物中, T 为治疗活性部分。

其中 T 为治疗活性部分的式 (I) 的化合物是新的, 并构成了本发明的另一个目标。

根据本发明的治疗活性部分的合适的实例包括: 能够使凝块溶解的溶解血栓试剂或纤维蛋白溶解试剂、选择性杀死和/或抑制例如癌细胞生长的细胞毒性试剂、和放射性治疗试剂。

在本发明的一个实施方案中, T 为上述溶解血栓试剂或纤维蛋白溶解试剂中的一个, 并且优选的是链激酶或尿激酶。其中 T 包含溶解

血栓试剂或纤维蛋白溶解试剂的式(I)的化合物可用于治疗哺乳动物(包括人)中的血栓相关疾病,特别是急性心肌梗塞。

因此,在不同的方面中,本发明涉及其中T包括溶解血栓试剂或纤维蛋白溶解试剂的、式(I)的化合物在制备用于治疗哺乳动物(包括人)中血栓相关疾病的药物配制物中的用途。

因此,在不同的方面中,本发明涉及其中T为抗肿瘤试剂的、式(I)的化合物。

所述试剂的合适的实例包括例如上文列出的抗肿瘤化合物以及毒素。

在本发明优选的实施方案中,T为包含治疗放射性核素的放射性治疗试剂。优选的是,T为用治疗活性放射性核素标记的螯合配体的残基。这些化合物优选地用作根据本发明的放射性治疗试剂。

因此,在另一个实施方案中,本发明涉及式(I)的新型放射性治疗试剂,其中T为用治疗活性放射性核素标记的螯合配体的残基。

优选用于治疗放射性核素包括 ^{64}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{105}Rh 、 ^{111}In 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{175}Yb 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 $^{186/188}\text{Re}$ 、和 ^{199}Au ,并且 ^{177}Lu 和 ^{90}Y 是特别优选的。

对用于特定放射性治疗用途的、合适的放射性核素的选择取决于多种因素,包括:

a. 物理半衰期—其应该足够长,从而可以由放射性金属和缀合体合成并纯化放射性治疗构建体,并将所述的构建体递送至注射位点,而且在注射前没有发生明显的放射性衰变。优选的是,所述的放射性核素的物理半衰期应该为约0.5至8天。

b. 放射性核素所发射的能量—作为粒子发射器(例如 α 发射器, β 发射器和Auger电子发射器)的放射性核素是特别有用的,这是因为它们会发射高能量的粒子,这些粒子在较短的距离内沉积它们的能量,从而产生高的局部损害。发射 β 粒子的放射性核素是特别优选的,这是因为由这些同位素发射的 β 粒子的能量会在5至约150个细胞直径内沉积。由这些核素制备的放射性治疗试剂能够杀死它们局部位点

相对附近的疾病细胞，但是不能传播较长的距离而损害相邻的正常组织（例如骨髓）。

c. 特异活性（即，单位质量放射性核素的放射活性）—具有高特异活性的放射性核素（例如，发生器所产生的 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu ）是特别优选的。放射性核素的特异活性可通过其产生的方法、产生所针对的特定靶物以及所讨论的同位素的性质来测定。

许多镧系元素和类镧系元素包括这样的放射性同位素，当该同位素发射 β 粒子时，其具有使得它们适用于放射性治疗试剂的核性质。一部分所述的同位素列于下表中。

表 4

同位素	半衰期(天)	最大 β -能量(MeV)	β 能量(keV)	β -粒子的大致范围(细胞直径)
$^{49}\text{-Pm}$	2.21	1.1	286	60
$^{53}\text{-Sm}$	1.93	0.69	103	30
$^{66}\text{-Dy}$	3.40	0.40	82.5	15
$^{66}\text{-Ho}$	1.12	1.8	80.6	117
$^{75}\text{-Yb}$	4.19	0.47	396	17
$^{77}\text{-Lu}$	6.71	0.50	208	20
$^{90}\text{-Y}$	2.67	2.28	-	150
$^{111}\text{-In}$	2.810	Auger 电子发射器	173, 247	< 5* μm

其中：Pm 为钷，Sm 为钐，Dy 为镝，Ho 为钬，Yb 为镱，Lu 为镥，Y 为钇，In 为铟。

作为上述镧系元素和类镧系元素的备选物，使用放射性镱同位素是本领域公知的，并且包括在本发明的范围内。

特别是，已经证明 $^{186/188}\text{Re}$ 同位素在核医药领域中特别受到关注，其在放射性药物治疗方法中具有大量的应用。

因此，在本发明优选的实施方案中，本发明涉及式(I)的新型放射性治疗试剂，其中 T 为发射致电离辐射（例如 β 粒子、 α 粒子以及 Auger 或 Coster-Kroning 电子）的、合适的螯合放射性核素的残基。

更优选的是，T 为由镧系元素或和类镧系元素放射性核素标记的

整合配体的残基，其中所述的放射性核素选自 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{175}Yb 和 ^{177}Lu 。合适的整合配体的实例可以选自图 6a 至 6c 中的那些。

因此，在特别优选的实施方案中，本发明涉及式 (I) 的新型放射性治疗试剂，其中 T 为用治疗活性核素 ^{90}Y 、 ^{111}In 或 ^{177}Lu 标记的、图 6a 至 6c 所示的整合配体的残基。

在另一个优选的方面中，本发明涉及式 (I) 的新型放射性治疗试剂，其中 T 为用 ^{186}Re 或 ^{188}Re 标记的、式 10 至 16 所示的整合配体的残基。

用治疗放射性核素标记的本发明的化合物可以用作放射性药物，或用作配对治疗试剂的治疗部分，其中所述的放射性药物在治疗诸如癌症之类的疾病中用作一线疗法，或者用作结合疗法，其中本发明的放射性治疗试剂可与辅助性化学疗法（例如与本文所述的其他治疗试剂中的一种）联合使用。

事实上，本发明的放射性治疗剂的肽部分能够将整合的放射活性同位素定位于病理学纤维蛋白沉积处，例如定位于与多发性硬化、特别是实体肿瘤有关的血栓/凝块、粥样硬化瘢痕和基于炎性的损伤处。因此，由局部定位的放射性同位素所发射的电离辐射而产生的细胞毒性的量能够使病理学组织发生细胞死亡。

盐

所述的配体以及式 (I) 的与顺磁或放射性核素整合的化合物还可以为生理学盐的形式。

如本文所用，术语“可药用的盐”是指本发明化合物的衍生物，其中所述的母体化合物通过使酸性或碱性的基团、而非内在中性的基团形成非毒性且稳定的盐的形式而被修饰，其中所述的盐不会破坏所述母体化合物的药物活性。

所述盐的合适的实例包括：碱性残基（例如胺）的矿物或有机酸盐；酸性残基（例如羧酸）的碱性或有机盐等。

可以适用于制备本发明的盐的无机碱的优选阳离子包括碱金属或

碱土金属（例如钾、钠、钙或镁）的离子。有机碱的优选阳离子包括伯胺、仲胺和叔胺等，例如乙醇胺、二乙醇胺、吗啉、葡萄糖胺、N-甲基葡萄糖胺、N,N-二甲基葡萄糖胺。

可以适用于使本发明的络合物形成盐的无机酸的优选阴离子包括卤酸离子，例如氟离子、溴离子、碘离子或其他离子（例硫酸根离子）。

有机酸的优选的阴离子包括在用于将碱性物质盐化的制药技术中所常用的那些酸，其中所述的碱性物质例如有乙酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、延胡索酸盐、马来酸盐或草酸盐。

氨基酸的优选的阳离子和阴离子包括例如：氨基乙磺酸、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸的那些，或者精氨酸和谷氨酸的那些。

光学成像

在本发明的其他优选的实施方案中，T表示光学活性成像部分。

其中T为光学活性成像部分的式(I)的化合物是新型的，并构成了本发明的另一个目的。这些化合物优选地用作光学成像造影剂。

因此，在其他实施方案中，本发明涉及具有式(I)的、用于光学成像的新型造影剂，其中T为光学活性成像部分。

光学活性成像部分的合适的实例包括本文所述的那些，例如染料分子；荧光分子，如荧光素；磷光分子；在UV光谱中进行吸收的分子；量子点；或者在近红外辐射或远红外辐射中能够进行吸收的分子。

在制作图像中待检测的光学参数可以包括例如：穿透辐射、吸收、荧光或磷光发射、光反射、吸收振幅的变化或最大、以及弹性散射。例如，对于近红外(NIR)波长为650-1000nm的光而言，生物组织是相对透明的。NIR辐射能够穿透组织至多达几厘米，从而允许了包含NIR部分的本发明的诊断试剂在体内对包含靶物的组织进行成像中的用途。

近红外的染料包括菁蓝或吲哚菁蓝衍生物，例如Cy5.5、IRDye800、吲哚菁蓝绿(ICG)、吲哚菁蓝绿衍生物（包括四磺酸取代的吲哚菁蓝绿(TS-ICG)）、以及它们的组合。

所述的纤维蛋白结合部分可以与光标记物缀合，所述的光标记物

例如有光学染料（包括有机发色团或荧光团），其具有大量的离域环体系和最大的吸收或发射范围为 400-1500 nm。所述的纤维蛋白结合部分可以备选地由生物发光分子衍生得到。光标记物最大的吸收或发射的优选范围为 600 至 1000nm，从而使由血红素产生的信号所造成的干扰最小化。优选的是，当荧光光学染料具有高的量子产率时，光吸收标记物具有大的摩尔吸收率，例如 $>10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 。光学染料的实例包括但不限于在 WO 98/18497、WO 98/18496、WO 98/18495、WO 98/18498、WO 98/53857、WO 96/17628、WO 97/18841、WO 96/23524、WO 98/47538 以及其中所引用的参考文献中所描述的那些。

例如，如上文所述，所述的光标记物可以以共价方式直接与本发明的肽部分相连，或者一个或多个光标记物通过分支的链 Y 与所述的肽部分相连。

在注射根据本发明的光学标记的诊断衍生物之后，在适于所述试剂所使用的光标记物的波长范围内，使用一种或多种光源（例如激光）对患者进行扫描。所用的光可以为单色或多色的，连续的或脉冲式的。使用被调节成单波长或多波长的光电探测器来检测透射光、散射光或反射光，从而测定受试者中含有靶物的组织（例如血管生成组织）的位置。可以在一定的时间内监控光学参数的变化，从而测定光学标记的试剂在靶物位点处的积聚情况。可以将标准的图像处理和检测装置与本发明的光学成像试剂联合使用。

在优选的实施方案中，本发明涉及其中 T 为 5-羧基荧光素的残基的、式 (I) 的新型光学成像试剂。

式 I 所示的化合物在成像和治疗与纤维蛋白有关的病理学状况（特别是肿瘤）中的用途

如上文所述，本发明的肽部分化合物能够选择性地与纤维蛋白结合，特别是与在肿瘤或基质的结缔组织的细胞外基质 (EC) 中存在的纤维蛋白结合，从而起到靶向部分的作用，所述的靶向部分能够对与纤维蛋白沉积物（特别是实体肿瘤或转移组织中的纤维蛋白沉积物）连接的活性部分进行定位。

因此，本发明的化合物在诊断、预防和治疗与纤维蛋白沉积有关的所有病理学状况（包括凝块和血栓栓塞性疾病，特别是实体肿瘤和转移过程）中具有有利的用途。此外，本发明的化合物可以有利地用于跟踪和监控肿瘤治疗的效力和肿瘤治疗的结果。

具体而言，其中 T 为根据本发明的诊断活性部分的、式 (I) 的化合物可以在定位和诊断显现与纤维蛋白沉积有关的动脉硬化症和瘢痕形成中具有有利的用途。在其他方面中，本发明的化合物可以对炎性过程（包括与多发性硬化有关的脱髓鞘过程和轴索损害）以及通常与其中纤维蛋白起到一定作用的过程有关的所有炎性状况进行诊断成像。在特别优选的方面中，其中 T 为根据本发明的诊断活性部分的、式 (I) 的化合物可以在定位和显现实体肿瘤和转移过程中的纤维蛋白内容物中具有有利的用途。

在另一个方面中，其中 T 为诊断活性部分的、式 (I) 的化合物在非侵入性组织病理学等级的实体肿瘤中具有用途。事实上，在提供有本发明化合物的肿块中源自 MRI 的纤维蛋白含量的测定值与所述实体肿瘤的组织病理学等级之间具有一定的相关性。

其中 T 为治疗活性部分的、式 (I) 的化合物可以在预防、减轻和/或治疗与纤维蛋白沉积有关的所有病理学状况（包括凝块、血栓栓塞性疾病、动脉粥样硬化瘢痕以及与纤维蛋白沉积有关的炎性损伤）中具有有利的用途。在特别优选的方面中，其中 T 为治疗活性部分的、式 (I) 的化合物在预防、减轻和/或治疗实体肿瘤及其相关的转移过程中具有有利的用途。在甚至更优选的实施方案中，其中 T 为放射性治疗部分的、式 (I) 的化合物可以有利地用于向由于存在一种或多种实体肿瘤及其相关的转移过程而有此需要的患者（特别是人）提供放射性治疗。

在另一个实施方案中，本发明涉及包含至少一种式 (I) 的化合物作为活性组分的药物组合物，该组合物包含可药用的盐，以及一种或多种可用的药物可接受的载体或赋形剂。

甚至在其他方面中，本发明涉及其中 T 为诊断活性部分的、式 (I)

的化合物在体外（离体样品）诊断得自活哺乳动物患者（优选为人类患者）的病理学系统（包括细胞、生物学流体和生物学组织）中的用途。此外，本发明涉及其中 T 为诊断活性部分的、式 (I) 的化合物在制备用于人体器官、区域或组织（其中发现纤维蛋白沉积，所述的器官、区域或组织包括肿瘤或癌组织和炎性组织）进行体内诊断成像的药物组合物中的用途。

在另一个方面中，本发明提供在体外和体内对实体肿瘤或肿瘤细胞（离体样品）进行成像的方法，该方法包括本发明的诊断成像试剂和成像技术的用途。

此外，本发明提供了在体内治疗和/或改善实体肿瘤或肿瘤细胞的方法，该方法包括施用本发明的治疗试剂。

制备

式 (I) 所示化合物的制备代表了本发明的其他目的，在所述的化合物中，T 为用顺磁金属离子或放射性核素标记的、原样形式的或生理学可接受的盐形式的螯合试剂的残基。

根据本发明的纤维蛋白结合部分及其与诊断或治疗活性部分形成的缀合体的分离、缀合和应用在以下的实施例中有进一步的说明。以下实施例中所包含的具体参数意欲说明本发明的实施情况，并且这些参数的呈现不能以任何方式限定本发明的范围。

实施例

使用以下材料来实施下述实施例：

材料：所用的 Fmoc 保护的氨基酸得自 Nova-Biochem (San Diego, CA, USA), Advanced ChemTech (Louisville, KY, USA), Chem-Impex International (Wood Dale Ill, USA), 和 Multiple Peptide Systems (San Diego, CA, USA)。DPPE、DSPE-PG4-NH₂ 和 DPPE-PG4-NH₂ 得自 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)。Fmoc-PEG3400-NHS 得自 Shearwater Polymers (Huntsville, AL)。其他试剂得自 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI) 和 VWR Scientific Products

(Bridgeport, NJ)。用于肽合成的溶剂得自 Pharmco Co. (Brookfield, CT)。

实施例 1-7 和 23 使用并参考了下述的过程 A-L。

用于肽合成的过程

过程 A: 自动化的肽固相肽合成

使用 ABI 433A 仪器 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 制备单独的肽。将 PAL-Peg-PS-树脂 (1.2 g, 0.18 mmol/g) 或 NovaSyn TGR 树脂 (1.25 g, 0.20 mmol/g) (NovaBiochem, Novato, CA) 用于所有的合成。采用 FastMoc™ 方法, 在树脂上组装所述的肽。合成后, 用 DCM (2 ×) 洗涤所述的树脂, 并干燥。

过程 B: 氨基酸的人工偶联

除非另作说明, 否则将 DMF 用作偶联溶剂。使用 HATU (0.5M 溶于 NMP 中, 3.0 当量) 和 DIEA (6.0 当量) 对溶于 DMF 中的合适的 Fmoc-氨基酸进行处理。将所得的混合物震动 ~ 2 min, 然后转移到装有所述树脂的合成容器中。然后将该容器在环境温度下震动过夜。对所述的树脂进行过滤, 从而除去过多的试剂, 然后用 DMF (4X) 进行洗涤。

过程 C: 人工除去 Fmoc 保护基团

将含有 Fmoc 保护的氨基酸的树脂用溶于 DMF (v/v, 15.0 mL/g 树脂) 中的 20% 哌啶处理 10 分钟。将所述溶液由树脂中排出。将该过程重复 1 次, 然后用 DMF (4X) 洗涤所述的树脂。

过程 D: 除去 ivDde 基团 (固相)

将含有 ivDde 保护的氨基酸的树脂用溶于 DMF (10 mL/g 树脂) 中的 10% (v/v) 胍处理 10 分钟。将所述溶液由树脂中排出。将该过程重复 1 次, 然后用 DMF (4X) 洗涤所述的树脂。

过程 E: 在溶液中除去肽的 ivDde 基团

将所述的肽 (50 mg) 溶解于 DMF (2.0 mL) 中, 并用纯的胍 (40-200 μ L) 处理 10 分钟。将所得的混合物用水稀释至体积为 10 mL, 然后将其直接施加到 C18 反相柱上, 并按照一般过程中所述的方法通过制备型 HPLC 进行纯化。

过程 F: Fmoc-Adoa (Fmoc-J) 的偶联

将 Fmoc-Adoa (2 当量) 和 HATU (2 当量) 溶解于 DMF 中, 并将 DIEA (4 当量) 加入到上述混合物中。将所述的混合物搅拌 1 分钟, 然后将活性酸转移至所述的树脂中。就标准的肽偶联而言, 试剂的浓度如上文所述。在环境温度下, 使偶联持续 12h。将所述的树脂由反应物中排出, 并用 DMF (4 ×) 洗涤。在将 2 个 Adoa 单元添加到所述树脂上的情况下, 除去第一个添加的 Fmoc-Adoa 单元的 Fmoc 基团 (过程 C), 用 DMF (4 ×) 洗涤所述的树脂, 然后偶联第二个 Adoa 部分。

过程 G: 结合树脂的肽的切割、及侧链的去保护

在环境温度下, 将试剂 B (88: 5: 5: 2 - TFA: 水: 苯酚: TIPS - v/v/wt/v) 以 15 mL/g 树脂的量加入到 ~1.0 g 的树脂中, 并将所述的容器震动 4.5 h。将所述的树脂过滤, 并用 TFA 洗涤 2 次 (5 mL/g 树脂)。将滤液合并, 并浓缩, 从而得到浆料, 将该浆料与 20 mL Et₂O/g 树脂一起研碎, 从而得到固体残余物, 将该残余物搅拌 5-15 分钟, 然后离心。倒出上清液, 并将所述的过程重复 3 次。将所得的固体在高真空下干燥, 或者用干燥的氮气流干燥。

过程 H: 二硫化物的环化作用

将与 Et₂O 一起的酶切混合物粗品研碎而得到的沉淀物转移到烧杯中, 并加入 DMSO (5-10 μL/mg 肽粗品)。通过加入 N-甲基-D-葡萄糖胺 (10-100 mM, 溶于 H₂O 中) 将所述溶液的 pH 调节至 8。将所得的混合物搅拌 48h, 然后通过制备型 HPLC 纯化。

过程 I: 肽的 5-羧基荧光素 (CF5) 衍生物的制备

向由肽在 DMF (15 μL/mg) 和 DIEA (20 当量/当量的肽) 中形成的溶液中加入溶于 DMF (20 μL/mg) 中的 5-羧基荧光素 NHS 酯 (1.3-1.5 当量)。将所得混合物搅拌 1-3h。通过质谱和分析型 HPLC 监控所述的反应。在所述反应结束时, 通过制备型 HPLC 对所述粗品进行过滤和纯化。

过程 J: Alloc-Gly-OH 的制备

将 Gly-O-t-Bu•AcOH (1 g, 5.24 mmol) 溶解于 DCM (15 mL) 中, 并滴加焦碳酸二烯丙酯 (1.1 g, 5.91 mmol, 1.13 当量)。将所得的混合

物在环境温度下搅拌 0.5h。然后加入 DIEA (3.7 g, 5 mL, 28.68 mmol, 5.47 当量)。将混合物在环境温度下搅拌过夜。除去挥发物, 并将残余物粗品溶解于 EtOAc (100 mL/g 粗品) 中, 然后将有机层用 1N HCl (2 ×) 洗涤。除去挥发物, 然后在高真空下干燥所得粗品。NMR (500 MHz, CDCl_3) 表明为纯的产物, 并与所述的结构一致。然后, 将所得的粗品溶解于 TFA/DCM (1/1, v/v, 25 mL) 溶液中, 并将所得的溶液搅拌过夜。除去挥发物, 加入 EtOAc, 从而洗去烧瓶壁上的任何残余物, 然后在旋转蒸发器上除去挥发物。重复上述过程。将所得的产物在高真空下干燥过夜。所得材料的 NMR 光谱 (CDCl_3 , 500 MHz) 与所预计的结构一致, 并发现所得的纯度足以用于人工偶联方法中。

过程 K: Aloc-Arg(Pmc)-OH 的制备

将 H-Arg(Pmc)-OH (5 g, 11.35 mmol) 溶解于由 H_2O 和二噁烷 (1/1, v/v, 125 mL) 形成的混合物中, 并加入焦碳酸二烯丙酯 (6.34 g, 34.05 mmol, 3.0 当量)。通过加入 Na_2CO_3 , 将所述混合物的 pH 调节至 >10.0。搅拌该混合物, 并保持回流过夜。通过旋转蒸发除去挥发物, 将所得的粗品溶解于 EtOAc (100 mL/g 粗品) 中, 并将得到的溶液用 1N HCl (2 ×) 洗涤。通过旋转蒸发除去挥发物, 将所得的粗品溶解于 CHCl_3 中, 然后将所得溶液加载到硅胶柱上。将该柱用 2 个柱体积的 CHCl_3 进行洗涤, 然后类似地用 5% 的溶于 CHCl_3 中的 MeOH 进行洗脱。合并含有所需化合物的级份, 并通过旋转蒸发以及在高真空下抽吸来除去挥发物, 从而得到 4.2g (70% 产率) 的 Aloc-Arg(Pmc)-OH。质子 NMR 光谱 (CDCl_3 , 500 MHz) 与所预计的结构以及所需的纯度一致

过程 L: 从肽上除去 Aloc 保护基团

将 Aloc 保护的肽以 5-20 mL/100 mg 肽的量溶解于 NMM: acetic acid: DMF (1: 2: 10) 溶液中。加入 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (1-10 当量/当量肽)。将所得的混合物搅拌 0.5-4h。采用 MS 和分析型 HPLC 来检测所述的反应。在所述的反应结束后, 将所得的反应混合物粗品用溶于 H_2O 中的 10%-25% CH_3CN 的稀释成 2 倍的体积, 然后通过制备型 HPLC 进行过滤和纯化。

分析和纯化的方法

分析型 HPLC

柱: Waters Corp. X-Terra, MS - C18; 4.6 mm i.d. x 50 mm; 5 μm 颗粒; 洗脱液 A: 水 (HPLC 级, 含有 0.1 重量% TFA); 洗脱液 B: 乙腈 (0.1 重量% TFA)。所采用的原始条件以及梯度洗脱概况在用于分析题述化合物的各个试验过程中有所描述。洗脱速率: 3 mL/min; 检测条件: 220 nm 处的 UV。

制备型 HPLC 纯化

柱: Waters Corp. X-Terra MS - C₁₈; 50 mm i.d. x 250 mm; 10 μm 颗粒; 洗脱液: 洗脱液 A: 水 (HPLC 级, 含有 0.1 重量% TFA); 洗脱液 B: 乙腈 (0.1 重量% TFA); 所采用的原始条件以及梯度洗脱概况在用于分析题述化合物的各个试验过程中有所描述。洗脱速率: 100 mL/min; 检测条件: 220 nm 处的 UV。

用于磷脂肽缀合体的制备型 HPLC 纯化

使用 Kromasil Prep C4 HPLC 柱来纯化磷脂肽缀合体

将所述的反应混合物用经过蒸馏的去离子水稀释, 并使用加入到 $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1, v/v, 0.1%TFA) 中的梯度为 50-100% 的水 (0.1 % TFA), 在 30 分钟内以 100 mL/min 的速率在反相 C4 制备型柱 (Kromasil[®] Prep C₄, 粒径 10 μm , 孔径 300 \AA , 20 x 250 mm) 上进行纯化。通过 HPLC (柱: YMC C-4, 5 μm , 300 \AA , 4.6 x 250 mm) 分析多个级份 (15 mL), 并将含有纯产物的级份集中在一起。通过旋转蒸发, 由合并的、含有产物的洗脱液中除去甲醇; 并将所得溶液用 10% 的水性乙腈稀释, 然后在进行冷冻和冻干, 从而得到所需的产物。

使用 Zorbax Prep C-3 HPLC 柱来纯化磷脂肽缀合体

将经稀释的反应混合物以 30 mL/min 的流速加载到预先用 25% 的 B (CH_3CN , 含有 0.1% TFA) 平衡的 Zorbax C-3 柱 (21.2 mm i.d. x 150 mm) 上。用相同的洗脱液以 30 mL/min 的速率洗涤所述的柱, 直到 DMF 塞 (plug) 被洗脱。然后, 在 3min 内, 将洗脱液 B 的比例由 25%B 增加至 30%B, 并在 50 分钟内逐渐增加 (ramped) 至 100%。收集多个级份

(15 mL), 将含有产物的积分集中起来, 再进行冷冻和冻干。

用于分析化合物的 HPLC 方法

用于分析肽和磷脂肽缀合体的 HPLC 体系

体系 A: 柱: Waters XTerra MS-C18 4.6 x 50 mm; 粒径: 5 微米; 洗脱液: A: 水 (0.1% TFA), B: 乙腈 (0.1% TFA); 洗脱方法: 线性梯度 5-55% B, 在 7 min 内; 流速: 3 mL/min; 检测条件: UV, $\lambda = 220$ nm。

体系 B: 柱: Waters XTerra MS-C18 4.6 x 50 mm; 粒径: 5 微米; 洗脱液: A: 水 (0.1% TFA), B: 乙腈 (0.1% TFA); 洗脱方法: 线性梯度 5-65% B, 在 7 min 内; 流速: 3 mL/min; 检测条件: UV, $\lambda = 220$ nm。

体系 C: 柱: Waters XTerra MS-C18 4.6 x 50 mm; 粒径: 5 微米; 洗脱液: A: 水 (0.1% TFA), B: 乙腈 (0.1% TFA); 洗脱方法: 线性梯度 15-65% B, 在 7 min 内; 流速: 3 mL/min; 检测条件: UV, $\lambda = 220$ nm。

体系 D: 柱: Waters XTerra MS-C18 4.6 x 50 mm; 粒径: 5 微米; 洗脱液: A: 水 (0.1% TFA), B: 乙腈 (0.1% TFA); 洗脱方法: 15% B 等度洗脱, 持续 1 min, 然后线性梯度 15-70% B, 在 6 min 内; 流速: 3 mL/min; 检测条件: UV, $\lambda = 220$ nm。

体系 E: 柱: Waters XTerra MS-C18, 4.6 mm i.d. x 50 mm; 粒径: 5 微米; 洗脱液: A: 水 (0.1% TFA), B: 乙腈 (0.1% TFA); 洗脱方法: 线性梯度 15-60% B, 在 6 min 内; 流速: 3.0 mL/min; 检测条件: UV, $\lambda = 220$ nm。

体系 F: 柱: YMC C18, 4.6 x 250 mm; 洗脱液: A: 水 (0.1%TFA), B: 乙腈 (0.1%TFA), 初始条件: 20% B, 洗脱方法: 线性梯度 20-80% B, 在 20 min 内; 流速: 1.0 mL/min; 检测条件: UV, $\lambda = 220$ nm。

体系 G: 柱: Waters XTerra MS-C18, 4.6 mm i.d. x 50 mm; 粒径: 5 微米; 洗脱液: A: 水 (0.1% TFA), B: 乙腈 (0.1% TFA); 洗脱方法: 初始条件: 10% B, 线性梯度 10-50% B, 在 8min 内; 流速: 3

mL/min; 检测条件: UV, $\lambda = 220$ nm。

体系 H: 柱: Waters XTerra MS-C18 4.6 x 50 mm; 粒径: 5 微米; 洗脱液: A: 水 (0.1% TFA), B: 乙腈 (0.1% TFA); 洗脱方法: 初始条件: 5% B, 线性梯度 5-65% B, 在 8min 内; 流速: 3 ml/min; 检测条件: UV @ 220 nm。

体系 I: 柱: Waters XTerra C-4, 4.6 x 50 mm; 洗脱液: A: 水 (0.1%TFA), B: 乙腈: 甲醇 (1:1) (0.1%TFA); 洗脱方法: 初始条件: 80% B, 线性梯度 80-100% B, 在 6min 内; 流速: 3.0 mL/min; 检测条件: UV, $\lambda = 220$ nm。

体系 J: 柱: YMC C-4, 4.6 x 250 mm; 洗脱液: A: 水 (0.1%TFA), B: 乙腈: 甲醇 (1:1) (0.1%TFA); 洗脱方法: 初始条件: 80% B, 线性梯度 80-100% B, 在 50min 内; 流速: 2.0 mL/min; 检测条件: UV, $\lambda = 220$ nm 以及 ELSD: 敏感度为 10, 温度为 51°C, 压力为 2.2 托。

体系 K: 柱: YMC C4; 250 mm x 4.6 mm i. d.; 粒径: 5.0 微米; 洗脱液: A: 水 (0.1% TFA), B: 乙腈 (0.1% TFA); 洗脱方法: 初始条件: 80% B, 线性梯度 80-90% B, 在 100min 内, 然后在 1min 内逐渐增加到 100% B, 接着在 100% B 下保持 1 min; 流速: 2.0 mL/min; 检测条件: UV, $\lambda = 220$ nm 以及 ELSD: 敏感度为 10, 温度为 51°C, 压力为 2.2 托。

体系 L: 柱: YMC C-4, 4.6 x 250 mm; 洗脱液: A: 水 (0.1% TFA), B: 乙腈/甲醇 (1:1, v/v) (0.1%TFA); 洗脱方法: 初始条件: 60% B, 线性梯度 60-100% B, 在 20 min 内; 流速: 2.0 mL/min; 检测条件: UV, $\lambda = 220$ nm 以及 ELSD: 敏感度为 10, 温度为 51°C, 压力为 2.2 托。

体系 M: 柱: YMC C-4, 4.6 x 250 mm; 洗脱液: A: 水 (0.1% TFA), B: 乙腈/甲醇 (1:1, v/v) (0.1%TFA); 洗脱方法: 初始条件: 50% B, 线性梯度 50-90% B, 在 10 分钟内; 流速: 3.0 mL/min; 检测条件: UV, $\lambda = 220$ nm 以及 ELSD: 敏感度为 10, 温度为 51°C, 压力为 2.2 托。

体系 N: 柱: Zorbax 300SB C-3, 3 mm i. d. x 150 mm; 3.5 μ m

颗粒；洗脱液 A: 水 (0.1% TFA)；洗脱液 B: 乙腈 (0.1% TFA)。初始条件: 50% B；洗脱方法: 线性梯度 50-90% B, 在 3 min 内, 在 90% B 下保持 11 min；洗脱速率: 0.5 mL/min；检测条件: UV, $\lambda = 220$ nm 以及 ELSD: 敏感度为 10, 温度为 51°C, 压力为 2.2 托。

体系 O: 柱: YMC C-4, 4.6 x 50 mm；洗脱液: A: 水 (0.1%TFA), B: 乙腈-甲醇 (1:1 v/v) (0.1%TFA)；洗脱方法: 初始条件: 75% B, 线性梯度 70-100% B, 在 10 min 内；流速: 3.0 mL/min；检测条件: UV, $\lambda = 220$ nm 以及 ELSD: 敏感度为 10, 温度为 51°C, 压力为 2.2 托。

体系 P: 柱: ES industries MacroSep C4, 4.6 x 50 mm；粒径: 5 μ ；洗脱液: A: 水 (0.1% TFA), B: 乙腈/甲醇 (1:1, v/v) (0.1% TFA)；洗脱方法: 初始条件: 25% B, 线性梯度 25-100%, 在 7 min 内；流速: 3 mL/min；检测条件: UV @ 220 nm。

使用 5-羧基荧光素标记的肽, 通过直接结合的荧光偏振 (FP) 方法对纤维蛋白结合肽进行测试

方法

1. 在含有 0.01%吐温的 HEPES 稀释缓冲剂 (HDB) 中, 制备 1mL 40nM 的 5-羧基荧光素标记的肽的溶液。

● HDB (10 mM HEPES、150 mM NaCl₂、2 mM CaCl₂)

2. 稀释所述的 40nM 的溶液, 从而得到 1ml 20nM 的测试 5-羧基荧光素标记的肽的溶液。

3. 制备高于所预计 K_D 的大约 5-10 倍的、一定浓度的 DDE 溶液。就所述的测试而言, 制备浓度为 8 μ M 的 DDE。

4. 将等量的 DDE 溶液与 40 nM 肽溶液混合。

5. 在由含 0.01%吐温 20 与 20nM 的 5-羧基荧光素标记的肽的结合缓冲剂构成的溶液中, 制备系列稀释的 DDE。

6. 在 Labsystems 384 孔微孔板中, 按照下表所示进行稀释, 并通过重复的吸出溶液和释放该溶液到孔中进行混合。

7. 在 2000RPM 下将所述的板离心 5 分钟, 从而除去孔中的气囊。

8. 在 Tecan Polarion Plate Reader 中在 485nm 处进行读取，从而得到各向异性的值。

排	靶蛋白质溶液 (μL)	20nM 肽溶液 (μL)	HDB 溶液 (μL)
A	0	8	8
B	0	8	0
C	16 μL 排 D	8	0
D	16 μL 排 E	8	0
E	16 μL 排 F	8	0
F	16 μL 排 G	8	0
G	16 μL 排 H	8	0
H	16 μL 排 I	8	0
I	16 μL 排 J	8	0
J	16 μL 排 K	8	0
K	16 μL 排 L	8	0
L	16 μL 排 M	8	0
M	16 μL 排 N	8	0
N	16 μL 排 O	8	0
O	16 μL 排 P	8	0
P	12 μL 靶蛋白质溶液+ 12 μL 40 nM 肽溶液	0	0

对受体浓缩物的各向异性（以 mP 表示一毫偏振 (millipolarization) 单位）与受体浓缩物的浓度（微摩尔/升）的对数作图。在所述曲线的中点处得到解离常数，其中所述曲线的极值为 $A_{\text{游离}}$ 和 $A_{\text{结合}}$ ，其中 $A_{\text{游离}}$ 为游离肽的各向异性，而 $A_{\text{结合}}$ 为整个结合肽的各向异性。所述的理论、操作的方法以及数学分析在例如以下文献中有所描述：Fluorescence Polarization Technical Resource Guide Technical Resource Guide 4th Edn. Invitrogen Corporation 501 Charmany Drive Madison, WI 53719 USA。具体而言，数据的数学分析及所得到的结合常数在第 8 章 (Analysis of FP Binding Data pp 8-2-8-7) 有所描述。

利用未标记的测试肽与标准的经 5-羧基荧光素标记的肽

Seq000-CF5 之间的竞争, 通过竞争性结合荧光偏振方法来测定纤维蛋白结合肽

将浓度为 10^{-5} M 的 DDE 等分到 96 孔板中。将标准的 5CF 标记的肽 Seq000-CF5 加入到含有 DDE 的孔中, 从而得到初始浓度为 10^{-6} M 的示踪物。将等分的竞争性肽加入到各孔中, 使其浓度范围为 10^{-10} M 至 10^{-3} M。将所述的肽与 DDE/Seq000-CF5 络合体温育 2h。然后, 在 Tecan Polarion Plate Reader 上, 在 485nm 处读取各向异性的值。利用测试肽的所有浓度构建竞争曲线。对于测试肽的数据的数学分析和 IC_{50} 的计算可以在 Prism Graph Pad™ Software 中利用回归程序来完成。试验过程和数据分析的理论和数学基础如下给出(例如): “Practical Use of Fluorescence Polarization In Competitive Receptor Binding Assays” - Section P of “Receptor Binding Assays” <http://www.Ncgc.Nih.Gov/Guidance/Section5.Html#Practical-Fluor-Polar>. Copyright © 2005, Eli Lilly and Company and the National Institutes Of Health Chemical Genomics Center。测试肽与 Seq000-CF5 的相对 IC_{50} 值可以用他们的 IC_{50} 除以通过将 Seq005 滴定到 Seq005-CF5/DDE 络合物中而得到的 IC_{50} 来计算得到。因此, 相对 IC_{50} 越低表明肽的结合越强。参见上述表 1 和表 2。

以下的实施例 1-3 描述了示例性肽 Seq016、Seq017 和 Seq049 的制备。

实施例 1: Ac-GWQPC*PWESWTFC*WDPGGGK-NH₂ 环状 (5→13) 肽 (Seq016) (SEQ ID NO. 7) 的制备

使用利用了 Fmoc 化学法的 ABI 肽合成仪, 按照过程 A 所述, 从 Fmoc-PAL-PEG-PS 树脂 (0.18 mmol/g, 1.38 g, 0.25 mmol), 通过 SPSS 来制备所述的肽序列, 其中所述的 Fmoc 化学法是采用 FastMoc™ 方法来原因实现的。切割以及侧链的去保护可以按照过程 G 所述来实施, 而二硫键的环化可以按照过程 H 来完成。HPLC 纯化得到了 105mg (17.8% 产率) 的纯化的环状肽。

实施例 2: Ac-SGSGJWQPC*PWESWTFC*WDPGGGK-NH₂ (环状 9→17) 肽

(Seq017) (SEQ ID NO. 9)的制备

采用过程 A、G 和 H 在 0.266mmol 级别上制备所述的肽，HPLC 纯化得到 130 mg (18.8%产率)的纯产物。

实施例 3: Ac-RWQPC*PAESWT-Cha-C*WDPGGGK-NH₂ 环状 (5→13) 肽 (Seq049) (SEQ ID NO. 69)的制备

采用过程 A、G 和 H 的方法制备所述的肽。HPLC 纯化得到 140 mg (27.5%产率)份的产物，其为蓬松的白色固体。

以下实施例 4 和图 1 描述并示例说明了用于制备 Adoa-Adoa 连接体官能化的 Seq005 的方法。

实施例 4: Ac-WQPC*PAESWTFC*WDPGGGK(JJ)-NH₂ 环状 (4→12) 肽 (Seq005-JJ) (SEQ ID NO. 136)的制备

将 ivDde 保护的肽 Ac-W(Nⁱⁿ-Boc)-Q(Trt)-P-C(Trt)-P-A-E(OtBu)-Ser(tBu)-W(Nⁱⁿ-Boc)-T(tBu)-F-C(Trt)-W(Nⁱⁿ-Boc)-D(OtBu)-P-GGGK(ivDde)-NH-TGR 组装在 130μmol 的级别 (0.65 g 树脂)上 (过程 A)。通过用溶于 DMF (6.5 mL) 中的 10%的胍对所述的树脂处理 10min (2×) 来除去 ivDde 基团 (过程 D)。然后，将树脂用 DMF (4×) 洗涤。在单独的烧瓶中，将溶于 NMP (1 mL) 中的 Fmoc-Adoa (100 mg, 0.26 mmol, 2.0 当量) 用溶于 DMF (0.5 mL) 和 DIEA (67 mg, 91 μL, 0.52 mmol, 4 当量) 中的 HATU (99 mg, 0.26 mmol, 2 当量) 处理 2min，然后将所得溶液转移到装有所述树脂的容器中，随后在环境温度下将所述的容器搅拌 12h (过程 F)。

将树脂用 DMF (4×5 mL) 洗涤，然后通过使用溶于 DMF (10 mL, 2×10 min) 中的 20%哌啶进行处理、再用 DMF 进行洗涤 (4 x 10 mL)，从而除去 Fmoc 基团 (过程 C)。接着，按照上文所述使 Fmoc-Adoa 与树脂偶联，然后除去 Fmoc 保护基团 (按照上文所述) 并洗涤所述的树脂。使用试剂 B (10 mL) 进行酶切和侧链的去保护，时间持续 4.5h (过程 G)。将树脂排出，并用 TFA (5 mL) 洗涤，然后将合并的溶液蒸发，再用乙醚研碎，从而得到线性肽的粗品，其为米白色固体。将该固体溶解于 DMSO (3 mL) 中，然后通过加入 0.1M 的水性 N-甲基葡萄糖胺将所

得溶液的 pH 调节至 8。将所得混合物搅拌 48h，在此过程中，通过分析型 HPLC 和质谱监控所述的反应(过程 H)。在反应结束时，将整个溶液用溶于 H₂O 中的 10% CH₃CN 稀释至 15mL，并通过加入水性 TFA 将 pH 调节至 2。

将所得溶液施加到制备型反相 C18 柱中，并使用溶于 H₂O (0.1% TFA) 中的、线性梯度的 10% CH₃CN (0.1% TFA) 进行纯化。收集多个级份(15 mL)，将含有产物的、纯的级份集中起来，并进行冷冻和冻干，从而得到 42 mg (13%产率) 肽，其为蓬松的白色固体，然后通过 HPLC 和质谱来表征该固体。HPLC: t_R 3.83 min; 柱: Waters XTerra MS-C18 4.6 x 50 mm; 粒径: 5 微米; 洗脱液: A: 水(0.1% TFA), B: 乙腈(0.1% TFA); 洗脱方法: 线性梯度 5-65% B, 在 7 min 内; 流速: 3 mL/min; 检测条件: UV, λ = 220 nm。质谱(API-ES): 阴离子: [M-H]: 2480.6; [M-2H]/2: 1239.9。

以下实施例 5 和 6 描述了具有 N 末端 Aloc-精氨酸的肽的制备

实施例 5: Aloc-RWQPC*PWESWTFC*WDPGGGK-NH₂ 环状(5→13) 肽 (Seq023-Aloc) (SEQ ID NO. 22) 的制备

通过自动化的 SPSS 来制备 0.54mmol(3g) 份的 W(Nⁱⁿ-Boc)-Q(Trt)-P-C(Trt)-P-W(Nⁱⁿ-Boc)-E(OtBu)-S(tBu)-W(Nⁱⁿ-Boc)-T(tBu)-F-C(Trt)-W(Nⁱⁿ-Boc)-D(OtBu)-P-GGG-K(Boc)-PAL-PEG-PS 树脂(过程 A)。采用如下所示的过程 B 的修饰方法将 Aloc-Arg(Pmc) 添加到 N 末端: 将所述的树脂加入到人工固相合成容器中, 并悬浮于 DMF (20 mL) 中, 进行简单的搅拌。在对所述容器进行干预搅拌的条件下依次加入 Aloc-Arg(Pmc)-OH (524 mg, 1.00 mmol, 1.85 当量)、HATU (380 mg, 1.0 mmol, 1.85 当量) 和 DIEA (257 mg, 347 μL, 1.98 mmol, 3.67 当量), 然后将所述容器震动过夜。按照阴性茚三酮测试所述, 完成所述的偶联反应。将树脂用 DCM (3 × 20 mL) 洗涤, 并干燥。

将试剂 B(88: 5: 5: 2 - TFA: 水: 苯酚: TIPS - v/v/wt/v) (25 mL) 加入到所述的容器中, 并在环境温度下将该容器震动 5h。将所述树脂过滤并用 TFA (2 × 5 mL) 洗涤。将合并的滤液浓缩成浆料, 将该浆

料与 Et₂O (20 mL) 一起研碎, 然后通过离心使所得的固体成团。倒出上清液, 并将上述过程重复 3 次(方法 G)。收集所得的固体, 并按照上文所述进行环化(48 h) (过程 H), 然后在反相 C18 柱上通过 HPLC 进行纯化。将含有产物的级分集中起来, 并进行冷冻和冻干, 从而得到 290 mg (21%产率) 所需的产物。

实施例 6: Aloc-RWQPC*PAESWT-Cha-C*WDPGGGK-NH₂ (Seq057-Aloc) (SEQ ID NO. 86) 的制备

通过过程 A、B、G 和 H 中的方法制备所述的肽, 从而得到 230 mg (26.7%产率) 份的产物, 该产物为蓬松的白色固体。

以下实施例 7 和图 2 描述并说明了肽的 5-羧基荧光素衍生物的制备

实施例 7: RWQPC*PAESWTFC*WDPGGGK (CF5)-NH₂ 环状 (5→13) 肽 (Seq056-CF5) (SEQ ID NO. 120) 的制备

通过过程 A、B、G 和 H 的方法来制备所述的肽 (Aloc-RWQPC*PAESWTFC*WDPGGGK-NH₂ 环状 (5→13) 肽 (Seq056-Aloc) (SEQ ID NO. 140)), 并通过 HPLC 进行纯化。根据以下的过程 I 来制备 N 末端 Aloc N^{ε20}-CF5 衍生物: 将所述的肽 (70 mg, 0.029 mmol) 溶解于无水 DMF (1 mL) 中, 并进行搅拌, 然后加入 DIEA (0.074 g, 100 μL, 0.572 mmol, 19.7 当量), 接着再加入由 CF5-NHS (20 mg, 0.042 mmol, 1.45 当量) 在无水 DMF 中形成的溶液。将所得的混合物在环境温度下搅拌 1h。将所得的反应混合物用溶于 H₂O 中的 20% CH₃CN 稀释至 2 倍的体积, 然后在 C18 反相制备型 HPLC 柱上进行纯化, 从而得到 50 mg (62.8%产率) 的 Aloc-RWQPC*PAESWTFC*WDPGGGK (CF5)-NH₂ (SEQ ID NO. 141) 环状 (5→13) 肽。

根据以下的过程 L 除去所述中间体的 Aloc 基团: 将所述的中间体溶解于 NMM: HOAc: DMF (1: 2: 10, v/v/v, 5 mL) 的溶液中, 搅拌所得的混合物, 并加入 Pd(PPh₃)₄ (21 mg, 0.018 mmol, 1.0 当量)。将如此得到的混合物在环境温度下搅拌 1h。然后, 将该反应混合物用溶于 H₂O 中的 10% CH₃CN 稀释至 2 倍的体积, 接着使用溶于 H₂O (0.1% TFA) 中

的、线性梯度的 CH_3CN (0.1% TFA) 在制备型反相 C18 柱上进行纯化。将含有产物的、纯的级份集中起来, 并进行冷冻和冻干, 从而得到 29 mg (60.4% 产率) 产物, 其为橘色固体。

以下实施例 8-16 和图 3-5 描述并示例说明了脂肽的制备, 其中所述的脂肽具体为 DSPE-PG4-肽缀合体, DPPE-PG4-肽缀合体, DPPE-PG2-肽缀合体和 DPPE-Pro9-Glut-Ttda-Dga-肽缀合体。下表 5 列出了所述脂肽的 MS 和分析数据。

表 5

	序列	HPLC 数据 (体系, t_R)	MALDI 质谱数据 (模式: 离子)
Seq005-PL1	Ac-WQPC*PAESWTFC*WDPGGGK (DSPE-PG4-Glut)-NH ₂ (SEQ ID NO. 123)	I, 5.612	阳离子: [M+H]: 5124
Seq005-PL2	Ac-WQPC*PAESWTFC*WDPGGGK (DPPE-PG4-Glut)-NH ₂ (SEQ ID NO. 124)	I, 5.361	阳离子: [M+H]: 5026
Seq024-PL1	Ac-SGSGSGSQWPC*PWESWTFC*WDPGGGK (DSPE-PG4-Glut)-NH ₂ (SEQ ID NO. 125)	J, 9.25	阳离子: 5753 [M+H], 1918 [M+3H]/3, 1439 [M+4H]/4, 1178 [M+5H]/5
Seq016-PL1	Ac-GWQPC*PWESWTFC*WDPGGGK (DSPE-PG4-Glut)-NH ₂ (SEQ ID NO. 126)	K, 11.40	阳离子: [M+H]: 5233
Seq017-PL1	Ac-SGSGJWQPC*PWESWTFC*WDPGGGK (DSPE-PG4-Glut)-NH ₂ (SEQ ID NO. 127)	K, 10.67	阳离子: [M+H]: 5565
Seq023-PL1	RWQPC*PWESWTFC*WDPGGGK (DSPE-PG4-Glut)-NH ₂ (SEQ ID NO. 128)	L, 15.42	阳离子: [M+H]: 5290
Seq049-PL1	Ac-RWQPC*PAESWT-Cha-C*WDPGGGK (DSPE-PG4-Glut)-NH ₂ (SEQ ID NO. 129)	M, 7.12	阳离子: [M+H]: 522
Seq057-PL1	RWQPC*PAESWT-Cha-C*WDPGGGK (DSPE-PG4-Glut)-NH ₂ (SEQ ID NO. 130)	N, 14.05	Pos. Ion: [M+H]: 5180
Seq005-PL3	Ac-WQPC*PAESWTFC*WDPGGGK (DPPE-Glut-PG2-JJ)-NH ₂ (SEQ ID NO. 131)	O, 5.97	阳离子: [M+H]: 6656
Seq005-PL4	Ac-WQPCPAESWTFCWDPGSAGSK (DPPE-Pro9-Glut-Ttda-Dga)-NH ₂ (SEQ ID	P, 5.68	阴离子: [2M-3H]/3:

	NO. 132)		2905.5, [M+Na-3H]/2: 2189.6, [M-2H]/2: 2178.4, [M-3H]/3: 1452.2
Seq005-PL5	Ac-WQPCPAESWTFCWDPGAGSGK (DPPE-Pro9-Glut-Ttda-Dga)-NH ₂ (SEQ ID NO. 133)	P, 5.77	阴离子: [2M-3H]/3: 2884.2, [M-2H]/2: 2163.3, [M-3H]/3: 1441.3

实施例 8: Ac-WQPC*PAESWTFC*WDPGGGK (DSPE-PG4-Glut)

-NH₂ 环状 (4→12) 肽 (Seq005-PL1) (SEQ ID NO. 123) 的制备

将由所述的肽 (Ac-WQPC*PAESWTFC*WDPGGGK-NH₂ 环状 (4→12) 肽 (Seq005) (SEQ ID NO. 1)) (150 mg, 0.069 mmol) 在 DMF (1.0 mL) 中形成的溶液加入到由 DSG (0.34 mmol, 112 mg, 5 当量) 和 DIEA (15 mg, 20 μL, 0.12 mmol, 1.67 当量) 在 DMF (1.0 mL) 中形成的、经搅拌的溶液中。将所得的混合物搅拌 0.5h, 并通过 HPLC 和 MS 监控所述反应的过程。在所述反应结束时, 真空除去挥发物, 并将所得的残余物用乙酸乙酯洗涤 (3 × 10 mL), 从而除去未反应的 DSG。将如此得到的残余物干燥, 并再次溶解于无水 DMF (1.0 mL) 中, 然后加入由 DSPE-PG4-NH₂ (134 mg, 0.048 mmol) 在 DMF (1.0 mL) 中形成的溶液, 接着再加入 DIEA (15 mg, 20 μL, 0.12 mmol, 1.67 当量)。将所得的混合物搅拌 16h。通过 HPLC 监控所述反应的过程, 其表明在 16h 时氨基聚乙二醇化的磷脂被消耗。

将所述的反应混合物用经过蒸馏的去离子水稀释, 并使用加入到 CH₃OH:CH₃CN (1:1, v/v, 0.1%TFA) 中的梯度为 50-100%的水 (0.1 % TFA)、在 5 分钟内以 100 mL/min 的流速, 然后在 50min 内逐渐增加到 100%的 B, 在反相制备型柱 (YMC Prep C₄, 粒径 10μm, 30 x 250 mm)

上进行纯化。通过 HPLC 分析多个级份 (15 mL)，并将含有纯产物的、纯的级份集中在一起。通过旋转蒸发，从合并的、含有产物的洗脱液中除去甲醇；并将所得溶液用 10% 的水性乙腈稀释，然后再进行冷冻和冻干，从而得到 108 mg (44% 产率) 所需的产物，其为蓬松的白色固体。

实施例 9: Ac-SGSGSGSGWQPC*PWESWTFC*WDPGGGK (DSPE-PG4 -Glut) -NH₂ 环状 (12→20) 肽 (Seq024-PL1) (SEQ ID NO. 125) 的制备

对由 DSG (50 mg, 0.15 mmol, 4.41 当量) 和 DIEA (20 mg, 0.15 mmol, 4.41 当量) 在无水的 DMF (2.0 mL) 中形成的溶液进行搅拌，并将所述的肽 (Ac-SGSGSGSGWQPC*PWESWTFC*WDPGGGK-NH₂ 环状 (12→20) 肽 (Seq024) (SEQ ID NO. 23)) (100 mg, 0.034 mmol) 以固体形式分批加入到上述溶液中。将所得的混合物在室温下搅拌 30 min。通过加入 EtOAc 将反应混合物的体积调节至 50 mL，并通过离心、再倒出上清液使沉淀的固体成团。重复洗涤过程 (3 ×)，从而得到所述肽的戊二酸单酰胺单-NHS 酯 (其为无色固体)，通过质谱分析 [(M-2H)/2: 1546.1, (M-3H)/3: 1030.5] 证明了所述肽的特性。

将所述肽的戊二酸单酰胺单-NHS 酯溶解于无水 DMF-DCM (2.0 mL, 8:2, v/v) 中。加入 DIEA (40 mg, 54 μL, 0.31 mmol)，并搅拌所得的混合物。加入固态的 DSPE-PG4-NH₂ (45 mg, 0.038 mmol, 0.9 当量)，并将所得的混合物在环境温度下搅拌 24 h。通过加入 CH₃OH (50%) 和 CH₃CN-水 (1:1) (50%)，将所述混合物的体积调节至 100 mL，并过滤所得的溶液，从而除去不溶的材料。

将经过滤的溶液以 30 mL/min 的流速加载到预先用 50% CH₃OH 和 CH₃CN (洗脱液 A) - 水 (洗脱液 B) (1:1) 平衡的 C4 反相柱 (YMC, Prep C₄, 10 μM, 100 Å, 30 x 250 mm) 上。用相同的洗脱液洗涤所述的柱，直到 DMF 塞由柱上洗脱为止。然后，在 1 min 内，将流动相组合物逐渐增加至 70% B，并以 1% B/min 至 100% B 的线性梯度速率连续供入洗脱液，此时用 100% B 洗脱所述的柱，直到产物完全由柱上洗脱下来为止。收

集多个级份(15 mL), 并收集含有纯度>98%的产物的那些, 然后在旋转蒸发仪上进行浓缩, 从而减少 CH₃OH 的含量。将经浓缩的溶液用溶于水中的 10% CH₃CN 稀释, 然后进行冷冻和冻干, 从而得到 65 mg (60% 产率)的产物, 其为无色固体。

实施例 10: Ac-GWQPC*PWESWTFC*WDPGGGK (DSPE-PG4-Glut)-NH₂ 环状(5→13)肽(Seq016-PL1) (SEQ ID NO. 126)的制备

将所述的肽 (Ac-GWQPC*PWESWTFC*WDPGGGK-NH₂ 环状(5→13)肽 (Seq016) (SEQ ID NO. 7)) (90 mg, 0.038 mmol)溶解于无水 DMF (0.5 mL)中, 然后将所得的溶液加入到由 DSG (65 mg, 0.2 mmol, 5.26 当量)和 DIEA (25 mg, 33.8 μL, 0.2 mmol, 5.26 当量)在无水 DMF (0.5 mL)中形成的溶液中, 并进行搅拌。将所得的混合物搅拌 2h, 然后加入 EtOAc (20 mL), 从而形成固体, 通过离心, 使该固体成团。倒出上清液, 并将所述的过程重复 2 次, 从而除去残留的 DSG。将得到的固体在真空(<0.1 mm)下干燥 30min, 然后通过搅拌溶解于 DMF (0.5 mL)中。分批加入固态 DSPE-PG4-NH₂ (53 mg, 0.19 mmol), 并将所得的混合物搅拌过夜。将所述的混合物用水(5 mL)稀释, 然后通过制备型 HPLC 纯化混合物粗品, 从而得到 60 mg (30%产率)所需的产物, 其为白色冻干物。

实施例 11: Ac-SGSGJWQPC*PWESWTFC*WDPGGGK (DSPE-PG4-Glut)-NH₂ 环状(9→17)肽(Seq017-PL1) (SEQ ID NO. 127)的制备

采用用于制备 SEQ005-PL1 的所述的过程来使用所述的肽 (Ac-SGSGJWQPC*PWESWTFC*WDPGGGK-NH₂ 环状(9→17)肽 (Seq017) (SEQ ID NO. 9)) (100 mg, 0.039 mmol)。HPLC 纯化得到 53 mg (25.7% 产率)的目的磷脂-肽缀合体。

实施例 12: RWQPC*PWESWTFC*WDPGGGK (DSPE-PG4-Glut)-NH₂ 环状(5→13)肽(Seq023-PL1) (SEQ ID NO. 128)的制备

将溶于 DMF (0.5 mL)中的 Aloc-RWQPC*PWESWTFC*WDPGGGK-NH₂ 环状(5→13)肽(Seq023-Aloc) (SEQ ID NO. 142) (100 mg, 0.04 mmol)加入到由 DSG (50 mg, 0.153 mmol, 3.825 当量)在 DMF (0.5 mL)中

形成的溶液中。将 DIEA (7.4 mg, 10 μ L, 0.057 mmol, 1.43 当量) 加入到所述的溶液中, 并在环境温度下持续搅拌 1h, 其后, 质谱表明反应结束。在高真空下除去挥发物, 从而得到半固体残余物。将 EtOAc (5 mL) 加入到所述的残余物中, 从而形成被较好定义的固体, 该固体通过离心而成团。倒出上清液, 并重复洗涤过程 (5 \times)。该过程得到了 100 mg (92 %产率) 份的白色固体, 其为中间体 N^{E19}—所述肽的戊二酸单酰胺单-NHS 酯。以完全相同的方式实施第二轮, 得到了另外的 100 mg 的白色固体。质谱分析与所述中间体的推定结构一致。所述中间体 NHS 酯的计算单一同位素分子量为 2713。由上述过程得到的白色固体的质谱分析 (API-ES 阴离子) 在 1356 [(M-2H)/2] 和 1431.6 [(M+TFA-2H)/2] 处形成了峰。

将所述肽的戊二酸单酰胺, 单-NHS 酯 (200 mg, 0.074 mmol) 溶解于 DMF (1 mL) 中, 并将 DIEA (11 mg, 15 μ L, 0.085 mmol, 1.15 当量) 加入到经搅拌的溶液中。将溶于 DMF (1 mL) 中的 DSPE-PG4-NH₂ (160 mg, 0.8 当量) 加入到所述的混合物中, 并在环境温度下持续搅拌过夜。在高真空下除去挥发物。将如此得到的残余物再次溶解于 13 mL 的 NMM/HOAc/DMF (1:2:10, v/v/v) 中。一次性地加入 Pd(PPh₃)₄ (300 mg, 3.0 当量)。将所得的混合物搅拌 1h。MS 和分析型 HPLC 表明反应完全。将所得的反应混合物粗品用溶于 H₂O 中的等体积的 20% CH₃CN 稀释, 并过滤不溶的材料。按照在 Seq005-PL1 中所述, 将所得的溶液直接施加到 C4 反相 HPLC 柱上, 并通过制备型 HPLC 进行纯化。将含有纯的产物的级份集中在一起, 并进行冷冻和冻干, 从而得到 140 mg (29%产率, 基于供入的 DSPE-PG4-NH₂) 的目的化合物, 其为蓬松的固体。

实施例 13: Ac-RWQPC*PAESWT-Cha-C*WDPGGGK (DSPE-PG4-Glut)-NH₂ 环状 (5 \rightarrow 13) 肽 (Seq049-PL1) (SEQ ID NO. 129) 的制备

按照与 Seq005-PL1 相同的方式, 使用 Ac-RWQPC*PAESWT-Cha-C*WDPGGGK-NH₂ (SEQ ID NO. 70) 环状 (5 \rightarrow 13) 肽 (94 mg, 0.04 mmol, 1.25 当量) 来制备 57 mg (34%产率) 份的目的磷脂肽缀合体。

实施例 14: RWQPC*PAESWT-Cha-C*WDPGGGK (DSPE-PG4-Glut)-NH₂ 环状 (5→13) 肽 (Seq057-PL1) (SEQ ID NO. 130) 的制备

将由 Aloc-RWQPC*PAESWT-Cha-C*WDPGGGK-NH₂ 环状 (5→13) 肽 (Seq057-Aloc) (SEQ ID NO. 143) (230 mg, 0.096 mmol) 在无水 DMF (1 mL) 中形成的溶液滴加到由 DSG (180 mg, 0.55 mmol, 5.75 当量, 相对于肽而言) 在含有 DIEA (110 mg, 0.86 mmol, 8.9 当量, 相对于肽而言) 的无水 DMF (0.5 mL) 中形成的经搅拌的溶液中。将所得的反应混合物搅拌 3h, 并通过分析型 HPLC 和质谱监控所述反应的过程。在 30℃ 下在高真空下除去溶剂, 从而得到粘性残余物。通过将 EtOAc (15 mL) 加入到所述的容器中来研碎所述的残余物, 从而形成白色固体, 该固体通过离心而成团。倒出上清液, 并以相同的方式洗涤所得的固体 (3×), 再采用干燥的氮气流进行干燥。

将由此得到的固体中间体溶解于无水 DMF (1 mL) 中, 并进行搅拌, 然后加入 DIEA (110 mg, 149 μL, 0.86 mmol, 8.9 当量, 相对于肽而言), 接着再滴加由 DSPE-PG4-NH₂ (213 mg, 0.077 mmol, 0.8 当量) 在无水 DMF (1 mL) 中形成的溶液。在环境温度下, 将所得的混合物搅拌过夜, 其后 HPLC 分析和质谱表明了脂质的消耗。

在高真空下除去挥发物, 并将所得的混合物粗品溶解于 13 mL 的 NMM: HOAc: DMF (1: 2: 10, v/v/v) 溶液中, 并进行搅拌。将 Pd(PPh₃)₄ (250 mg, 0.22 mmol, 2.25 当量, 相对于肽而言) 加入到经搅拌的溶液中, 并持续搅拌 4h。过滤固体, 然后将所得的溶液用由 25% CH₃CN 在 H₂O 中形成的溶液稀释至其体积的 2 倍。将所得的溶液以 30 mL/min 的流速加载到预先用 25% 的 B (CH₃CN, 含有 0.1% TFA) 平衡的 Zorbax C-3 柱 (21.2 mm i.d. × 150 mm) 上。用相同的洗脱液以 30 mL/min 的速率洗涤所述的柱, 直到 DMF 塞被洗脱。然后, 在 3min 内, 将洗脱液 B 的比例由 25%B 增加至 30%B, 并在 50 分钟内逐渐增加至 100%。收集多个级份 (15 mL), 将含有产物的积分集中起来, 再进行冷冻和冻干。对经分离产物所进行的 HPLC 分析表明需要进一步的纯化。重复纯化过程, 然后通过冷冻被集中起来的含有产物的、纯的级份以及进行冻干

来分离所述的产物，从而得到 23 mg (4.5%产率)的目的磷脂-肽缀合体。

以下实施例 15 描述了脂肽 DPPE-PG4-肽缀合体的制备。

实施例 15A: Ac-WQPC*PAESWTFC*WDPGGGK (DPPE-PG4-Glut)-NH₂ 环状(4→12)肽 (Seq005-PL2) (SEQ ID NO. 124)的制备

所述过程适用于制备 Seq005-PL1, 不同之处在于用 DPPE-PG4-NH₂ 替代 DSPE-PG4-NH₂。因此, 将由所述的肽 (Ac-WQPC*PAESWTFC*WDPGGGK-NH₂ 环状(4→12)肽 (Seq005) (SEQ ID NO. 1)) (66 mg, 0.03 mmol)和 DIEA (11 mg, 15 μL, 0.085 mmol, 2.84 当量)在 DMF (0.5 mL)中形成的溶液加入到由 DSG (33 mg, 0.10 mmol, 3.3 当量)在 DMF (0.5 mL)中形成的经搅拌的溶液中。将所得的混合物搅拌 1h, 并通过 HPLC 和 MS 监控所述的反应过程。在反应结束时, 真空除去挥发物, 并用乙酸乙酯洗涤残余物 (4 × 5 mL), 从而除去中间体肽的戊二酸单酰胺单-NHS 酯中未反应的 DSG。

将所得的固体干燥, 并再次溶解于无水 DMF (1.00 mL)中, 然后与由 DPPE-PG4-NH₂ (95 mg, 0.035 mmol, 1.16 当量)在 DMF (1.0 mL)中形成的溶液一起搅拌 24 小时。通过 HPLC 监控所述的反应过程, 其表明中间体肽的戊二酸单酰胺单-NHS 酯被完全消耗。将得到的溶液用水稀释, 并在 30min 内, 用梯度为 60-100 %的水 (0.1 % TFA)以及由 CH₃OH 和 CH₃CN (1:1, 0.1% TFA)构成的混合物, 通过反相 C4 制备型柱 (Kromasil[®] Prep C₄, 10 μm, 300Å, 20 x 250 mm, 流速 25 mL/min)进行纯化。以 15mL 为一部分收集多个级份, 并使用 ELSD 和 UV 检测器 (λ = 220 nm)通过 HPLC (柱: YMC C-4, 5 μm, 300Å, 4.6 x 250 mm)进行分析。收集含有产物的、纯的级份, 并在旋转蒸发仪上浓缩, 从而除去洗脱液中的甲醇, 将得到的溶液用溶于 H₂O 中的 10% CH₃CN 稀释, 再进行冷冻和冻干, 从而得到 72 mg (48%产率)所需的产物, 其为蓬松的白色固体。

实施例 15B: 与 DSPE-PG4-Glut (称为 Seq000-PL1)缀合的竞争性肽 Seq000 的制备

按照与实施例 15A 相似的过程来制备 Ac-WQPC*PWESWTFC*WDPGGGK (DPPE-PG4-Glut)-NH₂ 环状 (4→12) 肽 Seq000-PL1。因此, 将由所述的肽 (Ac-WQPC*PWESWTFC*WDPGGGK-NH₂ 环状 (4→12) 肽 (Seq000) (SEQ ID NO. 122)) (115 mg, 0.05 mmol) 和 DIEA (130 mg, 176 μL, 1.0 mmol, 20 当量) 在 DMF (2.0 mL) 中形成的溶液加入到由 DSG (100 mg, 0.30 mmol, 6 当量) 在 DMF (0.5 mL) 中形成的经搅拌的溶液中。将所得的混合物搅拌 1h, 并通过 HPLC 和 MS 监控所述的反应过程。在反应结束时, 真空除去挥发物, 并用乙酸乙酯洗涤残余物 (4 × 20 mL), 从而除去中间体肽的戊二酸单酰胺单-NHS 酯中未反应的 DSG。

将所得的固体干燥, 并再次溶解于无水 DMF (1.00 mL) 中, 然后与由 DPPE-PG4-NH₂ (160 mg, 0.0573 mmol, 1.11 当量) 在 DMF (1.0 mL) 中形成的溶液一起搅拌 24 小时。通过 HPLC 监控所述的反应过程, 其表明中间体肽的戊二酸单酰胺单-NHS 酯被完全消耗。将得到的溶液用水稀释, 并在 30min 内, 用梯度为 50-100 % 的水 (0.1 % TFA) 以及由 CH₃OH 和 CH₃CN (1:1, 0.1% TFA) 构成的混合物, 通过反相 C4 制备型柱 (Kromasil[®] Prep C₄, 10 μm, 300Å, 20 x 250 mm, 流速 25 mL/min) 进行纯化。以 15mL 为一部分收集多个级份, 并使用 ELSD 和 UV 检测器 (λ = 220 nm) 通过 HPLC (柱: YMC C-4, 5 μm, 300Å, 4.6 x 250 mm) 进行分析。收集含有产物的、纯的级份, 并在旋转蒸发仪上浓缩, 从而除去洗脱液中的甲醇, 将得到的溶液用溶于 H₂O 中的 10% CH₃CN 稀释, 再进行冷冻和冻干, 从而得到 138 mg (52% 产率) 所需的产物, 其为蓬松的白色固体。

质谱: 方法: MALDI; 模式: 阳离子; [M+Na+2H]: 5199 (平均)

HPLC: 保留时间: 5.88 min; 测定: >98% (区域%); 柱: YMC C-4, 5 μm, 300Å, 4.6 x 50 mm; 洗脱液: A: 水 (0.1% TFA), B: 乙腈: 甲醇 (1:1, v/v) (0.1% TFA); 洗脱方法: 初始条件: 80% B, 线性梯度 80-100% B, 在 10min 内; 流速: 3.0 mL/min; 检测条件: UV @ 220 nm & ELSD。

以下实施例 16A 和图 5 描述并示例说明了 DPPE-Glut-PG2-肽缀合体的制备

实施例 16A : Ac-WQPC*PAESWTFC*WDPGGGK (DPPE-Glut-PG2-JJ)-NH₂ 环状 (4→12) 肽 (Seq005-PL3) (SEQ ID NO. 131) 的制备

将所述的肽 (Ac-WQPC*PAESWTFC*WDPGGGK (JJ)-NH₂ 环状 (4→12) 肽 (Seq005-JJ) (SEQ ID NO. 136)) (63 mg, 0.025 mmol) 溶解于 DMF (1.0 mL) 中, 并加入 DIEA (9.8 mg, 13.3 μL, 0.076 mmol, 3 当量)。将所得溶液简单搅拌, 并滴加由 Fmoc-PG2-NHS (111 mg, 0.032 mmol, 1.28 当量) 在 DMF (1.0 mL) 中形成的溶液, 同时进行搅拌。将如此得到的混合物搅拌 16h, HPLC 分析表明起始肽被消耗。将反应混合物用吡啶 (172 mg, 200 μL, 2.02 mmol, 80 当量, 反应混合物中的最终浓度为 ~9% v/v) 处理 30min, 然后将该反应混合物用 H₂O 稀释, 再用反相 C4 柱 (Kromasil® Prep C₄, 10μm, 300Å, 20 x 250 mm) 通过制备型 HPLC 来进行纯化, 纯化方法如下: 洗脱方法: 采用溶于 H₂O (0.1% TFA) 中的 20% CH₃CN 的初始条件来洗脱 DMF 塞, 然后在 40min 内, 采用溶于 H₂O (0.1% TFA) 中的、线性梯度为 20%-80% 的 CH₃CN (0.1% TFA) 以 25 mL/min 的流速来洗脱产物。收集多个级份 (15 mL), 并将含有纯的产物的那些 (HPLC 分析) 集中起来, 再进行冷冻和冻干, 从而得到 70 mg (47% 产率) 的 PG2-衍生肽 (Ac-WQPC*PAESWTFC*WDPGGGK (NH₂-PG2-JJ) (SEQ ID NO. 143) -NH₂ 环状 (4→12) 肽)。

将由 Ac-WQPC*PAESWTFC*WDPGGGK (NH₂-PG2-JJ)-NH₂ (SEQ ID NO. 143) 环状 (4→12) 肽 (50 mg, 0.009 mmol, 1.14 当量) 在 DMF (1.0 mL) 中形成的溶液用 DIEA (14.8 mg, 20 μL, 0.114 mmol, 14.6 当量) 进行处理, 然后用溶于 DMF:CH₂Cl₂ (1:1) 混合物 (1.0 mL) 中的 DPPE-Glut-NHS (7 mg, 0.0078 mmol) 来进行处理, 并将得到的混合物在室温下搅拌 16hr。将所得溶液用 H₂O 稀释至 10 mL, 然后在 40min 内, 用梯度为 50-80% 的水 (0.1% TFA) / 乙腈:MeOH (1:1, 0.1% TFA) 通过反相 C4 制备型柱 (Kromasil® Prep C₄, 10μm, 300Å, 10 x 250 mm,

流速, 10 mL/min)进行纯化。将含有产物的、纯的级份集中起来, 并进行冷冻和冻干, 从而得到 26 mg (42%产率)目的化合物, 其为蓬松的白色固体。

以下实施例 16B-16C 描述并示例说明了 DPPE-Pro9-Glut-Ttda-Dga-肽缀合体的制备。以下实施例 16D 描述并示例说明了由 Seq000(Adoa-Adoa)和 DPPE 制备竞争性脂肽 Seq000-PL2。

实施例 16B : Ac-WQPCPAESWTFCWDPGSAGSK (DPPE-Pro9-Glut-Ttda-Dga)-NH₂ 环状(4→12)肽 (Seq005-PL4) (SEQ ID NO. 132) 的制备

Seq005-P2 (Ttda-Dga) 的制备

在 1.2 g 0.2mmol 级别的 Fmoc-Pal-Peg-PS 树脂 (0.17 mmol/g) 上进行肽链的延长 (过程 A), 从而得到 Ac-W(Nⁱⁿ-Boc)-Q(Trt)-P-C(Trt)-P-A-E(OtBu)-S(tBu)-W(Nⁱⁿ-Boc)-T(tBu)-F-C(Trt)-W(Nⁱⁿ-Boc)-D(OtBu)-P-GS(tBu)-A-G-S(tBu)-K(ivDde)-NH-Pal-Peg-PS 树脂。将得自两轮中的树脂合并在一起。使用 20ml 的溶于 DMF 中的 10%脍除去 ivDde 基团 (2 x 10 min)。然后, 将溶于 DMF (20 mL) 中的二甘醇酐 (0.464 g, 10 当量) 和 DIEA (0.516 g, 0.7 mL, 4.0 mmol) 加入到所述的树脂中, 并将该树脂搅拌 15h。将所得树脂用 DMF (5 x 20 mL) 洗涤, 然后用溶于 DMF (20 mL) 中的 N1-(叔丁氧基羰基)-1,3-二氨基-4,7,10-三氧杂十三烷 (0.513 g, 1.6 mmol, 4 当量)、HATU (0.608 g, 1.6 mmol, 4 当量) 和 DIEA (0.413 g, 0.558 mL, 3.2 mmol, 8 当量) 处理 15h。将所得树脂用 DMF (5 x 20 mL) 洗涤。使用试剂 B 从树脂上切下所述的肽 (过程 G), 并使固态的肽粗品经历二硫键环化作用 (过程 H)。按照题述的过程, 将所得的混合物粗品用水稀释至其体积的大约 5 倍, 然后施加到 Waters XTerra C-18 (250 mm x 50 mm i. d.) 柱上, 再采用溶于 H₂O (0.1% TFA) 中的 ACN (0.1% TFA) 进行线性梯度洗脱来进行纯化。将含有产物的、纯的级份集中起来, 并进行冷冻和冻干, 从而得到 175 mg (16.2 %产率) 所述的肽, 其为蓬松的白色固体。

从 DPPE-Pro9-H 和 Seq005-P2(Ttda-Dga) 制备 Ac-WQPCPAESWTFWCWDPGSAGSK (DPPE-Pro9-Glut-Ttda-Dga)-NH₂ 环状 (4→12) 肽 (Seq005-PL4)

将 DPPE-(Pro)₉-H, 120 mg, 0.077 mmol 加入到溶于 DMF (2 mL) 中的 DSG (100 mg, 0.306 mmol, 4.0 当量) 中, 然后加入 DIEA (0.059 g, 0.08 mL, 0.46 mmol, 6.0 当量); 将所得的混合物搅拌 4h。在高真空下除去挥发物。将所得的残余物粗品用 EtOAc 洗涤两次, 从而除去 DSG, 以及 DMF 和 DIEA 的残余示踪物。将所得的粗品再次溶解于 DMF (1 mL) 中, 并加入溶于 DMF (1 mL) 中的 Seq005-P2(Ttda-Dga) [Ac-WQPCPAESWTFWCWDPGSAGSK (Dga-Ttda)-NH₂] (SEQ ID NO. 145), (170 mg, 0.063 mmol), 然后加入 DIEA (0.088 g, 0.12 mL, 0.69 mmol, 11 当量, 相对于所加入的肽而言)。将如此得到的混合物在 40°C 下搅拌 15h。将得到的混合物用溶于水 (25 mL) 中的 35% MeOH 稀释, 并用 0.45 微米的过滤器过滤。通过制备型 HPLC 纯化所得的溶液。将包含产物的、纯的级份合并在一起, 然后进行冷冻和冻干, 从而得到所述的产物 (90 mg, 32.8% yield), 其为蓬松的固体。

实施例 16C : Ac-WQPCPAESWTFWCWDPGAGSGK (DPPE-Pro9-Glut-Ttda-Dga)-NH₂ 环状 (4→12) 肽 (Seq005-PL5) (SEQ ID NO. 133) 的制备

Seq005-P3(Ttda-Dga) 的制备

在 1.2 g 0.2mmol 级别的 Fmoc-Pal-Peg-PS 树脂 (0.17 mmol/g) 上进行肽链的延长 (过程 A), 从而得到 Ac-W(Nⁱⁿ-Boc)-Q(Trt)-P-C(Trt)-P-A-E(OtBu)-S(tBu)-W(Nⁱⁿ-Boc)-T(tBu)-F-C(Trt)-W(Nⁱⁿ-Boc)-D(OtBu)-P-G-A-G-S(t-Bu)-G-K(ivDde)-NH-Pal-Peg-PS 树脂。将得自两轮中的树脂合并在一起。使用 20ml 的溶于 DMF 中的 10% 胍除去 ivDde 基团 (2 x 10 min)。然后, 将溶于 DMF (20 mL) 中的二甘醇酐 (0.464 g, 10 当量) 和 DIEA (0.516 g, 0.7 mL, 4.0 mmol) 加入到所述的树脂中, 并将该树脂搅拌 15h。将所得树脂用 DMF (5 x 20 mL) 洗涤, 然后用溶于 DMF (15 mL) 中的 N1-(叔丁氧基羰基)-1,3-二氨基-4,7,10-三氧杂

十三烷 (0.385 g, 1.2 mmol, 3 当量)、HATU (0.456 g, 1.2 mmol, 3 当量) 和 DIEA (0.310 g, 0.419 mL, 2.4 mmol, 6 当量) 处理 15h。将所得树脂用 DMF (5 x 20 mL) 洗涤。使用试剂 B 从树脂上切下所述的肽 (过程 G), 并使固态的肽粗品经历二硫键环化作用 (过程 H)。按照题述的过程, 将所得的混合物粗品用水稀释至其体积的大约 5 倍, 然后施加到 Waters XTerra C-18 (250 mm x 50 mm i.d.) 柱上, 再采用溶于 H₂O (0.1% TFA) 中的 ACN (0.1% TFA) 进行线性梯度洗脱来进行纯化。将含有产物的、纯的级份集中起来, 并进行冷冻和冻干, 从而得到 227.7 mg (21.3 % 产率) 所述的肽, 其为蓬松的白色固体。

从 DPPE-Pro9-H 和 Seq005-P3(Ttda-Dga) 制备 Ac-WQPCPAESWTFWDPGAGSGK (DPPE-Pro9-Glut-Ttda-Dga)-NH₂ 环状 (4→12) 肽 (Seq005-PL5)

对溶解于 DMF (0.75 mL) 中的 DSG (75 mg, 0.230 mmol, 3.59 当量) 进行搅拌, 并向所得的混合物中加入溶解于 DCM (0.5 mL) 中的 DPPE-(Pro)₉-H (100 mg, 0.064 mmol)。然后加入 DIEA (0.03 g, 0.04 mL, 0.23 mmol, 3 当量), 并将所得的混合物搅拌 4h。质谱分析证明 DPPE-(Pro)₉ 的戊二酸单酰胺-单 NHS 酯形的形成。在高真空下除去挥发物, 并将残余物粗品在高真空下保持 2h。将所得的残余物粗品研碎, 在用 EtOAc 洗涤, 从而除去 DSG, 以及 DMF 和 DIEA 的残余示踪物。将所得的粗品再次溶解于 DMF (1 mL) 中, 并加入溶于 DMF (1 mL) 中的 Seq005-P3(Ttda-Dga) [Ac-WQPCPAESWTFWDPGSAGSK (Ttda-Dga)-NH₂] (SEQ ID NO. 145), (165 mg, 0.062 mmol), 然后加入 DIEA (0.088 g, 0.12 mL, 0.69 mmol, 11 当量, 相对于所加入的肽而言)。将如此得到的混合物在 40°C 下搅拌 15h, 此后 HPLC 和 MS 分析表明所需的产物已经形成。将得到的混合物用溶于水 (15 mL) 中的 35% MeOH 稀释, 并用 0.45 微米的过滤器过滤。通过制备型 HPLC 在 C2 柱上纯化所得的溶液。在使用溶于水 (洗脱液 A) 中的 25% ACN-MeOH (1:1, v/v) (洗脱液 B) 的情况下, 将得到的化合物施加到所述的柱上。在施加所述的化合物并且所述的溶剂塞被洗脱之后, 将洗脱组合物逐渐增加至 50%B, 然

后在 30min 内逐渐由 50%B 增加至 100%B。将含有产物的、纯的积分合并在一起，并通过旋转蒸发除去大部分的 MeOH。将叔丁醇加入到所述的混合物中，然后由此得到的混合物进行冷冻和冻干，从而得到所述的产物 (125 mg, 46.5% 产率)，其为蓬松的固体。

实施例 16D: 对照脂肽 Seq000-PL2 的制备

在 0.2mmol 的级别上制备侧链完全受到保护的肽序列 Ac-W(Boc)-Q(Trt)-P-C(Trt)-P-W(Boc)-E(O-t-Bu)-S(t-Bu)-W(Boc)-T($\Psi^{Me, Me}$ pro)-F-C(Trt)-W(Boc)-D(O-t-Bu)-P-GGGK(ivDde)-TGR。将 ivDde 保护基团从 400 mg 份 (公称为 0.08 mmol) 的树脂上除去 (过程 D)。将所述的树脂用 DMF (2 × 20 mL) 和 DCM (20 mL) 洗涤，然后再次悬浮于 DMF (10 mL) 中，再用 Fmoc-Adoa (154 mg, 0.4 mmol)、HOBT (54 mg, 0.4 mmol)、DIC (51 mg, 62 μ L, 0.4 mmol) 和 DIEA (139 μ L, 0.8 mmol) 处理 4h。将所述的试剂滤出，然后用 DMF (2 × 20 mL) 和 DCM (20 mL) 洗涤所述的树脂。通过用溶于 DMF (2x20 mL) 中的 20% 的哌啶进行处理，从而除去 Fmoc 基团 (经修改的过程 C)，然后再用 DMF (2 × 20 mL) 和 DCM (20 mL) 洗涤所述的树脂。重复 Fmoc-Adoa 的偶联过程和 Fmoc 的除去过程。将所述的树脂再次悬浮于 DMF (7 mL) 中，然后用 3,6,9-三氧杂十一烷-1,11-二羧酸酐溶液 [其是通过使相应的酸 (1.0 g, 0.45 mmol) 与 DIC (0.56 g, 0.45 mmol) 在二氯甲烷 (5.0 mL) 中反应 12 小时而制备得到的，过滤所得溶液，然后直接使用] 处理 16 小时。将所述的试剂滤出，然后用 DMF (2 × 20 mL) 和 DCM (2x 20 mL) 洗涤所述的树脂，将该树脂再次悬浮于 DCM (10 mL) 中，并用由二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (690 mg, 1.0 mmol)、HATU (450 mg, 1.0 mmol) 和 DIEA (400 mg) 在 DCM (5.0 mL) 中形成的溶液进行处理，再将如此得到的混合物震动 26 小时 (经修改的过程 B)。将所述的试剂滤出，然后用 DMF (2 × 20 mL) 和 DCM (2x 20 mL) 洗涤所述的树脂并进行干燥。然后，将所述的树脂用试剂 B (30 mL) 处理 4 小时 (过程 G)。将所述的树脂滤出，浓缩滤液，然后用 200mL 的无水 Et₂O 处理滤液，再通过过滤收集固态的产物粗品。该过程得到了 400mg 的产物粗品，将该产物

粗品溶解于 DMSO (4.0 mL) 中, 然后用 N-甲基-D-葡萄糖胺的水性溶液将所得溶液的 pH 调节至 7.5, 并在空气中搅拌 48h, 从而有效地形成了环状肽的二硫键。将所得的溶液用水稀释至 40mL 的体积, 然后在 15min 内, 使用梯度为 50-100 % 的水 (0.1 % TFA) / 乙腈:MeOH (1:1, 0.1%TFA) 通过反相制备型 HPLC (Kromasil® Prep C₄, 10 μ, 300Å, 20 x 250 mm, 流速 10 mL/min) 进行纯化。收集含有产物的、纯的级份, 并将它们合并在一起, 再进行冻干, 从而得到目的化合物 (28 mg, 10% 产率), 其为蓬松的白色固体。

以下实施例 17-20 描述了制备具有与磷脂 (脂肽) 缀合的纤维蛋白结合肽的靶向微气泡的过程。所述的微气泡特别适用于超声成像。

实施例 17—具有 DSPC/DPPG 包膜的靶向微气泡的制备

实施例 17A—使用对照脂肽 Seq000-PL1

在水浴条件下, 在 60 °C 下, 将 383 mg 的混合物 DSPC/DPPG/Seq000-PL1 (摩尔比为 47.5/47.5/5, 三种成分分别相应为 157.5, 148.5 和 77.3 mg) 和 22.6 g 的 PEG-4000 溶解于 120g 的叔丁醇中。将所述的溶液装到小瓶中, 每个小瓶都装有 0.8mL 的溶液。将样品在 -45 °C 下冷冻并冻干。其顶部的空气被 C₄F₁₀/氮气 (50/50) 的混合物所代替, 盖上小瓶并压折 (crimped)。每个瓶中, 冻干的样品都与 5mL 的 H₂O 重新构建。

实施例 17B—使用 Seq005-PL1

重复实施例 17A, 但是用相同的相对摩尔量的 Seq005-PL1 替代 Seq000-PL1。

实施例 18—具有 DPPE/DPPG 包膜的靶向微气泡的制备

实施例 18A—使用对照脂肽 Seq000-PL1

在 60 °C 下, 在 500 μL 的蒸馏水中制备 DSPE-PEG1000 (0.5 mg-0.28 μmole) 和 Seq000-PL1 (3.3 mg-0.63 μmole) 的水性悬浮液, 从而得到胶团悬浮液。

在 70 °C 下, 在 20 分钟内, 将 DPPE (15.8 mg-22.8 μmoles) 和 DPPG (4.2 mg-5.7 μmoles) 分别分散在由 PEG4000 10% 在蒸馏水中形成的溶

液(20mL)中。然后将分散液冷却至室温。使用高速匀浆器(Polytron PT3000, 探针直径为3 cm), 在10000rpm下, 在1分钟内, 将全氟庚烷(1.6 mL)加入到所述的水相中, 从而得到乳液。

将所述的胶团悬浮液与所述的乳液混合, 然后将所得的混合物在80℃下在搅拌条件下加热1小时。在室温下冷却(1小时)后, 将所述的混合物通过离心(200g/10min - Sigma centrifuge 3K10)洗涤1次, 从而除去过量的磷脂。回收分离的上清液(含有乳化的微滴状的溶剂)并用初始体积的10% PEG 4000水性溶液再次悬浮。

将所得的悬浮液上样到DIN8R小瓶(1 mL /小瓶)中。然后, 将小瓶在-50℃下冷却(Christ Epsilon 2-12DS Freeze Dryer), 接着在-25℃和0.2毫巴下冷冻干燥12小时, 最终的干燥步骤为在30℃和0.1毫巴下进行7小时。

然后, 将冻干的产物暴露于含有C₄F₁₀/氮气(50/50, 体积比)的气氛中, 并将所述的小瓶密封。

通过温和的手动震动, 将所述的冻干的产物分散于2倍初始体积的水中。

实施例18B—使用Seq017-PL1

重复实施例18A, 不同之处在于用相同的相对摩尔量的Seq017-PL1替代Seq000-PL1。

实施例18C—使用Seq005-PL1

重复实施例18A, 不同之处在于用相同的相对摩尔量的Seq005-PL1替代Seq000-PL1。

实施例19—具有DSPC/DSPG包膜的靶向微气泡的制备

实施例19A—使用对照脂肽Seq000-PL1来形成DSPC/DSPG

在60℃下, 在500μL的蒸馏水中制备DSPE-PEG1000(0.5 mg-0.28 μmole)和Seq000-PL1(3.3 mg-0.63 μmole)的水性悬浮液, 从而得到胶团悬浮液。

在80℃下, 将DSPC(18mg-22.75 μmoles)和DSPG(2 mg-2.53 μmoles)分别溶解于环辛烷(1.6 mL)中。使用高速匀浆器(Polytron

PT3000, 探针直径为 3 cm), 在 9000rpm 下, 在 1 分钟内, 将所述的有机相加入到在水中形成的 PEG4000 10%溶液 (20 mL) 中, 从而得到乳液。

将所述的胶团悬浮液与所述的乳液混合, 然后将所得的混合物在 80°C 下在搅拌条件下加热 1 小时。在室温下冷却 (1 小时) 后, 将所述的乳液通过离心 (1500g/10min - Sigma centrifuge 3K10) 洗涤 1 次, 从而除去过量的磷脂。回收分离的上清液 (含有乳化的微滴状的溶剂) 并再次悬浮于 2 倍初始体积的 10% PEG 4000 水性溶液中。

将所得的悬浮液上样到 DIN8R 小瓶 (1 mL /小瓶) 中。然后, 将小瓶在 -50°C 下冷却 (Christ Epsilon 2-12DS Freeze Dryer), 接着在 -25°C 和 0.2 毫巴下冷冻干燥 12 小时, 最终的干燥步骤为在 30°C 和 0.1 毫巴下进行 7 小时。

将冻干的产物暴露于含有 C₄F₁₀/氮气 (35/65, 体积比) 的气氛中, 并将所述的小瓶密封。

然后, 通过温和的手动震动, 将所述的冻干的产物分散于 2 倍初始体积的水中。

实施例 19B—使用对照肽 Seq000-PL1 形成 DSPC/DSPG

重复实施例 19A, 但是不同之处在于使用 2.6mg 的 DSPE-PEG1000 (1.44 μ moles) 和 1.9mg 的 Seq000-PL1 (0.36 μ mole) 来制备胶团悬浮液。

实施例 19C—使用 Seq024-PL1 形成 DSPC/DSPG

重复实施例 19A, 但是不同之处在于使用 2.6mg 的 Seq024-PL1 (0.45 μ moles) 和 0.8mg 的 DSPE-PEG1000 (0.45 μ moles) 来制备胶团悬浮液。

实施例 19D—使用 Seq023-PL1 形成 DSPC/DSPG

重复实施例 19A, 但是不同之处在于使用 2.4mg 的 Seq023-PL1 (0.45 μ moles) 和 0.8mg 的 DSPE-PEG1000 (0.45 μ moles) 来制备胶团悬浮液。

实施例 19E—使用 Seq016-PL1 形成 DSPC/DSPG

重复实施例 19A, 但是不同之处在于使用 2.3mg 的 Seq016-PL1 (0.45 μmoles) 和 0.8mg 的 DSPE-PEG1000 (0.45 μmoles) 来制备胶团悬浮液。

实施例 20A-20D—具有 DSPC/硬脂酸酯包膜的靶向微气泡的制备
实施例 20A—使用对照脂肽 Seq000-PL1

在 60°C 下, 在 500 μL 的蒸馏水中制备 DSPE-PEG1000 (0.5 mg-0.28 μmoles) 和 Seq000-PL1 12 (3.3 mg-0.63 μmoles) 的水性悬浮液, 从而得到胶团悬浮液。

在 70°C 下, 在 20 分钟内, 将 DSPC (18.2 mg-23.1 μmoles) 和硬脂酸酯 (1.8 mg-5.8 μmoles) 分别分散在由 PEG4000 10% 在蒸馏水中形成的溶液 (20mL) 中。将所述的分散液冷却至室温。使用高速匀浆器 (Polytron PT3000, 探针直径为 3 cm), 在 11000rpm 下, 在 1 分钟内, 将全氟庚烷 (1.6mL) 加入到水相中, 从而得到乳液。

将所述的胶团溶液与所述的乳液混合, 然后将所得的混合物在 60°C 下在搅拌条件下加热 4 小时。在室温下冷却 (1 小时) 后, 将所得到的乳液通过离心 (200g/10min - Sigma centrifuge 3K10) 洗涤 1 次, 从而除去过量的磷脂。回收分离的上清液 (含有乳化的微滴状的溶剂) 并用初始体积的 10% PEG 4000 水性溶液再次悬浮。

将所得的悬浮液上样到 DIN8R 小瓶 (1 mL /小瓶) 中。然后, 将小瓶在 -50°C 下冷却 (Christ Epsilon 2-12DS Freeze Dryer), 接着在 -25°C 和 0.2 毫巴下冷冻干燥 12 小时, 最终的干燥步骤为在 30°C 和 0.1 毫巴下进行 7 小时。

然后, 将冻干的产物暴露于含有 C_4F_{10} /氮气 (35/65, 体积比) 的气氛中, 并将所述的小瓶密封。

通过温和的手动震动, 将所述的冻干的产物分散于 2 倍初始体积的水中。

实施例 20B—使用 Seq017-PL1

重复实施例 20A, 不同之处在于用相同的相对摩尔量的 Seq017-PL1 替代 Seq000-PL1。

实施例 20C—使用 Seq005-PL1

重复实施例 20A，不同之处在于用相同的相对摩尔量的 Seq005-PL1 替代 Seq000-PL1。

实施例 20D—使用 Seq016-PL1

重复实施例 20A，不同之处在于用 5.8 μmoles 的硬脂酸酯替代 DSPG。

实施例 20E-20H—具有 DSPC/DSPA 包膜的靶向微气泡的制备

实施例 20E—使用 Seq005-PL4

在 80°C 下将 DSPC (16.3 mg-20.58 μmoles)、DSPA (3.7 mg-5.15 μmoles) 和 Seq005-PL4 (0.26 μmoles , 按照上文所述制备) 溶解于环辛烷 (1.6 mL) 中。

使用高速匀浆器 (Polytron PT3000, 探针直径为 3 cm), 在 8000rpm 下, 在 1 分钟内, 将所述的有机悬浮液在 PEG4000 10% 的水相 (20 mL) 中乳化, 从而得到乳液。

将所得的乳液在 80°C 下在搅拌条件下加热 1 小时。在室温下冷却 (1 小时) 后, 将所述的乳液通过离心 (1500g/10min - Sigma centrifuge 3K10) 洗涤 1 次, 从而除去过量的磷脂, 然后回收分离的上清液 (微滴) 并再次悬浮于 2 倍初始体积的 10% PEG 4000 水性溶液中。

将所述的乳液上样到 DIN8R 小瓶 (1 mL /小瓶) 中, 然后, 根据以下顺序进行冻干 (试验室冷冻干燥机 Lyobeta-35 TELSTAR)。

冷冻: 在 -50°C 下, 2h。

主要干燥: 在 -25°C 和 0.2 毫巴下, 12h。

最终干燥: 在 30°C 和 0.1 毫巴下, 6h。

在进行再次分散以前, 将冻干物暴露于含有 C₄F₁₀/空气 (50/50, 体积比) 的气氛中。然后, 通过温和的手动震动, 将所述的冻干的产物分散于 2 倍初始体积的水中。

实施例 20F—使用 Seq005-PL4

在 80°C 下将 DSPC (16.3 mg-20.58 μmoles)、DSPA (3.7 mg-5.15 μmoles) 和 Seq005-PL4 (0.795 μmoles , 按照上文所述制备) 溶解于

环辛烷(1.6 mL)中。

使用高速匀浆器(Polytron PT3000, 探针直径为 3 cm), 在 8000rpm 下, 在 1 分钟内, 将所述的有机悬浮液在 PEG4000 10%的水相(20 mL)中乳化, 从而得到乳液。

将所得的乳液在 80℃下在搅拌条件下加热 1 小时。在室温下冷却(1 小时)后, 将所述的乳液通过离心(1500g/10min - Sigma centrifuge 3K10)洗涤 1 次, 从而除去过量的磷脂, 然后回收分离的上清液(微滴)并再次悬浮于 2 倍初始体积的 10% PEG 4000 水性溶液中。

将所述的乳液上样到 DIN8R 小瓶(1 mL /小瓶)中, 然后, 根据以下顺序进行冻干(试验室冷冻干燥机 Lyobeta-35 TELSTAR)。

冷冻: 在-50℃下, 2h。

主要干燥: 在-25℃和 0.2 毫巴下, 12h。

最终干燥: 在 30℃和 0.1 毫巴下, 6h。

在进行再次分散以前, 将冻干物暴露于含有 C₄F₁₀/空气(50/50, 体积比)的气氛中。然后, 通过温和的手动震动, 将所述的冻干的产物分散于 2 倍初始体积的水中。

实施例 20G—使用 Seq005-PL5

在 80℃下将 DSPC (16.3 mg-20.58 μmoles)、DSPA (3.7 mg-5.15 μmoles)和 Seq005-PL5(0.26 μmoles, 按照上文所述制备)溶解于环辛烷(1.6 mL)中。

使用高速匀浆器(Polytron PT3000, 探针直径为 3 cm), 在 8000rpm 下, 在 1 分钟内, 将所述的有机悬浮液在 PEG4000 10%的水相(20 mL)中乳化, 从而得到乳液。

将所得的乳液在 80℃下在搅拌条件下加热 1 小时。在室温下冷却(1 小时)后, 将所述的乳液通过离心(1500g/10min - Sigma centrifuge 3K10)洗涤 1 次, 从而除去过量的磷脂, 然后回收分离的上清液(微滴)并再次悬浮于 2 倍初始体积的 10% PEG 4000 水性溶液中。

将所述的乳液上样到 DIN8R 小瓶(1 mL /小瓶)中, 然后, 根据以下顺序进行冻干(试验室冷冻干燥机 Lyobeta-35 TELSTAR)。

冷冻：在 -50°C 下，2h。

主要干燥：在 -25°C 和 0.2 毫巴下，12h。

最终干燥：在 30°C 和 0.1 毫巴下，6h。

在进行再次分散以前，将冻干物暴露于含有 C_4F_{10} /空气 (50/50, 体积比) 的气氛中。然后，通过温和的手动震动，将所述的冻干的产物分散于 2 倍初始体积的水中。

实施例 20H—使用 Seq000-PL2

在 80°C 下将 DSPC (16.3 mg-20.58 μmoles)、DSPA (3.7 mg-5.15 μmoles) 和 Seq000-PL2 (0.26 μmoles , 按照上文所述制备) 溶解于环辛烷 (1.6 mL) 中。

使用高速匀浆器 (Polytron PT3000, 探针直径为 3 cm), 在 8000rpm 下, 在 1 分钟内, 将所述的有机悬浮液在 PEG4000 10% 的水相 (20 mL) 中乳化, 从而得到乳液。

将所得的乳液在 80°C 下在搅拌条件下加热 1 小时。在室温下冷却 (1 小时) 后, 将所述的乳液通过离心 (1500g/10min - Sigma centrifuge 3K10) 洗涤 1 次, 从而除去过量的磷脂, 然后回收分离的上清液 (微滴) 并再次悬浮于 2 倍初始体积的 10% PEG 4000 水性溶液中。

将所述的乳液上样到 DIN8R 小瓶 (1 mL / 小瓶) 中, 然后, 根据以下顺序进行冻干 (试验室冷冻干燥机 Lyobeta-35 TELSTAR)。

冷冻：在 -50°C 下，2h。

主要干燥：在 -25°C 和 0.2 毫巴下，12h。

最终干燥：在 30°C 和 0.1 毫巴下，6h。

在进行再次分散以前，将冻干物暴露于含有 C_4F_{10} /空气 (50/50, 体积比) 的气氛中。然后，通过温和的手动震动，将所述的冻干的产物分散于 2 倍初始体积的水中。

实施例 21—靶向微泡与纤维蛋白结合肽的动态结合测试

纤维蛋白涂敷的盖玻片的制备

根据以下方法用纤维蛋白涂敷玻璃盖玻片 (直径为 40 mm, Bioprotechs Inc., Butler, PA, USA)。

将 5mL 的由 BSA 1% w/v 在 PBS pH 7.4 中形成的溶液加入到装有一个盖玻片的 60mm 的培养皿中, 并在 37°C 下温育 15min。然后将所述的盖玻片用 5ml 的吐温 80/PBS (0.1%, v:v) 洗涤 3 次。每 1mL 的人纤维蛋白原溶液 (0.5 mg/mL, 溶于 50 mM 磷酸钠和 NaCl 280 mM 中, pH 7.4) 中加入 25 μ L 的浓度为 5 U/mL 的人凝血酶溶液, 然后进行温和地混合。然后, 将 5mL 的所得溶液立即分配到每个培养皿中。将所述的盖玻片在 37°C 下温育 1 小时, 然后在 45°C 下干燥过夜。

结合测定

使用平行平板流动腔 (FCS2, Biotech Inc., Butler, PA, USA) 来进行靶向微泡的结合研究, 其中所述的平行平板流动腔具有厚度为 0.25mm 的腔体衬垫, 以及用于将上下腔体倒置的自定义适配器。将经涂敷的盖玻片作为所述流动腔的平板插入。使用具有 60ml 注射器 (Terumo) 的可调节输液泵 (Auto Syringe[®] AS50 Infusion Pump, Baxter, Deerfield, IL, USA) 将填充有气体的微囊 (5×10^6 泡/mL, 溶于 50% 的人血浆 (溶解于 PBS) 中) 拉过所述的流动腔。将泵流动速率调节至 1 mL/min, 从而得到约 114 s^{-1} 的所需剪切速率。10 分钟后, 停止流动, 并使用 40 x 物镜和与倒置 Olympus IX 50 显微镜相连的 CCD 单色照相机 (F-View II, Soft Imaging Systems, Germany), 在所述的盖玻片上 (在大约 0.025 mm^2 的表面上), 在不同的位置处随机拍摄照片。测定各照片上微泡的数量, 并将照片上微泡的总数求平均值, 然后将得到的值除以 10 (从而得到“斜率”, 即, 每分钟结合微泡的平均数量)。

就实施例 17-20 的各个制备过程而言, 将所述的结合测定重复 4 次, 从而得到所述斜率的平均值。所述的斜率代表了在目的底物上微泡的结合速率。例如, 斜率值为 8 表示在 10 分钟内, 平均有八十 (80) 个微泡与经涂敷的盖玻片结合。斜率越高, 表示在流动条件下微泡与靶标结合的能力越好。

在下表 5-10 中, 示出了根据实施例 17-20 制备的微泡的结合活性。如这些表所示, 相对于对照肽 Seq000 (具体而言, 相对于脂肽

Seq000-PL1 和 Seq000-PL2) 而言,根据本发明的肽(特别是他们各自的脂肽)显示出优异的活性。

表 6

纤维蛋白结合脂肽	实施例制备的微泡	斜率
Seq000-PL1	17A	6.44
Seq005-PL1	17B	8.54

表 7

纤维蛋白结合脂肽	实施例制备的微泡	斜率
Seq000-PL1	18A	4.8
Seq017-PL1	18B	8.9
Seq005-PL1	18C	7.2

表 8

纤维蛋白结合脂肽	实施例制备的微泡	斜率
Seq000-PL1	19A	4.4
Seq000-PL1	19B	4.9
Seq024-PL1	19C	6.2
Seq023-PL1	19D	8.5
Seq016-PL1	19E	11.5

表 9

纤维蛋白结合脂肽	实施例制备的微泡	斜率
Seq000-PL1	20A	1.6
Seq017-PL1	20B	3.1
Seq005-PL1	20C	6.1
Seq016-PL1	20D	8.4

表 10

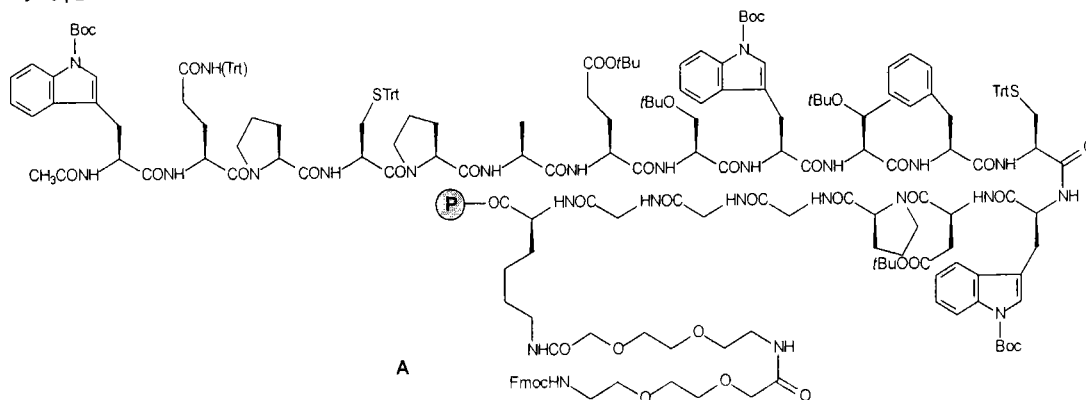
纤维蛋白结合脂肽	实施例制备的微泡	斜率
Seq005-PL4	20E	6.4
Seq005-PL4	20F	8.0
Seq005-PL5	290G	6.0
Seq000-PL2	20H	4.6

实施例 22

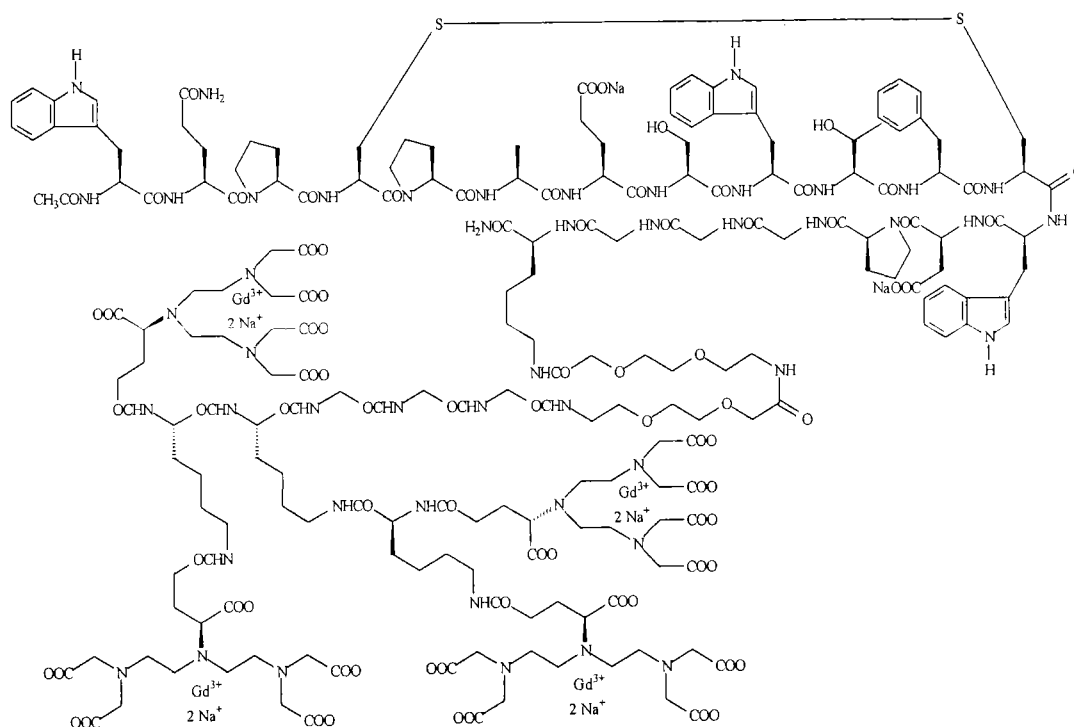
整合络合体 1 的制备

用于制备整合络合物 1 的合成方法在方案 5 中列出。

方案 5



- | | | |
|--|---|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1) DMAC 中 50% 的吗啉 2) Fmoc-GGG-OH, DIC, HOBT, DMAC 3) DMAC 中 50% 的吗啉 4) Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, DIC, HOBT, DMAC 5) DMAC 中 50% 的吗啉 6) Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, DIC, HOBT, DMAC | ↓ | <ol style="list-style-type: none"> 7) DMAC 中 50% 的吗啉 8) DTPA-Glu, DIC, HOBT, DMAC 9) 试剂 B, Et₂O 10) 空气氧化, 纯化 (制备型 HPLC) 11) GdCl₃, NaOH, pH=7 12) 脱盐 |
|--|---|--|



整合络合物 1

将如图 1 所示方案制备的、Fmoc-PAL-PEG-PS 树脂支承的中间体 A (5.00 g; 0.90 mmol) 在装有溶于 DMAC (40 mL) 的 50% 吗啉的 SPPS 容器中震动 1h, 从而使所述的树脂膨胀。在滤出溶剂后, 将

Fmoc-GGG-OH (1.48 g; 3.60 mmol)、HOBt (0.55 g; 3.60 mmol)、DIC (0.56 mL; 3.60 mmol)和DMAC (40 mL)加入到所述的树脂中,将得到的悬浮液在室温下震动 6h,然后过滤所得的混合物,再用 DMAC (5x40 mL)洗涤所述的树脂。然后,将所得的树脂与溶于 DMAC (7 mL)中的 50%的吗啉一起震动 10min,过滤得到的混合物,然后加入溶于 DMAC (7 mL)中的、新鲜 50%的吗啉。将所得的悬浮液搅拌 20min,然后过滤得到的混合物,再用 DMAC (5x40 mL)洗涤所述的树脂。将 Fmoc-Lys(Fmoc)-OH(2.13 g; 3.60 mmol)、HOBt (0.55 g; 3.60 mmol)、DIC (0.56 mL; 3.60 mmol)和 DMAC (40 mL)加入到所述的树脂中,然后将所得的悬浮液在室温下震动 6h,再进行过滤,并用 DMAC (5x40 mL)对所述的树脂进行洗涤。然后,将所得的树脂与溶于 DMAC (7 mL)中的 50%的吗啉一起震动 10min,过滤得到的混合物,然后加入溶于 DMAC (7 mL)中的、新鲜 50%的吗啉。将所得的悬浮液搅拌 20min,然后过滤得到的混合物,再用 DMAC (5x40 mL)洗涤所述的树脂。将 Fmoc-Lys(Fmoc)-OH(4.26 g; 7.20 mmol)、HOBt (1.10 g; 7.20 mmol)、DIC(1.12 mL; 7.20 mmol)和 DMAC (40 mL)加入到所述的树脂中,然后将所得的悬浮液在室温下震动 6h,再进行过滤,并用 DMAC (5x40 mL)对所述的树脂进行洗涤。然后,将所得的树脂与溶于 DMAC (7 mL)中的 50%的吗啉一起震动 10min,过滤得到的混合物,然后加入溶于 DMAC (7 mL)中的、新鲜 50%的吗啉。将所得的悬浮液搅拌 20min,然后过滤得到的混合物,再用 DMAC (5x40 mL)洗涤所述的树脂。将 DTPA-Glu (10.7 g; 14.4 mmol)、HOBt (2.20 g; 14.4 mmol)、DIC (2.26 mL; 14.4 mmol)、DIEA (4.90 mL; 28.8 mmol)和 DMAC (40 mL)加入到所述的树脂中,然后将所得的悬浮液在室温下震动 24h,再进行过滤,并用 DMAC (5x40 mL)和 CH₂Cl₂ (5x40 mL)对所述的树脂进行洗涤,随后进行真空干燥。将所得的树脂与“试剂 B”(150 mL)在烧瓶中震动 4.5h。过滤所述的树脂,并在减压下使所述的溶液蒸发,从而得到油状粗品,当该粗品用 Et₂O (40 mL)处理后,得到了沉淀物。将所述的沉淀物进行离心,倾倒出来后,再用 Et₂O (4x40 mL)进行洗涤,从而

得到白色的固体(2.10 g)。将该产物(2.10 g)溶解于由 DMSO (36 mL) 和 H₂O (4.0 mL) 形成的混合物中, 然后用 D-(-)-*N*-甲基葡萄糖胺(1.23 g) 将 pH 调节至 8。将所得的溶液在室温下搅拌 96 小时, 然后通过制备型 HPLC 进行纯化。将含有所述产物的级份冻干, 从而得到所需的螯合配体(0.280 g; 0.058 mmol), 该配体为白色固体。将所述的配体(0.240 g; 0.050 mmol) 悬浮于 H₂O (80 mL) 中, 并通过添加 0.1N 的 NaOH(8.50 mL; 0.85 mmol) 至 pH 为 6.5 使其溶解。加入 5.187 mM 水性 GdCl₃ (38.3 mL; 0.202 mmol), 并使用 0.1 N NaOH (6.0 mL; 0.60 mmol) 将 pH 保持为 6.5。将所得的溶液用 0.1N 的 NaOH 调节至 pH7.0, 然后加载到 XAD 1600 柱上, 并用梯度 H₂O/ACN(用百分率为 30 的 ACN 洗脱所需的产物) 进行洗脱, 在经过蒸发之后, 得到化合物—螯合的络合物 1 的钠盐(0.167 g; 0.029 mmol), 其为白色固体。总产率为 3.8 %。

螯合络合物 1 的分析数据

Mr (分子量): 5663.73 (C₂₀₅H₂₇₆Gd₄N₄₈Na₁₀O₈₃S₂)

CE (毛细管电泳): 88.5 % (区域%)

MS (质谱): 所得的数据与螯合络合物 1 的结构一致

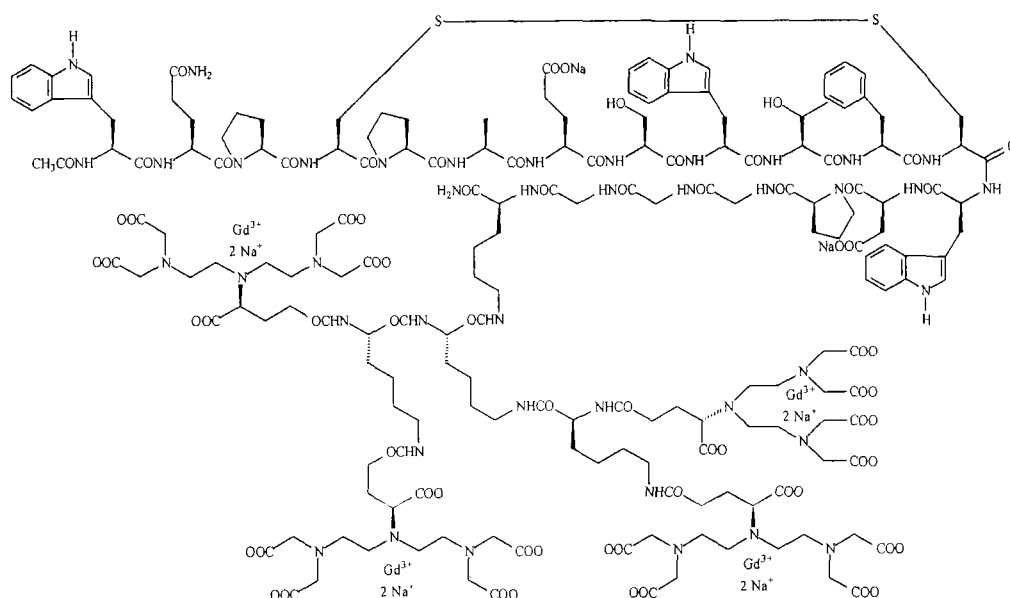
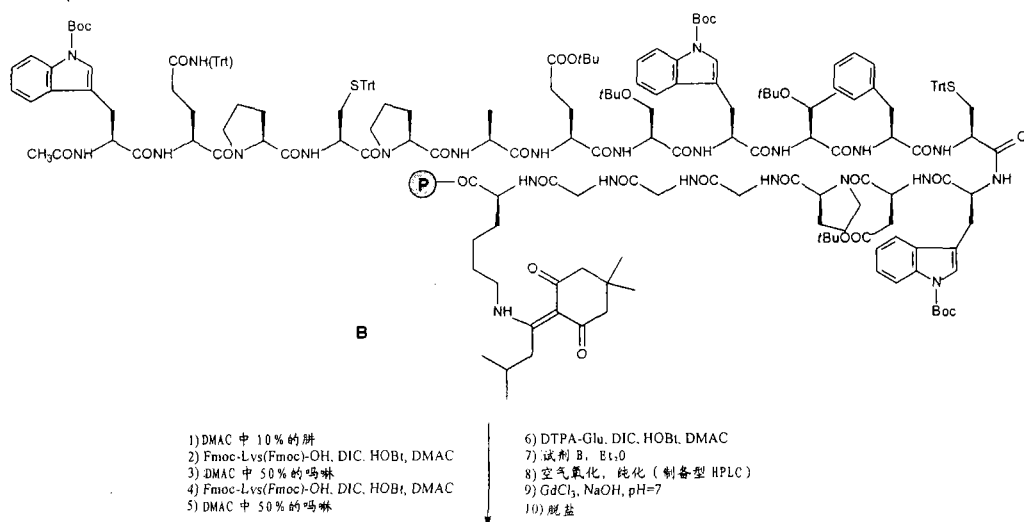
实施例 23

螯合络合物 2 的制备

用于制备螯合络合物 2 的合成方法在方案 6 中列出。

方案 6

方案 6



螯合络合物 2

根据上文所述的过程 A 得到的、Fmoc-PAL-PEG-PS 树脂支承的中间体 B (3.00 g; 0.60 mmol) 在装有 DMAC (25 mL) 的 SPPS 容器中震动 1h, 从而使所述的树脂膨胀。在滤出溶剂后, 用 DMF (5x25 mL) 洗涤所述的树脂。然后, 将该树脂与溶于 DMF (25 mL) 中的 10% 的胍一起震动 15min, 过滤溶剂, 加入溶于 DMF (25 mL) 中的、新鲜 10% 的胍。

将所得的悬浮液搅拌 20min 以上, 然后过滤得到的混合物, 接着先用 DMF (5x25 mL)、再用 DMAC (5x25 mL) 对所述的树脂进行洗涤。将 Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (1.42 g; 2.40 mmol)、HOBt (0.36 g; 2.40 mmol)、DIC (0.37 mL; 2.40 mmol) 和 DMAC (25 mL) 加入到所述的树

脂中，将所得的悬浮液在室温下震动 24h，然后进行过滤，再用 DMAC (5x25 mL) 洗涤所述的树脂。然后，将所得的树脂与溶于 DMAC (25 mL) 中的 50% 的吗啉一起震动 10min，过滤得到的混合物，然后加入溶于 DMAC (25 mL) 中的、新鲜 50% 的吗啉。将所得的悬浮液搅拌 20min，然后过滤得到的混合物，再用 DMAC (5x25 mL) 洗涤所述的树脂。将 Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (2.84 g; 4.80 mmol)、HOBt (0.73 g; 4.80 mmol)、DIC (0.75 mL; 4.80 mmol) 和 DMAC (25 mL) 加入到所述的树脂中，然后将所得的悬浮液在室温下震动 24h，再进行过滤，并用 DMAC (5x25 mL) 对所述的树脂进行洗涤。然后，将所得的树脂与溶于 DMAC (25 mL) 中的 50% 的吗啉一起震动 10min，过滤得到的混合物，然后加入溶于 DMAC (25 mL) 中的、新鲜 50% 的吗啉。将所得的悬浮液搅拌 20min，然后过滤得到的混合物，再用 DMAC (5x25 mL) 洗涤所述的树脂。将 DTPA-Glu (7.17 g; 9.60 mmol)、HOBt (1.47 g; 9.60 mmol)、DIC (1.50 mL; 9.60 mmol)、DIEA (3.26 mL; 9.60 mmol) 和 DMAC (25 mL) 加入到所述的树脂中。然后将所得的悬浮液在室温下震动 24h，再进行过滤，并用 DMAC (5x25 mL) 和 CH_2Cl_2 (5x25 mL) 对所述的树脂进行洗涤，随后进行真空干燥。将所得的树脂与“试剂 B” (100 mL) 在烧瓶中震动 4.5h。过滤所述的树脂，并在减压下使所述的溶液蒸发，从而得到油状粗品，当该粗品用 Et_2O (40 mL) 处理后，得到了沉淀物。将所述的沉淀物进行离心，倾倒出来后，再用 Et_2O (4x40 mL) 进行洗涤，从而得到白色的固体 (1.60 g)。将该产物 (1.60 g) 溶解于由 DMSO (27 mL) 和 H_2O (3.0 mL) 形成的混合物中，然后用 D-(-)-N-甲基葡萄糖胺 (0.94 g) 将 pH 调节至 8。将所得的溶液在室温下搅拌 96 小时，然后通过制备型 HPLC 进行纯化。将含有所述产物的级份冻干，从而得到所需的螯合配体 (0.260 g; 0.060 mmol)，该配体为白色固体。将所述的配体 (0.220 g; 0.050 mmol) 悬浮于 H_2O (80 mL) 中，并通过添加 0.1N 的 NaOH (7.40 mL; 0.74 mmol) 至 pH 为 6.5 使其溶解。加入 6.21 mM 水性 GdCl_3 (32.60 mL; 0.202 mmol)，并使用 0.1 N NaOH (6.10 mL; 0.61 mmol) 将 pH 保持为 6.5。将所得的溶液用 0.1N 的 NaOH 调节至 pH 7.0，

然后加载到 XAD 1600 柱上,并用梯度 H₂O/ACN(用百分率为 30 的 ACN 洗脱所需的产物)进行洗脱,在经过蒸发之后,得到化合物一整合的络合体 2 的钠盐(0.174 g; 0.033 mmol),其为白色固体。总产率为 6.6 %。

分析数据

Mr: 5202.26 (C₁₈₇H₂₄₅Gd₄N₄₃Na₁₀O₇₄S₂)

CE: 87.8 % (区域%)

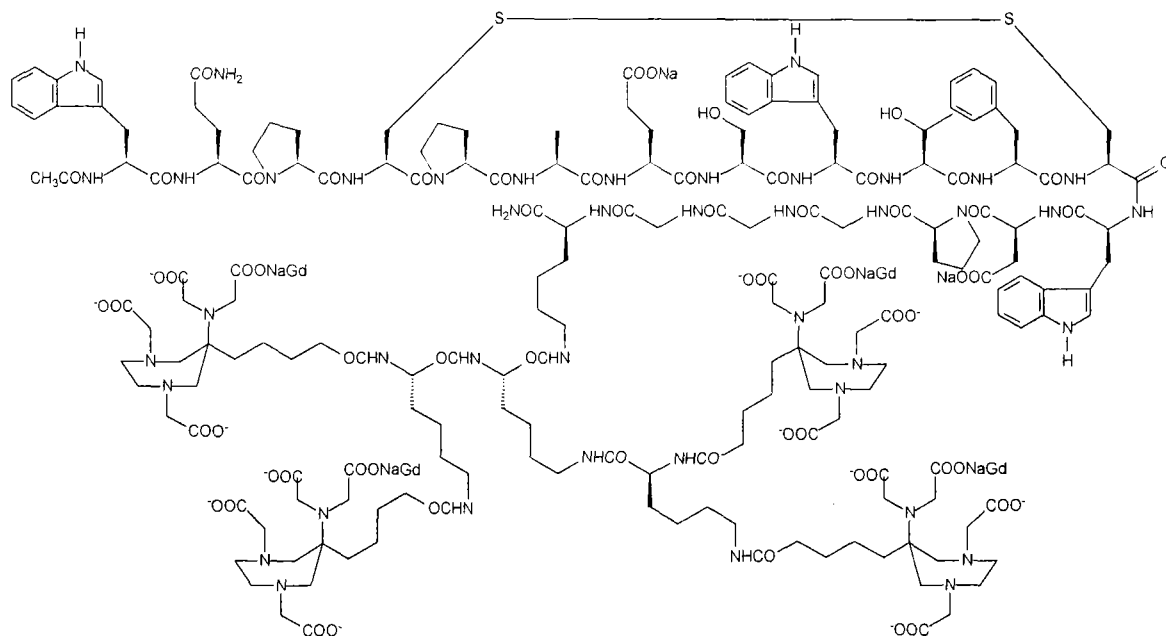
MS: 所得的数据与整合络合体 2 的结构一致

实施例 24

整合络合体 4 的制备

通过以下方案 6 所示的合成过程,并通过用合适的 AAZTA 配体来替代相应的 DTPA 配体,还制备出整合的络合体 4。

整合络合体 4



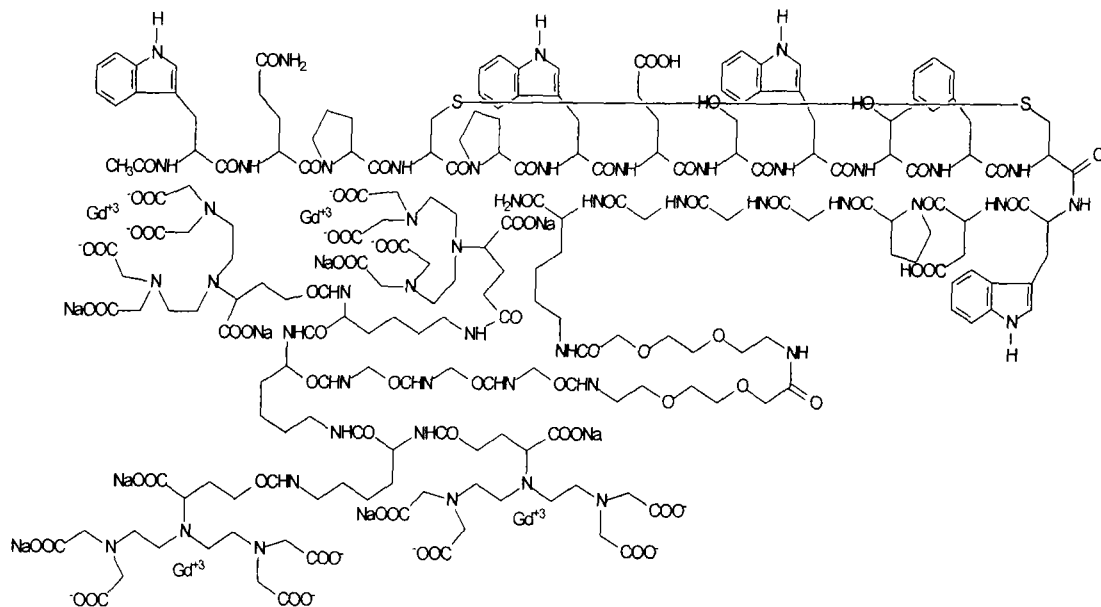
参照络合体

通过起始于由 W002/055544 提供的目前已知的肽 Ac-WQPC*PWESWTFQ*WDGGGK-NH₂,以及通过以下所示的方案 5 和 6 的合

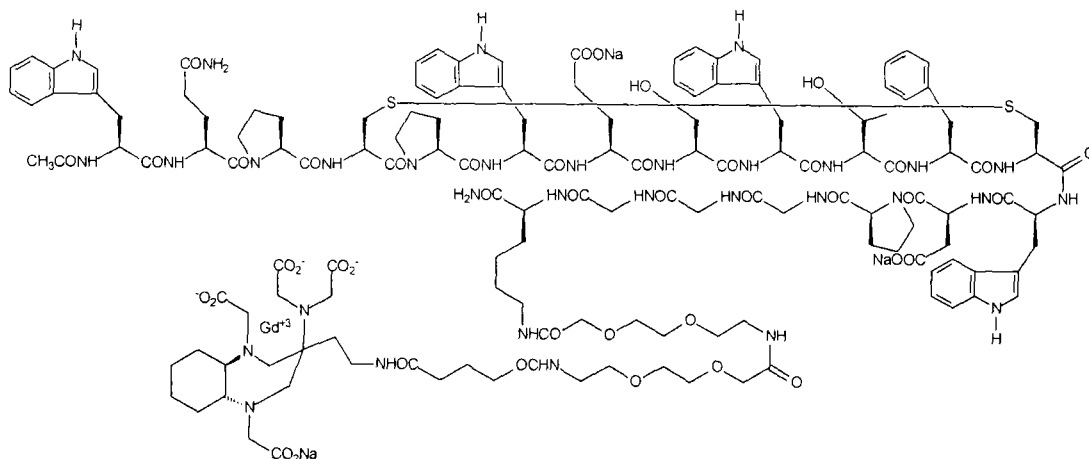
成过程，适当地将待缀合的螯合配体部分改变成连接体官能化的肽中间体，已经制备出一些螯合的化合物作为参照化合物，以用于体内和体外测试。

具体而言，已经制备出以下参照化合物：

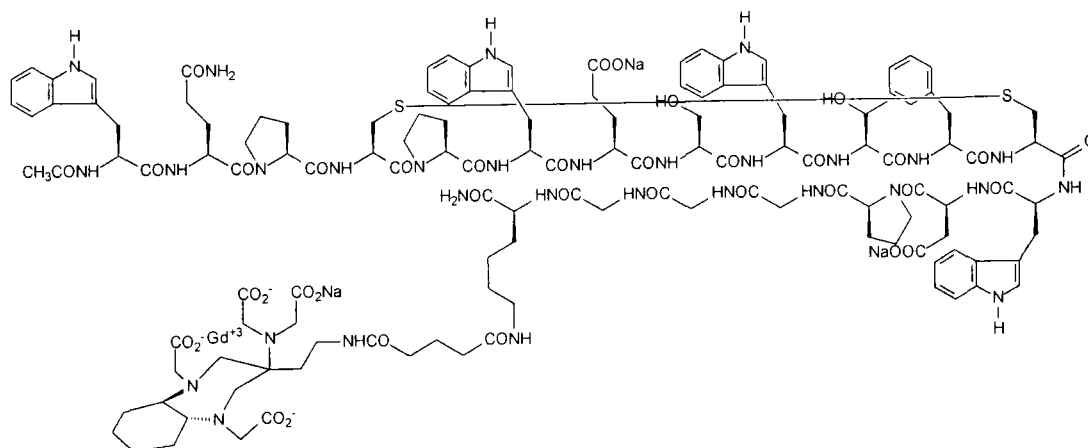
参照 1



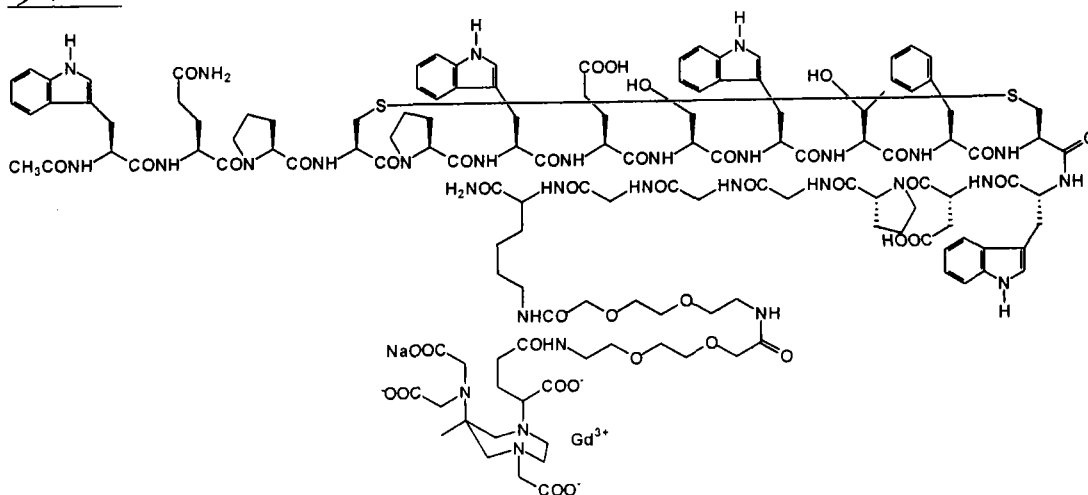
参照 2



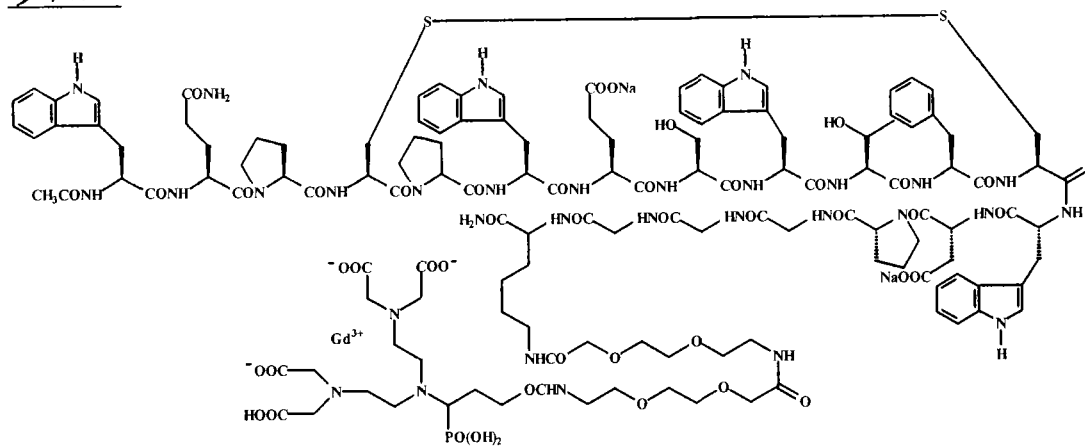
参照 3



参照 4



参照 5



实施例 25

人/小鼠凝块中的纤维蛋白 MRI 成像

体外 MRI 测试

得自不同物种（人、豚鼠和小鼠）的直径为 0.5-7mm 的小型血块是通过将柠檬酸盐抗凝血浆 (1:3, v/v) 磷脂 (试剂 Pathromtin) 与 0.008 M 的 CaCl_2 (Dade Behring, Germany) 在 37°C 下合并到 2ml 的小瓶中而形成的。将凝块用 TBS 1X 洗涤 3 次, 然后在 37°C 下与 100 μM 的造影剂温育 30 分钟。对每个温育溶液都制备 2 个凝块。在经温育的凝块用 TBS 1X 洗涤 4 次之后, 将其放置到装有 TBS 1X 的小瓶中, 以用于 MRI 分析。采用以下参数得到 T1-加权的 2D 自旋回波 (SE) 图像: TR/TE = 400/8 ms, 空间分辨率 = 344 μm 和切片厚度 = 2 mm。在各包含凝块的图像中测定最大信号强度, 然后将该强度与得自 TBS 中培养的凝块的信号强度作对比。在 MRI 之后, 制备多个凝块用于 ICP 分析。

在温育培养基中, 通过 MRI 在人凝块上测试不同浓度 (25, 100 和 400 μM 的络合体) 下的本发明的螯合络合体 1、参照化合物 1、参照化合物 2、参照化合物 4 和参照化合物 5。

结果

通过对比在所记录的凝块 (在与浓度为 100 μM 的化合物温育后) 中的信号增强, 根据以下所示的性能对测试化合物进行分类:

表 10

化合物	在 100 μM 下的最大信号增强情况	与螯合络合体 1 相比
螯合络合体 1	100%	
参照化合物 2	68%	- 32%
参照化合物 1	44%	- 66%
参照化合物 5	41%	- 69%
参照化合物 4	23%	- 77 %

所述的结果表明本发明的化合物 (螯合络合体 1) 具有最大的信号增强程度。

实施例 26

肿瘤模型中的纤维蛋白 MRI 成像

体内 MRI 测试:

按照以下方式构成并测试每组 5 只小鼠的 3 组小鼠, 其中所述的小鼠都接种有 $2 \cdot 10^6$ 个使用 PBS 的成神经细胞瘤细胞:

组 a: 参照化合物 2,

组 b: 螯合络合体 1,

组 c: ProHance® (参见方法部分)

在接种肿瘤细胞后的第 10 天, 在每组中选出具有相似肿瘤尺寸(直径为 5-10 mm)的至少 4 只小鼠来用于体内 MRI 测试。在增强前采集 MRI (pre-contrast MRI acquisition) (T1 和 T2 高分辨率 2D 自旋回波和 3D 梯度回波图像) 之后, 施用测试化合物 ($25 \mu\text{mol}/\text{kg}$, 静脉内施用), 并在注射 4h 和 24h 之后进行 MRI 操作。在整个肿瘤的区域并且在覆盖整个肿瘤的每个增强后图像中测定最大信号强度, 然后将该信号与造影前的图像比较。在 MRI 检测结束时, 处死所有的动物, 并取出肿瘤、血液、肝脏、肾脏和骨髓, 并将它们用于通过 ICP-AES (电感耦合等离子体原子发射光谱法) 进行的 Gd 测定。

结果

在所有的组中肿瘤的尺寸都是相似的(肿瘤的体积为大约 500 mm^3)。

在注射螯合络合体 1 后的 4h, 观察到明显的肿瘤信号增强, 而在使用参照化合物 2 的组中, 增强较低, 并且没有覆盖整个肿瘤(9 个切片中 < 3 个, ~30% 的切片覆盖了肿瘤)。图 8 示出了在注射 $25 \mu\text{mol}/\text{kg}$ 的所述络合体之后, 在 2T 时记录的所获得 T1 加权的 MRI 图像。就注射 ProHance® 的情况而言, 信号分布仅在边缘处, 而在肿瘤的内部没有观察到信号增强。

按照以下方法实施实施例 25 和 26 所述的体外和体内测试。

方法

本发明的纤维蛋白靶向化合物的筛选

为了测试本发明化合物的特异性和效力, 研发并使用了以下两种

方法。一种方法是专注于对凝块进行体外 MRI 测试，另一种用于对神经细胞瘤小鼠模型的体内 MRI 测试。

体外测试

已经研发出该方法并将其用于测试本发明的纤维蛋白靶向造影剂的特异性和效力，以用于通过采用 MRI 方法对血栓进行敏感的检测。所述的研究是对来自不同物种的血浆在体外形成的凝块而进行的。计算来自各样品（其经过了与所述的纤维蛋白靶向造影剂一起温育）的信号增强，并将该信号增强情况与标准的造影剂 ProHance®比较。

材料

测试制品

化合物：测试的造影剂为本发明的化合物，该化合物包含纤维蛋白肽、任意的连接体以及至少一个钆的螯合络合物。

试剂

化合物：生物学样品（物种、生物学流体和品系）：

豚鼠血浆 (Dunkin Hartley)

小鼠血浆 CD®-1 (ICR) BR IGS

兔血浆 (New Zealand White)

储存：在 -20°C

测试体系

所用的测试体系为得自不同物种（人、豚鼠、小鼠和兔）的血浆在体外形成的凝块，其中选择所述的物种是因为它们是合适的模型，并且容易重现本研究。

器材

所有的 MRI 试验都是在 2T Oxford 磁体（钻孔 = 45 cm i.d.）上进行的，其中所述的磁体装备有自屏蔽梯度设置（16 cm i.d.），该自屏蔽梯度设置是由 6 个 TECHRON®放大器（4:1:1 的构造）（其最大梯度强度为 110 mT/m，转换速率为 75 μ s）驱动的，并且与 MRRS 控制台（MR Research Systems Ltd, Surrey UK）形成界面连接。还使用了鸟笼谐振器天线（7.3 cm i.d.）。

方法

体外测试方法

所交付的对照血浆 N 得自从健康血液供体收集来的集中起来的血浆，其中所述的血浆用 HEPES 缓冲剂溶液 (12 g/L) 稳定并且是冻干的。在使用前，通过将所述的悬浮液小心地震动使得冻干的血浆溶解，从而在蒸馏水中重新构建血浆对照 N。在 2mL 的小瓶中形成凝块，其中所述的小瓶中加入有 300 μ l 重新构建的血浆和 300 μ L Pathromtin** SL (二氧化硅颗粒, 植物磷脂, 氯化钠 2.4 g/L, Hepes 14.3 g/L, pH 7.6)。将所得的混合物在 37 $^{\circ}$ C 下温育 2 分钟, 然后加入预先在 37 $^{\circ}$ C 下温育的 300 μ L 氯化钠溶液, 从而得到新鲜混合物, 将该混合物在 37 $^{\circ}$ C 下进一步温育 30 分钟。将所得的凝块转移到 5mL 的试管中, 用 3mL 的 TBS 洗涤 3 次, 然后在 37 $^{\circ}$ C 下与最终浓度为 0.0 至 0.2mM 的测试制品温育 30 分钟。在温育结束时, 将凝块用 3mL 的 TBS 冲洗 4 次, 从而除去未结合的测试制品, 然后将这些凝块放置到 1.5ml 的试管中以用于 MRI 过程。

接着, 通过采用 T1 加权的自旋回波 (SE) 序列来进行高分辨率的 MRI。此外, 由所采集的 2D 梯度回波图像或反转恢复自旋回波图像来计算 T1 图。

在试验结束时, 将所述的凝块送至分析试验室, 以进行 ICP-AES 分析。

生物学样品中钆的检测

设备

所述的测定是在 Jobin-Yvon Mod 24 分光仪上进行的, 所述分光仪按照以下的仪器参数来进行操作:

- 样品流速: 1mL/min
- 等离子体火焰: 6000 至 10000 $^{\circ}$ C
- 波长: 342.247 nm
- 氩气流: 喷雾器 0.3 L/min, 输送的气体 0.2 L/min, 冷却气体 12 L/min。

使用微波系统 (MDS-2000 CEM Corporation) 进行样品消化。

样品的制备和分析条件

对各种生物学基质采用不同的制备方法。

通过将所述的凝块悬浮于 1.5 mL 的硝酸中 (65% v/v) 来制备凝块溶液。

将 1.5 mL 的硝酸 (65% v/v) 加入到温育溶液中 (在温育前和温育后), 从而洗涤所述的溶液。

通过对所述的样品进行使用微波炉系统的湿灰化过程 (wet ashing process) 来破坏所述的有机基质。

最后, 将干态的残余物溶解于 3.0 mL 的 HCL 5% (v/v) 中, 然后通过 ICP-AES 进行分析。

数据处理

简而言之, 分别针对低浓度和高浓度的两个标准品 (溶于 HCl 5% (v/v), 范围为 0.00 至 20 mg (Gd) /L) 来评价线性。通过使用所述仪器的校正直线来计算测试样品中钆的总含量, 并以 $\mu\text{g (Gd) / mL}$ 表示。

MRI 数据分析

在包含凝块的目的区域 (ROI) 中测定平均信号强度, 其中所述的区域是由操作者使用专用软件 (MR Research Systems Ltd, Surrey UK) 在各个 MR 图像上通过拖拽得到的。按照下式确定信号强度的增强 (Enh%):

$$\text{Enh\%} = 100 * (\text{SI}_x - \text{SI}_0) / \text{SI}_0$$

其中 SI_0 和 SI_x 分别为未使用测试制品和使用测试制品温育的凝块的平均信号强度。

体内测试方法

本研究的目的是评价本发明的纤维蛋白靶向试剂作为造影剂用于敏感地检测实体肿瘤中的纤维蛋白的特异性和效力。

本研究是在神经母细胞瘤的小鼠模型上进行的, 其中所述的神经细胞瘤是通过在 A/J 小鼠的右侧肋腹中皮下注射 Neuro-2a 细胞而诱导的 (例如参见: Y. Chen. Effects of irradiated tumor vaccine and

continuous localized infusion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on neuroblastomas in mice. J. Pediatr Surg. 2003. 37(9), 1298-1304; Anthony D. Sandler, Hiroshi Chihara and Gen Kobayashi. CpG Oligonucleotides Enhance the Tumor Antigen-specific Immune Response of a Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor-based Vaccine Strategy in Neuroblastoma Cancer Research 2003, 63, 394-399)。

在注射本发明的纤维蛋白靶向造影剂之后来评价肿瘤中信号增强的动力学，并将该动力学与标准试剂 ProHance®的动力学作比较。

材料

测试制品

化合物：所测试的造影剂包含纤维蛋白靶向肽、任选的连接体以及至少一个钆的螯合络合物。

参照制品

化合物：ProHance®

浓度：0.5M

批次：T2059

储存：在 RT 下，避光

试剂

化合物：青霉素/链霉素 (10000 µg/mL)，供应商：Biochrom KG, Berlin, Germany

化合物：L-谷氨酰胺 (200mM) ， 供应商：SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany

化合物：胎牛血清，供应商：HyClone®, Logan, Utah, USA

化合物：Eagle 最低必需培养基，供应商：SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany

化合物：Dulbecco' s 磷酸缓冲盐溶液 (PBS， 供应商：SIGMA Chemicals, St. Louis, MO, U. S. A.

化合物：Zoletil 100， 供应商：Virbac, Carros, France

化合物: Rompun®, 供应商: Bayer AG, Laverkusen, Germany

● 测试体系

动物

物种和品系: 小鼠 A/J (选择这样的小鼠是由于其为用于神经母细胞瘤的药理毒理和成像研究的合适的模型)。

动物的数量及性别: 10 只雄鼠 (5 只雄鼠/组); 5 只动物用于可能发生的替换。

得到动物时动物的重量和年龄: 20-25g; 5-6 周龄

供应商: Harlan Italy, S. Pietro al Natisone (UD), Italy
设备

所有的试验都是在与 2T Oxford 磁体 (钻孔= 45 cm i.d.) 形成界面连接的 MRRS 控制台 (MR Research Systems Ltd, Surrey UK) 上进行的, 其中所述的磁体装备有 16 cm i.d. 的自屏蔽梯度设置, 该自屏蔽梯度设置是由 6 个 TECHRON® 放大器 (4:1:1 的构造) (其最大梯度强度为 110 mT/m, 转换速率为 75 μ s) 驱动的。使用针对小鼠的尺寸进行优化的驻波谐振器作为 R.F. 线圈。

方法

实验设计

小鼠神经母细胞瘤细胞系 (BS TCL 128 Neuro-2a) 由 the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell' Emilia, Brescia 提供。将所述的细胞培养在 90% 的 MEM 培养基和 10% 的胎牛血清中, 收集这些细胞, 并用生理学盐水洗涤 2 次, 然后再次悬浮于 PBS 中 (10^6 个细胞/0.2mL)。将 10^6 个细胞皮下注射到每只动物的右侧肋腹中。

在接种后, 通过每隔一天测量肿瘤直径来跟踪肿瘤的发展, 直到 MRI 试验的那天为止。选择肿瘤直径为 300 至 700mm 的动物以用于体内成像。在施用所述的测试制品后直至 24h 通过 MRI 来跟踪肿瘤的信号增强, 然后将该增强情况与由施用参照制品所得信号增强情况作比较。麻醉动物, 并在试验期间使动物保持麻醉。

将所述的测试制品和 ProHance® (参照制品) 以 0.025-0.1mmol/kg 的剂量进行施用。

采用高分辨率的 T1 加权的自旋回波和梯度回波序列来获取使用了合适造影剂的图像, 从而检测肿瘤并跟踪测试制品和参照制品的造影效果。

在本试验结束时, 处死动物。然后取得肿瘤、血液、肾脏、肝脏和骨髓, 对其称重, 然后储存在大约 4°C 下, 直到采用 ICP-AES 进行分析为止。

生物学样品中钆的检测

装置

所述的检测是在 Jobin-Yvon Mod 24 分光仪上进行的, 所述分光仪按照以下的仪器参数来进行操作:

- 样品流速: 1mL/min
- 等离子体火焰: 6000 至 10000°C
- 波长: 342.247 nm
- 氩气流: 喷雾器 0.3 L/min, 输送的气体 0.2 L/min, 冷却气

体 12 L/min。

使用微波系统 (MDS-2000 CEM Corporation) 进行样品消化。

样品的制备和分析条件

对各种生物学基质采用不同的制备方法:

通过将所述的、精确称重的肿瘤悬浮于 1.5mL 的硝酸中 (65% v/v) 来制备肿瘤溶液。

通过测量 1.5mL 硝酸 (65% v/v) 中精确称重的肝脏来制备肝脏。

通过将各个精确称重的肾脏悬浮于 1.5mL 的硝酸中 (65% v/v) 来制备肾脏溶液。

通过将 1mL 的血液混合到 1.5mL 的硝酸 (65% v/v) 中来制备血液溶液。

通过将精确称重的各大腿骨悬浮于 1.5mL 的硝酸 (65% v/v) 中来制备骨溶液。

通过对所述的样品进行使用微波炉系统的湿灰化过程来破坏所述的有机基质。

最后，将干态的残余物溶解于 3.0 mL 的 HCl 5% (v/v) 中，然后通过 ICP-AES 进行分析。

数据处理

简而言之，分别针对低浓度和高浓度的两个标准品（溶于 HCl 5% (v/v)，范围为 0.00 至 20 mg (Gd) /L）来评价线性。通过使用所述仪器的校正直线来计算测试样品中钆的总含量，并以 $\mu\text{g (Gd) /mL}$ 表示。

MRI 数据分析

在包含整个肿瘤的目的区域 (ROI) 中测定平均信号强度，其中所述的区域是由操作者使用专用软件 (MR Research Systems Ltd, Surrey UK) 在各个 MR 图像上通过拖拽得到的。按照下式确定信号强度的增强情况 (Enh%)：

$$\text{Enh\%} = 100 * (\text{SI}_x - \text{SI}_0) / \text{SI}_0$$

其中 SI_0 和 SI_x 分别为注射所述的造影剂（测试制品或参照制品）之前和注射造影剂之后肿瘤的平均信号强度。

对收集的数据（体重、临床症状、粗略病理学检查）进行定性分析。

代表性实施方案

以下非限定性的、所列举的实施方案进一步说明了本发明：

1. 一种经分离的纤维蛋白结合肽，其具有选自由表 1 或表 2 所提供的序列中的氨基酸序列。
2. 一种包含根据实施方案 1 的纤维蛋白结合肽的诊断成像试剂，其中所述的纤维蛋白结合肽与可检测标记物连接。
3. 实施方案 2 所述的成像试剂，其中所述的纤维蛋白结合肽任选地通过螯合剂而与至少一种适用于磁共振成像的顺磁金属原子连接。
4. 实施方案 2 所述的成像试剂，其中所述的纤维蛋白结合肽与适用于超声成像的超声波生成标记物连接。

5. 实施方案 2 所述的成像试剂,其中所述的纤维蛋白结合肽任选地通过螯合剂而与诊断放射性核素连接。

6. 实施方案 5 所述的成像试剂,其中所述的诊断放射性核素选自: ^{64}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 和 ^{111}In 。

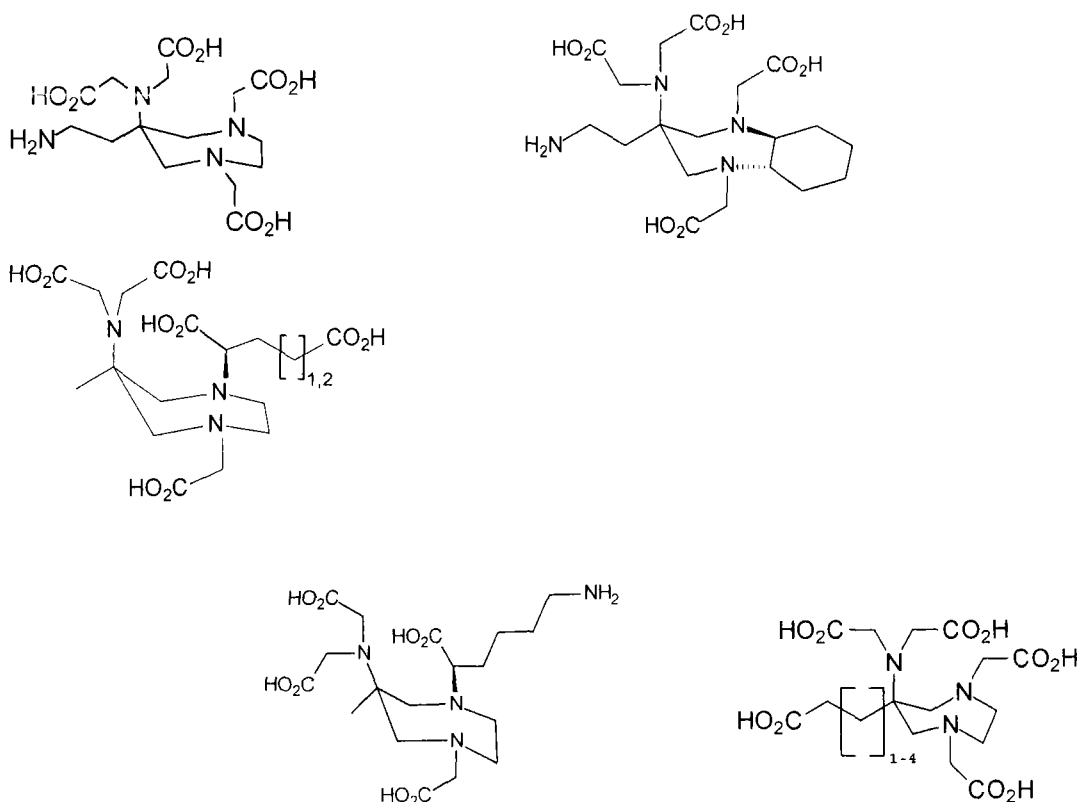
7. 实施方案 2 所述的成像试剂,其中所述的纤维蛋白结合肽是荧光素标记的。

8. 一种包含根据实施方案 1 的纤维蛋白结合肽的治疗试剂,其中所述的纤维蛋白结合肽与所述的治疗试剂连接。

9. 实施方案 8 所述的治疗试剂,其中所述的纤维蛋白结合肽任选地通过螯合剂与治疗放射性核素连接。

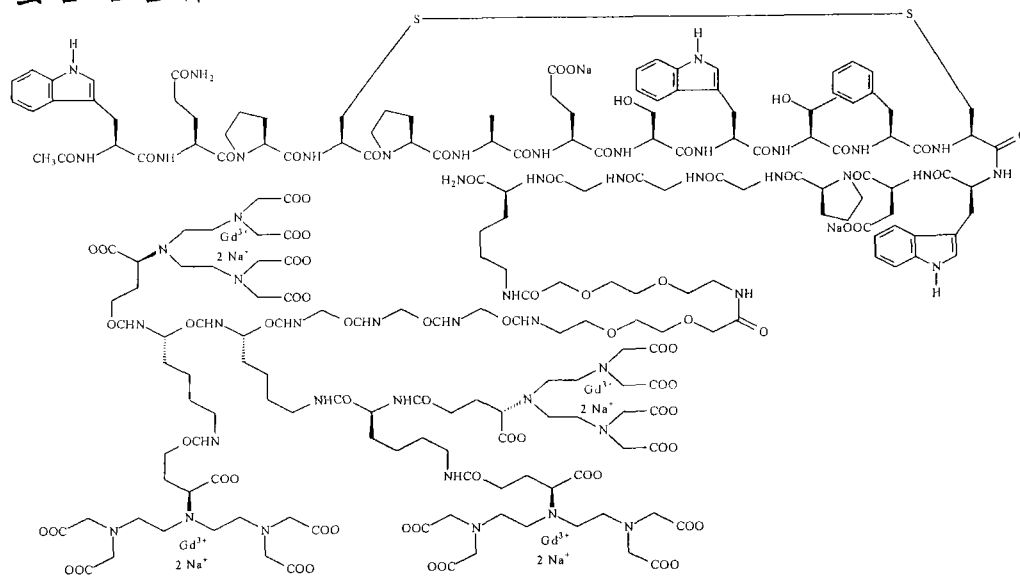
10. 实施方案 9 所述的治疗试剂,其中所述的治疗放射性核素选自: ^{64}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{105}Rh 、 ^{111}In 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Lu 、 $^{186-188}\text{Re}$ 和 ^{199}Au 。

11. 实施方案 3 所述的成像试剂,其中所述的螯合剂选自: DTPA、DTPA-GLU、DTPA-Lys、DOTA、AAZTA、以及以下所示的它们的衍生物:

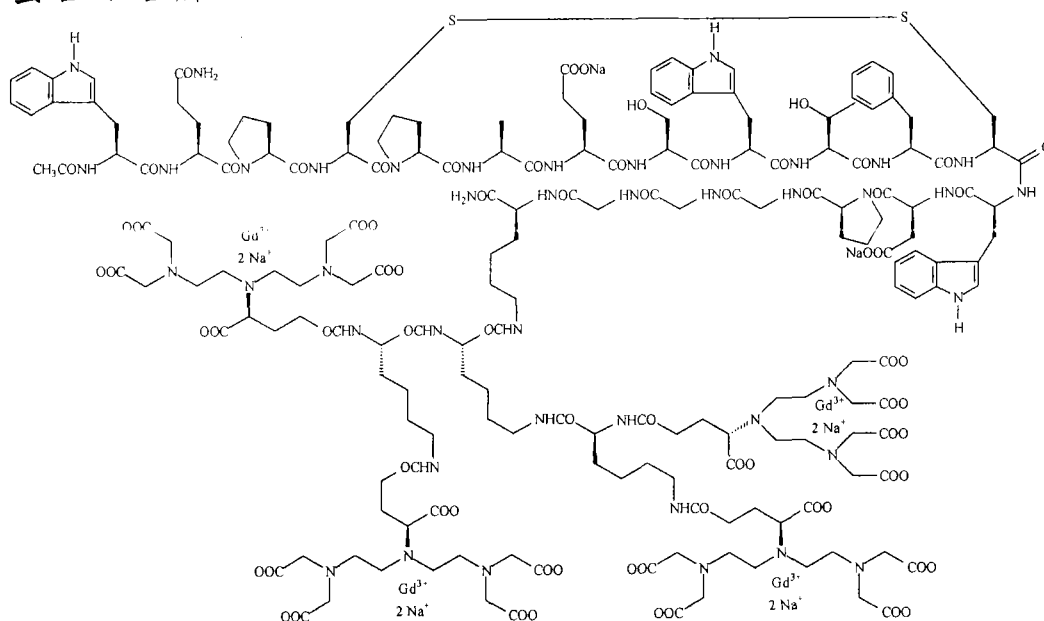


12. 实施方案 3 所述的成像试剂，其选自：

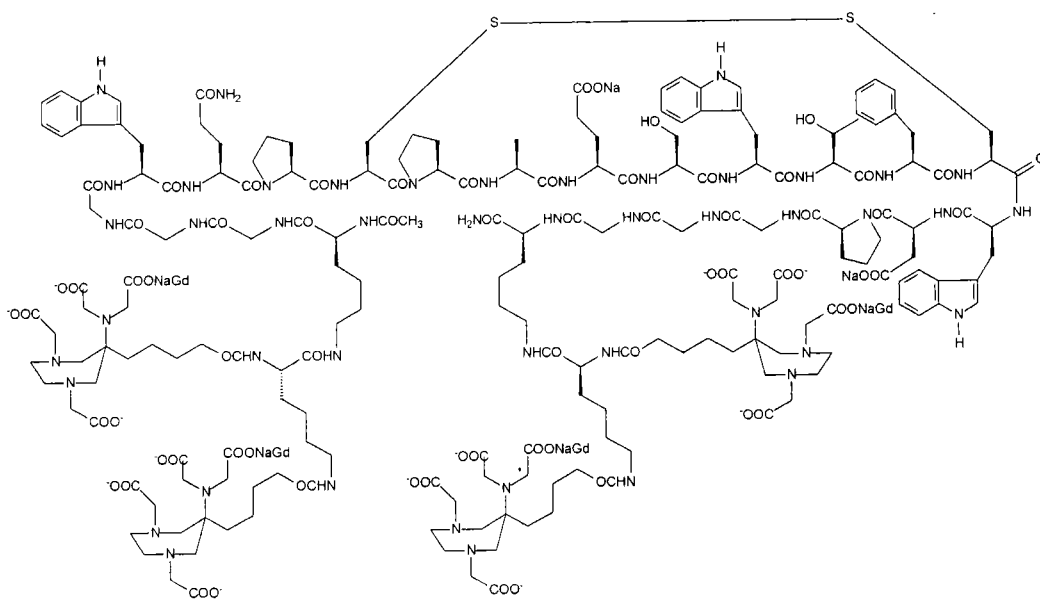
螯合络合物 1



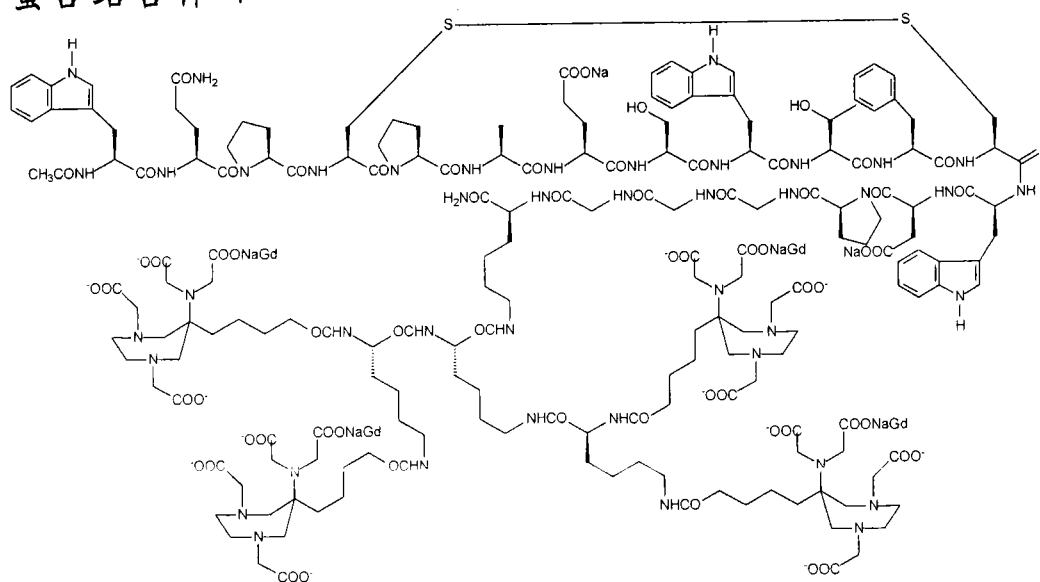
螯合络合物 2



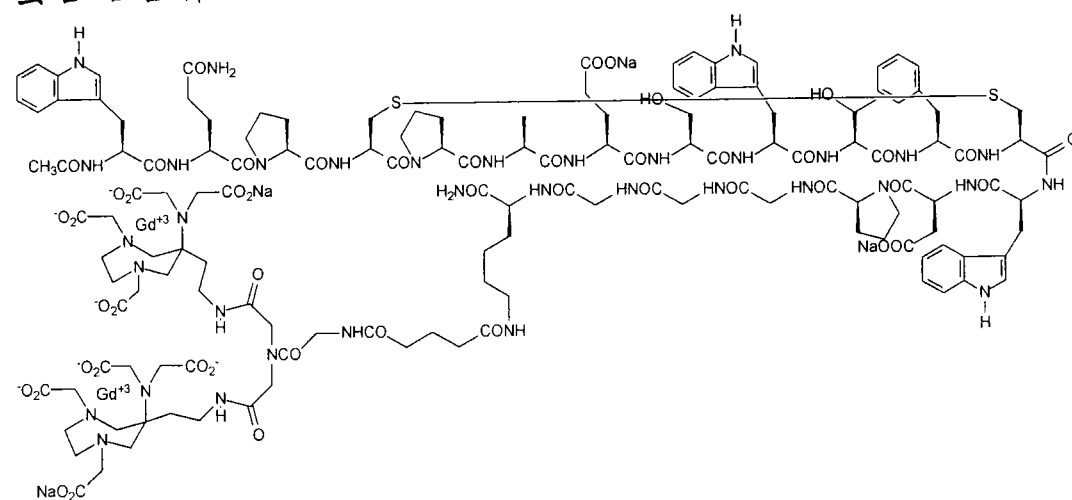
螯合络合物 3



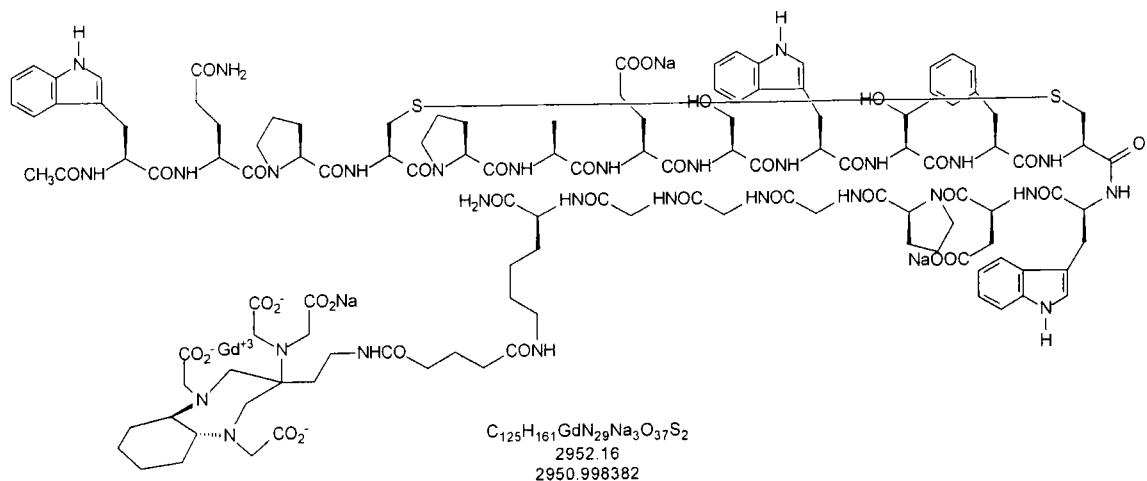
螯合络合物 4



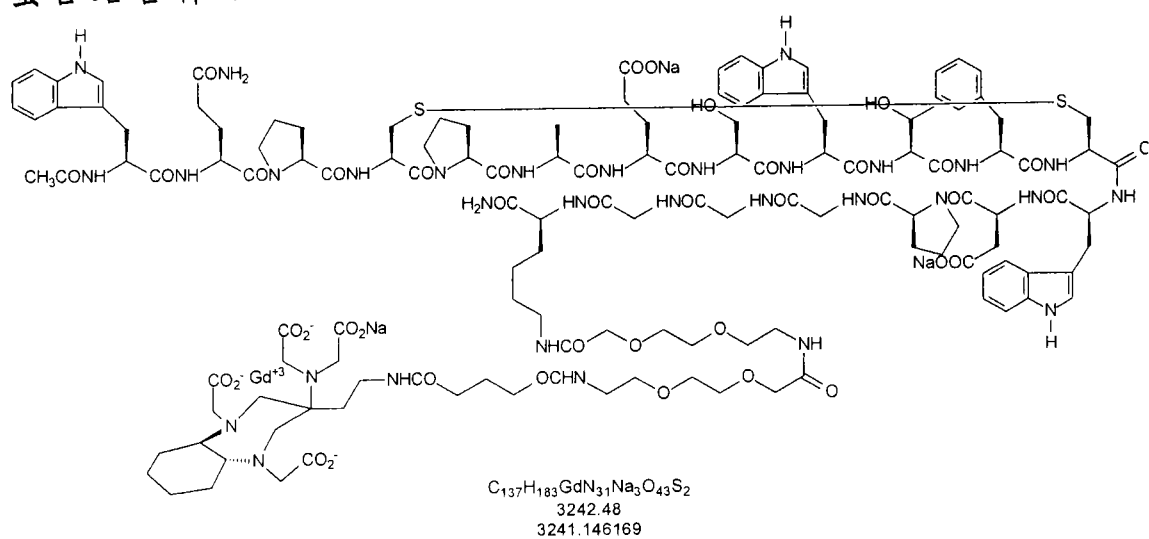
螯合络合物 5



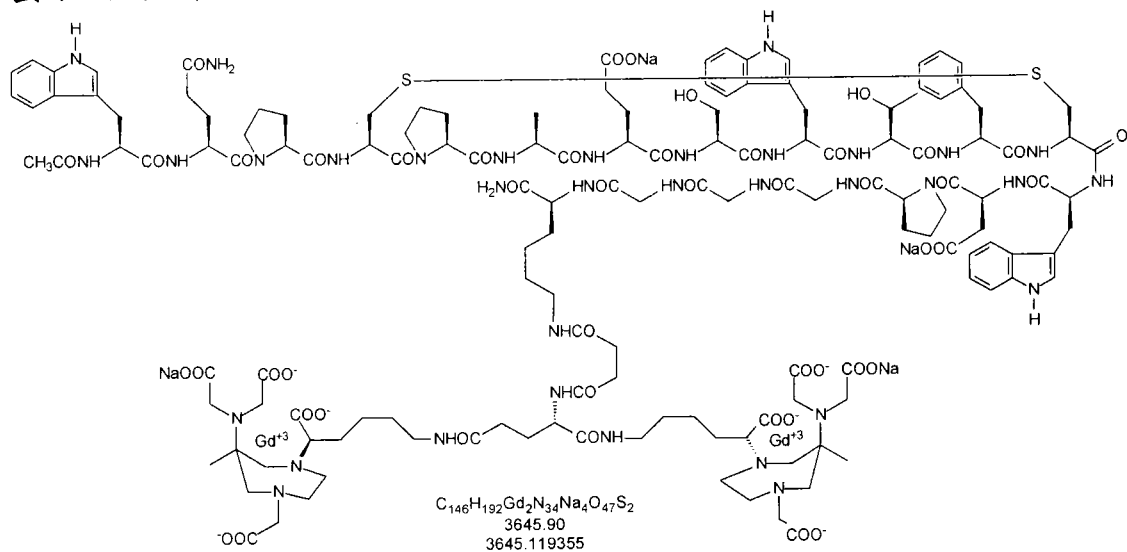
螯合络合物 6



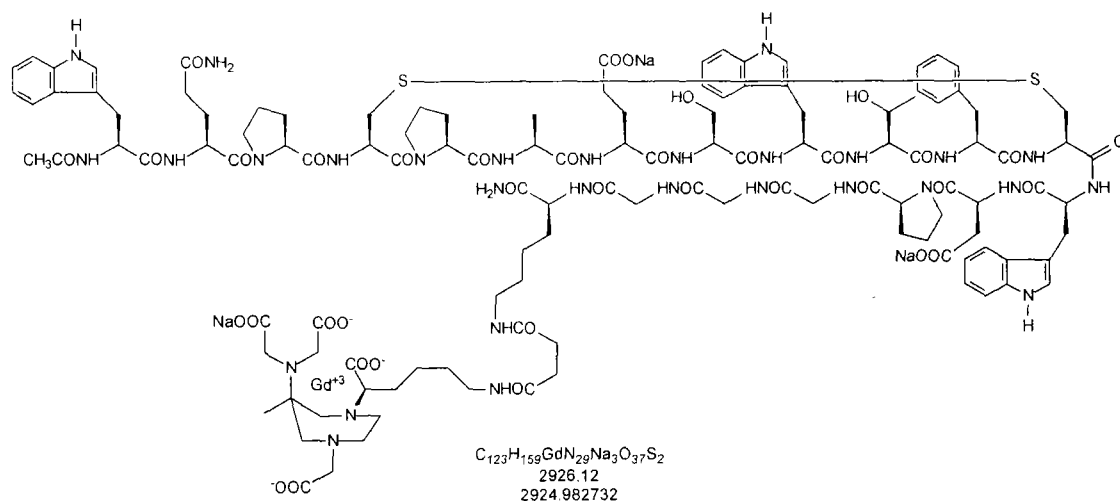
螯合络合物 7



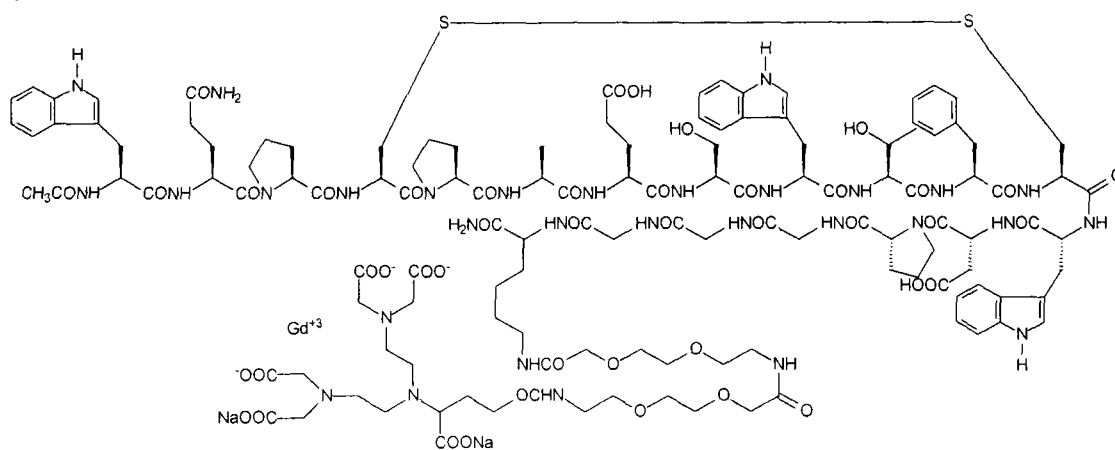
螯合络合物 8



螯合络合物 9



整合络合物 10



13. 实施方案 4 所述的成像试剂，其中适用于超声成像的超声波生成标记物包括含有气体的微球。

14. 实施方案 4 所述的成像试剂，其中适用于超声成像的超声波生成标记物包括含有气体的微气泡。

15. 实施方案 14 所述的成像试剂，其中所述的微气泡包含选自以下中两种或多种的混合物：DSPC、DPPG、DPPA、DSPE-PEG1000、DSPE-PEG2000、DSPE-PEG3400、DPPE-PEG3400、棕榈酸和硬脂酸。

16. 一种含有微气泡的超声造影剂，其中所述的微气泡含有气体，其中所述的微气泡包含脂肽，该脂肽包含与磷脂连接的实施方案 1 所述的纤维蛋白结合肽。

17. 实施方案 16 所述的超声造影剂，该造影剂包含选自 Seq000-PL1、Seq005-PL1、Seq016-PL1、Seq017-PL1、Seq023-PL1 和 Seq024-PL1 中的脂肽。

18. 实施方案 17 所述的超声造影剂,其中所述的微气泡进一步包含 DSPC 和 DPPG。

19. 实施方案 17 所述的超声造影剂,其中所述的微气泡进一步包含 DSPE-PEG1000、DPPE 和 DPPG。

20. 实施方案 17 所述的超声造影剂,其中所述的微气泡进一步包含 DSPE-PEG1000、DSPC 和 DSPG。

21. 实施方案 17 所述的超声造影剂,其中所述的气体包含 SF₆ 或全氟碳化物,这些气体任选地与空气、氮气、氧气或二氧化碳混合。

22. 实施方案 18 - 20 中任一项所述的超声造影剂,其中所述的气体包含 C₄F₁₀, 该气体任选地与空气、氮气、氧气或二氧化碳混合。

23. 实施方案 16 所述的超声造影剂,该造影剂进一步包含冻干添加剂和/或膨胀剂。

24. 一种具有氨基酸序列 Ac-WQPC*PWESWTFC*WDPGGGK-NH₂ (SEQ ID NO. 2) 的经分离的纤维蛋白结合肽,其中进行了以下所述的一种或多种修饰:

(a) 用 Ala 替代 Trp⁶;

(b) 用 Cha 替代 Phe¹¹; 以及

(c) 在 N 末端处加入一种或多种极性氨基酸。

25. 一种包含实施方案 24 所述的纤维蛋白结合肽的诊断成像试剂,其中所述的纤维蛋白结合肽与可检测标记物连接。

26. 一种包含实施方案 24 所述的纤维蛋白结合肽的治疗成像试剂,其中所述的纤维蛋白结合肽与治疗试剂连接。

27. 一种式 (I) 的化合物或其生理学可接受的盐,



其中

A 为包含氨基酸序列的纤维蛋白结合肽部分,其中所述的氨基酸序列选自由表 1 或表 2 所提供的序列;

Y 为将 A 与至少一个 T 连接起来的合适的连接部分;当 s 为 2 时,单元 Y 彼此相同或不同;

T 在各种情况下均独立地为诊断或治疗活性部分;

S 为 1 或 2; 以及

r 在各种情况下独立地为整数 1 至 8。

28. 一种实施方案 27 的化合物, 其中 T 为诊断活性部分。

29. 实施方案 28 所述的化合物, 其中所述的诊断活性部分选自: 螯合的 γ 射线或者正电子发射放射性核素; 螯合的或多螯合的络合体形式的顺磁金属离子; X 射线吸收试剂, 其包括原子序数大于 20 的原子; 染料分子; 荧光分子; 磷光分子; 在 UV 光谱中吸收的分子; 量子点; 在近红外辐射或远红外辐射中能够进行吸收的分子; 以及可通过超声检测的部分。

30. 实施方案 27 所述的化合物, 其中 T 为治疗活性部分。

31. 实施方案 30 所述的化合物, 其中所述的治疗活性部分选自: 溶解血栓的试剂、纤维蛋白溶解试剂、细胞毒性试剂、用于选择性地杀死肿瘤细胞和/或抑制肿瘤细胞生长的试剂和放射性治疗试剂。

32. 实施方案 27 所述的化合物, 其中 Y 选自线性或分支的二价连接部分和线性或分支的多官能连接部分。

33. 实施方案 32 所述的化合物, 其中所述的二价连接部分包含 -GGGK。

34. 实施方案 27 所述的化合物, 其中 A 包含如表 1 所示的 Seq005。

35. 一种包含肽部分 A 的中间体化合物, 其中所述的肽部分 A 与任选保护的 Y 部分、或者与任选经保护的 Y 部分的亚单元缀合, 其中 A 为具有氨基酸序列的纤维蛋白结合肽, 其中所述的氨基酸序列选自表 1 或表 2 所提供的序列, 并且 Y 为连接部分。

Ac-W(Nⁱⁿ-Boc)-Q(Trt)-P-C(Trt)-P-A-E(OtBu)-S(tBu)-W(Nⁱⁿ-Boc)-T(tBu)-F-C(Trt)-W(Nⁱⁿ-Boc)-D(OtBu)-P-GGGK(ivDde)-NH-TGR

1. 10% NH₂NH₂/DMF (2 x 10 min)
2. DMF 洗涤 (4X)

Ac-W(Nⁱⁿ-Boc)-Q(Trt)-P-C(Trt)-P-A-E(OtBu)-S(tBu)-W(Nⁱⁿ-Boc)-T(tBu)-F-C(Trt)-W(Nⁱⁿ-Boc)-D(OtBu)-P-GGGK-NH-TGR

1. Fmoc-J-OH/HATA/DIEA/NMP, 12 h, RT
2. 20% 哌啶/DMF (2 x 10 min)
3. DMF 洗涤 (4X)
4. 重复步骤 1-3

Ac-W(Nⁱⁿ-Boc)-Q(Trt)-P-C(Trt)-P-A-E(OtBu)-S(tBu)-W(Nⁱⁿ-Boc)-T(tBu)-F-C(Trt)-W(Nⁱⁿ-Boc)-D(OtBu)-P-GGGK(NH₂-JJ)-NH-TGR

1. 试剂 B, 4.5 h, RT
2. 挥发物的蒸发
3. Et₂O (线性肽粗品的沉淀)
4. DMSO (aq) / N-甲基葡萄糖胺

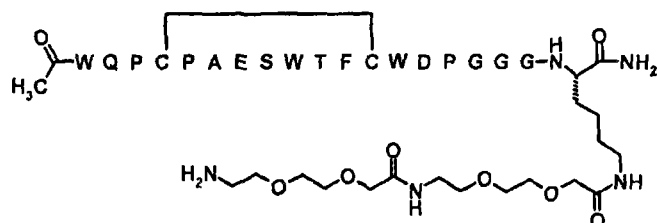


图 1

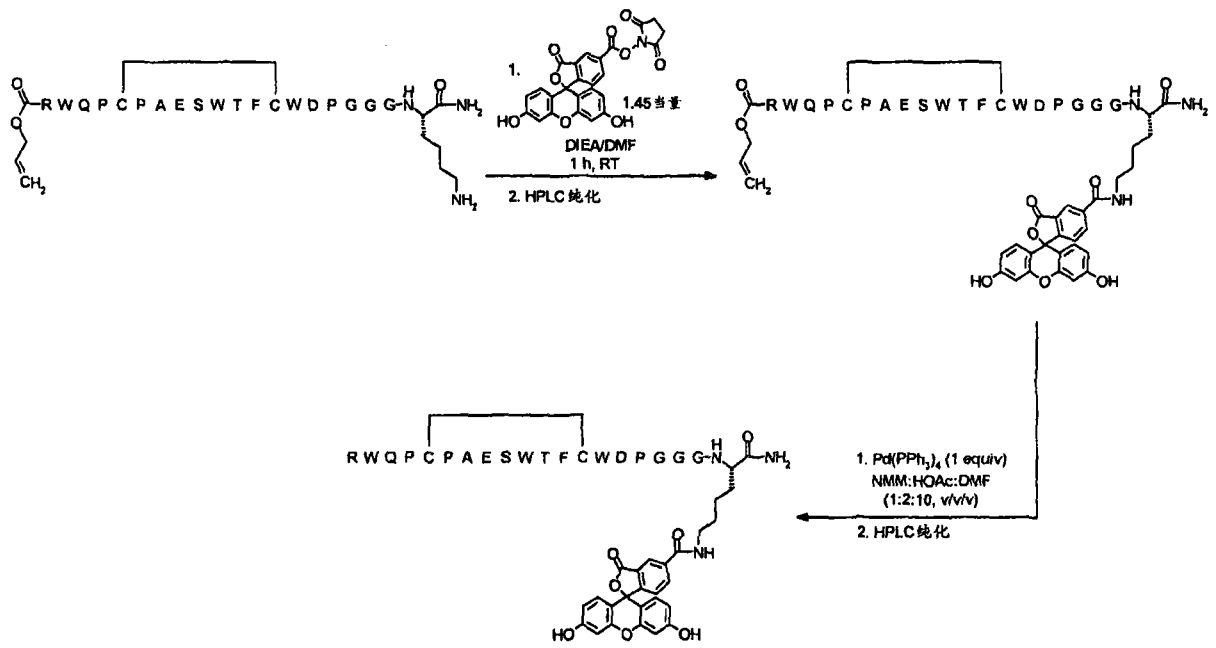


图2

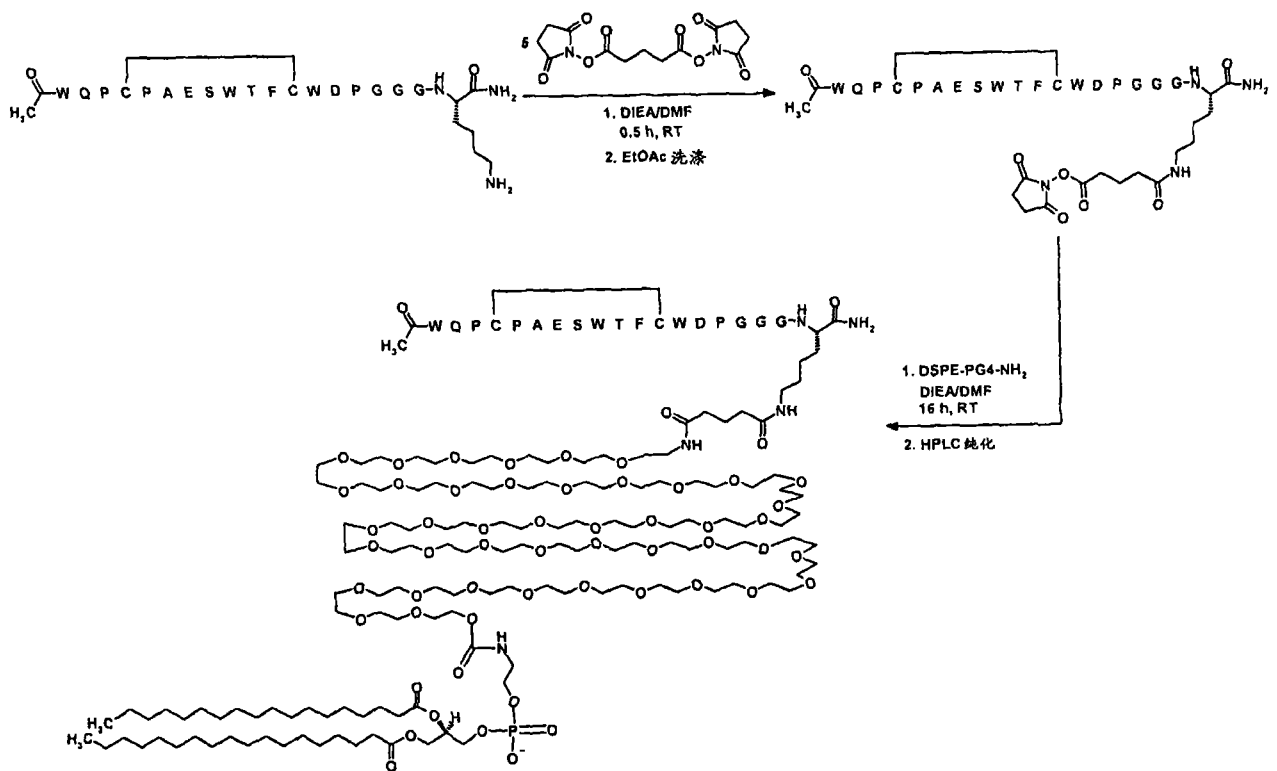


图3

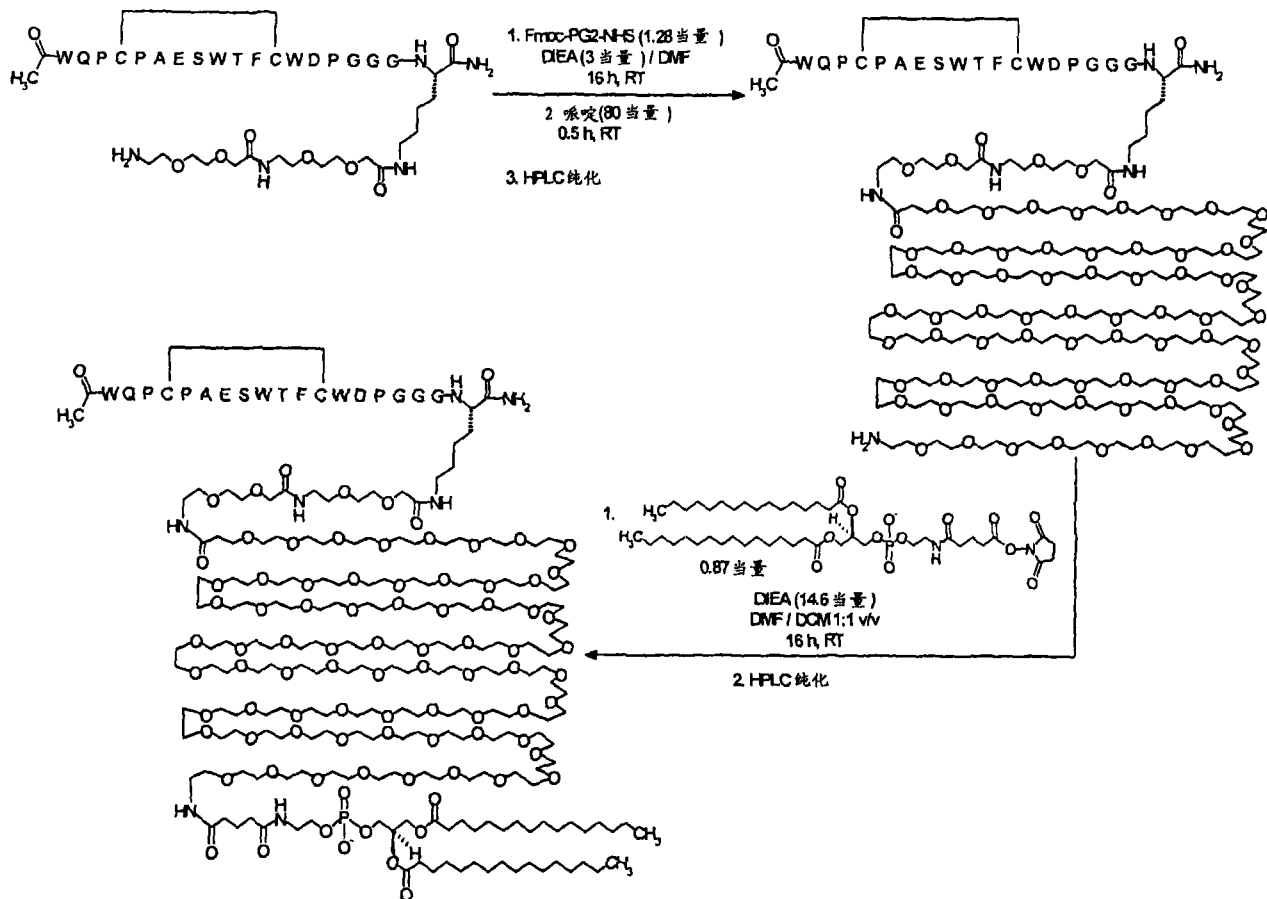


图5

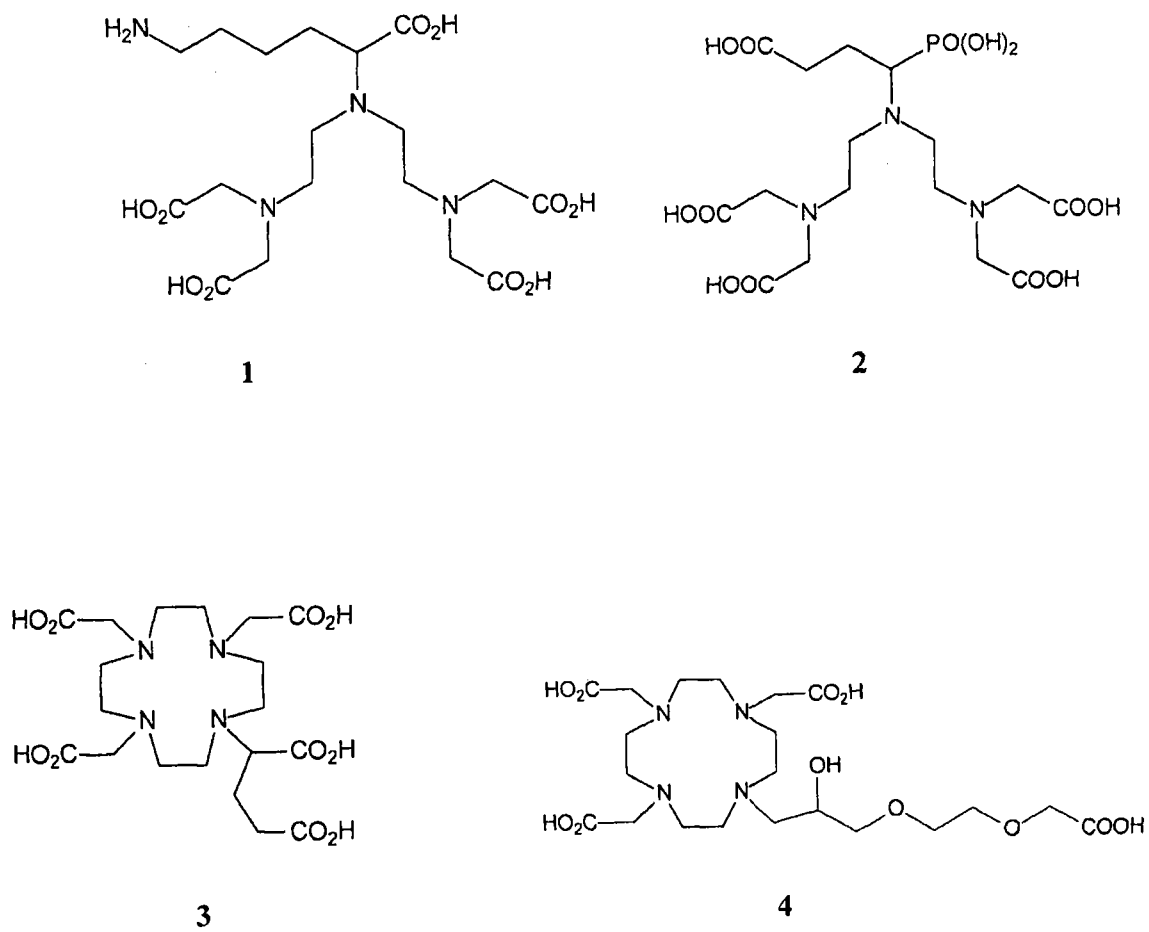


图 6A

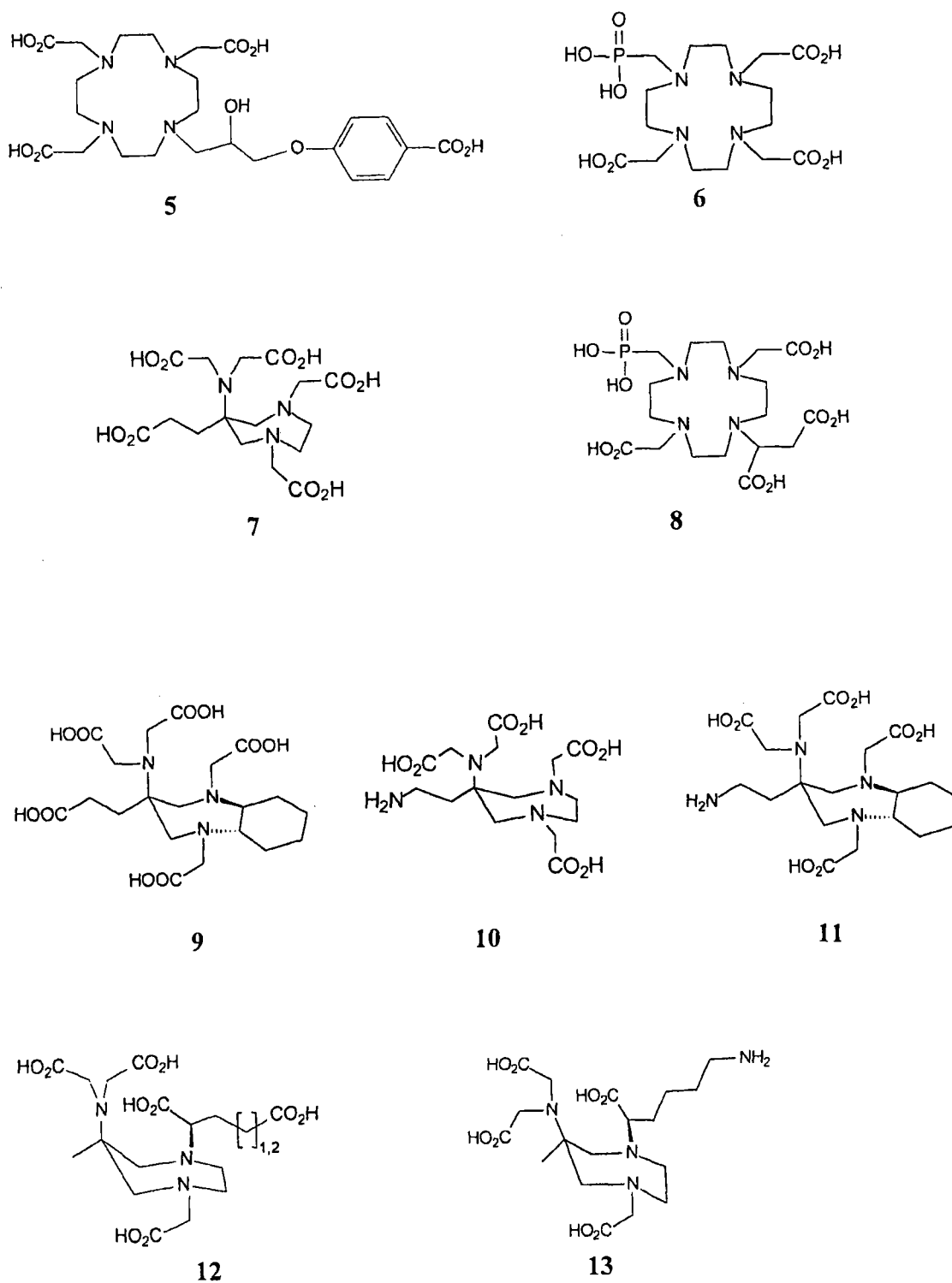


图6B

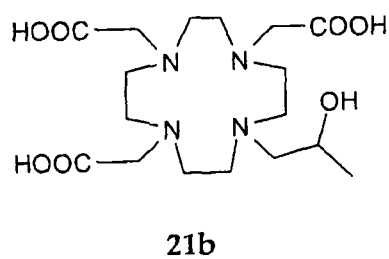
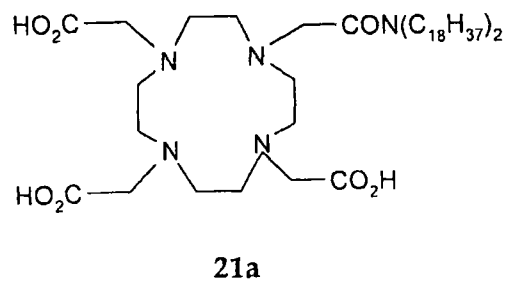
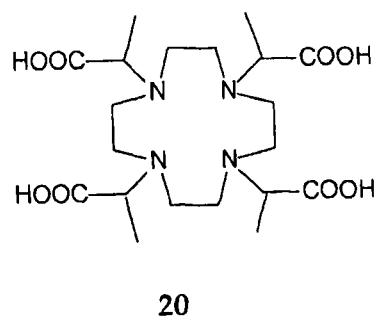
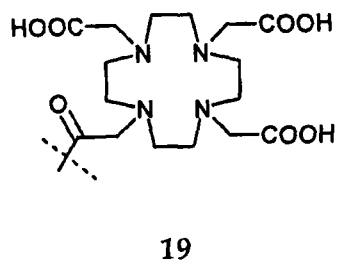
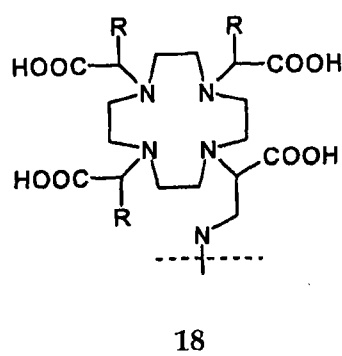
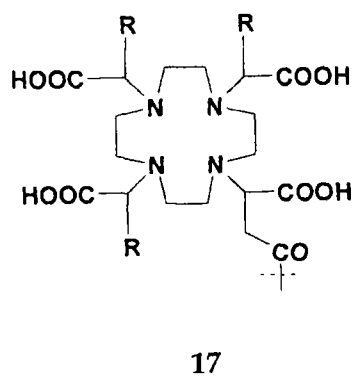
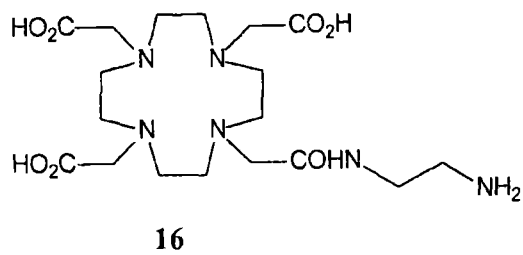
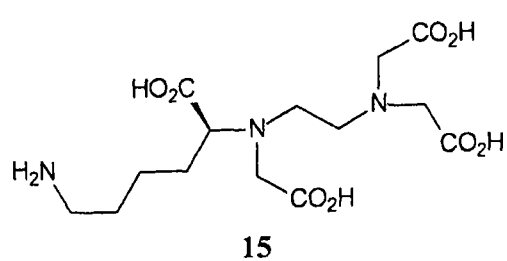
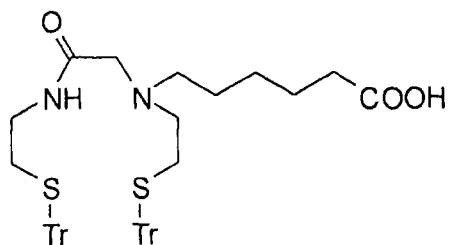
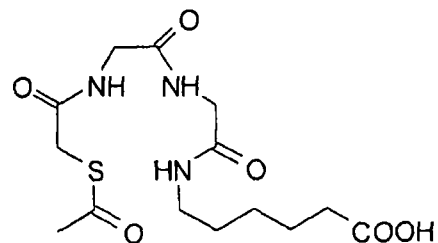


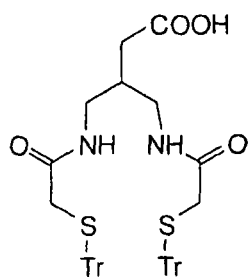
图6C



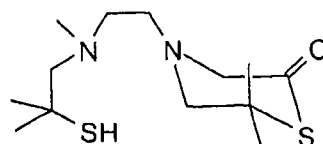
22



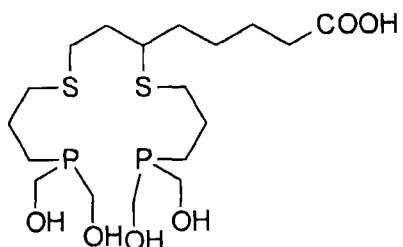
23



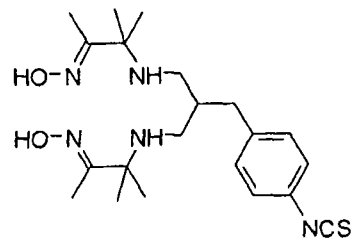
24



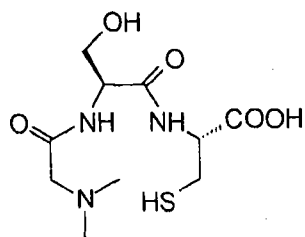
25



26

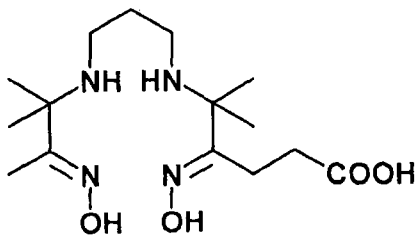


27

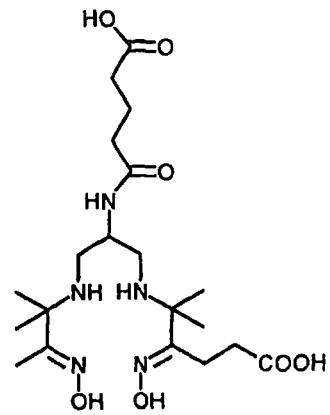


28

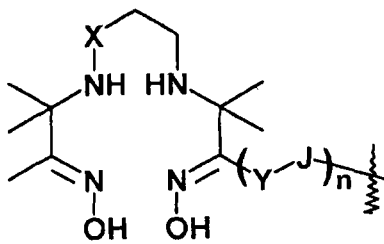
图7A



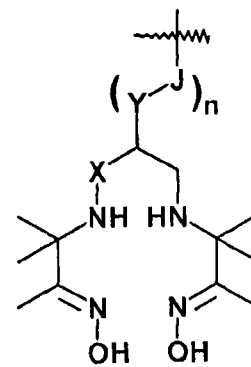
29



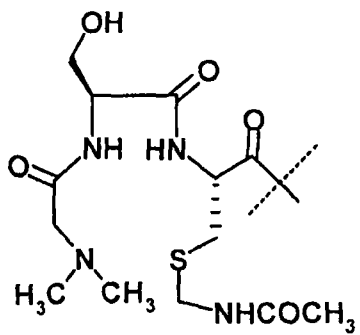
30



31



32



33

图 7B

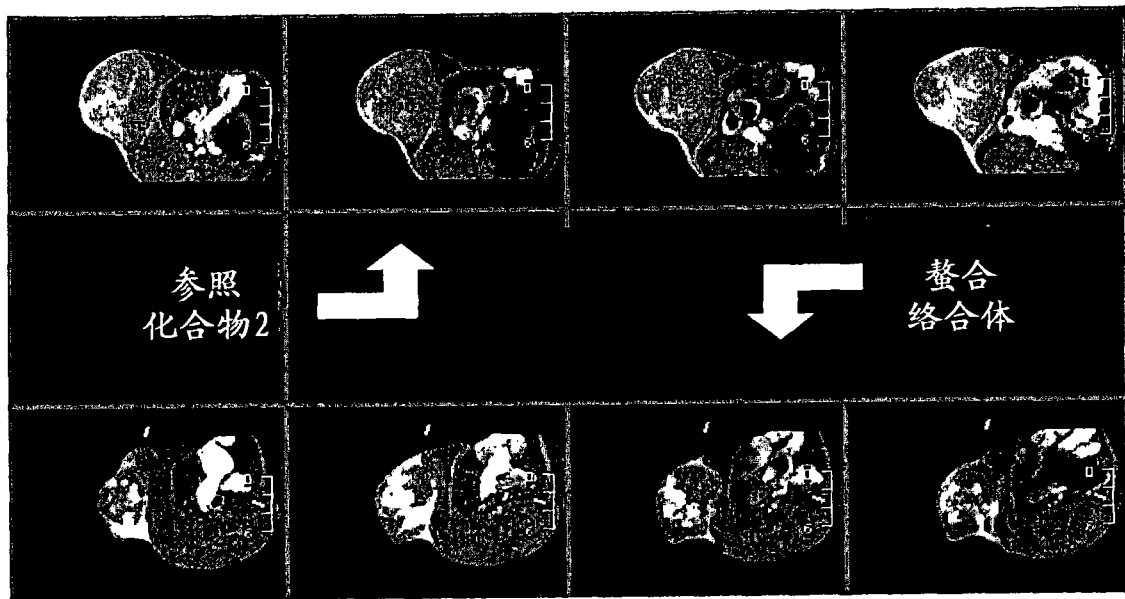


图 8