(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110741242 B
(45)授权公告日 2023.07.07

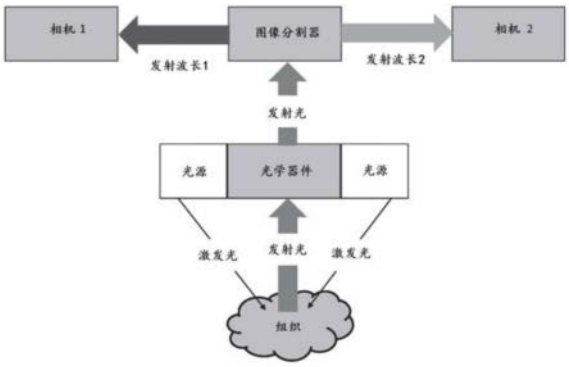
(21)申请号 201880038173.9
(22)申请日 2018.04.05
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110741242 A
(43)申请公布日 2020.01.31
(30)优先权数据
62/483,004 2017.04.07 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.12.09
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/026336 2018.04.05
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/187629 EN 2018.10.11
(73)专利权人 艾维拉斯生物科学公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 亚历克·哈鲁图涅
杰瑟斯·E·冈萨雷斯
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 张少波 杨明钊
(51)Int.Cl.
G01N 21/64(2006.01)
G01N 33/483(2006.01)
(56)对比文件
CN 103874512 A,2014.06.18
CN 103874512 A,2014.06.18
WO 2004005895 A1,2004.01.15
WO 2016148657 A1,2016.09.22
US 2013221240 A1,2013.08.29
US 2015050650 A1,2015.02.19
US 2012150043 A1,2012.06.14
US 2016110870 A1,2016.04.21
审查员 初孟霖
权利要求书3页 说明书48页 附图23页

(54)发明名称

比率荧光成像方法

(57)摘要

本文公开了比率荧光成像试剂,以及使用荧光比率和强度阈值以提高的准确性检测并可视化生物样本中的生物活性区域的图像处理方法。



CN 110741242 B

1.一种用于检测生物样本中的生物活性区域的方法,该方法包括:

a)使生物样本与所述生物活性的比率荧光指示剂接触;

b)在第一发射波长下捕获所述生物样本的第一荧光强度图像,并且在第二发射波长下捕获所述生物样本的第二荧光强度图像;

c)组合所述第一荧光强度图像和所述第二荧光强度图像以创建荧光比率图像;

d)使用图像分析算法处理所述荧光比率图像、第一荧光强度图像、第二荧光强度图像或其任意组合,以检测生物活性区域,其中所述图像分析算法:

i)使用荧光比率阈值来创建所述荧光比率图像的掩模图像,和/或使用第一荧光强度阈值来创建所述第一荧光强度图像的掩模图像,和/或使用第二荧光强度阈值来创建所述第二荧光强度图像的掩模图像,

ii)如果两个或更多个掩模图像已在步骤i)中创建,则对所述两个或更多个掩模图像执行“与”逻辑运算,并且

iii)提供所述生物样本对于所述生物活性呈阳性或阴性的分类,其中所述分类基于对步骤i)中使用的所述荧光比率图像、第一荧光强度图像和第二荧光强度图像中的一个或更多个内目标区域的检测,其中所述荧光比率图像、所述第一荧光强度图像和所述第二荧光强度图像中的一个或更多个分别展现出超过在步骤i)中用于创建所述荧光比率图像的掩模图像的所述荧光比率阈值的荧光比率值,超过在步骤i)中用于创建所述第一荧光强度图像的掩模图像的所述第一荧光强度阈值的第一荧光强度值,以及超过在步骤i)中用于创建所述第二荧光强度图像的掩模图像的所述第二荧光强度阈值的第二荧光强度值,以及

iv)任选地将分类结果存储在计算机存储器中。

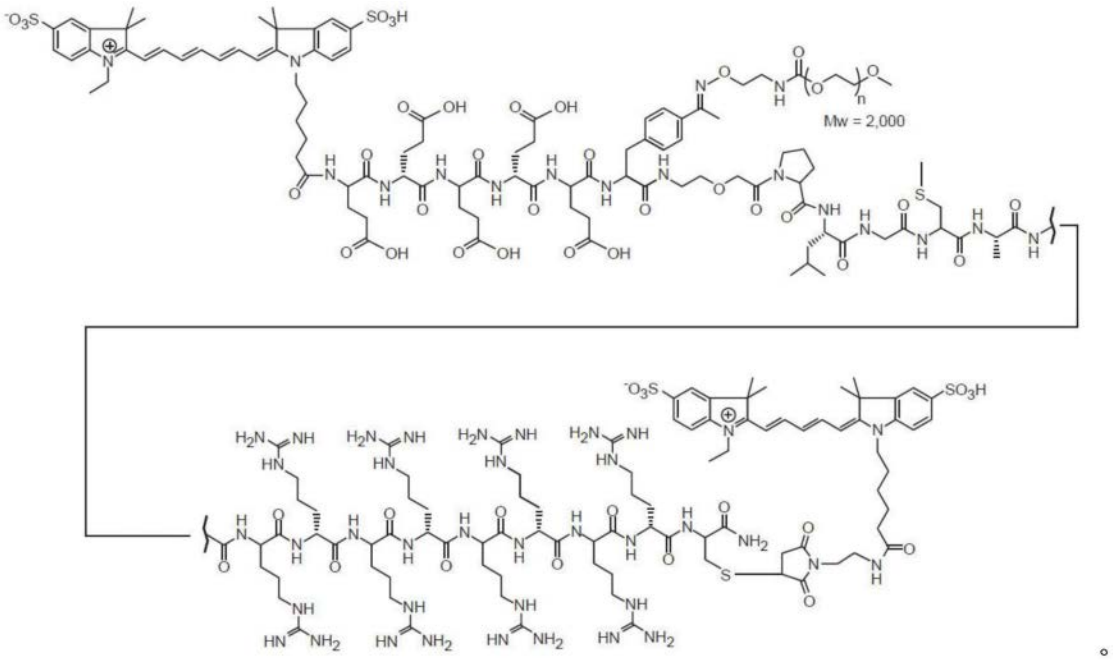
2.根据权利要求1所述的方法,其进一步包括显示所述荧光比率图像、所述第一荧光强度图像、所述第二荧光强度图像或其任意组合内的所述目标区域。

3.根据权利要求1所述的方法,其中所述生物样本是细胞样品、离体组织样品或体内组织样品。

4.根据权利要求1所述的方法,其中步骤(b)至(d)以限定的时间间隔重复两次或更多次,以提供一系列第一荧光强度图像、第二荧光强度图像和荧光比率图像,以供监测生物活性随时间的变化。

5.根据权利要求1所述的方法,其中使用内窥镜捕获所述第一荧光强度图像和所述第二荧光强度图像,并且所述目标区域的显示用来引导所述内窥镜的定位。

6.根据权利要求1所述的方法,其中所述比率荧光指示剂是具有如下结构的SDM-25:



7.根据权利要求1所述的方法，其中在创建所述荧光比率图像之前，用图像曝光时间对所述第一和第二荧光强度图像进行归一化。

8.根据权利要求1所述的方法，其中目标区域内的平均荧光比率或平均荧光强度值提供了所述目标区域中的生物活性的定性或定量度量。

9.一种用于自动优化用来检测生物样本的比率荧光图像中的生物活

性区域的荧光比率和荧光强度阈值的方法，该方法包括：

a)使多个生物样本与生物活性的比率荧光指示剂接触；

b)为每个生物样本捕获在第一发射波长的第一荧光强度图像和在第二发射波长的第二荧光强度图像；

c)组合所述第一荧光强度图像和所述第二荧光强度图像以为每个生物样本创建荧光比率图像；

d)提供第一荧光强度阈值、第二荧光强度阈值或荧光比率阈值中的一个或更多个的起始值；以及

e)对于每个生物样本：

i)使用图像分析算法处理以及使用各自的起始阈值所述荧光比率图像、第一荧光强度图像和第二荧光强度图像中的一个或更多个，其中所述图像分析算法：

(A)使用所述各自的荧光比率阈值、第一荧光强度阈值以及第二荧光强度阈值来创建所述荧光比率图像的掩模图像、所述第一荧光强度图像的掩模图像和所述第二荧光强度图像的掩模图像中的一个或多个，

(B)如果两个或更多个掩模图像已在步骤(A)创建，则对所述掩模图像执行“与”逻辑运算，

(C)在步骤(A)中创建任何掩模图像或者在步骤(B)中执行所述“与”逻辑运算时，任选地，所述图像分析算法核实所述荧光比率图像、第一荧光强度图像和第二荧光强度图像中的一个或更多个内所检测的目标区域大于指定的最小大小，其中所检测的目标区域是展现出的荧光比率或荧光强度值超过各自的荧光比率阈值、第一荧光强度阈值或第二荧光强度

阈值的区域，并且

(D)使用在步骤(A)中创建的所述掩模图像中的任一个，或者使用步骤(B)的所述“与”逻辑运算，如果已检测到目标区域，则所述图像分析算法提供所述生物样本对于所述生物活性呈阳性的分类，或者如果未检测到目标区域，则所述图像分析算法提供所述生物样本对于所述生物活性呈阴性的分类；

ii)将所述图像分析算法提供的分类与所述生物样本的病理学实验室检验结果进行比较，以确定所述分类是真阳性、假阴性、真阴性还是假阳性；

iii)将所述真阳性、假阴性、真阴性或假阳性分类结果存储在计算机存储器中；以及

f)用以下值重复步骤(e)：

i)当第一荧光强度图像被处理时，使用所述第一荧光强度阈值的值递增，而所述第二荧光强度阈值和荧光比率阈值保持固定，直到通过所述图像分析算法将所有生物样本分类为阴性，或者

ii)当第二荧光强度图像被处理时，使用所述第二荧光强度阈值的值递增，而所述第一荧光强度阈值和荧光比率阈值保持固定，直到通过所述图像分析算法将所有生物样本分类为阴性，或者

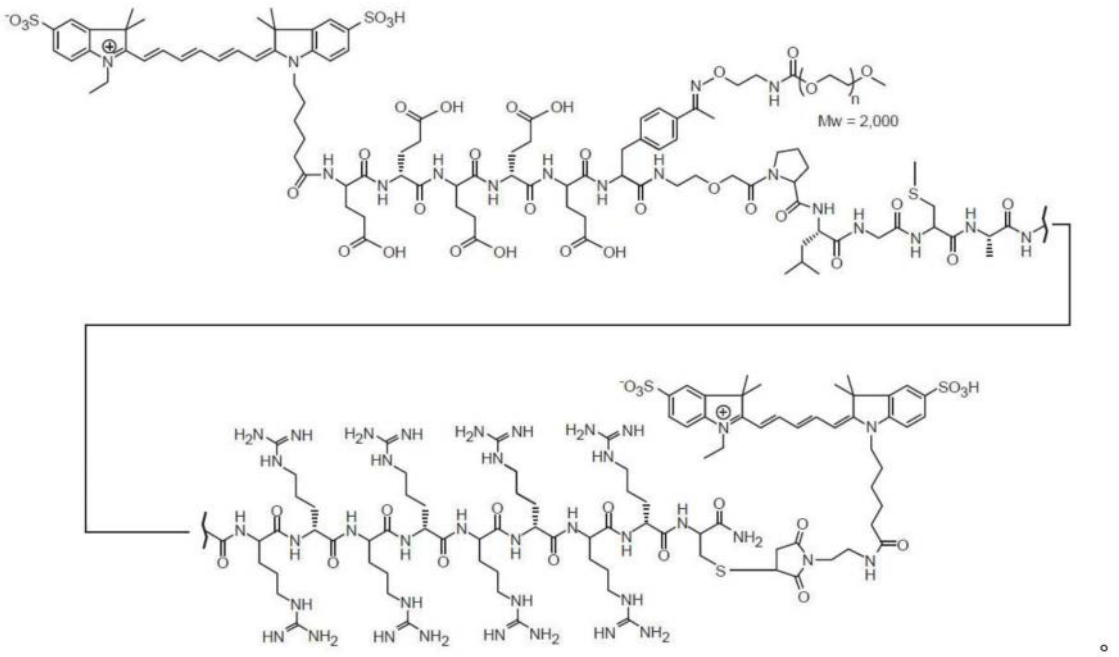
iii)当荧光比率图像被处理时，使用所述荧光比率阈值的值递增，而所述第一荧光强度阈值和第二荧光强度阈值保持固定，直到通过所述图像分析算法将所有生物样本分类为阴性；

g)对每组阈值，使用所存储的分类结果计算受试者工作特征(ROC)曲线；以及

h)对每组阈值，比较ROC曲线下面积，以确定所述荧光比率阈值、第一荧光强度阈值和第二荧光强度阈值中一个或更多个的最佳设置。

10.根据权利要求9所述的方法，其中所述生物样本是细胞样品、离体组织样品或体内组织样品。

11.根据权利要求9所述的方法，其中所述比率荧光指示剂是具有如下结构的SDM-25：



。

比率荧光成像方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年4月7日提交的第62/483,004号美国临时申请的权益,该临时申请通过引用并入本文。

发明内容

[0003] 本文公开了使用荧光比率和强度阈值检测并可视化生物样本中的生物活性区域的方法,该方法包括:a)使生物样本与所述生物活性的比率荧光指示剂接触;b)为所述生物样本捕获在第一发射波长的第一荧光强度图像和在第二发射波长的第二荧光强度图像;c)组合所述第一荧光图像和所述第二荧光图像以创建荧光比率图像;d)使用图像分析算法处理所述荧光比率图像、第一荧光强度图像、第二荧光强度图像或其任意组合,其中所述图像分析算法:i)使用荧光比率阈值、第一荧光强度阈值、第二荧光强度阈值或其任意组合来创建所述荧光比率图像的掩模图像、所述第一荧光强度图像的掩模图像、所述第二荧光强度图像的掩模图像或其任意组合,ii)如果两个或更多个掩模图像已在步骤(i)中创建,则对所述荧光比率图像的掩模图像、所述第一荧光强度图像的掩模图像、所述第二荧光强度图像的掩模图像或其任意组合执行“与”(AND)逻辑运算,并且iii)提供所述生物样本对于所述生物活性呈阳性或阴性的分类,其中所述分类基于对所述荧光比率图像、第一荧光强度图像、第二荧光强度图像或其任意组合内的目标区域的检测,所述区域展现出的荧光比率值或荧光强度值超过所述荧光比率阈值、第一荧光强度阈值、第二荧光强度阈值或其任意组合的值,以及e)向用户显示所述荧光比率图像、第一荧光强度图像或第二荧光强度图像内的所述目标区域,以及任选地将分类结果存储在计算机存储器中。

[0004] 在一些实施方案中,所述生物样本是细胞样品、离体组织样品或体内组织样品。在一些实施方案中,待检测并可视化的生物活性与疾病相关。在一些实施方案中,该疾病是关节炎、动脉粥样硬化、癌症、癌前病变、炎症或其任意组合。在一些实施方案中,该癌症是乳腺癌。在一些实施方案中,待检测并可视化的生物活性与恶性组织或凝血(血液凝固)相关。在一些实施方案中,步骤(b)至(e)以限定的时间间隔重复两次或更多次,以提供一系列第一荧光强度图像、第二荧光强度图像和荧光比率图像,以供监测生物活性随时间的变化。在一些实施方案中,实时提供所述目标区域的显示。在一些实施方案中,外科医生在术中设置中使用所述目标区域的显示来引导手术过程。在一些实施方案中,使用内窥镜捕获所述第一荧光强度图像和所述第二荧光强度图像,并且所述目标区域的显示用来引导所述内窥镜的定位。在一些实施方案中,所述比率荧光指示剂包含由可裂解的连接体隔开的荧光供体部分和荧光受体部分。在一些实施方案中,所述荧光供体部分和荧光受体部分分别为Cy5和Cy7。在一些实施方案中,所述可裂解的连接体包含可被蛋白酶裂解的肽键。在一些实施方案中,所述蛋白酶是金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶或半胱氨酸蛋白酶。在一些实施方案中,所述比率荧光指示剂包含式(I)的分子:

[0005] $[D_A\text{-}c_A]\text{-}A\text{-}[c_M\text{-}M]\text{-}X\text{-}B\text{-}[c_B\text{-}D_B]$ 式(I)

[0006] 其中X是可被蛋白酶裂解的可裂解的连接体,A是具有包含5至20个酸性氨基酸残

基的序列的肽，B是具有包含5至20个碱性氨基酸残基的序列的肽，c_A、c_B和c_M各自独立地包含0至1个氨基酸，M是大分子，并且D_A和D_B是能够彼此发生荧光共振能量转移的一对受体和供体荧光部分；并且其中[c_M-M]结合至A或X上的任何位置，[D_A-c_A]结合至A的任何氨基酸残基，且[c_B-D_B]结合至B的任何氨基酸残基。在一些实施方案中，式(I)的分子是SDM-25。在一些实施方案中，仅使用荧光比率阈值来创建掩模文件。

[0007] 本文还公开了用于自动优化用来检测生物样本的比率荧光图像中的生物活性区域的荧光比率和荧光强度阈值的方法，该方法包括：a)提供多个生物样本；b)使每个生物样本与所述生物活性的比率荧光指示剂接触；c)为每个生物样本捕获在第一发射波长的第一荧光强度图像和在第二发射波长的第二荧光强度图像；d)组合所述第一荧光图像和所述第二荧光图像以为每个生物样本创建荧光比率图像；e)提供第一荧光强度阈值、第二荧光强度阈值、荧光比率阈值或其任意组合的起始值；以及f)对于每个生物样本：i)使用图像分析算法处理所述荧光比率图像、第一荧光强度图像、第二荧光强度图像或其任意组合，其中所述图像分析算法：使用所述荧光比率阈值、第一荧光强度阈值、第二荧光强度阈值或其任意组合来创建所述荧光比率图像的掩模图像、所述第一荧光强度图像的掩模图像、所述第二荧光强度图像的掩模图像或其任意组合，如果两个或更多个掩模图像已在上一步创建，则对所述荧光比率图像的掩模图像、所述第一荧光强度图像的掩模图像、所述第二荧光强度图像的掩模图像或其任意组合执行“与”逻辑运算，任选地核实所述荧光比率图像、第一荧光强度图像、第二荧光强度图像或其任意组合内所检测的目标区域大于指定的最小大小，其中所检测的目标区域是展现出的荧光比率或荧光强度值超过所述荧光比率阈值、第一荧光强度阈值、第二荧光强度阈值或其任意组合的值的区域，并且如果已检测到目标区域，则提供所述生物样本对于所述生物活性呈阳性的分类，或者如果未检测到目标区域，则提供所述生物样本对于所述生物活性呈阴性的分类；ii)将所述图像分析算法提供的分类与所述生物样本的病理学实验室检验结果进行比较，以确定所述分类是真阳性、假阴性、真阴性还是假阳性；iii)将所述真阳性、假阴性、真阴性或假阳性分类结果存储在计算机存储器中；以及g)用以下值重复步骤(f)：i)所述第一荧光强度阈值的值递增，而所述第二荧光强度阈值和荧光比率阈值保持固定，直到通过所述图像处理算法将所有生物样本分类为阴性，或者ii)所述第二荧光强度阈值的值递增，而所述第一荧光强度阈值和荧光比率阈值保持固定，直到通过所述图像处理算法将所有生物样本分类为阴性，或者iii)所述荧光比率阈值的值递增，而所述第一荧光强度阈值和第二荧光强度阈值保持固定，直到通过所述图像处理算法将所有生物样本分类为阴性；h)对每组荧光比率阈值、第一荧光强度阈值和第二荧光强度阈值的值，使用所存储的分类结果计算受试者工作特征(ROC)曲线；以及i)对每组荧光比率阈值、第一荧光强度阈值和第二荧光强度阈值的值，比较ROC曲线下面积，以确定所述荧光比率阈值、第一荧光强度阈值、第二荧光强度阈值或其任意组合的最佳设置。

[0008] 在一些实施方案中，所述所述生物样本是细胞样品、离体组织样品或体内组织样品。在一些实施方案中，待检测的生物活性与疾病相关。在一些实施方案中，该疾病是关节炎、动脉粥样硬化、癌症、癌前病变、炎症或其任意组合。在一些实施方案中，该癌症是乳腺癌。在一些实施方案中，待检测并可视化的生物活性与恶性组织或凝血(血液凝固)相关。在一些实施方案中，所述比率荧光指示剂包含由可裂解的连接体隔开的荧光供体部分和荧光受体部分。在一些实施方案中，所述荧光供体部分和荧光受体部分分别为Cy5和Cy7。在一些

实施方案中，所述可裂解的连接体包含可被蛋白酶裂解的肽键。在一些实施方案中，所述蛋白酶是金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶或半胱氨酸蛋白酶。在一些实施方案中，所述比率荧光指示剂是用Cy5和Cy7标记的SDM-25。

[0009] 本文公开了用于检测生物样本中的生物活性区域的比率荧光成像方法，该方法包括：a)使生物样本与所述生物活性的比率荧光指示剂接触；b)用第一激发波长的激发光照射所述生物样本；c)在第一发射波长下捕获所述生物样本的第一荧光强度图像；d)随后或同时在第二发射波长下捕获所述生物样本的第二荧光强度图像；以及e)提供用于组合所述第一荧光强度图像和所述第二荧光强度图像的图像处理软件以创建荧光比率图像，其中使用图像处理算法来检测或显示所述生物样本的荧光比率图像内展现出所述生物活性的目标区域，其中目标区域包括展现出的荧光比率值、第一荧光强度值、第二荧光强度值或其任意组合超过第一荧光强度阈值、第二荧光强度阈值、荧光比率阈值或其任意组合的值的比率图像区域。

[0010] 在一些实施方案中，所述第一和第二荧光强度图像是体外生物样本的捕获图像。在一些实施方案中，所述第一和第二荧光强度图像是体内生物样品的捕获图像。在一些实施方案中，所述生物样本是细胞样品、离体组织样品或体内组织样品。在一些实施方案中，所述比率荧光指示剂是式(I)的分子：

[0011] $[D_A\text{-}c_A]\text{-}A\text{-}[c_M\text{-}M]\text{-}X\text{-}B\text{-}[c_B\text{-}D_B]$ 式(I)

[0012] 其中X是可被蛋白酶裂解的可裂解的连接体，A是具有包含5至20个酸性氨基酸残基的序列的肽，B是具有包含5至20个碱性氨基酸残基的序列的肽，c_A、c_B和c_M各自独立地包含0至1个氨基酸酸，M是大分子，并且D_A和D_B是能够彼此发生荧光共振能量转移的一对受体和供体荧光部分；并且其中$[c_M\text{-}M]$结合至A或X上的任何位置，$[D_A\text{-}c_A]$结合至A的任何氨基酸残基，且$[c_B\text{-}D_B]$结合至B的任何氨基酸残基。

[0013] 在一些实施方案中，A是具有包含5至9个酸性氨基酸残基的序列的肽。在一些实施方案中，A是具有包含5或9个连续谷氨酸残基的序列的肽。在一些实施方案中，B是具有包含7至9个碱性氨基酸残基的序列的肽。在一些实施方案中，B是具有包含8或9个连续精氨酸残基的序列的肽。在一些实施方案中，A是包含5或9个连续谷氨酸残基的肽序列且B是包含8或9个连续精氨酸残基的肽序列。在一些实施方案中，A是包含5个连续谷氨酸残基的肽序列且B是包含8个连续精氨酸残基的肽序列。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地选自天然存在的氨基酸或非天然存在的氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地选自D氨基酸、L氨基酸、α-氨基酸、β-氨基酸或γ-氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地选自具有游离巯基的任意氨基酸，具有N-末端胺基的任意氨基酸，以及具有在与羟胺或肼基反应时能够形成肟或腙键的侧链的任意氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地选自D-半胱氨酸、D-谷氨酸、赖氨酸和对-4-乙酰基L-苯丙氨酸。在一些实施方案中，c_B是具有游离巯基的任意氨基酸。在一些实施方案中，c_B是D-半胱氨酸。在一些实施方案中，c_A是具有N-末端胺基的任意氨基酸。在一些实施方案中，c_A是D-谷氨酸。在一些实施方案中，c_A是赖氨酸。在一些实施方案中，c_M是具有在与羟胺或肼基反应时能够形成肟或腙键的侧链的任意氨基酸。在一些实施方案中，c_M是对-4-乙酰基L-苯丙氨酸。在一些实施方案中，X包含肽键。在一些实施方案中，X包含选自以下的氨基酸序列：PLGLAG、PLG-C(me)-AG、RPLALWRS、ESPAYYTA、DPRSFL、PPRSFL、RLQLKL和RLQLK(Ac)L。在一些实施方案中，X可被金属蛋白酶裂

解。在一些实施方案中，该金属蛋白酶是基质金属蛋白酶、ADAM金属蛋白酶、蛇毒蛋白酶(adamalysin)、冠毛素(pappalysin)、基质分解素(matrilysin)、中性溶酶(neprilysin)(中性内肽酶)、血管紧张素转化酶、金属羧肽酶或谷氨酸羧肽酶。在一些实施方案中，X包含可被MMP1、MMP2、MMP7、MMP9、MMP13或MMP14裂解的氨基酸序列。在一些实施方案中，X可被丝氨酸或苏氨酸蛋白酶裂解。在一些实施方案中，该丝氨酸蛋白酶是弹性蛋白酶、凝血因子(凝血酶、因子VIIa、因子IXa或因子Xa)、组织型纤溶酶原激活物、尿激酶型纤溶酶原激活物、纤溶酶、testisin、corin，组织或血浆激肽释放酶、类胰蛋白酶或二肽基肽酶。在一些实施方案中，X可被半胱氨酸蛋白酶裂解。在一些实施方案中，该半胱氨酸蛋白酶是组织蛋白酶B、组织蛋白酶K、组织蛋白酶S、组织蛋白酶L、胱天蛋白酶或豆荚蛋白(legumain)。在一些实施方案中，D_A和D_B是能够发生从一个到另一个的荧光共振能量转移的一对荧光受体和供体部分。在一些实施方案中，D_A和D_B是Cy5和Cy7。在一些实施方案中，第一激发波长为约610nm至约650nm。在一些实施方案中，第一发射波长为约660nm至约720nm。在一些实施方案中，第二发射波长为约760nm至约830nm。在一些实施方案中，D_A和D_B是Cy5和IR Dye750。在一些实施方案中，D_A和D_B是Cy5和IR Dye800。在一些实施方案中，D_A和D_B是Cy5和ICG。在一些实施方案中，步骤(c)至(e)以限定的时间间隔重复两次或更多次，以提供一系列荧光比率图像，以供监测生物活性随时间的变化。在一些实施方案中，在创建所述荧光比率图像之前，用图像曝光时间对所述第一和第二荧光强度图像进行归一化。在一些实施方案中，所述图像处理算法包括使用荧光比率阈值、第一荧光强度阈值、第二荧光强度阈值或其任意组合来检测目标区域。在一些实施方案中，所述图像处理算法进一步包括：(i)使用所述荧光比率阈值、第一荧光强度阈值、第二荧光强度阈值或其任意组合来创建所述荧光比率图像的掩模图像、所述第一荧光强度图像的掩模图像、所述第二荧光强度图像的掩模图像或其任意组合，(ii)如果两个或更多个掩模图像已在步骤(i)中创建，则对所述荧光比率图像的掩模图像、第一荧光强度图像的掩模图像、第二荧光强度图像的掩模图像或其任意组合执行“与”逻辑运算，以及(iii)如果已检测到目标区域，则提供所述生物样本对于所述生物活性呈阳性的分类，或者如果未检测到目标区域，则提供所述生物样本对于所述生物活性呈阴性的分类。在一些实施方案中，目标区域内的平均荧光比率或平均荧光强度值提供了该目标区域中的生物活性的定性度量。在一些实施方案中，目标区域内的平均荧光比率或平均荧光强度值提供了该目标区域中的生物活性的定量度量。在一些实施方案中，所检测的目标区域与癌性生物活性相关。在一些实施方案中，所述荧光比率图像在癌组织与正常组织之间提供至少1.5:1的对比度。在一些实施方案中，所述图像处理算法进一步包括核实所检测的目标区域大于指定的最小大小。

[0014] 本文公开了用于执行基于比率荧光成像的癌症诊断试验的方法，该方法包括：a)使生物样本与比率荧光指示剂接触；b)用第一激发波长的激发光照射所述生物样本；c)在第一发射波长下捕获所述生物样本的第一荧光强度图像；d)随后或同时在第二发射波长下捕获所述生物样本的第二荧光强度图像；以及e)提供用于组合所述第一荧光强度图像和所述第二荧光强度图像的成像软件以创建所述生物样本的荧光比率图像，其中使用图像处理算法来检测或显示生物样本的荧光比率图像内与癌性生物活性相关的目标区域。

[0015] 在一些实施方案中，在创建所述荧光比率图像之前，用图像曝光时间对所述第一荧光强度图像和所述第二荧光图像进行归一化。在一些实施方案中，所述图像处理算法包

括使用荧光比率阈值、第一荧光强度阈值、第二荧光强度阈值或其任意组合来检测与癌性生物活性相关的目标区域。在一些实施方案中，所述图像处理算法进一步包括：(i)使用所述荧光比率阈值、第一荧光强度阈值、第二荧光强度阈值或其任意组合来创建所述荧光比率图像的掩模图像、所述第一荧光强度图像的掩模图像、所述第二荧光强度图像的掩模图像或其任意组合，(ii)如果两个或更多个掩模图像已在步骤(i)中创建，则对所述荧光比率图像的掩模图像、第一荧光强度图像的掩模图像、第二荧光强度图像的掩模图像或其任意组合执行“与”逻辑运算，(iii)任选地核实所检测的目标区域大于指定的最小大小，以及(iv)如果已检测到目标区域，则提供所述生物样本对于所述癌性活性呈阳性的分类，或者如果未检测到目标区域，则提供所述生物样本对于所述癌性活性呈阴性的分类。在一些实施方案中，所述比率荧光指示剂是式(I)的分子：

[0016] $[D_A\text{-}c_A]\text{-A-}[c_M\text{-M}]\text{-X-B-}[c_B\text{-}D_B]$ 式(I)

[0017] 其中X是可被蛋白酶裂解的可裂解的连接体，A是具有包含5至20个酸性氨基酸残基的序列的肽，

[0018] B是具有包含5至20个碱性氨基酸残基的序列的肽，c_A、c_B和c_M各自独立地包含0至1个氨基酸酸，M是大分子，并且D_A和D_B是能够彼此发生荧光共振能量转移的一对受体和供体荧光部分；并且其中$[c_M\text{-M}]$结合至A或X上的任何位置，$[D_A\text{-}c_A]$结合至A的任何氨基酸残基，且$[c_B\text{-}D_B]$结合至B的任何氨基酸残基。在一些实施方案中，所述比率荧光指示剂是用Cy 5和Cy7标记的SDM-25。在一些实施方案中，所述癌性生物活性与黑素瘤、非黑素瘤皮肤癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌、胰腺癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、头颈癌、淋巴结癌、甲状腺癌、神经胶质瘤、胃肠癌或肉瘤相关。在一些实施方案中，向患者输注所述比率荧光指示剂，并且使用所述方法在切除后手术样本中检测乳腺癌。在一些实施方案中，关于癌症诊断的临床灵敏度大于80％。在一些实施方案中，关于癌症诊断的临床特异性大于80％。在一些实施方案中，向患者输注所述比率荧光指示剂，并且在术中使用所述方法指导手术过程。在一些实施方案中，所述方法提供检验结果，医师或保健提供者使用该检验结果来作出诊断或治疗决策。在一些实施方案中，将所述检验结果从执行所述方法的位置传送到所述医师或保健提供者的位置。

附图说明

[0019] 本发明的新特征在随附的权利要求书中具体阐述。通过参考以下对利用本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述和附图，将会对本发明的特征和优点获得更好的理解，在附图中：

[0020] 图1示出了包含Cy5荧光供体和Cy7荧光猝灭剂的选择性递送分子(SDM)(或可激活的细胞穿透肽(ACPP))的一个实施方案的结构。图1所示的结构是SDM-25分子。

[0021] 图2A-图2B示出了SDM-25的吸光度和荧光发射谱，SDM-25是一种比率ACPP(RACPP)，其包含与Cy7部分缀合并通过可裂解的连接体连接至与Cy5部分缀合的聚阳离子结构域上的聚阴离子结构域。图2A：在80％/20％PBS/乙腈中的17.5μg/mL SDM-25(AVB-620)从500nm至800nm的吸收光谱。图2B：使用630nm激发波长和620-850nm范围的发射波长，SDM-25在TCNB缓冲液中的荧光发射光谱。在与MMP9一起预孵育和不进行预孵育的情况下制备了两个样品。显示了代表性光谱(来自六个实验)。在用MMP9蛋白酶处理之前(红色)和之

后(蓝色),使用630nm激发光在比色皿荧光分光计中测量荧光发射光谱。裂解前,Cy5被Cy7猝灭,Cy7再次发出在780nm处吸收的激发光。裂解后,Cy7不再猝灭Cy5,导致670nm Cy5发射峰增加,而Cy7在780nm处的再发射减少。从710nm到840nm的残留肩峰很大程度上是由于Cy5发射引起的。

[0022] 图3A-图3C提供了数据示例,其示出了在人乳腺癌肿瘤组织和正常组织中观察到的SDM-25(AVB-620)的不同裂解率,以及在基于比率荧光成像的人乳腺癌组织检测中使用SDM-25的受试者工作特征(ROC)曲线。图3A:在25个配对的人乳腺癌患者组织匀浆中的SDM-25裂解率(每分钟裂解的nM)。显示了癌症阳性的肿瘤组织(红色菱形)和癌症阴性的相邻组织(蓝色三角形)。配对的样品用线连接。配对t检验得出P<0.0001以表示肿瘤与正常组织之间的显著性差异。图3B:相同数据的散点图,平均值±95%置信度。图3C:显示了肿瘤相比于正常组织的SDM-25裂解率检测的ROC曲线。

[0023] 图4A-图4B提供了数据示例,其示出了使用SDM-25对非恶性乳腺组织和肿瘤匀浆中的MMP活性进行定量。图4A:在10%明胶酶谱上分析来自三个代表性人乳腺癌样品和配对的正常组织的匀浆,该组织选自其数据在图3A-图3C中呈现的25名患者。重组活性MMP2和MMP9显示为标准品(每个泳道2ng)。图4B:在五个代表性人乳腺癌样品(标记为(1))和配对的正常组织(标记为(2))(包括图4A中示出的三对)中的六种MMP的ELISA定量。误差条是标准偏差。ND=检测不到。

[0024] 图5示意性地示出了比率荧光成像系统的一个非限制性实例,该比率荧光成像系统利用图像分割器将两个不同波长下的荧光发射成像到两个不同的相机上。

[0025] 图6提供了比率成像系统的示意图,其包括硬件(例如,图像采集硬件、处理器和计算机存储器)和软件组件(例如,操作系统以及图像采集、图像处理和图像显示软件模块)。

[0026] 图7示出了用来鉴别目标区域(ROI)的图像处理算法,该目标区域在荧光比率图像内展现出高荧光比率和/或荧光强度值。

[0027] 图8A-图8B示出了已输注了SDM-25(也称为AVB-620)的来自人类剂量递增研究的生物样本图像的荧光强度数据的实例。

[0028] 图9显示了数据示例,其表明使用SDM-25进行的比率荧光成像可以区分乳腺癌患者的恶性(阳性)组织和非恶性(阴性)组织。提供了来自原发性肿瘤和淋巴结的数据。误差条表示标准偏差。

[0029] 图10示出了图像处理算法,其用来鉴别目标区域(ROI)并提供已输注了比率荧光指示剂例如SDM-25的生物样本中的生物活性(例如,增强的酶活性)的预测。对于荧光强度比率阈值(例如,Cy5/Cy7荧光强度比率阈值)和/或荧光强度阈值(例如,Cy5荧光强度阈值)的给定组合,生成了阳性或阴性评分的预测。

[0030] 图11示出了图像处理算法,其用来确定已输注了比率荧光指示剂例如SDM-25的生物样品中生物活性(例如,增强的酶活性)的阳性或阴性预测。对于荧光比率阈值(例如,Cy5/Cy7荧光比率阈值)和/或荧光强度阈值(例如,Cy5荧光强度阈值)的给定组合,生成了阳性或阴性活性的确定。

[0031] 图12示出了图像处理算法的一个非限制性实例,其用来鉴别荧光比率和/或强度阈值的最准确的组合,以确定已输注了比率荧光指示剂例如SDM-25的生物样本中生物活性(例如,增强的酶活性)的存在。在该实例中,一个阈值(即荧光比率阈值或荧光强度阈值)发

生变化，而另一个阈值保持固定，以对一组生物样本，基于成像数据与病理学实验室数据的比较(或其它独立的生物活性确定)生成最准确的阈值。受试者工作特征(ROC)曲线是通过将来自不同荧光比率和/或强度阈值下的图像分析的预测与病理学实验室结果进行比较而生成的。

[0032] 图13A-图13C提供了使用荧光比率阈值和荧光强度阈值的不同组合生成的，来自已输注了SDM-25的人类患者的原发性肿瘤样本的ROC曲线的实例。

[0033] 图14A-图14B提供了使用荧光比率阈值和荧光强度阈值的不同组合生成的，来自已输注了SDM-25的人类患者的淋巴结样本的ROC曲线的实例。

[0034] 图15A-图15C提供了使用荧光比率阈值和荧光强度阈值的不同组合生成的，已输注了SDM-25的单个患者样本的ROC曲线的实例。

[0035] 图16提供了来自施用8mg剂量的SDM-25的患者的切除原发性肿瘤样本图像的实例，其中在输注后的第二天进行成像。白色表示Cy5/Cy7荧光比率阈值R≥120且Cy5强度阈值I≥50。阈值使用所描述的方法来确定。

[0036] 图17A-图17D提供了转移性淋巴结模型和体内诊断性成像方案的示意图。将乳腺癌细胞植入小鼠耳内并转移至颈部淋巴结(图17A)。为了评价淋巴结状态，通过尾静脉注射施用SDM-25(AVB-620)，并且在3-6小时后通过手术暴露颈部区域(图17B)并对淋巴结进行成像。获得荧光比率图像并使用RGB标度将其叠加显示在白光图像上，其中高荧光比率为红色，而低比率为蓝色——示例示于(图17C)。然后通过外科手术移除结节，并对其进行处理以进行H&E组织病理学分析(图17D)。使用RGB标度将病理学结果直接与图像比率值进行比较，其中红色等于高比率。红色箭头指示由SDM-25(AVB-620)荧光标记的转移性(癌症阳性)颈部淋巴结。青色箭头指示通过组织病理学确定为癌症阴性的颈部淋巴结。

[0037] 图18A-图18D显示了使用鼠4T1乳腺转移性淋巴结模型对荧光比率成像和组织病理学的比较。图18A:叠加有(右)和未叠加(左)荧光比率图像的代表性黑白背侧小鼠图像，其显示在小鼠耳的原发性肿瘤中有高荧光比率。图18B:SDM-25(AVB-620)生成的颈部淋巴结的荧光比率值，其按照由H&E组织病理学确定的癌症状态进行分组。示出了癌症阳性(红色菱形)和癌症阴性(蓝色三角形)淋巴结。黑线表示平均值±95％置信度。图18C:施用SDM-25(AVB-620)后6小时拍摄的暴露的淋巴结的代表性荧光比率图像，与反射光图像混合。使用RGB标度显示比率，其中红色表示高比率，蓝色表示低比率。红色和青色箭头分别指示通过H&E染色确定的癌症阳性和阴性淋巴结。图18D:显示了SDM-25(AVB-620)体内诊断性荧光信号的发展的动力学。在施用后1小时至48小时范围内的时间点进行成像。示出了癌症阳性(红色菱形)和癌症阴性(蓝色三角形)淋巴结。每个数据点的测量次数(N)在3至24的范围内，并且误差条表示标准偏差。

[0038] 图19A提供了来自施用8mg剂量的SDM-25的患者的原发性病灶切除术样本图像的表面边缘的第一示例，其中在输注后的第二天进行成像。

[0039] 图19B提供了来自施用8mg剂量的SDM-25的患者的原发性病灶切除术样本图像的表面边缘的第二示例，其中在输注后的第二天进行成像。

具体实施方式

[0040] 比率荧光检测和单强度荧光检测是用于体外和体内成像应用的方法。在一些情况

下,由于不同组织具有不同的形态、厚度、细胞组成和细胞外基质,因此干扰了在单波长下荧光发射的测量。比率荧光检测利用响应于特定生物活性在两个不同波长下产生比率变化的荧光剂或指示剂的组合。在一些情况下,该方法已显示出可减少由于多种实验因素而导致的假象,这些因素包括例如荧光团浓度差异、受试对象移动以及不同荧光检测器和仪器的激发光强度和/或荧光发射收集和检测效率的差异。

[0041] 在某些实施方案中,本文公开了用于体内和离体检测并可视化生物样本中的生物活性的比率荧光成像方法。在一些情况下,相对于本领域中描述的成像方法,本文描述的比率荧光成像方法具有提高的准确性。在一些情况下,通过使用在展现出目标生物活性的生物样本区域与不展现目标生物活性的生物样本区域之间提供更大辨别力的特定比率荧光指示剂,实现了准确性的提高。例如,如将在下面更详细地描述的,在一些情况下,通过使用包含荧光供体和荧光受体部分的比率可激活的细胞穿透肽(RACPP)来实现检测并可视化生物活性(例如,增强的蛋白酶活性)区域的准确性的提高。该RACPP的一个非限制性实例是SDM-25(也称为AVB-620),下面将对其进行更详细的描述。

[0042] 在一些情况下,通过使用本文公开的图像处理算法来产生并显示荧光比率图像和与所成像的生物样本中展现出特定生物活性或目标结构的区域相对应的目标区域(ROI),实现了检测并可视化生物活性区域的准确性的提高。在一些实例中,从荧光比率图像生成ROI。在一些实例中,从荧光比率图像和/或荧光强度图像的组合生成ROI。

[0043] 在一些情况下,通过使用提供更大辨别力的特定比率荧光指示剂和所公开的用于生成并显示荧光比率图像和ROI的图像处理算法,实现了检测并可视化生物活性区域的准确性的提高。

[0044] 使用所公开的比率成像技术检测并可视化的生物活性的实例包括但不限于离子浓度的变化(例如,Ca^{2+}离子的积累或释放,或局部pH的变化)、可激发细胞的跨膜电位的变化、蛋白酶活性增强的区域或其任意组合。在一些情况下,待检测并可视化的生物活性与诸如关节炎、动脉粥样硬化、癌症、乳腺癌、癌前病变、恶性组织、凝血(血液凝固)、炎症或其任意组合等各种疾病状态相关。

[0045] 在一些实例中,所公开的成像和图像处理方法用来实时可视化ROI。在一些实例中,这些方法在手术期间使用。在一些实例中,这些方法用来引导组织的手术切除。在一些实例中,待去除的组织是癌组织。在一些实例中,这些方法在内窥镜检查过程中使用。在一些实例中,这些方法用来引导内窥镜的定位或在微创外科手术中引导组织的手术去除。在一些实例中,这些方法用来离体可视化ROI。如上所述,在一些实例中,这些方法与包含荧光供体和荧光受体的可激活的细胞穿透肽(ACPP)(即比率ACPP)一起使用。在一些实例中,这些方法与SDM-25一起使用。在一些实例中,这些方法用于乳腺癌患者或从这些患者中取出的组织。

[0046] 定义

[0047] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语具有的含义与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。如在本说明书和所附权利要求书中使用的,除非上下文另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代物。除非另有说明,否则本文对“或者”的任何提及旨在涵盖“和/或”。

[0048] 如本文所用的,术语“生物样本”包括但不限于培养的细胞样品、原代细胞样品(例

如,其中细胞外基质已经被消化或溶解从而将单个细胞释放到悬浮液中的组织样品)、血液样品或其部分、离体组织样品(例如,活检样品或手术切除的样品)、体内组织样品(例如,在外科手术过程中暴露的肿瘤组织或边缘组织)等。生物样本可以从多种生物体中的任何一种收集,例如原核生物、真核生物、真菌、植物、动物或人。在一些情况下,生物样本是患者样品。

[0049] 如本文所用的,术语“生物活性”包括但不限于离子浓度或转运活性的变化(例如,Ca^{2+}离子的积累或释放,或局部pH的变化)、可激发细胞的跨膜电位的变化、蛋白酶活性增强的区域、可使用比率荧光指示剂监测的其它生化或生理过程的变化,或其任意组合。

[0050] 如本文所用的,术语“比率荧光指示剂”(或“比率荧光探针”)和“比率荧光成像”在其广义上使用,不仅包括使用常规比率指示剂(例如,基于荧光共振能量转移(FRET)的探针)和相关的成像技术,而且包括例如使用两种或更多种荧光团(例如,不能进行FRET配对的荧光团)的组合的情况,其中一种荧光团用作内部对照,而至少一种其它荧光团用作目标生物活性的指示剂。在一些情况下,比率荧光指示剂是显像剂,例如用于体内成像应用。

[0051] 如本文所用的,术语“激发波长”是指用来激发荧光指示剂(例如,荧光团或染料分子)并产生荧光的光的波长。尽管通常将激发波长指定为单个波长,例如620nm,但是本领域技术人员应当理解,本说明书是指以指定波长为中心的波长范围或激发滤光器带通。在一些情况下,指定激发波长的光包括指定波长±2nm、±5nm、±10nm、±20nm、±40nm、±80nm或更多的光。在一些情况下,所使用的激发波长可以与荧光指示剂的吸收峰最大值一致,也可以不一致。

[0052] 如本文所用的,术语“发射波长”是指当被适当波长的光激发时,荧光指示剂(例如,荧光团或染料分子)所发射的光的波长。尽管通常将发射波长指定为单个波长,例如670nm,但是本领域技术人员应当理解,本说明书是指以指定波长为中心的波长范围或发射滤光器带通。在一些情况下,指定发射波长的光包括指定波长±2nm、±5nm、±10nm、±20nm、±40nm、±80nm或更多的光。

[0053] 如本文所用的,术语“实时”是指获取、处理和/或显示荧光图像数据的速率,使得例如外科医生在外科手术过程中使用该信息来引导病变组织的去除。通常,如本文所用的术语“实时”是指至少0.5Hz、至少1Hz、至少5Hz、至少10Hz、至少20Hz、至少30Hz、至少40Hz、至少50Hz、至少60Hz、至少70Hz、至少80Hz、至少90Hz或至少100Hz的图像采集、处理和/或显示的更新率。

[0054] 如本文所用的术语“手术”是指用来通过物理干预在组织中考察、操作、改变或产生效果的任何方法。这些方法包括但不限于开放手术、内窥镜手术、腹腔镜手术、微创手术、机器人手术以及任何影响癌组织的操作,如肿瘤切除、癌组织消融、癌症分期、癌症诊断、淋巴结分期、前哨淋巴结的检测或癌症治疗。

[0055] 如本文所用的术语“引导手术”是指外科医生使用显像剂来引导手术的任何手术操作。

[0056] 如本文所用的术语“癌症”是指涉及人体内细胞的不受控生长或增殖的任何疾病。癌症的特征可以进一步在于细胞从原始部位迁移并扩散至远处部位(即转移)的能力。癌症可以是肉瘤、癌、淋巴瘤、白血病、胚细胞瘤或生殖细胞瘤。癌症可以发生在多种组织中,包括但不限于肺、乳腺、卵巢、结肠、食道、直肠、骨、前列腺、脑、胰、膀胱、肾、肝、血细胞、淋巴

结和胃。

[0057] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在此可互换使用，是指氨基酸残基的聚合物。这些术语适用于天然存在的氨基酸聚合物以及其中一个或多个氨基酸残基是非天然存在的氨基酸(例如，氨基酸类似物)的氨基酸聚合物。这些术语涵盖任意长度的氨基酸链，包括全长蛋白质(即，抗原)，其中氨基酸残基通过共价肽键连接。

[0058] 当在此提供氨基酸序列时，也考虑到该序列的L-、D-或β氨基酸形式，以及其逆序、反转和逆-反转同种型。肽还包括其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物，以及天然存在的氨基酸聚合物。另外，该术语还适用于通过肽键或通过其它修饰的连接所连接的氨基酸(例如，其中肽键被替换为α-酯、β-酯、硫代酰胺、磷酰胺、氨基甲酸酯、羟基化物等(参见，例如，Spatola，(1983) Chem.Biochem.Amino Acids and Proteins 7:267-357)，其中酰胺被替换为饱和胺(参见，例如，Skiles等人，美国专利4,496,542，其通过引用并入本文，和Kaltenbronn等人(1990) Proc.11th American Peptide Symposium,ESCOM Science Publishers,The Netherlands中的第969-970页，等等))。

[0059] 术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸，以及以与天然存在的氨基酸相似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是那些由遗传密码编码的氨基酸以及后来修饰的氨基酸，例如，羟脯氨酸、γ-羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸被分组为疏水性氨基酸、极性氨基酸、非极性氨基酸和带电荷的氨基酸。疏水性氨基酸包括小疏水性氨基酸和大疏水性氨基酸。小疏水性氨基酸可以是甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸及其类似物。大疏水性氨基酸可以是缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸及其类似物。极性氨基酸可以是丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、酪氨酸及其类似物。非极性氨基酸可以是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸及其类似物。带电荷的氨基酸可以是赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸、谷氨酸及其类似物。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构(即，结合至氢、羧基、氨基和R基团的α碳)的化合物，例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砜。这样的类似物具有修饰的R基团(例如，正亮氨酸)或修饰的肽骨架，但是保留了与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指结构不同于氨基酸的一般化学结构，但以与天然存在的氨基酸相似的方式起作用的化学化合物。氨基酸是D氨基酸或L氨基酸。

[0060] 在一些情况下，这类保守修饰的变体还包括并且不排除本发明的多态性变体、种间同源物和等位基因。

[0061] 比率荧光成像

[0062] 比率荧光成像已广泛用于多种测量，包括细胞内离子浓度、细胞膜电压和细胞内pH动力学的实时测量。如上所述，比率成像技术通过观察荧光发射波长的变化或通过比较荧光团组合的发射强度而不是监测强度的简单变化，而克服了使用荧光强度测量进行定量所固有的一些局限性(例如，荧光指示剂浓度的变化，激发光强度的变化或不同仪器之间收集和检测荧光发射的效率，以及由于组织具有不同形态、厚度、细胞组成和细胞外基质等而引起的体内成像的其它挑战)。

[0063] 在一些情况下，所述比率荧光指示剂包括这样的分子，其在单个激发波长下被激发，并且在感测到特定的生物活性时，例如在离子结合或被蛋白酶裂解时，在荧光发射波长

上显示出位移。在这些情况下，相关的比率荧光成像技术包括用单个激发波长的光照射已输注了指示剂的生物样本，并在两个不同发射波长(连续或同时)下捕获荧光图像以创建荧光比率图像。

[0064] 在一些情况下，所述比率荧光指示剂包括这样的分子，其在单一发射波长下发射荧光，并且在感测到特定的生物活性时，例如在离子结合或被蛋白酶裂解时，显示出吸收最大值的位移。在这些情况下，相关的比率荧光成像技术包括用两个不同激发波长的光照射已输注了指示剂的生物样本，并在单个发射波长下连续捕获荧光图像以创建荧光比率图像。

[0065] 在一些情况下，所述“比率荧光指示剂”包括一组两个或更多个荧光团，其中一个用作内部对照(例如，用于监测染料浓度或基线生物过程)，并且其中一个或多个用作目标生物活性的指示剂。在这些情况下，相关的比率荧光成像技术包括用两个或更多个不同激发波长的光照射已输注了一组两个或更多个荧光团的生物样本，并在两个或更多个不同发射波长下连续捕获荧光图像，以创建一个或多个荧光比率图像。

[0066] 比率荧光指示剂

[0067] 已经开发出多种比率荧光指示剂，用于监测细胞内离子浓度、细胞膜电压、蛋白酶活性和其它生物过程。实例包括但不限于钙指示剂Indo-1、Fura-2、Fura-4F、Fura-6F、Fura-FF和Fura-Red(或组合使用的Fluo-3和Fura Red)(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA)；pH指示剂SNARF、Oregon Green和BCECF(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA)；膜偏振指示剂Di-4-ANEPPS、Di-8-ANEPPS、Di-2-ANEPEQ、JC-1和JC-9(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA)(另见Gonzalez,J.E.and Tsien,R.Y.(1997),“Improved Indicators of Cell Membrane Potential that use Fluorescence Resonance Energy Transfer”,Chemistry&Biology 4:269-277)；以及用荧光供体和荧光受体标记的比率酶底物，例如针对以下酶活性的比率指示剂:HIV-1蛋白酶活性(Jin等人(2011),“Visualization of HIV Protease Inhibition Using a Novel FRET Molecular Probe”,Biotechnol Prog.27(4):1107-1114)、基质金属蛋白酶MMP-7和其它基质金属蛋白酶活性(T.Jiang等人(2004),Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101:17867-17872;Scherer等人(2008),Optical Imaging of Matrix Metalloproteinase-7Activity In vivo Using a Proteolytic Nanobeacon”,Mol Imaging.7(3):118-131;Olson等人(2009)Integr.Biol.1:382-393)、弹性蛋白酶活性(Whitney等人(2010),J.Biol.Chem.285:22532-22541)、凝血酶活性(Whitney等人(2013),“Ratiometric Activatable Cell-Penetrating Peptides Provide Rapid In vivo Readout of Thrombin Activation”,Angew.Chem.Int.Ed.52,325-330)和胱天蛋白酶-3激活(Mizukami,S.等人(1999),“Imaging of Caspase-3Activation in HeLa Cells Stimulated with Etoposide Using a Novel Fluorescent Probe”,FEBS Lett.453,356-360)。

[0068] 基于荧光共振能量转移的比率荧光指示剂

[0069] 一些比率荧光指示剂依赖于荧光共振能量转移(FRET)机制来赋予其对特定目标生物活性的响应性。例如，用于监测蛋白酶活性的荧光酶底物是一类荧光指示剂，其通常依赖于基于FRET的机制，并且通常包含短肽序列或连接体(例如，对应于特定蛋白酶的全部或部分天然底物序列的肽序列)，其在一端用荧光团(例如荧光供体)标记，而在另一端用荧光

猝灭剂(例如荧光受体)标记。荧光猝灭剂本身可以是荧光团,也可以不是荧光团。在完整的基于FRET的探针中,荧光供体和猝灭剂彼此紧密靠近,例如,通常相隔小于约100 Å。除了要求荧光供体的发射光谱与荧光猝灭剂的吸收光谱基本重叠外,荧光共振能量转移过程的效率对分离距离I极其敏感,并且与$1/R^6$成比例。用蛋白酶裂解将供体和猝灭剂隔开的连接体会抑制能量转移过程的效率,从而导致荧光供体发射强度的增加和荧光受体发射的减少或消除(在受体是荧光团的情况下,这是比率探针所典型的)。监测荧光强度的变化(在比率探针的供体和受体的发射波长处)并与蛋白酶活性进行关联。

[0070] 比率可激活的细胞穿透肽(RACPP)

[0071] 可激活的细胞穿透肽(ACPP;也称为"选择性递送分子"(SDM))是能够将包括荧光染料或其它显像剂在内的各种货物(cargo)靶向递送到体内蛋白酶活性部位的分子(Whitney等人(2013),"Ratiometric Activatable Cell-Penetrating Peptides Provide Rapid In vivo Readout of Thrombin Activation",Angew.Chem.Int.Ed.52,325-330;Liu等人,WO2013/019681A2)。ACPP由附接在货物上的聚阳离子细胞穿透肽和带有蛋白酶可裂解连接体的聚阴离子抑制结构域组成。探针的活化和货物的摄取取决于连接聚阴离子和聚阳离子结构域的连接体序列的局部蛋白水解,其将探针转化为粘附形式。该方法通过被裂解的探针的积累来检测活组织中空间定位的酶活性。以前已经报道了ACPP靶向肿瘤中的基质金属蛋白酶(MMP)和弹性蛋白酶,以及动脉粥样硬化和脑损伤中的凝血酶活化。

[0072] 比率可激活的细胞穿透肽(RACPP)是这样的ACPP,其进一步包含荧光供体和受体部分,以提供FRET依赖性发射比率读数,以供实时监测蛋白酶活性(Whitney等人(2013),"Ratiometric Activatable Cell-Penetrating Peptides Provide Rapid In vivo Readout of Thrombin Activation",Angew.Chem.Int.Ed.52,325-330),并且对于体内成像而言比单发射波长探针具有明显优势。例如,ACPP内从Cy5到Cy7的FRET由于不需要冲洗就可以在裂解位点处产生反差以及消除了干扰单波长发射带处强度测量的许多非酶促因素,相比于基于强度的ACPP或荧光去猝灭探针提供了明显改善。其它优点包括在探针的酶促裂解后发生大的光谱位移,以及将可扩散底物转化为仍位于裂解位点处的粘合产物,从而提供提高的空间分辨率。发夹结构将Cy5和Cy7(或其它荧光供体-受体对)保持一定距离,以确保有效的FRET。探针的裂解导致发射率的较大变化(在Whitney等人(2013)报道的Cy5/Cy7标记的凝血酶激活RACPP的情况下,约为40倍),而与感测的底物序列或酶无关。

[0073] 在一些实施方案中,在当前公开的成像方法中使用的RACPP(或比率SDM探针)包含具有以下结构的式(I)的分子:

[0074] $[D_A\text{-}c_A]\text{-}A\text{-}[c_M\text{-}M]\text{-}X\text{-}B\text{-}[c_B\text{-}D_B]$ 式(I)

[0075] 其中

[0076] X是可被蛋白酶裂解的可裂解的连接体;

[0077] A是具有包含5至20个酸性氨基酸残基的序列的肽;

[0078] B是具有包含5至20个碱性氨基酸残基的序列的肽;

[0079] c_A、c_B和c_M各自独立地包含0至1个氨基酸;

[0080] M是大分子;并且

[0081] D_A和D_B是能够发生荧光共振能量转移的一对受体和供体荧光部分;并且其中$[c_M\text{-}M]$结合至A或X上的任何位置,$[D_A\text{-}c_A]$结合至A的任何氨基酸残基,且$[c_B\text{-}D_B]$结合至B的任何

氨基酸残基。

[0082] 在一些实施方案中,在当前公开的成像方法中使用的RACPP(或比率SDM探针)包含具有以下结构的式(II)的分子:

[0083] $[D_A\text{-}c_A]\text{-}A\text{-}[c_M\text{-}M]\text{-}X\text{-}B\text{-}Y\text{-}[c_B\text{-}D_B]$ 式(II)

[0084] 其中

[0085] X是可被蛋白酶裂解的可裂解的连接体;

[0086] Y是连接体;

[0087] A是具有包含5至20个酸性氨基酸残基的序列的肽;

[0088] B是具有包含5至20个碱性氨基酸残基的序列的肽;

[0089] c_A、c_B和c_M各自独立地包含0至1个氨基酸;

[0090] M是大分子;并且

[0091] D_A和D_B是能够发生荧光共振能量转移的一对受体和供体荧光部分;并且其中$[c_M\text{-}M]$结合至A或X上的任何位置,$[D_A\text{-}c_A]$结合至A的任何氨基酸残基,且$[c_B\text{-}D_B]$结合至Y。

[0092] 部分A

[0093] 在一些实施方案中,A是具有包含2至20个酸性氨基酸的序列的肽。在一些实施方案中,肽部分A包含约2至约20个酸性氨基酸。在一些实施方案中,肽部分A包含约5至约20个酸性氨基酸。在一些实施方案中,A具有包含5至9个酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含5至8个酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含5至7个酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含5个酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含6个酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含7个酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含8个酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含9个酸性氨基酸的序列。

[0094] 在一些实施方案中,肽部分A包含约2至约20个连续酸性氨基酸。在一些实施方案中,肽部分A包含约5至约20个连续酸性氨基酸。在一些实施方案中,A具有包含5至9个连续酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含5至8个连续酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含5至7个连续酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含5个连续酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含6个连续酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含7个连续酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含8个连续酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含9个连续酸性氨基酸的序列。

[0095] 在一些实施方案中,肽部分A包含约2至约20个选自天冬氨酸和谷氨酸的酸性氨基酸。在一些实施方案中,肽部分A包含约5至约20个选自天冬氨酸和谷氨酸的酸性氨基酸。在一些实施方案中,A具有包含5至9个选自天冬氨酸和谷氨酸的酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含5至8个选自天冬氨酸和谷氨酸的酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含5至7个选自天冬氨酸和谷氨酸的酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含5个选自天冬氨酸和谷氨酸的酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含6个选自天冬氨酸和谷氨酸的酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含7个选自天冬氨酸和谷氨酸的酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含8个选自天冬氨酸和谷氨酸的酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含9个选自天冬氨酸和谷氨酸的酸性氨基酸的序列。

[0096] 在一些实施方案中,肽部分A包含约2至约20个选自天冬氨酸和谷氨酸的连续酸性氨基酸。在一些实施方案中,肽部分A包含约5至约20个选自天冬氨酸和谷氨酸的连续酸性氨基酸。在一些实施方案中,A具有包含5至9个选自天冬氨酸和谷氨酸的连续酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含5至8个选自天冬氨酸和谷氨酸的连续酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含5至7个选自天冬氨酸和谷氨酸的连续酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含5个选自天冬氨酸和谷氨酸的连续酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含6个选自天冬氨酸和谷氨酸的连续酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含7个选自天冬氨酸和谷氨酸的连续酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含8个选自天冬氨酸和谷氨酸的连续酸性氨基酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含9个选自天冬氨酸和谷氨酸的连续酸性氨基酸的序列。

[0097] 在一些实施方案中,肽部分A包含约2至约20个谷氨酸。在一些实施方案中,肽部分A包含约5至约20个谷氨酸。在一些实施方案中,A具有包含5至9个谷氨酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含5至8个谷氨酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含5至7个谷氨酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含5个谷氨酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含6个谷氨酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含7个谷氨酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含8个谷氨酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含9个谷氨酸的序列。

[0098] 在一些实施方案中,肽部分A包含约2至约20个连续的谷氨酸。在一些实施方案中,肽部分A包含约5至约20个连续的谷氨酸。在一些实施方案中,A具有包含5至9个连续谷氨酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含5至8个连续谷氨酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含5至7个连续谷氨酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含5个连续谷氨酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含6个连续谷氨酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含7个连续谷氨酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含8个连续谷氨酸的序列。在一些实施方案中,A具有包含9个连续谷氨酸的序列。

[0099] 在一些实施方案中,部分A包含5个连续的谷氨酸(即,EEEEE或eeeee)。在一些实施方案中,部分A包含9个连续的谷氨酸(即,EEEEEEEEE或eeeeeeeee)。

[0100] 酸性部分A可以包括非酸性的氨基酸。酸性部分A可包含其它部分,如带负电荷的部分。在本文公开的选择性递送分子的实施方案中,酸性部分A是带负电荷的部分,优选地在生理pH下具有约2至约20个负电荷(不包括氨基酸)。

[0101] 在一些实施方案中,部分A中的负电荷的量与部分B中的正电荷的量大致相同。在一些实施方案中,部分A中的负电荷的量与部分B中的正电荷的量不同。在一些实施方案中,对于其中部分A中负电荷的量与部分B中正电荷的量不同的选择性递送分子,观察到改善的组织摄取。在一些实施方案中,对于其中部分A中负电荷的量与部分B中正电荷的量不同的选择性递送分子,观察到改善的溶解性。在一些实施方案中,对于其中部分A中负电荷的量与部分B中正电荷的量不同的选择性递送分子,观察到更快的组织摄取。在一些实施方案中,对于其中部分A中负电荷的量与部分B中正电荷的量不同的选择性递送分子,观察到更多的组织摄取。

[0102] 部分A是L-氨基酸或D-氨基酸。在本发明的实施方案中,为了使得免疫原性和由背景肽酶或蛋白酶导致的非特异性裂解最小化,D-氨基酸是优选的。

[0103] 应当理解,部分A可以包括非标准氨基酸,例如,羟赖氨酸、锁链素、异锁链素或其

它非标准氨基酸。部分A可以包括修饰的氨基酸，包括翻译后修饰的氨基酸，例如，甲基化的氨基酸(例如，甲基组氨酸、赖氨酸的甲基化形式等)、乙酰化的氨基酸、酰胺化的氨基酸、甲酰化的氨基酸、羟基化的氨基酸、磷酸化的氨基酸或其它修饰的氨基酸。部分A还可包括肽模拟部分，包括通过非肽键连接的部分和通过非氨基酸部分连接或连接至非氨基酸部分的氨基酸。

[0104] 当A位于氨基末端或A位于羧基末端时，本文公开的选择性递送分子都是有效的，即，肽键的任一取向都是允许的。

[0105] 部分B

[0106] 在一些实施方案中，B是具有包含5至15个碱性氨基酸的序列的肽。在一些实施方案中，肽部分B包含约5至约20个碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含约5至约12个碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含约7至约9个碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含约7至约8个碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含9个碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含8个碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含7个碱性氨基酸。

[0107] 在一些实施方案中，肽部分B包含约5至约20个连续的碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含约5至约12个连续的碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含约7至约9个连续的碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含约7至约8个连续的碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含9个连续的碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含8个连续的碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含7个连续的碱性氨基酸。

[0108] 在一些实施方案中，肽部分B包含约5至约20个选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含约5至约12个选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含约7至约9个选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含约7至约8个选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含9个选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含8个选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含7个选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的碱性氨基酸。

[0109] 在一些实施方案中，肽部分B包含约5至约20个选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的连续碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含约5至约12个选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的连续碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含约7至约9个选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的连续碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含约7至约8个选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的连续碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含9个选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的连续碱性氨基酸。在一些实施方案中，肽部分B包含8个选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸的连续碱性氨基酸。

[0110] 在一些实施方案中，肽部分B包含约5至约20个精氨酸。在一些实施方案中，肽部分B包含约5至约12个精氨酸。在一些实施方案中，肽部分B包含约7至约9个精氨酸。在一些实施方案中，肽部分B包含约7至约8个精氨酸。在一些实施方案中，肽部分B包含9个精氨酸。在一些实施方案中，肽部分B包含8个精氨酸。在一些实施方案中，肽部分B包含7个精氨酸。

[0111] 在一些实施方案中，肽部分B包含约5至约20个连续的精氨酸。在一些实施方案中，肽部分B包含约5至约12个连续的精氨酸。在一些实施方案中，肽部分B包含约7至约9个连续

的精氨酸。在一些实施方案中，肽部分B包含约7至约8个连续的精氨酸。在一些实施方案中，肽部分B包含9个连续的精氨酸。在一些实施方案中，肽部分B包含8个连续的精氨酸。在一些实施方案中，肽部分B包含7个连续的精氨酸。

[0112] 碱性部分B可以包括非碱性的氨基酸。碱性部分B可包含其它部分，如带正电荷的部分。在实施方案中，碱性部分B是带正电荷的部分，优选地在生理pH下具有约5至约20个正电荷(不包括氨基酸)。在一些实施方案中，部分A中的负电荷的量与部分B中的正电荷的量大致相同。在一些实施方案中，部分A中的负电荷的量与部分B中的正电荷的量不同。

[0113] 部分B是L-氨基酸或D-氨基酸。在本发明的实施方案中，为了使得免疫原性和由背景肽酶或蛋白酶导致的非特异性裂解最小化，D-氨基酸是优选的。已知寡-D-精氨酸序列的细胞摄取比寡-L-精氨酸的细胞摄取更好或与之一样好。

[0114] 应当理解，部分B可以包括非标准氨基酸，例如，羟赖氨酸、锁链素、异锁链素或其它非标准氨基酸。部分B可以包括修饰的氨基酸，包括翻译后修饰的氨基酸，例如，甲基化的氨基酸(例如，甲基组氨酸、赖氨酸的甲基化形式等)、乙酰化的氨基酸、酰胺化的氨基酸、甲酰化的氨基酸、羟基化的氨基酸、磷酸化的氨基酸或其它修饰的氨基酸。部分B还可包括肽模拟部分，包括通过非肽键连接的部分和通过非氨基酸部分连接或连接至非氨基酸部分的氨基酸。

[0115] 在X是可被蛋白酶裂解的肽的实施方案中，优选将X的C-末端连接至B的N-末端，从而由X裂解所产生的新的氨基末端能贡献额外的正电荷，该正电荷添加到B中已经存在的正电荷中。

[0116] 缀合基团(c)

[0117] 在一些实施方案中，货物(例如，D_A和D_B)和大分子载体(M)间接附接至A-X-B。

[0118] 在一些实施方案中，货物(例如，D_A和D_B)和大分子载体(M)通过缀合基团(c_A、c_B和c_M)间接附接至A-X-B。在一些实施方案中，货物(例如，D_A和D_B)和大分子载体(M)通过反应性缀合基团(c_A、c_B和c_M)间接附接至A-X-B。在一些实施方案中，货物(例如，D_A和D_B)和大分子载体(M)通过正交反应性缀合基团(c_A、c_B和c_M)间接附接至A-X-B。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地包含氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地包含0-10个氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地包含1个氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地包含2个氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地包含3个氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地包含4个氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地包含5个氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地包含6个氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地包含7个氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地包含8个氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地包含9个氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地包含10个氨基酸。

[0119] 在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地包含衍生的氨基酸。在一些实施方案中，多重货物(D)附接至衍生的氨基酸缀合基团。

[0120] 在一些实施方案中，所述缀合基团包含受体配体。

[0121] 在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地包含天然存在的氨基酸或非天然存在的氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地包含D氨基酸、L氨基酸、α-氨基酸、β-氨基酸或γ-氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地包含具有游离巯基的任意氨基

酸，含有游离胺基的任意氨基酸，具有N-末端胺基的任意氨基酸，以及具有在与羟胺或肼基反应时能够形成肟或腙键的侧链的任意氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地包含D-半胱氨酸、D-谷氨酸、赖氨酸和对-4-乙酰基L-苯丙氨酸。在一些实施方案中，c_B包含具有游离巯基的任意氨基酸。在一些实施方案中，c_B包含D-半胱氨酸。在一些实施方案中，c_A包含具有N-末端胺基的任意氨基酸。在一些实施方案中，c_A包含D-谷氨酸。在一些实施方案中，c_A包含赖氨酸。在一些实施方案中，cM包含具有在与羟胺或肼基反应时能够形成肟或腙键的侧链的任意氨基酸。在一些实施方案中，c_M包含对-4-乙酰基L-苯丙氨酸。

[0122] 在一些实施方案中，cA、c_B和c_M各自独立地选自天然存在的氨基酸或非天然存在的氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地选自D氨基酸、L氨基酸、α-氨基酸、β-氨基酸或γ-氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地为具有游离巯基的任意氨基酸，含有游离胺基的任意氨基酸，具有N-末端胺基的任意氨基酸，以及具有在与羟胺或肼基反应时能够形成肟或腙键的侧链的任意氨基酸。在一些实施方案中，c_A、c_B和c_M各自独立地选自：D-半胱氨酸、D-谷氨酸、赖氨酸和对-4-乙酰基L-苯丙氨酸。在一些实施方案中，c_B是具有游离巯基的任意氨基酸。在一些实施方案中，c_B是D-半胱氨酸。在一些实施方案中，c_A是具有N-末端胺基的任意氨基酸。在一些实施方案中，c_A是D-谷氨酸。在一些实施方案中，c_A是赖氨酸。在一些实施方案中，c_M是具有在与羟胺或肼基反应时能够形成肟或腙键的侧链的任意氨基酸。在一些实施方案中，c_M是对-4-乙酰基L-苯丙氨酸。

[0123] 显像剂(货物)

[0124] 在一些实施方案中，所述选择性递送分子的货物部分(D)包含显像剂，例如，荧光团或染料。在一些实施方案中，显像剂是荧光部分。在一些实施方案中，荧光部分选自：荧光蛋白、荧光肽、荧光染料、荧光材料或其组合。在一些实施方案中，显像剂包含附接到相同选择性递送分子上的荧光部分的组合(例如，D_A和D_B)。

[0125] 所有的荧光部分都涵盖在术语“荧光部分”中。本文给出的荧光基团的具体实例是说明性的，并非意在限定本文公开的靶向分子所使用的荧光部分。

[0126] 荧光染料的实例包括但不限于呫吨类(例如，罗丹明、对甲氨基酚和荧光素，以及它们的衍生物)；二甲基吡唑并[1,2-a]吡唑-1,7-二酮类(bimanes)；香豆素类和它们的衍生物(例如，伞形酮和氨基甲基香豆素)；芳族胺(例如，丹酰；方酸染料)；苯并呋喃；荧光花青；吲哚羰花青；咔唑类；二氰基亚甲基吡喃；聚甲炔；氧杂苯并蒽；呫吨；吡喃鎓；carbostyl；芘；吖啶酮；喹吖啶酮；红荧烯；蒽；蔻；酚蒽；苝；丁二烯；芴；卟啉；酞菁；镧系金属螯合物；稀土金属螯合物；以及这些染料的衍生物。

[0127] 荧光素染料的实例包括但不限于5-羧基荧光素、荧光素-5-异硫氰酸酯、荧光素-6-异硫氰酸酯和6-羧基荧光素。

[0128] 罗丹明染料的实例包括但不限于四甲基罗丹明-6-异硫氰酸酯、5-羧基四甲基罗丹明、5-羧基对甲氨基酚衍生物、四甲基罗丹明和四乙基罗丹明、二苯基二甲基罗丹明和二苯基二乙基罗丹明、二萘基罗丹明、罗丹明101磺酰氯(以商品名TEXAS RED®出售)。

[0129] 花青染料的实例包括但不限于Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、IR Dye680、Alexa Fluor 750、IR Dye800CW、ICG。

[0130] 荧光肽的实例包括GFP(绿色荧光蛋白)或GFP的衍生物(例如，EBFP、EBFP2、Azurite、mKalama1、ECFP、Cerulean、CyPet、YFP、Citrine、Venus、Ypet)。

[0131] 在一些实施方案中，显像剂是用于近红外(近IR)成像的近红外荧光团，用于生物发光成像的萤光素酶(萤火虫、细菌或腔肠动物的)或其它发光分子，或用于超声的全氟化碳填充囊泡。

[0132] 在优选的实施方案中，本公开的RACCP或比率SDM用荧光供体-受体对标记。合适的荧光供体-受体对的实例包括但不限于荧光素/罗丹明、荧光素/Cy5、罗丹明/Cy5、Cy5/Cy7、Cy5/IR Dye750、Cy5/IR Dye800、Cy5/ICG等。Cy5和Cy7提供了优选的荧光供体-受体对的一个实例，因为Cy5和Cy7的长波长对于体内成像是理想的，其中激发和发射波长应远高于600nm，以避免内源血红素的强吸收。例如，对于Cy5/Cy 7供体-受体对，用约610nm至630nm波长范围内的光激发(对于Cy5激发)，并收集约660nm至720nm(对于Cy5发射)和约760nm至830nm(对于Cy 7发射)的荧光发射，允许进行精确的比率测量，同时避免受到内源血红素的干扰。

[0133] 大分子载体(M)

[0134] 术语“载体”是指调节血浆半衰期、溶解度或生物分布的惰性分子。在一些实施方案中，载体调节本文公开的选择性递送分子的血浆半衰期。在一些实施方案中，载体调节本文公开的选择性递送分子的溶解度。在一些实施方案中，载体调节本文公开的选择性递送分子的生物分布。

[0135] 在一些实施方案中，载体降低非靶细胞或组织对选择性递送分子的摄取。在一些实施方案中，载体降低选择性递送分子向软骨内的摄取。在一些实施方案中，相对于向靶组织内的摄取，载体降低选择性递送分子向关节内的摄取。

[0136] 在一些实施方案中，载体提高靶细胞或组织对选择性递送分子的摄取。在一些实施方案中，相对于向靶组织内的摄取，载体降低选择性递送分子向肝脏内的摄取。在一些实施方案中，载体降低选择性递送分子向肾脏内的摄取。在一些实施方案中，载体提高向癌组织内的摄取。在一些实施方案中，载体提高向淋巴道和/或淋巴结内的摄取。

[0137] 在一些实施方案中，载体通过降低肾小球过滤来提高血浆半衰期。在一些实施方案中，载体通过增加或降低代谢或蛋白酶降解来调节血浆半衰期。在一些实施方案中，由于肿瘤血管系统的增加的通透性和保留(EPR)，载体提高了肿瘤摄取。在一些实施方案中，载体提高选择性递送分子的水溶性。

[0138] 在一些实施方案中，任意M独立地直接或间接(例如，通过c_M)结合至A、B或X。在一些实施方案中，任意M独立地在N-末端聚谷氨酸处结合至A。在一些实施方案中，任意M独立地通过共价键结合至A(或者，N端聚谷氨酸)。在一些实施方案中，任意M独立地在C-末端聚精氨酸处结合至B。在一些实施方案中，任意M独立地通过共价键结合至B(或者，C-末端聚精氨酸)。在一些实施方案中，任意M独立地直接或间接结合至X与A、X与B、B与C/N末端或A与C/N末端之间的连接体。在一些实施方案中，该共价键包括醚键、硫醚键、胺键、酰胺键、肟键、碳-碳键、碳-氮键、碳-氧键或碳-硫键。

[0139] 在一些实施方案中，M选自蛋白质、合成或天然聚合物或树状聚体。在一些实施方案中，M选自葡聚糖、PEG聚合物(例如，PEG 5kDa、PEG 12kDa、PEG 20kDa、PEG 30kDa和PEG40kDa)、白蛋白或其组合。

[0140] 在一些实施方案中，M是PEG聚合物。在一些情况下，PEG是多分散或单分散的化合物。在一些情况下，多分散材料包括该材料的不同分子量的分散分布，其特征在于平均重量

(重均)大小和分散度。在其它情况下,PEG是单分散化合物,其包含一种大小的分子。

[0141] 在一些实施方案中,PEG的分子量约为200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000或100,000Da。

[0142] 在一些情况下,M的分子量约为200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000或100,000Da。在一些情况下,M的分子量约为200Da。在一些情况下,M的分子量约为300Da。在一些情况下,M的分子量约为400Da。在一些情况下,M的分子量约为500Da。在一些情况下,M的分子量约为600Da。在一些情况下,M的分子量约为700Da。在一些情况下,M的分子量约为800Da。在一些情况下,M的分子量约为900Da。在一些情况下,M的分子量约为1000Da。在一些情况下,M的分子量约为1100Da。在一些情况下,M的分子量约为1200Da。在一些情况下,M的分子量约为1300Da。在一些情况下,M的分子量约为1400Da。在一些情况下,M的分子量约为1450Da。在一些情况下,M的分子量约为1500Da。在一些情况下,M的分子量约为1600Da。在一些情况下,M的分子量约为1700Da。在一些情况下,M的分子量约为1800Da。在一些情况下,M的分子量约为1900Da。在一些情况下,M的分子量约为2000Da。在一些情况下,M的分子量约为2100Da。在一些情况下,M的分子量约为2200Da。在一些情况下,M的分子量约为2300Da。在一些情况下,M的分子量约为2400Da。在一些情况下,M的分子量约为2500Da。在一些情况下,M的分子量约为2600Da。在一些情况下,M的分子量约为2700Da。在一些情况下,M的分子量约为2800Da。在一些情况下,M的分子量约为2900Da。在一些情况下,M的分子量约为3000Da。在一些情况下,M的分子量约为3250Da。在一些情况下,M的分子量约为3350Da。在一些情况下,M的分子量约为3500Da。在一些情况下,M的分子量约为3750Da。在一些情况下,M的分子量约为4000Da。在一些情况下,M的分子量约为4250Da。在一些情况下,M的分子量约为4500Da。在一些情况下,M的分子量约为4600Da。在一些情况下,M的分子量约为4750Da。在一些情况下,M的分子量约为5000Da。在一些情况下,M的分子量约为5500Da。在一些情况下,M的分子量约为6000Da。在一些情况下,M的分子量约为6500Da。在一些情况下,M的分子量约为7000Da。在一些情况下,M的分子量约为7500Da。在一些情况下,M的分子量约为8000Da。在一些情况下,M的分子量约为10,000Da。在一些情况下,M的分子量约为12,000Da。在一些情况下,M的分子量约为20,000Da。在一些情况下,M的分子量约为35,000Da。在一些情况下,M的分子量约为40,000Da。在一些情况下,M的分子量约为50,000Da。在一些情况下,M的分子量约为60,000Da。在一些情况下,M的分子量约为100,000Da。

[0143] 在一些实施方案中,M的平均分子量为50至70kD。

[0144] 在一些实施方案中,M是离散的PEG,其中该离散的PEG是包含一个以上重复环氧乙烷单元的聚合PEG。在一些情况下,离散的PEG(dPEG)包含2至60、2至50或2至48个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、35、40、42、48、50个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,

dPEG包含约2个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约3个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约4个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约5个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约6个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约7个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约8个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约9个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约10个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约11个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约12个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约13个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约14个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约15个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约16个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约17个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约18个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约19个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约20个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约22个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约24个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约26个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约28个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约30个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约35个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约40个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约42个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约48个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约50个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG由纯(例如约95%、98%、99%或99.5%)的起始物质以逐步方式合成为单分子量化合物。在一些情况下,dPEG具有特定的分子量,而不是平均分子量。在一些情况下,本文所述的dPEG是来自Quanta Biodesign,LMD的dPEG。

[0145] 在一些实施方案中,所述选择性递送分子与白蛋白缀合。在某些情况下,白蛋白在正常生理条件下被排除在肾小球滤液之外。在一些实施方案中,选择性递送分子包含能够与白蛋白形成共价缀合物的反应性基团,如马来酰亚胺。包含白蛋白的选择性递送分子导致裂解的选择性递送分子以依赖于裂解的方式在肿瘤中发生增多的积累。在一些实施方案中,白蛋白缀合物具有良好的药代动力学性质。

[0146] 在一些实施方案中,选择性递送分子与PEG聚合物缀合。在一些实施方案中,选择性递送分子与PEG 500Da聚合物缀合。在一些实施方案中,选择性递送分子与PEG 1kDa聚合物缀合。在一些实施方案中,选择性递送分子与PEG 2kDa聚合物缀合。在一些实施方案中,选择性递送分子与PEG 5kDa聚合物缀合。在一些实施方案中,选择性递送分子与PEG 10kDa聚合物缀合。在一些实施方案中,选择性递送分子与PEG 12kDa聚合物缀合。在一些实施方案中,选择性递送分子与PEG20kDa聚合物缀合。在一些实施方案中,30kD PEG缀合物与游离肽相比具有更长的半衰期。在一些实施方案中,选择性递送分子与具有肝和肾清除率的20-40kD PEG聚合物缀合。

[0147] 在一些实施方案中,选择性递送分子与葡聚糖缀合。在一些实施方案中,选择性递送分子与70kDa葡聚糖缀合。在一些实施方案中,葡聚糖缀合物,作为分子量的混合物,难以可再现地合成并纯化。

[0148] 在一些实施方案中,选择性递送分子与链霉亲和素缀合。

[0149] 在一些实施方案中,选择性递送分子与第五代PAMAM树状聚体缀合。

[0150] 在一些实施方案中,对载体加帽。在一些实施方案中,对载体加帽改善了药代动力学,并通过增加亲水性降低了载体的细胞毒性。在一些实施方案中,所述帽选自:乙酰基、琥珀酰基、3-羟基丙酰基、2-磺基苯甲酰基、缩水甘油基、PEG-2、PEG-4、PEG-8和PEG-12。

[0151] 部分X(连接体)

[0152] 在一些实施方案中,由一个或多个氨基酸组成的连接体用来连接肽序列A(即,设计为抑制肽B的递送活动的序列)和肽序列B。通常,肽连接体除了连接这些分子或在它们之间保持一定的最小距离或其它空间关系外,将不具有特定的生物活性。然而,可以对连接体的组成氨基酸进行选择,以影响分子的一些性质,如折叠、净电荷或疏水性。

[0153] 在活细胞中,由于部分A的存在,本文公开的完整的选择性递送分子可能无法进入细胞。从而,由于阻止细胞摄取的部分A不能有效地在健康细胞中被胞内酶裂解(因为其无法被吸收,而将无法被此类胞内酶接近),因此裂解X的严格的细胞内过程将不能在健康细胞中有效裂解X。然而,当细胞受损伤或病变(例如,癌细胞、缺氧细胞、缺血细胞、凋亡细胞、坏死细胞)时,此类胞内酶从细胞中漏出,将会发生A的裂解,从而允许部分B和/或货物进入细胞,从而实现部分B和/或货物D向相邻细胞的靶向递送。在一些实施方案中,X在胞外间隙中裂解。

[0154] 在一些实施方案中,毛细血管经常在肿瘤和其它创伤部位周围渗漏这一事实增强了高分子量(例如,约30kDa或更大的分子量)的分子到达间质区室的能力。在一些实施方案中,不表达相关蛋白酶但紧邻表达细胞的细胞从选择性递送分子中拾取货物,因为X连接体的裂解一般是细胞外的。在一些实施方案中,由于细胞表型的异质性和消除尽可能高百分比的可疑细胞的愿望,这种旁观者(bystander)靶向在肿瘤治疗中是有益的。

[0155] 在一些实施方案中,X是可裂解的连接体。在一些实施方案中,X是可被蛋白酶裂解的连接体。在一些实施方案中,X是可被细胞外蛋白酶裂解的连接体。

[0156] 在一些实施方案中,所述连接体是柔性的。在一些实施方案中,所述连接体是刚性的。

[0157] 在一些实施方案中,所述连接体包含线性结构。在一些实施方案中,所述连接体包含非线性结构。在一些实施方案中,所述连接体包含分支结构。在一些实施方案中,所述连接体包含环状结构。

[0158] 连接体包括但不限于直链或支链碳连接体、杂环碳连接体、肽连接体和聚醚连接体。这些连接体任选地具有酰胺键、巯基连接或杂官能连接。

[0159] 在一些实施方案中,X的长度为约5至约30个原子。在一些实施方案中,X的长度为约6个原子。在一些实施方案中,X的长度为约8个原子。在一些实施方案中,X的长度为约10个原子。在一些实施方案中,X的长度为约12个原子。在一些实施方案中,X的长度为约14个原子。在一些实施方案中,X的长度为约16个原子。在一些实施方案中,X的长度为约18个原子。在一些实施方案中,X的长度为约20个原子。在一些实施方案中,X的长度为约25个原子。在一些实施方案中,X的长度为约30个原子。

[0160] 在一些实施方案中,所述连接体通过共价键将肽部分A(即,阻止细胞摄取的肽序列)结合至肽部分B(即,递送序列)。在一些实施方案中,该共价键包括醚键、硫醚键、胺键、

酰胺键、肼键、腙键、碳-碳键、碳-氮键、碳-氧键或碳-硫键。

[0161] 在一些实施方案中,X包含肽键。该肽键包含L-氨基酸和/或D-氨基酸。在本发明的实施方案中,为了使得免疫原性和由背景肽酶或蛋白酶导致的非特异性裂解最小化,D-氨基酸是优选的。已知寡-D-精氨酸序列的细胞摄取比寡-L-精氨酸的细胞摄取更好或与之一样好。

[0162] 在一些实施方案中,X连接体被设计为在特定条件的存在下或在特定环境下裂解。在优选的实施方案中,X连接体可在生理条件下裂解。这样的X连接体的裂解可以例如被与需要递送货物的细胞相关的特定病理信号或特定环境所增强或影响。X连接体针对被特定条件例如被特定酶裂解的设计允许将细胞摄取靶向至获得此类条件的特定位置。因此,选择性递送分子提供将细胞摄取特异性靶向至期望的细胞、组织或区域的一种重要方式是通过将连接体部分X设计为能够被此类靶向细胞、组织或区域附近的条件所裂解。

[0163] 在一些实施方案中,X是pH-敏感的连接体。在一些实施方案中,X在碱性pH条件下裂解。在一些实施方案中,X在酸性pH条件下裂解。在一些实施方案中,X被蛋白酶、基质金属蛋白酶或其组合裂解。在一些实施方案中,X被还原剂裂解。

[0164] 在一些实施方案中,X被MMP裂解。基质金属蛋白酶(MMP)的水解活性已与转移性肿瘤细胞的侵袭性迁移相关联。在某些情况下,MMP可见于炎症部位附近。在某些情况下,MMP可见于中风部位附近(即,以血流量减少后的脑损伤为特征的病症)。因此,对具有本发明特征的分子的摄取能够引导货物(至少一个D部分)向在细胞外环境中具有活性MMP的特定细胞、组织或区域的细胞摄取。在一些实施方案中,X连接体包含LG-C(Me)-AG(SEQ ID NO:1)、PLGLAG(SEQ ID NO:2),其被金属蛋白酶MMP-2、MMP-9或MMP-7(参与癌症和炎症的MMP)所裂解。

[0165] 在一些实施方案中,X被见于癌细胞附近的蛋白水解酶或还原性环境所裂解。这样的环境或这样的酶通常在正常细胞附近未发现。

[0166] 在一些实施方案中,X被包括但不限于凝血酶和组织蛋白酶的丝氨酸蛋白酶裂解。在一些实施方案中,X被组织蛋白酶K、组织蛋白酶S、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、组织蛋白酶W、组织蛋白酶F、组织蛋白酶A、组织蛋白酶C、组织蛋白酶H、组织蛋白酶Z或其任意组合所裂解。在一些实施方案中,X被组织蛋白酶K和/或组织蛋白酶S裂解。

[0167] 在一些实施方案中,X在经历低氧的组织中或其附近被裂解。在一些实施方案中,在低氧组织中或其附近的裂解能够允许癌细胞和癌组织、梗塞区域及其它低氧区域的靶向。在一些实施方案中,X包含二硫键。在一些实施方案中,包含二硫键的连接体优先在低氧区域裂解,从而将货物递送靶向至该区域中的细胞。低氧被认为能导致癌细胞变得更耐受放疗和化疗,并且还可以启动血管发生。在低氧环境中,例如在存在渗漏或坏死细胞时,游离硫醇和其它还原剂在细胞外可获得,而通常使细胞外环境保持氧化的O_2明显被消耗。在一些实施方案中,该氧化还原平衡的变化促进了X连接体中二硫键的还原和裂解。除了利用硫醇-二硫化物平衡的二硫键外,在设计为在低氧环境中裂解的X连接体中还可以使用包括当还原成氢醌时会裂解的醌的键。

[0168] 在一些实施方案中,X在坏死环境中裂解。坏死通常导致酶或其它细胞内容物的释放,该酶或细胞内容物可用于引发X连接体的裂解。在一些实施方案中,坏死酶(例如,钙蛋白酶)对X的裂解使货物被病变细胞和尚未完全渗漏的邻近细胞吸收。

[0169] 在一些实施方案中,X是酸不稳定的连接体。在一些实施方案中,X包含乙缩醛或乙烯醚键。由于从氧化磷酸化到无氧糖酵解和乳酸产生的Warburg转移,在受损部位或低氧组织中观察到酸中毒。在一些实施方案中,通过将B中的一些精氨酸替换为只在低于pH 7时才变为阳离子的组氨酸,而使用酸中毒作为货物摄取的引发物。

[0170] 应当理解,本文公开的连接体可以包括非标准氨基酸,例如,羟赖氨酸、锁链素、异锁链素或其它非标准氨基酸。本文公开的连接体可以包括修饰的氨基酸,包括翻译后修饰的氨基酸,例如,甲基化的氨基酸(例如,甲基组氨酸、赖氨酸的甲基化形式等)、乙酰化的氨基酸、酰胺化的氨基酸、甲酰化的氨基酸、羟基化的氨基酸、磷酸化的氨基酸或其它修饰的氨基酸。本文公开的连接体还可包括肽模拟部分,包括通过非肽键连接的部分和通过非氨基酸部分连接或连接至非氨基酸部分的氨基酸。

[0171] 在一些实施方案中,连接体X包含选自以下的氨基酸序列:PLGLAG、PLG-C(me)-AG、RPLALWRS、ESPAYYTA、DPRSFL、PPRSFL、RLQLKL和RLQLK(Ac)。在一些实施方案中,连接体X包含氨基酸序列PLGLAG。在一些实施方案中,连接体X包含氨基酸序列PLG-C(me)-AG。在一些实施方案中,连接体X包含氨基酸序列PLGxAG,其中x为任意氨基酸(天然存在的或非天然存在的)。在一些实施方案中,连接体X包含氨基酸序列RPLALWRS。在一些实施方案中,连接体X包含氨基酸序列ESPAYYTA。在一些实施方案中,连接体X包含氨基酸序列DPRSFL。在一些实施方案中,连接体X包含氨基酸序列PPRSFL。在一些实施方案中,连接体X包含氨基酸序列RLQLKL。在一些实施方案中,连接体X包含氨基酸序列RLQLK(Ac)。

[0172] 在一些实施方案中,连接体X包含选自以下的肽:PR(S/T)(L/I)(S/T)(其中括号中的字母表示所指的氨基酸中的任何一种位于该序列中的该位置处);GGAANLVRGG;SGRIGFLRTA;SGRSA;GFLG;ALAL;FK;PIC(Et)F-F(其中C(Et)表示S-乙基半胱氨酸(巯基上连接有乙基的半胱氨酸),“-”表示该序列及之后的序列中典型的裂解位点);GGPRGLPG;HSSKLQ;LVLA-SSSFGY;GVSQNY-PIVG;GVVQA-SCRLA;f(Pip)R-S(其中“f”表示D-苯丙氨酸,“Pip”表示哌啶-2-羧酸(六氢吡啶羧酸,一种具有六元环的脯氨酸类似物);DEVD;GWEHDG;RPLALWRS,或其组合。

[0173] 在一些实施方案中,X在低氧条件下被裂解。在一些实施方案中,X包含二硫键。在一些实施方案中,X包含奎宁。

[0174] 在一些实施方案中,X在坏死条件下被裂解。在一些实施方案中,X包含可被钙蛋白酶(calpain)裂解的分子。

[0175] 在一些实施方案中,X包含6-氨基己酰基、5-(氨基)-3-氧杂戊酰基,或其组合。在一些实施方案中,X包含二硫键。

[0176] 在一些实施方案中,所述连接体是烷基。在一些实施方案中,所述连接体是杂烷基。

[0177] 在一些实施方案中,所述连接体是亚烷基。在一些实施方案中,所述连接体是亚烯基。在一些实施方案中,所述连接体是亚炔基。在一些实施方案中,所述连接体是亚杂烷基。

[0178] “烷基”基团是指脂肪族烃基团。烷基部分可以是饱和烷基或不饱和烷基。根据结构,烷基基团可以是单价或二价基团(即,亚烷基基团)。

[0179] “烷基”部分可具有1至10个碳原子(每当在本文中出现时,数值范围如“1至10”是指给定范围内的各个整数;例如,“1至10个碳原子”意指该烷基可以由1个碳原子、2个碳原

子、3个碳原子等等，直到10个碳原子并且包括10个碳原子组成，虽然本定义也涵盖未指定数值范围的术语“烷基”的存在)。烷基也可以是具有1至6个碳原子的“低级烷基”。本文描述的化合物的烷基基团可被指定为“C1-C4烷基”或类似的指定。仅举例来说，“C1-C4烷基”表示在烷基链中有1-4个碳原子，即，该烷基链选自：甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。典型的烷基基团包括但绝不不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、乙烯基、丙烯基、丁烯基等等。

[0180] 在一些实施方案中，所述连接体包含环结构(例如，芳基)。如本文所用的，术语“环”是指任何共价闭合的结构。环包括，例如，碳环(例如，芳基和环烷基)、杂环(例如，杂芳基和非芳族杂环)、芳族(例如芳基和杂芳基)和非芳族(例如，环烷基和非芳族杂环)。环可以任选地被取代。环可以是单环或多环的。

[0181] 如本文所用的术语“芳基”是指其中构成环的每个原子都是碳原子的芳环。芳环可以由五、六、七、八、九个或多于九个碳原子形成。芳基基团可任选地被取代。芳基基团的实例包括但不限于苯基、萘基、菲基、蒽基、芴基和茚基。根据结构，芳基可以是单价基团或双价基团(即亚芳基)。

[0182] 术语“环烷基”指单环或多环的非芳族基团，其中构成环的每个原子(即，骨架原子)都是碳原子。环烷基可以是饱和的或部分不饱和的。环烷基基团包括具有3至10个环原子的基团。环烷基包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。

[0183] 在一些实施方案中，所述环是环烷。在一些实施方案中，所述环是环烯。

[0184] 在一些实施方案中，所述环是芳环。术语“芳族”是指具有包含4n+2个π电子的离域π-电子体系的平面环，其中n为整数。芳环可以由5、6、7、8、9个或多于9个原子形成。芳族可以任选地被取代。术语“芳族”包括碳环芳基(例如，苯基)和杂环芳基(或“杂芳基”或“杂芳族”)基团(例如，吡啶)。该术语包括单环或稠环的多环(即，共用相邻的碳原子对的环)基团。

[0185] 在一些实施方案中，所述环是杂环。术语“杂环”是指含有1-4个各自选自O、S和N的杂原子的杂芳族和杂脂环基团，其中各杂环基团在其环系中具有4-10个原子，且条件为所述基团的环不含有两个邻近的O或S原子。非芳香杂环基团包括在其环系中只具有3个原子的基团，但是芳香杂环基团在其环系中必须具有至少5个原子。杂环基团包括苯并稠合的环系。3元杂环基团的一个实例是吖丙啶基。4元杂环基团的一个实例是氮杂环丁基(衍生自氮杂环丁烷)。5元杂环基团的一个实例是噻唑基。6元杂环基团的一个实例是吡啶基，而10元杂环基团的一个实例是喹啉基。非芳族杂环基团的实例是吡咯烷基、四氢呋喃基、二氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢吡喃基、二氢吡喃基、四氢噻喃基、哌啶子基、吗啉基、硫代吗啉基、噻噁烷基、哌嗪基、氮杂环丁烷基、氧杂环丁烷基、硫杂环丁烷基、高哌啶基、氧杂环庚烷基、硫杂环庚烷基、氧氮杂䓬基、二氮杂䓬基、硫氮杂䓬基、1,2,3,6-四氢吡啶基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、二氢吲哚基、2H-吡喃基、4H-吡喃基、二氧杂环己烷基、1,3-二氧杂环戊烷基、吡唑啉基、二噻烷基、二硫杂环戊烷基、二氢吡喃基、二氢噻吩基、二氢呋喃基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、3-氮杂双环[3.1.0]己烷基、3-氮杂双环[4.1.0]庚烷基、3H-吲哚基和喹嗪基。芳族杂环基团的实例是吡啶基、咪唑基、嘧啶基、吡唑基、三唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、异噁唑基、噻唑基、噁唑基、异噻唑基、吡咯基、喹啉基、异喹啉基、吲哚基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、噌啉基、吲唑基、吲嗪基、酞嗪基、哒嗪基、三嗪基、异吲哚基、蝶啶基、

噁唑基、噁二唑基、噻二唑基、呋咱基、苯并呋咱基、苯并噻吩基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、喹唑啉基、喹喔啉基、萘啶基和呋喃并吡啶基。只要可能的话，前述基团可以是C-连接的或N-连接的。例如，衍生自吡咯的基团是吡咯-1-基(N-连接的)或吡咯-3-基(C-连接的)。此外，衍生自咪唑的基团是咪唑-1-基或咪唑-3-基(均为N-连接的)或咪唑-2-基、咪唑-4-基或咪唑-5-基(均为C-连接的)。杂环基团包括苯并稠合的环系和用一个或两个氧(=O)部分取代的环系例如吡咯烷-2-酮。根据结构，杂环基团可以是单价基团或双价基团(即，亚杂环基团)。

[0186] 在一些实施方案中，所述环是稠合的。术语“稠合的”是指其中两个或更多个环共有一个或多个键的结构。在一些实施方案中，所述环是二聚体。在一些实施方案中，所述环是三聚体。在一些实施方案中，所述环是取代的。

[0187] 术语“碳环的”或“碳环”是指其中每个成环原子都是碳原子的环。碳环包括芳基和环烷基。该术语因此将碳环与在环骨架中含有至少一个不同于碳的原子(即杂原子)的杂环(“杂环的”)区分开。杂环包括杂芳基和杂环烷基。碳环和杂环可以任选地被取代。

[0188] 在一些实施方案中，连接体X是取代的。术语“任选取代的”或“取代的”意指所提到的基团可被一个或多个另外的基团取代，所述另外的基团单独且独立地选自C_1-C_6烷基、C_3-C_8环烷基、芳基、杂芳基、C_2-C_6杂脂环、羟基、C_1-C_6烷氧基、芳氧基、C_1-C_6烷硫基、芳硫基、C_1-C_6烷基亚砜、芳基亚砜、C_1-C_6烷基砜、芳基砜、氰基、卤素、C_2-C_8酰基、C_2-C_8酰氧基、硝基、C_1-C_6卤代烷基、C_1-C_6氟代烷基和氨基，包括C_1-C_6烷基氨基，及其经保护的衍生物。举例来说，可选的取代基可以是LsRs，其中每个Ls独立地选自键、-O-、-C(=O)-、-S-、-S(=O)-、-S(=O)2-、-NH-、-NHC(=O)-、-C(=O)NH-、S(=O)2NH-、-NHS(=O)2-、-OC(=O)NH-、-NHC(=O)O-、-(C_1-C_6烷基)-或-(C_2-C_6烯基)-；且每个Rs独立地选自H、(C_1-C_4烷基)、(C_3-C_8环烷基)、杂芳基、芳基和C_1-C_6杂烷基。任选取代的非芳香基团可以被一个或多个氧代基团(=O)取代。可形成上述取代基的保护性衍生物的保护基团是本领域技术人员已知的。

[0189] 在一些实施方案中，连接体X包含零连接体。在一些情况下，零连接体包含共价键。在一些实施方案中，该共价键包含醚键、硫醚键、胺键、酰胺键、肟键、腙、碳-碳键、碳-氮键、碳-氧键或碳-硫键。

[0190] 在一些实施方案中，连接体X进一步包含双官能连接体。在一些情况下，双官能连接体具有一个对第一分子(例如，选择性递送分子)上的基团为反应性的官能团，和对第二分子(例如，成像货物)为反应性的第二官能团。在一些情况下，该双官能连接体是同双官能连接体或异双官能连接体。或者，在一些实施方案中，进行衍生化以提供官能团。因此，例如，在肽上产生游离巯基的程序也是已知的(参见美国专利4,659,839)。或者，连接体X可包含含有两个或更多个不同反应性基团的杂双官能交联体，所述反应性基团形成可以与选择性递送分子相互作用的杂环。例如，异双官能交联体如半胱氨酸可以包含胺反应性基团，并且硫醇反应性基团可以与衍生的选择性递送分子上的醛相互作用。适用于异双官能交联体的反应性基团的其它组合包括，例如，胺反应性和巯基反应性基团；羰基和巯基反应基团；胺和光反应性基团；巯基和光反应性基团；羰基和光反应性基团；羧酸酯和光反应性基团；以及精氨酸和光反应性基团。

[0191] 示例性的同双官能连接体包括但不限于Lomant试剂二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)DSP、3’3’-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP)、双琥珀酸亚氨基辛二酸酯

(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS)、二琥珀酰亚胺基酒石酸酯(DST)、二磺基琥珀酰亚胺基酒石酸酯(磺基DST)、乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(EGS)、二琥珀酰亚胺基戊二酸酯(DSG)、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)、二亚胺代己二酸二甲酯(DMA)、庚二亚氨酸二甲酯(DMP)、辛二亚氨酸二甲酯(DMS)、二甲基-3,3'-二硫代二丙亚氨酸酯(DTBP)、1,4-二-3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺基)丁烷(DPDPB)、双马来酰亚胺基己烷(BMH)、含芳基卤的化合物(DFDNB),例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯或1,3-二氟-4,6-二硝基苯、4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯砜(DFDNPS)、双-[β-(4-叠氮基水杨酰胺基)乙基]二硫化物(BASED)、甲醛、戊二醛、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、己二酸二酰肼、碳酰肼、邻甲苯胺、3,3'-二甲基联苯胺、联苯胺、α,α'-对二氨基二苯基、二碘-对二甲苯磺酸、N,N'-亚乙基-双(碘乙酰胺)或N,N'-六亚甲基-双(碘乙酰胺)。

[0192] 示例性的异双官能连接体包括但不限于胺反应性和巯基交联体,如N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(sPDP)、长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(LC-sPDP)、水溶性长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(磺基-LC-sPDP)、琥珀酰亚胺基氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基二硫代)甲苯(sMPT)、磺基琥珀酰亚胺基-6-[α-甲基-α-(2-吡啶基二硫代)甲苯酰胺基]己酸酯(磺基-LC-sMPT)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(sMCC)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBs)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBs)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(sIAB)、磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(磺基-sIAB)、琥珀酰亚胺基-4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(sMPB)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(磺基-sMPB)、N-(γ-马来酰亚胺基丁酰基氧基)琥珀酰亚胺酯(GMBs)、N-(γ-马来酰亚胺基丁酰基氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBs)、琥珀酰亚胺基6-((碘乙酰基)氨基)己酸酯(sIAX)、琥珀酰亚胺基6-[6-(((碘乙酰基)氨基)己酰基)氨基]己酸酯(sIAXX)、琥珀酰亚胺基4-(((碘乙酰基)氨基)甲基)环己烷-1-甲酸酯(sIAC)、琥珀酰亚胺基6-((((4-碘乙酰基)氨基)甲基)环己烷-1-羰基)氨基)己酸酯(sIACX)、对硝基苯基碘乙酸酯(NPIA)、羰基反应性和巯基反应性交联体,如4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酰肼(MPBH)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-酰肼-8(M2C2H)、3-(2-吡啶基二硫代)丙酰基酰肼(PDPH)、胺反应性和光反应性交联体,如N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(NHs-AsA)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(磺基-NHs-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-(4-叠氮基水杨酰胺基)己酸酯(磺基-NHs-LC-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(对叠氮基水杨酰胺基)乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAsD)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(HsAB)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(磺基-HsAB)、N-琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(sANPAH)、磺基琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(磺基-sANPAH)、N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰基氧基琥珀酰亚胺(ANB-NOs)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(间叠氮基-邻硝基苯甲酰胺基)-乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAND)、N-琥珀酰亚胺基-4(4-叠氮基苯基)1,3′-二硫代丙酸酯(sADP)、N-磺基琥珀酰亚胺基(4-叠氮基苯基)-1,3'-二硫代丙酸酯(磺基-sADP)、磺基琥珀酰亚胺基4-(对叠氮基苯基)丁酸酯(磺基-sAPB)、磺基琥珀酰亚胺基2-(7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺)乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAED)、磺基琥珀酰亚胺基7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酸酯(磺基-

sAMCA)、对硝基苯基重氮丙酮酸酯(ρNPDP)、对硝基苯基-2-重氮-3,3,3-三氟丙酸酯(PP-DTP)、巯基反应性和光反应性交联体,如1-(对叠氮基水杨酰胺基)-4-(碘乙酰胺基)丁烷(AsIB)、N-[4-(对叠氮基水杨酰胺基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺(APDP)、苯甲酮-4-碘乙酰胺、苯甲酮-4-马来酰亚胺羰基反应性和光反应性交联体,如对叠氮基苯甲酰基酰肼(ABH)、羧酸酯反应性和光反应性交联体,如4-(对叠氮基水杨酰胺基)丁胺(AsBA),以及精氨酸反应性和光反应性交联体,如对叠氮基苯基乙二醛(APG)。

[0193] 在一些情况下,连接体X进一步包含反应性官能团。在一些实施方案中,该反应性官能团将连接体X缀合至本文所述的货物。在一些情况下,该反应性官能团包含对亲电子基团具有反应性的亲核基团。示例性的亲电子基团包括羰基——如醛、酮、羧酸、酯、酰胺、烯酮、酰基卤或酸酐。在一些实施方案中,该反应性官能团是醛。示例性的亲核基团包括酰肼、肟、氨基、肼、缩氨基硫脲、联氨羧酸酯和芳基酰肼。

[0194] 在一些实施方案中,连接体X包含马来酰亚胺基团、烷基卤基团或碘乙酰胺基团。

[0195] 在一些实施方案中,连接体X包含马来酰亚胺基团。在一些情况下,该马来酰亚胺基团也被称为马来酰亚胺间隔体。在一些情况下,该马来酰亚胺基团进一步包含己酸,形成马来酰亚胺基己酰基(mc)。在一些情况下,该连接体包含马来酰亚胺基己酰基(mc)。在一些情况下,该连接体是马来酰亚胺基己酰基(mc)。在其它情况下,该马来酰亚胺基团包含马来酰亚胺基甲基,如上述琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(sMCC)或磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)。

[0196] 在一些实施方案中,所述马来酰亚胺基团是自稳定化的马来酰亚胺。在一些情况下,自稳定化的马来酰亚胺利用二氨基丙酸(DPR)并入与马来酰亚胺相邻的碱性氨基,以提供硫代琥珀酰亚胺环水解的分子内催化,从而避免了马来酰亚胺通过逆迈克尔反应发生消除反应。在一些情况下,自稳定化的马来酰亚胺是Lyon等人,"Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates,"Nat.Biotechnol.32(10):1059-1062(2014)中描述的马来酰亚胺基团。在一些实施方案中,所述连接体包含自稳定化的马来酰亚胺。在一些实施方案中,所述连接体是自稳定化的马来酰亚胺。

[0197] 在一些实施方案中,本文公开的选择性递送分子包含单个连接体。使用单一机理来介导成像货物和治疗性货物两者的摄取是特别有价值的,因为可以用无害的示踪剂的量进行成像来检测后续的治疗剂量是否可能正确地集中于靶组织中。

[0198] 在一些实施方案中,本文公开的选择性递送分子包含多个连接体。当本文公开的选择性递送分子包括多个X连接时,部分A与分子的其它部分的分离需要裂解所有的X连接。多个X连接体的裂解可以是同时或相继的。多个X连接可以包括具有不同特异性的X连接,从而部分A与分子的其它部分的分离需要该分子遇到多于一个条件或环境(例如,"信号"或"细胞外信号")。因此多个X连接体的裂解可以用作此类信号或细胞外信号的组合的检测器。例如,选择性递送分子可以包括连接碱性部分B与酸性部分A的两个连接体部分Xa和Xb。Xa和Xb连接体都必须在酸性部分A与碱性部分B分离前进行裂解,从而允许部分B和货物部分C(如果有的话)进入细胞。应当理解,连接体区可独立于可能存在的另一个连接体而连接至碱性部分B或货物部分C,并且在需要的时候,可以包含多于两个连接体区X。

[0199] 可以使用两个或更多个连接体的组合来进一步调节分子的靶向和向期望的细胞、

组织或区域的递送。如果需要的话，使用信号或细胞外信号的组合来使得X连接体的裂解特异性变宽或变窄。当多个X连接体平行连接时，裂解特异性变窄，因为每个X连接体都必须在部分A可以与分子的其它部分分离之前进行裂解。当多个X连接体顺序连接时，裂解特异性变宽，因为任一X连接体上的裂解都允许部分A与分子的其它部分分离。例如，为了检测蛋白酶或低氧(即，在蛋白酶或低氧的存在下裂解X)，将X连接体设计为串联地放置蛋白酶敏感性和还原敏感性位点，从而使得任何一个的裂解将足以允许酸性部分A的分离。或者，为了检测蛋白酶和低氧两者的存在(即，在蛋白酶和低氧两者同时存在、而不是只有一者存在的情况下裂解X)，将X连接体设计为在至少一对彼此用二硫键键合的半胱氨酸之间放置蛋白酶敏感性位点。在这种情况下，为了允许部分A的分离，既需要蛋白酶裂解又需要二硫键还原。

[0200] 部分Y连接体

[0201] 在一些实施方案中，Y是由一个或多个氨基酸组成的连接体，用来将货物(D)连接至SDM的其余部分。在一些实施方案中，Y是由一个或多个氨基酸组成的连接体，用来将货物(D)连接至部分B。通常，肽连接体除了连接这些分子或在它们之间保持一定的最小距离或其它空间关系外，将不具有特定的生物活性。然而，可以对连接体的组成氨基酸进行选择，以影响分子的一些性质，如折叠、净电荷或疏水性。

[0202] 在一些实施方案中，Y连接体通过共价键将D的货物部分结合至B的肽部分(即递送序列)。在一些实施方案中，该共价键包含醚键、硫醚键、胺键、酰胺键、肟键、腙键、碳-碳键、碳-氮键、碳-氧键或碳-硫键。

[0203] 在一些实施方案中，Y连接体是柔性的。在一些实施方案中，Y连接体是刚性的。在一些实施方案中，Y连接体包含线性结构。在一些实施方案中，Y连接体包含非线性结构。在一些实施方案中，Y连接体包含分支结构。在一些实施方案中，连接体包含环状结构。

[0204] 在一些实施方案中，Y连接体包含肽键。该肽键包含L-氨基酸和/或D-氨基酸。在实施方案中，为了使得免疫原性和由背景肽酶或蛋白酶导致的非特异性裂解最小化，D-氨基酸是优选的。已知寡-D-精氨酸序列的细胞摄取比寡-L-精氨酸的细胞摄取更好或与之一样好。

[0205] 在一些实施方案中，Y连接体是不可裂解的连接体。

[0206] 在一些实施方案中，Y连接体被设计为在特定条件的存在下或在特定环境下裂解。在一些实施方案中，Y连接体可被细胞内蛋白酶裂解。在一些实施方案中，Y可被细胞内蛋白酶裂解。在一些实施方案中，Y连接体可被溶酶体蛋白酶裂解。在一些实施方案中，该细胞内蛋白酶是半胱氨酸蛋白酶。在一些实施方案中，该细胞内蛋白酶是天冬氨酰蛋白酶。在一些实施方案中，该细胞内蛋白酶是丝氨酸蛋白酶。在一些实施方案中，该半胱氨酸蛋白酶是胱天蛋白酶、组织蛋白酶、钙蛋白酶、木瓜蛋白酶或豆荚蛋白。在一些实施方案中，该细胞内蛋白酶是起始胱天蛋白酶。在一些实施方案中，该细胞内蛋白酶是效应胱天蛋白酶。在一些实施方案中，Y连接体可被选自以下的蛋白酶裂解：组织蛋白酶B、组织蛋白酶L、组织蛋白酶H、组织蛋白酶K、组织蛋白酶W、组织蛋白酶C、组织蛋白酶F、组织蛋白酶V、组织蛋白酶X、组织蛋白酶S、组织蛋白酶D、组织蛋白酶G、HCP-1、HCP-2、二肽基-肽酶I、MEROPS C13、CED-3肽酶、胱天蛋白酶2、胱天蛋白酶3、胱天蛋白酶6、胱天蛋白酶7、胱天蛋白酶8、胱天蛋白酶9、胱天蛋白酶10、胱天蛋白酶11、胱天蛋白酶12、胱天蛋白酶13和胱天蛋白酶14。在一些实施方

案中,Y连接体可被选自组织蛋白酶B、组织蛋白酶L、胱天蛋白酶3、胱天蛋白酶7、胱天蛋白酶8和胱天蛋白酶9的蛋白酶裂解。在一些实施方案中,Y连接体可被组织蛋白酶B二肽基羧肽酶裂解。在一些实施方案中,该连接体在P1位置具有赖氨酸、瓜氨酸或精氨酸残基,且在P1'位置具有大的疏水残基。

[0207] 在一些实施方案中,Y连接体包含酸敏感性化学连接体。在一些实施方案中,酸敏感性化学连接体是腙或其衍生物。在一些实施方案中,Y连接体包含自牺牲(self-immolative)间隔体。在一些实施方案中,自牺牲间隔体的长度足以防止在SDM的B部分与治疗性货物之间发生空间位阻。在一些实施方案中,Y包含对氨基苄醇(PABOH)间隔体或其衍生物。在一些实施方案中,Y包含对氨基苄基羰基(PABC)间隔体或其衍生物。在一些实施方案中,Y包含支链双(羟甲基)苯乙烯(BHMS)间隔体或其衍生物。在一些实施方案中,Y包含2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物或邻-或对-氨基苄基缩醛间隔体。在一些实施方案中,Y包含2,6-双羟基甲基-对甲酚或半硫代缩胺衍生物。

[0208] 在一些实施方案中,Y连接体包含双官能连接体。在一些情况下,双官能连接体具有一个对第一分子(例如,选择性递送分子)上的基团为反应性的官能团,和对第二分子(例如,成像货物)为反应性的第二官能团。在一些情况下,该双官能连接体是同双官能连接体或异双官能连接体。或者,在一些实施方案中,进行衍生化以提供官能团。因此,例如,在肽上产生游离巯基的程序也是已知的(参见美国专利4,659,839)。或者,连接体可包含含有两个或更多个不同反应性基团的杂双官能交联体,所述反应性基团形成可以与选择性递送分子相互作用的杂环。例如,异双官能交联体如半胱氨酸可以包含胺反应性基团,并且硫醇反应性基团可以与衍生的选择性递送分子上的醛相互作用。适用于异双官能交联体的反应性基团的其它组合包括,例如,胺反应性和巯基反应性基团;羰基和巯基反应基团;胺和光反应性基团;巯基和光反应性基团;羰基和光反应性基团;羧酸酯和光反应性基团;以及精氨酸和光反应性基团。

[0209] 示例性的同双官能连接体包括但不限于Lomant试剂二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)DSP、3'3'-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP)、双琥珀酸亚氨基辛二酸酯(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS)、二琥珀酰亚胺基酒石酸酯(DST)、二磺基琥珀酰亚胺基酒石酸酯(磺基DST)、乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(EGS)、二琥珀酰亚胺基戊二酸酯(DSG)、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)、二亚胺代己二酸二甲酯(DMA)、庚二亚氨酸二甲酯(DMP)、辛二亚氨酸二甲酯(DMS)、二甲基-3,3'-二硫代二丙亚氨酸酯(DTBP)、1,4-二-3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺基)丁烷(DPDPB)、双马来酰亚胺基己烷(BMH)、含芳基卤的化合物(DFDNB),例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯或1,3-二氟-4,6-二硝基苯、4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯砜(DFDNPS)、双-[β-(4-叠氮基水杨酰胺基)乙基]二硫化物(BASED)、甲醛、戊二醛、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、己二酸二酰肼、碳酰肼、邻甲苯胺、3,3'-二甲基联苯胺、联苯胺、α,α'-对二氨基二苯基、二碘-对二甲苯磺酸、N,N'-亚乙基-双(碘乙酰胺)或N,N'-六亚甲基-双(碘乙酰胺)。

[0210] 示例性的异双官能连接体包括但不限于胺反应性和巯基交联体,如N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(sPDP)、长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(LC-sPDP)、水溶性长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(磺基-LC-sPDP)、琥珀酰亚胺基氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基二硫代)甲苯(sMPT)、磺基琥珀酰亚胺基-6-[α-甲

基-α-(2-吡啶基二硫代)甲苯酰胺基]己酸酯(磺基-LC-sMPT)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(sMCC)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBs)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBs)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(sIAB)、磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(磺基-sIAB)、琥珀酰亚胺基-4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(sMPB)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(磺基-sMPB)、N-(γ-马来酰亚胺基丁酰基氧基)琥珀酰亚胺酯(GMBs)、N-(γ-马来酰亚胺基丁酰基氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBs)、琥珀酰亚胺基6-((碘乙酰基)氨基)己酸酯(sIAX)、琥珀酰亚胺基6-[6-(((碘乙酰基)氨基)己酰基)氨基]己酸酯(sIAXX)、琥珀酰亚胺基4-(((碘乙酰基)氨基)甲基)环己烷-1-甲酸酯(sIAC)、琥珀酰亚胺基6-((((4-碘乙酰基)氨基)甲基)环己烷-1-羰基)氨基)己酸酯(sIACX)、对硝基苯基碘乙酸酯(NPIA)、羰基反应性和巯基反应性交联体,如4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酰肼(MPBH)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-酰肼-8(M2C2H)、3-(2-吡啶基二硫代)丙酰基酰肼(PDPH)、胺反应性和光反应性交联体,如N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(NHs-AsA)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(磺基-NHs-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-(4-叠氮基水杨酰胺基)己酸酯(磺基-NHs-LC-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(对叠氮基水杨酰胺基)乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAsD)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(HsAB)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(磺基-HsAB)、N-琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(sANPAH)、磺基琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(磺基-sANPAH)、N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰基氧基琥珀酰亚胺(ANB-NOs)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(间叠氮基-邻硝基苯甲酰胺基)-乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAND)、N-琥珀酰亚胺基-4(4-叠氮基苯基)1,3′-二硫代丙酸酯(sADP)、N-磺基琥珀酰亚胺基(4-叠氮基苯基)-1,3'-二硫代丙酸酯(磺基-sADP)、磺基琥珀酰亚胺基4-(对叠氮基苯基)丁酸酯(磺基-sAPB)、磺基琥珀酰亚胺基2-(7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺)乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAED)、磺基琥珀酰亚胺基7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酸酯(磺基-sAMCA)、对硝基苯基重氮丙酮酸酯(ρNPDP)、对硝基苯基-2-重氮-3,3,3-三氟丙酸酯(PP-DTP)、巯基反应性和光反应性交联体,如1-(对叠氮基水杨酰胺基)-4-(碘乙酰胺基)丁烷(AsIB)、N-[4-(对叠氮基水杨酰胺基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺(APDP)、苯甲酮-4-碘乙酰胺、苯甲酮-4-马来酰亚胺羰基反应性和光反应性交联体,如对叠氮基苯甲酰基酰肼(ABH)、羧酸酯反应性和光反应性交联体,如4-(对叠氮基水杨酰胺基)丁胺(AsBA),以及精氨酸反应性和光反应性交联体,如对叠氮基苯基乙二醛(APG)。

[0211] 在一些实施方案中,连接体Y包含马来酰亚胺基团。在一些情况下,该马来酰亚胺基团也被称为马来酰亚胺间隔体。在一些情况下,该马来酰亚胺基团进一步包含己酸,形成马来酰亚胺基己酰基(mc)。在一些情况下,该连接体包含马来酰亚胺基己酰基(mc)。在一些情况下,该连接体是马来酰亚胺基己酰基(mc)。在其它情况下,该马来酰亚胺基团包含马来酰亚胺基甲基,如上述琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(sMCC)或磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)。

[0212] 在一些实施方案中,所述马来酰亚胺基团是自稳定化的马来酰亚胺。在一些情况下,自稳定化的马来酰亚胺利用二氨基丙酸(DPR)并入与马来酰亚胺相邻的碱性氨基,以提

供硫代琥珀酰亚胺环水解的分子内催化，从而避免了马来酰亚胺通过逆迈克尔反应发生消除反应。在一些情况下，自稳定化的马来酰亚胺是Lyon等人，“Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates,”Nat.Biotechnol.32(10):1059-1062(2014)中描述的马来酰亚胺基团。在一些实施方案中，所述连接体包含自稳定化的马来酰亚胺。在一些实施方案中，所述连接体是自稳定化的马来酰亚胺。

[0213] 在一些实施方案中，Y连接体包含溶酶体可裂解的肽。在一些实施方案中，Y连接体包含溶酶体可裂解的二肽Phe-Arg。在一些实施方案中，Y连接体包含溶酶体可裂解的二肽Phe-Lys。在一些实施方案中，Y连接体包含溶酶体可裂解的二肽Val-Cit(l-瓜氨酸)。在一些实施方案中，Y连接体包含溶酶体可裂解的四肽Gly-Phe-Leu-Gly。在一些实施方案中，Y连接体包含溶酶体可裂解的四肽Ala-Leu-Ala-Leu。

[0214] 在一些实施方案中，Y连接体包含溶酶体可裂解的肽和自牺牲间隔体。

[0215] 在一些实施方案中，Y是pH-敏感的连接体。在一些实施方案中，Y在酸性pH条件下裂解。在一些实施方案中，Y在溶酶体的酸性pH条件下裂解。

[0216] 应当理解，本文公开的连接体可以包括非标准氨基酸，例如，羟赖氨酸、锁链素、异锁链素或其它非标准氨基酸。本文公开的连接体可以包括修饰的氨基酸，包括翻译后修饰的氨基酸，例如，甲基化的氨基酸(例如，甲基组氨酸、赖氨酸的甲基化形式等)、乙酰化的氨基酸、酰胺化的氨基酸、甲酰化的氨基酸、羟基化的氨基酸、磷酸化的氨基酸或其它修饰的氨基酸。本文公开的连接体还可包括肽模拟部分，包括通过非肽键连接的部分和通过非氨基酸部分连接或连接至非氨基酸部分的氨基酸。

[0217] 另外的修饰

[0218] 在一些实施方案中，本公开的选择性递送分子任选地缀合至增加标记的多价性和亲合力的高分子量分子。在一些实施方案中，该高分子量分子为水溶性聚合物。合适的水溶性聚合物的实例包括但不限于肽、糖、聚(乙烯)、聚(醚)、聚(胺)、聚(羧酸)等。在一些实施方案中，该水溶性聚合物为葡聚糖、聚乙二醇(PEG)、聚氧化烯、聚唾液酸、淀粉或羟乙基淀粉。使用任何合适的方法将肽缀合至水溶性聚合物(参见Hermanson G.,Bioconjugate Techniques第二版,Academic Press,Inc.2008)。

[0219] 用于比率成像的示例性选择性递送分子

[0220] 图1显示了用于所公开的比率荧光成像方法的选择性递送分子的一个非限制性实例(即，SDM-25或AVB-620)的结构。SDM-25在荧光成像方法中使用，以将一对能够发生荧光共振能量转移的荧光供体和受体部分(例如Cy5和Cy7)(即显像剂)递送到目标组织，该方法包括(a)使目标组织与SDM-25接触(例如，向个体静脉内施用SDM-25)，以及(b)可视化至少一种显像剂。

[0221] 图2B示出了用Cy5/Cy7供体-受体对标记的比率SDM-25在裂解使供体和受体保持紧密靠近的连接体后，荧光发射光谱的变化。对于完整的探针，当被620nm光激发时，Cy5供体分子吸收的能量向Cy7受体分子的基于FRET的转移导致在大约780nm处有强荧光发射。裂解后，两个荧光团的分离消除了基于FRET的能量转移，导致780nm处Cy7荧光发射减少，而670nm处Cy5荧光发射增加。

[0222] 图3A-图3C提供了数据示例，其示出了在人乳腺癌肿瘤组织和正常组织中观察到

的SDM-25(AVB-620)的不同裂解率,以及在基于比率荧光成像的人乳腺癌组织检测中使用SDM-25的受试者工作特征(ROC)曲线。图3A:在25个配对的人乳腺癌患者组织匀浆中的SDM-25裂解率(每分钟裂解的nM)。显示了癌症阳性的肿瘤组织(红色菱形)和癌症阴性的相邻组织(蓝色三角形)。配对的样品用线连接。配对t检验得出P<0.0001以表示肿瘤与正常组织之间的显著性差异。图3B:相同数据的散点图,平均值±95%置信度。图3C:显示了肿瘤相比于正常组织的SDM-25裂解率检测的ROC曲线。

[0223] 如图3A-图3B所示,在正常人乳腺和癌性人乳腺组织匀浆与Cy5/Cy7标记的SDM-25一起孵育后,发现与正常人乳腺组织相比,癌性人乳腺组织中的酶活性和SDM-25裂解显著更高。

[0224] 图4A-图4B提供了数据示例,其示出了使用SDM-25对非恶性乳腺组织和肿瘤匀浆中的MMP活性进行定量。图4A:在10%明胶酶谱上分析来自三个代表性人乳腺癌样品和配对的正常组织的匀浆,该组织选自其数据在图3A-图3C中呈现的25名患者。重组活性MMP2和MMP9显示为标准品(每个泳道2ng)。图4B:在五个代表性人乳腺癌样品(红色)和配对的正常组织(蓝色)(包括图4A中示出的三对)中的六种MMP的ELISA定量。误差条是标准偏差。ND=检测不到。

[0225] 在一些情况下,向生物样本输注Cy5/Cy7标记的SDM-25(或其它比率指示剂)允许区分展现出目标生物活性的区域和不具有高图像对比度的区域。例如,向生物样本输注Cy5/Cy7标记的SDM-25(或其它比率指示剂)可在展现出与癌症相关的蛋白酶活性的区域与不展现该活性的区域之间提供至少1.25:1、1.5:1、1.75:1、2:1、3:1、4:1、5:1、10:1、20:1或更高的荧光比率图像或荧光强度图像对比度。

[0226] 使用方法

[0227] 如上所述,所公开的比率荧光指示剂和成像方法可以用来检测和/或可视化生物样本中展现出目标生物活性的区域。“生物样本”的实例包括但不限于培养的细胞样品、原代细胞样品(例如,其中细胞外基质已经被消化或溶解从而将单个细胞释放到悬浮液中的组织样品)、血液样品或其部分、离体组织样品(例如,活检样品或手术切除的样品)、体内组织样品(例如,在外科手术过程中暴露的肿瘤组织或边缘组织)等。生物样本可以从多种生物体中的任何一种收集,例如原核生物、真核生物、真菌、植物、动物或人。在一些情况下,生物样本是患者样品。“生物活性”的实例包括但不限于离子浓度或转运活性的变化(例如,Ca^{2+}离子的积累或释放,或局部pH的变化)、可激发细胞的跨膜电位的变化、蛋白酶活性(例如,细胞外蛋白酶活性)增强的区域、使用比率荧光指示剂监测的其它生化或生理过程的变化,或其任意组合。在一些情况下,待检测并可视化的生物活性与诸如关节炎、动脉粥样硬化、癌症、乳腺癌、癌前病变、恶性组织、凝血(血液凝固)、炎症或其任意组合等各种疾病状态相关。

[0228] 在一些实施方案中,所公开的比率荧光指示剂用来检测和诊断离体组织样品(例如,活检样品或手术切除的样品)中的癌症。

[0229] 在一些实施方案中,所公开的比率荧光指示剂和成像方法用来可视化有需要的个体(例如患者)中的目标组织。在一些实施方案中,该比率成像方法包括:(a)向个体施用比率荧光指示剂,例如用Cy5/Cy7供体-受体对标记的比率ACPP如SDM-25,和(b)可视化至少一种荧光物质。

[0230] 在一些实施方案中，比率荧光指示剂向细胞或组织的靶向递送使得医学专业人士能对特定组织(例如，癌组织)进行可视化/成像。在一些实施方案中，显像剂向细胞或组织的靶向递送使得医学专业人士能去除(或手术切除)目标组织(例如，癌组织)。在一些实施方案中，显像剂向细胞或组织的靶向递送使得医学专业人士能去除(或手术切除)目标组织(例如，癌组织)而手术切缘减小。在一些实施方案中，显像剂向细胞或组织的靶向递送使得医学专业人士能去除(或手术切除)肿瘤/癌组织并减少一些肿瘤/癌组织不能被去除的机会。在一些实施方案中，显像剂向细胞或组织的靶向递送使得医学专业人士能最大化地压实(debulk)肿瘤/癌组织。在一些实施方案中，显像剂向癌性乳腺组织的靶向递送减少了不必要的手术和再次手术的机会。在一些实施方案中，在术中评估癌症边缘状态。

[0231] 在一些实施方案中，显像剂向细胞或组织的靶向递送使得医学专业人士能够对目标组织(例如，癌组织)进行更精确地采样(例如，活检(例如，切除活检、切开活检、针吸活检或穿刺活检))。在一些实施方案中，显像剂向细胞或组织的靶向递送使得医学专业人士能在含有健康组织的切除组织中对特定组织(例如，癌组织)进行可视化/成像。能够鉴定靶组织(例如，癌组织)可以引导病理学家对切片组织样品进行病理学评价并减少病理学家错过不健康组织(例如，癌组织)和对产生假阴性结果的健康组织进行采样的机会。在一些实施方案中，在使用式(I)化合物或式(II)化合物之后移除的组织(例如，癌组织)用于制备病理切片或玻片。在一些实施方案中，在使用式(I)化合物或式(II)化合物之后移除的癌组织用于制备用来诊断该组织是恶性的还是良性的病理切片或玻片。

[0232] 在一些实施方案中，显像剂向癌性乳腺组织的靶向递送使得医学专业人士能对癌症精确地分期，从而能够作出医疗决定。在一些实施方案中，显像剂向癌组织的靶向递送使得医学专业人士能观察肿瘤(癌组织)的大小或癌组织的扩散(例如，转移病灶)。在一些实施方案中，显像剂向细胞或组织的靶向递送使得医学专业人士能设计有效的治疗方案。

[0233] 在一些实施方案中，包含显像剂的根据式(I)的选择性递送分子(例如，用荧光供体-受体对标记的选择性递送分子)在引导手术中使用。在一些实施方案中，选择性递送分子优先定位至癌组织或其它蛋白酶活性上调的病理组织(例如，正在经历炎症应答的组织)。在一些实施方案中，包含显像剂的根据式I的选择性递送分子在引导手术中用来去除癌组织，例如结直肠癌。在一些实施方案中，应用选择性递送分子的引导手术允许外科医生切除尽可能少的健康(即非癌性)组织。在一些实施方案中，应用选择性递送分子的引导手术允许外科医生可视化并切除比在没有选择性递送分子存在下外科医生所能够切除的癌组织更多的癌组织。在一些实施方案中，该手术是荧光引导的手术。

[0234] 在一些实施方案中，包含显像剂的根据式(II)的选择性递送分子(例如，用荧光供体-受体对标记的选择性递送分子)在引导手术中使用。在一些实施方案中，选择性递送分子优先定位至癌组织或其它蛋白酶活性上调的病理组织(例如，正在经历炎症应答的组织)。在一些实施方案中，包含显像剂的根据式(II)的选择性递送分子在引导手术中用来去除结直肠癌。在一些实施方案中，应用选择性递送分子的引导手术允许外科医生切除尽可能少的健康(即非癌性)组织。在一些实施方案中，应用选择性递送分子的引导手术允许外科医生可视化并切除比在没有选择性递送分子存在下外科医生所能够切除的癌组织更多的癌组织。在一些实施方案中，该手术是荧光引导的手术。

[0235] 在一些实施方案中，目标组织是：乳腺癌组织、结肠癌组织、鳞状细胞癌组织、前列

腺癌组织、黑素瘤组织、肉瘤组织、甲状腺癌组织、结直肠癌组织、皮肤癌组织、卵巢癌组织、癌性淋巴结组织、宫颈癌组织、肺癌组织、胰腺癌组织、头颈癌组织或食道癌组织。在一些实施方案中，目标组织是乳腺癌组织。在一些情况下，目标组织是结肠癌组织。在一些情况下，目标组织是肺癌组织。在一些实施方案中，目标组织是前列腺癌组织。

[0236] 在一些实施方案中，所述癌症是AIDS相关的癌症(例如，AIDS相关的淋巴瘤)、肛门癌、基底细胞癌、胆管癌(例如，肝外)、膀胱癌、骨癌(骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤)、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌(例如，子宫癌)、室管膜瘤、食管癌、眼癌(例如，眼内黑素瘤和视网膜母细胞瘤)、胃癌、生殖细胞瘤(例如，颅外、性腺外、卵巢)、头颈癌、白血病、唇和口腔癌、肝癌、肺癌(例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌)、卵巢癌、胰腺癌、垂体瘤、前列腺癌、肾癌、肉瘤、皮肤癌、小肠癌、鳞状细胞癌、睾丸癌、喉癌、甲状腺癌、尿道癌和移植后淋巴增生障碍(PTLD)。

[0237] 在一些实施方案中，所述癌症是乳腺癌。在一些情况下，该乳腺癌包括浸润性导管癌(IDC)、浸润性小叶癌(ILC)、原位导管癌(DCIS)、炎性乳腺癌、卢布氏原位癌(LCIS)、男性乳腺癌、乳腺癌的分子亚型癌、乳头Paget病、乳腺叶状肿瘤和转移性乳腺癌。在一些情况下，IDC进一步细分为乳腺管状癌、乳腺髓样癌、乳腺粘液癌、乳头乳头状癌和乳状筛状癌。在一些情况下，乳腺癌的分子亚型包括管腔A、管腔B、三阴性/基底样、HER2富集或正常样乳腺癌。

[0238] 在一些实施方案中，所述癌症是淋巴癌(例如，淋巴瘤)。

[0239] 在一些实施方案中，所述癌症是B细胞癌。在一些实施方案中，所述癌症是前体B细胞癌(例如，前体B-淋巴母细胞性白血病/淋巴瘤)和外周B细胞癌(例如，B-细胞慢性淋巴细胞白血病/幼淋巴细胞白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤(小淋巴细胞(SL)NHL)、淋巴浆细胞样淋巴瘤/免疫细胞瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡中心淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤(例如，细胞学等级:I(小细胞)、II(混合的小细胞和大细胞)、Ⅲ(大细胞)和/或亚型:弥漫性和主要小细胞型)、低度/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)、中度/滤泡性NHL、边缘区B细胞淋巴瘤(例如，结节外(例如，MALT型+/-单核细胞样B细胞)和/或结节(例如，+/-单核细胞样B细胞))、脾边缘区淋巴瘤(例如，+/-绒毛状淋巴细胞)、毛细胞白血病、浆细胞瘤/浆细胞骨髓瘤(如骨髓瘤和多发性骨髓瘤)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(例如，主纵隔(胸腺)B细胞淋巴瘤)、中度弥漫性NHL、伯基特淋巴瘤、高度B细胞淋巴瘤、伯基特样、高度免疫母细胞NHL、高度淋巴母细胞NHL、高度小无裂细胞NHL、大病变NHL、AIDS相关淋巴瘤和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症)。

[0240] 在一些实施方案中，所述癌症是T细胞和/或推定的NK细胞癌。在一些实施方案中，所述癌症是前体T细胞癌(前体T淋巴母细胞淋巴瘤/白血病)和外周T细胞和NK细胞癌(例如，T-细胞慢性淋巴细胞白血病/幼淋巴细胞白血病和大颗粒淋巴细胞白血病(LGL)(例如，T型细胞类型和/或NK细胞型)、皮肤T-细胞淋巴瘤(例如，蕈样真菌病/塞泽里综合征)、未指明的原发性T细胞淋巴瘤(例如，细胞学分类(例如，中等大小细胞、混合的中等和大细胞)、大细胞、淋巴上皮细胞、亚型肝脾γδT细胞淋巴瘤和皮下脂膜炎T-细胞淋巴瘤)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤(AILD)、血管中心性淋巴瘤、肠T-细胞淋巴瘤(例如，+/-肠病相关的)、成人T细胞淋巴瘤/白血病(ATL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)(例如，CD30+、T细胞和裸细胞类型)、间变性大细胞淋巴瘤和霍奇金病等)。

[0241] 在一些实施方案中，所述癌症是霍奇金病。

[0242] 在一些实施方案中,所述癌症是白血病。在一些实施方案中,所述癌症是慢性髓细胞I(粒细胞)白血病、慢性髓性和慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性淋巴母细胞白血病(ALL)、急性髓样白血病、急性淋巴细胞白血病和急性粒细胞白血病(例如,成髓细胞、前髓细胞、髓单核细胞、单核细胞和红白血病)。

[0243] 在一些实施方案中,所述癌症是液体瘤或浆细胞瘤。在一些实施方案中,所述癌症是髓外浆细胞瘤、单发性骨髓瘤和多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,该浆细胞瘤为多发性骨髓瘤。

[0244] 在一些实施方案中,所述癌症是肺癌。

[0245] 在一些实施方案中,所述癌症是前列腺癌。在一些实施方案中,该前列腺癌是腺癌。在一些实施方案中,该前列腺癌是肉瘤、神经内分泌肿瘤、小细胞癌、导管癌或淋巴瘤。在一些实施方案中,该前列腺癌是A期前列腺癌(在直肠检查期间无法感觉到癌症)。在一些实施方案中,该前列腺癌是B期前列腺癌(即,肿瘤累及前列腺内的更多的组织,其可以在直肠检查期间感觉到,或由于高PSA水平而在进行活组织检查时发现)。在一些实施方案中,该前列腺癌是C期前列腺癌(即,癌已经扩散到前列腺外的邻近组织)。在一些实施方案中,该前列腺癌是D期前列腺癌。在一些实施方案中,该前列腺癌为非雄激素依赖性前列腺癌(AIPC)。在一些实施方案中,该前列腺癌是雄激素依赖性前列腺癌。在一些实施方案中,该前列腺癌对于激素疗法是难治性的。在一些实施方案中,该前列腺癌对于激素疗法基本上是难治性的。在一些实施方案中,该前列腺癌对于化疗是难治性的。在一些实施方案中,该前列腺癌是转移性前列腺癌。在一些实施方案中,个体是具有与前列腺癌相关的基因、基因突变或多态性(例如,RNASEL/HPC1、ELAC2/HPC2、SR-A/MSR1、CHEK2、BRCA2、PON1、OGG1、MIC-1、TLR4和PTEN)或具有一个或多个与前列腺癌相关的基因的额外拷贝的人。在一些实施方案中,该前列腺癌是HER2阳性的。在一些实施方案中,该前列腺癌是HER2阴性的。

[0246] 在一些实施方案中,所述癌症已经转移并以循环肿瘤细胞为特征。

[0247] 在一些实施方案中,目标组织是蛋白酶活性上调的组织(例如,正在经历炎症应答的组织)。

[0248] 药物组合物

[0249] 在某些实施方案中,本文公开了包含任何本文公开的SDM的药物组合物。在一些实施方案中,包含SDM的药物组合物包含式I或式II中任一个的SDM和药学上可接受的载体。

[0250] 使用一种或多种生理学上可接受的载体配制本文的药物组合物,该载体包括有助于将活性剂加工成药学上使用的制剂的赋形剂和辅料。合适的制剂取决于选定的给药途径。药物组合物的概述见于,例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Nineteenth Ed(Easton,Pa.:Mack Publishing Company,1995);Hoover,John E.,Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pennsylvania 1975;Liberman,H.A.和Lachman,L.,Eds.,Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Decker,New York,N.Y.,1980;和Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第7版.(Lippincott Williams&Wilkins,1999)。

[0251] 在某些实施方案中,本文公开的药物组合物进一步包含药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体。在一些实施方案中,该药物组合物包含其它药物或药剂、载体、佐剂(如防腐剂、稳定剂、润湿剂或乳化剂)、助溶剂、调节渗透压的盐和/或缓冲液。另外,该药物组合物

还含有其它在治疗上有价值的物质。

[0252] 在某些实施方案中，通过任何合适的给药途径向受试者施用本文公开的药物组合物，该给药途径包括但不限于肠胃外(静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内、血管内、鞘内、玻璃体内、输注或局部)给药。

[0253] 适于肌肉内、皮下、瘤周或静脉内注射的制剂包括生理学上可接受的无菌水或非水溶液、分散体、悬浮液或乳液，以及用于重建成无菌注射溶液或分散体的无菌粉末。适当的水性和非水性载体、稀释剂、溶剂或媒介物的实例包括水、乙醇、多元醇(丙二醇、聚乙二醇、甘油、克列莫佛(cremophor)等)、它们的合适的混合物、植物油(诸如橄榄油)和可注射的有机酯(如油酸乙酯)。例如，通过使用诸如卵磷脂的包衣，通过在分散体的情况下保持所要求的粒径，以及通过使用表面活性剂，来保持适当的流动性。适合皮下注射的制剂还包含可选的添加剂，如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。

[0254] 对于静脉内注射，活性剂可任选地配制于水溶液中，优选地在生理相容性缓冲液中，例如Hank溶液、Ringer溶液或生理盐水缓冲液。

[0255] 肠胃外注射任选地包括浓注或连续输注。用于注射的制剂任选地以单位剂量形式呈现，例如，在安瓿或多剂量容器中，其中加有防腐剂。在一些实施方案中，本文所述的药物组合物是适合于肠胃外注射的在油性或水性媒介物中的无菌悬浮液、溶液或乳液的形式，并含有配制剂如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。用于肠胃外给药的药物制剂包括水溶性形式的活性剂的水溶液。此外，悬浮液任选地制备为适当的油性注射悬浮液。

[0256] 在一些实施方案中，本文描述的药物组合物是适于精确剂量的单次给药的单位剂量形式。在单位剂量形式中，制剂被分成含有适量的本文公开的活性剂的单位剂量。在一些实施方案中，单位剂量是含有离散量的制剂的包装的形式。非限制性实例是在小瓶或安瓿中包装的片剂或胶囊和粉剂。在一些实施方案中，水性悬浮液组合物包装在不可再封闭的单剂量容器中。或者，使用可再封闭的多剂量容器，在这种情况下，在组合物中一般含有防腐剂。仅举例来说，用于肠胃外注射的制剂以单位剂量形式呈现，其包括但不限于安瓿，或在多剂量容器中，其中加有防腐剂。

[0257] 在一些实施方案中，给定SDM的量根据诸如特定化合物、受试者的情况(例如体重)、给药途径以及可视化所需的化合物持续时间等多种因素而变化。示例性剂量包括但不限于0.5mg、1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、11mg、12mg、15mg、18mg、20mg、25mg或30mg。在一些情况下，施用于受试者的SDM的剂量为1mg。在一些情况下，施用于受试者的SDM的剂量为2mg。在一些情况下，施用于受试者的SDM的剂量为4mg。在一些情况下，施用于受试者的SDM的剂量为6mg。在一些情况下，施用于受试者的SDM的剂量为8mg。在一些情况下，施用于受试者的SDM的剂量为10mg。在一些情况下，施用于受试者的SDM的剂量为12mg。在一些情况下，施用于受试者的SDM的剂量为15mg。在一些情况下，施用于受试者的SDM的剂量为20mg。在一些情况下，施用于受试者的SDM的剂量为25mg。在一些情况下，施用于受试者的SDM的剂量为30mg。

[0258] 在一些情况下，在手术前约30分钟至约24小时施用SDM。在一些情况下，在手术前约1小时至约22小时、约1小时至约20小时、约2小时至约22小时、约2小时至约20小时、约2小时至约18小时、约2小时至约16小时、约2小时至约14小时、约2小时至约12小时、约2小时至约10小时、约2小时至约8小时、约4小时至约18小时、约4小时至约16小时、约4小时至约12小

时、约4小时至约8小时、约6小时至约20小时、约6小时至约18小时、约6小时至约12小时、约8小时至约18小时或约8小时至约12小时施用SDM。在一些情况下，在手术前约30分钟、1小时，2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、14小时、16小时、18小时、20小时、22小时或24小时施用SDM。

[0259] 在一些实施方案中，通过输注将SDM施用于受试者。在一些情况下，输注的时间长度约为20分钟、30分钟、40分钟、50分钟、1小时、1.5小时、2小时、2.5小时、3小时、4小时、5小时、6小时或更长时间。在一些情况下，输注的时间长度约为20分钟。在一些情况下，输注的时间长度约为30分钟。在一些情况下，输注的时间长度约为40分钟。在一些情况下，输注的时间长度约为50分钟。在一些情况下，输注的时间长度约为1小时。在一些情况下，输注的时间长度约为50分钟。在一些情况下，输注的时间长度约为1.5小时。在一些情况下，输注的时间长度约为50分钟。在一些情况下，输注的时间长度约为2小时。在一些情况下，输注的时间长度约为50分钟。在一些情况下，输注的时间长度约为4小时。在一些情况下，输注的时间长度约为50分钟。在一些情况下，输注的时间长度约为6小时。

[0260] 荧光检测和成像系统

[0261] 多种荧光检测仪器和成像系统中的任何一种都可以与显像剂，例如比率荧光指示剂、本公开的成像方法一起使用。例如，对于体外研究，可以使用常规的荧光分光计进行基于细胞的测定。对于离体组织样品的成像，可以采用配备有适当一组激发和发射滤光器以及一个或多个CCD相机的落射荧光显微镜。对于体内成像应用，可以采用更复杂的成像系统。在专门的体内成像应用中，例如结肠镜检查中，可以使用允许在两个(或更多个)发射波长处收集荧光图像的改进的内窥镜。

[0262] 通常，这些荧光检测和成像系统将包括：(i)一个或多个激发光源，(ii)激发和发射滤光器组(或用于调整波长设置和带通的其它组件)，(iii)一个或多个检测器，和(iv)用于操控光束在横穿光学系统时的路径的其它光学组件。在一些情况下，荧光检测和成像系统进一步包括一个或多个处理器、计算机数据存储(存储器)组件、操作系统软件、仪器控制软件(例如图像采集软件)和/或数据处理和显示软件(例如，图像处理和显示软件)。

[0263] 图5示意性地示出了比率荧光成像系统的一个非限制性实例，该比率荧光成像系统利用图像分割器光学组件(例如，二向色反射器)将两个不同波长下的荧光发射成像到两个不同相机上。例如由围绕显微镜物镜的环形光提供的激发光用来以指定的激发波长照射组织样品。光学成像系统收集发射的荧光，将其引导到图像分割器组件，在该图像分割器组件中，根据图像分割器的发射波长截止值将图像分为两个分量图像，然后分别成像到两个不同相机的图像传感器芯片上。在一些实施方案中，同时捕获两个图像。在一些实施方案中，依次捕获两个图像。

[0264] 可以使用本领域技术人员已知的多种光源中的任何一种作为激发光源，包括但不限于弧光灯、钨卤素灯、激光器(例如氩离子激光器、氦氖(HeNe)激光器等)、二极管激光器、发光二极管(LED)、光引擎等，或其任意组合。在一些情况下，荧光检测或成像系统包括至少一个光源、至少两个光源、至少三个光源、至少四个光源、至少五个光源或更多个光源。

[0265] 激发和发射滤光器组包括本领域技术人员已知的多种光学滤光器中的任何类型，包括但不限于光学玻璃滤光器(例如，Schott光学滤光器)、长通滤光器、短通滤光器、干涉滤光器、二向色反射器、陷波滤光器等，或其任意组合。在一些情况下，通过改变该系统的光

路中的一个或多个光学滤光器来设置和/或调节激发和/或发射波长(或带通)。在一些实施方案中,使用诸如衍射光栅、单色仪、声光调制器、可调谐液晶滤光器等其它组件来设置和/或调节激发和/或发射波长(和带通)。

[0266] 在一些情况下,独立地调节用于荧光检测或成像系统的激发或发射波长设置,并且其范围为约350nm至约900nm。在一些情况下,激发或发射波长被设置于约350nm、375nm、400nm、425nm、450nm、475nm、500nm、525nm、550m、575nm、600nm、625nm、650nm、675nm、700nm、725nm、750nm、775nm、800nm、825nm、850nm、875nm或900nm。本领域技术人员将认识到,可以将激发或发射波长设置为该范围内的任何值,例如约620nm。

[0267] 在一些情况下,激发光和发射光的带宽可以独立调节,并被指定为指定的激发或发射波长±2nm、±5nm、±10nm、±20nm、±40nm、±80nm或更多。本领域技术人员将认识到,可以将激发或发射带宽设置为该范围内的任何值,例如,大约±55nm。

[0268] 可以使用本领域技术人员已知的多种检测器和图像传感器中的任何种类,包括但不限于光电二极管、雪崩光电二极管、光电二极管阵列、光电倍增管、CCD或CMOS图像传感器和相机等,或其任意组合。在一些情况下,荧光检测或成像系统包括至少一个检测器、至少两个检测器(例如,用于同时在两个不同的发射波长下捕获荧光图像)、至少三个检测器、至少四个检测器、至少五个检测器或者更多个检测器。在一些光学设计中,荧光检测或成像系统被配置为在两个(或更多个)不同的发射波长下捕获荧光强度图像,例如,通过在图像捕获步骤之间改变荧光发射滤光器。在一些光学设计中,荧光检测或成像系统被配置为同时在两个(或更多个)不同的发射波长下收集荧光强度图像,例如,通过在发射光路径中包括适当的二向色反射器,并对每个发射波长使用不同的检测器。

[0269] 可以在荧光检测和成像系统中使用的其它光学组件的实例包括但不限于透镜或透镜系统、棱镜、分束器、镜子、光纤、用于色差校正的衍射光学元件等。这些组件与光源、激发和发射滤光器(或其它用于调节波长设置和带通的组件)以及检测器一起,以本领域技术人员已知的任何光学布置进行配置。

[0270] 图像处理算法

[0271] 本文还公开了与比率荧光成像方法一起使用的图像处理算法,以提高检测并可视化所成像的生物样本内的生物活性区域的准确性。所公开的用于生成和显示荧光比率图像和其中的目标区域(ROI)的算法使得能够自动、半自动或手动鉴别与展现出特定生物活性或目标结构的生物样本内的区域相对应的ROI。在一些实例中,从荧光比率图像生成ROI。在一些实例中,从荧光比率图像和/或荧光强度图像的组合生成ROI。

[0272] 图6提供了既包括硬件组件又包换软件组件的荧光成像系统的示意图。如上所述,在一些情况下,该系统的硬件组件包括图像采集硬件(例如,光源,激发和发射滤光器或等同物,以及检测器,如上所述),以及一个或多个处理器、计算机存储(存储器)组件、图像显示组件、其它仪器控制模块(例如,温度控制器)和/或通信硬件。在一些情况下,该系统的软件组件包括操作系统,在该操作系统内,关于一个或多个图像采集、图像处理和/或图像显示软件模块以及其它可选的仪器控制和通信软件模块的编程指令得到执行。

[0273] 如上所述,在所公开的比率荧光成像方法的一些实施方案中,在图像处理软件模块的指令集中编码的一种或多种图像处理算法用来实现对所分析的图像内的ROI的自动、半自动或手动鉴别,该ROI对应于生物样本中展现出特定生物活性或目标结构的区域。

[0274] 图7示出了用来鉴别目标区域(ROI)的图像处理算法,该目标区域在荧光比率图像和/或相应的荧光强度图像内展现出高荧光比率和/或荧光强度值。使用两个不同发射波长(强度1和强度2)的荧光强度图像来计算荧光比率图像。在一些情况下,在计算比率之前,将强度图像减去背景并且/或者相对于用来捕获图像的曝光时间进行归一化。对于荧光比率和荧光强度图像中的每一个,使用比率或强度的阈值生成掩模图像(即相应的二进制图像文件,其中原始图像的比率或强度等于或低于阈值的每个像素被设置为0的值,并且原始图像的比率或强度值大于阈值的每个像素被设置为1的值)。通过执行逻辑“与”运算以组合三个掩模图像来检测ROI。在一些实施方案中,任选地评价所得的ROI,以确保它们满足最小大小要求(即,消除单个像素噪声或其它检测假象,以确保它们具有生物学相关性)。最小ROI设置与成像系统的光学分辨率有关,并选择为超过成像系统的分辨率以避免被鉴别为假阳性。在一些实施方案中,所述算法以全自动方式执行。在一些实施方案中,其以半自动方式执行。在一些实施方案中,其以手动方式执行。在一些情况下,测量ROI内荧光比率和/或荧光强度的平均值提供了生物活性的定性量度。在一些情况下,测量ROI内的荧光比率和/或荧光强度的平均值提供了生物活性的定量量度。

[0275] 图10示出了图像处理算法,其用来(i)鉴别在荧光比率图像和/或相应的荧光强度图像内展现出高荧光比率和/或荧光强度值的目标区域(ROI),并且(ii)对图像准备中使用的比率荧光指示剂所指示的生物活性作出阳性或阴性预测。使用两个不同发射波长(F1和F2)的荧光强度图像来计算荧光比率图像。在一些情况下,在计算比率之前,将强度图像减去背景并且/或者相对于用来捕获图像的曝光时间进行归一化。在一些情况下,荧光比率图像用于检测ROI。在一些情况下,两个荧光强度图像之一和荧光比率图像用于检测ROI。在一些情况下,荧光比率图像和两个荧光强度图像都用于检测ROI。对于所选的荧光比率和荧光强度图像中的每一个,使用比率和/或强度的阈值生成掩模图像(即相应的二进制图像文件,其中原始图像的比率或强度等于或低于阈值的每个像素被设置为0的值,并且原始图像的比率或强度值大于阈值的每个像素被设置为1的值)。在同时使用荧光比率图像和至少一个荧光强度图像的情况下,通过执行逻辑“与”运算以组合三个掩模图像来检测ROI。在一些实施方案中,任选地评价所得的ROI,以确保它们满足最小大小要求(即,消除单个像素噪声或其它检测假象,以确保它们具有生物学相关性)。最小ROI设置与成像系统的光学分辨率有关,并选择为超过成像系统的分辨率以避免被鉴别为假阳性。经验证的ROI的存在用来对所研究的生物样本内的指定生物活性作出阳性预测。在一些实施方案中,所述算法以全自动方式执行。在一些实施方案中,其以半自动方式执行。在一些实施方案中,其以手动方式执行。在一些情况下,测量ROI内荧光比率和/或荧光强度的平均值提供了生物活性的定性量度。在一些情况下,测量ROI内的荧光比率和/或荧光强度的平均值提供了生物活性的定量量度。

[0276] 图11示出了图像处理算法,其中使用用户选择的ROI对图像准备中使用的比率荧光指示剂所指示的生物活性作出阳性或阴性预测。使用两个不同发射波长(F1和F2)的荧光强度图像来计算荧光比率图像。在一些情况下,在计算比率之前,将强度图像减去背景并且/或者相对于用来捕获图像的曝光时间进行归一化。在一些情况下,荧光比率图像用于鉴别用户选择的ROI。在一些情况下,两个荧光强度图像之一和荧光比率图像用于鉴别用户选择的ROI。在一些情况下,荧光比率图像和两个荧光强度图像都用于鉴别用户选择的ROI。对

于鉴别用户选择的ROI的荧光比率和荧光强度图像中的每一个，计算用户选择的ROI内比率和/或强度值的平均值，并将其与荧光比率和/或强度阈值进行比较，以生成掩模图像(即相应的二进制图像文件，其中原始图像的比率或强度等于或低于阈值的每个像素被设置为0的值，并且原始图像的比率或强度值大于阈值的每个像素被设置为1的值)。在生成两个或更多个掩模图像的情况下，然后通过执行逻辑“与”运算来组合掩模图像，以鉴别已超过所有阈值的那些ROI。在一些实施方案中，任选地评价所得的ROI，以确保它们满足最小大小要求(即，消除单个像素噪声或其它检测假象，以确保它们具有生物学相关性)。最小ROI设置与成像系统的光学分辨率有关，并选择为超过成像系统的分辨率以避免被鉴别为假阳性。经验证的ROI的存在用来对所研究的生物样本内的指定生物活性作出阳性预测。在一些实施方案中，所述算法以全自动方式执行。在一些实施方案中，其以半自动方式执行。在一些实施方案中，其以手动方式执行。在一些情况下，测量ROI内荧光比率和/或荧光强度的平均值提供了生物活性的定性量度。在一些情况下，测量ROI内的荧光比率和/或荧光强度的平均值提供了生物活性的定量量度。

[0277] 图12示出了图像处理算法的一个非限制性实例，其用来鉴别荧光比和/或强度阈值的最准确的组合，以供确定已输注了比率荧光指示剂的生物样本中生物活性(例如，与癌症相关的增强的细胞外酶活性)的存在。使用两个不同发射波长的荧光强度图像来计算多个生物样本(即已输注了比率荧光指示剂的组织样本)中每个样本的荧光比率图像。在一些情况下，在计算比率之前，将强度图像减去背景并且/或者相对于用来捕获图像的曝光时间进行归一化。为第一荧光强度阈值、第二荧光强度阈值、荧光比率阈值或其任意组合提供起始值；并且对于每个生物样本，重复以下步骤：i)使用图像分析算法(例如，图7、图10或图11所示的算法)处理荧光比率图像、第一荧光强度图像、第二荧光强度图像或其任意组合，其中该图像分析算法使用荧光比率阈值、第一荧光强度阈值、荧光强度阈值或其任意组合来创建荧光比率图像和荧光强度图像的掩模图像，如果已创建两个或更多个掩模图像，则对掩模图像执行“与”逻辑运算，任选地核实展现出的荧光比率或强度值超过指定荧光比率或强度阈值的任何所检测的目标区域大于指定的最小大小，并提供该生物样本对于指定的生物活性(例如癌症)呈阳性或阴性的分类；ii)将所述图像分析算法提供的分类与生物样本的病理学实验室检验结果进行比较，以确定分类是真阳性、假阴性、真阴性还是假阳性；以及iii)存储真阳性、假阴性、真阴性或假阳性结果。然后使用增加的第一荧光强度阈值、第二荧光强度阈值或荧光比率阈值，同时其它阈值保持固定，来重复这些步骤，直到通过所述图像处理算法将所有生物样本分类为阴性。受试者工作特征(ROC)曲线绘制出临床灵敏度(或“真阳性率”)与(1-临床特异性)(或“假阳性率”)，并且常规用于确定诊断试验的灵敏度和特异性。对于每组荧光比率和强度阈值，使用存储的分类结果计算受试者工作特征(ROC)曲线；并比较每组荧光比率和强度阈值的ROC曲线下面积，以确定荧光比率阈值、第一荧光强度阈值、第二荧光强度阈值或其任意组合的最佳设置。

[0278] 每次一个阈值(即荧光比率阈值或荧光强度阈值)发生变化，而其它阈值保持固定，以对一组生物样本，基于成像数据与病理学实验室数据的比较(或其它独立的生物活性确定)生成最准确的阈值。受试者工作特征(ROC)曲线是通过将来自不同荧光比率和/或强度阈值下的图像分析的预测与例如病理学实验室结果进行比较而生成的。

[0279] 在一些实施方案中，所述阈值优化算法以全自动方式执行。在一些实施方案中，其

以半自动方式执行。在一些实施方案中，其以手动方式执行。

[0280] 本文所述的算法可单独或组合使用，以提高所公开的使用比率荧光指示剂检测目标生物活性的比率成像方法的临床(或非临床)灵敏度(或“真阳性率”)、特异性(或“真阴性率”)和总体预测准确性。在一些情况下，灵敏度为至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％或100％。在一些情况下，特异性为至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％或100％。本领域技术人员将认识到，灵敏度和特异性可以各自独立地具有这些范围内的任何值，例如，灵敏度可以是92％，且特异性可以是94％。在一些情况下，灵敏度和/或特异性取决于待检测的生物活性(或相关疾病状态)的类型。例如，灵敏度和/或特异性可以根据正被检测的癌症的特定类型而变化。

[0281] 在下面描述的实例中，已经使用由美国国立卫生研究院开发的开源ImageJ软件实现了本文公开的图像处理算法，但是本领域技术人员将会认识到，它们也可以使用多种其它编程语言(例如，包括但不限于C、C++、Java、Fortran、Lua、Visual Basic等)和软件包(例如，包括但不限于Cell Profiler、Icy、LabVIEW、MatLab(Mathworks,Natick,MA)等)中的任意一种来实现。在一些实施方案中，本文公开的图像处理算法可以潜在地使用有助于该算法的性能的定制软件代码来实现，使得它们运行得更快，使用更少的计算机存储器，在便宜的处理器上运行，等等。

[0282] 计算机系统

[0283] 使用一个或多个处理器来实现本文公开的图像处理方法和算法。所述一个或多个处理器可以包括硬件处理器，如中央处理单元(CPU)、图形处理单元(GPU)、通用处理单元或计算平台。所述一个或多个处理器可以由多种合适的集成电路、微处理器、逻辑设备等中的任何种类组成。尽管以处理器为例描述了本公开内容，但是其它类型的集成电路和逻辑设备也可以适用。处理器可以具有任何合适的数据运算能力。例如，处理器可以执行512位、256位、128位、64位、32位或16位数据运算。所述一个或多个处理器可以是单核或多核处理器，或者是配置用于并行处理的多个处理器。

[0284] 所述一个或多个处理器或荧光成像系统本身可以是较大计算机系统的一部分，并且/或者可以借助于通信接口可操作地耦合到计算机网络(“网络”)，以促进图像数据和预测结果的传输并共享。该网络可以是局域网、内联网和/或外联网，与因特网通信的内联网和/或外联网，或因特网。在一些情况下，该网络是电信和/或数据网络。该网络可以包括一个或多个计算机服务器，在一些情况下其能实现分布式计算如云计算。在一些情况下，该网络在计算机系统的帮助下可以实现对等网络，这可以使与计算机系统耦合的设备能够起到客户端或服务器的作用。

[0285] 计算机系统还可包括存储器或存储器位置(例如，随机存取存储器、只读存储器、闪速存储器)、电子存储单元(例如，硬盘)、用于与一个或多个其它系统通信的通信接口(例如，网络适配器)和外围设备，如高速缓冲存储器、其它存储器、数据存储和/或电子显示适配器。该存储器、存储单元、接口和外围设备可以通过通信总线与一个或多个处理器例如CPU通信，例如，如主板上所见。该存储单元可以是用于存储数据的数据存储单元(或数据存储库)。

[0286] 所述一个或多个处理器，例如CPU，执行体现在程序或软件中的一系列机器可读指

令。该指令存储在存储器位置中。该指令被导向CPU，该指令随后对CPU进行编程或以其它方式进行配置以实现本公开的方法。由CPU执行的操作的实例包括提取、解码、执行和回写。该CPU可以是电路如集成电路的一部分。该系统的一个或多个其它组件可以包含在该电路中。在一些情况下，该电路是专用集成电路(ASIC)。

[0287] 存储单元存储文件，如驱动程序、文件库和保存的程序。存储单元存储用户数据，例如用户指定的偏好和用户指定的程序。在一些情况下，所述计算机系统可以包括位于计算机系统外部(诸如位于通过内联网或因特网与计算机系统通信的远程服务器上)的一个或多个附加数据存储单元。

[0288] 本文所提供的图像处理方法的某些方面，诸如所公开的图像处理算法，是通过存储在计算机系统的电子存储位置(例如，存储器或电子存储单元)中的机器(例如，处理器)可执行代码来实现的。该机器可执行或机器可读代码以软件的形式提供。在使用期间，该代码由一个或多个处理器执行。在一些情况下，从存储单元中检索代码并将其存储在存储器中以供一个或多个处理器随时访问。在一些情况下，排除电子存储单元，并将机器可执行指令存储在存储器中。可将代码预编译并配置用于与具有适于执行该代码的一个或多个处理器的机器一起使用，或者可以在运行时间对其进行编译。该代码可以以编程语言的形式提供，该编程语言被选择用于使得该代码能够以预编译或实时编译的方式执行。

[0289] 所述技术的各个方面可以被认为是“产品”或“制品”，一般呈保存在某一类型的机器可读介质中的机器(或处理器)可执行代码和/或相关数据的形式。机器可执行代码存储在电子存储单元如存储器(例如，只读存储器、随机存取存储器、闪速存储器)或硬盘中。“存储”型介质包括计算机、处理器等的任何或全部有形存储器，或其相关模块，如各种半导体存储器芯片、磁带驱动器、磁盘驱动器等，其可随时为编码本文公开的图像处理方法和算法的软件编程提供非暂时性存储。

[0290] 全部或部分软件代码可以不时地通过因特网或各种其它电信网络进行通信。这样的通信例如使得软件能够从一个计算机或处理器加载到另一个计算机或处理器，例如从管理服务器或主机计算机加载到应用程序服务器的计算机平台。因此，其它类型的可用来传送软件编码的指令的介质包括光波、电波和电磁波，如跨越本地设备之间的物理接口使用的那些，通过有线和光学陆上线路网络以及通过各种大气链路使用的那些。诸如有线或无线链路、光学链路等携带此类波的物理元件也被视为传送软件编码的指令以供执行本文所公开的方法的介质。如本文所用的，除非限于非暂时性的有形“存储”介质，否则诸如计算机或机器“可读介质”等术语是指参与向处理器提供指令以供执行的任何介质。

[0291] 所述计算机系统通常包括用于提供例如由成像装置捕获的图像的电子显示器或可以与该电子显示器通信。该显示器通常还能够提供用户界面。UI的实例包括但不限于图形用户界面(GUI)、基于Web的用户界面等。

[0292] 实施例

[0293] 这些实施例的提供只是为了说明性目的，而非限制本文提供的权利要求的范围。

[0294] 实施例1-对于人的比率成像

[0295] 研究设计：作为1期、开放标签、剂量递增研究的一部分，在接受手术的原发性、非复发性乳腺癌女性中进行比率成像。该研究对于剂量递增阶段包括5个剂量队列，采用3+3队列扩展设计，起始剂量为1mg，然后根据荧光特性和在每个剂量组中观察到的安全性数据

增加了第6个额外的队列。另一个队列比较了手术和成像前不同SDM-25(AVB-620)施用时间的荧光特性。患者在进行病灶切除术/乳房切除术和前哨淋巴结活检/腋窝淋巴结清扫术之前的2至20小时接受SDM-25的输注。对手术野以及包括暴露的原发性肿瘤在内的切除后手术样本所获得的图像进行成像分析。为了将成像结果与组织病理学数据相关联,获得了病理学报告。通过静脉内(IV)输注施用SDM-25,然后用生理盐水冲洗。进入队列1至4的受试者在手术前12至20小时(前一天)接受腹膜内(IP)注射。扩展队列中的受试者在手术前2至12小时(当天)或12至20小时(前一天)接受SDM-25。

[0296] 图像捕获:成像系统由研究资助方提供,并利用三相机系统同时记录三个在空间上记录的图像。第一个是彩色相机,另外两个相机用来对荧光进行成像。成像系统显示四个实时图像:彩色亮视野图像,Cy5染料荧光图像,Cy7染料荧光图像,和由这两个荧光图像生成的Cy5/Cy7比率图像。在样本成像之前拍摄背景图像(关闭激发光)。图像曝光时间随剂量而不同,并进行调整以适应相机传感器的动态范围。获得了初始手术野、残留肿瘤床和腋窝内容物的体内图像。手术切除后,从多个角度采集了原发性肿瘤、边缘样本和所有淋巴结的许多图像。

[0297] 图像分析:手术后分析切除的组织的存储图像。将Cy5和Cy7图像减去背景并用来生成Cy5/Cy7比率图像。肿瘤区域(即目标区域(ROI))被鉴别为展现出高荧光比率的区域。绘制ROI,以便仅分析包含目标组织的图像区域。为了在全部队列中进行定量和比较,用曝光时间长度对荧光强度读数进行归一化。使用来自ROI的经曝光校正的荧光强度值生成最终的ROI比率图像。

[0298] 如图7所示,基于用户定义的阈值自动生成ROI。或者,用户可根据Cy5/Cy7荧光比率和/或强度手动选择ROI。

[0299] 人类组织样本的病理学分析:不同研究地点的病理科根据当地科室方案检查了手术切除的组织。收集关于肿瘤大小、等级、淋巴结状态的数据,包括组织学分类(例如,浸润性导管、浸润性小叶、导管癌等)以及雌激素受体(ER)、孕酮受体(PR)和HER2受体状态。通过将最终病理报告中的数据与上述图像分析得出的结果进行匹配,进行成像与病理的关联。

[0300] 结果:如图8A-图8B所示,在病灶切除术切除的组织和淋巴结中,Cy5和Cy7的荧光强度均随着SDM-25剂量的增加而增加。图8A:原发性病灶切除术样本;切除的原发性样本组织的平均Cy5和Cy7强度相对于剂量的图。这些值是从整个切除的样本得出的。图8B:阴性淋巴结包;研究中每个队列的阴性淋巴结的平均Cy5和Cy7强度的图。这些值是从整个切除的样本得出的。误差条表示标准偏差。仅使用荧光比率数据,对于给予SDM-25的当天和前一天,恶性原发性肿瘤的荧光比率数据与相邻组织的荧光比率数据显著不同(图9)。

[0301] 实施例2-基于荧光阈值的诊断方法

[0302] 通过对如实施例1所述收集的原发性样本图像选择Cy5/Cy7荧光比率和Cy5强度较高的区域,对可能发生癌症的位置进行基于图像分析的预测。使用美国国立卫生研究院开发的开源ImageJ软件,基于应用Cy5/Cy7比率阈值和/或Cy5强度阈值结合对高于阈值的区域确定最小大小,进行了自动预测。该过程如图10所示,使用图像分析来生成ROI。或者,可以使用用户选择的ROI基于Cy5/Cy7荧光和/或Cy5强度来生成预测,如图11所示。对于Cy5/Cy7比率和/或Cy5强度的给定阈值,作出阳性或阴性的预测。图11示出了概述由荧光比率和各个强度图像生成ROI的过程的流程图。该方法基于荧光比率阈值和/或荧光比率阈值与各

个荧光强度阈值的组合来创建图像掩模。然后使用图像掩模的组合应用来生成ROI。

[0303] 实施例3-使用荧光比率和强度值两者提高诊断性能

[0304] ROC曲线分析:受试者工作曲线(ROC)分析用于确定最佳Cy5/Cy7荧光比率阈值、单个荧光强度阈值以及组合的荧光强度和比率阈值,以提高预测准确性。ROC曲线绘制出临床灵敏度(或“真阳性率”)与(1-临床特异性)(或“假阳性率”),并且常规用于确定诊断试验的灵敏度和特异性。使用成像的组织样品被检测为癌症阳性或阴性的上述图像分析预测来生成ROC曲线,如图12中的流程图所示。

[0305] 原发性肿瘤示例:通过将使用用户选择的ROI对原发性样本图像进行的图像分析获得的预测与金标准病理检验结果进行比较而生成ROC曲线,该病理检验结果包括对苏木精和曙红(H&E)染色的组织切片的病理学家评估,如图11和图12所示。以不同的阈值比较ROI中的Cy5/Cy7比率和Cy5强度,以生成病理学预测。对组合的高荧光比率和高强度区域(假定为阳性——预测为真阳性或假阴性)以及原发性标本的较低Cy5/Cy7比率和较低Cy5强度的相邻区域(假设为阴性——预测为真阴性或假阳性),由基于阈值的病理学预测生成ROC曲线。这些假设与病理学实验室检验一致。结果示于图13A-图13C中,其显示,最高的预测准确性(ROC曲线的最高“曲线下面积”(AUC))是利用Cy5/Cy7荧光比率和Cy5强度(图13C)。图13A:通过改变荧光比率阈值计算的ROC曲线。汇总分析所有给药时间(即当天、前一天)的图像数据。曲线下面积(AUC)=0.86。图13B:在将荧光强度阈值固定为I=80的值的情况下,通过改变荧光比率阈值计算的ROC曲线;AUC=0.98。将原始的8位强度图像扩展为16位图像,以将强度对500ms的曝光进行归一化。图13C:在将荧光比率阈值固定为R=60(在0至255的8位图像数据标度上)的值的情况下,通过改变荧光强度阈值计算的ROC曲线;AUC=0.99。在这种情况下,使用荧光比率和强度阈值的组合获得了最高的准确性。

[0306] 淋巴结示例:使用图7、图10和图12所示的图像分析过程生成图14A-图14B中对于淋巴结样品所示的ROC曲线,以预测组织在给定阈值下是阳性还是阴性。图14A:通过改变荧光比率阈值计算的ROC曲线;强度阈值设置为I≥10;AUC=0.83。图14B:通过改变荧光比率阈值计算的ROC曲线;强度阈值设置为I≥60;AUC=0.95。在这种情况下,使用荧光比率和强度阈值的组合获得了最高的准确性。

[0307] 还在单个患者水平上生成ROC曲线。单个患者的ROC曲线在图15A-图15C中示出,并使用图7、图10和图12所示的图像分析过程流程来生成,以预测组织在给定阈值下是阳性还是阴性。成像的离体组织样品包括原发性样本、淋巴结和边缘。图15A:单个患者的荧光比率阈值ROC曲线(荧光强度阈值设置为I≥5),AUC=0.85。图15B:荧光强度阈值ROC曲线(荧光比率阈值设置为R≥5),AUC=0.83。图15C:单个患者的组合荧光比率和荧光强度ROC曲线;荧光比率阈值增加,而荧光强度阈值固定在I=85,AUC=1.00。在这种情况下,使用荧光比率和强度阈值的组合再次获得了最高的准确性。

[0308] 临床研究:手术前一天(DBD)向患者施用8mg SDM-25。成像和分析方法基于上述方法。

[0309] 来自临床研究的病灶切除术表面和边缘刮取物(shaves)示例:使用图7、图10和图12中所示的图像分析过程,对切除的病灶切除术表面和从手术腔中获取的刮取边缘样品生成ROC曲线,以预测组织在给定阈值下是阳性还是阴性。所有样本和表面数据均与病理学结果进行关联。ROC曲线下面积(AUC)结果是准确性的度量,在下面的表1中给出。

[0310]

方法	表面 DBD (ROC AUC %)	刮取物 DBD (ROC AUC %)
比率+强度	63	67
强度	54	57
比率	57	57

[0311] 在表1所示的这两个组织样本中，使用荧光比率和强度阈值的组合获得了最高的诊断性能或准确性。

[0312] 实施例4-显示从施用SDM-25的患者中切除的人乳腺癌预测癌活性的图像

[0313] 该方法的目的是直观地指示在术中或围手术期存在癌症。来自研究的示例图像在图16中示出。使用上述方法确定Cy5/Cy7比率和Cy5强度高于特定阈值的图像区域，着色为绿色。输注当天拍摄的图像与输注后第二天拍摄的图像使用不同的Cy5/Cy7比率阈值。比率阈值和强度阈值均基于从相机生成的从0到255的像素值的8位图像显示。通过移动显示软件中的Cy5阈值滑块，可以在不进行转换的情况下输入Cy5强度阈值。将比率阈值(8位)转换为百分比(100x(阈值/255))，并通过移动在软件查看器中标记为背景的滑块来输入。Cy5强度阈值未针对曝光或强度差异进行校正。

[0314] 实施例5-显示从施用SDM-25的患者中切除的原发性病灶切除术样本预测癌活性的图像

[0315] 阳性病灶切除术表面边缘示例。经病理学证实为癌症阳性的手术切除的原发性病灶切除术样本表面的示例图像在图19A-图19B中示出。使用上述方法，使用ImageJ软件确定Cy5/Cy7比率和Cy5强度高于指定阈值的图像区域，并再次将其着色为浅灰色。箭头指向高于阈值的区域，该区域对应于已通过病理学证实为癌症的表面。在该实施例中，使用ImageJ软件针对曝光校正了Cy5强度阈值。

[0316] 图19A和图19B提供了来自施用8mg剂量的SDM-25的患者的原发性样本图像的表面边缘的示例，其中在输注后的第二天进行成像。浅灰色区域表示Cy5/Cy7荧光比率阈值R≥170，Cy5强度阈值I≥50。箭头指向高于阈值的区域，该区域对应于已通过病理学证实为癌症的表面。使用所述方法确定阈值。

[0317] 实施例6-乳腺癌小鼠模型中的比率成像

[0318] 体内小鼠模型：基于对黑素瘤模型描述的方法(Hoshida等人(2006)，“Imaging Steps of Lymphatic Metastasis Reveals That Vascular Endothelial Growth Factor-C Increases Metastasis by Increasing Delivery of Cancer Cells to Lymph Nodes:Therapeutic Implications”，Cancer Res.66:8065-75)的改进，开发了用于显像剂评价的小鼠耳肿瘤的淋巴和颈部淋巴结转移模型。使来自ATCC的转移性4T1肿瘤细胞(CRL-2539™)生长并悬浮在DPBS/Matrigel™(1:1体积)中，然后在氯胺酮-赛拉嗪麻醉下皮下注射(4x 10^5个肿瘤细胞/50mL/小鼠)到雌性BALB/c小鼠的右耳耳廓的耳软骨上方。耳肿瘤生长后由于癌细胞向淋巴结的迁移而发生颈部淋巴结转移。在耳肿瘤细胞植入后17至20天(4T1肿瘤模型)，使用带有耳肿瘤的小鼠测试SDM-25。随机选择荷瘤小鼠，用旋转尾注射器(Braintree Scientific,Inc.,MA)约束，并静脉内(尾静脉)给予SDM-25溶液(60μM SDM-

25;100μL/约20克小鼠),即1.8mg/kg体重)。给药后,将每只荷瘤小鼠放回其指定的笼中,并在研究前保持在受控的环境条件下(随意进食和饮水)。在SDM-25给药后3h(N=9)和6h(N=21)检查了总共30只4T1荷瘤小鼠。

[0319] 成像程序和硬件:在通过腹膜内施用盐酸氯胺酮/盐酸赛拉嗪混合物(100mg/kg氯胺酮-10mg/kg赛拉嗪)终末麻醉的带有耳肿瘤的小鼠中,对原发性肿瘤和颈部淋巴结进行体内成像。每只小鼠均对同侧(耳肿瘤侧)和对侧颈部淋巴结进行钝性解剖。手术后,确定了六个主要的可见浅表颈部淋巴结(包括同侧和对侧淋巴结),并用生理盐水(0.9%氯化钠灌注液USP,B.Braun Medical Inc.,Irvine,CA)润湿,并使用各个系统进行成像,这些系统包括:与来自Hamamatsu(Hamamatsu Photonics,K.K.,Systems Division,Shizuoka-Pref,Japan)的HCImage图像采集软件系统相连的SZX10荧光立体显微镜(Olympus Optical,CO,Ltd,Tokyo,Japan);以及与用于图像采集的Spot Software 5.0(SPOT™Imaging Solutions,Sterling Heights,MI)界面连接的定制Navitar Imaging System(Navitar Inc,Rochester,NY)。所有上述荧光成像系统均配备有在约630+/-20nm处发射的LED光源以激发Cy5荧光团,以及两个发射滤光器以分别捕获相同视野的Cy5和Cy7强度图像。

[0320] 诊断性荧光图像分析:在带有耳肿瘤的小鼠中,在SDM-25施用后对颈部淋巴结进行成像和分析。对于每只荷瘤小鼠,收集同时包含同侧和对侧颈部淋巴结的Cy5和Cy7荧光图像,并将其用于制作Cy5/Cy7荧光比率图像。通过使用成像处理程序ImageJ将Cy5图像除以Cy7图像来制作比率图像。在一些情况下,为了显示目的,将强度加权的伪彩色比率图像与反射光图像组合。为每个颈部淋巴结绘出椭圆形或多边形目标区域(ROI),并测量ROI中各个平均荧光强度。如果在检查的淋巴结中比率均匀,则将整个淋巴结用于ROI。如果在成像的颈部淋巴结上存在被定义为具有较高荧光比率的清晰限定区域的“热点”(要求大于淋巴结面积的5%),则选择较小的热点ROI进行分析。从每个ROI计算平均Cy5/Cy7荧光比率。

[0321] 为了显示比率图像,将曝光校正的Cy5波长荧光图像除以曝光校正的Cy7发射波长图像,然后乘以15,以使比率图像的值填充8位动态范围,并且位于0到255之间,如下所示。然后使用为每个强度水平分配的RGB值的查找表对比率图像进行伪彩色处理。通过将伪彩色图像乘以Cy5或Cy7波长荧光图像,针对荧光强度来放大伪彩色比率图像,从而得到其中色相或颜色代表比率且亮度代表荧光强度的图像。

[0322] 显示比率图像值=15*(ICy5/TCy5)/(ICy7/TCy7)

[0323] 其中:

[0324] ICy5=Cy5波长荧光图像强度

[0325] ICy7=Cy7波长荧光图像强度

[0326] TCy5=Cy5曝光时间

[0327] TCy7=Cy7曝光时间

[0328] 使用从对染色的颈部淋巴结切片的H&E分析确定的计算荧光发射比率和淋巴结病理学状态(癌细胞存在/不存在)的比较来评价临床灵敏度和特异性。然后构建受试者工作特征(ROC)曲线,其中绘制阳性值的真阳性分数(真阳性率)与阴性值的假阳性分数(假阳性率),以确定SDM-25的临床灵敏度和特异性。对于ROC曲线分析,基于荧光发射比率的阈值将数据分为阳性和阴性的二元分类。

[0329] 通过将基于荧光发射比率数据和阈值从成像的颈部前哨淋巴结作出的预测与病

理学家使用成像颈部淋巴结的H&E染色组织切片所确定的癌细胞的存在(阳性)或不存在(阴性)进行比较,来确定真阳性、假阳性、真阴性和假阴性。

[0330] 从低值到高值逐渐调整阈值,以获得从(1,1)或全阳性到(0,0)或全阴性的完整ROC曲线。实际上,通过对数据进行分选并使用刚好高于每个检查的淋巴结的实际比率值的阈值来生成ROC曲线。使用布尔逻辑的Excel电子表格用来计算ROC曲线中每个点的真阳性、假阴性、真阴性和假阳性。灵敏度被计算为真阳性率,而特异性被计算为1减去假阳性率。

[0331] 组织病理学:成像后,对每只小鼠进行终末麻醉,收集颈部淋巴结并将其固定在10%缓冲的福尔马林中。立即通过心脏内施用过量的氯胺酮-赛拉嗪对终末麻醉的小鼠施以安乐死。在福尔马林过夜固定之后,对颈部淋巴结进行处理以供组织学评价,以评估荧光/癌症的相关性。获得颈部前哨淋巴结的石蜡切片(5μm),并进行处理,以便由Zyagen(San Diego,CA)和HistoTox Labs,Inc.(Boulder,CO)进行常规的苏木精和曙红(H&E)染色。由VA San Diego Health Care System(San Diego,CA)经过认证的解剖学和临床病理学家进行外科病理学评估,这是确定颈部淋巴结组织中是否存在转移性癌细胞的经典方法。使用Nikon Eclipse显微镜(Tochigi Nikon Precision Co.,Ltd.,Tochigi,Japan)对H&E染色的颈部淋巴结切片进行盲法检查。通过应用标准组织病理学标准确定H&E切片中是否存在转移性癌细胞。

[0332] 实施例7-鼠转移性淋巴结模型中的体内诊断性成像

[0333] 为了评价SDM-25在体内被激活并可视化淋巴结中的乳腺癌的能力,使用了鼠淋巴结转移性乳腺癌模型。实验方案的示意图在图17A-图17D中示出。将癌细胞植入具有免疫能力的小鼠的耳中,并在约2周后转移到颈部淋巴结(图17A)。施用SDM-25,并在3-6小时后麻醉小鼠,并手术暴露颈部淋巴结并成像(图17B-图17C)。最后,取出成像的淋巴结,处理以进行H&E病理学评估,并且比较成像和病理学结果(图17D)。在第一个模型中,经由尾静脉注射SDM-25(6nmol)向30只在耳廓上带有转移性4T1乳腺癌肿瘤的雌性BALB/c小鼠进行静脉内给药。通过从2至24nmol/小鼠的剂量范围研究确立成像剂量。6nmol剂量在恶性与非恶性淋巴结之间产生最大的Cy5/Cy7荧光比率差异,同时在Cy5和Cy7图像中仍都提供可接受的荧光强度信号:背景比。3-6小时后对小鼠的背侧位、前侧位和手术暴露的颈部淋巴结进行术前荧光成像。术前图像显示出植入耳中的原发性肿瘤。叠加有和未叠加荧光比率图像的代表性黑白图像在图18A中示出。图像显示,与暴露的其余部分相比,经病理学证实的原发性肿瘤具有高Cy5/Cy7荧光比率和强度。手术后,分析了60个淋巴结的荧光比率图像,并将其与金标准H&E组织病理学检验的结果进行比较以评估成像准确性,结果示于图18B中。使用6.7-7.4的比率阈值,诊断灵敏度和特异性分别为96%和100%,这产生98%的最高总体准确性。来自一只小鼠的代表性图像在图18C中示出。

[0334] 在给予SDM-25后1至48小时,评价了无癌淋巴结与转移性淋巴结之间Cy5/Cy7荧光比率差异的动力学和稳定性。结果示于图18D中。在1h时观察到显著的荧光比率差异($p<0.02$,t检验),但在3-6h时最大,并且稳定至24h。这个有用的时间窗口远大于SDM-25在小鼠中的血浆半衰期0.24h。在48h时,比率差异仍然显著($p<0.01$,t检验),但主要由于未累及淋巴结中的Cy5/Cy7比率增加而降低。该结果与针对r9e9比率ACPP所观察到的结果有很大不同,后者似乎在2小时时具有最大的对比度,而在24小时时在恶性组织与非恶性组织之间未显示出差异。

[0335] 虽然本文已经示出并描述了本发明的优选实施方案，但对于本领域技术人员显而易见的是，这些实施方案只是通过示例的方式提供的。在不偏离本发明的情况下，本领域技术人员现在将会想到许多变换、改变和替代。应当理解，在实施本发明的过程中可以采用本文所述的本发明实施方案的各种替代方案。旨在用以下权利要求限定本发明的范围，并因此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

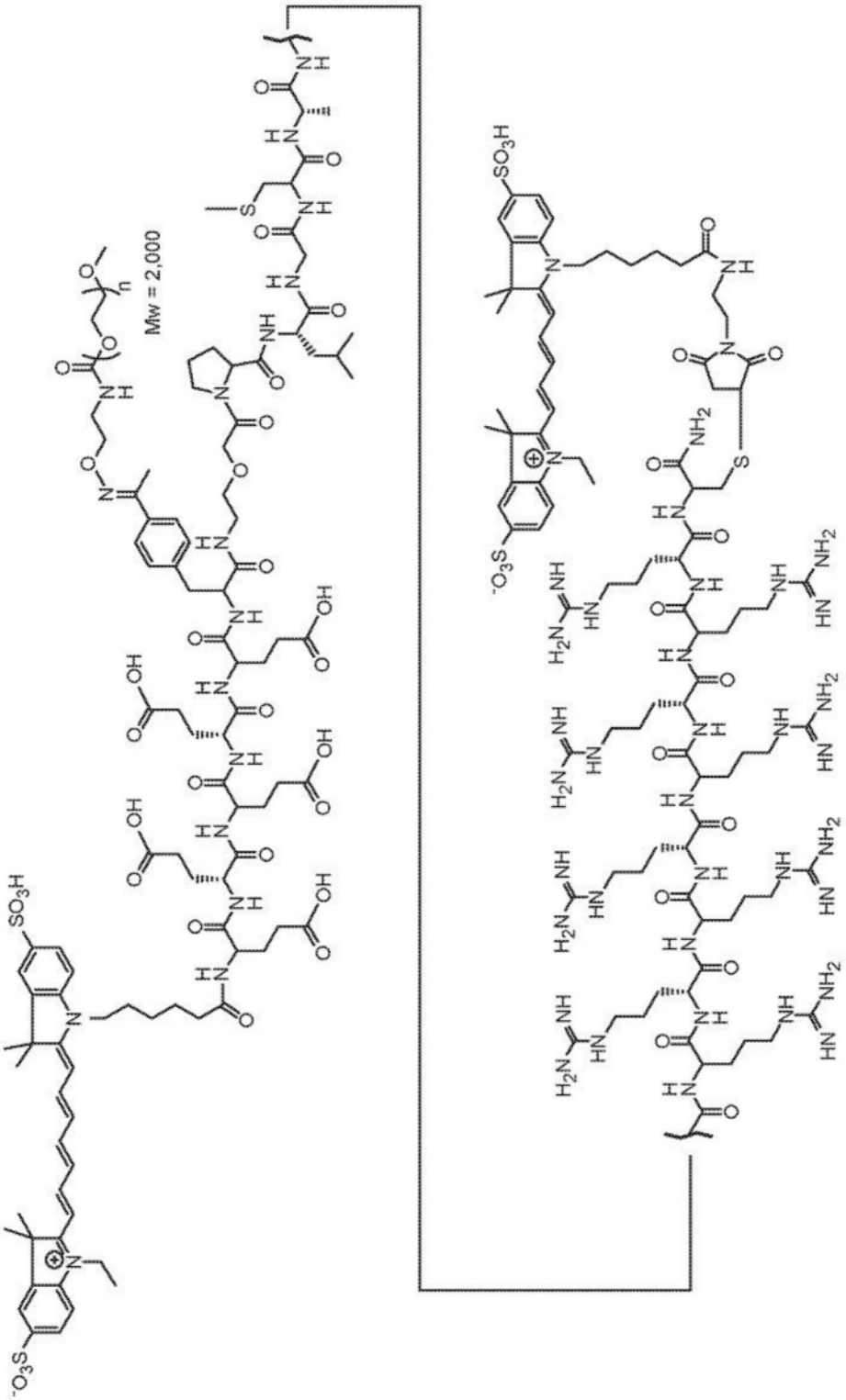


图1

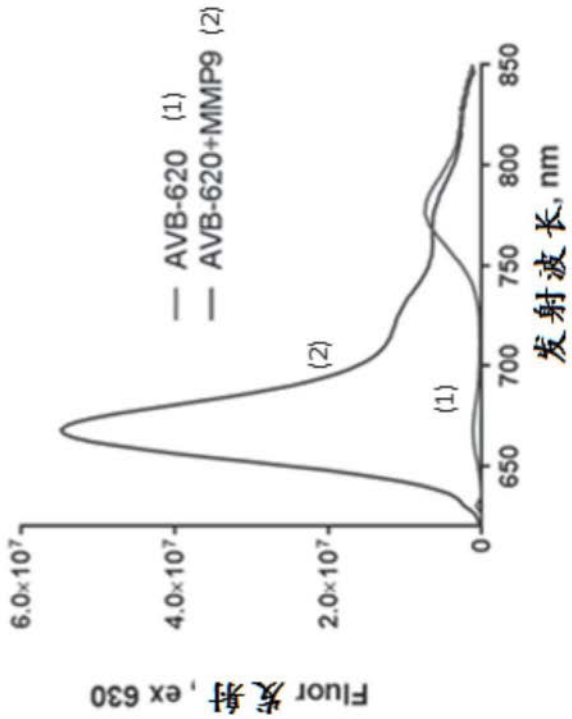

AVB-620 (1)
AVB-620+MMP9 (2)
(1)
(2)
Fluor 发射 , ex 630
6.0x10^7
4.0x10^7
2.0x10^7
0
650
700
750
800
850
发射波长, nm

图 2B

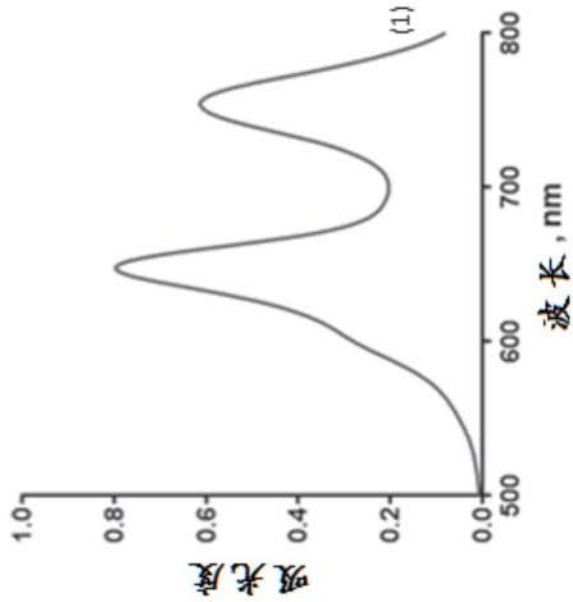

(1)
吸光度
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
500
600
700
800
波长, nm

图 2A

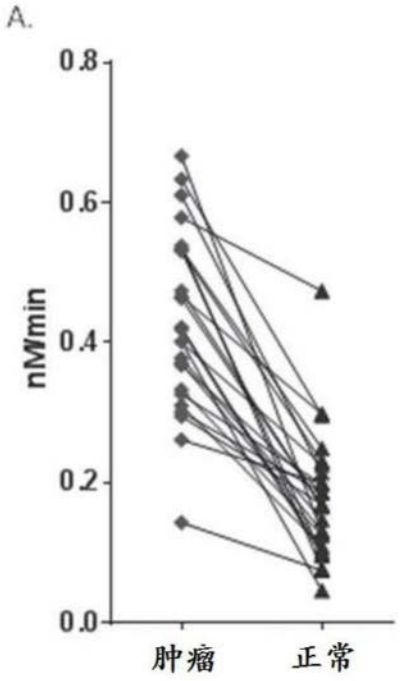


图3A

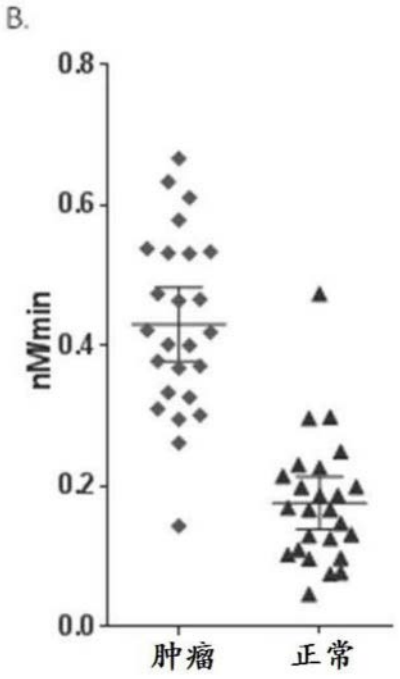


图3B

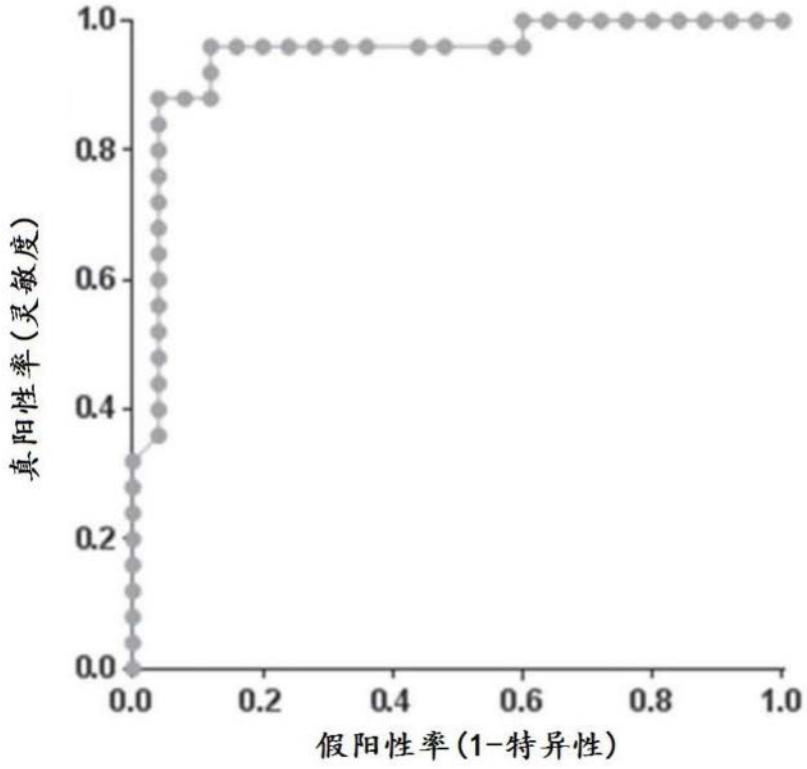

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
真阳性率(灵敏度)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
假阳性率(1-特异性)

图3C

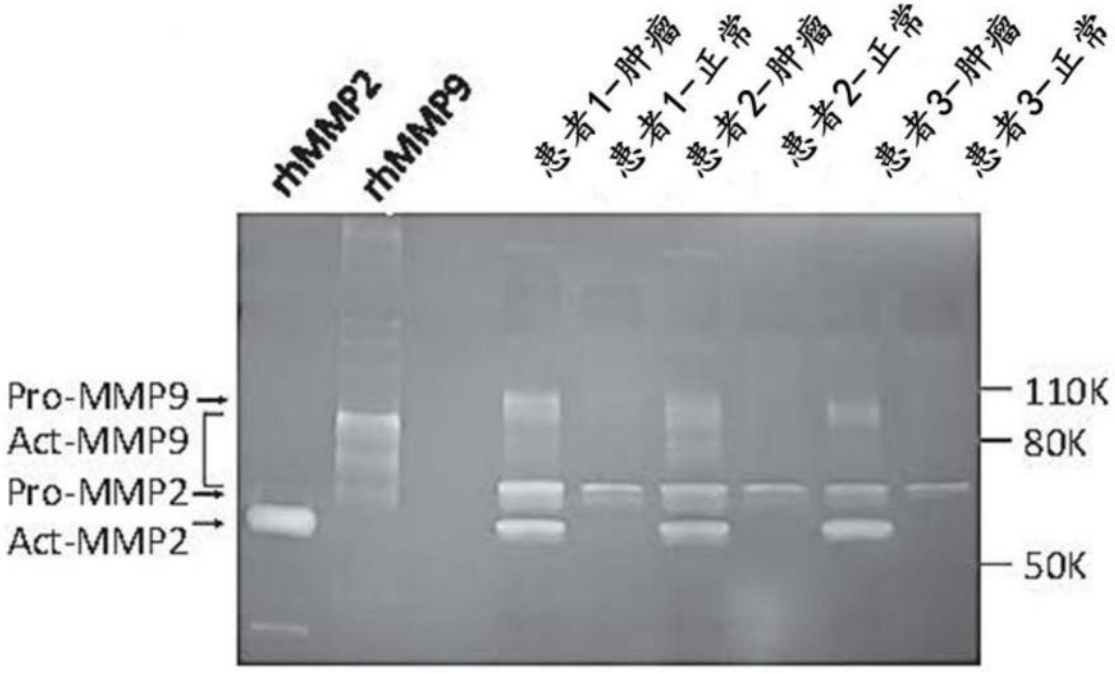

rhMMP2
rhMMP9
患者1-肿瘤
患者1-正常
患者2-肿瘤
患者2-正常
患者3-肿瘤
患者3-正常
Pro-MMP9
Act-MMP9
Pro-MMP2
Act-MMP2
110K
80K
50K

图4A

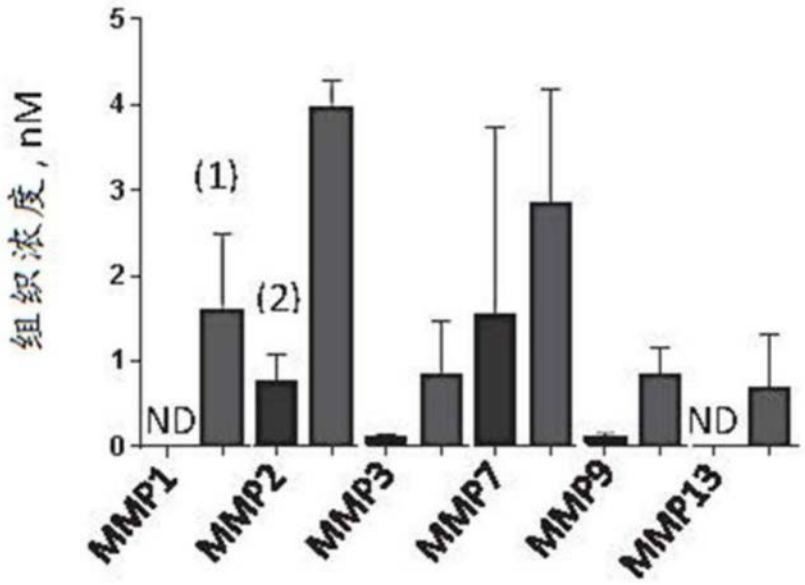


图4B

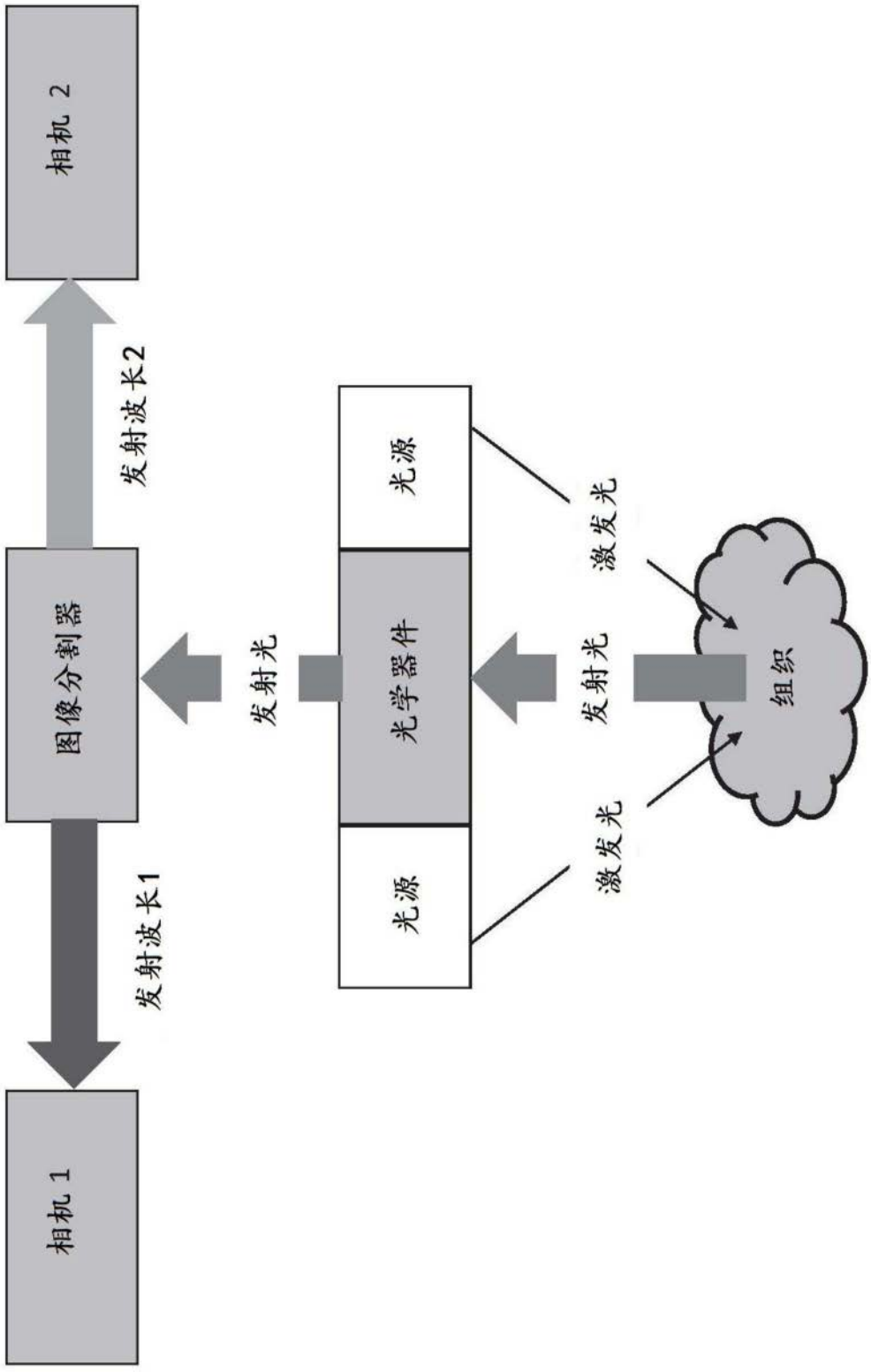


图5

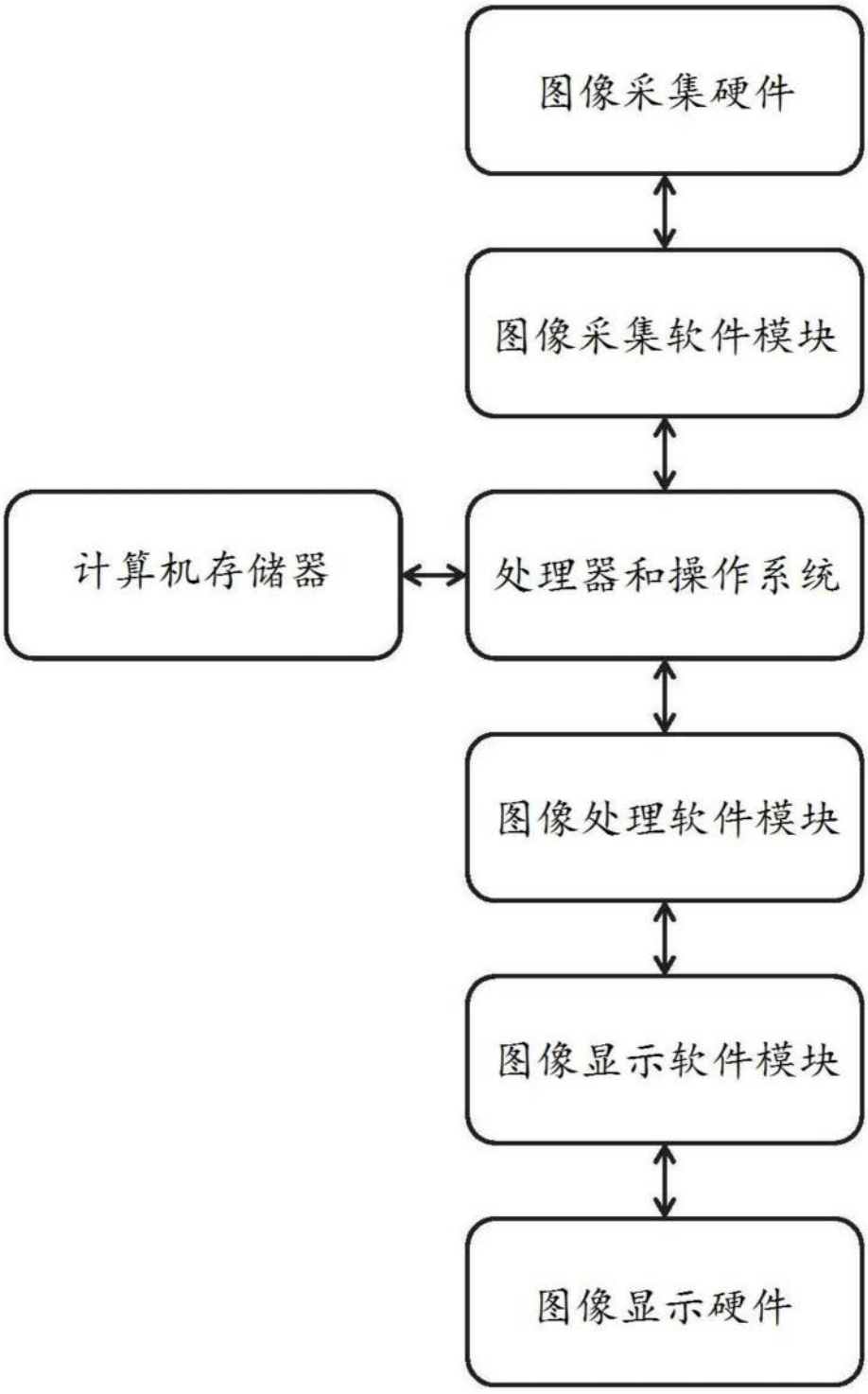

图像采集硬件
图像采集软件模块
计算机存储器
处理器和操作系统
图像处理软件模块
图像显示软件模块
图像显示硬件

图6

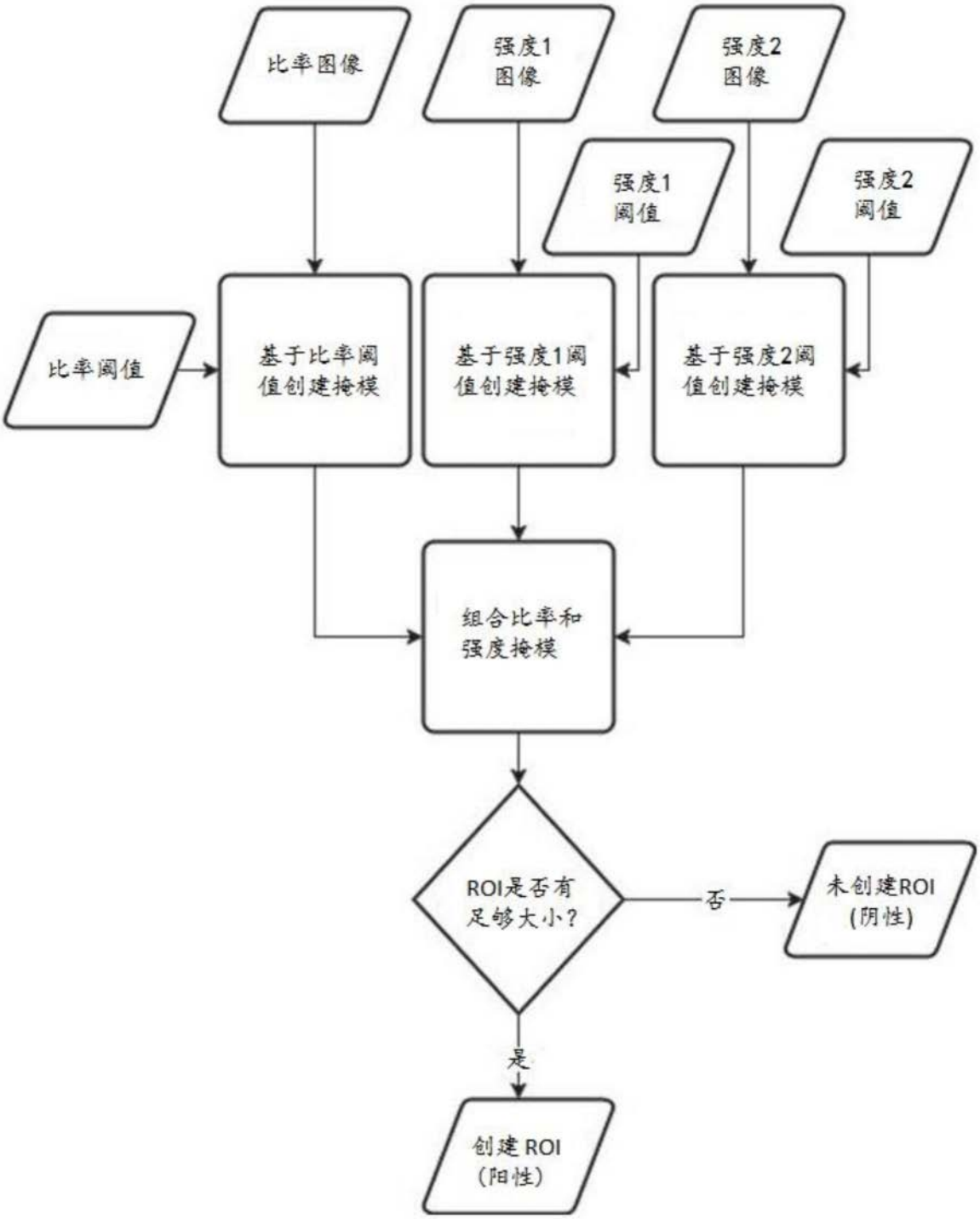

比率图像
强度1图像
强度2图像
强度1阈值
强度2阈值
比率阈值
基于比率阈值创建掩模
基于强度1阈值创建掩模
基于强度2阈值创建掩模
组合比率和强度掩模
ROI是否有足够大小?
否
未创建ROI(阴性)
是
创建ROI(阳性)

图7

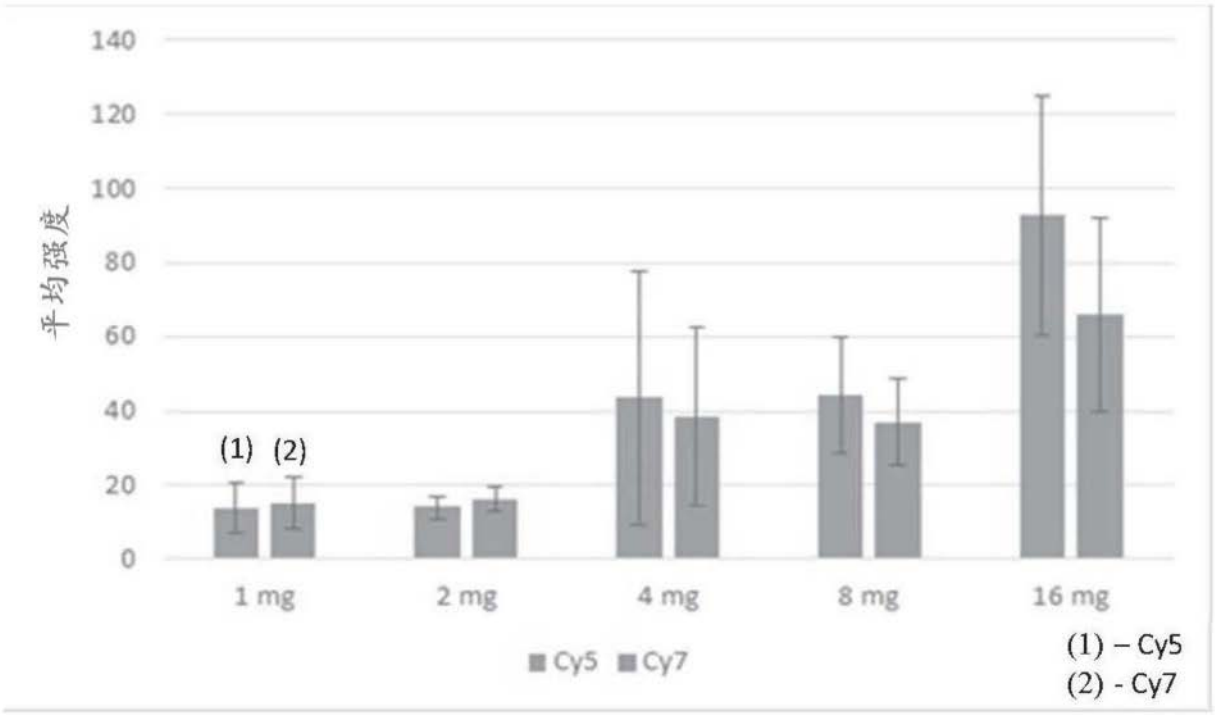

140
120
100
80
60
40
20
0
平均强度
(1) (2)
1 mg
2 mg
4 mg
8 mg
16 mg
Cy5 Cy7
(1) – Cy5
(2) - Cy7

图8A

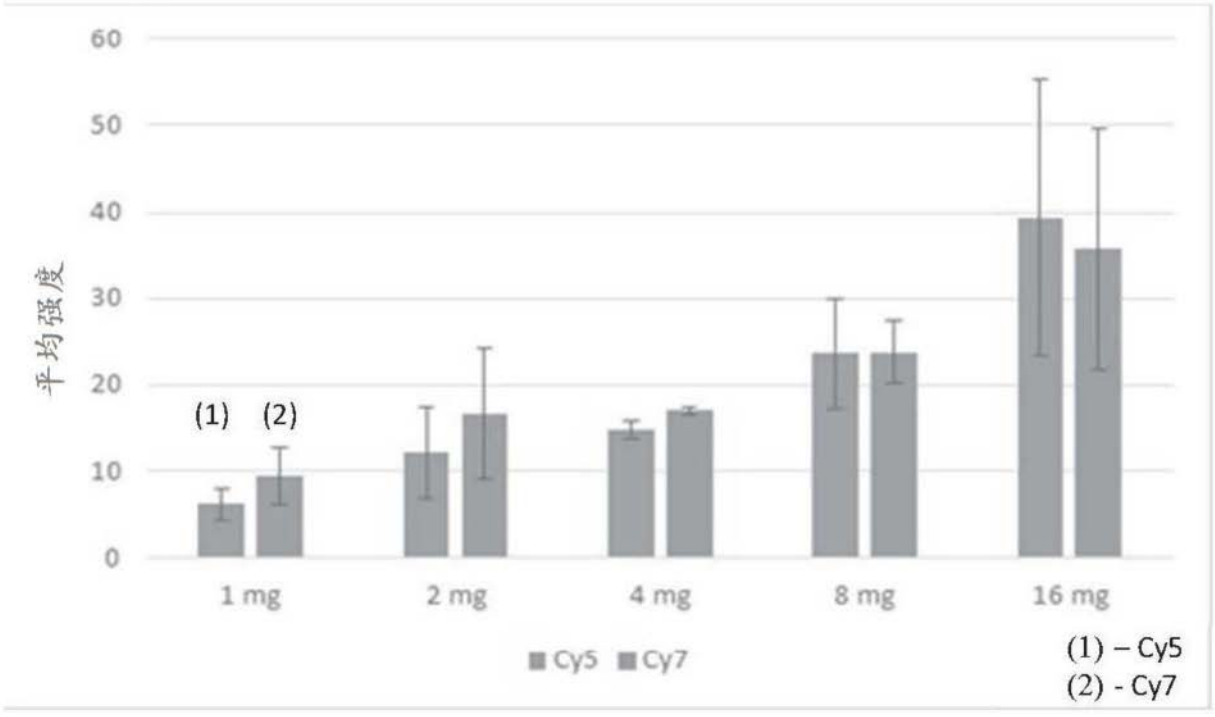

60
50
40
30
20
10
0
平均强度
(1) (2)
1 mg
2 mg
4 mg
8 mg
16 mg
Cy5 Cy7
(1) – Cy5
(2) - Cy7

图8B

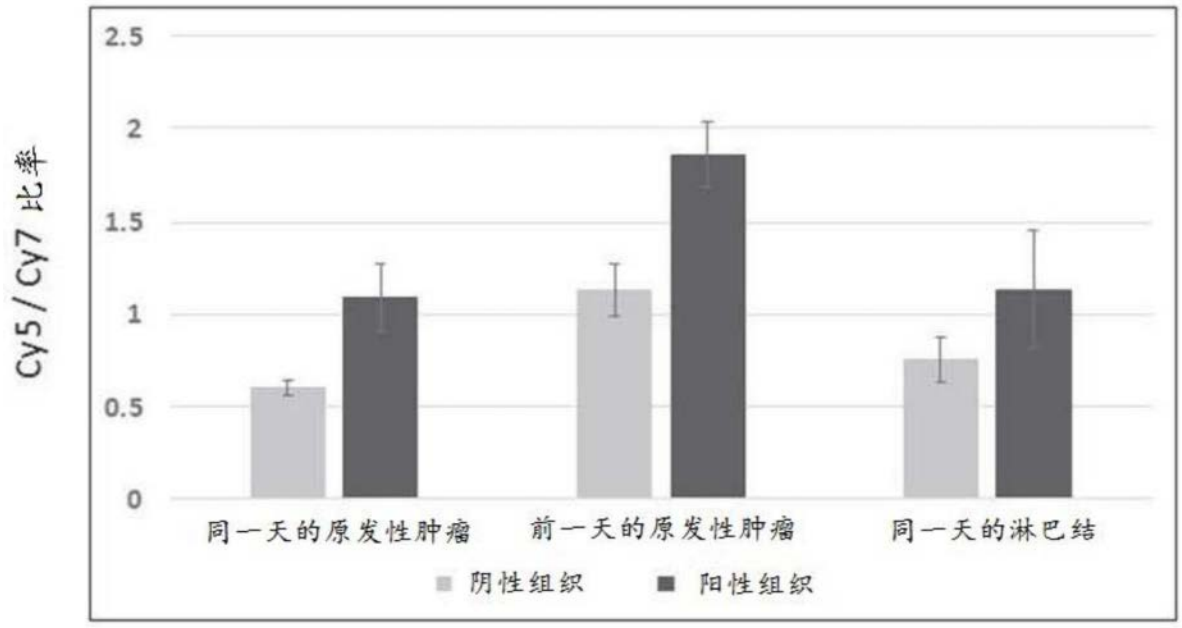

Cy5/Cy7 比率
2.5
2
1.5
1
0.5
0
同一天的原发性肿瘤
前一天的原发性肿瘤
同一天的淋巴结
阴性组织
阳性组织

图9

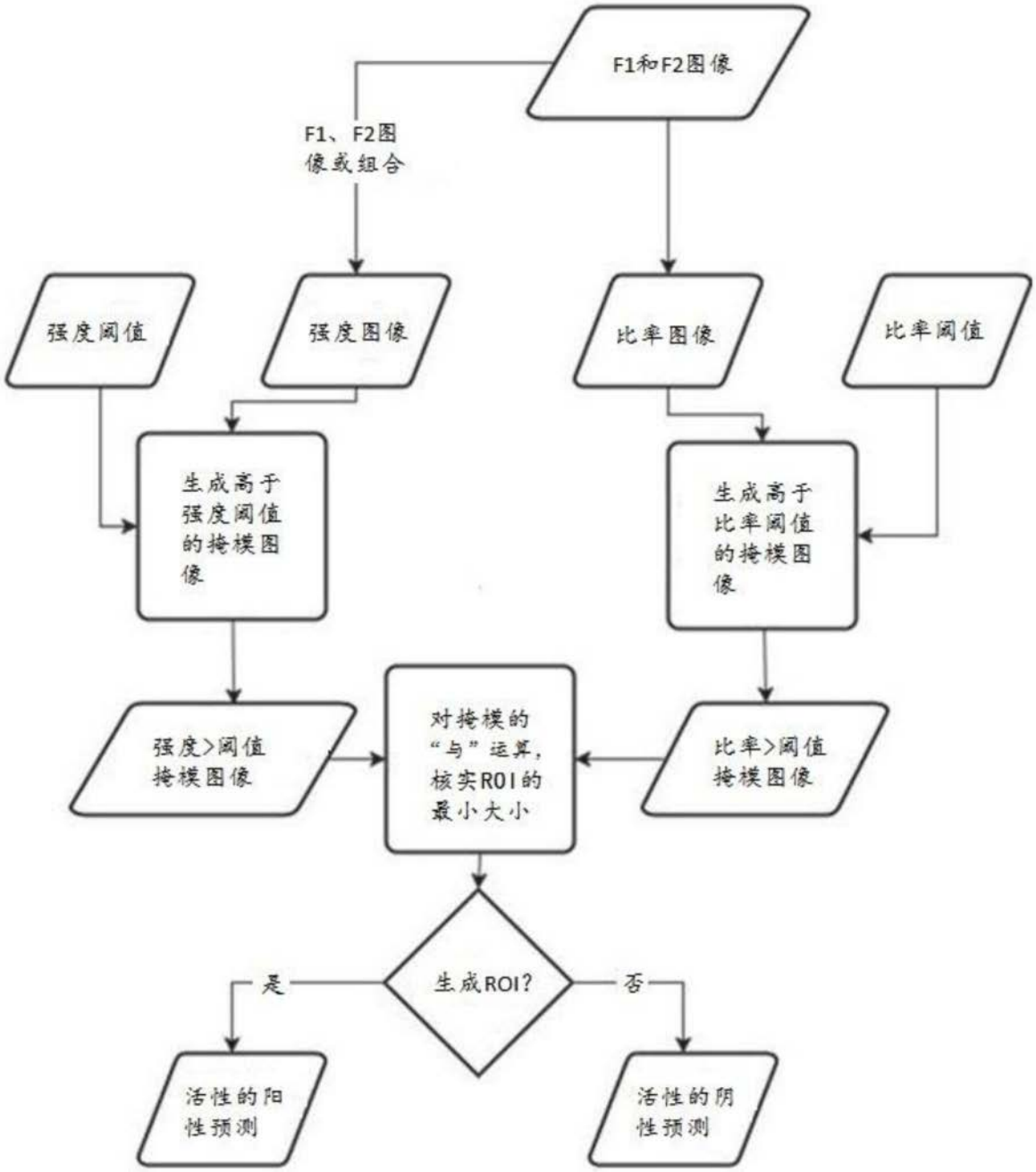

F1和F2图像
F1、F2图像或组合
强度阈值
强度图像
比率图像
比率阈值
生成高于强度阈值的掩模图像
生成高于比率阈值的掩模图像
强度>阈值掩模图像
对掩模的“与”运算，核实ROI的最小大小
比率>阈值掩模图像
生成ROI?
是
否
活性的阳性预测
活性的阴性预测

图10

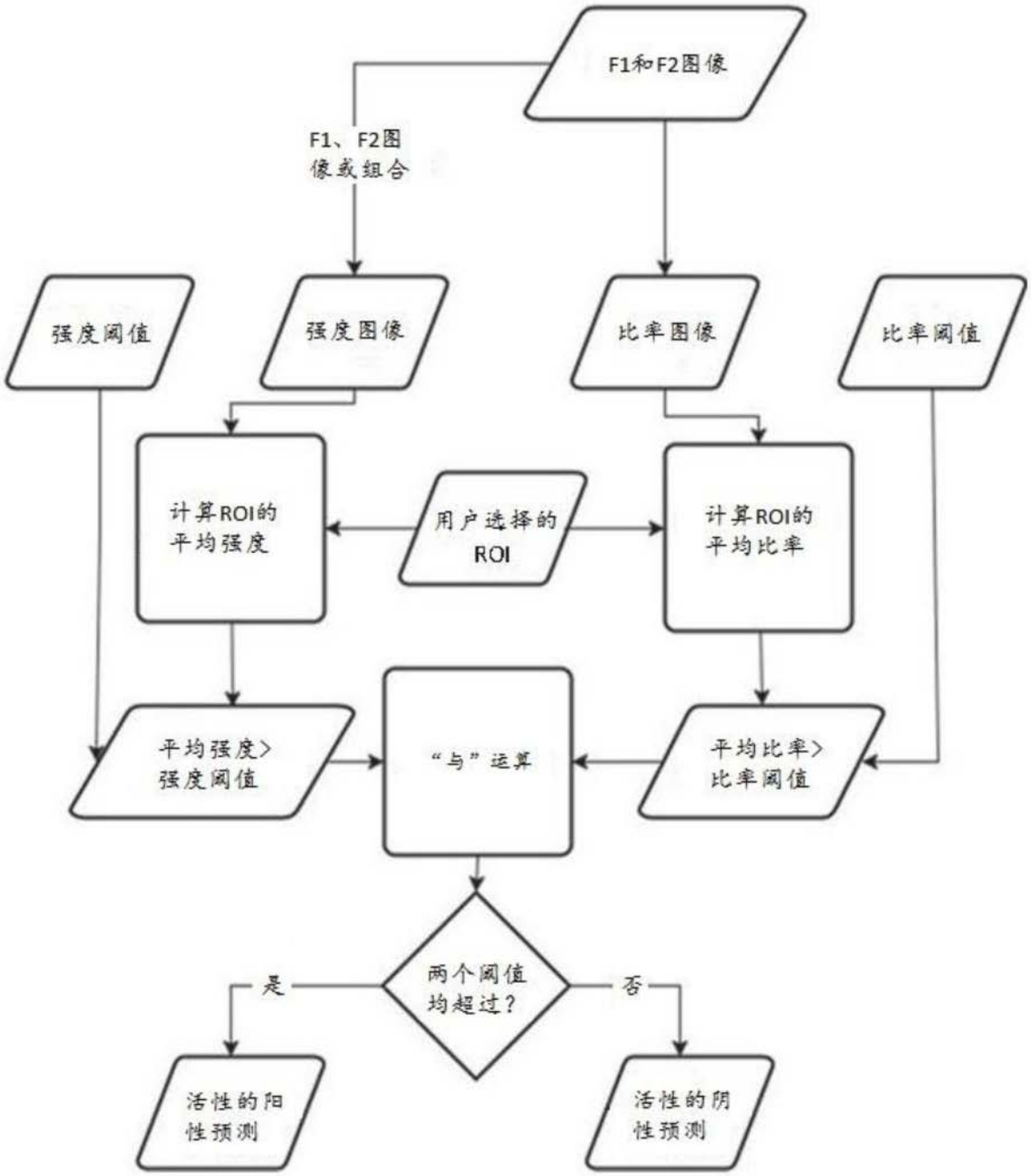

F1和F2图像
F1、F2图像或组合
强度阈值
强度图像
比率图像
比率阈值
计算ROI的平均强度
用户选择的ROI
计算ROI的平均比率
平均强度>强度阈值
“与”运算
平均比率>比率阈值
两个阈值均超过?
是
否
活性的阳性预测
活性的阴性预测

图11

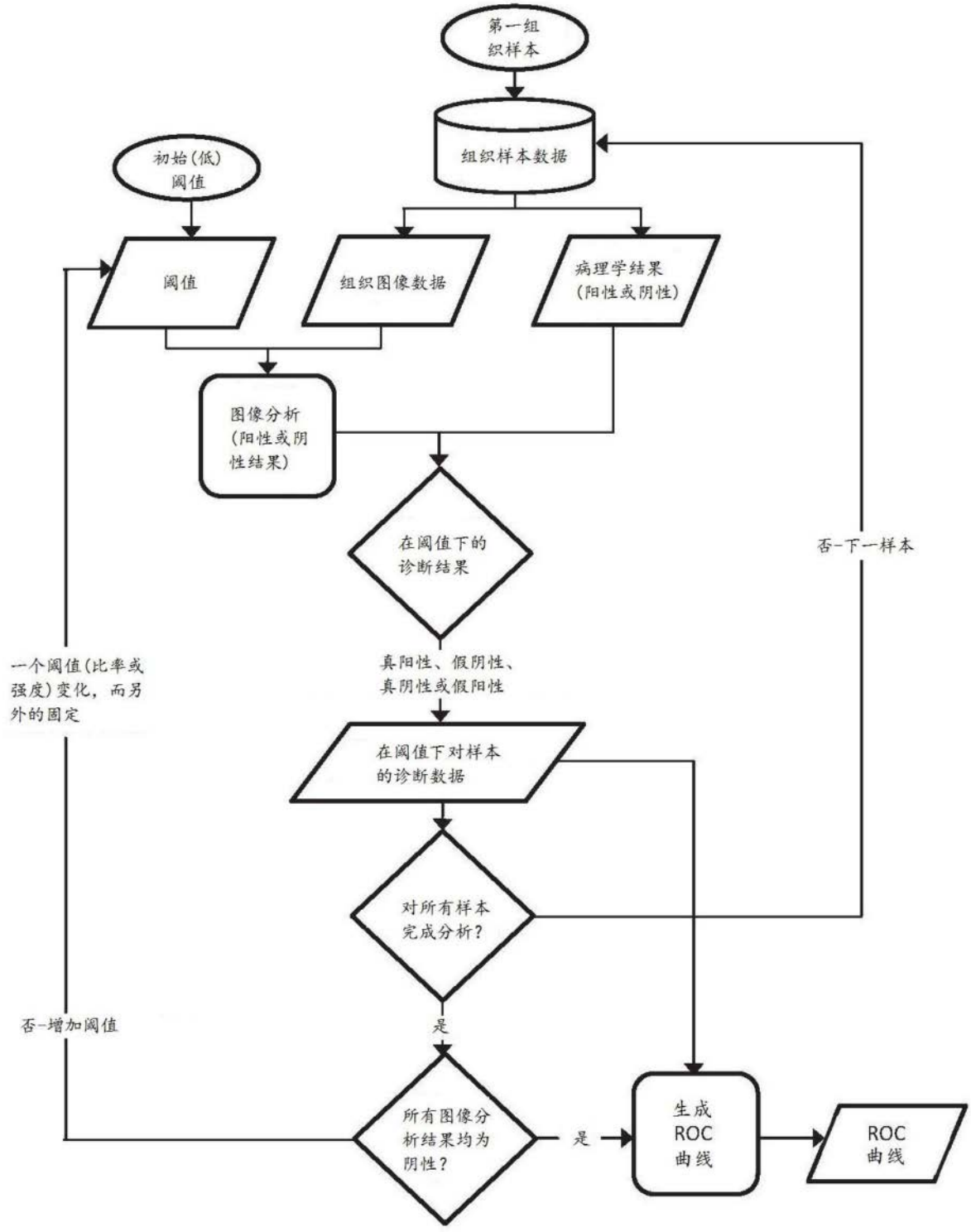

第一组织样本
组织样本数据
初始(低)阈值
阈值
组织图像数据
病理学结果(阳性或阴性)
图像分析(阳性或阴性结果)
在阈值下的诊断结果
否-下一样本
一个阈值(比率或强度)变化，而另外的固定
真阳性、假阴性、真阴性或假阳性
在阈值下对样本的诊断数据
对所有样本完成分析?
否-增加阈值
是
所有图像分析结果均为阴性?
是
生成ROC曲线
ROC曲线

图12

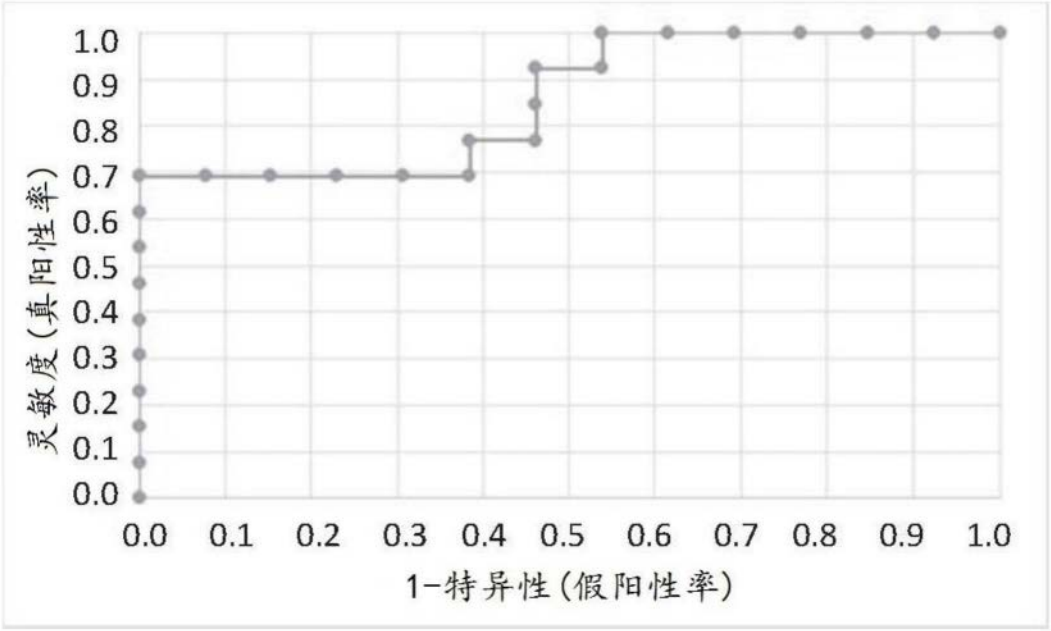

1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
灵敏度(真阳性率)
0.0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1.0
1-特异性(假阳性率)

图13A

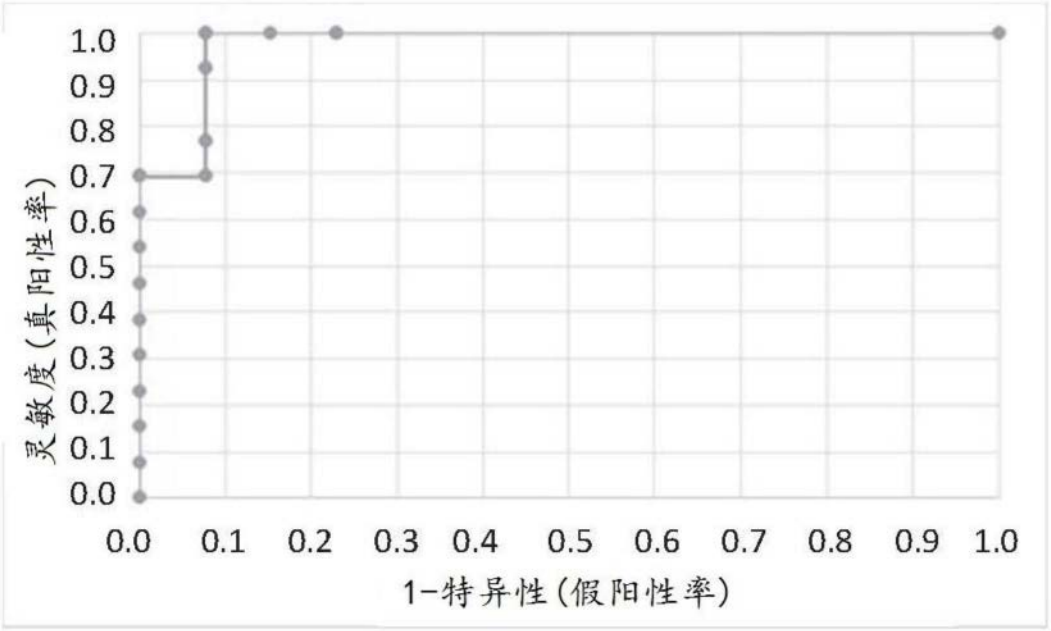

1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
灵敏度(真阳性率)
0.0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1.0
1-特异性(假阳性率)

图13B

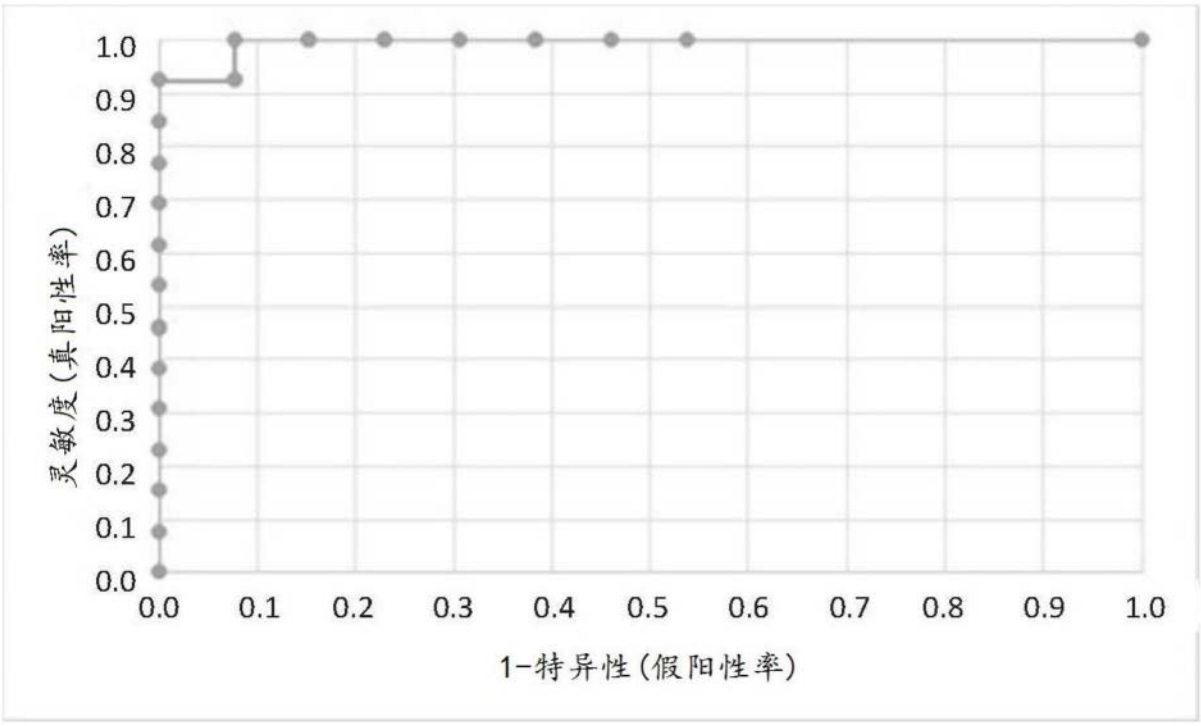

1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
灵敏度(真阳性率)
0.0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1.0
1-特异性(假阳性率)

图13C

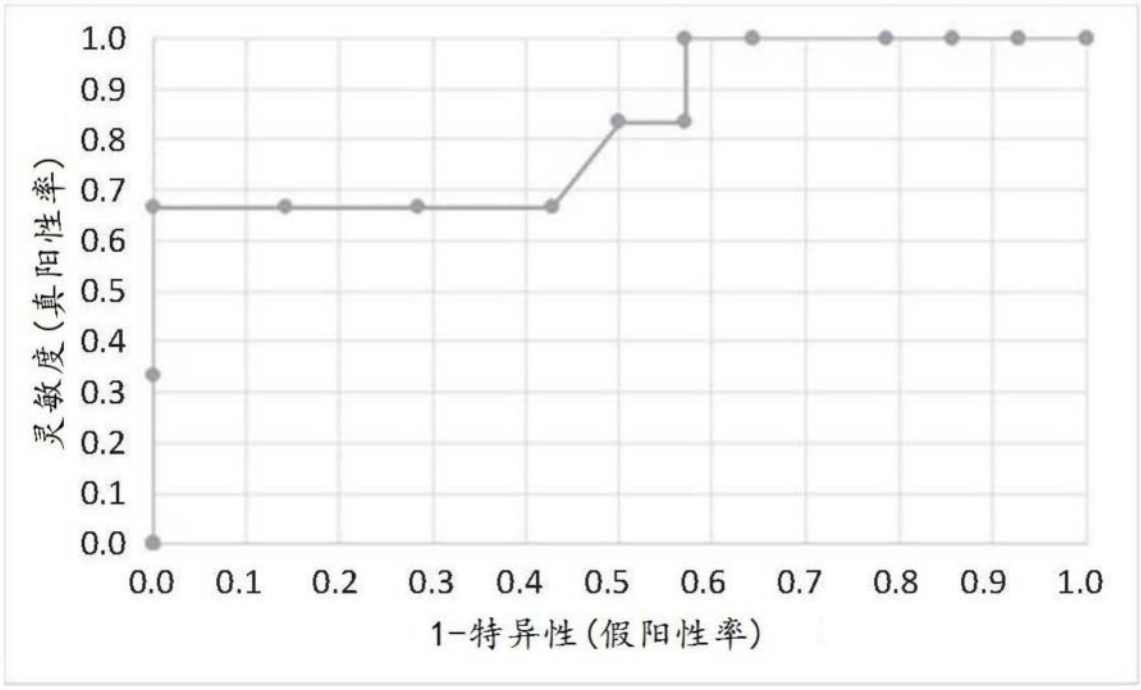

1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
灵敏度(真阳性率)
0.0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1.0
1-特异性(假阳性率)

图14A

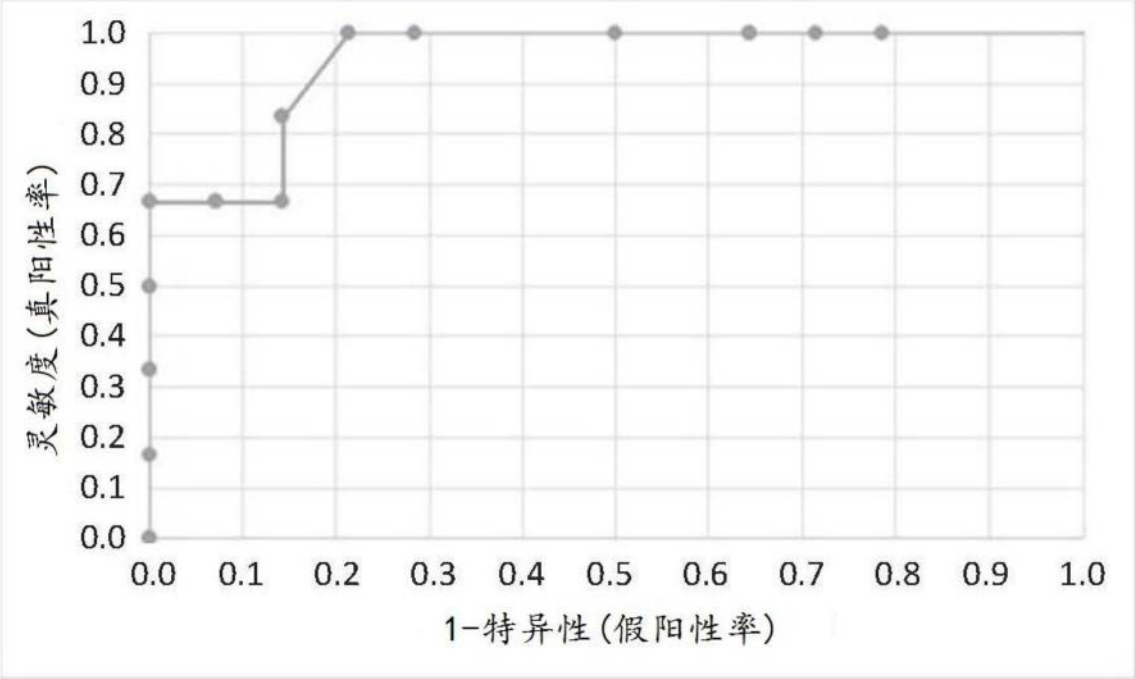

1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
灵敏度(真阳性率)
0.0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1.0
1-特异性(假阳性率)

图14B

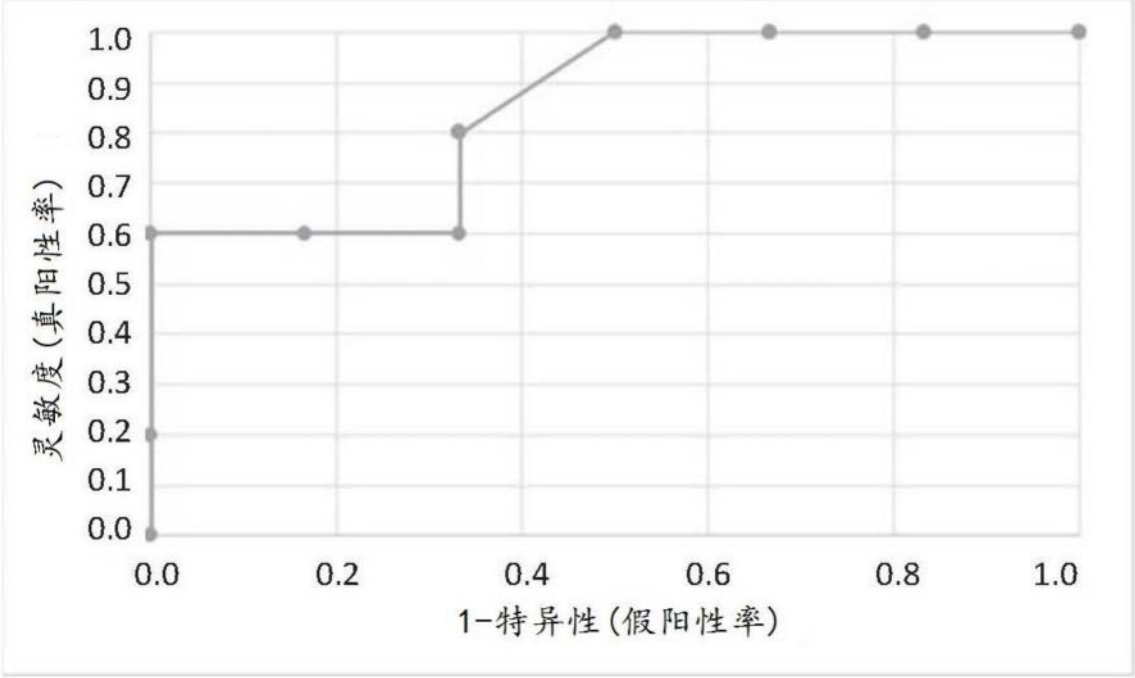

1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
灵敏度(真阳性率)
0.0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0
1-特异性(假阳性率)

图15A

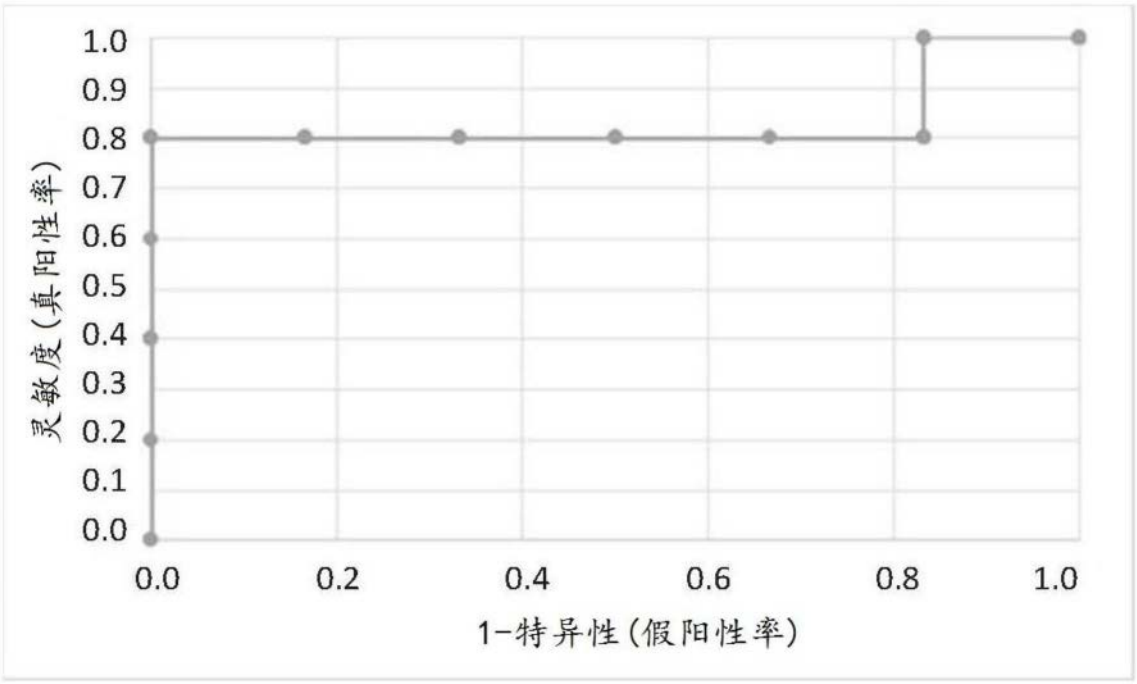

1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
灵敏度(真阳性率)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1-特异性(假阳性率)

图15B

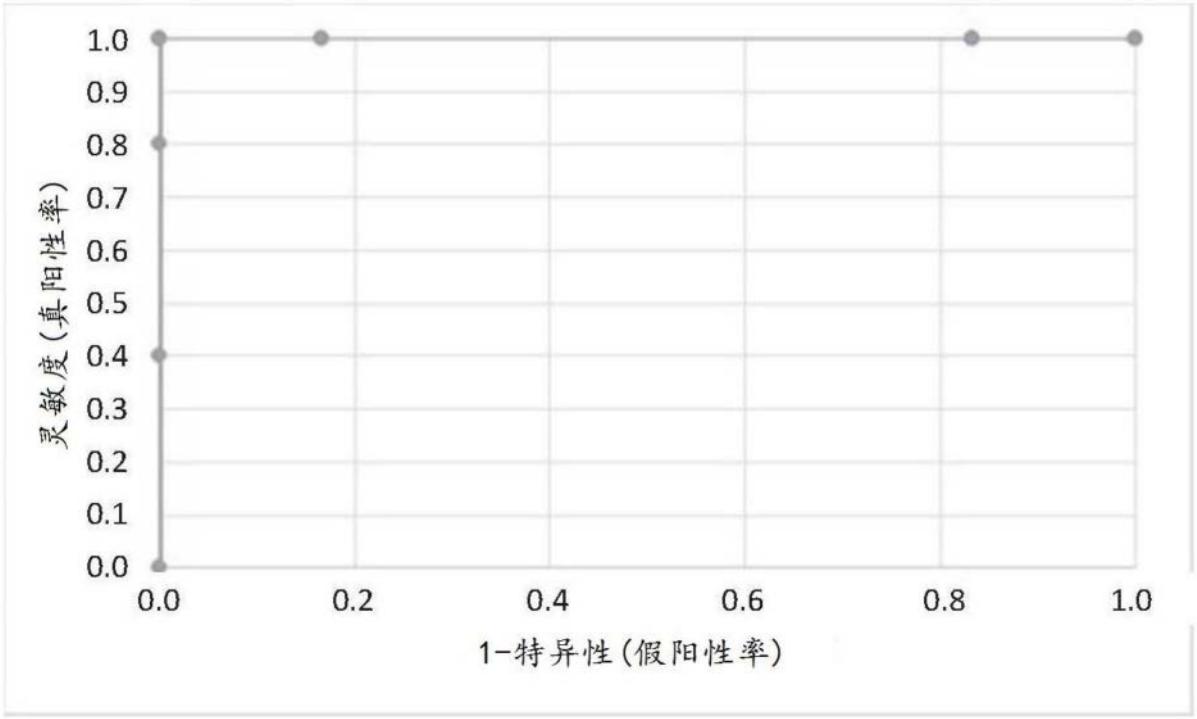

1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
灵敏度(真阳性率)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1-特异性(假阳性率)

图15C

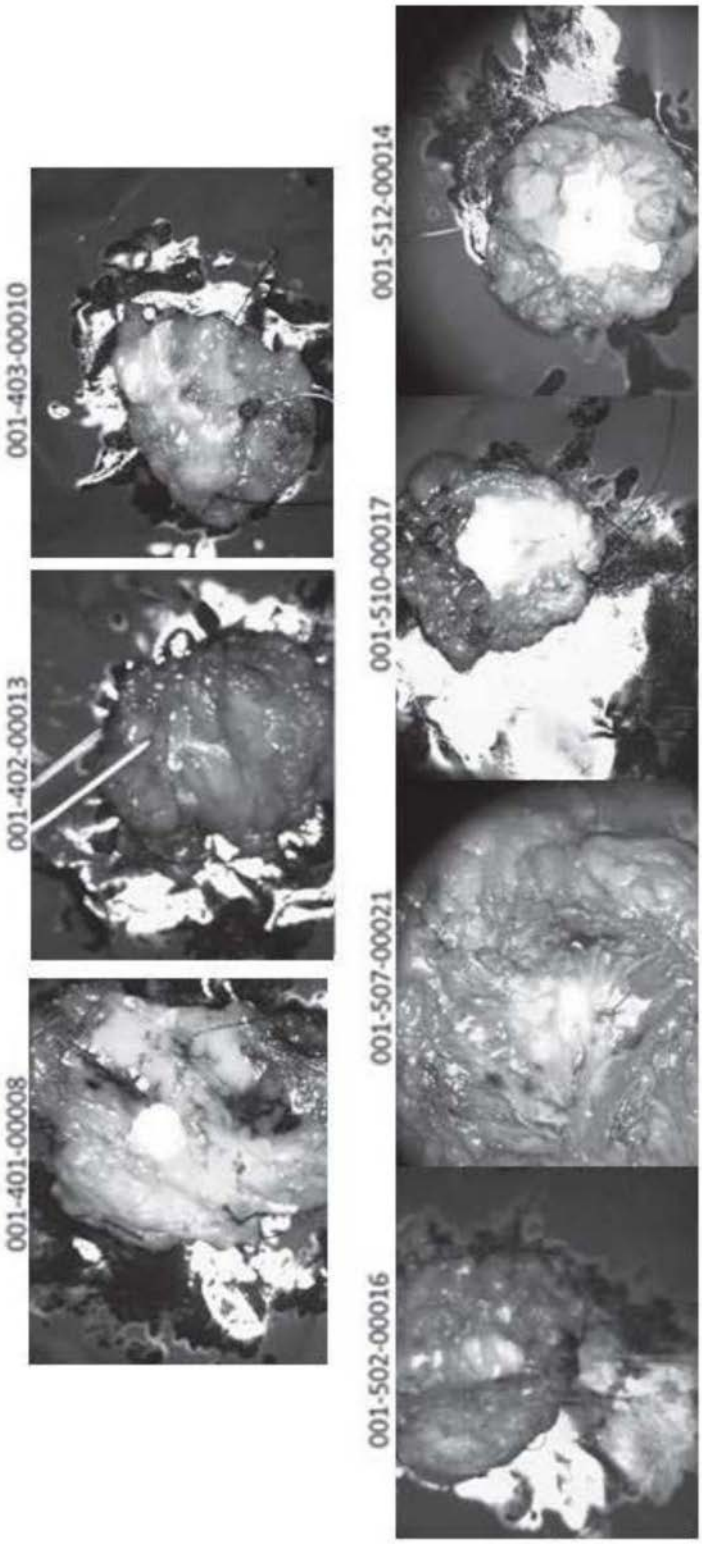
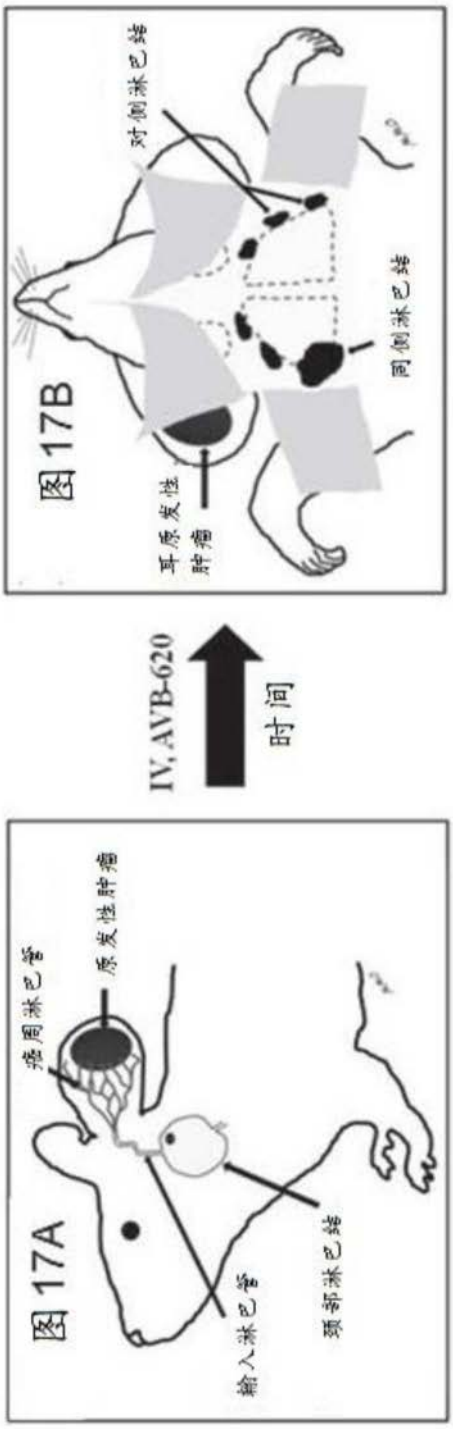

001-403-00010
001-402-00013
001-401-00008
001-512-00014
001-510-00017
001-507-00021
001-502-00016

图16


图17A
癌周淋巴管
原发性肿瘤
输入淋巴管
颈部淋巴结
IV, AVB-620
时间
图17B
对侧淋巴结
耳原发性肿瘤
同侧淋巴结

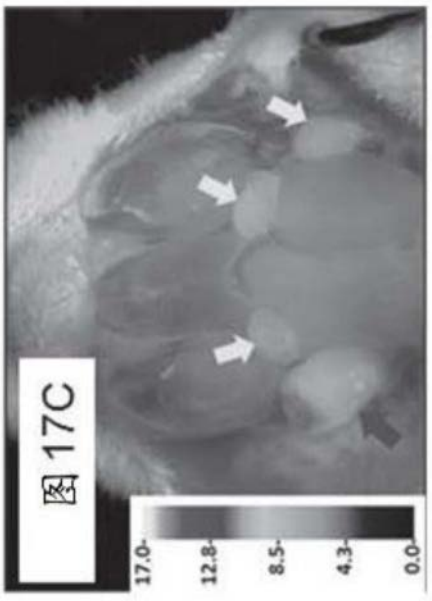


图17C

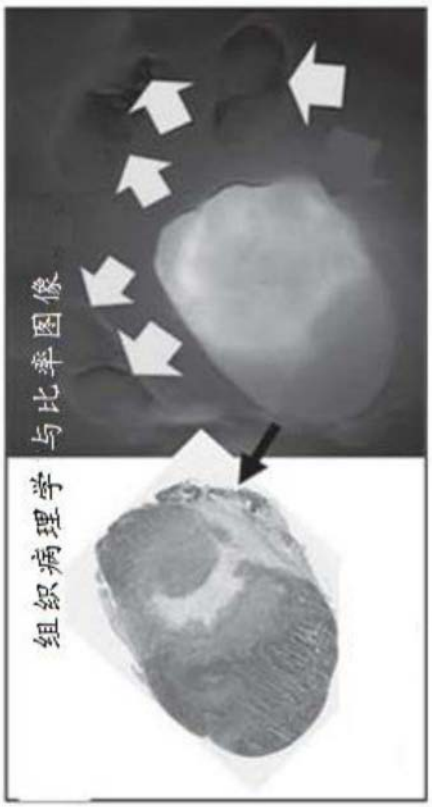


图17D



图18A

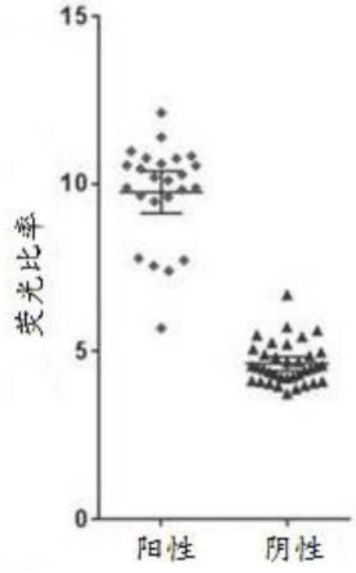


图18B

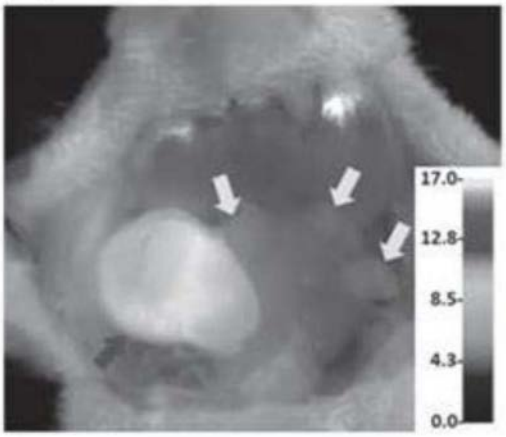


图18C

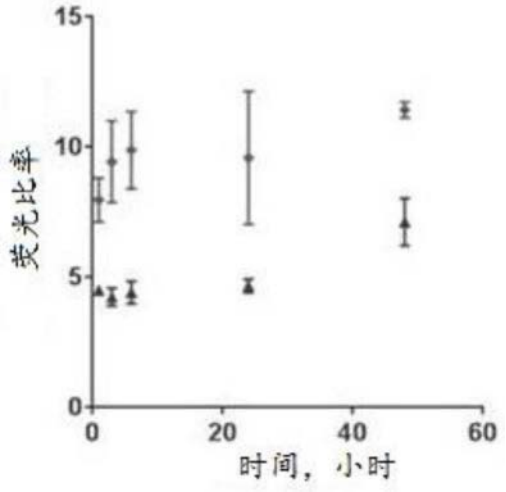


图18D

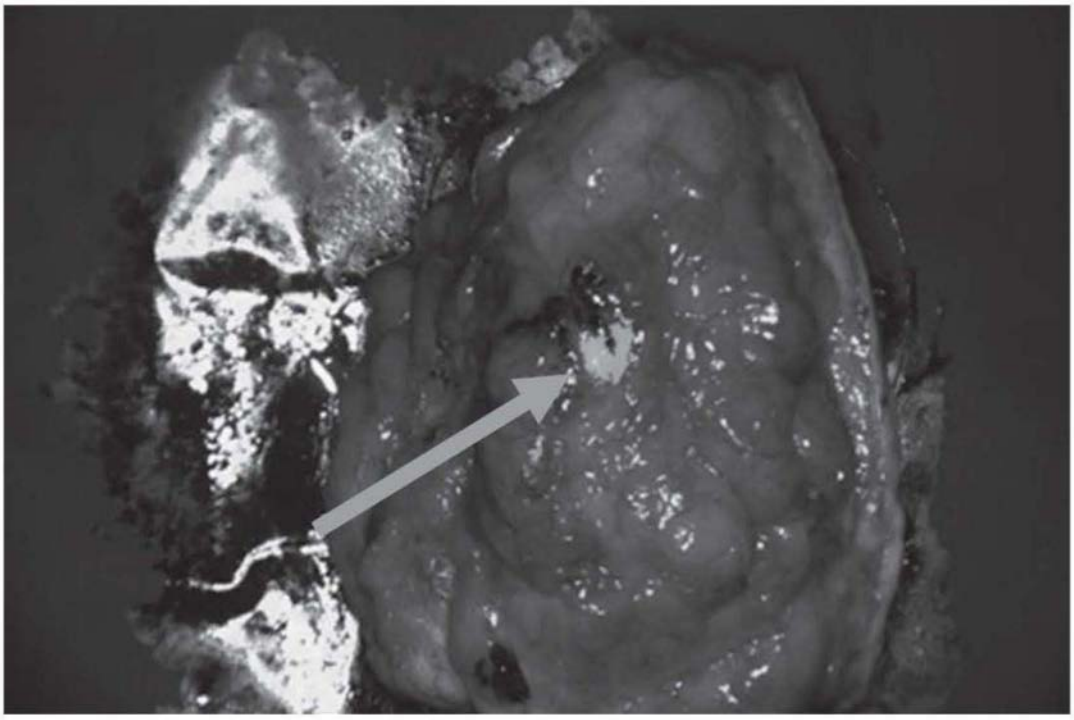


图19A

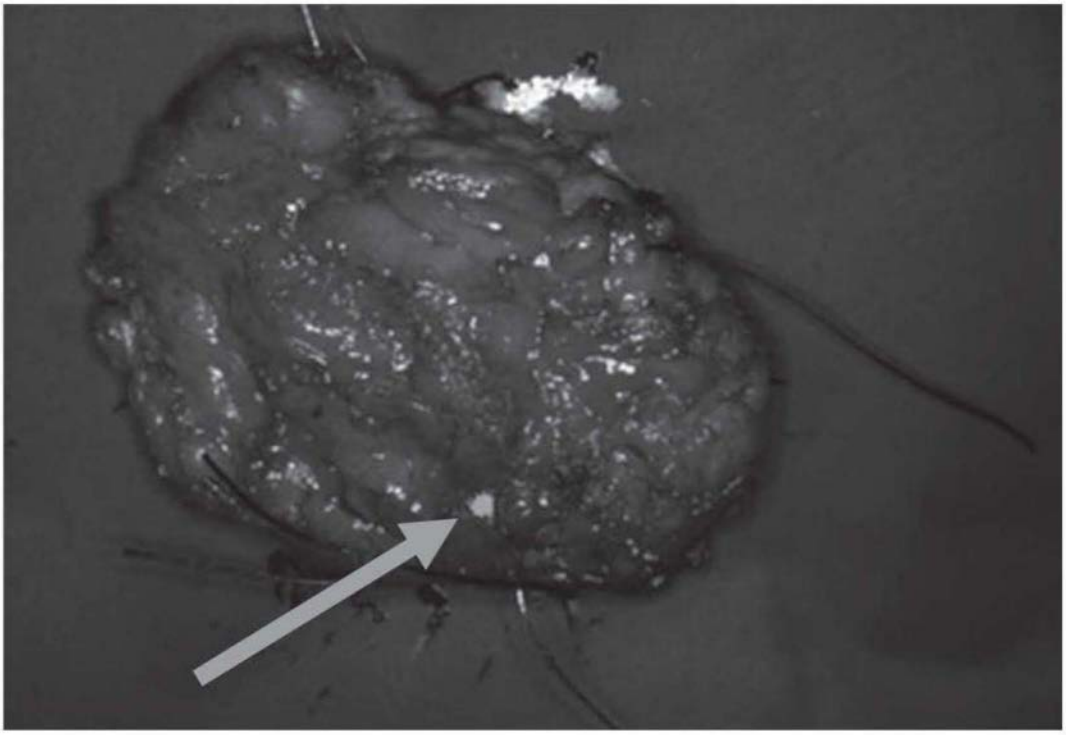


图19B