



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I568747 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 02 月 01 日

(21)申請案號：102107648

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 03 月 05 日

(51)Int. Cl. : *C07K7/02 (2006.01)* *C07K1/107 (2006.01)*
A61K38/08 (2006.01) *A61P7/02 (2006.01)*
A61P9/10 (2006.01) *A61P39/06 (2006.01)*

(30)優先權：2012/09/05 中國大陸 201210323848.9
 2012/09/05 中國大陸 201210323951.3
 2012/09/05 中國大陸 201210323850.6
 2012/09/05 中國大陸 201210323849.3

(71)申請人：上海晟順生物科技有限公司 (中國大陸) SHANGHAI LUMOSA THERAPEUTICS
 CO., LTD. (CN)
 中國大陸

(72)發明人：彭師奇 PENG, SHIQI (CN)；趙明 ZHAO, MING (CN)；蔣雪云 JIANG, XUEYUN
 (CN)

(74)代理人：蔡坤財；李世章

(56)參考文獻：

CN 101190940A	CN 101190941A
CN 101591376A	CN 102477072A
CN 102875644A	CN 102887941A
CN 102898505A	CN 102898506A

張桂娟等，P6A 及類似物修飾的咪唑啉的合成、自由基清除和溶栓活性研究，首都醫科大學學報，2005 年第 26 卷第 1 期 42 頁

趙逸松，趙明，靶向寡肽溶栓劑，首都醫科大學學報，2008 年第 29 卷第 1 期 103-105 頁

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：27 項 圖式數：40 共 152 頁

(54)名稱

同時具溶血栓、清除自由基和血栓靶向功能的新穎化合物及其製備方法和用途

NOVEL COMPOUNDS HAVING THROMBOLYTIC, FREE RADICAL SCAVENGING AND
 THROMBUS-TARGETING ACTIVITIES, AND PROCESSES FOR PREPARATION AND USES
 THEREOF

(57)摘要

本發明涉及一種同時具有溶血栓、清除自由基和血栓靶向/抗血栓三種功能的新穎化合物及其製備方法和用途。本發明以連接臂將溶血栓肽、自由基清除劑和血栓靶向/抗血栓肽組合在一起形成三元綴合物，得到集跨血腦屏障、溶血栓、清除自由基、血栓靶向/抗血栓等作用於一體的所述化合物。本發明還涉及含有所述化合物的藥物組合物，其中所述化合物形成奈米球結構。本發明化合物具有較高的清除 NO 自由基活性、優異的溶血栓活性和血栓靶向/抗血栓活性。本發明化合物還具有優異的抗缺血性中風活性，可製備成治療腦梗塞的臨床藥物。

指定代表圖：

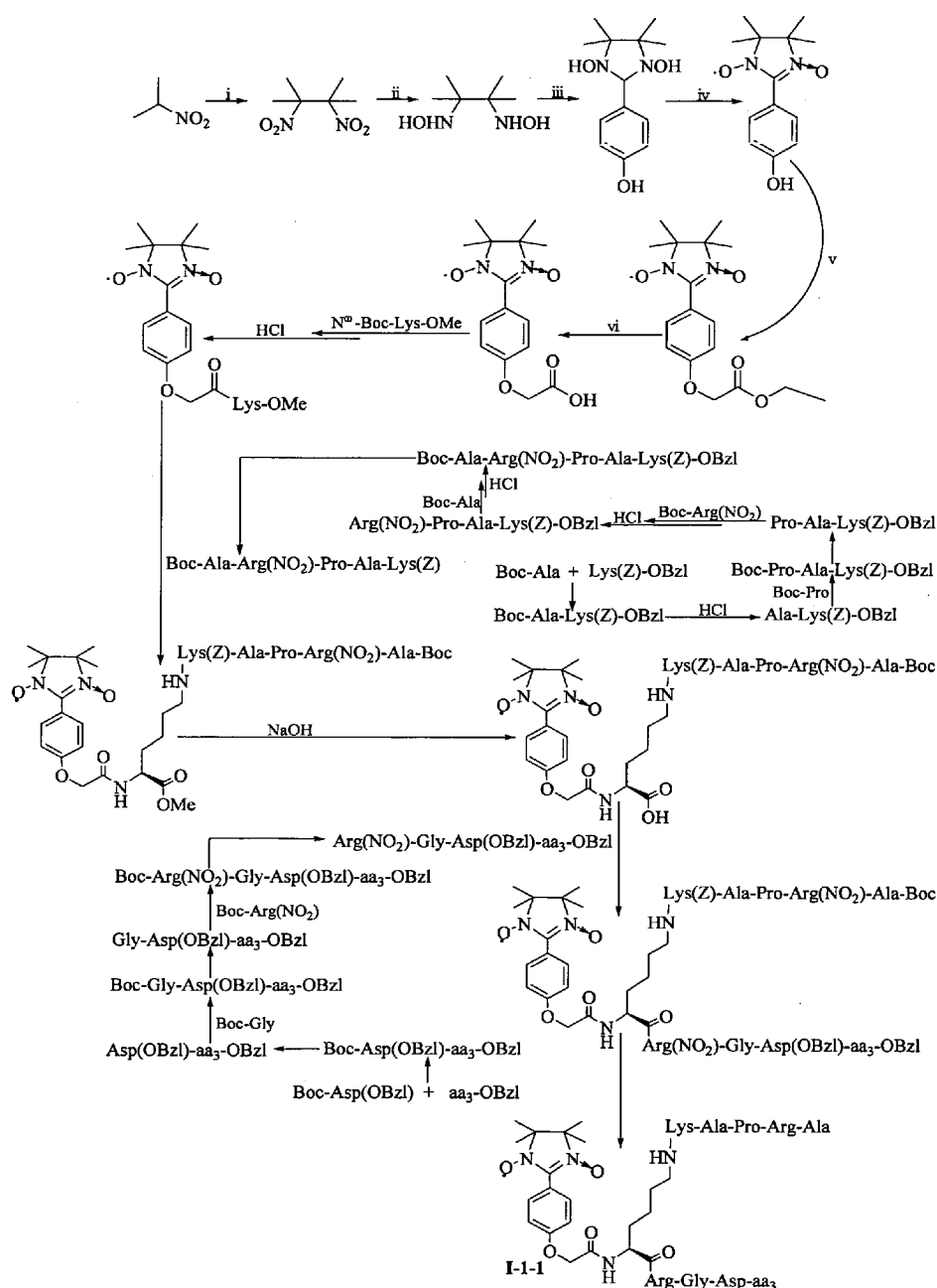
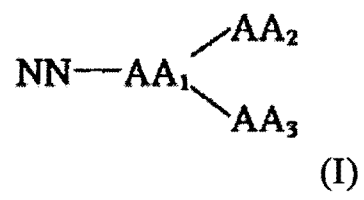


圖 1

特徵化學式：



發明摘要

※ 申請案號：102107648

C07K 7/02 (2006.01)

※ 申請日：102. 3. 05

※IPC 分類：

C07K 1/107 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

同時具溶血栓、清除自由基和血栓靶向功能的新穎化合物及其製備方法和用途

Novel compounds having thrombolytic, free radical scavenging and thrombus-targeting activities, and processes for preparation and uses thereof

【中文】

本發明涉及一種同時具有溶血栓、清除自由基和血栓靶向/抗血栓三種功能的新穎化合物及其製備方法和用途。本發明以連接臂將溶血栓肽、自由基清除劑和血栓靶向/抗血栓肽組合在一起形成三元綴合物，得到集跨血腦屏障、溶血栓、清除自由基、血栓靶向/抗血栓等作用於一體的所述化合物。本發明還涉及含有所述化合物的藥物組合物，其中所述化合物形成奈米球結構。本發明化合物具有較高的清除NO自由基活性、優異的溶血栓活性和血栓靶向/抗血栓活性。本發明化合物還具有優異的抗缺血性中風活性，可製備成治療腦梗塞的臨床藥物。

【英文】

The present invention is directed to novel compounds having thrombolytic,

free radical scavenging and thrombus-targeting activities; and the processes for preparation and uses thereof. In the present invention, a thrombolytic peptide, a free radical scavenger and a thrombus-targeting/antithrombotic peptide are joined together via a linking arm to give a three-component conjugate, thereby providing a compound of the present invention which has simultaneously the functions of overcoming the blood-brain barrier, dissolving thrombus, scavenging free radicals, and targeting thrombus/inhibiting the formation of thrombus. The present invention is further directed to pharmaceutical compositions comprising the compounds of the invention, wherein the compounds are in the form of nanoparticles. The compounds of the present invention show a better free radical scavenging activity, and superior thrombolytic and thrombus-targeting/antithrombotic activities. The compounds of the present invention also show an excellent anti-stroke activity, such that they can be used in making drugs for treating cerebral thrombosis.

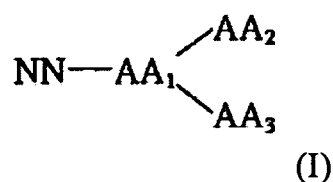
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

同時具溶血栓、清除自由基和血栓靶向功能的新穎化合物及其製備方法和用途

Novel compounds for simultaneously dissolving blood clots, scavenging free radicals and targeting blood clots, and processes for preparation and use thereof

【技術領域】

本發明涉及一種同時具有溶血栓、清除NO自由基和血栓靶向/抗血栓三種功能的新穎化合物及其製備方法和用途。本發明進一步涉及以含有羧基和胺基的連接臂將含PAK (Pro-Ala-Lys)序列的溶血栓寡肽、1-(4-氧乙醯基-苯基)-3,3,4,4-四甲基-咪唑啉及含RGD (Arg-Gly-Asp)序列的血栓靶向肽/抗血栓寡肽連接在一起形成的“含PAK序列肽/咪唑啉/含RGD序列肽”的新穎三元綴合物。本發明還涉及包含所述化合物的用於清除NO自由基、溶血栓、血栓靶向/抗血栓和治療中風/腦梗塞的藥物組合物。本發明同時還涉及所述化合物的製備方法。

【先前技術】

在全球範圍內，血栓性疾病的發病率和死亡率都居首位。冠狀動脈血栓，導致心肌梗塞。腦血管栓塞，導致腦梗塞，也就是臨床上的缺血性中風。心肌梗塞患者既可以靜脈注射溶栓藥物，也可以施以搭橋手術。必須指出，給心肌梗塞患者靜脈注射溶栓藥物的正面結果是缺血再灌注。由於缺血再灌注過程中產生大量NO自由基，所以溶栓過程與心肌損傷及患者死

亡相聯繫。這是目前溶栓治療心肌梗塞的嚴重問題。目前，腦梗塞治療面臨的問題更複雜。例如現有溶栓藥物都不能有效地跨過血腦屏障，以至於靜脈注射溶栓藥物對腦梗塞患者的療效極其有限。又例如目前還沒有適宜的手術可以救治腦梗塞患者。同樣，給腦梗塞患者靜脈注射溶栓藥物即使有正面結果，缺血再灌注過程中也會產生大量NO自由基，使溶栓過程與腦組織損傷及患者死亡相聯繫。這是目前溶栓治療腦梗塞的嚴重問題。再者，中風患者的臨床治療面臨四個難題：1) 除tPA (tissue-type plasminogen activator, 組織型纖溶酶原啟動劑)外，沒有其它藥物可對中風患者顯示療效；2) tPA治療只在患者中風3小時之內顯示療效，即tPA只有3小時治療黃金期；3) tPA治療通常引起全身出血；4) tPA治療無法避免缺血再灌注過程中產生的大量NO自由基對患者造成的腦組織損傷及患者死亡。只有解決了這四個難題，中風患者的臨床治療才可能獲得實質性突破。

在中國專利申請公佈號CN102807604和CN102807605的申請案中，公開了 N^{α} -(1,3-二氧-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-2-苯基-4'-氧乙醯基)- n^{ω} -脂肪醯基-Lys-Arg-Gly-Asp-Val (SEQ. ID NO. 1)和 N^{α} -(1,3-二氧-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-2-苯基-4'-氧乙醯基)- n^{ω} -脂肪醯基-Lys-Arg-Gly-Asp-Phe (SEQ. ID NO. 2)兩種化合物。這兩種化合物是將具清除NO自由基活性的咪唑啉與含RGD序列(Arg-Gly-Asp)的抗血栓寡肽以賴氨酸組合。與本發明的化合物不同，此兩種化合物中沒有連接溶栓肽。由於此兩種化合物沒有溶血栓作用，不適用於製備溶血栓藥物，且不適用於治療缺血性中風的患者。

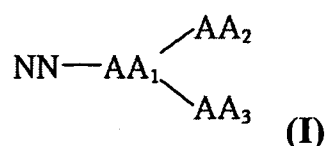
為解決上述問題，需要一種同時具有溶血栓、清除NO自由基和血栓靶向/抗血栓作用的新穎化合物。並且，這樣的新穎化合物要能夠有在患者中

風3小時之後顯示療效，即不受使用tPA的 3小時治療黃金期的限制；沒有tPA樣的全身出血反應；且能夠清除缺血再灌注過程中產生的大量NO自由基。

【發明內容】

本發明提供一種集跨血腦屏障、溶血栓、抗血栓和清除NO自由基活性作用於一體的三元綴合物，其中所述三元是指具清除NO自由基活性的咪唑啉類、具溶血栓活性肽及血栓靶向肽，其通過適合的連接臂連接在一起。

具體而言，本發明之三元綴合物可以式I化合物表示：



其中，NN代表具清除NO自由基活性的咪唑啉類；AA₁代表具有至少三個連接用基團的連接臂；AA₂代表具溶血栓活性肽；AA₃代表血栓靶向肽。

可用於本發明的咪唑啉類包含Nitronyl Nitroxides(NN)類咪唑啉類氮氧自由基，其能夠清除NO，還具有清除氧自由基的功能，對氧自由基損傷的細胞有很強的保護作用。本發明的具清除NO自由基活性的咪唑啉類，較佳是1,3-二氧基-2-[(4-氧乙酸)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉，其具有突出的化學穩定性和物理，即不僅可用於與溶血栓活性肽及血栓靶向肽綴合的任何化學反應，而且在儲存過程中不容易分解，因而可滿足製劑需求。

可用於本發明的連接臂具有至少三個連接用基團，例如：羧基和胺基，用以將咪唑啉類、具溶血栓活性肽、血栓靶向肽這三者連接在一起。本發

明的連接臂可為天然胺基酸，例如：L-Lys、L-Asp和L-Glu。當用於本發明的連接臂(AA₁)具有三個以上的連接用基團時，可接一個以上的NN、AA₂、或AA₃；其中兩個以上的NN、AA₂、或AA₃可為相同或不同。例如，當AA₁有四個連接用基團時，可接一個NN、兩個AA₂、和一個AA₃；此時兩個AA₂可為相同或不同的溶血栓活性肽。

可用於本發明的具溶血栓活性肽可為含PAK (Pro-Ala-Lys)序列、AKP (Ala-Lys-Pro)序列或KAP (Lys-Ala-Pro)序列的寡肽或包含以PAK序列、AKP序列或KAP序列為結構單元的重複序列肽。寡肽是指分子量在1000道爾頓(D) 以下的小分子肽，一般由3至8個胺基酸組成。本發明的具溶血栓活性寡肽可為含PAK序列、AKP序列或KAP序列的三肽至八肽，較佳為含PAK序列、AKP序列或KAP序列的三肽至五肽。舉例來說，可用於本發明的含PAK序列、AKP序列或KAP序列的寡肽可為PAK、RPAK(Arg-Pro-Ala-Lys) (SEQ. ID NO. 3)、ARPAK (Ala-Arg- Pro-Ala-Lys) (SEQ. ID NO. 4)、GRPAK (Gly-Arg-Pro-Ala-Lys) (SEQ. ID NO. 5)、QRPAK (Gln-Arg-Pro-Ala-Lys) (SEQ. ID NO. 6)、AKP、KAP、KPAK (Lys-Pro-Ala-Lys) (SEQ. ID NO. 7)、PAKP (Pro-Ala-Lys-Pro) (SEQ. ID NO. 8)、AKPAK (Ala-Lys-Pro-Ala-Lys) (SEQ. ID NO. 9) 或PAKPA (Pro-Ala-Lys-Pro-Ala) (SEQ. ID NO. 10)。舉例來說，可用於本發明的以PAK序列、AKP序列或KAP序列為結構單元的重複序列肽可為在中國專利申請公佈號CN101190941的申請案中公佈的一系列具有溶血栓活性的肽，包含以PAK為結構單元合成的重複序列肽(PAK)₂、(PAK)₃、(PAK)₄、(PAK)₅和(PAK)₆；以AKP為結構單元合成的重複序列肽(AKP)₂、(AKP)₃、(AKP)₄、(AKP)₅和(AKP)₆；及以KPA為結構單元合成的重

複序列肽(KPA)₂、(KPA)₃、(KPA)₄、(KPA)₅和(KPA)₆。

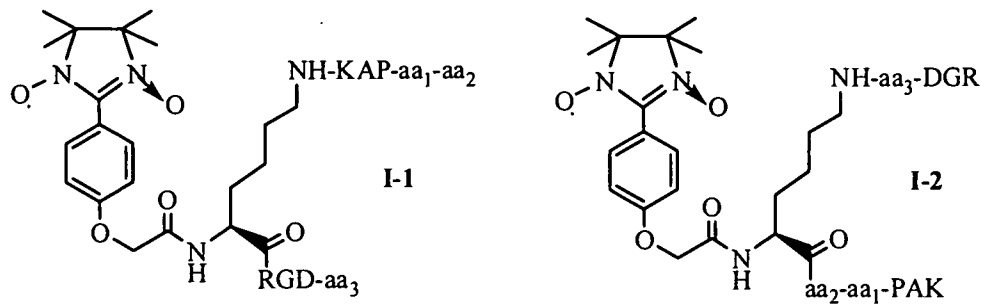
可用於本發明的血栓靶向/抗血栓肽可為含RGD序列(Arg-Gly-Asp)的寡肽。含RGD序列的寡肽可為RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) (SEQ. ID NO. 11)、RGDV (Arg-Gly-Asp-Val) (SEQ. ID NO. 12) 和RGDF (Arg-Gly-Asp-Phe) (SEQ. ID NO. 13) 等RGD四肽。纖維蛋白原(Fibrinogen,Fg)和活化血小板膜糖蛋白(Glycoprotein, GP)IIb/IIIa受體的特異性結合是各種生理性誘導劑引起血小板聚集的最終共同通道，在血栓形成中起著重要作用。而RGD序列則是配體Fg和活化GPIIb/IIIa受體結合的活性位點，具有活化血小板靶向性。含RGD序列的結構物可競爭性地抑制和阻斷Fg和GPIIb/IIIa受體的結合，從而阻斷血小板聚集和血栓的形成，使含RGD的寡肽成為有效的血栓靶向分子與抗血栓劑。

另外，可用於本發明的血栓靶向肽可為在中國專利申請公佈號CN101190940的申請案中公開的一系列有靶向抗血栓活性的多肽，包含對RGD肽與YIGS (Tyr-Ile-Gly-Ser) (SEQ. ID NO. 14) 肽進行綴合式修飾而得的多肽。這些修飾而得的多肽可為YIGSRRGDS (SEQ. ID NO. 15)、YIGSRRGDV (SEQ. ID NO. 16)、YIGSRRGDF (SEQ. ID NO. 17)、YIGSRYIGSK (SEQ. ID NO. 18)、YIGSRYIGSR (SEQ. ID NO. 19)、YIGSKRGDS (SEQ. ID NO. 20)、YIGSKRGDF (SEQ. ID NO. 21)、YIGSKRGDV (SEQ. ID NO. 22)、YIGSKYIGSK (SEQ. ID NO. 23)、YIGSKYIGSR (SEQ. ID NO. 24)、RGDSRGDS (SEQ. ID NO. 25)、RGDVRGDV (SEQ. ID NO. 26)、RGDFRGDF (SEQ. ID NO. 27)、RGDSYIGSR (SEQ. ID NO. 28)、RGDSYIGSK (SEQ. ID NO. 29)、

RGDVYIGSR (SEQ. ID NO. 30)、RGDVYIGSK (SEQ. ID NO. 31)、
RGDFYIGSR (SEQ. ID NO. 32)、或RGDFYIGSK (SEQ. ID NO. 33)。

在一較佳實施例中，本發明化合物中具清除NO自由基活性的咪唑啉類為1,3-二氧基-2-[(4-氧乙酸)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉；具溶血栓活性肽為含PAK序列(Pro-Ala-Lys)的寡肽；且血栓靶向肽為含RGD序列(Arg-Gly-Asp)的寡肽。據此，本發明提供了一種集跨血腦屏障、溶血栓、抗血栓和清除NO自由基活性作用於一體的“含PAK序列肽/咪唑啉/含RGD序列肽”三元綴合物。

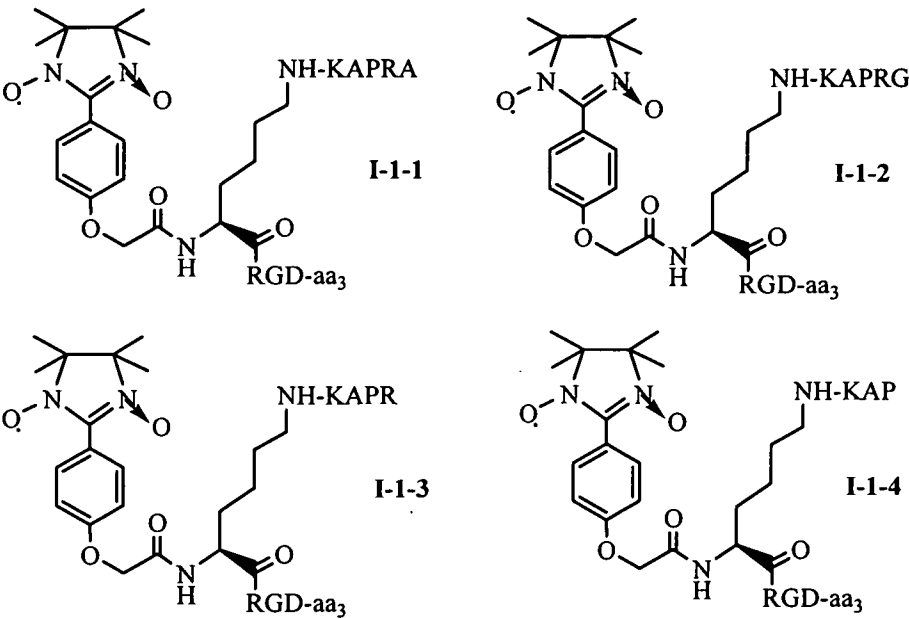
在一實施例中，本發明化合物中具清除NO自由基活性的咪唑啉類為1,3-二氧基-2-[(4-氧乙酸)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉；連接臂為L-Lys；具溶血栓活性肽為含PAK序列(Pro-Ala-Lys)的寡肽；且血栓靶向肽為含RGD序列(Arg-Gly-Asp)的寡肽。其中，含PAK序列的寡肽可為ARPAK (SEQ. ID NO. 4) 五肽、GRPAK (SEQ. ID NO. 5)五肽、RPAK (SEQ. ID NO. 3) 四肽或PAK三肽；且含RGD序列的寡肽可為RGD四肽，例如RGDS (SEQ. ID NO. 11)、RGDV (SEQ. ID NO. 12)或RGDF (SEQ. ID NO. 13)。當以L-Lys為連接臂時，本發明化合物可為以下通式I-1或I-2：



其中aa₁和aa₂可為同時存在、aa₁存在但aa₂不存在、或同時不存在；當其同時存在時，aa₁ 為R (Arg)，且aa₂為G (Gly)、A (Ala)或Q (Gln)；當aa₁存在但aa₂

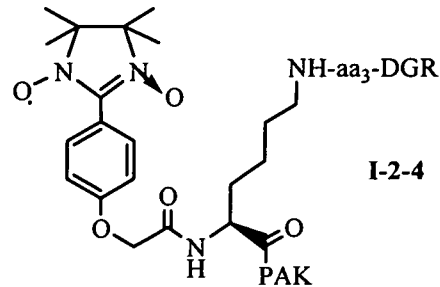
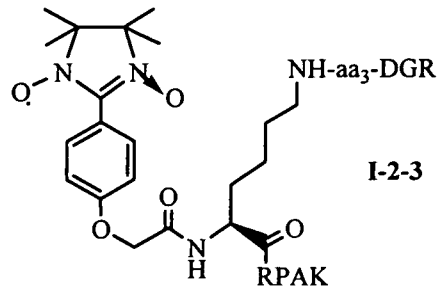
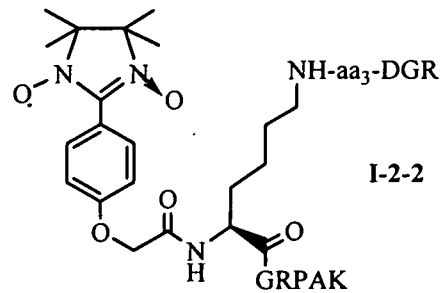
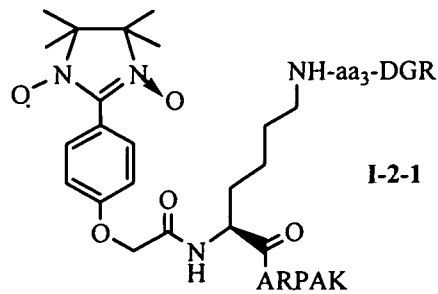
不存在時，aa₁ 為R (Arg)；aa₃可為S (Ser), V (Val), 或F (Phe)。

以通式I-1化合物為例，在一較佳實施例中，本發明化合物可為如以下通式I-1-1表示的ARPAK (SEQ. ID NO. 4)/咪唑啉/RGD三元綴合物；在另一較佳實施例中，本發明化合物可為如以下通式I-1-2表示的GRPAK (SEQ. ID NO. 5)/咪唑啉/RGD三元綴合物；在又一較佳實施例中，本發明化合物可為如以下通式I-1-3表示的RPAK (SEQ. ID NO. 3)/咪唑啉/RGD三元綴合物；且在再一較佳實施例中，本發明化合物可為如以下通式I-1-4表示的PAK/咪唑啉/RGD三元綴合物：



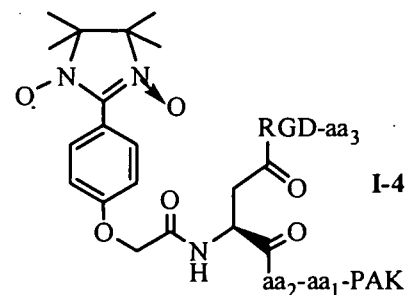
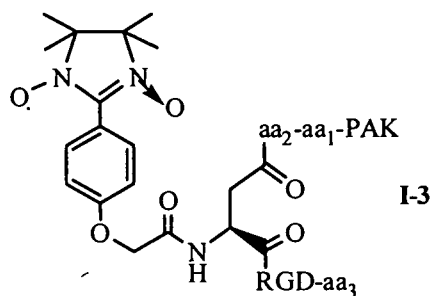
aa₃可為S (Ser), V (Val), 或F (Phe)，且較佳為V (Val)。

以通式I-2化合物為例，本發明化合物可較佳為以下通式I-2-1、I-2-2、I-2-3或I-2-4：



aa₃可為S (Ser), V (Val), 或F (Phe), 且較佳為V (Val)。

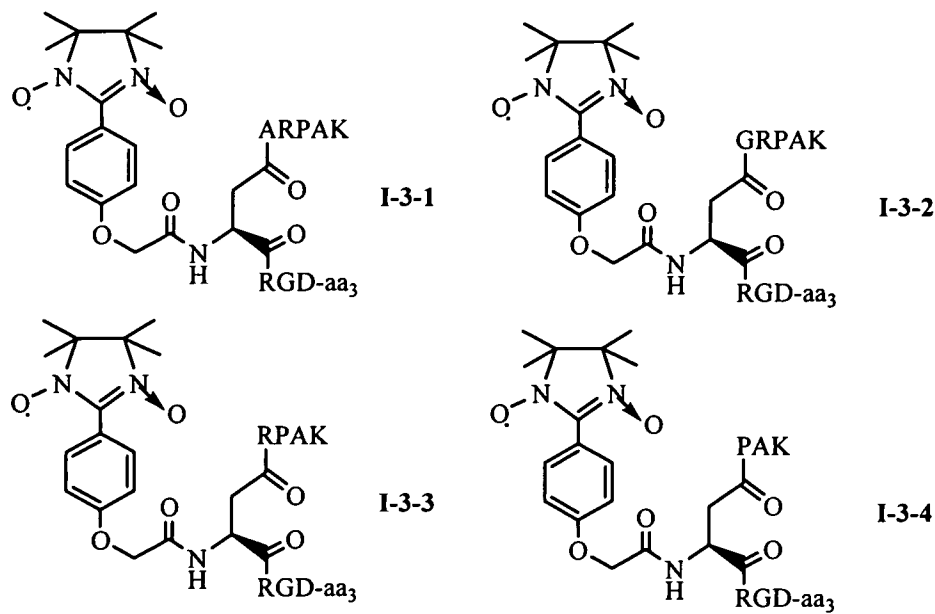
另一實施例中，本發明化合物中具清除NO自由基活性的咪唑啉類為1,3-二氧基-2-[(4-氧乙酸)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉；連接臂為L-Asp；具溶血栓活性肽為含PAK序列(Pro-Ala-Lys)的寡肽；且所述血栓靶向肽為含RGD序列(Arg-Gly-Asp)的寡肽。當以L-Asp為連接臂時，本發明化合物可為以下通式I-3或I-4：



其中aa₁和aa₂可為同時存在、aa₁存在但aa₂不存在、或同時不存在；當其同時存在時，aa₁ 為R (Arg), 且aa₂為G (Gly)、A (Ala)或Q (Gln)；當aa₁存在但aa₂不存在時，aa₁ 為R (Arg)；aa₃可為S (Ser), V (Val), 或F (Phe)。aa₁ 較佳為R (Arg)；aa₂較佳為G (Gly)；且aa₃較佳為V (Val)。

以通式I-3化合物為例，本發明化合物可較佳為以下通式I-3-1、I-3-2、

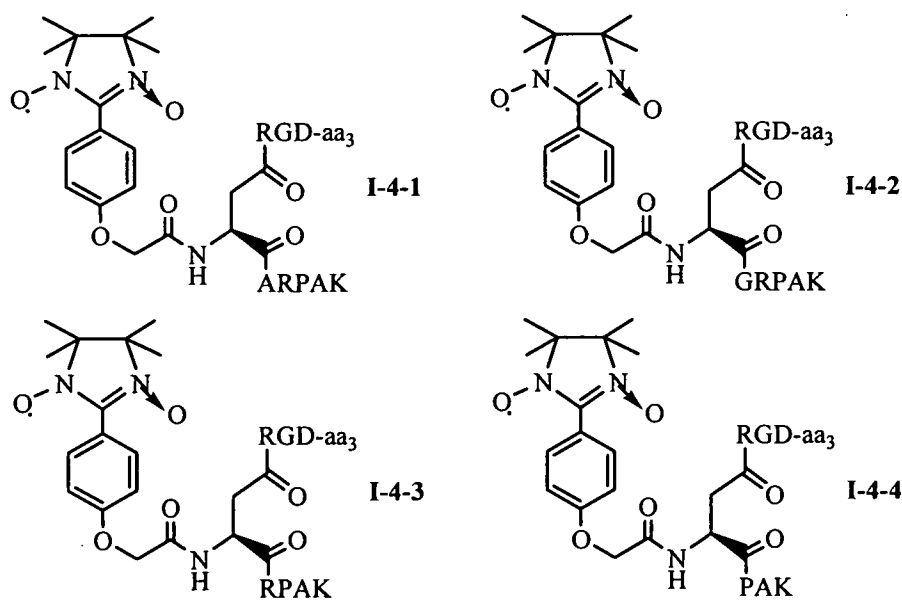
I-3-3或I-3-4：



aa₃可為S (Ser), V (Val), 或F (Phe)，且較佳為V (Val)。

以通式I-4化合物為例，本發明化合物可較佳為以下通式I-4-1、I-4-2、

I-4-3或I-4-4：

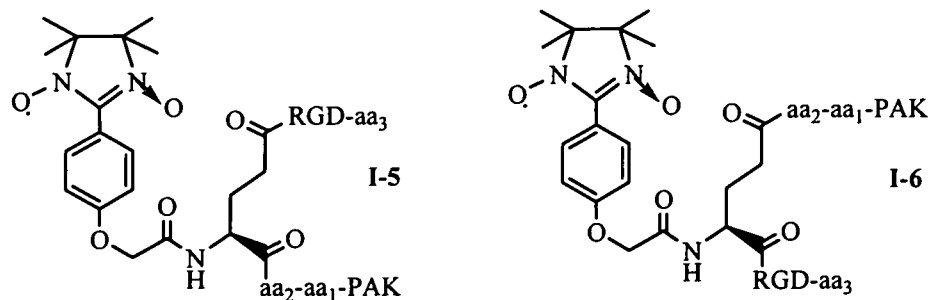


aa₃可為S (Ser), V (Val), 或F (Phe)，且較佳為V (Val)。

又一實施例中，本發明化合物中具清除NO自由基活性的咪唑啉類為1,3-二氧基-2-[(4-氧乙酸)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉；連接臂為L-Glu；具溶血栓活性肽為含PAK序列(Pro-Ala-Lys)的寡肽；且血栓靶向肽為含RGD序列

(Arg-Gly-Asp)的寡肽。當以L- Glu為連接臂時，本發明化合物可為以下通式

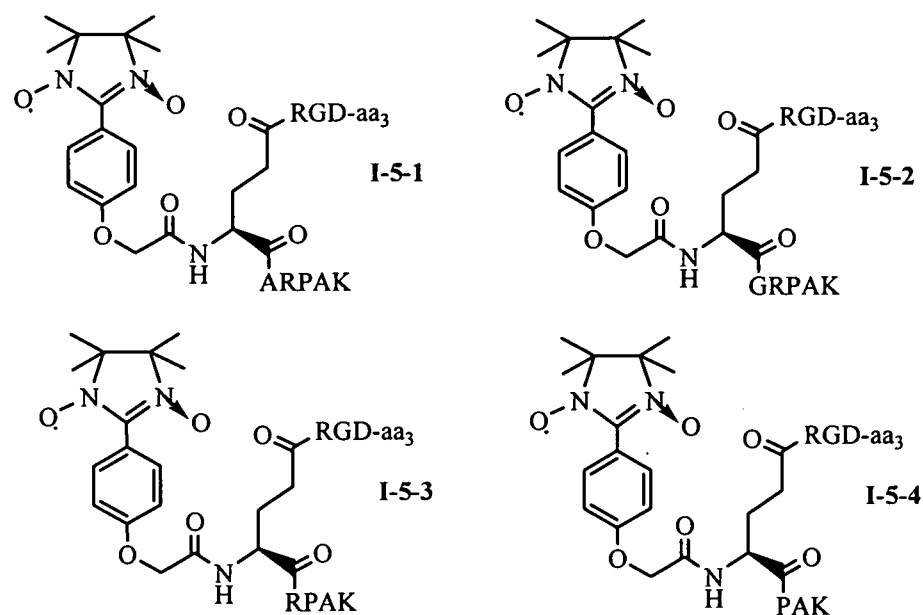
I-5或I-6：



其中aa₁和aa₂可為同時存在、aa₁存在但aa₂不存在、或同時不存在；當其同時存在時，aa₁ 為R (Arg)，且aa₂為G (Gly)、A (Ala)或Q (Gln)；當aa₁存在但aa₂不存在時，aa₁ 為R (Arg)；aa₃可為S (Ser), V (Val), 或F (Phe)。aa₁ 較佳為R (Arg)；aa₂較佳為G (Gly)；且aa₃較佳為V (Val)。

以通式I-5化合物為例，本發明化合物可較佳為以下通式I-5-1、I-5-2、

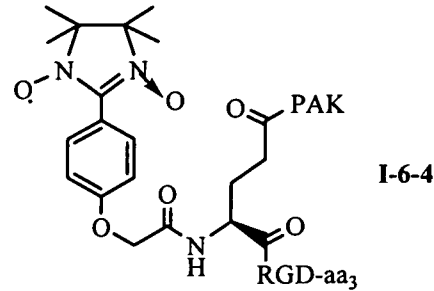
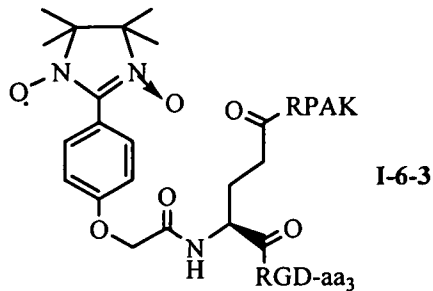
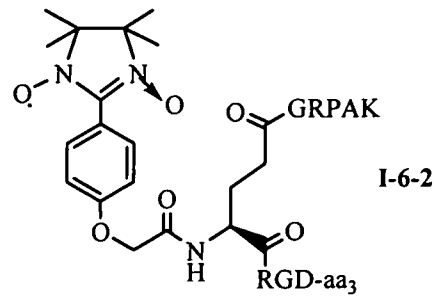
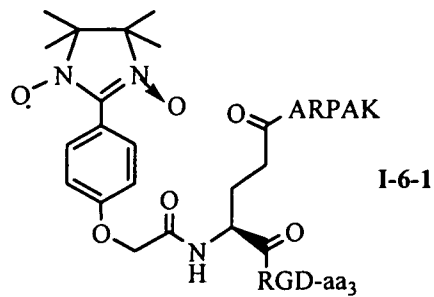
I-5-3或I-5-4：



aa₃可為S (Ser), V (Val), 或F (Phe)，且較佳為V (Val)。

以通式I-6化合物為例，本發明化合物可較佳為以下通式I-6-1、I-6-2、

I-6-3或I-6-4：



aa₃可為S (Ser), V (Val), 或F (Phe), 且較佳為V (Val)。

又一方面, 本發明還涉及一種藥物組合物, 包含前述的本發明化合物, 及藥學上可接受的載劑。本發明藥物組合物較佳是包含前述通式I-1、I-2、I-3、I-4、I-5、或I-6的化合物。本發明藥物組合物更佳是包含通式I-1-1、I-1-2、I-1-3或I-1-4的化合物。當本發明藥物組合物包含通式I-1-1、I-1-2、I-1-3或I-1-4的化合物時, 這些化合物在藥物組合物中可形成二聚體、三聚體或四聚體結構, 並且可形成直徑為2 nm 至300 nm的奈米球。在本發明藥物組合物中, 所述奈米球結構更佳是具有2 nm 至100 nm的直徑。奈米藥學的一個公知的事實是, 直徑小於100 nm的奈米球在血液在輸送不易被巨噬細胞吞噬, 容易跨過毛細血管壁。這些性能使得本發明的化合物可跨過血腦屏障。

本發明藥物組合物可作為溶血栓藥物, 用於治療心肌梗塞(Myocardial infarction)、中風(Ischemic stroke)、靜脈栓塞(Deep vein thrombosis)、肺栓塞(Pulmonary embolism)、周邊動脈阻塞性疾病(Peripheral arterial occlusive disease)、靜脈導管阻塞(occluded central vascular access devices)、動靜脈瘻管及分流管阻塞(Clotted arteriovenous fistula and shunts)、和頸動脈狹窄

(Carotid Stenosis)等疾病。本發明藥物組合物亦可作為清除NO自由基藥物，用於治療神經退化疾病(Neurodegenerative diseases)，例如阿爾茨海默氏病(Alzheimer's disease)、帕金森氏症(Parkinson's disease)、運動神經元病(motor neuron diseases)、肌萎縮性脊髓側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis)、雜訊聾(Noise-induced hearing loss)、盧賈裡格症(Lou Gehrig's disease、或亨廷頓病性癡呆(Huntington's disease)；用於治療心血管疾病(Cardiovascular disease)，例如動脈粥樣硬化(Atherosclerosis)、冠心病(Coronary heart disease)、或心肌梗死(Myocardial infarction)；用於治療精神疾病，例如躁鬱症(Bipolar disorder)、精神分裂症(Schizophrenia)、或自閉症(Autism)；及用於治療高地綜合症(Altitude sickness)、糖尿病、類風濕性關節炎、創傷性腦損傷(Traumatic brain injury)、癌症、X染色體易裂症(Fragile X syndrome)、鐮刀型紅血球疾病(Sickle Cell Disease)、扁平苔蘚(Lichen planus)、白斑病(Vitiligo)、或慢性疲勞症候群(Chronic fatigue syndrome)等疾病。本發明藥物組合物還可作為血栓靶向/抗血栓藥物，用於治療血小板增多症(Thrombocytosis)、骨髓增生性疾病(myeloproliferative disease)、真性紅細胞增多症(Polycythemia vera)、或布卡綜合征(Budd-Chiari syndrome)等疾病。本發明藥物組合物也可作為治療中風或腦梗塞藥物，更佳用於治療發病超過3小時、4小時、6小時和24小時的中風或腦梗塞，且以連續給藥方式來治療。本發明藥物組合物/化合物同時具有清除NO自由基、溶血栓、和抗血栓/血栓靶向的功能，因此能夠在患者中風3小時之後仍然保持療效，即不受使用tPA的3小時治療黃金期的限制；不會造成tPA樣的全身出血反應；和能夠清除缺血再灌注過程中產生的大量NO自由基，使患者在治療時腦神經組織

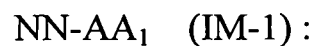
免受損傷。本發明藥物組合物中，所述化合物的奈米結構可達成跨過血腦屏障、溶血栓、血栓靶向/抗血栓和清除缺血再灌注過程中產生的NO自由基的作用最大化。

本發明藥物組合物可為任何一種臨床可接受的適宜製劑，例如，可以是注射製劑（粉針、凍乾粉針、水針、輸液等）、片劑、口服液、顆粒劑、膠囊劑、軟膠囊或滴丸等；其中，藥學上可接受的載劑可為木糖醇、甘露醇、乳糖、果糖、葡聚糖、葡萄糖、聚乙烯吡咯烷酮、低分子右旋糖酐、氯化鈉、葡萄糖酸鈣或磷酸鈣中的一種或幾種。另外，本發明藥物組合物還可包含輔料，所述的輔料可以是抗氧絡合劑、填充劑、骨架材料等。

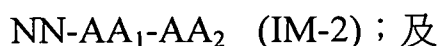
再一方面，本發明還涉及前述式I化合物的製備方法，包括以下步驟：

(1) 提供具清除NO自由基活性的咪唑啉類(NN)、具有至少三個連接用基團的连接臂(AA₁)、具溶血栓活性肽(AA₂)及血栓靶向肽(AA₃)，其中連接臂具有第一連接用基團、第二連接用基團及第三連接用基團；

(2) 在適當反應條件下，連接具清除NO自由基活性的咪唑啉類(NN)與連接臂(AA₁)的第一連接用基團，形成通式IM-1化合物：



(3) 在適當反應條件下，連接具溶血栓活性肽(AA₂)與通式IM-1化合物，其中具溶血栓活性肽的一端與連接臂的第二連接用基團相連接，形成通式IM-2化合物：



(4) 在適當反應條件下，連接血栓靶向肽(AA₃)與通式IM-2化合物，

其中血栓靶向肽的一端與連接臂的第三連接用基團相連接而形成通式I化合物；

其中步驟(3)與步驟(4)的順序可以交換。

本發明的製備方法，在步驟(1)更包含將連接臂(AA₁)的第二和第三連接用基團以保護基保護，且將具溶血栓活性肽(AA₂)和血栓靶向肽(AA₃)上除連接用一端外的活性基團以保護基保護；步驟(3)更包含先將受保護的第二連接用基團去保護，再將具溶血栓活性肽與去保護的第二連接用基團相連接；步驟(4)更包含先將受保護的第三連接用基團去保護，再將血栓靶向肽與去保護的第三連接用基團相連接；且步驟(4)後更包含將具溶血栓活性肽(AA₂)和血栓靶向肽(AA₃)上受保護的活性基團去保護。利用加上保護基和去除保護基的技術，可以控制NN、AA₂和AA₃與連接臂連接的次序和位置；待組合完成後再將其它活性基團上的保護基去保護。適當反應條件是指多肽合成中的常規條件。可用於本發明製備方法的NO自由基活性的咪唑啉類(NN)、具有至少三個連接用基團的連接臂(AA₁)、具溶血栓活性肽(AA₂)及血栓靶向肽(AA₃)與前述用於本發明式I化合物中的定義相同。

本發明製備方法可由以下更詳細的說明來進一步瞭解。

在一實施例中，本發明製備方法的連接臂的第一連接用基團為胺基，且所述第二和第三連接用基團選自羧基和胺基。

本發明製備方法的較佳實施例中，具清除NO自由基活性的咪唑啉類為1,3-二氧基-2-[(4-氧乙酸)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉；連接臂為L-Lys；具溶血栓活性肽為含PAK序列(Pro-Ala-Lys)的寡肽；且血栓靶向肽為含RGD序列(Arg-Gly-Asp)的寡肽。當以L-Lys為連接臂時，可有以下兩種接合方式：

- (1) 1,3-二氧基-2-[(4-氧乙酸)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉與L-Lys連接臂的一胺基相連接；含PAK序列的寡肽上的羧基與L-Lys連接臂的另一胺基相連接；且含RGD序列的寡肽上的胺基與L-Lys連接臂的羧基相連接(如前述通式I-1化合物所示)；或
- (2) 1,3-二氧基-2-[(4-氧乙酸)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉與L-Lys連接臂的一胺基相連接；含PAK序列的寡肽上的胺基與L-Lys連接臂的羧基相連接；且含RGD序列的寡肽上的羧基與L-Lys連接臂的另一胺基相連接(如前述通式I-2化合物所示)。

以通式I-1化合物為例，當製備通式I-1-1、I-1-2、I-1-3或I-1-4化合物時，本發明製備方法可為圖1-4所示的合成路線。圖1為製備通式I-1-1化合物的合成路線圖；圖2為製備通式I-1-2化合物的合成路線圖；圖3為製備通式I-1-3化合物的合成路線圖；圖4為製備通式I-1-4化合物的合成路線圖。圖1至圖4中，aa₃如前所述，可為S (Ser), V (Val), 或F (Phe)。以通式I-1-2化合物為例，本發明的製備方法說明如下：

- (1) 製備1,3-二氧基-2-(4-氧乙酸基-苯基)-4,4,5,5-四甲基咪唑啉；
- (2) 製備1,3-二氧基-2-[(4'-氧乙醯基-Lys-OMe)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉(在Lys連接臂的羧基以保護基保護)；
- (3) 製備HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl,
HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp (OBzl)-Val-Obzl或
HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-Obzl；
- (4) 製備Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)；
- (5) 將Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)連接到1,3-二氧基-2-[(4'-氧

乙醯基-Lys-OMe)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉的賴氨酸上得到1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N⁰-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉；

- (6) 將 HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl, HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl 或 HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl 分別與 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N⁰-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉相綴合分別得到 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N⁰-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉, 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N⁰-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉或1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N⁰-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉；

- (7) 將步驟(6)所製備的化合物脫去保護基，得到1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N⁰-[Gly-Arg-Pro-Ala-Lys]-Lys-Arg-Gly-Asp-Ser}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉，1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N⁰-[Gly-Arg-Pro-Ala-Lys]-Lys-Arg-Gly-Asp-Val}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉或1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N⁰-[Gly-Arg-Pro-Ala-Lys]-Lys-Arg-Gly-Asp-Phe}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉。

在製備通式I-1-1、I-1-3、和I-1-4化合物時，則是將步驟(4)中的“Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)”置換為“Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)”、“Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)”、和“Boc-Pro-Ala-Lys(Z)”來執行上述的制程步驟。

含PAK序列的寡肽與含RGD序列的寡肽可依組合設計的需要，在適當位置的活性基團上以保護基保護，以選擇序列的一端(含可與連接臂接合的活性基團)來和連接臂的活性基團結合。組合含PAK序列的寡肽與含RGD序列的寡肽的步驟可以交換順序，例如，先與含RGD序列的寡肽組合，再與含PAK序列的寡肽組合。

活性基團包含胺基或羧基等可進行縮合反應的基團。胺基的保護基可為苄氧羰基(CBz)、叔丁氧羰基(Boc)、9-芴甲氧羰基(Fmoc)、苄基(Bn)或對甲氧苄基(PMP)。羧基的保護基可為甲基酯(OMe)、苄基酯(Obn)、苄甲基酯(Obzl)、叔丁基酯(Obut)、或矽基酯(OSi(CH₃)₃)。

以通式I-2化合物為例，當製備通式I-2-1、I-2-2、I-2-3或I-2-4化合物時，本發明製備方法可為圖5-8所示的合成路線。圖5為製備通式I-2-1化合物的合成路線圖；圖6為製備通式I-2-2化合物的合成路線圖；圖7為製備通式I-2-3化合物的合成路線圖；圖8為製備通式I-2-4化合物的合成路線圖。圖5至圖8中，aa₃如前所述，可為S (Ser), V (Val), 或F (Phe)。在合成通式I-2-1、I-2-2、I-2-3或I-2-4化合物時，可先製備1,3-二氧基-2-[(4'-氧乙醯基-Lys-OMe)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉，然後將含RGD序列的寡肽的C端與Lys連接臂的胺基先組合；最後將含PAK序列的寡肽的N端與去保護後的連接臂的羧基組合。

在另一實施例中，本發明製備方法的具清除NO自由基活性的咪唑啉類為1,3-二氧基-2-[(4-氧乙酸)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉；連接臂為L-Asp；具溶血栓活性肽為含PAK序列(Pro-Ala-Lys)的寡肽；血栓靶向肽為含RGD序列(Arg-Gly-Asp)的寡肽；且其中1,3-二氧基-2-[(4-氧乙酸)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉與L-Asp連接臂的胺基相連接；含PAK序列的寡肽上的胺基與L-Asp連接臂的一羧基相連接；且含RGD序列的寡肽上的胺基與L-Asp連接臂的另一羧基相連接(如前述通式I-3或I-4化合物所示)。

以通式I-3化合物為例，當製備通式I-3-1、I-3-2、I-3-3或I-3-4化合物時，本發明製備方法可為圖9-12所示的合成路線。圖9為製備通式I-3-1化合物的合成路線圖；圖10為製備通式I-3-2化合物的合成路線圖；圖11為製備通式I-3-3化合物的合成路線圖；圖12為製備通式I-3-4化合物的合成路線圖。圖9至圖12中，aa₃如前所述，可為S (Ser), V (Val), 或F (Phe)。在合成通式I-3-1、I-3-2、I-3-3或I-3-4化合物時，可先製備1,3-二氧基-2-[(4'-氧乙醯基-Asp-OMe)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉，然後將含PAK序列的寡肽的N端與Asp連接臂的一羧基先組合；最後將含RGD序列的寡肽的N端與去保護後的Asp連接臂的另一羧基組合。

以通式I-4化合物為例，當製備通式I-4-1、I-4-2、I-4-3或I-4-4化合物時，本發明製備方法可為圖13-16所示的合成路線。圖13為製備通式I-4-1化合物的合成路線圖；圖14為製備通式I-4-2化合物的合成路線圖；圖15為製備通式I-4-3化合物的合成路線圖；圖16為製備通式I-4-4化合物的合成路線圖。圖13至圖16中，aa₃如前所述，可為S (Ser), V (Val), 或F (Phe)。在合成通式I-4-1、I-4-2、I-4-3或I-4-4化合物時，可先製備1,3-二氧基-2-[(4'-氧乙醯基

-Asp-OMe)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉，然後將含RGD序列的寡肽的N端與Asp連接臂的一羧基先組合；最後將含PAK序列的寡肽的N端與去保護後的Asp連接臂的另一羧基組合。

在又一實施例中，本發明製備方法的具清除NO自由基活性的咪唑啉類為1,3-二氧基-2-[(4-氧乙酸)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉；連接臂為L-Glu；具溶血栓活性肽為含PAK序列(Pro-Ala-Lys)的寡肽；且血栓靶向肽為含RGD序列(Arg-Gly-Asp)的寡肽；且其中1,3-二氧基-2-[(4-氧乙酸)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉與L-Glu的胺基相連接；含PAK序列的寡肽上的胺基與L-Glu連接臂的一羧基相連接；且含RGD序列的寡肽上的胺基與L-Glu連接臂的另一羧基相連接(如前述通式I-5或I-6化合物所示)。

以通式I-5化合物為例，當製備通式I-5-1、I-5-2、I-5-3或I-5-4化合物時，本發明製備方法可為圖17-20所示的合成路線。圖17為製備通式I-5-1化合物的合成路線圖；圖18為製備通式I-5-2化合物的合成路線圖；圖19為製備通式I-5-3化合物的合成路線圖；圖20為製備通式I-5-4化合物的合成路線圖。

圖17至圖20中，aa₃如前所述，可為S (Ser), V (Val), 或F (Phe)。在合成通式I-5-1、I-5-2、I-5-3或I-5-4化合物時，可先製備1,3-二氧基-2-[(4'-氧乙醯基-Glu-OMe)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉，然後將含RGD序列的寡肽的N端與Glu連接臂的一羧基先組合；最後將含PAK序列的寡肽的N端與去保護後的Glu連接臂的另一羧基組合。

以通式I-6化合物為例，當製備通式I-6-1、I-6-2、I-6-3或I-6-4化合物時，本發明製備方法可為圖21-24所示的合成路線。圖21為製備通式I-6-1化合物的合成路線圖；圖22為製備通式I-6-2化合物的合成路線圖；圖23為製備通

式I-6-3化合物的合成路線圖；圖24為製備通式I-6-4化合物的合成路線圖。

圖21至圖24中，aa₃如前所述，可為S (Ser), V (Val), 或F (Phe)。在合成通式I-6-1、I-6-2、I-6-3或I-6-4化合物時，可先製備1,3-二氧基-2-[(4'-氧乙醯基-Glu-OMe)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉，然後將含PAK序列的寡肽的N端與Glu連接臂的一羧基先組合；最後將含RGD序列的寡肽的N端與去保護後的Glu連接臂的另一羧基組合。

前述製備方法中含PAK序列的寡肽可為ARPAK (Ala-Arg- Pro-Ala-Lys)

(SEQ. ID NO. 4), GRPAK (Gly-Arg-Pro-Ala-Lys) (SEQ. ID NO. 5), QRPAAK (Gln-Arg-Pro-Ala-Lys) (SEQ. ID NO. 6), RPAK(Arg-Pro-Ala-Lys) (SEQ. ID NO. 3) 或 PAK (Pro-Ala-Lys)；且含RGD序列的寡肽可為RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) (SEQ. ID NO. 11)、RGDV (Arg-Gly-Asp-Val) (SEQ. ID NO. 12) 或RGDF (Arg-Gly-Asp-Phe) (SEQ. ID NO. 13)。

本發明的化合物或藥物組合物在大鼠體內NO清除活性試驗中表明，具有較高的清除NO自由基活性；在體內外溶血栓和抗血栓活性試驗中表明，具有優異的溶血栓和抗血栓活性；在大鼠體內抗中風活性試驗中證明，可以有效地保護中風大鼠的神經功能，具有優異的抗中風活性；在中風大鼠大腦梗死體積試驗中表明，可以有效地可以降低中風大鼠大腦梗塞壞死體積。

【圖式簡單說明】

圖1為本發明化合物一實施例(通式I-1-1化合物)的合成路線圖；

圖2為本發明化合物一實施例(通式I-1-2化合物)的合成路線圖；

圖3為本發明化合物一實施例(通式I-1-3化合物)的合成路線圖；

圖4為本發明化合物一實施例(通式I-1-4化合物)的合成路線圖；

圖5為本發明化合物一實施例(通式I-2-1化合物)的合成路線圖；

圖6為本發明化合物一實施例(通式I-2-2化合物)的合成路線圖；

圖7為本發明化合物一實施例(通式I-2-3化合物)的合成路線圖；

圖8為本發明化合物一實施例(通式I-2-4化合物)的合成路線圖；

圖9為本發明化合物一實施例(通式I-3-1化合物)的合成路線圖；

圖10為本發明化合物一實施例(通式I-3-2化合物)的合成路線圖；

圖11為本發明化合物一實施例(通式I-3-3化合物)的合成路線圖；

圖12為本發明化合物一實施例(通式I-3-4化合物)的合成路線圖；

圖13為本發明化合物一實施例(通式I-4-1化合物)的合成路線圖；

圖14為本發明化合物一實施例(通式I-4-2化合物)的合成路線圖；

圖15為本發明化合物一實施例(通式I-4-3化合物)的合成路線圖；

圖16為本發明化合物一實施例(通式I-4-4化合物)的合成路線圖；

圖17為本發明化合物一實施例(通式I-5-1化合物)的合成路線圖；

圖18為本發明化合物一實施例(通式I-5-2化合物)的合成路線圖；

圖19為本發明化合物一實施例(通式I-5-3化合物)的合成路線圖；

圖20為本發明化合物一實施例(通式I-5-4化合物)的合成路線圖；

圖21為本發明化合物一實施例(通式I-6-1化合物)的合成路線圖；

圖22為本發明化合物一實施例(通式I-6-2化合物)的合成路線圖；

圖23為本發明化合物一實施例(通式I-6-3化合物)的合成路線圖；

圖24為本發明化合物一實施例(通式I-6-4化合物)的合成路線圖；

圖25為本發明化合物**Ia**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構；

圖26為本發明化合物**Ib**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構；

圖27為本發明化合物**Ic**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構；

圖28為本發明化合物**Id**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構；

圖29為本發明化合物**Ie**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構；

圖30為本發明化合物**If**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構；

圖31為本發明化合物**Ig**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構；

圖32為本發明化合物**Ih**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構；

圖33為本發明化合物**Ii**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構；

圖34為本發明化合物**Ij**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構；

圖35為本發明化合物**Ik**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構；

圖36為本發明化合物II在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構；

圖37為本發明化合物Ie在0.01 μ M濃度下的高分辨FT- MS質譜圖；

圖38為本發明化合物Ie在0.1 μ M濃度下的高分辨FT- MS質譜圖；

圖39為本發明化合物Ie在1 μ M濃度下的高分辨FT- MS質譜圖；

圖40為本發明化合物Ie在10 μ M濃度下的高分辨FT-MS質譜圖。

【實施方式】

下面結合具體實施例來進一步描述本發明，本發明的優點和特點將會隨著描述而更為清楚。但這些實施例僅是範例性的，並不對本發明的範圍構成任何限制。本領域技術人員應該理解的是，在不偏離本發明的精神和範圍下可以對本發明技術方案的細節和形式進行修改或替換，但這些修改和替換均落入本發明的保護範圍內。

製備具清除NO自由基活性的咪唑啉類：1,3-二氧基-2-[(4-氧乙酸)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

實施例1 製備2,3-二甲基-2,3-二硝基丁烷

69 g (0.78 mol) 2-硝基丙烷加入130 ml NaOH (6N) 水溶液中，在冰鹽浴攪拌下滴加20 ml (0.38 mol) Br₂, 1 h 內滴加完，然後加入240 mL乙醇, 90 °C回流3 h, 將反應液乘熱倒入800 ml冰水中，濾得55 g (81%) 標題化合物，為無色片狀結晶, Mp 110-112 °C.

實施例 2 製備2,3-二甲基-2,3-二羥胺基丁烷

將7 g (40 mmol) 2,3-二甲基-2,3-二硝基丁烷和4 g NH_4Cl 混懸於80 mL乙醇水溶液(50%) 中, 冰浴下攪拌, 在3 h內加入16 g 鋅粉。鋅粉加完後,撤去冰浴,繼續室溫攪拌反應3 h,然後將反應液抽濾。濾餅用乙醇水溶液(50%)反覆洗滌,合併濾液及洗滌液,用濃鹽酸調節 $\text{pH}=2$,減壓蒸至泥漿狀。加入適量碳酸鉀,拌勻後,使用索氏提取器,氯仿為提取劑,抽提6 h,提取液減壓濃縮至少量,加入石油醚後析出2.60 g (44%)標題化合物,為無色晶體。Mp 157-159 °C.

實施例 3 製備1,3-二羥基-2-(4'-羥基苯基)-4,4,5,5-四甲基咪唑烷

1.22 g (10 mmol) 對羥基苯甲醛與1.48g (10 mmol) 2,3-二甲基-2,3-二羥胺基丁烷溶於10 mL甲醇中, 室溫攪拌8 h後, TLC顯示原料點消失。抽濾得到1.29 g (51%)標題化合物,為無色晶體。EI-MS (m/z) 252 $[\text{M}]^+$. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) $\delta(\text{ppm}) = 1.03$ (s, 6H), 1.05 (s, 6H), 4.39 (s, 1H), 6.70 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.23 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.63 (s, 1H), 7.85(s, 2H)。

實施例 4 製備1,3-二羥基-2-(4'-羥基苯基)-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

將504 mg (2 mmol) 1,3-二羥基-2-(4'-羥基苯基)-4,4,5,5-四甲基咪唑啉溶解於30 mL甲醇中,加入3 g PbO_2 ,室溫攪拌40 min,TLC顯示原料點消失。抽濾除去固體,濾液室溫下減壓蒸乾,殘留物柱層析純化(氯仿洗脫),260 mg (52%)標題化合物,為藍色固體。Mp 134-135 °C,EI-MS (m/z) 249 $[\text{M}]^+$. IR (KBr) 3250,1610,1500,1490, 840。

實施例 5 製備1,3-二氧基-2-(4'-氧基乙酸乙酯-苯基)-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

將250 mg(1 mmol) 1,3-二羥基-2-(4'-羥基苯基)-4,4,5,5-四甲基咪唑啉、0.32 mL溴代乙酸乙酯及32 mg氫化鈉溶於5 mL無水THF中,混合物60 °C攪拌5小時,TLC顯示原料點消失。室溫下減壓過濾,濾液減壓濃縮至乾,殘留物柱層析(乙酸乙酯:石油醚 = 1:5)純化,得到300 mg (90%)目標化合物。Mp 107-109 °C。

實施例 6 製備1,3-二氧基-2-(4'-氧乙酸-苯基)-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

(TMMZ)

向33 mg (0.1 mmol) 1,3-二氧基-2-(4'-氧基乙酸乙酯-苯基)-4,4,5,5-四甲基咪唑啉與3 mL甲醇的溶液中加7滴NaOH(2N)水溶液,室溫攪拌30 min, TLC顯示原料點消失。將反應液減壓濃縮,殘留物先加2 mL飽和食鹽水稀釋,再用2N HCl調pH 6,然後用乙酸乙酯萃取3次(3 ml × 3),合併的乙酸乙酯層用無水硫酸鈉乾燥,過濾,濾液室溫下減壓濃縮至乾,得30 mg (99%)標題化合物,為藍色晶體。Mp 155-157 °C. EI-MS (m/z) 307 $[M]^+$ 。

組合具清除NO自由基活性的咪唑啉類與連接臂：1,3-二氧基-2-[(4'-氧乙醯基-Lys-OMe)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉**實施例 7 製備1,3-二氧基-2-[(4'-氧乙醯-N^o-Boc-Lys-OMe)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉**

將307 mg(1 mmol) 1,3-二氧基-2-(4'-氧乙酸-苯基)-4,4,5,5-四甲基咪唑啉與30 ml無水THF的溶液在冰浴下攪拌。向溶液加250 mg (1.2 mmol) DCC及135 mg (1 mmol) HOBt,冰浴下攪拌10 min。向該溶液加由300 mg (1 mmol) HCl·Lys(Boc)-OMe, 122 mg (1 mmol)N-甲基嗎啉及6 mL無水THF配製的溶液。得到的反應混合物室溫反應24小時。TLC(乙酸乙酯:石油醚 = 2:1)顯示HCl·Lys(Boc)-OMe消失。反應混合物減壓濃縮至乾, 殘留物用乙酸乙酯溶解, 濾除不溶物。濾液依次用飽和碳酸氫鈉水溶液和飽和氯化鈉水溶液洗。分出的乙酸乙酯層用無水硫酸鈉乾燥、過濾、濾液37°C減壓濃縮(這些操作在下文中統稱常規處理),殘留物柱層析純化(乙酸乙酯:石油醚 = 2:1), 得433 mg(65%)標題化合物,為藍色固體。ESI-MS(m/z) 550 [M + H]⁺。

實施例 8 製備1,3-二氧基-2-[(4'-氧乙醯-Lys-OMe)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

將 625 mg (1 mmol) 1,3-二氧基-2-[(4'-氧乙醯-N^ω-Boc-Lys-OMe)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉溶於15 mL無水氯化氫-乙酸乙酯液(4N), 室溫攪拌3小時, TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應混合物按常規方法處理, 殘留物用無水乙醚析晶, 得標題化合物。

製備具溶血栓活性肽：適當保護的ARPAK (SEQ. ID NO. 4)

實施例 9 製備Boc-Ala-Lys(Z)-OBzl

將473 mg (2.5 mmol)Boc-Ala溶於10 ml無水THF。冰浴下往裡加由338 mg

(2.5 mmol) HOBt, 619 mg (3 mmol) DCC及10 mL無水THF配製的溶液。反應混合物冰浴下攪拌 20 分鐘。向該溶液中加由 936 mg (2.3 mmol)HCl·Lys(Z)-OBzl, 232 mg (2.3 mmol)N-甲基嗎啉先及6 mL無水THF配製的溶液。得到的反應混合物室溫反應24小時,TLC (CHCl₃:MeOH = 30:1) 顯示HCl·Lys(Z)-OBzl消失。反應混合物按常規處理得1.204 g (97%) 標題化合物,為無色固體。Mp 88-90 °C. $[\alpha]_D^{20} = -29.2$ (c = 0.1, MeOH). ESI-MS(m/z) 565 [M + Na]⁺。

實施例 10 製備HCl·Ala-Lys(Z)-OBzl：

將1.354 g (2.5 mmol)Boc-Ala-Lys(Z)-OBzl溶於約10 ml無水氯化氫-乙酸乙酯溶液(4N), 室溫攪拌3小時, TLC(CHCl₃:MeOH, 30:1)顯示原料點消失。反應混合液在室溫下減壓濃縮, 殘留物再用乙酸乙酯溶解並室溫下濃縮, 如此反覆數次,直至除淨游離的氯化氫(這些操作在下文中統稱常規處理)。殘留物用無水乙醚析晶, 得標題化合物, 直接用於下步反應。

實施例 11 製備Boc-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl

將538 mg (2.5 mmol) Boc-Pro溶於適量無水THF, 冰浴下加入338 mg (2.5 mmol)HOBt, 619 mg (3 mmol) DCC的無水THF溶液, 反應20分鐘。向該溶液加由1.099 g (2.3 mmol) HCl·Ala-Lys(Z)-OBzl, 232 mg(2.3 mmol)N-甲基嗎啉及10 mL無水THF配製的溶液, 室溫反應24小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1) 顯示原料點消失。反應化合物按常規處理, 得2.847 g (98%)標題化合物. Mp 82-83 °C. $[\alpha]_D^{20} = -46.4$ (c = 0.11, MeOH). ESI-MS(m/z) 661 [M + Na]⁺。

實施例 12 製備HCl·Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl

將1.596 g (2.5 mmol) Boc-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl溶於15 mL無水氫化氫-乙酸乙酯液(4N), 室溫攪拌3小時, TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應混合物按常規方法處理, 殘留物用無水乙醚析晶, 得標題化合物, 直接用於下步反應。

實施例 13製備Boc-Arg(NO₂)- Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl

冰浴下將798 mg(2.5 mmol) Boc-Arg(NO₂), 338 mg (2.5 mmol) HOBT, 619 mg (3 mmol) DCC和10 mL無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液中加由1.322 g (2.3 mmol) HCl·Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl, 232 mg(2.3 mmol)N-甲基嗎啉與5 mL無水THF配製的溶液, 室溫反應24小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1) 顯示原料點消失。按常規處理, 得1.642 g (85%)標題化合物. Mp 84-85 °C. $[\alpha]_D^{20} = -65.0$ (c = 0.13, MeOH). ESI-MS (m/z) 864 [M + Na]⁺。

實施例 14製備HCl· Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl

將2.099 g (2.5 mmol) Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl溶於20 mL無水氫化氫-乙酸乙酯液(4N), 室溫攪拌3小時, TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1) 顯示原料點消失。反應混合物按常規方法處理, 殘留物用無水乙醚析晶, 得標題化合物, 直接用於下步反應。

實施例 15製備Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl

冰浴下將473 mg(2.5 mmol) Boc-Ala, 338 mg(2.5 mmol)HOBt, 619 mg (3 mmol) DCC和10 mL無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液中加由1.785 g(2.3 mmol)HCl·Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl, 232 mg(2.3 mmol)N-甲基嗎啉與5 mL無水THF配製的溶液, 反應24小時得1.802 g (86%)標題化合物。Mp 87 - 89 °C. $[\alpha]_D^{20} = -63.9$ (c = 0.12, MeOH). ESI-MS (m/e) 934 [M + Na]⁺。

實施例 16製備Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)

將921 mg(1 mmol) Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl溶於3 mL甲醇中, 冰浴下加入NaOH水溶液(2N), 室溫下攪拌30 min, 保持pH 12, 冰浴下攪拌10 min, TLC顯示原料點消失。用2N HCl調pH 7, 將反應液減壓濃縮, 殘留物加2 mL飽和食鹽水稀釋, 用2N HCl調pH 2, 用乙酸乙酯萃取3次(5 mL×3), 合併的乙酸乙酯層用無水硫酸鈉乾燥, 室溫下減壓濃縮得767 mg (80%)標題化合物, 為無色固體。EI-MS (m/z) 830 [M - H]⁻。

製備血栓靶向/抗血栓肽：適當保護的RGDS (SEQ. ID NO. 11), RGDV (SEQ. ID NO. 12), RGDF (SEQ. ID NO. 13)

實施例 17製備Boc-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl

冰浴下將808 mg(2.5 mmol)Boc-Asp(OBzl), 338 mg(2.5 mmol)HOBt, 619 mg(3 mmol)DCC和10 mL無水THF的溶液攪拌反應20分鐘。向該溶液加由740 mg (2.3 mmol)HCl·Ser(Bzl)-OBzl, 232 mg (2.3 mmol)N-甲基嗎啉與5 mL無水THF配製的溶液, 室溫反應24小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)顯示原料

點消失。反應化合物按常規處理，得1.29 g (95%)標題化合物，為無色油狀物。ESI-MS(m/z) 591 $[M + H]^+$ 。

實施例 18 製備HCl·Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl

將1.477 g (2.5 mmol) Boc-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl溶於15 mL無水氯化氫-乙酸乙酯液(4N)並室溫攪拌3小時，TLC($CHCl_3$:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應混合物按常規方法處理，殘留物用無水乙醚析晶，得標題化合物，直接用於下步反應。

實施例 19 製備Boc-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl

冰浴下將438 mg (2.5 mmol)Boc-Gly,338 mg (2.5 mmol) HOBT,619 mg (3 mmol) DCC和10 mL無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液中加由1.212 g (2.3 mmol)HCl·Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-Obzl, 232 mg(2.3 mmol)N-甲基嗎啉與5 mL無水THF配製的溶液，室溫反應24小時。TLC ($CHCl_3$:MeOH, 20:1) 顯示原料點消失。反應混合物按常規處理，得1.461 g (98%)標題化合物，為無色固體。Mp 53 - 55 °C. $[\alpha]_D^{20} = -23.7$ ($c = 0.13$, MeOH). ESI-MS (m/z) 649 $[M + H]^+$ 。

實施例 20 製備HCl· Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl

將1.619 g (2.5 mmol) Boc-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl溶於15 mL無水氯化氫-乙酸乙酯液(4N)，室溫攪拌3小時，TLC ($CHCl_3$:MeOH, 20:1) 顯示原料點消失。反應混合物按常規方法處理，殘留物用無水乙醚析晶，得標題化合物，

直接用於下步反應。

實施例 21 製備Boc-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl

冰浴下將798 mg(2.5 mmol) Boc-Arg(NO₂), 338 mg(2.5 mmol) HOBt, 619 mg (3 mmol) DCC及10 mL無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液加由1.343 g(2.3 mmol) HCl·Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl, 232 mg (2.3 mmol) N-甲基嗎啉與5 mL無水THF配製的溶液, 室溫反應24小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。按常規處理, 得標題化合物1.66 g (85%), 為無色固體。Mp 74 - 75 °C. $[\alpha]_D^{20} = -26.2$ (c = 0.12, MeOH). ESI-MS(m/z) 872 [M + Na]⁺。

實施例 22 製備HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl

將2.122 g (2.5 mmol) Boc-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl與20 mL氯化氫-乙酸乙酯液(4N)的混合物室溫攪拌3小時, TLC(CHCl₃: MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應混合物按常規方法處理, 殘留物用無水乙醚析晶, 得標題化合物。

實施例 23 製備Boc-Asp(OBzl)-Val-OBzl

冰浴下將808 mg (2.5 mmol) Boc-Asp(OBzl), 338 mg (2.5 mmol) HOBt, 619 mg (3 mmol) DCC及10 mL無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液加由558 mg (2.3 mmol) HCl·Val-OBzl, 232 mg (2.3 mmol) N-甲基嗎啉與5 mL無水THF配製的溶液, 室溫反應24小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應化合物按常規處理, 得1.129 g (96%)標題化合物, 為無色油狀液體。

ESI-MS(m/z) 512 $[M + H]^+$ 。

實施例24 製備HCl·Asp(OBzl)-Val-OBzl

將1.278 g (2.5 mmol) Boc-Asp(OBzl)-Val-OBzl溶於15 ml無水氯化氫-乙酸乙酯液(4N)，室溫攪拌3小時，TLC ($CHCl_3$:MeOH, 20:1) 顯示原料點消失。反應混合物按常規方法處理，殘留物用無水乙醚析晶，得標題化合物，直接用於下步反應。

實施例25 製備Boc-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl

冰浴下將438 mg (2.5 mmol)Boc-Gly，338 mg (2.5 mmol) HOBt，619 mg (3 mmol) DCC和10 mL無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液加由1.03 g (2.3 mmol) HCl·Asp(OBzl)-Val-Obzl, 232 mg (2.3 mmol) N-甲基嗎啉與5 mL無水THF配製的溶液，室溫反應24小時。TLC($CHCl_3$:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應化合物按常規處理，得1.242 g (95%)標題化合物，為無色固體。Mp 66 - 68 °C. $[\alpha]_D^{20} = -43.8$ ($c = 0.11$, MeOH). ESI-MS(m/z) 592 $[M + Na]^+$ 。

實施例 26製備HCl· Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl

將1.421 g (2.5 mmol) Boc-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl溶於15 mL無水氯化氫-乙酸乙酯液(4N)，室溫攪拌3小時，TLC($CHCl_3$:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應混合物按常規方法處理，殘留物用無水乙醚析晶，得標題化合物，直接用於下步反應。

實施例 27 製備 Boc-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl

冰浴下將 798 mg (2.5 mmol) Boc-Arg(NO₂), 338 mg (2.5 mmol) HOBt, 619 mg (3 mmol) DCC 和 10 mL 無水 THF 的溶液攪拌 20 分鐘。向該溶液加由 1.162 g (2.3 mmol) HCl·Gly-Asp(OBzl)-Val-Obzl, 232 mg (2.3 mmol) N-甲基嗎啉與 5 mL 無水 THF 配製的溶液, 室溫反應 24 小時。TLC (CHCl₃:MeOH, 20:1) 顯示原料點消失。反應化合物按常規處理, 得 1.523 g (86%) 標題化合物, 為無色固體。Mp 107 - 109 °C. $[\alpha]_D^{20} = -38.0$ (c = 0.12, MeOH). ESI-MS(m/z) 793 [M + Na]⁺。

實施例 28 製備 HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl

將 1.925 g (2.5 mmol) Boc-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl 溶於 20 mL 無水氯化氫-乙酸乙酯液(4N), 室溫攪拌 3 小時, TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1) 顯示原料點消失。反應混合物按常規方法處理, 殘留物用無水乙醚析晶, 得標題化合物。

實施例 29 製備 Boc-Asp(OBzl)-Phe-OBzl

冰浴下將 808 mg (2.5 mmol) Boc-Asp(OBzl), 338 mg (2.5 mmol) HOBt, 619 mg (3 mmol) DCC 和 10 mL 無水 THF 的溶液攪拌 20 分鐘。向該溶液加由 668 mg (2.3 mmol) HCl·Phe-OBzl, 232 mg (2.3 mmol) N-甲基嗎啉與 5 mL 無水 THF 配製的溶液, 室溫反應 24 小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1) 顯示原料點消失。按常規處理, 得標題化合物 1.222 g (95%), 為無色固體。Mp 79 - 80 °C. $[\alpha]_D^{20} = -24.2$ (c = 0.13, MeOH), ESI-MS(m/z) 561 [M + H]⁺。

實施例 30 製備HCl·Asp(OBzl)-Phe-OBzl

將1.398 g (2.5 mmol) Boc-Asp(OBzl)-Phe-OBzl溶於15 mL無水氯化氫-乙酸乙酯溶液(4N)，室溫攪拌3小時，TLC (CHCl₃:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應混合物按常規方法處理，殘留物用無水乙醚析晶，得標題化合物，直接用於下步反應。

實施例 31 製備Boc-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl

冰浴下將438 mg (2.5 mmol)Boc-Gly, 338 mg (2.5 mmol)HOBt, 619 mg (3 mmol) DCC的無水THF溶液攪拌20分鐘。向該溶液加由1.141 g (2.3 mmol) HCl·Asp(OBzl)-Phe-OBzl, 232 mg (2.3 mmol)N-甲基嗎啉與5 mL無水THF配製的溶液，室溫反應24小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應混合物按常規處理，得1.29 g (91%) 標題化合物，為無色固體。Mp 70 - 71 °C. $[\alpha]_D^{20} = -22.5$ (c = 0.14, MeOH). ESI-MS(m/z) 640 [M + Na]⁺。

實施例 32 製備HCl· Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl

將1.541 g (2.5 mmol) Boc-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl溶於15 mL無水氯化氫-乙酸乙酯液(4N)，室溫攪拌3小時，TLC (CHCl₃:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應混合物按常規方法處理，殘留物用無水乙醚析晶，得標題化合物，直接用於下步反應。

實施例 33 製備Boc-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl

冰浴下將798 mg (2.5 mmol) Boc-Arg(NO₂), 338 mg (2.5 mmol)HOBt, 619 mg (3 mmol) DCC和10 mL無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液加由1.272 g (2.3 mmol) HCl·Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl, 232 mg (2.3 mmol)N-甲基嗎啉與5 mL 無水THF配製的溶液, 室溫反應24小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應混合物按常規處理, 得1.637g (87%)標題化合物, 為無色固體。Mp 77 - 79 °C. $[\alpha]_D^{20} = -22.6$ (c = 0.09, MeOH). ESI-MS(m/z) 841 [M + Na]⁺。

實施例 34 製備HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl

將2.045 g (2.5 mmol) Boc-Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl溶於15 mL無水氯化氫-乙酸乙酯液(4N), 室溫攪拌3小時, TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1) 顯示原料點消失。反應混合物按常規方法處理, 殘留物用無水乙醚析晶, 得標題化合物。

製備ARPAK (SEQ. ID NO. 4)/咪唑啉/RGD三元綴合物(通式I-1-1化合物)：

Ia, Ib, Ic

實施例 35 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-[N^ω-[Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala- Lys(Z)]-Lys-OMe}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將821 mg (1 mmol) Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z), 135 mg (1 mmol)HOBt, 250 mg (1 mmol) DCC和10 mL無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液加由480 mg(1 mmol) 1,3-二氧基-2-[(4'-氧乙醯基-Lys-OMe)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉和100 mg (1 mmol) N-甲基嗎啉與5 mL無水THF配

製的溶液，室溫反應24小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 40:1)顯示原料點消失。反應化合物按常規處理，得925 mg (83%)標題化合物，為藍色固體。Mp 179 - 182 °C. $[\alpha]_D^{20} = -34.3$ (c = 0.14, MeOH), ESI-MS(*m/z*) 1275 [M + Na]⁺。IR (KBr) 3319, 2935, 1658, 1531, 1448, 1363, 1254, 1168, 1053, 835, 749, 540 cm⁻¹。

實施例 36 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將 1260 mg (1 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-OMe}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉溶於3 mL甲醇中，加入NaOH水溶液(2N)，室溫下攪拌30 min。保持pH 12，冰浴下攪拌10 min，TLC顯示原料點消失。用2N HCl調pH 7，將反應液減壓濃縮，殘留物用2 mL飽和食鹽水稀釋，用2N HCl調pH 2，用乙酸乙酯萃取3次(5 mL× 3)。合併的乙酸乙酯層用無水硫酸鈉乾燥，過濾，濾液室溫下減壓濃縮，得945 mg (82%)標題化合物，為藍色固體。EI-MS (*m/z*) 1238 [M - H]⁻。

實施例 37 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將 618 mg(0.5 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉，69 mg (0.5

mmol) HOBt, 126 mg (0.6 mmol) DCC和20 mL無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液加由442 mg (0.5 mmol) HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl, 50 mg (0.5 mmol)N-甲基嗎啉及5 mL無水THF配製的溶液, 室溫反應24小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應混合物按常規處理, 得300 mg (31%)標題化合物, 為藍色固體。Mp 138 - 140 °C. $[\alpha]_D^{20} = -39.4$ (c = 0.13, MeOH). ESI-MS(m/z) 1991 [M + H]⁺. IR(KBr) 3309, 2936, 1656, 1531, 1449, 1363, 1256, 836, 743, 697, 601 cm⁻¹。

實施例 38 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N⁰-[Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala- Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將618 mg(0.5 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N⁰-[Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉, 69 mg (0.5 mmol) HOBt, 126 mg (0.6 mmol) DCC和20 mL無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液加由421 mg (0.5 mmol) HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl, 50 mg (0.5 mmol)N-甲基嗎啉及5 mL無水THF配製的溶液, 室溫反應24小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應混合物按常規處理, 得389 mg (36%)標題化合物, 為藍色固體。Mp 117 - 120 °C. $[\alpha]_D^{20} = -14.8$ (c = 0.01, MeOH). ESI-MS(m/z) 1913 [M + H]⁺. IR(KBr) 3312, 2937, 1655, 1530, 1448, 1362, 1257, 835, 744, 697, 592 cm⁻¹。

實施例 39製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N⁰-[Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala-

Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將 618 mg (0.5 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-[N^ω-[Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉, 69 mg (0.5 mmol) HOBt, 126 mg (0.6 mmol) DCC和20 ml無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液加由445 mg (0.5 mmol) HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl, 50 mg (0.5 mmol) N-甲基嗎啉及5 mL無水THF配製的溶液, 室溫反應24小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應混合物按常規處理, 得320 mg (36%)標題化合物, 為藍色固體。Mp 115 - 118 °C. $[\alpha]_D^{20} = -21.5$ (c = 0.16, MeOH). ESI-MS(m/z) 1961 [M + H]⁺. IR(KBr) 3316, 2936, 1654, 1529, 1448, 1362, 1256, 1169, 742, 698, 593 cm⁻¹。

實施例 40 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-[N^ω-(Ala-Arg-Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg-Gly-Asp-Ser]苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉 (Ia)

冰浴下將 199 mg (0.1 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-[N^ω-[Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉與6 mL 三氟乙酸和1.5 mL三氟甲磺酸混合, 攪拌1小時後TLC(CHCl₃:MeOH, 1:1)顯示原料點消失。反應化合物減壓濃縮, 殘留物用無水乙醚反覆洗滌, 減壓濃縮, 殘留物用水溶解, 用25%氨水調pH 8, 用Sephadex G10 除鹽, 用C18柱純化, 收集的餾分凍乾, 得109 mg (85%)標題化合物, 為藍色固體。Mp 134 - 135 °C. $[\alpha]_D^{20} = -39.7$ (c = 0.12, MeOH). FT-MS(m/z) 1374.7290 [M + H]⁺, 2748.4580 [2M + H]⁺, 4122.1870 [3M + H]⁺,

5495.9160 $[4M + H]^+$. $g = 2.00779$. IR(KBr) 3346, 3180, 2920, 1665, 1537, 1449, 1252, 1179, 1030, 837, 801, 720, 639, 518 cm^{-1} 。

實施例 41 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-[N^ω-(Ala-Arg-Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg- Gly-Asp-Val]苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉 (Ib)

冰浴下將 190 mg(0.1 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl} 苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉與 6 mL 三氟乙酸和 1.5 mL 三氟甲磺酸混合，攪拌 1 小時後TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1)顯示原料點消失。反應化合物減壓濃縮，殘留物用無水乙醚反覆洗滌，減壓濃縮，殘留物用水溶解，用 25% 氨水調 pH 8，用 Sephadex G10 除鹽，用 C18 柱純化，收集的餾分凍乾，得 96 mg (82%) 標題化合物，為藍色固體。Mp 143 - 144 °C. $[\alpha]_D^{20} = -31.8$ ($c = 0.01$, MeOH). FT-MS(m/z) 1386.7654 $[M + H]^+$, 2772.5308, $[2M + H]^+$, 4158.2962 $[3M + H]^+$, 5544.0616 $[4M + H]^+$. $g = 2.00779$. IR(KBr) 3349, 2942, 1659, 1539, 1394, 1250, 1030, 639 cm^{-1} 。

實施例 42 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-[N^ω-(Ala-Arg-Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg- Gly-Asp-Phe]苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉 (Ic)

冰浴下將 194 mg(0.1 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Ala-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl} 苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉與 6 mL 三氟乙酸和 1.5 mL 三氟甲磺酸混合，攪拌 1 小時後TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1)顯示原料點消失。反應化合物減壓濃縮，殘

留物用無水乙醚反覆洗滌，減壓濃縮，殘留物用水溶解，用25%氨水調pH 8，用Sephadex G10 除鹽，用C18柱純化，收集的餾分凍乾，得106 mg (81%)標題化合物，為藍色固體。Mp 96 – 97 °C. $[\alpha]_D^{20} = -44.4$ (c = 0.15, MeOH). FT-MS (m/z) ESI-MS (m/z) 1444.7654 $[M + H]^+$, ESI-MS(m/z) 2888.5308 $[2M + H]^+$, 4332.2962 $[3M + H]^+$, 5776.0616 $[4M + H]^+$. g = 2.00789. IR(KBr) 3363, 1665, 1538, 1448, 1256, 1173, 1031, 640, 577, 518 cm^{-1} 。

製備具溶血栓活性肽：適當保護的GRPAK (SEQ. ID NO. 5)

實施例 43製備Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl

冰浴下將438 mg(2.5 mmol) Boc-Gly, 338 mg(2.5 mmol)HOBt, 619 mg (3 mmol) DCC和10 mL無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液中加由1.785 g(2.3 mmol)HCl· Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl, 232 mg(2.3 mmol)N-甲基嗎啉與5 mL無水THF配製的溶液，反應24小時，得1.857 g (90%)標題化合物。Mp 85 - 87 °C. $[\alpha]_D^{20} = -38.5$ (c = 0.11, MeOH). ESI-MS (m/e) 920 $[M + Na]^+$ 。

實施例 44製備Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)

將907 mg(1 mmol) Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl溶於3 mL甲醇中，冰浴下加入NaOH水溶液(2N)，室溫下攪拌30 min，保持pH 12，冰浴下攪拌10 min, TLC顯示原料點消失。用2N HCl調pH 7，將反應液減壓濃縮，殘留物加2 mL飽和食鹽水稀釋，用2N HCl調pH 2，用乙酸乙酯萃取3次(5 mL × 3)，合併的乙酸乙酯層用無水硫酸鈉乾燥，室溫下減壓濃縮得785 mg

(82%)標題化合物,為無色固體. EI-MS (m/z) 816 $[M - H]^-$ 。

製備GRPAK (SEQ. ID NO. 5)/咪唑啉/RGD三元綴合物(通式I-1-2化合物)：

Id, Ie, If

實施例 45 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^o-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-OMe}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將817 mg (1 mmol) Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z), 135 mg (1 mmol)HOBt, 250 mg (1 mmol) DCC和10 mL無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液加由480 mg(1 mmol) 1,3-二氧基-2-[(4'-氧乙醯基-Lys-OMe)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉和100 mg (1 mmol) N-甲基嗎啉與5 mL無水THF配製的溶液, 室溫反應24小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 40:1)顯示原料點消失。反應化合物按常規處理, 得680 mg (52%)標題化合物, 為藍色固體。Mp 79 - 82 °C. $[\alpha]_D^{20} = -12.3$ ($c = 0.14$, MeOH), ESI-MS(m/z) 1261 $[M + Na]^+$ 。IR (KBr)

3319, 2935, 1658, 1531, 1448, 1363, 1254, 1168, 1053, 835, 749, 540 cm^{-1} 。

實施例 46 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^o-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將1260 mg (1 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^o-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-OMe}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉溶於3 mL 甲醇中, 加入NaOH水溶液(2N), 室溫下攪拌30 min。保持pH 12, 冰浴下攪拌10 min, TLC顯示原料點消失。用2N HCl調pH 7, 將反應液減壓濃縮, 殘留物用2 mL飽和食鹽水稀釋, 用2N HCl調pH 2, 用乙酸乙酯萃取3次(5 mL ×

3)。合併的乙酸乙酯層用無水硫酸鈉乾燥，過濾，濾液室溫下減壓濃縮，得 945 mg (82%)標題化合物，為藍色固體。EI-MS (m/z) 1223 $[M - H]^-$ 。

實施例 47 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將 611 mg (0.5 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉，69 mg (0.5 mmol) HOBt，126 mg (0.6 mmol) DCC和20 mL無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液加由 442 mg (0.5 mmol) HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl，50 mg (0.5 mmol) N-甲基嗎啉及5 mL無水THF配製的溶液，室溫反應24小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應混合物按常規處理，得500 mg (48%)標題化合物，為藍色固體。Mp 127 - 129 °C. $[\alpha]_D^{20} = -49.4$ ($c = 0.13$, MeOH). ESI-MS(m/z) 1956 $[M + H]^+$. IR(KBr) 3306, 2936, 1652, 1531, 1449, 1362, 1255, 1166, 742, 697, 592 cm^{-1} 。

實施例 48 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將 611 mg (0.5 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉，69 mg (0.5 mmol) HOBt，126 mg (0.6 mmol) DCC和20 mL無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液加由421 mg (0.5 mmol) HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl，

50 mg (0.5 mmol) N-甲基嗎啉及 5 mL 無水 THF 配製的溶液，室溫反應 24 小時。TLC (CHCl₃:MeOH, 20:1) 顯示原料點消失。反應混合物按常規處理，得 392 mg (35%) 標題化合物，為藍色固體。Mp 147 - 150 °C. $[\alpha]_D^{20} = -34.6$ (c = 0.16, MeOH). ESI-MS (m/z) 1899 [M + Na]⁺. IR (KBr) 3311, 3068, 2937, 1661, 1531, 1451, 1395, 1254, 1163, 839, 743, 697, 596 cm⁻¹。

實施例 49 製備 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-[N^ω-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl} 苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將 611 mg (0.5 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-[N^ω-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys} 苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉，69 mg (0.5 mmol) HOBt，126 mg (0.6 mmol) DCC 和 20 mL 無水 THF 的溶液攪拌 20 分鐘。向該溶液加由 445 mg (0.5 mmol) HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl，50 mg (0.5 mmol) N-甲基嗎啉及 5 mL 無水 THF 配製的溶液，室溫反應 24 小時。TLC (CHCl₃:MeOH, 20:1) 顯示原料點消失。反應混合物按常規處理，得 336 mg (31%) 標題化合物，為藍色固體。Mp 125 - 128 °C. $[\alpha]_D^{20} = -31.3$ (c = 0.18, MeOH). ESI-MS (m/z) 1925 [M + H]⁺. IR (KBr) 3315, 2935, 1657, 1529, 1448, 1361, 1257, 1173, 834, 742, 698, 541 cm⁻¹。

實施例 50 製備 1,3-二氧基-2-{4'-[N^ω-(Gly-Arg-Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg-Gly-Asp-Ser] 苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉 (Id)

冰浴下將 195 mg (0.1 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基

-{N^ω-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl} 苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉與6 mL三氟乙酸和1.5 mL三氟甲磺酸混合，攪拌1小時後TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1)顯示原料點消失。反應化合物減壓濃縮，殘留物用無水乙醚反覆洗滌，減壓濃縮，殘留物用水溶解，用25%氨水調pH 8，用Sephadex G10 除鹽，用C18柱純化，收集的餾分凍乾，得102 mg (82%)標題化合物，為藍色固體。Mp 142 - 145 °C. $[\alpha]_D^{20} = -29.7$ (c = 0.14, MeOH). FT-MS(m/z) 1360.7133 [M + H]⁺, 2720.4266 [2M + H]⁺, 4080.1399 [3M + H]⁺, 5439.8532 [4M + H]⁺. g = 2.00779. IR(KBr) 3348, 3180, 2940, 1670, 1539, 1447, 1199, 1134, 1034, 836, 801, 721, 638 cm⁻¹。

實施例 51 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-[N^ω-(Gly-Arg-Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg- Gly-Asp-Val]苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉 (Ie)

冰浴下將190 mg(0.1 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl} 苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉與6 mL 三氟乙酸和1.5 mL三氟甲磺酸混合，攪拌1小時後TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1)顯示原料點消失。反應化合物減壓濃縮，殘留物用無水乙醚反覆洗滌，減壓濃縮，殘留物用水溶解，用25%氨水調pH 8，用Sephadex G10 除鹽，用C18柱純化，收集的餾分凍乾，得99 mg (84%)標題化合物，為藍色固體。Mp 147 - 149 °C. $[\alpha]_D^{20} = -31.1$ (c = 0.17, MeOH). FT-MS(m/z) 1372.7497 [M + H]⁺, 2744.4994 [2M + H]⁺, 4116.2491 [3M + H]⁺, 5487.9988 [4M + H]⁺. g = 2.00779. IR(KBr) 3338, 2960, 1662, 1539, 1451, 1392, 1251, 1170, 1030, 639, 519 cm⁻¹。

實施例52 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-[N^ω-(Gly-Arg-Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg- Gly-Asp-Phe]苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉 (If)

冰浴下將 192 mg(0.1 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-[N^ω-[Boc-Gly-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉與6 mL 三氟乙酸和1.5 mL三氟甲磺酸混合,攪拌1小時後TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1)顯示原料點消失。反應化合物減壓濃縮,殘留物用無水乙醚反覆洗滌,減壓濃縮,殘留物用水溶解,用25%氨水調pH 8,用Sephadex G10 除鹽,用C18柱純化,收集的餾分凍乾,得106 mg (81%)標題化合物,為藍色固體。Mp 84 - 85 °C. $[\alpha]_D^{20} = -54.1$ (c = 0.15, MeOH). FT-MS (m/z) 1420.7497 [M + H]⁺, 2840.4994 [2M + H]⁺, ESI-MS FT-MS(m/z) 1420.7497 [M + H]⁺, 2840.4994 [2M + H]⁺, 4260.2491 [3M + H]⁺, 5679.9976 [4M + H]⁺. g = 2.00789. IR(KBr) 3344, 3080, 2930, 1666, 1535, 1392, 1250, 1181, 1030, 835, 800, 719, 638 cm⁻¹。

製備具溶血栓活性肽：適當保護的RPAK (SEQ. ID NO. 3)

實施例 53 製備Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)

將850 mg(1 mmol) Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl溶於3 mL甲醇中,冰浴下加入NaOH水溶液(2N),室溫攪拌30 min,保持PH 12,冰浴攪拌10 min, TLC顯示原料點消失。用2N HCl調pH 7,將反應液減壓濃縮,殘留物加2 mL飽和食鹽水稀釋,用2N HCl調pH 2,用乙酸乙酯萃取3次(5 mL × 3),合併的

乙酸乙酯層用無水硫酸鈉乾燥，過濾，濾液室溫下減壓濃縮得742 mg (92%)
標題化合物，為無色固體。EI-MS (m/z) 849 $[M - H]^-$ 。

製備RPAK (SEQ. ID NO. 3)/咪唑啉/RGD三元綴合物(通式I-1-3化合物)：Ig,

Ih, Ii

實施例 54 製備1,3-二氧基-2-{4'-[N^ω-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-OMe}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將760 mg (1 mmol) Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z), 135 mg (1 mmol)HOBt, 250 mg (1 mmol) DCC和10 mL無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液加由480 mg(1 mmol) 1,3-二氧基-2-[(4'-氧乙醯基-Lys-OMe)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉和100 mg (1 mmol) N-甲基嗎啉與5 mL無水THF配製的溶液，室溫反應24小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 40:1)顯示原料點消失。反應化合物按常規處理，得920 mg (83%)標題化合物，為藍色固體。Mp 72 - 76 °C. $[\alpha]_D^{20} = -32.7$ ($c = 0.13$, MeOH), ESI-MS(m/z) 1204 $[M + Na]^+$ 。IR (KBr) 3317, 2937, 1658, 1531, 1447, 1362, 1254, 1168, 1055, 835, 746, 697, 541, 460 cm^{-1} 。

實施例 55 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將1200 mg (1 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-OMe}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉溶於3 mL甲醇中，加

入NaOH水溶液(2N), 室溫下攪拌30 min。保持pH 12, 冰浴下攪拌10 min, TLC顯示原料點消失。用2N HCl調pH 7, 將反應液減壓濃縮, 殘留物用2 mL 飽和食鹽水稀釋, 用2N HCl調pH 2, 用乙酸乙酯萃取3次(5 mL × 3)。合併的乙酸乙酯層用無水硫酸鈉乾燥, 過濾, 濾液室溫下減壓濃縮, 得899 mg (80%)標題化合物, 為藍色固體。EI-MS (m/z) 1116 $[M - H]^-$ 。

實施例 56 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys- Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將 583 mg(0.5 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉, 69 mg (0.5 mmol) HOBt, 126 mg (0.6 mmol) DCC和20 mL無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液加由442 mg (0.5 mmol) HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl, 50 mg (0.5 mmol)N-甲基嗎啉及5 mL無水THF配製的溶液, 室溫反應24小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應混合物按常規處理, 得421 mg (40%)標題化合物, 為藍色固體。Mp 77 - 79 °C. $[\alpha]_D^{20} = -45.4$ ($c = 0.15$, MeOH). ESI-MS(m/z) 1897 $[M + H]^+$. IR(KBr) 3319, 2934, 1658, 1530, 1449, 1361, 1256, 834, 741, 698, 542 cm^{-1} 。

實施例 57 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]- Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將 583 mg (0.5 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^o-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys} 苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉, 69 mg (0.5 mmol) HOBt, 126 mg (0.6 mmol) DCC和20 mL無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液加由421 mg (0.5 mmol) HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl, 50 mg (0.5 mmol)N-甲基嗎啉及5 mL無水THF配製的溶液, 室溫反應24小時。TLC(CHCl₃: MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應混合物按常規處理, 得 472 mg (42%)標題化合物, 為藍色固體。Mp 107 - 109 °C. $[\alpha]_D^{20} = -28.8$ (c = 0.11, MeOH). ESI-MS(m/z) 1820 [M + H]⁺。IR(KBr) 3314, 2938, 1658, 1531, 1448, 1362, 1258, 742, 698, 594 cm⁻¹。

實施例 58 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^o-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl} 苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將583 mg(0.5 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^o-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys} 苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉, 69 mg (0.5 mmol) HOBt, 126 mg (0.6 mmol) DCC和20 mL無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液加由 445 mg (0.5 mmol) HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl, 50 mg (0.5 mmol)N-甲基嗎啉及5 mL無水THF配製的溶液, 室溫反應24小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應混合物按常規處理, 得420 mg (47%)標題化合物, 為藍色固體。Mp 141 - 144 °C. $[\alpha]_D^{20} = -35.7$ (c = 0.12, MeOH). ESI-MS(m/z) 1867 [M + H]⁺。IR(KBr) 3319, 2936, 1656, 1529, 1448, 1362, 1257, 1169, 834, 743, 698, 541 cm⁻¹。

實施例 59 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-[N^ω-(Arg-Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg-Gly-Asp-Ser]苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉 (Ig)

冰浴下將 170 mg (0.1 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl} 苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉與 6 mL 三氟乙酸和 1.5 mL 三氟甲磺酸混合，攪拌 1 小時後TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1)顯示原料點消失。反應化合物減壓濃縮，殘留物用無水乙醚反覆洗滌，減壓濃縮，殘留物用水溶解，用 25% 氨水調 pH 8，用 Sephadex G10 除鹽，用 C18 柱純化，收集的餾分凍乾，得 102 mg (82%) 標題化合物，為藍色固體。Mp 148 - 150 °C. $[\alpha]_D^{20} = -22.4$ (c = 0.14, MeOH). FT-MS(m/z) 1303.6919 [M + H]⁺, 2606.3838, [2M + H]⁺, 3909.0757 [3M + H]⁺, 5211.7676 [4M + H]⁺. g = 2.00779. IR(KBr) 3344, 3080, 2930, 1666, 1535, 1392, 1250, 1181, 1030, 835, 800, 719, 638。

實施例 60 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-[N^ω-(Arg-Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg-Gly-Asp-Val]苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉 (Ih)

冰浴下將 182 mg (0.1 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl} 苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉與 6 mL 三氟乙酸和 1.5 mL 三氟甲磺酸混合，攪拌 1 小時後TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1)顯示原料點消失。反應化合物減壓濃縮，殘留物用無水乙醚反覆洗滌，減壓濃縮，殘留物用水溶解，用 25% 氨水調 pH 8，用 Sephadex G10 除鹽，用 C18 柱純化，收集的餾分凍乾，得 99 mg (84%) 標題

化合物，為藍色固體。Mp 137 - 139 °C. $[\alpha]_D^{20} = -34.3$ (c = 0.18, MeOH).

FT-MS(m/z) ESI-MS(m/z) 1315.7282 $[M + H]^+$, 2630.4564 $[2M + H]^+$, 3945.1846 $[3M + H]^+$, 5259.9128 $[4M + H]^+$. g = 2.00779. IR(KBr) 3329, 2953, 1665, 1533, 1391, 1198, 1134, 834, 801, 720, 599 cm^{-1} 。

實施例61 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-[N^ω-(Arg-Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg-Gly-Asp-Phe]苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉 (Ii)

冰浴下將 187 mg(0.1 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Arg(NO₂)-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl} 苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉與6 mL 三氟乙酸和1.5 mL三氟甲磺酸混合，攪拌1小時後TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1)顯示原料點消失。反應化合物減壓濃縮，殘留物用無水乙醚反覆洗滌，減壓濃縮，殘留物用水溶解，用25%氨水調pH 8，用Sephadex G10 除鹽，用C18柱純化，收集的餾分凍乾，得96 mg (81%)標題化合物，為藍色固體。Mp 99 - 100 °C. $[\alpha]_D^{20} = -24.7$ (c = 0.14, MeOH).

FT-MS (m/z) 1363.7282 $[M + H]^+$, 2726.4564 $[2M + H]^+$, 4089.1846 $[3M + H]^+$, 5451.9128 $[4M + H]^+$. g = 2.00789. IR(KBr) 3322, 3060, 2928, 1661, 1530, 1391, 1303, 1247, 641 cm^{-1} 。

製備具溶血栓活性肽：適當保護的PAK

實施例 62 製備Boc-Pro-Ala-Lys(Z)

將638 mg (1 mmol) Boc-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl溶於3 mL甲醇中，冰浴下加入

NaOH水溶液(2N), 室溫下攪拌30 min。保持pH 12, 冰浴下攪拌10 min。TLC顯示原料點消失, 用2N HCl調pH 7。將反應液減壓濃縮, 殘留物用2 mL飽和食鹽水溶液稀釋, 用2N HCl調pH 2, 用乙酸乙酯萃取3次 (5 ml × 3), 合併的乙酸乙酯層用無水硫酸鈉乾燥, 過濾, 濾液室溫下減壓濃縮, 得509 mg (91.6%)標題化合物, 為無色固體。EI-MS (m/z) 547 $[M - H]^-$ 。

製備PAK/咪唑啉/RGD三元綴合物(通式I-1-4化合物) : Ij, Ik, Il

實施例 63 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N⁰-[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-OMe}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將548 mg (1 mmol) Boc-Pro-Ala-Lys(Z), 135 mg (1 mmol)HOBt, 250 mg (1 mmol) DCC和10 mL 無水THF的溶液攪拌20分鐘。向該溶液加由480 mg(1 mmol) 1,3-二氧基-2-[(4'-氧乙醯基-Lys-OMe)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉和100 mg (1 mmol) N-甲基嗎啉與5 mL無水THF配製的溶液, 室溫反應24小時。TLC(CHCl_3 :MeOH, 40:1)顯示原料點消失。反應化合物按常規處理, 得876 mg (87%)標題化合物, 為藍色固體。Mp 77 - 80 °C. $[\alpha]_D^{20} = -12.6$ (c = 0.16, MeOH). ESI-MS(m/z) 1003 $[M + Na]^+$ 。IR (KBr): 3315, 3069, 2937, 1671, 1531, 1449, 1394, 1364, 1302, 1167, 1132, 1054, 836, 743, 698, 596, 541, 458 cm^{-1} 。

實施例 64 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N⁰-[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將 980 mg (1 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-OMe}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉溶於 3 mL 甲醇中，加入 NaOH 水溶液(2N)，室溫下攪拌 30 min。保持 pH 12，冰浴下攪拌 10 min，TLC 顯示原料點消失。用 2N HCl 調 pH 7，將反應液減壓濃縮，殘留物用 2 mL 飽和食鹽水稀釋，用 2N HCl 調 pH 2，用乙酸乙酯萃取 3 次(5 mL × 3)。合併的乙酸乙酯層用無水硫酸鈉乾燥，過濾，濾液室溫下減壓濃縮，得 867 mg (80%) 標題化合物，為藍色固體。EI-MS (*m/z*) 965 [M - H]⁻。

實施例 65 製備 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將 483 mg (0.5 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉，69 mg (0.5 mmol) HOBt，126 mg (0.6 mmol) DCC 和 20 mL 無水 THF 的溶液攪拌 20 分鐘。向該溶液加由 442 mg (0.5 mmol) HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl，50 mg (0.5 mmol) N-甲基嗎啉及 5 mL 無水 THF 配製的溶液，室溫反應 24 小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1) 顯示原料點消失。反應混合物按常規處理，得 421 mg (42%) 標題化合物，為藍色固體。Mp 97 - 100 °C. $[\alpha]_D^{20} = -42.5$ (c = 0.14, MeOH). ESI-MS(*m/z*) 1697 [M + H]⁺. IR(KBr) 3298, 3070, 2935, 2869, 1642, 1534, 1450, 1369, 1253, 741, 697, 596 cm⁻¹。

實施例 66 製備 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將 483 mg (0.5 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉, 69 mg (0.5 mmol) HOBt, 126 mg (0.6 mmol) DCC 和 20 mL 無水 THF 的溶液攪拌 20 分鐘。向該溶液加由 432 mg (0.5 mmol) HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl, 50 mg (0.5 mmol) N-甲基嗎啉及 5 mL 無水 THF 配製的溶液, 室溫反應 24 小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應混合物按常規處理, 得 357 mg (37%) 標題化合物, 為藍色固體。Mp 117 - 120 °C. $[\alpha]_D^{20} = -22.3$ (c = 0.17, MeOH). ESI-MS(m/z) 1620 [M + H]⁺。IR(KBr) 3303, 3072, 2935, 1644, 1533, 1451, 1394, 1364, 1255, 1167, 745, 697, 597 cm⁻¹。

實施例 67 製備 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉

冰浴下將 483 mg (0.5 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys}苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉, 69 mg (0.5 mmol) HOBt, 126 mg (0.6 mmol) DCC 和 20 mL 無水 THF 的溶液攪拌 20 分鐘。向該溶液加由 439 mg (0.5 mmol) HCl·Arg(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl, 50 mg (0.5 mmol) N-甲基嗎啉及 5 mL 無水 THF 配製的溶液, 室溫反應 24 小時。TLC(CHCl₃:MeOH, 20:1)顯示原料點消失。反應混合物按常規處理, 得 472 mg (48%) 標題化合物, 為藍色固體。Mp 111 - 114 °C. $[\alpha]_D^{20} = -15.3$ (c = 0.13, MeOH). ESI-MS(m/z) 1667 [M + H]⁺。IR(KBr) 3296, 3071, 2935, 1641, 1534, 1394, 1253, 1170, 834, 745, 697, 594 cm⁻¹。

實施例 68 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-[N^ω-(Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg-Gly-Asp-Ser]苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉 (Ij)

冰浴下將 169 mg (0.1 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Ser(Bzl)-OBzl} 苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉與 6 mL 三氟乙酸和 1.5 mL 三氟甲磺酸混合，攪拌 1 小時後 TLC(CHCl₃:MeOH, 1:1)顯示原料點消失。反應化合物減壓濃縮，殘留物用無水乙醚反覆洗滌，減壓濃縮，殘留物用水溶解，用 25% 氨水調 pH 8，用 Sephadex G10 除鹽，用 C18 柱純化，收集的餾分凍乾，得 98 mg (80%) 標題化合物，為藍色固體。Mp 127 - 128 °C. $[\alpha]_D^{20} = -22.4$ (c = 0.13, MeOH). FT-MS(m/z) 1147.5907 [M + H]⁺, 2294.1814 [2M + H]⁺, 3440.7721 [3M + H]⁺, 4587.3628 [4M + H]⁺. g = 2.00779. IR(KBr) 3204, 1672, 1543, 1436, 1199, 1133, 837, 801, 722, 598 cm⁻¹。

實施例 69 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-[N^ω-(Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg-Gly-Asp-Val]苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉 (Ik)

冰浴下將 162 mg (0.1 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Val-OBzl} 苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉與 6 mL 三氟乙酸和 1.5 mL 三氟甲磺酸混合，攪拌 1 小時後 TLC(CHCl₃:MeOH, 1:1)顯示原料點消失。反應化合物減壓濃縮，殘留物用無水乙醚反覆洗滌，減壓濃縮，殘留物用水溶解，用 25% 氨水調 pH 8，用 Sephadex G10 除鹽，用 C18 柱純化，收集的餾分凍乾，得 96 mg (81%) 標題化合物，為藍色固體。Mp 123 - 124 °C. $[\alpha]_D^{20} = -24.6$ (c = 0.13, MeOH).

FT-MS(m/z) 1159.6271 $[M + H]^+$, 2318.2542 $[2M + H]^+$, 3476.8813 $[3M + H]^+$, 4635.5084 $[4M + H]^+$. $g = 2.00779$. IR(KBr) 3388, 2959, 1666, 1540, 1494, 1198, 1134, 835, 801, 720, 598 cm^{-1} 。

實施例 70 製備1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-[N^ω-(Pro-Ala-Lys)-Lys-Arg-Gly-Asp-Phe] 苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉 (II)

冰浴下將169 mg(0.1 mmol) 1,3-二氧基-2-{4'-氧乙醯基-{N^ω-[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-Lys-Arg-(NO₂)-Gly-Asp(OBzl)-Phe-OBzl} 苯基}-4,4,5,5-四甲基咪唑啉與6 mL 三氟乙酸和1.5 mL 三氟甲磺酸混合，攪拌1小時後TCL(CHCl₃:MeOH, 1:1)顯示原料點消失。反應化合物減壓濃縮，殘留物用無水乙醚反覆洗滌，減壓濃縮，殘留物用水溶解，用25%氨水調pH 8，用Sephadex G10 除鹽，用C18柱純化，收集的餾分凍乾，得96 mg (81%)標題化合物，為藍色固體。Mp 153 - 154 °C. $[\alpha]_D^{20} = -12.6$ ($c = 0.16$, MeOH).

FT-MS (m/z) 1207.6271 $[M + H]^+$, 2414.2542 $[2M + H]^+$, 3620.8813 $[3M + H]^+$, 4827.5084 $[4M + H]^+$. $g = 2.00789$. IR(KBr) 3385, 2938, 1659, 1541, 1450, 1391, 1251, 1126, 963, 841, 599, 456 cm^{-1} 。

試驗例1 本發明化合物Ia至II的NO自由基清除試驗

體重250-300g雄性Wistar大鼠，術前禁食12小時，自由飲水，頸椎脫位致死，迅速開胸摘取胸主動脈，剝離附著的結締組織，將血管剪成3-5 mm長的動脈環置於灌流浴槽內。浴槽盛有15 ml Krebs-Henseleit液，37 °C恒溫，通95%O₂-5%CO₂氣體，固定動脈環的掛鉤連接張力換能器，在二道記錄儀上描記血管舒縮曲線，紙速為1 mm/min。調整靜止張力為1.0g，平衡30 min後

給予終濃度為 10^{-8} M 去甲腎上腺素使動脈收縮以起預激作用。洗去去甲腎上腺素，平衡30 min，浴槽加終濃度為 10^{-8} M 去甲腎上腺素，待收縮張力持續穩定為水平水準後，浴槽加20 μ l生理鹽水(空白)或加20 μ l化合物**Ia-l**之一的生理鹽水溶液(終濃度為 5×10^{-6} M)，或加20 μ l NO自由基清除劑(1,3-二氧基-2-(4'-氧乙酸-苯基)-4,4,5,5-四甲基咪唑啉，TMMZ)的生理鹽水溶液(終濃度為 5×10^{-6} M)，待平穩後，加入20 μ l 乙醯膽鹼的生理鹽水溶液 (終濃度為 10^{-6} M)。藥物清除NO的能力以抑制乙醯膽鹼舒張血管條的百分比來表示。試驗結果見表1。

試驗結果表明，通過清除NO，**Ia-l**可抑制乙醯膽鹼的血管舒張作用。可見，通過Lys將溶栓肽ARPAK (SEQ. ID NO. 4), GRPAK (SEQ. ID NO. 5), RPAK (SEQ. ID NO. 3)或PAK和靶向肽RGDS (SEQ. ID NO. 11), RGDV(SEQ. ID NO. 12)或RGDF (SEQ. ID NO. 13)連接到自由基清除劑(1,3-二氧基-2-(4'-氧乙酸-苯基)-4,4,5,5-四甲基咪唑啉，TMMZ)上，有9個化合物抑制乙醯膽鹼舒張血管條的活性明顯比TMMZ強，有2個化合物抑制乙醯膽鹼舒張血管的活性與TMMZ沒有差異，有1個化合物抑制乙醯膽鹼舒張血管條的活性明顯比TMMZ弱。在評價的12種化合物中，抑制率超過30%有4個化合物。這4個化合物抑制乙醯膽鹼舒張血管條的活性順序是**Ie** > **Ih** > **Ib** > **If**。這就意味著通過Lys將溶栓肽ARPAK (SEQ. ID NO. 4), GRPAK (SEQ. ID NO. 5), RPAK (SEQ. ID NO. 3)或PAK和靶向肽RGDS (SEQ. ID NO. 11), RGDV (SEQ. ID NO. 12)或RGDF (SEQ. ID NO. 13)連接到自由基清除劑TMMZ上，整體上改善了TMMZ基清除NO自由基的活性。

表1 **Ia-l**對乙醯膽鹼舒張血管的百分抑制率

化合物	抑制率(Mean ± SD %)
TMMZ	15.47 ± 2.20
Ia	22.82 ± 3.27 ^a
Ib	35.32 ± 4.74 ^a
Ic	21.78 ± 3.11 ^a
Id	17.60 ± 2.75 ^b
Ie	41.28 ± 3.27 ^a
If	32.55 ± 2.55 ^a
Ig	24.40 ± 3.60 ^a
Ih	37.54 ± 1.84 ^a
Ii	13.75 ± 2.07 ^b
Ij	27.22 ± 2.68 ^a
Ik	11.13 ± 2.92 ^c
II	22.62 ± 3.60 ^a

n = 6; a) 與TMMZ比p<0.01; b) 與TMMZ比p > 0.05;
c) 與TMMZ比p<0.05.

試驗例2 本發明化合物**Ia**至**II**的溶解優球蛋白試驗

取豬血與3.8%枸橼酸鈉溶液按9:1的體積比混合，立即以3000 r/min速度離心10 min，分離出貧血小板血漿。向50 mL的離心管加2 mL貧血小板的豬血漿和36 mL超純水。每管加0.4 mL乙酸(1%)，充分混合，放入4 °C冰箱冷凍10 min，以3000 r/min速度離心10 min。倒置離心管，待液體流乾後用濾紙

吸乾管內壁。將離心所得的優球蛋白沉澱冷凍乾燥約40 min, 刮出。取約35 mg優球蛋白溶於7 mL硼砂緩衝液(pH 9.28)。1小時後優球蛋白基本溶解, 加入0.7 mL CaCl₂溶液(25 mM), 立刻將其平鋪於10 × 10 cm的玻璃板上, 厚約1 mm。凝固後, 用移液槍將10 μL生理鹽水或10 μL化合物**Ia-l**之一的生理鹽水溶液 (1 mM) 或10 μL尿激酶的生理鹽水溶液 (0.8 mg/mL) 滴加到凝固平板上, 每兩點之間的時間大於1.5 cm, 每個樣品點3次。4小時後量取溶圈的直徑, 讀數列入表2。

試驗結果表明, 通過Lys將溶栓肽ARPAK (SEQ. ID NO. 4), GRPAK (SEQ. ID NO. 5), RPAK (SEQ. ID NO. 3)或PAK和靶向肽RGDS (SEQ. ID NO. 11), RGDV (SEQ. ID NO. 12)或RGDF (SEQ. ID NO. 13)連接到自由基清除劑TMMZ上, 所有化合物顯示明確的優球蛋白溶解活性。

表2 **Ia-l**作用4 h的優球蛋白溶解直徑

化合物	直徑 (Mean ± SD mm)
生理鹽水	2.9 ± 0.6 ^a
尿激酶	10.7 ± 0.4 ^a
Ia	4.0 ± 0.0
Ib	5.2 ± 0.3
Ic	3.8 ± 0.3
Id	5.2 ± 0.3
Ie	5.5 ± 0.3
If	4.5 ± 0.5

Ig	5.2 ± 0.3
Ih	4.2 ± 0.3
Ii	4.0 ± 0.0
Ij	4.0 ± 0.0
Ik	4.5 ± 0.5
Il	4.2 ± 0.3

n=3; a) 與**Ia-l**比p < 0.01.

試驗例3 本發明化合物Ia**至**Il**的體外溶栓試驗**

SD 大鼠(雄性, 350 - 400 g) 按1200 mg/kg劑量腹腔注射烏拉坦(Urethane)溶液進行麻醉。麻醉大鼠仰臥位固定, 分離右頸總動脈, 於近心端夾動脈夾, 近心端和遠心端分別穿入手術線, 將遠心端的手術線於皮毛用止血鉗夾緊, 在遠心端插管, 鬆開動脈夾, 放出全部動脈血, 裝在50 ml事先矽油化的容器中。往垂直固定的玻璃管(長20 mm, 內徑4 mm, 外徑5 mm, 管底用膠塞密封) 中注入0.8 ml大鼠動脈血液, 往管內迅速插入一支不銹鋼質料的血栓固定螺栓。該血栓固定螺旋用直徑為0.2 mm 的不銹鋼絲繞成, 螺旋部分長18 mm, 含15個螺圈, 螺圈的直徑為1.8 mm, 托柄與螺旋相連, 長7.0 mm, 呈問號型。血液凝固40 min後, 打開玻璃管底部的膠塞, 用鑷子固定血栓固定螺旋的托柄, 從玻璃管中小心地取出被血栓包裹的血栓固定螺旋。將其懸浮浸泡於三蒸水中, 以除去表面的浮血。1 h後取出, 精確稱重。將血栓懸浮浸泡在8 mL生理鹽水中或化合物**Ia-l**之一的生理鹽水溶液(濃度為100 nM) 中或ARPAK (SEQ. ID NO. 4), 或GRPAK (SEQ. ID NO. 5),

或RPAK (SEQ. ID NO. 3),或 PAK的生理鹽水溶液(濃度為100 nM) 中或尿激酶的生理鹽水溶液(100 IU/mL)中, 於37 °C恒溫搖床中振搖 (63 r/min), 2 h後取出, 精確稱量栓重。求出血栓在給藥前後的品質差,結果列入表3。

試驗結果表明, 通過Lys將溶栓肽ARPAK (SEQ. ID NO. 4), GRPAK (SEQ. ID NO. 5), RPAK (SEQ. ID NO. 3)或PAK和靶向肽RGDS (SEQ. ID NO. 11), RGDV (SEQ. ID NO. 12)或RGDF (SEQ. ID NO. 13)連接到自由基清除劑TMMZ上, 所有化合物顯示明確的體外溶栓活性。由於**Ia-c**的活性與ARPAK (SEQ. ID NO. 4)的活性相當, **Id-f**的活性與GRPAK (SEQ. ID NO. 5)的活性相當, **Ig-i**的活性與RPAK (SEQ. ID NO. 3) 的活性相當, **Ij-l**的活性與PAK的活性相當, 所以一方面**Ia-l**的體外溶栓活性應當歸咎於溶栓肽的活性, 另一方面通過Lys將溶栓肽ARPAK (SEQ. ID NO. 4), GRPAK (SEQ. ID NO. 5), RPAK (SEQ. ID NO. 3)或PAK和靶向肽RGDS (SEQ. ID NO. 11), RGDV (SEQ. ID NO. 12)或RGDF (SEQ. ID NO. 13)連接到自由基清除劑TMMZ上不會降低對應的溶栓肽的活性。

表3 **Ia-l**作用2h的體外溶栓活性

化合物	血栓減重(Mean ± SD mg)
生理鹽水	16.67 ± 1.86 ^a
尿激酶	58.33 ± 4.08 ^a
ARPAK (SEQ. ID NO. 4)	26.35 ± 3.10
Ia	28.50 ± 2.59
Ib	28.17 ± 2.31

Ic	27.33 ± 2.07
GRPAK (SEQ. ID NO. 5)	15.47 ± 2.61
Id	14.17 ± 3.55
Ie	14.00 ± 1.41
If	15.29 ± 3.36
RPAK (SEQ. ID NO. 3)	26.01 ± 3.11
Ig	27.83 ± 2.56
Ih	29.33 ± 3.01
Ii	24.83 ± 1.17
PAK	26.67 ± 3.20
Ij	26.16 ± 3.15
Ik	25.00 ± 1.54
II	25.83 ± 2.31

n = 6; a) 與**Ia-I**比p < 0.01.

試驗例4 本發明化合物**Ia**至**II**的體內溶栓試驗

SD 大鼠(雄性, 220-230 g) 按1200 mg/kg劑量腹腔注射烏拉坦(Urethane)溶液進行麻醉。麻醉大鼠仰臥位固定, 分離右頸總動脈, 於近心端夾動脈夾, 近心端和遠心端分別穿入手術線, 將遠心端的手術線於皮毛用止血鉗夾緊, 在遠心端插管, 鬆開動脈夾, 放出約1ml動脈血, 裝在1ml子彈頭中。往垂直固定的玻璃管(長15 mm, 內徑2.5 mm, 外徑5.0 mm, 管底用膠塞密封) 中注入0.1 ml大鼠動脈血液, 往管內迅速插入一支不銹鋼質料的血栓固定螺栓。該血栓固定螺旋用直徑為0.2 mm 的不銹鋼絲繞成,螺旋部

分長12 mm, 含15 個螺圈, 螺圈的直徑為1.0 mm, 托柄與螺旋相連, 長7.0 mm, 呈問號型。血液凝固15 min 後, 打開玻璃管底部的膠塞, 用鑷子固定血栓固定螺旋的托柄, 從玻璃管中小心地取出被血栓包裹的血栓固定螺旋, 精確稱重。

旁路插管由3 段構成。中段為聚乙烯膠管, 長60.0 mm, 內徑3.5 mm。兩端為相同的聚乙烯管, 管長100.0 mm, 內徑1.0 mm, 外徑2.0 mm 該管的一端拉成尖管以便插入大鼠頸動脈或靜脈, 外徑為1.0 mm, 另一端的外部套一段長7.0 mm, 外徑為3.5 mm 的聚乙烯管(加粗, 用於插入中段的聚乙烯膠管內) 3段管的內壁均矽烷化(1%的矽油乙醚溶液)。將血栓包裹的血栓固定螺旋放入中段聚乙烯膠管內, 膠管的兩端分別與兩根聚乙烯的加粗端相套。用注射器通過尖管端將管中注滿肝素生理鹽水溶液(50 IU/kg), 備用。繼續分離麻醉大鼠的氣管, 並做氣管插管。分離大鼠的左頸外靜脈, 近心端和遠心端分別穿入手術線, 在暴露的左頸外靜脈上小心地剪一斜口, 將上面製備好的旁路管道的尖管由斜口插入左頸外靜脈開口的近心端, 同時遠離旁路管中段(含精確稱重的血栓固定螺旋)內血栓固定螺旋的托柄。用注射器通過另一端的尖管推入準確量的肝素生理鹽水(50 IU/kg), 此時注射器不要撤離聚乙烯管, 用止血鉗夾住注射器與聚乙烯管之間的軟管。在右頸總動脈的近心端用動脈夾止血, 在離動脈夾不遠處將右頸總動脈小心地剪一斜口。從聚乙烯管的尖部拔出注射器, 將聚乙烯管的尖部插入動脈斜口的近心端。旁路管道的兩端都用4號手術縫線與動靜脈固定。

用頭皮針將生理鹽水(3 mL/kg), 或尿激酶的生理鹽水溶液(劑量為20000 IU/kg) 或化合物Ia-1之一的生理鹽水溶液(劑量為0.1 μ mol/kg)或

ARPAK (SEQ. ID NO. 4), 或GRPAK (SEQ. ID NO. 5), 或RPAK (SEQ. ID NO. 3),或 PAK的生理鹽水溶液(劑量為1 $\mu\text{mol/kg}$)通過旁路管的中段(含精確稱重的血栓固定螺旋), 刺入遠離血栓固定螺旋的近靜脈處, 打開動脈夾, 使血流通過旁路管道從動脈流向靜脈, 此即大鼠動靜脈旁路溶栓模型, 緩慢將注射器中的液體注入到血液中, 使生理鹽水(空白對照), 尿激酶(陽性對照)或或ARPAK (SEQ. ID NO. 4), 或GRPAK (SEQ. ID NO. 5), 或RPAK (SEQ. ID NO. 3),或 PAK (組分對照) 或**Ia-l** 通過血液迴圈, 按靜脈—心臟—動脈的順序作用到血栓上。從開始注射時計時, 1 h 後從旁路管道中取出血栓固定螺旋, 精確稱重。求每隻大鼠旁路管道中血栓固定螺旋給藥前後的品質差, 試驗結果見表4。

試驗結果表明, 通過Lys將溶栓肽ARPAK (SEQ. ID NO. 4), GRPAK (SEQ. ID NO. 5), RPAK (SEQ. ID NO. 3)或PAK和靶向肽RGDS (SEQ. ID NO. 11), RGDV (SEQ. ID NO. 12)或RGDF (SEQ. ID NO. 13)連接到自由基清除劑TMMZ上得到的化合物**Ia-c**在0.1 $\mu\text{mol/kg}$ 劑量下不僅都有確切的溶栓活性, 而且活性強度與對應的溶栓肽ARPAK (SEQ. ID NO. 4), GRPAK (SEQ. ID NO. 5), RPAK (SEQ. ID NO. 3)或PAK在1 $\mu\text{mol/kg}$ 劑量下的溶栓活性強度相當。可見, 通過Lys將溶栓肽ARPAK (SEQ. ID NO. 4), GRPAK (SEQ. ID NO. 5), RPAK (SEQ. ID NO. 3)或PAK和靶向肽RGDS (SEQ. ID NO. 11), RGDV (SEQ. ID NO. 12)或RGDF (SEQ. ID NO. 13)連接到自由基清除劑TMMZ上可使有效劑量降低10倍。

表4 **Ia-l**的體內溶栓活性

化合物	血栓減重 (Mean $\pm$ SD mg)
生理鹽水	11.05 $\pm$ 1.51 ^a
尿激酶	18.02 $\pm$ 2.32 ^a
ARPAK (SEQ. ID NO. 4)	15.20 $\pm$ 2.55
Ia	15.39 $\pm$ 3.19
Ib	14.35 $\pm$ 2.95
Ic	15.79 $\pm$ 3.07
GRPAK (SEQ. ID NO. 5)	15.47 $\pm$ 2.61
Id	14.17 $\pm$ 3.55
Ie	14.00 $\pm$ 1.41
If	15.29 $\pm$ 3.36
RPAK (SEQ. ID NO. 3)	15.67 $\pm$ 2.61
Ig	16.35 $\pm$ 2.42
Ih	15.37 $\pm$ 1.82
Ii	15.73 $\pm$ 2.95
PAK	15.00 $\pm$ 2.61
Ij	14.89 $\pm$ 1.84
Ik	15.47 $\pm$ 2.61
II	16.21 $\pm$ 2.84

n = 10; a) 與**Ia-I**比p < 0.01.

試驗例5 本發明化合物**Ia**至**II**的體內抗栓試驗

將SD 大鼠(雄性, 220-230 g) 隨機分組, 每組11隻, 靜息飼養一天, 停

止餵養過夜。大鼠經灌胃給予生理鹽水 (劑量為3 mL/kg), 或化合物**Ia-l**之一的生理鹽水溶液(劑量為0.1 μmol/kg), 或靶向肽RGDS (SEQ. ID NO. 11), RGDV (SEQ. ID NO. 12)或RGDF (SEQ. ID NO. 13)的生理鹽水溶液(劑量為10 μmol/kg), 或阿司匹林(劑量為33 mg/kg)。30分鐘後, 大鼠用20%烏拉坦(Urethane)溶液麻醉後分離右頸動脈和左頸靜脈。將插管充滿肝素鈉的生理鹽水溶液後, 一端插入左側靜脈, 另一端用注射器加入定量肝素鈉抗凝後, 然後插入右側動脈。血流從右側動脈流經聚乙烯管流入左側靜脈, 15分鐘後取出附有血栓的絲線並記錄重量, 總重量減去絲線重量即為血栓濕重。試驗結果見表5。

試驗結果表明, 通過Lys將溶栓肽ARPAK (SEQ. ID NO. 4), GRPAK(SEQ. ID NO. 5), RPAK (SEQ. ID NO. 3)或PAK和靶向肽RGDS (SEQ. ID NO. 11), RGDV (SEQ. ID NO. 12)或RGDF (SEQ. ID NO. 13)連接到自由基清除劑TMMZ上得到的化合物**Ia-c**在0.1 μmol/kg口服劑量下不僅都有確切的抗栓活性, 而且活性強度與對應的靶向肽RGDS (SEQ. ID NO. 11), RGDV (SEQ. ID NO. 12)或RGDF (SEQ. ID NO. 13)在10 μmol/kg劑量下的抗栓活性強度相當。可見, 通過Lys將溶栓肽ARPAK (SEQ. ID NO. 4), GRPAK (SEQ. ID NO. 5), RPAK (SEQ. ID NO. 3)或PAK和靶向肽RGDS (SEQ. ID NO. 11), RGDV (SEQ. ID NO. 12)或RGDF (SEQ. ID NO. 13)連接到自由基清除劑TMMZ上可使有效劑量降低100倍。

表5 **Ia-l**的體內抗栓活性

化合物	血栓濕重(Mean ± SD mg)
-----	--------------------

生理鹽水	27.38 ± 2.62 ^a
阿司匹林	12.85 ± 2.49 ^a
RGDS (SEQ. ID NO. 11)	20.02 ± 2.35
RGDV (SEQ. ID NO. 12)	21.26 ± 2.07
RGDF (SEQ. ID NO. 13)	19.55 ± 2.21
Ia	24.32 ± 2.10
Ib	20.14 ± 2.45
Ic	20.50 ± 2.26
Id	19.46 ± 1.84
Ie	16.92 ± 1.53
If	17.99 ± 2.47
Ig	17.89 ± 2.05
Ih	18.24 ± 1.89
Ii	17.79 ± 2.02
Ij	19.45 ± 1.79
Ik	22.25 ± 2.25
Il	19.32 ± 2.56

n=11; a)與**Ia-l**比p < 0.01.

建立評價本發明化合物對中風患者的確切療效的動物模型

- (1) 這裡描述的大鼠實驗方案符合日內瓦動物試驗指南並經學校倫理委員會認可。體重為280-305 g的清潔級健康雄性SD大鼠，購自維通利華實驗動物中心。這些大鼠隨機用於製備血栓或製造中風模型;

- (2) SD大鼠腹腔注射10%水合氯醛溶液，劑量為400 mg/kg體重，使麻醉。分離頸動脈，取新鮮動脈血15 mL，按每10 μ L為一份置於1.5 mL的EP管裡，形成的血栓先室溫放置2小時，再-20 $^{\circ}$ C冰箱中放置22小時。使用時加0.5 mL生理鹽水，用玻璃棒搗碎，製成大小均勻的血栓塊的生理鹽水懸浮液，每個血栓塊的體積大約為0.1 mm^3 。
- (3) SD大鼠腹腔注射10%水合氯醛溶液，劑量為400 mg/kg體重，使麻醉。分離頸動脈，取新鮮動脈血15 mL，按每10 μ L為一份置於1.5 mL的EP管裡，形成的血栓先室溫放置24小時。使用時加0.5 mL生理鹽水，用玻璃棒搗碎，製成大小均勻的血栓塊的生理鹽水懸浮液，每個血栓塊的體積大約為0.1 mm^3 。
- (4) 雄性SD大鼠腹腔注射10%水合氯醛溶液，劑量為400 mg/kg體重，使麻醉。於頸部正中縱行切口，分離出右側頸總動脈主幹(約3 cm長)。於舌骨水平分離結紮頸外動脈各分支，於頸膨大處分離出頸內動脈。用無創動脈夾分別夾閉頸內動脈開口處和頸總動脈近心端，並結紮頸外動脈遠端。於頸外動脈主幹處插入裝有0.5 mL血栓塊生理鹽水懸浮液的導管，在鬆開頸內動脈夾的同時，將導管內的0.5 mL血栓塊生理鹽水懸浮液緩慢從頸外動脈向近心端經過頸內動脈注入大腦中動脈。之後，結紮頸外動脈近心端，打開頸內動脈和頸總動脈處的動脈夾，恢復血流，分離大頸外靜脈，把生理鹽水(空白對照)或者本發明化合物的生理鹽水溶液從頸外靜脈輸入。縫合傷口，並肌肉注射2萬IU的青黴素，預防感染。這是中風立即治療模型。
- (5) 雄性SD大鼠腹腔注射10%水合氯醛溶液，劑量為400 mg/kg體

重，使麻醉。於頸部正中縱行切口，分離出右側頸總動脈主幹(約3 cm長)。於舌骨水平分離結紮頸外動脈各分支，於頸膨大處分離出頸內動脈。用無創動脈夾分別夾閉頸內動脈開口處和頸總動脈近心端，並結紮頸外動脈遠端。於頸外動脈主幹處插入裝有0.5 mL血栓塊生理鹽水懸浮液的導管，在鬆開頸內動脈夾的同時，將導管內的0.5 mL血栓塊生理鹽水懸浮液緩慢從頸外動脈向近心端經過頸內動脈注入大腦中動脈。之後，結紮頸外動脈近心端，打開頸內動脈和頸總動脈處的動脈夾，恢復血流，縫合傷口。並肌肉注射2萬IU的青黴素，預防感染。4小時、6小時或者24小時之後把生理鹽水(空白對照)或者本發明化合物的生理鹽水溶液從尾靜脈輸入。這是中風4小時、6小時和24小時大鼠的治療模型。

建立評價本發明化合物對中風4小時、6小時和24小時的確切療效的動物模型

- (1) 大鼠中風立即接受本發明化合物治療、大鼠中風4小時之後接受本發明化合物治療、大鼠中風6小時之後接受本發明化合物治療的療效是指，大鼠大甦甦醒24小時後觀察行為。行為包括行走方式、右眼眼皮下垂程度、尾巴僵直程度、肌肉張力、腦袋偏斜程度、四肢支撐力和死亡狀況。
- (2) 大鼠中風24小時之後接受本發明化合物治療的療效是指，治療24小時後觀察大鼠行為。行為包括行走方式、右眼眼皮下垂程度、尾巴僵直程度、肌肉張力、腦袋偏斜程度、四肢支撐力和死亡狀況。
- (3) 一次性接受本發明化合物治療的中風大鼠的療效與一次性接受

生理鹽水治療的中風大鼠進行比較。

- (4) 連續接受治療的中風大鼠每隔24小時從尾靜脈輸入本發明化合物的生理鹽水一次，於翌日錄影，自身進行比較。

本發明化合物Ia至II在上述動物模型的試驗結果如下：

試驗例6 大鼠中風後立即接受本發明化合物Ia至II治療的試驗

本發明化合物的體內抗中風活性用神經功能評分表示，評分越低活性越強。SD雄性大鼠(250-300 g)用10%水合氯醛(400 mg/kg)腹腔注射麻醉，從頸部正中略偏右部豎直開約2 cm長切口，沿胸鎖乳突肌內側緣分離出右頸總動脈、頸外動脈和頸內動脈。用無創動脈夾分別夾閉頸內動脈開口處和頸總動脈近心端，在頸外動脈剪一小口，結紮頸外動脈遠心端，鬆開頸總動脈近心端的動脈夾，取10 μ L血，取血之後再用無創動脈夾夾閉頸總動脈近心端。將取得的10 μ L血裝入1 mL EP管中，先在常溫下放置30分鐘使血液凝固，然後轉移至-20 $^{\circ}$ C冰箱中放置1小時，使血凝塊結實。1小時後取出血液凝塊，加入1 mL生理鹽水用鋼鏟把血液凝塊搗成比較均一的細小血栓，然後把細小血栓混懸液轉移至1 mL注射器內備用。鬆開大鼠頸內動脈夾的同時，將1 mL注射器內的血栓混懸液緩慢從大鼠頸外動脈向近心端經過頸內動脈注入大鼠的大腦，然後結紮頸外動脈近心端，打開頸內動脈和頸總動脈處得動脈夾，恢復血流。分離大鼠頸總靜脈，或立即結紮靜脈，傷口處滴加3滴青黴素，縫合傷口，等待動物甦醒，為假手術組，或注入尿激酶的生理鹽水溶液（陽性對照組，劑量為20000 IU/kg），或注入生理鹽水（空白對照

組，劑量為3 ml/kg)，或注入TMMZ的生理鹽水溶液（組分對照組，劑量為1 $\mu\text{mol/kg}$ ），或注入溶栓肽ARPAK (SEQ. ID NO. 4), GRPAK (SEQ. ID NO. 5), RPAK (SEQ. ID NO. 3)或PAK 的生理鹽水溶液（組分對照，劑量為1 $\mu\text{mol/kg}$ ），或注入化合物**Ia-l**之一的生理鹽水溶液(劑量為0.1 $\mu\text{mol/kg}$)。大鼠甦醒24小時後按Zealonga 方法評定神經功能缺損程度。0分表示無任何神經功能缺失體證，1分表示未損傷側前肢不能伸展，2分表示向未損傷側行走，3分表示向未損傷側轉圈成追尾狀行走，4分表示意識障礙無自主行走，5分表示死亡。試驗結果見表6。

試驗結果表明，通過Lys將溶栓肽ARPAK (SEQ. ID NO. 4), GRPAK (SEQ. ID NO. 5), RPAK (SEQ. ID NO. 3)或PAK和靶向肽RGDS (SEQ. ID NO. 11), RGDV (SEQ. ID NO. 12)或RGDF (SEQ. ID NO. 13)連接到自由基清除劑TMMZ上得到的化合物**Ia-c**在0.1 $\mu\text{mol/kg}$ 劑量下都有確切的抗中風活性。而在20000 IU/kg劑量下尿激酶沒有顯示確切的抗中風活性。同樣，在1 $\mu\text{mol/kg}$ 劑量下溶栓肽ARPAK (SEQ. ID NO. 4), GRPAK (SEQ. ID NO. 5), RPAK (SEQ. ID NO. 3)或PAK也沒有顯示確切的抗中風活性。可見，通過Lys將溶栓肽ARPAK (SEQ. ID NO. 4), GRPAK (SEQ. ID NO. 5), RPAK (SEQ. ID NO. 3)或PAK和靶向肽RGDS (SEQ. ID NO. 11), RGDV (SEQ. ID NO. 12)或RGDF (SEQ. ID NO. 13)連接到自由基清除劑TMMZ上可使化合物具有抗中風作用。其中在1 $\mu\text{mol/kg}$ 劑量下有4種化合物的抗中風活性與20000 IU/kg劑量下的尿激酶的抗中風活性相當，有8種化合物的抗中風活性明顯強於20000 IU/kg劑量下的尿激酶的抗中風活性。

表6 **Ia-c**的體內抗中風活性

化合物	神經功能評分 (Mean $\pm$ SD)
生理鹽水	3.07 $\pm$ 1.04
尿激酶	1.90 $\pm$ 1.37 ^a
TMMZ	2.83 $\pm$ 0.75 ^a
ARPAK (SEQ. ID NO. 4)	2.21 $\pm$ 0.94 ^a
Ia	1.00 $\pm$ 1.01 ^b
Ib	0.56 $\pm$ 1.01 ^c
Ic	0.89 $\pm$ 1.36 ^c
GRPAK (SEQ. ID NO. 5)	2.38 $\pm$ 0.92 ^a
Id	1.22 $\pm$ 1.32 ^b
Ie	0.44 $\pm$ 1.01 ^c
If	0.60 $\pm$ 0.84 ^c
RPAK (SEQ. ID NO. 3)	2.38 $\pm$ 0.97 ^a
Ig	1.00 $\pm$ 1.19 ^b
Ih	1.33 $\pm$ 1.22 ^b
Ii	0.87 $\pm$ 1.05 ^c
PAK	2.42 $\pm$ 0.95 ^a
Ij	0.90 $\pm$ 1.10 ^c
Ik	0.56 $\pm$ 0.53 ^c
Il	0.50 $\pm$ 0.53 ^c

n = 10; a) 與生理鹽水比 p > 0.05; b) 與尿激酶比p > 0.05,

與生理鹽水比 p < 0.01; c) 與生理鹽水及尿激酶比p < 0.01.

試驗例7 大鼠中風後立即接受本發明化合物Ia至II治療的腦梗塞壞死體積試驗

試驗例6的大鼠甦醒24小時評定神經功能缺損程度後，用烏拉坦(Urethane)麻醉後迅速斷頭取腦，將腦組織置於-20 °C冰箱2小時後，從前額極開始行約2 mm冠狀連續切片，共6片，然後置於2%TTC溶液中37 °C避光孵育30 min，並觀察腦切片的顏色變化，正常腦組織被TTC染成紅色，而缺血腦組織即梗死腦組織呈白色。然後用數位相機照相，經SPSS統計軟體處理，計算冠狀切片中梗死腦組織體積和正常腦組織體積。試驗結果見表7。試驗結果表明，通過Lys將溶栓肽ARPAK (SEQ. ID NO. 4), GRPAK (SEQ. ID NO. 5), RPAK (SEQ. ID NO. 3)或PAK和靶向肽RGDS (SEQ. ID NO. 11), RGDV (SEQ. ID NO. 12)或RGDF (SEQ. ID NO. 13)連接到自由基清除劑TMMZ上得到的化合物Ia-c在0.1 μmol/kg劑量下不僅都可有效地減小中風大鼠的腦梗塞壞死體積，而且這種作用明顯強於在20000 IU/kg劑量下尿激酶的作用。

表7 Ia-c治療的中風大鼠的腦梗塞壞死體積

化合物	梗死體積比(Mean ± SD%)
生理鹽水	22.92 ± 2.74
尿激酶	11.00 ± 2.42 ^b
TMMZ	22.96 ± 2.43 ^a
ARPAK (SEQ. ID NO. 4)	22.00 ± 2.20 ^a

Ia	7.21 ± 0.82
Ib	7.13 ± 0.83
Ic	7.40 ± 1.65
GRPAK (SEQ. ID NO. 5)	21.77 ± 2.46 ^a
Id	8.21 ± 1.91
Ie	6.44 ± 1.51
If	7.47 ± 1.31
RPAK (SEQ. ID NO. 3)	22.11 ± 2.25 ^a
Ig	6.40 ± 0.28
Ih	7.35 ± 1.14
Ii	7.06 ± 1.08
PAK	22.07 ± 2.40 ^a
Ij	6.84 ± 0.82
Ik	7.86 ± 1.02
Il	6.56 ± 0.41

n = 10; a) 與生理鹽水相比p > 0.05;

b) 與生理鹽水及**Ia-l** 比p<0.01.

試驗例8 大鼠中風後立即接受不同劑量本發明化合物Ie**治療的試驗**

為了說明化合物**Ia**至**Il**在上述試驗中體現的治療作用具有劑量依賴關係，本發明在分析、比較和綜合所有試驗結果的基礎上選擇化合物**Ie**作代表，進行量效關係試驗。應當強調的是，因為在試驗例1-7中**Ia**至**Il**的其它化合物與**Ie**達到類似的NO自由基清除、溶解優球蛋白、溶血栓、抗血栓以及治療中風大鼠等效果，所以**Ia**至**Il**的其它化合物應與**Ie**一樣可以獲得劑量依

賴的治療作用。

SD雄性大鼠(250-300 g)用10%水合氯醛(400 mg/kg)腹腔注射麻醉，從頸部正中略偏右部豎直開約2 cm長切口，沿胸鎖乳突肌內側緣分離出右頸總動脈、頸外動脈和頸內動脈。用無創動脈夾分別夾閉頸內動脈開口處和頸總動脈近心端，在頸外動脈剪一小口，結紮頸外動脈遠心端，鬆開頸總動脈近心端的動脈夾，取10 μ l血，取血之後再用無創動脈夾夾閉頸總動脈近心端。將取得的10 μ l血裝入1 mL EP管中，先在常溫下放置30分鐘使血液凝固，然後轉移至-20 $^{\circ}$ C冰箱中放置1小時，使血凝塊結實。1小時後取出血液凝塊，加入1 mL生理鹽水用鋼鏟把血液凝塊搗成比較均一的細小血栓，然後把細小血栓混懸液轉移至1 mL注射器內備用。鬆開大鼠頸內動脈夾的同時，將1 mL注射器內的血栓混懸液緩慢從大鼠頸外動脈向近心端經過頸內動脈注入大鼠的大腦，然後結紮頸外動脈近心端，打開頸內動脈和頸總動脈處得動脈夾，恢復血流，注入尿激酶的生理鹽水溶液（陽性對照組，劑量為20000 IU/kg），或注入tPA的生理鹽水溶液（陽性對照組，劑量為3 mg/kg），或注入生理鹽水（空白對照組，劑量為3 mL/kg），或注入化合物**Ie**的生理鹽水溶液（劑量為1 μ mol/kg, 0.1 μ mol/kg, 0.1 μ mol/kg）。大鼠甦醒24小時後按Zealanga 方法評定神經功能缺損程度。0分表示無任何神經功能缺失體證，1分表示未損傷側前肢不能伸展，2分表示向未損傷側行走，3分表示向未損傷側轉圈或追尾狀行走，4分表示意識障礙無自主行走，5分表示死亡。試驗結果見表8。結果表明，大鼠中風之後立即接受1 μ mol/kg, 0.1 μ mol/kg和0.01 μ mol/kg化合物**Ie**治療，神經功能評分為0的大鼠的百分數分別為60%，30%和0%；神經功能評分為1的大鼠的百分數分別為20%，30% 和10%。可見，化

化合物**Ie**的抗中風活性顯示劑量依賴性。此外，與20000 IU/kg尿激酶和3 mg/kg tPA治療的中風大鼠的神經功能評分為0的大鼠的百分數分別為10%和40%以及神經功能評分為1的大鼠的百分數分別為50%和10%相比，1 μ mol/kg和0.1 μ mol/kg化合物**Ie**的療效明顯優秀。

表8 不同劑量下本發明化合物**Ie**的體內抗中風活性

化合物		每天神經功能評分 (Mean $\pm$ SD)及得分的大鼠數目					
		0分	1 分	2分	3分	4分	5分
生理鹽水		0隻	2隻	3隻	5隻	1隻	0隻
尿激酶		1隻	5隻	0隻	3隻	1隻	0隻
tPA		4隻	1隻	1隻	3隻	1隻	0隻
Ie	1 μ mol/kg	6隻	2隻	0隻	2隻	0隻	0隻
	100 nmol/kg	3隻	3隻	0隻	3隻	1隻	0隻
	10 nmol/kg	0隻	1隻	6隻	1隻	1隻	0隻

n = 10; a) 與生理鹽水比 p<0.01.

試驗例9 大鼠中風4小時後接受1 μ mol/kg本發明化合物**Ie**連續治療6次的試驗

療效用神經功能評分表示，評分越低療效越好。雄性SD大鼠腹腔注射10%水合氯醛溶液，劑量為400 mg/kg體重，使麻醉。於頸部正中縱行切口，分離出右側頸總動脈主幹(約3 cm長)。於舌骨水準分離結紮頸外動脈各分支，於頸膨大處分離出頸內動脈。用無創動脈夾分別夾閉頸內動脈開口處

和頸總動脈近心端，並結紮頸外動脈遠端。於頸外動脈主幹處插入裝有0.5 mL血栓塊生理鹽水懸浮液的導管，在鬆開頸內動脈夾的同時，將導管內的0.5 mL血栓塊生理鹽水懸浮液緩慢從頸外動脈向近心端經過頸內動脈注入大腦中動脈。之後，結紮頸外動脈近心端，打開頸內動脈和頸總動脈處的動脈夾，恢復血流，縫合傷口。並肌肉注射2萬IU的青黴素，預防感染。4小時之後把化合物**Ie**(劑量為1 $\mu\text{mol/kg}$, $n = 11$)的生理鹽水溶液，或尿激酶(劑量為20000 IU/kg, $n = 6$)的生理鹽水溶液，或tPA(劑量為3 mg/kg, $n = 6$)的生理鹽水溶液從尾靜脈輸入。每天從大鼠尾靜脈輸1次化合物**Ie**的生理鹽水溶液，連續輸6天，觀察7天，每天自身對照，按Zealanga 方法評定神經功能缺損程度。或每天從大鼠尾靜脈輸1次尿激酶的生理鹽水溶液，連續輸2天，每天自身對照，按Zealanga 方法評定神經功能缺損程度。或每天從大鼠尾靜脈輸1次tPA的生理鹽水溶液，連續輸2天，每天自身對照，按Zealanga 方法評定神經功能缺損程度。0分表示無任何神經功能缺失體證，1分表示未損傷側前肢不能伸展，2分表示向未損傷側行走，3分表示向未損傷側轉圈或追尾狀行走，4分表示意識障礙無自主行走，5分表示死亡。試驗結果見表9-1, 9-2 和 9-3。

表9-1的資料說明，大鼠中風 4小時之後每天接受1次劑量為1 $\mu\text{mol/kg}$ 的化合物**Ie**治療，連續治療6 次，除1隻於第二天意外死亡，其餘10隻大鼠有8隻好轉為無任何神經功能缺失體證，有兩隻殘留輕微的神經功能缺失體證。可見，在1 $\mu\text{mol/kg}$ 劑量下，化合物**Ie**對超出黃金期的中風有確切的治療作用。

表 9-1 大鼠中風4小時後接受1 $\mu\text{mol/kg}$ 本發明化合物**Ie**治療的療效

評分時間	每天神經功能評分 (Mean ± SD)及得分的大鼠數目					
	0分	1 分	2分	3分	4分	5分
第一天	1隻	4隻	4隻	1隻	1隻	0隻
第二天	3隻	5隻	1隻	1隻	0隻	1隻
第三天	5隻	5隻	0隻	0隻	0隻	0隻
第四天	7隻	3隻	0隻	0隻	0隻	0隻
第五天	8隻	2隻	0隻	0隻	0隻	0隻
第六天	8隻	2隻	0隻	0隻	0隻	0隻
第七天	8隻	2隻	0隻	0隻	0隻	0隻

表9-2的資料說明，大鼠中風 4小時之後每天接受1次劑量為20000 IU/kg的尿激酶治療，6隻大鼠有2隻於48小時內死亡。對死亡大鼠進行了屍體解剖，發現它們的臟器都有出血現象，尤其是肺出血嚴重。於是，在給藥2次之後終止給藥。2次給藥沒有大鼠好轉為無任何神經功能缺失體證或殘留輕微的神經功能缺失體證。

表 9-2 大鼠中風4小時後接受20000 IU/kg尿激酶治療的療效

評分時間	每天神經功能評分 (Mean ± SD)及得分的大鼠數目					
	0分	1 分	2分	3分	4分	5分
第一天			2隻	3隻		1隻
第二天			3隻	1隻		1隻

表9-3的資料說明，大鼠中風 4小時之後每天接受1次劑量為3mg/kg的tPA治療，6隻大鼠有1隻於24小時內死亡。對死亡大鼠進行了屍體解剖，發現它們的臟器都有出血現象，尤其是肺出血嚴重。於是，在給藥2次之後終止給藥。2次給藥沒有大鼠好轉為無任何神經功能缺失體證，有2隻好轉為殘留輕微的神經功能缺失體證。

表 9-3 大鼠中風4小時後接受3 mg/kg tPA治療的療效

評分時間	每天神經功能評分 (Mean ± SD)及得分的大鼠數目					
	0分	1 分	2分	3分	4分	5分
第一天			2隻	3隻		1隻
第二天		2隻	2隻	1隻		

綜合表9-1, 9-2和 9-3的資料可以看出，對於中風4小時的大鼠即使連續治療兩天，劑量為1 μmol/kg的化合物Ie也明顯比劑量為20000 IU/kg的尿激酶和劑量為3mg/kg的tPA優秀。

試驗例10 大鼠中風6小時後接受1 μmol/kg本發明化合物Ie連續治療6次的試驗

療效用神經功能評分表示，評分越低療效越好。雄性SD大鼠腹腔注射10%水合氯醛溶液，劑量為400 mg/kg體重，使麻醉。於頸部正中縱行切口，分離出右側頸總動脈主幹(約3 cm長)。於舌骨水準分離結紮頸外動脈各分支，於頸膨大處分離出頸內動脈。用無創動脈夾分別夾閉頸內動脈開口處

和頸總動脈近心端，並結紮頸外動脈遠端。於頸外動脈主幹處插入裝有0.5 mL血栓塊生理鹽水懸浮液的導管，在鬆開頸內動脈夾的同時，將導管內的0.5 mL血栓塊生理鹽水懸浮液緩慢從頸外動脈向近心端經過頸內動脈注入大腦中動脈。之後，結紮頸外動脈近心端，打開頸內動脈和頸總動脈處的動脈夾，恢復血流，縫合傷口。並肌肉注射2萬IU的青黴素，預防感染。6小時之後把化合物 **Ie**(劑量為1 $\mu\text{mol/kg}$, $n=11$)的生理鹽水溶液，或尿激酶(劑量為20000 IU/kg, $n=6$)的生理鹽水溶液，或tPA(劑量為3 mg/kg, $n=6$)的生理鹽水溶液從尾靜脈輸入。每天從大鼠尾靜脈輸1次化合物**Ie**的生理鹽水溶液，連續輸6天，觀察7天，每天自身對照,按Zealanga方法評定神經功能缺損程度。或每天從大鼠尾靜脈輸1次尿激酶的生理鹽水溶液，連續輸2天，每天自身對照,按Zealanga 方法評定神經功能缺損程度。或每天從大鼠尾靜脈輸1次tPA的生理鹽水溶液，連續輸2天，每天自身對照，按Zealanga 方法評定神經功能缺損程度。0分表示無任何神經功能缺失體證，1分表示未損傷側前肢不能伸展，2分表示向未損傷側行走，3分表示向未損傷側轉圈成追尾狀行走，4分表示意識障礙無自主行走，5分表示死亡。試驗結果見表10-1, 10-2和10-3。

表10-1的資料說明，大鼠中風 6小時之後每天接受1次劑量為1 $\mu\text{mol/kg}$ 的化合物**Ie**治療，連續治療6次，除2隻於第二天意外死亡，其餘9隻大鼠有2隻好轉為無任何神經功能缺失體證，有1隻殘留輕微的神經功能缺失體證，有6隻殘留未損傷側轉圈成追尾狀行走體證。可見，在1 $\mu\text{mol/kg}$ 劑量下，化合物**Ie**對超出黃金期的中風確實有治療作用。

表 10-1 大鼠中風6小時後接受1 μmol/kg本發明化合物Ie治療的療效

評分時間	每天神經功能評分 (Mean ± SD)及得分的大鼠數目					
	0分	1 分	2分	3分	4分	5分
第一天	0隻	3隻	5隻	2隻	1隻	0隻
第二天	0隻	2隻	2隻	4隻	1隻	2隻
第三天	0隻	2隻	4隻	2隻	1隻	0隻
第四天	1隻	1隻	2隻	4隻	0隻	0隻
第五天	1隻	1隻	2隻	4隻	0隻	0隻
第六天	2隻	1隻	1隻	4隻	1隻	0隻
第七天	2隻	1隻	0隻	6隻	0隻	0隻

表10-2的資料說明，大鼠中風 6小時之後每天接受1次劑量為20000 IU/kg的尿激酶治療，6隻大鼠有4隻於24小時內死亡。對死亡大鼠進行了屍體解剖，發現它們的臟器都有出血現象，尤其是肺出血嚴重。於是，在給藥2次之後終止給藥。2次給藥有1隻大鼠好轉為無任何神經功能缺失體證，有1隻大鼠殘留意識障礙無自主行走體證。

表 10-2 大鼠中風6小時後接受20000 IU/kg尿激酶治療的療效

評分時間	每天神經功能評分 (Mean ± SD)及得分的大鼠數					
	0分	1 分	2分	3分	4分	5分
第一天		1隻			1隻	4隻
第二天	1隻				1隻	

表10-3的資料說明，大鼠中風 6小時之後每天接受1次劑量為3mg/kg的tPA治療，6隻大鼠有2隻於24小時內死亡。對死亡大鼠進行了屍體解剖，發現它們的臟器都有出血現象，尤其是肺出血嚴重。於是，在給藥2次之後終止給藥。2次給藥沒有大鼠好轉為無任何神經功能缺失體證，有2隻殘留輕微的神經功能缺失體證，有1隻殘留未損傷側轉圈或追尾狀行走體證，有1隻殘留意識障礙無自主行走體證。

表 10-3 大鼠中風6小時後接受3 mg/kg tPA治療的療效

評分時間	每天神經功能評分 (Mean ± SD)及得分的大鼠數					
	0分	1 分	2分	3分	4分	5分
第一天		1隻	1隻	1隻	1隻	2隻
第二天		2隻		1隻	1隻	

綜合表10-1，10-2和 10-3的資料可以看出，對於中風6小時的大鼠即使連續治療兩天，劑量為1 μmol/kg的化合物Ie也明顯比劑量為20000 IU/kg的尿激酶和劑量為3mg/kg的tPA優秀。

試驗例11 大鼠中風6小時後首次5 μmol/kg 之後5次2 μmol/kg 本發明化合物Ie治療的試驗

療效用神經功能評分表示，評分越低療效越好。雄性SD大鼠腹腔注射10%水合氯醛溶液，劑量為400 mg/kg體重，使麻醉。於頸部正中縱行切口，分離出右側頸總動脈主幹(約3 cm長)。於舌骨水準分離結紮頸外動脈各分

支，於頸膨大處分離出頸內動脈。用無創動脈夾分別夾閉頸內動脈開口處和頸總動脈近心端，並結紮頸外動脈遠端。於頸外動脈主幹處插入裝有0.5 mL血栓塊生理鹽水懸浮液的導管，在鬆開頸內動脈夾的同時，將導管內的0.5 mL血栓塊生理鹽水懸浮液緩慢從頸外動脈向近心端經過頸內動脈注入大腦中動脈。之後，結紮頸外動脈近心端，打開頸內動脈和頸總動脈處的動脈夾，恢復血流，縫合傷口。並肌肉注射2萬IU的青黴素，預防感染。6小時之後把化合物 **Ie** (首次劑量為5 $\mu\text{mol/kg}$, n=12)的生理鹽水溶液從尾靜脈輸入。之後，每天從大鼠尾靜脈輸1次化合物**Ie**的生理鹽水溶液(劑量為2 $\mu\text{mol/kg}$, n=12)，連續輸6天，觀察7天，每天自身對照,按Zealanga方法評定神經功能缺損程度。0分表示無任何神經功能缺失體證, 1分表示未損傷側前肢不能伸展, 2分表示向未損傷側行走, 3分表示向未損傷側轉圈成追尾狀行走, 4分表示意識障礙無自主行走, 5分表示死亡。試驗結果見表11。

表11的資料說明，大鼠中風 6小時之後第一天接受1次劑量為5 $\mu\text{mol/kg}$ 的化合物**Ie**治療，之後5天每天接受1次劑量為2 $\mu\text{mol/kg}$ 的化合物**Ie**治療可以獲得確切療效。除2隻死亡外，接受治療的12隻大鼠中餘下的10隻大鼠有6隻好轉為好轉為無任何神經功能缺失體證，有2隻殘留輕微的神經功能缺失體證，有1隻殘留向未損傷側行走體證，有1隻殘留未損傷側轉圈成追尾狀行走體證。可見，化合物**Ie**連續治療對於對超出黃金期的中風確實有效。

表 11 大鼠中風6小時後接受本發明化合物**Ie**治療的療效

大鼠編號	每天神經功能評分 (Mean $\pm$ SD)
------	--------------------------

	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天
1	1	1	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0	0
3	3	1	5				
4	2	1	1	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
6	2	2	1	0	0	0	0
7	5						
8	2	1	1	1	1	1	1
9	0	0	0	0	0	0	0
10	4	3	3	2	2	2	2
11	3	3	3	2	1	1	1
12	1	1	4	3	3	3	3

試驗例12 大鼠中風24小時後首次5 μmol/kg 之後5次2 μmol/kg 本發明化合物Ie治療的試驗

療效用神經功能評分表示，評分越低療效越好。雄性SD大鼠腹腔注射10%水合氯醛溶液，劑量為400 mg/kg體重，使麻醉。於頸部正中縱行切口，分離出右側頸總動脈主幹(約3 cm長)。於舌骨水準分離結紮頸外動脈各分支，於頸膨大處分離出頸內動脈。用無創動脈夾分別夾閉頸內動脈開口處和頸總動脈近心端，並結紮頸外動脈遠端。於頸外動脈主幹處插入裝有0.5 mL血栓塊生理鹽水懸浮液的導管，在鬆開頸內動脈夾的同時，將導管內的



0.5 mL血栓塊生理鹽水懸浮液緩慢從頸外動脈向近心端經過頸內動脈注入大腦中動脈。之後，結紮頸外動脈近心端，打開頸內動脈和頸總動脈處的動脈夾，恢復血流，縫合傷口。並肌肉注射2萬IU的青黴素，預防感染。24小時之後把化合物 **Ie** (首次劑量為5 $\mu\text{mol/kg}$, $n=12$)的生理鹽水溶液從尾靜脈輸入。之後，每天從大鼠尾靜脈輸1次化合物**Ie**的生理鹽水溶液(劑量為2 $\mu\text{mol/kg}$)，連續輸6天，觀察7天，每天自身對照,按Zealanga方法評定神經功能缺損程度。0分表示無任何神經功能缺失體證, 1分表示未損傷側前肢不能伸展, 2分表示向未損傷側行走, 3分表示向未損傷側轉圈成追尾狀行走, 4分表示意識障礙無自主行走, 5分表示死亡。試驗結果見表12。

表12的資料說明，大鼠中風 24小時之後第一天接受1次劑量為5 $\mu\text{mol/kg}$ 的化合物**Ie**治療，之後5天每天接受1次劑量為2 $\mu\text{mol/kg}$ 的化合物**Ie**治療可以獲得確切療效。除3隻死亡外，接受治療的12隻大鼠中餘下的9隻大鼠有8隻好轉為好轉為無任何神經功能缺失體證，有1隻殘留輕微的神經功能缺失體證。可見，化合物**Ie**連續治療對於對超出黃金期的中風確實有效。

表 12 大鼠中風24小時後接受本發明化合物**Ie**治療的療效

大鼠編號	每天神經功能評分 (Mean $\pm$ SD)						
	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天
1	3	2	2	1	0	0	0
2	3	2	1	1	1	0	0
3	2	1	1	0	0	0	0

4	3	2	2	1	1	0	0
5	5						
6	2	1	1	1	1	0	0
7	3	3	3	2	1	1	1
8	3	4	2	1	1	0	0
9	5						
10	3	3	1	1	1	1	1
11	5	0	0	0	0	0	0
12	2	1	1	1	0	0	0

試驗例13 大鼠中風6小時後 6次2 μmol/kg 本發明化合物Ie治療的試驗

療效用神經功能評分表示，評分越低療效越好。雄性SD大鼠腹腔注射10%水合氯醛溶液，劑量為400 mg/kg體重，使麻醉。於頸部正中縱行切口，分離出右側頸總動脈主幹(約3 cm長)。於舌骨水準分離結紮頸外動脈各分支，於頸膨大處分離出頸內動脈。用無創動脈夾分別夾閉頸內動脈開口處和頸總動脈近心端，並結紮頸外動脈遠端。於頸外動脈主幹處插入裝有0.5 mL血栓塊生理鹽水懸浮液的導管，在鬆開頸內動脈夾的同時，將導管內的0.5 mL血栓塊生理鹽水懸浮液緩慢從頸外動脈向近心端經過頸內動脈注入大腦中動脈。與前面的試驗例不同，本試驗例使用的血栓塊不是用-24 °C保存的血栓製備的血栓塊的生理鹽水懸浮液，而是用室溫放置24小時的更加陳舊的血栓製備的明顯硬的血栓塊的生理鹽水懸浮液。之後，結紮頸外動脈近心端，打開頸內動脈和頸總動脈處的動脈夾，恢復血流，縫合傷口。並肌肉注射2萬IU的青黴素，預防感染。24小時之後把化合物 Ie (首次劑量

為5 $\mu\text{mol/kg}$, $n=12$)的生理鹽水溶液從尾靜脈輸入。之後，每天從大鼠尾靜脈輸1次化合物**Ie**的生理鹽水溶液(劑量為2 $\mu\text{mol/kg}$)，連續輸6天，觀察7天，每天自身對照,按Zealonga方法評定神經功能缺損程度。0分表示無任何神經功能缺失體證，1分表示未損傷側前肢不能伸展，2分表示向未損傷側行走，3分表示向未損傷側轉圈成追尾狀行走，4分表示意識障礙無自主行走，5分表示死亡。試驗結果見表13。

表13的資料說明，在陳舊血栓誘導的大鼠中風6小時之後的模型上，每天給於1次劑量為2 $\mu\text{mol/kg}$ 的化合物**Ie**治療，連續6次可以獲得確切療效。除6隻死亡外，接受治療的12隻大鼠中餘下的6隻大鼠有1隻好轉為好轉為無任何神經功能缺失體證，有5隻殘留輕微的神經功能缺失體證。可見，化合物**Ie**連續治療對於陳舊性中風確實有效。

表 13 大鼠中風6小時後接受2 $\mu\text{mol/kg}$ 本發明化合物**Ie**治療的療效

大鼠編號	每天神經功能評分 (Mean $\pm$ SD)						
	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天
1	4	3	2	1	1	1	1
2	3	2	1	1	0	0	0
3	3	3	3	3	1	1	1
4	3	3	1	1	1	1	1
5	5						
6	3	3	1	1	1	1	1

7	5						
8	3	3	1	1	1	1	1
9	5						
10	5						
11	5						
12	3	5					

應當強調的是，因為在試驗例1-7中**Ia**至**II**的其它化合物與**Ie**達到類似的NO
自由基清除、溶解優球蛋白、溶血栓、抗血栓以及治療中風大鼠等效果，
所以**Ia**至**II**的其它化合物應與**Ie**一樣可以獲得對於陳舊性中風的治療作用。

試驗例14 本發明化合物**Ia**至**II**在 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 和 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 濃度下的奈米結構試驗

將本發明化合物**Ia**至**II**用三蒸水分別配成 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ ， $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 和 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 的溶液，吸取10 μL 滴於銅網表面，銅網下面襯濾紙，自然晾乾，在透射電子顯微鏡透射電鏡(JEOL, JEM- 1230)下觀察並用照片記錄形態及粒徑。

- 1. 供試化合物：本發明化合物**Ia**至**II**。
- 2. 試驗方法：將供試化合物（**Ia**-**II**）用三蒸水分別配成 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ ， $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 和 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 的溶液，吸取微量(約10 μl)滴於銅網表面，銅網下面襯濾紙，自然晾乾，在透射電子顯微鏡透射電鏡(JEOL, JEM-1230)下觀察形態及粒徑，並用照片記錄。

3. 試驗結果試驗結果見圖25-36。圖25為本發明化合物**Ia**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構，水溶液中**Ia**的奈米結構是直徑為3.1 nm至86.1 nm的奈米球；圖26為本發明化合物**Ib**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構，水溶液中**Ib**的奈米結構是直徑為4.3 nm至297.9 nm的奈米球；圖27為本發明化合物**Ic**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構，水溶液中**Ic**的奈米結構分別是直徑為2.2 nm至165.7 nm的奈米球；圖28為本發明化合物**Id**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構，水溶液中**Id**的奈米結構是直徑為16.2 nm至201.2 nm的奈米球；圖29為本發明化合物**Ie**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構，水溶液中**Ie**的奈米結構是直徑為3.3 nm至138.9 nm的奈米球；圖30為本發明化合物**If**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構，水溶液中**If**的奈米結構是直徑為3.6 nm至82.4 nm的奈米球；圖31為本發明化合物**Ig**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構，水溶液中**Ig**的奈米結構是直徑為6.3 nm至264.5 nm的奈米球；圖32為本發明化合物**Ih**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構，水溶液中**Ih**的奈米結構是直徑為5.1 nm至149.8 nm的奈米球；圖33為本發明化合物**Ii**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構，水溶液中**Ii**的奈米結構是直徑為4.7 nm至107.7 nm的奈米球；圖34為本發明化合物**Ij**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構，水溶液中**Ij**的奈米結構是直徑為9.1 nm至73.7 nm的奈米球；圖35為本發明化

合物**Ik**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構，水溶液中**Ik**的奈米結構是直徑為10.1 nm至66.7 nm的奈米球；圖36為本發明化合物**II**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M水溶液中的奈米結構，水溶液中**II**的奈米結構是直徑為6.1 nm至153.3 nm的奈米球。

試驗例15 本發明化合物**Ia**至**II**在 1×10^{-6} M, 1×10^{-9} M和 1×10^{-12} M濃度下的高分辨FT- MS試驗

將化合物**Ia-l**用三蒸水分別配成12.5 μ M的溶液，吸取10 μ L進樣，在solarix FT-ICR 質譜 (Bruker Daltonik)上觀察分子間締合狀態，並記錄資料。結果列入表14-16。

表 14本發明化合物**Ia-l**在三種濃度下形成的二聚體的高分辨FT-MS資料

化合物	濃度		
	1×10^{-6} M/二聚體	1×10^{-9} M/二聚體	1×10^{-12} M/二聚體
Ia	2748.4580	2748.4580	2748.4580
Ib	2772.5308	2772.5308	2772.5308
Ic	2888.5308	2888.5308	2888.5308
Id	2720.4266	2720.4266	2720.4266
Ie	2744.4994	2744.4994	2744.4994
If	2840.4994	2840.4994	2840.4994
Ig	2606.3838	2606.3838	2606.3838
Ih	2630.4564	2630.4564	2630.4564

Ii	2726.4564	2726.4564	2726.4564
Ij	2294.1814	2294.1814	2294.1814
Ik	2318.2542	2318.2542	2318.2542
Il	2414.2542	2414.2542	2414.2542

表 15本發明化合物**Ia-l**在三種濃度下形成的三聚體的高分辨FT-MS資料

化合物	濃度		
	1×10^{-6} M/三聚體	1×10^{-9} M/三聚體	1×10^{-12} M/三聚體
Ia	4122.1870	4122.1870	4122.1870
Ib	4158.2962	4158.2962	4158.2962
Ic	4332.2962	4332.2962	4332.2962
Id	4080.1399	4080.1399	4080.1399
Ie	4116.2491	4116.2491	4116.2491
If	4260.2491	4260.2491	4260.2491
Ig	3909.0757	3909.0757	3909.0757
Ih	3945.1846	3945.1846	3945.1846
Ii	4089.1846	4089.1846	4089.1846
Ij	3440.7721	3440.7721	3440.7721
Ik	3476.8813	3476.8813	3476.8813
Il	3620.8813	3620.8813	3620.8813

表 16本發明化合物**Ia-l**在三種濃度下形成的四聚體的高分辨FT-MS資料

化合物	濃度
-----	----

	1×10^{-6} M/四聚體	1×10^{-9} M/四聚體	1×10^{-12} M/四聚體
Ia	5495.9160	5495.9160	5495.9160
Ib	5544.0616	5544.0616	5544.0616
Ic	5776.0616	5776.0616	5776.0616
Id	5439.8532	5439.8532	5439.8532
Ie	5487.9988	5487.9988	5487.9988
If	5679.9976	5679.9976	5679.9976
Ig	5211.7676	5211.7676	5211.7676
Ih	5259.9128	5259.9128	5259.9128
Ii	5451.9128	5451.9128	5451.9128
Ij	4587.3628	4587.3628	4587.3628
Ik	4635.5084	4635.5084	4635.5084
Il	4827.5084	4827.5084	4827.5084

表14-16是使用FT高分辨質譜儀測定的精確質數。這些品質數說明，本發明化合物**Ia-l**在 1×10^{-6} M、 1×10^{-9} 和 1×10^{-12} M三種濃度下同時測定到二聚體、三聚體和四聚體。可見，本發明化合物在水溶液中可以同時形成二聚體、三聚體和四聚體。

試驗例16 本發明化合物Ie**在10.0 μM, 1.0 μM, 0.1 μM, 0.01 μM濃度下的高分辨FT-MS試驗**

為了將質譜視覺化將化合物**Ie**用三蒸水分別配成10.0 μM, 1.0 μM, 0.1 μM, 0.01 μM的溶液，吸取10 μL進樣，在solarix FT-ICR 質譜 (Bruker

Daltonik)上觀察分子間締合狀態，並記錄圖譜。結果如圖37-40所示。圖37為本發明化合物Ie在0.01 μM 濃度下的高分辨FT- MS質譜圖：915.84146為二聚體的三電荷離子，1030.32114三聚電荷離子1099.00914為四聚體的五電荷離子；圖38為本發明化合物Ie在0.1 μM 濃度下的高分辨FT-MS質譜圖：915.84146為二聚體的三電荷離子，1030.32114三聚電荷離子1099.00914為四聚體的五電荷離子；圖39為本發明化合物Ie在1 μM 濃度下的高分辨FT- MS質譜圖：915.84146為二聚體的三電荷離子，1030.32114三聚電荷離子1099.00914為四聚體的五電荷離子；圖40為本發明化合物Ie在10 μM 濃度下的高分辨FT- MS質譜圖：915.84146為二聚體的三電荷離子，1030.32114三聚電荷離子1099.00914為四聚體的五電荷離子。

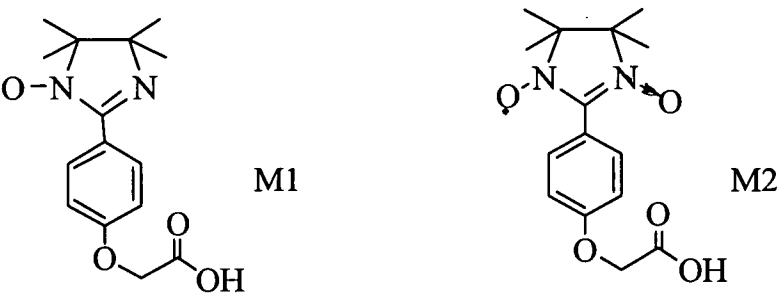
本發明化合物在水溶液中形成的二聚體、三聚體和四聚體進一步組裝便形成直徑為2 nm至300 nm的奈米球。在這些尺寸的奈米球中，直徑小於100 nm的奈米球數量超過99%。奈米藥學的一個公知的事實是，直徑小於100 nm的奈米球在血液在輸送不易被巨噬細胞吞噬，容易跨過毛細血管壁。這些性能使得本發明的化合物可跨過血腦屏障。正是本發明的化合物可跨過血腦屏障的性能，使得在接受治療的中風大鼠的腦組織中可檢測到本發明的化合物的代謝產物。

試驗例17 高分辨FT- MS監測本發明化合物Ie治療的大鼠腦組織中的代謝產物試驗

取大鼠整個大腦，放置於50 mL離心管中，加入10 mL 0.9% NaCl溶液，勻漿得到均一的混懸物，然後於3000 rpm的條件下離心10 min；取上清液5

mL，再加入10 mL 甲醇，振盪混勻後，於3000 rpm的條件下離心10 min，取上清液並減壓濃縮蒸乾。再加入1 mL甲醇，再次於12000 rpm的條件下離心10 min所得上清液用於監測化合物在Ie治療的大鼠腦組織中的代謝產物含量。

高分辨FT- MS的測試結果顯示腦中有兩個代謝產物M1和M2。其中M1的[M+1]⁺為291.06971，分子式為C₁₅H₁₉O₅N₂；M2的[M+1]⁺為307.04350，分子式為C₁₅H₁₉O₄N₂（質譜條件：進樣量為10 μL；電離模式為ES⁺；錐孔電壓為30 V；流動相流速為0.2 mL/min）。根據這些資料，我們推斷代謝產物M1和M2應為以下化合物：



	M1	M2
理論分子量：	291.1345	307.1249
測得分子量：	291.0697	307.0435

這說明了本發明化合物Ie確實通過了血腦屏障，可以達成在腦內清除NO自由基、溶血栓和抗血栓的療效。

【符號說明】

無

【 補充序列表 】

<110> 上海晟順生物科技有限公司

<120> 同時具溶血栓、清除自由基和血栓靶向功能的新穎化合物及其製備
方法和用途

<140> 102107648

<141> 2013-03-05

<150> CN20121032848.9、CN20121032951.3、CN20121032850.6、

CN20121032849.3

<151> 2012-09-05

<160> 35

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 1

Lys Arg Gly Asp Val

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 2

Lys Arg Gly Asp Phe

1 5

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 3
Arg Pro Ala Lys
1

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 4
Ala Arg Pro Ala Lys
1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 5

Gly Arg Pro Ala Lys

1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 6

Gln Arg Pro Ala Lys

1 5

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 7
Lys Pro Ala Lys
1

<210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 8

Pro Ala Lys Pro

1

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 9

Ala Lys Pro Ala Lys

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 10

Pro Ala Lys Pro Ala

1 5

<210> 11

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 11

Arg Gly Asp Ser

1

<210> 12

<211> 4

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 12
Arg Gly Asp Val
1

<210> 13
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 13
Arg Gly Asp Phe
1

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 14

Tyr Ile Gly Ser

1

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 15

Tyr Ile Gly Ser Arg Arg Gly Asp Ser

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 16

Tyr Ile Gly Ser Arg Arg Gly Asp Val

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 17

Tyr Ile Gly Ser Arg Arg Gly Asp Phe

1 5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 18

Tyr Ile Gly Ser Arg Tyr Ile Gly Ser Lys

1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 19

Tyr Ile Gly Ser Arg Tyr Ile Gly Ser Arg

1 5 10

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 20

Tyr Ile Gly Ser Lys Arg Gly Asp Ser

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 21

Tyr Ile Gly Ser Lys Arg Gly Asp Phe

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 22

Tyr Ile Gly Ser Lys Arg Gly Asp Val

1 5

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 23

Tyr Ile Gly Ser Lys Tyr Ile Gly Ser Lys

1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 24

Tyr Ile Gly Ser Lys Tyr Ile Gly Ser Arg

1 5 10

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 25

Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser

1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 26

Arg Gly Asp Val Arg Gly Asp Val

1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 27

Arg Gly Asp Phe Arg Gly Asp Phe

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 28

Arg Gly Asp Ser Tyr Ile Gly Ser Arg

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 29

Arg Gly Asp Ser Tyr Ile Gly Ser Lys

1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 30
Arg Gly Asp Val Tyr Ile Gly Ser Arg
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 31

Arg Gly Asp Val Tyr Ile Gly Ser Lys

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 32

Arg Gly Asp Phe Tyr Ile Gly Ser Arg

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 33

Arg Gly Asp Phe Tyr Ile Gly Ser Lys

1 5

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 34

Lys Ala Pro Arg Ala

1 5

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

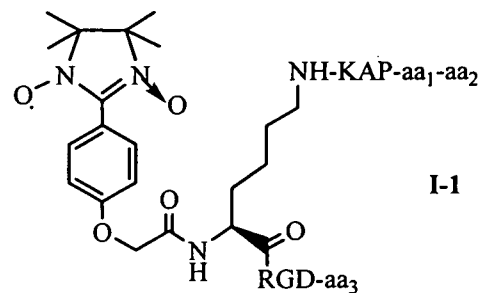
<400> 35

Lys Ala Pro Arg Gly

1 5

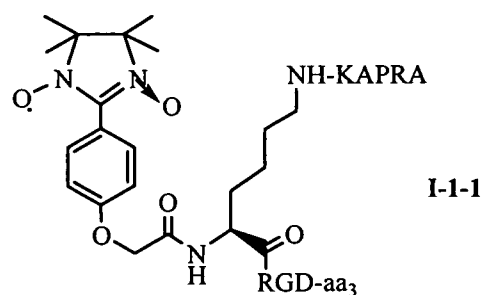
申請專利範圍

- 1、一種化合物，其是由通過L-Lys連接臂連接在一起的具清除NO自由基活性的1,3-二氧基-2-[(4-氧乙酸)苯基]-4,4,5,5-四甲基咪唑啉、具溶血栓活性的ARPAK (SEQ. ID NO. 4)、GRPAK (SEQ. ID NO. 5)、RPAK (SEQ. ID NO. 3)或PAK肽，以及具抗血栓活性的含RGD序列的四肽所構成，具有以下通式I-1：



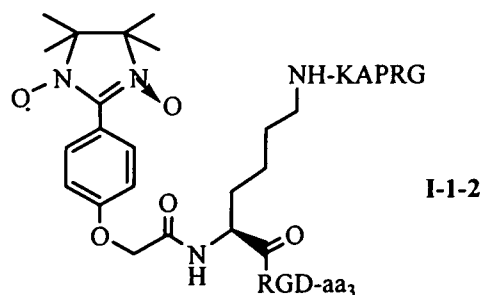
其中aa₁和aa₂可為同時存在、aa₁存在但aa₂不存在、或同時不存在；當其同時存在時，aa₁為R (Arg)，且aa₂為G (Gly)、A (Ala)或Q (Gln)；當aa₁存在但aa₂不存在時，aa₁為R (Arg)；aa₃可為S (Ser)、V (Val)或F (Phe)。

- 2、如請求項1所述的化合物，具有以下通式I-1-1：



其中aa₃的定義如請求項1中所述。

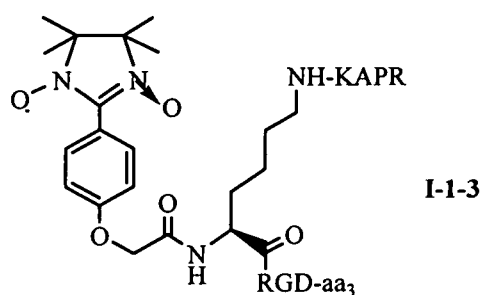
- 3、如請求項1所述的化合物，具有以下通式I-1-2：



其中aa₃的定義如請求項1中所述。

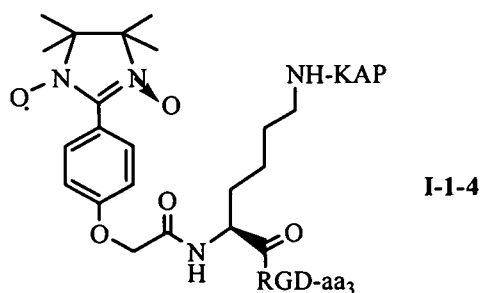
4、如請求項3所述的化合物，其中aa₃為V (Val)。

5、如請求項1所述的化合物，具有以下通式I-1-3：



其中aa₃的定義如請求項1中所述。

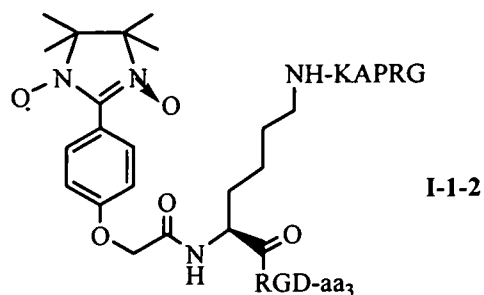
6、如請求項1所述的化合物，具有以下通式I-1-4：



其中aa₃的定義如請求項1中所述。

7、一種藥物組合物，包含如請求項1至6任一項所述的化合物，及藥學上可接受的載劑。

8、如請求項7所述的藥物組合物，其中所述化合物具有以下通式I-1-2：

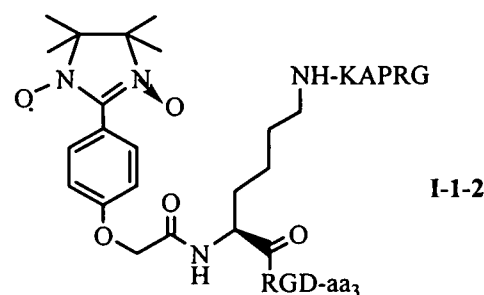


其中aa₃可為S (Ser)、V (Val)、或F (Phe)。

- 9、如請求項8所述的藥物組合物，其中aa₃為V (Val)。
- 10、如請求項7所述的藥物組合物，其中所述化合物可形成二聚體、三聚體、或四聚體結構。
- 11、如請求項7所述的藥物組合物，其中所述化合物可形成奈米球結構。
- 12、如請求項11所述的藥物組合物，其中所述奈米球結構的直徑為2 nm 至300 nm。
- 13、如請求項12所述的藥物組合物，其中所述奈米球結構的直徑為2 nm 至100 nm。
- 14、如請求項7所述的藥物組合物，作為溶血栓藥物。
- 15、如請求項14所述的藥物組合物，用於治療心肌梗塞(Myocardial infarction)、中風(Ischemic stroke)、靜脈栓塞(Deep vein thrombosis)、肺栓塞(Pulmonary embolism)、周邊動脈阻塞性疾病(Peripheral arterial occlusive disease)、靜脈導管阻塞(occluded central vascular access devices)、動靜脈瘻管及分流管阻塞(Clotted arteriovenous fistula and shunts)、或頸動脈狹窄(Carotid Stenosis)。
- 16、如請求項7所述的藥物組合物，作為清除NO自由基藥物。

- 17、 如請求項16所述的藥物組合物，用於治療神經退化疾病 (Neurodegenerative diseases)、心血管疾病(Cardiovascular disease)、精神疾病、高地綜合症(Altitude sickness)、糖尿病、類風濕性關節炎、創傷性腦損傷(Traumatic brain injury)、癌症、X染色體易裂症(Fragile X syndrome)、鐮刀型紅血球疾病(Sickle Cell Disease)、扁平苔蘚 (Lichen planus)、白斑病(Vitiligo)、或慢性疲勞症候群。
- 18、 如請求項7所述的藥物組合物，作為抗血栓藥物。
- 19、 如請求項18所述的藥物組合物，用於治療血小板增多症 (Thrombocytosis)、骨髓增生性疾病(myeloproliferative disease)、真性紅細胞增多症 (Polycythemia vera)、或布卡綜合征 (Budd-Chiari syndrome)。
- 20、 如請求項7所述的藥物組合物作為治療中風或腦梗塞藥物。
- 21、 如請求項20所述的藥物組合物，其中所述化合物具有以下通式

I-1-2：



aa₃可為S (Ser)、V (Val)、或F (Phe)。

- 22、 如請求項20所述的藥物組合物，其中所述化合物的aa₃為V (Val)。
- 23、 如請求項20所述的藥物組合物，用於連續給藥方式來治療中風

或腦梗塞。

24、 如請求項20所述的藥物組合物，用於治療發病超過3小時的中風或腦梗塞。

25、 如請求項24所述的藥物組合物，用於治療發病超過4小時的中風或腦梗塞。

26、 如請求項25所述的藥物組合物，用於治療發病超過6小時的中風或腦梗塞。

27、 如請求項26所述的藥物組合物，用於治療發病超過24小時的中風或腦梗塞。