



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 48140

(13) C2

(51) B A61K41/00,51/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ОЛИГОНУКЛЕОТИДНІ КОН'ЮГАТИ, ВИГОТОВЛЕНІ З КОМПЛЕКСІВ МЕТАЛІВ ТА ОЛИГОНУКЛЕОТИДІВ, СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ СТРУКТУРИ-МІШЕНІ, СПОСІБ НЕІНВАЗИВНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЗАХВОРЮВАНЬ, ДІАГНОСТИЧНИЙ НАБІР

1

2

(21) 97020642  
(22) 30 06 1995  
(24) 15 08 2002  
(86) PCT/EP95/02539, 30 06 1995  
(31) P 4424922 5  
(32) 14 07 1994  
(33) DE  
(31) P 4445078 8  
(32) 05 12 1994  
(33) DE  
(46) 15 08 2002, Бюл. № 8, 2002 р.  
(72) Дінкельборг Лудгер, DE, Хільгер Кристоф-Штефан, DE, Нідбалла Ульріх, DE, Платцек Йоханнес, DE, Радюхель Бернд, DE, Шлек Ульріх, DE, Гопд Ларрі, US, Пікен Вольфганг, DE  
(73) ШЕРІНГ АГ, DE, НЕКСТАР ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ІНК, US  
(56) US A 4416988, 22 11 83  
EP A 0588299, 23 03 94  
WO A 89/00062, 12 01 89  
(57) 1 Олигонуклеотидный конъюгат, состоящий из олигонуклеотидного радикала N и n заместителей (B-K), в которых  
В обозначает непосредственную связь или связующий компонент с олигонуклеотидным радикалом, и К обозначает комплексообразующий агент или комплекс изотопов радиоактивного металла или стабильных изотопов, которые  
- становятся радиоактивными под воздействием внешнего облучения,  
- превращают внешнее облучение в облучение различной природы, различной энергии и/или различной длины волны элементов с атомными номерами 5, 21-29, 31, 39, 42-44, 49, 57-83 или 85, отличающийся тем, что олигонуклеотидный радикал N содержит модификацию, которая препятствует или, по крайней мере, ингибирует деградацию встречающимися в природе нуклеазами, и в которых олигонуклеотид связывается специфически с высоким связывающим средством со структурой-мишенью  
2 Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что имеет общую формулу (I)  
N-(B-K)<sub>n</sub> (I)  
в которой N представляет собой олигонуклеотид, который связывается специфически с высоким

связывающим средством с другими структурами-мишенями и имеет модификации, которые существенно понижают деградацию встречающимися в природе нуклеазами,  
В представляет собой химическую связь или связующий компонент, который образует связь между N и К, и  
К представляет собой комплексообразующий лиганд, который может проявлять себя как сигнал-передающий или терапевтический активный элемент, и  
n является числом от 1 до 10  
3 Конъюгат по пп. 1 или 2, отличающийся тем, что N представляет собой олигонуклеотид с 5-200 нуклеотидами, где  
а) 2'-положение сахаридного звена, независимо друг от друга, занято следующими группами группой -OR, в которой R представляет алкильный радикал с 1-20 углеродными атомами, который произвольно содержит до 2 гидроксильных групп и который произвольно прерывается 1-5 атомами кислорода, атом водорода, гидроксильную группу, атом фтора, аминный радикал, аминогруппу и гидроксильные группы, расположенные в концевых положениях 3' и 5', независимо друг от друга, произвольно этерифицированы радикалом R и/или  
b) фосфодиэфиры, которые необязательно используются в качестве межнуклеотидной связи, независимо друг от друга, замещены фосфориоатами, фосфордитиоатами и/или алкилфосфонатами, предпочтительно метилфосфонатом, и/или  
с) концевые радикалы в 3'- и 5'-положениях связаны внутримолекулярным способом один с другим при помощи межнуклеотидной связи, как описано в b), и/или  
d) он содержит межнуклеотидную связь, как описано в b), которая связывает 3'-3'- или 5'-5'-положения, и/или  
е) он содержит фосфодиэфирную связь, описанную в b), которая соединяет, подобно сложноэфирной, два тимидина, соответственно, при по-

(13) C2

(11) 48140

(19) UA

мощи  $C_2-C_{10}$  гидроксиалкильного радикала в 3-положении или соединяет аналогично замещенный тимидиновый радикал, подобно спожноэфирной, с гидроксильной группой другого сахара в 2'-, или 3'-, или 5'-положении, и/или

f) концевые радикалы в 3'- и 5'-положениях содержат межнуклеотидные связи, произвольно модифицированные, как описано в b)

4 Конъюгат по п. 3, отличающийся тем, что олигонуклеотид N включает от 15 до 100 нуклеотидов

5 Конъюгат по одному из пп. 1-4, отличающийся тем, что N представляет олигонуклеотид, который связан специфически с высоким связывающим сродством с другими структурами-мишенями и который может быть получен тем, что смесь олигонуклеотидов, содержащую случайные последовательности, вводят вместе со структурой-мишенью, и некоторые олигонуклеотиды проявляют повышенное сродство со структурой-мишенью относительно смеси олигонуклеотидов, последние отделяют от остатка смеси олигонуклеотидов, затем олигонуклеотиды с повышенным сродством к структуре-мишени амплифицируют с получением смеси олигонуклеотидов, которая содержит повышенную часть олигонуклеотидов, которые связаны со структурами-мишенями

6 Конъюгат по одному из пп. 1-5, отличающийся тем, что N представляет собой олигонуклеотид, который связан специфически с высоким связывающим сродством с другими структурами-мишенями и который получают следующим образом

a) сначала получают ДНК-цепь путем химического синтеза так, что ДНК-цепь содержит определенную последовательность на 3'-конце, которая комплементарна промотору для РНК-полимеразы и в то же время комплементарна праймеру полимеразной цепной реакции (PCR) так, что эта ДНК-цепь содержит определенную ДНК последовательность на 5'-конце, которая комплементарна праймерной последовательности для полимеразной цепной реакции, и эта последовательность между определенными последовательностями содержит случайную последовательность,

b) эту ДНК-цепь транскрибируют в комплементарную РНК-цепь с помощью РНК-полимеразы, при этом полимеразе предлагаются нуклеотиды, которые модифицированы в 2'-положении рибозного звена,

c) РНК-олигонуклеотиды, полученные таким путем, вводят вместе со структурой-мишенью, с которой олигонуклеотид должен быть специфически связан,

d) те олигонуклеотиды, которые связаны со структурой-мишенью, отделяют сначала вместе со структурой-мишенью от несвязавшихся нуклеотидов, и затем связанные нуклеотиды снова отделяют от структуры-мишени,

e) эти структура-мишень-специфические РНК-олигонуклеотиды транскрибируют с помощью обратной транскриптазы в комплементарную ДНК-цепь,

f) эти ДНК-цепи амплифицируют полимеразно-цепной реакцией с использованием определенных праймерных последовательностей,

g) ДНК-олигонуклеотиды, амплифицированные

таким путем, затем подвергают транскрибированию снова с помощью РНК-полимеразы и модифицированных нуклеотидов в РНК-олигонуклеотиды,

h) вышеупомянутые стадии отбора c)-g) произвольно повторяют до тех пор, пока олигонуклеотиды, которые отличаются высоким связывающим сродством к структуре-мишени, не будут достаточно отобраны, и тогда последовательности полученных таким образом олигонуклеотидов произвольно могут быть определены

7 Конъюгат по п. 6, отличающийся тем, что структуру-мишень выбирают среди макромолекул, тканевых структур высших организмов, таких как животные или люди, органы или части органов животного или человека, клетки, опухолевые клетки или опухоли

8 Конъюгат по одному из пп. 1-7, отличающийся тем, что соединяющий(е) компонент(ы) В связан(ы)

a) с 4'-концом олигонуклеотидного радикала N, урезанным в 4-положении на СН-ОН группу, и/или

b) с 3'-концом олигонуклеотидного радикала N, уменьшенным в 3-положении на атом водорода, и/или

c) с фосфодиэфирным мостиком(ами), уменьшенным(и) на ОН группу(ы), каждый между двумя нуклеотидами, и/или

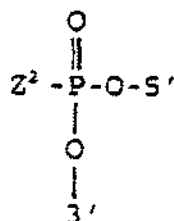
d) с 1-10 основанием (ями) нуклеиновой кислоты, которое(ые) уменьшены на атом водорода, соответственно, в 5-, 8-положении (ях) и/или на аминоксигруппу(ы) в 2-, 4- и 6-положении (ях)

9 Конъюгат по п. 8, отличающийся тем, что В, который связан с 4'-концом олигонуклеотидного радикала N, урезанным в 4-положении на СН-ОН группу или с 3'-концом олигонуклеотидного радикала N, уменьшенным в 3-положении на атом водорода, в котором В имеет общую формулу  $X-Y-Z^1$ , который соединен со стороны X с комплексобразующим агентом или комплексом и со стороны Z - с олигонуклеотидом, в котором X представляет собой простую связь, -NH или -S группу,

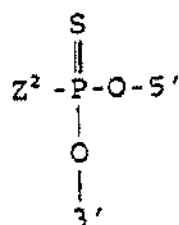
Y представляет собой неразветвленную цепь, разветвленную цепь, насыщенную или ненасыщенную  $C_1-C_{20}$  алкиленовую цепь, которая произвольно содержит 1-2 циклогексилена, 1-5 имино, 1-3 фенилена, 1-3 фениленимино, 1-3 фениленокси, 1-3 гидроксифенилена, 1-5 амидо, 1-2 гидразида, 1-5 карбонила, 1-5 этиленокси, уреидо, тиoureидо, 1-2 карбоксиалкилимину, 1-2 сложноэфирные группы, 1-3 группы Ar, где Ar обозначает насыщенное или ненасыщенное 5- или 6-членное кольцо, которое произвольно содержит 1-2 гетероатома, выбранных из азота, кислорода и серы и/или 1-2 карбонильные группы, 1-10 кислородов, 1-5 азотов и/или 1-5 атомов серы, и/или произвольно замещена 1-5 гидрокси, 1-2 меркапто, 1-5 оксо, 1-5 тиоксо, 1-3 карбокси, 1-5 карбокси- $C_1-C_4$ -алкильными, 1-5 сложноэфирными, 1-3 амино, 1-3 гидроксид- $C_1-C_4$ -алкильными, 1-3  $C_1-C_7$ -алкокси группами и

$Z^1$  представляет собой -CONH-CH<sub>2</sub>-4', -NH-CO-4', -O-P(O)R<sup>1</sup>-NH-CH<sub>2</sub>-4', -O-P(O)R<sup>1</sup>-O-CH<sub>2</sub>-4', -O-P(S)R<sup>1</sup>-O-3' или -O-P(O)R<sup>1</sup>-O-3', в котором 4' или 3' указывает связь с концевым сахаридным зве-

ном(ями) и  $R^1$  представляет собой O, S,  $C_1$ - $C_4$  алкильную или  $NR^2R^3$  группу, причем  $R^2$  и  $R^3$  означают водород или  $C_1$ - $C_4$  алкильные радикалы  
 10 Конъюгат по п 8, отличающийся тем, что В, который связан с фосфодиэфирным мостиком (ами), уменьшенным на OH группу (ы), каждый между двумя нуклеотидами, имеет обычную формулу  $X-Y-Z^2$ , который соединен со стороной X с комплексообразующим агентом или комплексом и со стороны Z с олигонуклеотидом, в котором  $Z^2$  в мостике, связывающем два соседних сахаридных звена,



и/или



представляют собой группу  $-NR^2$ -,  $-O$ - или  $-S$ -, X представляет собой непосредственную связь, -NH или -S группу,

Y представляет собой неразветвленную цепь, разветвленную цепь, насыщенную или ненасыщенную  $C_1$ - $C_{20}$  алкиленовую цепь, которая произвольно содержит 1-2 циклогексилена, 1-5 имино, 1-3 фенилена, 1-3 фениленимино, 1-3 фениленокси, 1-3 гидроксифенилена, 1-5 амидо, 1-2 гидразида, 1-5 карбонилы, 1-5 этиленокси, уреидо, тиоуреидо, 1-2 карбоксиалкилимино, 1-2 сложноэфирные группы, 1-3 группы Ar, где Ar обозначает насыщенное или ненасыщенное 5- или 6-членное кольцо, которое произвольно содержит 1-2 гетероатома, выбранных из азота, кислорода и серы и/или 1-2 карбонильные группы, 1-10 кислородов, 1-5 азотов и/или 1-5 атомов серы, и/или произвольно замещена 1-5 гидрокси, 1-2 меркапто, 1-5 оксо, 1-5 тиоксо, 1-3 карбокси, 1-5 карбокси- $C_1$ - $C_4$ -алкильными, 1-5 сложноэфирными, 1-3 амина, 1-3 гидроксид- $C_1$ - $C_4$ -алкильной, 1-3  $C_1$ - $C_7$ -алкокси группами, и

$R^2$  представляет собой водород или  $C_1$ - $C_4$  алкильные радикалы

11 Конъюгат по п 8, отличающийся тем, что В, который связан с 1-10 основанием(ями) нуклеиновой кислоты, которое(ые) уменьшено на атом водорода, соответственно, в 5-, 8-положении (ях) и/или на amino группу(ы) в 2-, 4- и 6-положении(ях), имеет общую формулу  $X-Y-Z^3$ , в которой  $Z^3$  обозначает -NH группу или непосредственную связь с нуклеоснованием,

X представляет собой непосредственную связь, -NH или -S группу,

Y представляет собой неразветвленную цепь, разветвленную цепь, насыщенную или ненасыщенную  $C_1$ - $C_{20}$  алкиленовую цепь, которая произвольно содержит 1-2 циклогексилена, 1-5 имино, 1-3 фенилена, 1-3 фениленимино, 1-3 фениленокси, 1-3 гидроксифенилена, 1-5 амидо, 1-2 гидразида, 1-5 карбонилы, 1-5 этиленокси, уреидо, тиоуреидо, 1-2 карбоксиалкилимино, 1-2 сложноэфирные группы, 1-3 группы Ar, где Ar обозначает насыщенное или ненасыщенное 5- или 6-членное кольцо, которое произвольно содержит 1-2 гетероатома, выбранных из азота, кислорода и серы и/или 1-2 карбонильные группы, 1-10 кислородов, 1-5 азотов и/или 1-5 атомов серы, и/или произвольно замещена 1-5 гидрокси, 1-2 меркапто, 1-5 оксо, 1-5 тиоксо, 1-3 карбокси, 1-5 карбокси- $C_1$ - $C_4$ -алкильными, 1-5 сложноэфирными, 1-3 амина, 1-3 гидроксид- $C_1$ - $C_4$ -алкильными, 1-3  $C_1$ - $C_7$ -алкоксигруппами

12 Конъюгат по одному из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что комплекс металла, в качестве визуализирующего элемента, содержит радиоактивный изотоп, выбранный из элементов медь, висмут, технеций, рений или индий

13 Конъюгат по одному из пп 1-12, отличающийся тем, что предназначен для использования в радиодиагностике и/или в радиотерапии

14 Конъюгат по одному из пп 1-4, отличающийся тем, что N представляет собой не встречающийся в природе олигонуклеотидный лиганд, имеющий специфическое связывающее сродство к молекуле-мишени, причем такая молекула-мишень имеет трехмерную химическую структуру, другую, чем полинуклеотид, которая связывается с указанным олигонуклеотидным лигандом по механизму, который преимущественно зависит от спаривания оснований Уотсон/Крика или тройного спирального связывания, где указанный олигонуклеотидный лиганд не является нуклеиновой кислотой, имеющей известную физиологическую функцию, будучи связанным молекулой мишенью

15 Способ обнаружения структуры-мишени, в котором одно или более из соединений по любому из пп 1-12 вводят вместе с образцом, подлежащим исследованию in vivo или in vitro, и основанный на сигнале, с помощью которого определяют, присутствует ли в образце структура-мишень, с которой олигонуклеотид N связывается специфически с высоким связывающим сродством

16 Способ неинвазивной диагностики заболеваний, в котором одно или более из соединений по одному из пп 1-12 вводят вместе со структурой-мишенью, подлежащей изучению in vivo, и основанный на сигнале, с помощью которого определяют, присутствует ли структура-мишень, с которой олигонуклеотид N связывается специфически и с высоким связывающим сродством, в организме, подлежащем изучению

17 Диагностический набор для in vivo и/или in vitro определения структур-мишеней, отличающийся тем, что диагностический набор содержит, по крайней мере, одно соединение по одному из пп 1-12

Это изобретение относится к конъюгатам олигонуклеотидов, которые содержат комплексообразующий агент или комплекс. Эти конъюгаты используют в областях диагностики и лечения.

Визуальная диагностика достигла большого прогресса за последние десятилетия и продолжает непрерывно развиваться. Сегодня возможно сделать видимой сосудистую систему, большинство органов и многие ткани в живом организме без особого вмешательства. Во многих случаях диагностику заболевания проводят по изменениям формы, размера и положения анатомических структур в теле. Такие анатомические данные о состоянии внутренних органов тела можно получить с помощью рентгеновской техники, ультразвуковой диагностики и магнитной резонансной томографии. Эффективность каждой из упомянутых техник может быть повышена путем использования фармацевтических средств для повышения естественного контраста тканей и жидкостей тела на получающейся картине. Фармацевтические средства, о которых идет речь, вводят в полости тела или инъецируют в кровеносные сосуды с целью контрастного изменения полостей или сосудов. Кроме того, они распространяются с помощью кровотока в организме и могут изменять видимость органов и тканей. В исключительных случаях, такие вещества связываются с определенными структурами в теле и/или активно транспортируются и/или экскретируются (выделяются) последними. Таким путем, в индивидуальных случаях функции могут быть также сделаны видимыми и могут быть использованы для диагностики заболеваний.

В противоположность этому, ядерная диагностика основана на веществах, которые могут сами по себе депаться видимыми. В этом случае радиоактивные изотопы, которые излучают радиацию в большом диапазоне, вводят в организм. Распространение этих веществ в организме можно проследить с помощью подходящих детекторов. Преимущество ядерного медицинского способа заключается в высокой эффективности при низкой дозе посылающих сигнал радиоактивных веществ, обозначаемых как радиофармацевтические средства.

Если используют изотопы, которые выделяют  $\alpha$ - или  $\beta$ -излучение или другие токсичные продукты разложения, эффективные в ткани, то радиофармацевтические средства могут быть также использованы для терапевтических целей, например, для разрушения опухолей. Такого же эффекта можно достигнуть тем, что опасные изотопы или вещества вводят в организм и превращают только там путем, например, облучения нейтронами или рентгеновскими лучами, ультразвуком или радиоволнами, в терапевтически эффективную форму.

Общая проблема заключается в диагностике и локализации патологических изменений за имеющееся в распоряжении время, при котором нет ясных изменений формы, строения и кровообращения в органах и тканях, о которых идет речь.

Такая диагностика и постоянное наблюдение имеет важное значение, например, в случае опухолевых заболеваний, включая поиск метастаз, оценку дефицита снабжения тканей кислородом, и в случае некоторых инфекций, и также метаболических заболеваний.

В настоящее время имеющиеся терапевтические и визуализирующие диагностические методы значительно зависят от доступности фармацевтических препаратов, которые аккумулируются в местах патологических нарушений, которые невозможно определить другим путем.

Контрастными средами, коммерчески доступными в данное время, преимущественно являются так называемые неспецифические препараты. Они пассивно распространяются в пространствах, в которые их вводят, например, путем инъекции.

В прошлом были идентифицированы многие вещества и классы веществ, которые могут проявлять специфичность или, как можно предположить, имеют специфичность в отношении их распространения в живом организме. Таким примерами, помимо антител, лектинов, являются все типы рецептор-связанных веществ, клетки, мембраны и компоненты мембран, нуклеиновые кислоты, природные метаболиты и их производные, а также большое количество фармацевтических веществ. Пептиды изучались и также подлежат исследованию с особым вниманием.

В Пат. США №4707352 рассматривается специальный способ маркировки комплексообразующих молекул радиоактивными изотопами, но не описаны приемлемые комплексообразующие агенты для связывания ионов металла.

В EP-A-0285057 раскрываются конъюгаты-нуклеотид-комплексообразующий агент, которые не пригодны из-за *in vivo* нестабильности используемых нуклеотидов в качестве *in vivo* диагностических или терапевтических средств и которые, кроме того, с трудом удовлетворяют другим требованиям совместимости и фармакокинетики.

Во многих патентах США, таких как, например, Пат. США 4707440, речь идет о модифицированных полимерах, которые имеют определенную химическую группу. Полимеры могут представлять собой полинуклеотиды и олигонуклеотиды, но они не стабилизированы против деградации встречающимися в природе нуклеазами, ни отобраны специальным способом, для этого их специфически связывают с высоким связующим средством со структурами-мишенями. Конкретные варианты воплощения этих детектируемых молекул упоминаются в Пат. США №2843122 и 4943523. Индивидуальный нуклеотид, модифицированный таким путем, заявлен в Пат. США №4952685. Использование этих средств в способах визуализации раскрывается в Пат. США 4849208.

Целью данного изобретения является получение специфически связывающихся диагностических средств для обнаружения структур-мишеней, с помощью которых, например, становится возможным визуализация органов, тканей и их пато-

логических изменений *in vitro* и *in vivo*

Найдено, что эта цель может быть достигнута при помощи конъюгатов нуклеотидов, которые помимо олигонуклеотидного радикала, имеют комплексообразующий агент, связанный непосредственно или с помощью связующего компонента, и чей олиго-нуклеотидный радикал модифицирован так, чтобы предотвратить или, по крайней мере, значительно ингибировать деградацию встречающимися в природе нуклеазами

Целью изобретения являются

1 Конъюгаты олигонуклеотидов, состоящие из олигонуклеотидного радикала N и n заместителей (B-K), в которых B обозначает непосредственную связь или соединяющий компонент с олигонуклеотидным радикалом, и K означает комплексообразующий агент или комплекс радиоактивных изотопов металла, или стабильных изотопов, которые

- превращаются в радиоактивные изотопы при помощи внешнего облучения,

- превращают внешнее облучение в облучение различного качества, различного энергетического содержания и/или различной длины волны, элементов под атомными номерами 5, 21 - 29, 31, 39, 42 - 44, 49, 57 - 59 или 85, при этом олигонуклеотидный радикал N представляет модификацию, которая предотвращает или, по крайней мере, значительно ингибирует деградацию имеющимися в природе нуклеазами

2 В предпочтительном варианте воплощения, конъюгаты олигонуклеотидов данного изобретения имеют общую формулу (1)

$N-(B-K)_n$  (1)

в которой N представляет олигонуклеотид с высоким связующим сродством, который специфически связывается со структурами-мишенями, и имеет модификации, которые значительно понижают деградацию встречающимися в природе нуклеазами,

B есть химическая связь или соединяющий компонент, который обеспечивает связь между N и K, и

K есть комплексообразующий лиганд, который может содержать посылающий-сигнал или терапевтически активный элемент, и

n - целое число от 1 до 10

3 Соединение по п п 1 или 2, в котором N представляет олигонуклеотид с от 5 до 200 нуклеотидами, в котором

а) 2'-положение сахаридного звена, независимо одно от другого, занято следующими группами группа OR, в которой

R означает алкильный радикал с 1 до 20 углеродными атомами, который произвольно содержит вплоть до 2 гидроксильных групп, и который произвольно прерывается 1 - 5 кислородными атомами

атом водорода,

гидроксильная группа,

атом фтора,

аминовый радикал,

аминовая группа,

и гидроксильные группы, присутствующие в концевых положениях 3' и 5', независимо одна от другой, произвольно этерифицированы радикалом R и/или

б) фосфодизфиры, которые необязательно используются в качестве межнуклеотидной связи, независимо друг от друга, замещены фосфориоатами, фосфордитиоатами, и/или алкилфосфонатами, предпочтительно метил фосфонатом, и/или

с) концевые радикалы в 3'- и 5'-положениях связаны внутримолекулярно один с другим при помощи межнуклеотидной связи, как описано в b) и/или

d) он содержит межнуклеотидную связь, как описано в b), которая связывает 3'-3'- или 5'-5'-положение и/или

e) он содержит фосфодизфирную связь, описанную в b), которая соединяет, подобно сложноэфирной, два тимидина при помощи C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> гидроксильного радикала соответственно в 3-положении или соединяет аналогично замещенный тимидиновый радикал, подобно сложноэфирной, с гидроксильной группой другого сахара в 2' или 3'- или 5'-положении и/или

f) концевые радикалы в 3'- и 5'-положениях содержат межнуклеотидные связи, произвольно модифицированные как описано в b)

4 Соединение по п 3, в котором олигонуклеотид N включает от 15 до 100 нуклеотидов

5 Соединение по п п 1 - 4, в котором N является олигонуклеотидом с высоким связующим сродством, который специфически связывается со структурами-мишенями с высоким связующим сродством, и который может быть получен тем, что смесь олиго-нуклеотидов, содержащую статистические последовательности, вводят вместе со структурой-мишенью, и некоторые олигонуклеотиды проявляют повышенное сродство к структуре-мишени относительно смеси олигонуклеотидов, последний отделяют от остатка олигонуклеотидной смеси, затем олигонуклеотиды с повышенным сродством к структуре-мишени амплифицируют, чтобы получить смесь олигонуклеотидов, которая имеет большое количество олигонуклеотидов, которые связываются на структурах-мишенях

6 Соединения, описанные в п п 1 - 5, в которых N есть олигонуклеотид с высоким связующим сродством, который специфически связывается со структурами-мишенями, и которые могут быть получены тем, что

а) сначала путем химического синтеза получают ДНК цепь, так что на 3'-конце эта ДНК цепь содержит определенную последовательность, которая комплементарна промотору для РНК-полимеразы и в то же самое время комплементарна праймеру по-лимеразно-цепевой реакции (PCR), и так что эта ДНК цепь содержит определенную последовательность на 5'-конце, которая комплементарна праймерной последовательности для полимеразно-цепевой реакции, и последовательностями между данными определенными последовательностями содержит статистическую последовательность,

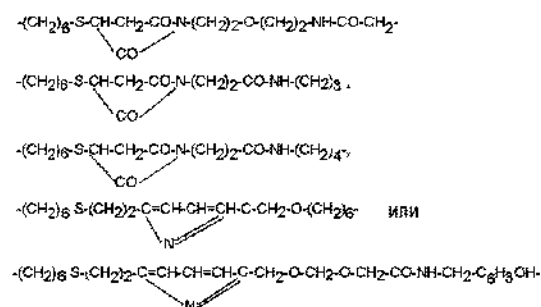
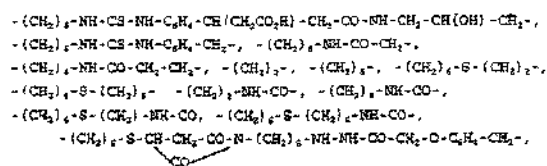
б) ДНК цепь транскрибируют в комплементарную РНК цепь с помощью РНК-полимеразы, и нуклеотиды предлагаются полимеразе, которые модифицированы в 2-положении рибозного звена,

с) РНК олигонуклеотиды, полученные таким путем, вводят вместе со структурой-мишенью, с которой олигонуклеотид должен быть специфиче-

1 - 3 группы Ag, в которых Ag обозначает насыщенное или ненасыщенное 5- или 6-членное кольцо, которое произвольно содержит 1 - 2 гетероатома, выбранные из азота, кислорода и серы

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{Z}^2 - \text{O} - \text{S}^1 \\ | \\ \text{O} \\ | \\ \text{S}^1 \end{array} \quad \text{H}^1 \text{H}^2 \text{H}^3 \quad \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{Z}^2 - \text{O} - \text{S}^1 \\ | \\ \text{O} \\ | \\ \text{S}^1 \end{array}$$

В качестве радикала Y, соединяющего компонента  $Z^1-Y-X$  (согласно п 9) или  $Z^2-Y-X$  (согласно п 10), можно упомянуть в качестве примеров радикалы



11 Соединение по п 3d), в котором В имеет общую формулу  $X-Y-Z^3$ , в которой  $Z^3$  обозначает -NH группу или непосредственную связь с нуклеоснованием и X и Y имеют значение, указанное в п 9

В качестве примеров можно упомянуть радикалы  $-CH_2-CO$   
 $NH-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ ,  $-NH-CO-CH_2-CO-NH-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ ,  
 $-CO-NH-CH_2-CH_2-NH-$ ,  $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-$ ,  $-CH_2-S-CH_2-CH_2-$ ,  
 $-(CH_2)_4-S-CH_2-CH_2-NH-$ ,  $-CO-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-$ ,  $-CO-CH_2-S-$   
 $(CH_2)_4-NH-$ ,  $-CH=CH-CO-NH-CH_2-CH_2-NH-$ ,  $-CH=CH-CH_2-NH-$ ,  
 $-C\equiv C-CH_2-NH-$  or  $-CO-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-NH-$ .

В качестве связывающих мест в случае пуриновых оснований, особенно пригодно 8-положение, а в случае пиримидиновых оснований, особенно пригодно 5-положение. В этом случае, чисто формально, атом водорода соответствующего основания замещен радикалом В-К. Но связь может осуществляться, кроме того, с помощью amino групп, необязательно содержащихся в 2-, 4- или 6-положении, так, например, при помощи 2-амино группы в гуанине, с помощью 6-амино группы в аденине или с помощью 4-амино группы в цитозине. В этом случае, атом водорода соответствующей amino группы, соответственно, замещен радикалом В-К.

12 Соединения по одному из предшествующих п п, в которых комплекс металла, в качестве визуализирующего элемента, содержит радиоактивный изотоп, выбранный из элементов меди, висмута, технеция, рения или индия.

13 Изобретение, кроме того, включает способ обнаружения структуры-мишени, в котором одно или более из соединений по одному из предшествующих п п вносят вместе *in vivo* или *in vitro* с образцом, подлежащим исследованию, и который основан на сигнале, с помощью которого определяют, присутствует ли в образце структура-мишень, на которой олигонуклеотид связан специфически и с высоким связывающим родством, а также

14 Способ неинвазивной диагностики заболеваний, в котором одно или более из соединений по одному из п п 1 - 12 вносят вместе со структур-мишенью, подлежащей исследованию *in vivo*, и основанном на сигнале, с помощью которого определяют, присутствует ли в организме, подлежащем изучению, структура-мишень, с которой олигонуклеотид специфически связан.

15 Целью изобретения также является использование соединения по п п 1 - 12 в радиодиагностике и/или в радиотерапии, а также

16 Диагностический набор для *in vivo* или *in vitro* определения структур-мишеней, и этот диагностический набор содержит, по крайней мере, одно соединение по одному из п п 1 - 12.

17 Соединение по одному из п п 1 - 4, в котором N представляет собой не встречающийся в природе олигонуклеотидный лиганд, имеющий специфическое связывающее сродство к молекуле-мишени, причем такая молекула-мишень имеет трехмерную химическую структуру, другую, чем полинуклеотид, которая связывается с указанным олигонуклеотидным лигандом посредством механизма, который преимущественно зависит от спа-

ривания оснований Уотсона-Крика (Watson/Crick) или от тройного спирального связывания, где указанный олигонуклеотидный лиганд не является нуклеиновой кислотой, имеющей известную физиологическую функцию, будучи связанным с молекулой-мишенью.

Если предлагаемые конъюгаты должны быть использованы в качестве диагностического агента, то комплексообразующий агент(ы) содержит (содержат) визуализирующий радиоактивный изотоп элементов с атомными номерами 21, 26 - 27, 29, 31, 43 или 49, предпочтительно 43 или 49. Если предлагаемые конъюгаты должны быть использованы в качестве терапевтического агента, то помимо вышеупомянутых элементов, также подходят изотопы элементов с атомными номерами 5, 22 - 25, 26, 42, 44, 57 - 83 и 85. Вне радиоактивных вышеупомянутых элементов, особенно пригодными в области лечения являются стабильные изотопы, которые

a) превращаются с помощью внешнего облучения в радиоактивные изотопы,

b) превращают внешнее облучение в облучение различного качества, различного энергетического содержания и/или различной длины волны.

Число визуализирующих или терапевтически эффективных заместителей В-К, связанных с олигонуклеотидным радикалом, с одной стороны, ограничивается величиной олигонуклеотида, но оно не бывает выше 10. Согласно изобретению, предпочтителен один или два заместителя В-К.

В принципе величина олигонуклеотидного радикала N не ограничена. Для данного изобретения, олигонуклеотиды с 5 до 600 нуклеотидов являются пригодными к употреблению, особенно предпочтительны олигонуклеотиды с 15 до 100 нуклеотидами.

Олигонуклеотиды, годные к употреблению, согласно изобретению являются стабилизированными против деградации нуклеазами, встречающимися *in vivo*.

Немодифицированные олигонуклеотиды или полинуклеотиды расщепляются *in vivo* эндонуклеазами и экзонуклеазами. Реакция деградации в РНК ряде начинается с активации 2-гидроксигруппы. Другими катаболическими ферментами являются, например, рибозимы, которые расщепляют фосфодиэфирную связь (смотри Science 261, 709 (1993)). *In vivo* стабильность RNS производных можно увеличить частичным или полным замещением 2-гидроксильной группы другими заместителями. Такими заместителями являются, например, алкокси группы, особенно метокси группа (смотри, например, Chem Pharm Bull 13, 1273 (1965), Biochemistry 10, 2581 (1971), атом водорода, атом фтора (смотри, например, Can J Chem 46, 1131 (1986) или amino группа (смотри, например, J Org Chem 42, 714 (1977)). Некоторые из этих заместителей, а также другие, могут быть введены в 2'-положение, используя способы, раскрываемые в заявке на Пат. США Сер №08/264029, поданной 22 июня 1994. Другие возможности для стабилизации межнуклеотидной связи заключаются в замещении одного или двух, атомов кислорода в фосфодиэфирном мостике при образовании фосфотиоатов (Trends Biochem

Sci 14, 97 (1989)) или фосфородитиоатов (J Chem Soc, Chem Commun 591 (1993) и Nucleic Acids Res 12, 9095 (1984) и в использовании алкилфосфонатов вместо фосфодиефиров (Ann Rep N Y Acad Sci 507, 220 (1988))

Стабилизация может быть достигнута, когда гидроксильные группы в 2'-положении рибозных звеньев, независимо друг от друга, модифицированы. Такую модификацию можно обеспечить замещением этой гидроксильной группы OR группой, атомом галоида, особенно атомом фтора, атомом водорода или аминным радикалом, особенно амино группой. Радикал R алкокси группы обозначает в этом случае неразветвленный-цепной или разветвленный-цепной алкильный радикал с 1 - 20 C атомами, такой как метил, этил, пропил, изопропил, бутил, трет-бутил, пентил или гексил или циклический незамещенный или замещенный алкильный радикал с 4 - 20 C атомами, такой как циклопентил или циклогексил, которые произвольно содержат 1 - 2 гидроксильные группы, и произвольно прерываются 1 - 5 атомами кислорода. Стабилизация также повышается, так как присутствующие гидроксильные группы в 3'- и 5'-положениях произвольно этерифицированы.

Другая (возможность стабилизации) стабилизация полинуклеотида достигается тем, что фосфодиефры, подлежащие использованию в качестве межнуклеотидной связи, замещают частично или полностью, и независимо друг от друга, фосфоротиоатами, фосфородитиоатами или алкилфосфонатами, особенно предпочтительно низшими алкилфосфонатами, такими как, например, метилфосфонат. Эти межнуклеотидные связи могут быть также связаны с концевыми радикалами в 3'- и 5'-положениях или же также могут соединять 3'-3' или 5'-5'-положения. Фосфодиефирная связь делает возможным дополнительное связывание гидроксильными радикалами, которые присутствуют при азотных или углеродных атомах нуклеосазинов, так, например, два тимидина могут быть связаны гидроксильными цепями, присутствующими в 3-положении или два пуриновых основания радикалами, присутствующими в 8-положении. Связывание может также происходить с гидроксильными группами в 2'- или 3'- или 5'-положении.

Модифицированные межнуклеотидные связи могут необязательно иметь место предпочтительно на концах полинуклеотида, и они особенно предпочтительно связывают с тимидином.

Согласно данному изобретению, используемые олигонуклеотидные радикалы N не ограничиваются специфическими олигонуклеотидными последовательностями. Но предпочтительными являются те олигонуклеотиды, которые специфически связываются с высоким связывающим сродством со структурами-мишенями, за исключением нуклеиновой кислоты.

Способ идентификации подходящих олигонуклеотидов, которые требуются в качестве исходных веществ для конъюгатов предлагаемого изобретения, описан в Пат. США 5270163. Этот способ, названный SELEX, может быть использован для того, чтобы получить лиганд нуклеиновой кислоты для любой требуемой молекулы-мишени.

SELEX способ включает отбор из смеси кандидатов-олигонуклеотидов и ступенчатые итерации связывания, разделения и амплификации, используя одну и ту же общую схему отбора для того, чтобы достичь фактически требуемого критерия связывающего сродства и селективности. Исходя из смеси нуклеиновых кислот, предпочтительно включающей сегмент статистической последовательности, SELEX способ включает стадии контактирования смеси с мишенью в условиях, благоприятных для связывания, разделения несвязанных нуклеиновых кислот от тех нуклеиновых кислот, которые специфически связались с молекулами-мишенями, диссоциации комплексов нуклеиновая кислота-мишень, амплификации нуклеиновых кислот, диссоциированных из комплексов нуклеиновая кислота-мишень, с получением лиганд-обогащенной смеси нуклеиновых кислот, затем повторная итерация стадий связывания, разделения, диссоциации и амплификации с таким количеством циклов, сколько требуется для того, чтобы получить высокую специфические лиганды с высоким сродством нуклеиновой кислоты к молекуле-мишени.

Основной SELEX способ был модифицирован, чтобы достичь ряда конкретных целей. Например, заявка на Пат. США Сер. №07/960093, поданная 14 октября 1992, раскрывает использование SELEX в конъюгации при электрофорезе в геле для отбора молекул нуклеиновой кислоты со специфическими структурными характеристиками, такую как изогнутая ДНК. Заявка на Пат. США Сер. №08/123935, поданная 17 сентября 1993, раскрывает способ на основе SELEX для селекции лигандов нуклеиновой кислоты, содержащих фотореакционноспособные группы, способные к связыванию и/или фотосшиванию с молекулой-мишенью и/или способных фотоинактивироваться молекулой-мишенью. Заявка на Пат. США Сер. №08/134028, поданная 7 октября 1993, раскрывает способ идентификации высокоспецифических лигандов нуклеиновой кислоты, способных различать близкородственные молекулы, получивший название Couter-SELEX. Заявка на Пат. США Сер. №08/143564, поданная 25 октября 1993, раскрывает способ на основе SELEX, который обеспечивает достаточно высокое разделение между олигонуклеотидами, имеющими высокое и низкое сродство к молекулам-мишеням. Заявка на Пат. США Сер. №07/964624, поданная 21 октября 1992, раскрывает способы получения улучшенных лигандов нуклеиновой кислоты после проведения SELEX. Заявка на Пат. США Сер. №08/400440, поданная 8 марта 1995, раскрывает способы ковалентного связывания лиганда с его мишенью.

SELEX способ охватывает идентификацию лигандов нуклеиновой кислоты с высоким сродством, содержащих модифицированные нуклеотиды, придающие улучшенные характеристики лиганду, такие как повышенная *in vivo* стабильность или улучшенные характеристики доставки. К примерам таких модификаций относятся химические замещения на рибозном заместителе и/или фосфатном и/или основном заместителях SELEX-идентифицированные лиганды нуклеиновой кислоты, содержащие модифицированные нуклео-



тиды, раскрываются в заявке на Пат. США Сер. №08/117991, поданной 8 сентября 1993, которая описывает олигонуклеотиды, содержащие производные нуклеотида, химически модифицированные в 5- и 2'-положениях пиримидинов. В заявке на Пат. США Сер. №08/134028, указано выше, раскрываются высокоспецифичные лиганды нуклеиновой кислоты, содержащие один или более нуклеотидов, модифицированных 2'-амино (2'-NH<sub>2</sub>), 2'-фторо (2'-F), и/или 2'-О-метилом (2'-OMe). В заявке на Пат. США Сер. №08/264029, поданной 22 июня 1994, раскрываются олигонуклеотиды, содержащие различные 2-модифицированные пиримидины.

SELEX способ включает в себя объединение отобранных олигонуклеотидов с другими отобранными олигонуклеотидами и неолigonуклеотидными функциональными единицами, описанными в заявках на Пат. США Сер. №08/284063, поданной 2 августа 1994, и Сер. №08/234997, поданной 28 апреля 1994, соответственно. Эти заявки допускают комбинацию широкого ряда форм и других свойств, и эффективных свойств амплификации и репликации, олигонуклеотидов с желательными свойствами других молекул.

В своей наиболее главной форме SELEX способ может быть охарактеризован следующими стадиями:

1) Получают смесь нуклеиновых кислот различной последовательности. Смесь обычно включает области фиксированных последовательностей (т.е., каждый из представителей смеси содержит одни и те же последовательности в одном и том же месте расположения) и области статистических последовательностей. Области фиксированных последовательностей выбирают либо (а) чтобы помочь в стадиях амплификации, описанных ниже, (б) чтобы имитировать известную последовательность, которая связывается с мишенью, либо увеличить концентрацию данного структурного расположения (порядка чередования) нуклеиновых кислот в смеси. Статистические последовательности могут быть статистическими полностью (то есть вероятность нахождения основания в любой позиции составляет одну четвертую) или только частично статистическими (например, вероятность нахождения основания в любой позиции может быть выбрана на любом уровне между 0 и 100 процентами).

2) Смесь контактирует с выбранной мишенью при условиях, благоприятных для связывания между мишенью и представителями смеси. В этих обстоятельствах, взаимодействие между мишенью и нуклеиновыми кислотами смеси-кандидата можно рассматривать как образование пар нуклеиновая кислота-мишень между мишенью и теми нуклеиновыми кислотами, которые имеют самое сильное сродство к мишени.

3) Нуклеиновые кислоты с самым сильным сродством к мишени отделяют от нуклеиновых кислот с меньшим сродством к мишени. Из-за того, что в смеси-кандидате существует лишь чрезвычайно малое число последовательностей (и возможно только одна молекула нуклеиновой кислоты), соответствующих нуклеиновым кислотам с самым высоким сродством, обычно желательно

установить критерии разделения такие, что существенное количество нуклеиновых кислот в смеси-кандидате (приблизительно 5 - 50%) сохраняется во время разделения.

4) Эти нуклеиновые кислоты, отобранные во время разделения, как имеющие относительно более высокое сродство к мишени, затем амплифицируют, создавая новую смесь, которая обогащена нуклеиновыми кислотами, имеющими относительно более высокое сродство к мишени.

5) Повторяя стадии разделения и амплификации, указанные выше, заново образованная смесь содержит меньше и меньше последовательностей, и средняя степень сродства нуклеиновых кислот к мишени обычно увеличивается. Наконец, SELEX способом получают смесь, содержащую одну или небольшое число нуклеиновых кислот, представляющих те нуклеиновые кислоты из исходной смеси, которые имеют наивысшее сродство к молекуле-мишени.

SELEX патенты и заявки на патент описывают и тщательно разрабатывают этот способ в деталях. Здесь же изложены мишени, которые могут быть использованы, способы разделения нуклеиновых кислот в смеси-кандидате, и способы увеличения разделенных нуклеиновых кислот, чтобы генерировать обогащенную смесь-кандидат. SELEX патенты и заявки на патент, кроме того, описывают лиганды, получаемые с рядом видов мишеней, включая как белковые мишени, где белок является белком, связывающим нуклеиновую кислоту, так и белковые мишени, где белок не является белком, связывающим нуклеиновую кислоту. Поэтому SELEX способ может быть использован для того, чтобы обеспечить высоко-аффинные лиганды молекулы-мишени.

Молекулы-мишени являются предпочтительно белками, но могут также включать, среди других, углеводы, пептидогликаны и ряд небольших молекул. Как и в случае белковых антигенов, антигена нуклеиновых кислот (олигонуклеотидные лиганды) могут быть применены для торпедирования биологических структур, таких как поверхности клеток или вирусы, посредством специфического взаимодействия с молекулой, которая является неотъемлемой частью той биологической структуры. Олигонуклеотидные лиганды выгодны тем, что они не ограничены собственной толерантностью, как обычные антигены. Кроме того, антигена нуклеиновых кислот не требуют животных и клеточных культур для синтеза или получения, поскольку SELEX есть полностью *in vitro* способ. Известно, нуклеиновые кислоты могут связываться с комплементарными последовательностями нуклеиновых кислот. Это свойство нуклеиновых кислот широко используют для определения, подсчета и выделения молекул нуклеиновых кислот. Таким образом, способы данного изобретения, как полагают, не включают эти хорошо известные способности к связыванию между нуклеиновыми кислотами. В частности, способы данного изобретения, относящиеся к использованию антигенов нуклеиновых кислот, не включают известные связывающие средства между молекулами нуклеиновых кислот. Известно, что ряд белков функционирует путем связывания с нуклеино-

выми последовательностями, такие как регуляторные белки, которые связываются с нуклеиновыми последовательностями оператора. Такая способность некоторых нуклеиновых кислот, связывающих белки, связываться с их природными сайтами, например, применена для определения, подсчета, изоляции и очистки таких белков. Способы данного изобретения, относящиеся к использованию олигонуклеотидных лигандов, как полагают, не включают известное связывающее сродство между белками, связывающими нуклеиновую кислоту, и последовательностями нуклеиновых кислот, с которыми они, как известно, связываются. Однако, используя SELEX, могут быть разработаны новые, не встречающиеся в природе последовательности, которые связываются с теми же белками, связывающими нуклеиновые кислоты. В частности, олигонуклеотидные лиганды данного изобретения связываются с такими молекулами-мишенями, которые включают (содержат) трехмерную химическую структуру, другую чем полинуклеотид, которая связывается с указанным олигонуклеотидным лигандом через механизм, который преимущественно зависит от спаривания оснований Уотсон-Крика или образования тройной спирали, где указанный олигонуклеотидный лиганд не является нуклеиновой кислотой, имеющей известную физиологическую функцию будучи связанной молекулой-мишенью.

Следует иметь в виду, что SELEX позволяет очень быстро определять последовательности нуклеиновых кислот, которые могут связываться с белком и, таким образом, может быть легко использован для определения структуры неизвестного оператора и последовательностей связывающего сайта, и эти последовательности затем могут быть применены для описываемых здесь применений SELEX, таким образом, представляет собой общий способ использования молекул нуклеиновой кислоты для определения, подсчета, изоляции и очистки белков, которые, как известно, не связывают нуклеиновые кислоты. Кроме того, некоторые антитела нуклеиновых кислот, выделяемые с помощью SELEX, могут также применяться для воздействия на функцию, например, ингибировать, усиливать или активировать функцию, конкретных молекул-мишеней или структур. В частности, антитела нуклеиновых кислот могут применяться для ингибирования, усиления или активации функции белков.

Олигонуклеотиды, используемые в конъюгатах согласно изобретению, получают в предпочтительном варианте воплощения согласно описанному ниже способу.

Так, подходящие олигонуклеотиды могут быть получены тем, что смесь олигонуклеотидов, содержащую статистические последовательности, вносят вместе со структурой-мишенью, и некоторые олигонуклеотиды демонстрируют повышенное сродство к структуре-мишени относительно смеси олигонуклеотидов, последние отделяют от остатка олигонуклеотидной смеси, затем олигонуклеотиды с повышенным сродством к структуре-мишени амплифицируют с получением смеси олигонуклеотидов, которая демонстрирует повышенное содержание олигонуклеотидов, которые свя-

заны со структурами-мишенями.

В способе сначала получают ДНК цепь подходящим путем с помощью химического синтеза. На 3'-конце эта ДНК цепь имеет известную последовательность, которую используют как промотор для РНК-полимеразы, и в то же время эта последовательность комплементарна праймерной последовательности для полимеразно-цепевой реакции (PCR, ПЦР). В особенно предпочтительном варианте воплощения, в этом случае, включен промотор для T7 РНК-полимеразы. Затем на промоторе синтезируют статистическую последовательность. Статистическая последовательность может быть получена тем, что подходящие четыре основания вводят в машину синтеза в том же самом отношении. Таким образом, получают полностью статистические ДНК последовательности. В предпочтительном варианте воплощения длина статистической последовательности составляет около 15 до 100 нуклеотидов. Другую ДНК последовательность, которая может быть использована для полимеразно-цепевой реакции (PCR), синтезируют на этом ДНК участке со статистической последовательностью.

После синтеза этой ДНК цепи последнюю транскрибируют в комплементарную РНК цепь с помощью РНК полимеразы. В предпочтительном варианте воплощения, в этом случае, используют T7 РНК полимеразу. При транскрипции, нуклеотиды, которые модифицированы, представляют РНК полимеразе. В особенно предпочтительном варианте воплощения рибозу модифицируют в 2-положении. В этом случае может быть включено замещение атома водорода или гидроксильной группы алкокси группой, предпочтительно метокси, amino или фтором. РНК олигонуклеотиды, полученные этим способом, затем используют в селекциях.

В селекционном способе РНК олигонуклеотиды смешивают (вносят) вместе со структурой-мишенью. Как полагают, структура-мишень означает структуру, с которой олигонуклеотид должен связываться специфически и с высоким сродством.

Таковыми структурами являются, например, макромолекулы, тканевые структуры высших организмов, таких как животные или люди, органы или части органов, клетки, в частности, опухолевые клетки или опухоли.

В этой связи, структура-мишень не должна быть в абсолютно чистой форме, она может также присутствовать на встречающемся в природе органе или на поверхности клетки. Преимущественно в способе селекции возможно добавление полиамино (tPHK, гепарин), плазмы или цельной крови в SELEX реакцию.

Если здесь включают изолированный белок, то последний может быть связан с твердой фазой, например, фильтром. При селекции используют избыток структуры-мишени относительно РНК смеси. При инкубации молекулы конкретных олигонуклеотидов связываются на структурах-мишенях, в то время как несвязанные олигонуклеотиды отделяют от смеси, например, путем промывки.

Затем олигонуклеотидные молекулы отделяют

от молекул-мишеней или удаляют промыванием соответствующими буферами или растворителями

С помощью обратной транскриптазы найденный РНК олигонуклеотид подвергают транскрипции в комплементарную ДНК цепь

Поскольку полученная ДНК цепь содержит праймерные последовательности (или промоторные последовательности) на обоих концах, амплификацию найденных ДНК последовательностей можно осуществить просто с помощью полимеразно-цепевой реакции

ДНК олигонуклеотиды, амплифицированные таким путем, затем снова транскрибируют с помощью ДНК полимеразы в РНК олигонуклеотиды, и таким образом полученные РНК олигонуклеотиды могут быть использованы в последующей стадии селекции (как описано выше).

После отделения связавшихся РНК олигонуклеотидов, полученных во второй стадии селекции, от молекул-мишеней, последние снова транскрибируют в ДНК с помощью обратной транскриптазы, и таким образом полученные комплементарные ДНК олигонуклеотиды амплифицируют с помощью полимеразно-цепевой реакции, и затем снова транскрибируют с помощью РНК полимеразы в РНК олигонуклеотиды, которые пригодны для последующей стадии селекции

Оказалось, что требуемые высокие специфичности и высокие связывающие средства можно получить, если стадии селекции повторять несколько раз. Изредка, требуемую олигонуклеотидную последовательность можно получить уже после одной или двух стадий селекции. Как только требуемая специфичность и связывающее средство между структурой-мишенью и олигонуклеотидом получена, олигонуклеотид(ы) может быть секвенирован и, как результат, последовательность специфически связывающих олигонуклеотидов может быть определена

Особое преимущество в этом способе заключается в том, что этот способ может быть использован не только с соответствующими белками, но также и *in vivo*. Однако, вышеупомянутый способ селекции может быть также осуществлен на очищенных структурах-мишенях. Но существенно, особенно для *in vivo* диагностики, что специфичность олигонуклеотидов обеспечивается структурой-мишенью в живой окружающей среде. Поэтому селекционные способы можно также проводить на клетках или клеточных культурах, на тканях или тканевых сечениях, на кровоснабжаемых органах и даже на живых организмах

В этом случае преимущество в том, что модифицированные олигонуклеотиды могут противостоять деградации почти вездесущими РНК-азами. Как результат, требуемые олигонуклеотидные последовательности сами аккумулируются в способах селекции на живых организмах, поскольку соответствующие встречающиеся в природе олигонуклеотиды должны деградироваться РНК-азами

Олигонуклеотидный радикал N может (содержать) один или более соединяющих компонентов В, или заместителей В-К, которые могут быть выбраны независимо один от другого. Здесь же за-

явлены олигонуклеотидные конъюгаты, которые содержат от 1 до 10 идентичных или от 210 различных соединяющих компонентов В. Особенно предпочтительны олигонуклеотидные конъюгаты с одним или двумя соединяющими компонентами В

Соединяющий компонент В соединяет олигонуклеотидный радикал N с комплексообразующим агентом или комплексом К

Преимущественно, в качестве донорных атомов могут быть использованы полидентат, комплексообразующие лиганды с открытой цепью или циклические комплексообразующие лиганды с О, S и N

В качестве примеров для комплексообразующего-агента К радикалов могут быть упомянуты полиаминополикарбоновые кислоты, уменьшенные на атом водорода, гидроксильную группу и/или уксуснокислую группу, этилендиаминтетрауксусная кислота, диэтилентриаминпентауксусная кислота, транс-1,2-циклогександиаминтетрауксусная кислота,

1,4,7,10-тетраазациклододекантетрауксусная кислота,

1,4,7-триазациклононантиуксусная кислота,

1,4,8,11-тетраазатетрадекантетрауксусная кислота,

1,5,9-триазациклододекантриуксусная кислота,

1,4,7,10-тетраазациклододекантриуксусная кислота, и

3,6,9,15-тетраазабицикло-[9,3,1]-пентадека-1(15),11,13-триентиуксусная кислота

Соответствующие комплексообразующие агенты описаны, например, в EP 0485045, EP 0071564 и EP 0588229, в OE 4310999 и DE 4311023, а также US 4965392

Для иллюстрации варьируемых возможностей комплексообразующих агентов К согласно данному изобретению, делается ссылка на рисунки 1 - 3, в которых несколько преимущественных структур компилированы. Эти рисунки подразумевают пример селекции и не ограничивают данное изобретение каким-либо способом в отношении представляемых комплексообразующих агентов

Комплексообразующий агент К может содержать все радиоактивные изотопы, обычно используемые в ядерной медицине для диагностических и терапевтических целей, в виде их ионов металлов. Могут быть также использованы стабильные изотопы, которые возбуждаются внешним облучением, чтобы испускать диагностическое или терапевтическое излучение, или изотопы, которые превращаются излучением извне в радиоактивные изотопы

Изотопы, пригодные для данного изобретения, выбирают из элементов с атомными номерами 5, 21 - 29, 31, 39, 42 - 44, 49, 57 - 83 или 85

Для использования соединения согласно изобретению в качестве радиофармацевтического средства комплексообразующий агент содержит радиоактивный элемент. Для этой цели пригодны все радиоактивные элементы, которые способны оказывать терапевтическое или диагностическое действие *in vivo* или *in vitro*. Предпочтительными являются радиоактивные изотопы элементов меди, висмута, технеция, рения или индия. Особенно

предпочтительны  $^{99m}\text{Tc}$ -комплексы

Если соединения общей формулы 1 согласно изобретению содержат позитрон-испускающие изотопы, такие как, например, Sc-43, Sc-44, Fe-52, Co-55, Ga-68 или Cu-61, последние могут быть использованы в позитрон эмиссионной томографии (ПЭТ, PET)

Если соединения общей формулы 1 согласно изобретению содержат гамма-излучение-испускающие изотопы, такие как, например, Tc-99m или In-111, то их можно использовать в синглетной протонной эмиссионной томографии (СПЭТ, SPECT)

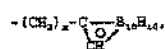
Соединения согласно изобретению могут быть использованы также в радиотерапии в виде их комплексов с радиоизотопами, такими как, например, Ir-192

Соединения согласно данному изобретению могут быть также использованы в радиоиммунотерапии или радиационной терапии. Последние отличаются от соответствующей диагностики только количеством и типом используемого изотопа. В этом случае цель состоит в разрушении клеток опухоли высокоэнергетическим коротковолновым излучением в самой маленькой, насколько это возможно, области. Подходящими  $\beta$ -излучающими ионами являются, например, Sc-46, Sc-47, Sc-48, Ga-72, Ga-73, Y-90, Re-186 или Re-188. Подходящими  $\alpha$ -излучающими ионами, имеющими небольшие периоды полураспада, являются, например, At-209, At-211, Bi-211, Bi-212, Bi-213 и Bi-214, и предпочтительным является Bi-212. Подходящим протон- и электронизлучающим ионом является  $^{158}\text{Gd}$ , который может быть получен из  $^{157}\text{Gd}$  путем нейтронного захвата.

Если агент согласно данному изобретению предназначен для использования в данном варианте радиационной терапии, предложенной R. L. Mills et al. (Nature 336, 787 (1988)), то центральный ион должен быть получен из Mossbauer изотопа, такого как, например,  $^{57}\text{Fe}$  или  $^{151}\text{Eu}$ .

Те группы карбоксильных кислот, которые не требуют для комплексообразования ионов металлов с атомными номерами с 21 по 29, 31, 39, 42 по 44, 49, 57 по 83 или 85, могут произвольно присутствовать в виде солей неорганических или органических оснований, таких как гидроксиды и карбонаты щелочного металла или щелочно-земельного металла, особенно гидроксид натрия и калия, или аммиак и алкиламины, или аминокислота, или в виде сложного эфира или амида.

Кроме того, могут быть использованы соединения, которые возбуждаются нейтронами с испусканием частиц и/или излучения. Особенно эффективен в этом случае гадолиний. Преимущественно, кроме того, могут быть использованы те соединения, которые содержат изотоп бор-10. В таких случаях K может иметь структуру



в которой X обозначает целое число от 1 до 10.

Кроме того, изобретение относится к способам получения конъюгатов согласно изобретению.

Так, конъюгаты, в которых соединяющий компонент В связан на 5'-конце олигонуклеотида, можно получить путем взаимодействия олигонуклеотида с фосфорамидитным производным (Tetrahedron 49, 1925 - 1963 (1993)). По этому концу 5'-гидроксигруппа олигонуклеотида подвергается взаимодействию с фосфорамидитом общей формулы  $\text{PR}'(\text{NR}_2'')\text{OR}''$ . В этом случае R' обозначает алкильную, алкокси или арилалкокси группу, произвольно содержащую N, NO<sub>2</sub>, Si или SO<sub>2</sub>, с 1 до 20 C атомов, такую как метил, этил, пропил, бутил, пентил, гексил, метокси, этокси, пропилокси, бутилокси, бензилокси или фенилэтокси, которая произвольно может быть замещена. В качестве заместителей особенно используют циано и нитро группы. Преимущественно, могут быть, например, использованы метокси,  $\beta$ -цианэтокси или нитрофенилэтокси группы. Особенно предпочтительны  $\beta$ -цианэтокси группы. R'' является C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> алкильным радикалом, и особенно предпочтительными являются этильный и пропильный радикалы. R''' представляет алкильную или арилалкильную группу, произвольно содержащую S, O, N, CN, NO<sub>2</sub> или галоид, с 1 до 20 C атомов. Предпочтительно используют защищенные amino и тиоалкильные радикалы, а также защищенные amino и тиоалкильные радикалы. Особенно предпочтительными являются 6-амино-гексил, 6-тиогексил, 3,6,9-триокса-11-амино-ундецил и 3,6-диокса-8-амино-октанильные группы. В качестве защитных групп обычно можно использовать обыкновенную N- или S-защитную группу. Например, подходящими являются трифторацетил, фталимидо и монометокситрилитильные группы.

В особенно предпочтительном варианте воплощения данного изобретения,  $\beta$ -цианэтил-N,N-диизопропиламино-6-(трифторацетамидо)-1-гексил-фосфорамидит используют в качестве фосфорамидитного производного.

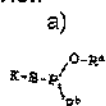
В другом предпочтительном варианте воплощения данного изобретения  $\beta$ -цианэтил-N,N-диизопропиламино-(3,6,9-триокса-11-фталимидо-1-ундецил)-фосфорамидит используют в качестве фосфорамидитного производного.

В другом варианте воплощения данного изобретения соединяющий компонент В связан на 3'-конце олигонуклеотида N путем, аналогичным пути, описанном выше, при помощи фосфорсодержащей группы.

Вышеописанную реакцию между олигонуклеотидом и фосфорамидитом проводят по схеме твердо-фазного синтеза, и олигонуклеотид находится на колонке автоматического синтезатора. После получения олигонуклеотида требуемой последовательности 5'-гидроксигруппу олигонуклеотида обрабатывают, например, трихлоруксусной кислотой и подвергают взаимодействию с фосфорамидитом, продукт реакции окисляют и выделяют. Затем, таким образом полученное олигонуклеотидное производное связывают по концевой amino или тиольной группе с комплексообразующим агентом или комплексом K произвольно при помощи другой линкерной группы. Радикал, связанный на первой стадии при помощи фосфорсодержащей группы на олигонуклеотиде, затем образует, вместе с произвольно присутствующей

дополнительной линкерной группой, соединяющий компонент В

Сцепление между олигонуклеотидом и комплексообразующим агентом может также происходить таким образом, что свободная 5'-гидроксильная группа олигонуклеотида взаимодействует с комплексообразующим агентом или комплексом, который терминально несет способный образовывать связь фосфорсодержащий радикал. Такой радикал может быть описан формулой



где  $\text{R}^a$  обозначает  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкильный радикал, который произвольно несет циано группу в  $\beta$ -положении,

$\text{R}^b$  обозначает вторичную amino группу и К и В имеют указанное значение, или формулой

b)



где  $\text{R}^c$  обозначает катион триалкиламмоний и К и В имеют упомянутое значение, или формулой

c)



где  $\text{R}^d$  обозначает арильный радикал, произвольно замещенный одним или более атомами галогена и/или одной или более нитро группами, или  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкильный радикал, который произвольно замещен в  $\beta$ -положении циано группой, и К, В и  $\text{R}^e$  имеют упомянутое значение, и при использовании радикала формулы а) стадия окисления в фосфат имеет место после завершения реакции связывания. В обоих случаях радикал  $-\text{OR}^a$  или  $-\text{OR}^c$  произвольно может быть отщеплен при гидролизе.

Связывание олигонуклеотидного производного с помощью линкера с комплексообразующим агентом или комплексом может также происходить на твердой фазе на колонке автоматического синтезатора. Соединение согласно изобретению может быть затем отделено от твердого носителя путем разделения.

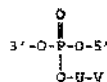
Сцепление олигонуклеотидного производного с линкером может иметь место не только при помощи 5'-ОН группы сахара концевой нуклеотида, но также при помощи других функциональных групп, которые могут быть генерированы из 5'-ОН группы, таких как, например, amino или карбокси группы. Такие нуклеотиды, несущие amino или карбокси группы, известны и могут быть легко по-

лучены. Синтез 5'-дезоксид-5'-аминоуридина описан в J Med Chem 22, 1273 (1979), а также в Chem Lett 6, 601 (1978). 4'-Карбокси-5'-дезоксидуридин доступен, как описано в J Med Chem 21, 1141, (1978), или Nucleic Acids Symp Ser 9, 95, (1981).

Связывание с комплексообразующим агентом в таком случае происходит при помощи линкера, несущего карбоновую кислоту или amino группу, способом, известным специалистам в данной области. Затем линкер образует соединяющий компонент В вместе с  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{-4'}$  или  $-\text{CO}-4'$  группой.

Следует отметить, что распределение конъюгатов согласно изобретению в нуклеотидном радикале, соединяющем компоненте и комплексообразующем агенте или комплексе происходит исключительно формально и поэтому независимо от действительной синтетической структуры. Так, например, в вышеупомянутом случае группа  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{-4'}$  или  $-\text{CO}-4'$  рассматривается как принадлежащая соединяющему компоненту В, в то время как олигонуклеотид, уменьшенный в 4-положении на  $\text{CH}_2\text{-OH}$  группу, обозначают как олигонуклеотидный радикал N.

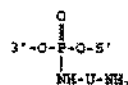
Способ получения конъюгатов, в которых соединяющий компонент с фосфордиэфирным или фосфоротиоатным мостиками, уменьшенными на ОН группы, имеет место, состоит в том, что сначала две сахаридные единицы связывают с динуклеотидом (смотри, например, Chem Lett 1305 (1933)). В этом случае сначала получается триэфир формулы



в которой U обозначает соответствующий алкиленовый радикал и V обозначает защищенную amino или серную группу. После отщепления, например, amino защитной группы комплексообразующий агент может быть произвольно связан способом, известным специалистам в данной области, при помощи линкера с amino группой - например, в форме амидной связи. Линкер затем образует соединяющий компонент В вместе с группой  $\text{O-U-V'}$  (в которой V' обозначает группу -NH).

Альтернативный способ состоит в том, что фосфотриэфир, проходя через промежуточное положение (например, путем реакции с 1,5-диаминопентаном), подвергают аминолитизу (смотри Biochemistry 27, 7237 (1988) или J Am Chem Soc 110, 4470 (1988)).

Полученные таким образом соединения формулы



могут быть связаны, как описано выше, с комплексообразующим агентом произвольно при помощи линкера.

Для целей связывания пригодны также динуклеозид-фосфат-мононуклеотиды (смотри J Am Chem Soc 111, 9117 (1983) и Nucl Acids Res 20, 5205 (1992))

Нуклеоснования представляют особенно большое разнообразие для связывания комплексобразующих агентов с нуклеотидами. Связывание с помощью амино групп в 2-положении в пуринах и в 4-положении в пиримидинах может происходить непосредственно. Но часто более выгодно сначала модифицировать пурины или пиримидины и связать эти модифицированные основания с комплексобразующими агентами (произвольно с помощью дополнительных линкеров). Подходящие модифицированные нуклеоснования описаны, например, в Biochemie [Biochemistry] 71, 319 (1989), Nucl Acids Res 16, 4937 (1988) или Nucleosides Nucleotides 10, 633 (1991)

Альтернативный способ связывания с помощью нуклеоснований заключается в палладий-катализируемом связывании бром или йод нуклеоснований с функциональными радикалами (Biogenic and Medical Chemistry Letter V, 361 (1994)). При помощи этих функциональных радикалов комплексобразующий агент может быть затем произвольно связан с нуклеоснованием посредством другого линкера согласно известным способам. В качестве функциональных радикалов в 5-положении пиримидина и в 8-положении пурина, могут быть упомянуты в качестве примеров акриловый сложный эфир или аллиламин (смотри Nucl Acids Res 14, 6115 (1986) и Nucl Acids Res 16, 4077 (1988)). Другой альтернативный способ получения в 5-положении модифицированных пиримидинов, особенно для введения функциональных групп, таких как карбонильная, алкенильная или арильная группы в 5-положении, и улучшенный палладиевый катализатор, способный связывать модифицированные группы в 5-положении пиримидинов, описан в заявке на Пат. США Сер. №08/076735, поданной 14 июня 1993. Галоидные производные, используемые в качестве предшественника, могут быть получены, как описано в Biophys J 44, 201 (1983), J Am Chem Soc 86, 1242 (1964) или Chem Commun 17 (1987).

Получение металлических комплексов согласно изобретению из свободных от металла олигонуклеотидных конъюгатов проводят, как раскрыто в DE 3401052, с помощью оксида металла или соли металла (например, нитрат, ацетат, карбонат, хлорид или сульфат) требуемого изотопа металла, который растворяют или суспендируют в воде и/или низшем спирте (таком как метанол, этанол или изопропанол) и который затем подвергают взаимодействию с раствором или суспензией эквивалентного количества олигонуклеотидного конъюгата, содержащего комплексобразующий агент, и затем, при необходимости, присутствующие кислые атомы водорода замещают катионами неорганических и/или органических оснований, или аминокислоты или свободные группы карбоновых кислот превращают в амиды аминокислот.

Нейтрализацию возможно все же присутствующих свободных кислых групп проводят с помощью неорганических оснований (например,

гидроксиды, карбонаты или бикарбонаты) например, натрия, калия, лития, магния или кальция и/или органических оснований, таких как, среди других, первичные, вторичные и третичные амины, такие как, например, этаноламин, морфолин, глюкамин, N-метил- и N,N-диметил-глюкамин, а также основные аминокислоты, такие как, например, лизин, аргинин и орнитин, или с помощью амидов первоначально нейтральных или кислых аминокислот.

Получение фармацевтических агентов согласно данному изобретению происходит также путем, известным в данной области, при помощи олигонуклеотидных конъюгатов согласно изобретению - произвольно при помощи добавления добавок, обычных для галеновых препаратов - которые суспендируют или растворяют в водной среде, и затем суспензию или раствор произвольно стерилизуют или стерилизуют фильтрацией. Подходящими добавками являются, например, физиологически безвредные буферы (такие как, например, триметамин), добавки комплексобразующих агентов (такие как, например, диэтилен-триаминпентауксусная кислота) или - при необходимости - электролиты, такие как, например, хлорид натрия или - при необходимости - антиоксиданты, такие как, например, аскорбиновая кислота, или, особенно для пероральных форм введения, маннит или другие осмотически активные вещества.

Если суспензии или растворы предлагаемых фармацевтических агентов в воде или физиологическом растворе требуются для энтерального применения или других целей, то их можно смешать с одним или более адъювантов, обычных для галеновых препаратов (например, метилцеллюлоза, лактоза, маннит), и/или с одним или более поверхностно-активных веществ (например, лектины, Твин (Tween<sup>TR</sup>, Myl<sup>TR</sup>)).

Фармацевтические агенты согласно изобретению предпочтительно содержат от 0,1 мкмоль/л до 3 ммоль/л олигонуклеотидных конъюгатов согласно изобретению и обычно дозируются в количествах от 0,01 ммоль/кг - 60 ммоль/кг. Они предназначены для энтерального и парентерального применения.

При in vivo использовании в медицине, меченые соединения обычно дозируют в количествах меньших, чем 10-10 ммоль/кг веса тела, и точную дозу можно широко варьировать как функцию области тела, подлежащей исследованию, но особенно также как функцию соответственно выбранного способа исследования. Исходя из среднего веса тела 70 кг, количество радиоактивности для диагностических применений находится между 40 и 1100 МБк, предпочтительно 200 - 800 МБк, для терапевтических применений - 1 - 500 МБк, предпочтительно 10 - 100 МБк на применение. Введение обычно проводят внутривенно, внутриартериально, внутритканево, перитонеально или внутрь опухоли, и внутривенное введение является предпочтительным. В общем, вводят на исследование от 0,01 до 20 мл агента, о котором идет речь.

Данное изобретение относится также к способу обнаружения структур-мишеней. В этом случае,

одно или более из вышеописанных соединений контактирует с образцом, подлежащим изучению *in vivo* или *in vitro*. В этом случае, олигонуклеотидный радикал N связывается специфически и с высоким связывающим средством со структурой-мишенью, подлежащей обнаружению.

Если структура-мишень присутствует в образце, то она может быть определена там на основе сигнала. Способ особенно пригоден для неинвазивной диагностики заболеваний. В этом случае, одно или более из вышеописанных соединений вводят *in vivo*, и можно определить с помощью сигнала, присутствует ли структура-мишень, с которой олигонуклеотидный радикал N связывается специфически и с высоким сродством, в организме, подлежащем исследованию.

Но помимо просто обнаружения структур-мишеней в образцах, подлежащих исследованию, последнюю можно также специфически разрушить. В этом аспекте, соединения данного изобретения особенно пригодны в радиотерапии, например, при лечении рака.

Другой вариант воплощения данного изобретения включает диагностический набор для *in vivo* определения структур-мишеней, который содержит один или более из вышеупомянутых соединений.

Конъюгаты и агенты согласно изобретению отвечают многим требованиям, которые должны предъявляться к фармацевтическому агенту для радиотерапии и диагностики. Они особенно отличаются высокой специфичностью или сродством по отношению к рассматриваемой структуре-мишени. Что касается известных олигонуклеотидных конъюгатов, конъюгаты предлагаемого изобретения демонстрируют особенно высокую *in vivo* стабильность. Это достигается путем замещения 2-гидроксильной группы и включением модифицированных тимидиновых последовательностей по концевым гидроксильным группам нуклеотидов. Неожиданно, что специфичность олигонуклеотида существенно не ухудшается ни путем этой модификации, ни путем связывания с комплексообразующим агентом. Другими преимуществами являются контролируемая фармакокинетика, а также требуемая совместимость.

#### Краткое описание фигур

Различные другие цели, признаки и сопутствующие преимущества настоящего изобретения будут более полно оценены, как они же становятся более понятными при рассмотрении в сочетании с прилагаемыми фигурами, в которых:

Фиг 1 показывает отбор циклических комплексообразующих агентов, к которые могут быть преимущественно использованы для данного изобретения. "b" обозначает место связывания на соединяющем компоненте B.

Фиг 2 и 3 показывают отбор комплексообразующих агентов K с открытой цепью, которые могут быть преимущественно использованы для данного изобретения.

Следующие примеры приведены для более подробной иллюстрации изобретения.

Полинуклеотиды, описанные в примерах, содержат модифицированные соединения.

Они означают

A, U, C, G	нуклеотиды содержат 2'-ОСН <sub>3</sub> группу
*	нуклеотидная связь - метил фосфонат
**	нуклеотидная связь - тисфосфонат
***	нуклеотидная связь - дитиофосфонат

Без дальнейших уточнений, полагают, что любой специалист в данной области может, используя предшествующее описание, использовать данное изобретение в его наиболее полном объеме. Нижеследующие предпочтительные конкретные варианты воплощения изобретения следует поэтому рассматривать как просто иллюстративные, и не ограничивающие объем данного изобретения.

В нижеследующих примерах все температуры приводятся (некорректированными) в градусах Цельсия, и, за исключением особо оговоренных случаев, все части и процентные содержания являются весовыми.

Полное раскрытие всех заявок, патентов и публикаций, цитируемых выше и ниже, включая DE 4424922,5, поданной 14 июля 1994, включены здесь в качестве уровня техники.

#### Пример 1

а) 5'(6-Амино-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-

CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*  
T\*T\*T-3'

30-мерный олигонуклеотид

5'-

CUCAUGGAGCGCGCAAGACGAAUAGCUACAUA -3', идентифицированный по SELEX способом, с модификацией последовательности T\*T\*T-T-3', расположенной против хода транскрипции, получают обычным путем в автоматическом синтезаторе Pharmacia company (смотри Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed F. Eckstein, Oxford University Press Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид также присутствует на колонке твердого носителя. Путем реакции с раствором трихлоруксусной кислоты в дихлорметане открывают 5'-гидроксильную группу. Нагрузка колонки составляет около 10мг 35-мерного олигонуклеотида. Чтобы соединить линкер, колонку подвергают взаимодействию с ацетонитрильным раствором 50мкмоль β-циано-этил-N,N-диизопропиламино-6-(трифторацетиламино)-1-гексил-фосфорамидита (полученного согласно Nucl. Acids Res. 16, 2659 - 2669 (1988)) в присутствии тетразола. Окисление образовавшегося фосфита в полностью защищенный фосфотриэфир проводят с помощью йода в тетрагидрофуране. Затем колонку промывают последовательно метанолом и водой. Чтобы удалить модифицированный олигонуклеотид от твердого носителя, содержимое колонки транспортируют в мультиампулу, смешивают с 5мл 30% раствора аммиака, сосуд герметизируют и встряхивают на протяжении ночи при 55°C. Затем охлаждают до 0°C, центрифугируют, носитель промывают 5мл воды, и объединенные водные фазы подвергают лиофильной сушке.

Для очистки, твердое вещество помещают в 2мл воды, смешивают с 2мл 0,5М раствора ацета-

та аммония и смешивают с 10мл этанола, оставляют стоять на протяжении ночи при -20°C, центрифугируют, и остаток промывают 1мл этанола (-20°C) и, наконец, сушат в вакууме при комнатной температуре. 8мг названного соединения получают в виде бесцветного порошка.

б) 10-[5-(2-карбоксифенил)-2-гидрокси-5-оксо-4-аза-пентил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаациклододекан

50г (144,3ммоль) 1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаациклододекана (DO3A) растворяют в 250мл воды и pH доводят до 13 при помощи 5 N раствора гидроксида натрия. Затем раствор 38,12г (187,6ммоль) N-(2,3-эпоксипропил)-фталимида в 100мл диоксана прикалывают по капле в пределах одного часа, перемешивают в течение 24 часов при 50°C и pH поддерживают при 13 путем добавления 5 N раствора гидроксида натрия. Раствор доводят до pH2 с помощью 10% хлористоводородной кислоты и выпаривают досуха в вакууме. Остаток растворяют в небольшом количестве воды и очищают на ионообменной колонке (Reillex<sup>(R)</sup> = поли-(4-винил)-пиридин, колонку элюируют водой). Основные фракции концентрируют путем испарения в вакууме, и остаток подвергают окончательной очистке при помощи хроматографии на RP-18 (LiChroPrep<sup>(R)</sup> = подвижный растворитель: градиент тетрагидрофуран/метанол/вода). После концентрирования испарением основных фракций, получают 63,57г (71% от теор.) аморфного твердого вещества.

Содержание воды 8,5%

Элементный анализ (относительно безводного вещества)

Рассч.	C	52,90	H	6,57	N	12,34
Найд.	C	52,65	H	6,68	N	12,15

с) 10-(3-Амино-2-гидрокси-пропил)-1,4,7-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаациклододекан

50г (88,1ммоль) названного соединения примера 1b кипятят с обратным холодильником в 300мл концентрированной хлористоводородной кислоты в течение 24 часов. Содержимое испаряют досуха, остаток растворяют в небольшом количестве воды и очищают на ионообменной колонке (Reillex<sup>(R)</sup> = поли-(4-винил)-пиридин, колонку элюируют водой). Основные фракции выпаривают досуха.

Выход 39г (95% от теор.) стекловидного твердого вещества.

Содержание воды 10,3%

Элементный анализ (относительно безводного вещества)

Рассч.	C	48,68	H	7,93	N	16,70
Найд.	C	48,47	H	8,09	N	16,55

д) 10-[7-(4-Нитрофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-аза-гептил]-1,4,7-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаациклододекан

9,84г (41,8ммоль) 3-(4-нитрофенил)-глутарового ангидрида (J Org Chem 26, 3856 (1961)) добавляют к 14,62г (34,86ммоль) назван-

ного соединения примера 1с) в 200мл диметил-формамида/20мл триэтиламина и перемешивают на протяжении ночи при комнатной температуре. Выпаривают досуха в вакууме. Остаток перекристаллизовывают из смеси изопропанол/уксусная кислота 95/5.

Выход 21,68г (95% от теор.) желтоватого твердого вещества.

Содержание воды 0,9%

Элементный анализ (относительно безводного вещества)

Рассч.	C	48,68	H	7,93	N	16,70
Найд.	C	48,47	H	8,09	N	16,55

е) 10-[7-(4-Аминофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-аза-гептил]-1,4,7-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаациклододекан

21,0г (32,07ммоль) названного соединения примера 1d) растворяют в 250мл этанола и добавляют 5г палладиевого катализатора (10% Pd на C). Содержимое гидрируют в течение ночи при комнатной температуре. Катализатор отфильтровывают, и фильтрат выпаривают досуха в вакууме.

Выход 19,63г (98% от теор.) твердого вещества кремового цвета.

Содержание воды 0,8%

Элементный анализ (относительно безводного вещества)

Рассч.	C	53,84	H	6,35	N	12,60
Найд.	C	53,73	H	6,45	N	12,51

ф) 10-[7-(4-Изотиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-аза-гептил]-1,4,7-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаациклододекан

12,4г (19,27ммоль) названного соединения примера 1е) растворяют в 200мл воды и добавляют 6,64г (57,8ммоль) тиофосгена в 50мл хлороформа. Содержимое перемешивают в течение 1 часа при 50°C. Охлаждают до комнатной температуры, органическую фазу отделяют, и водную фазу встряхивают дважды со 100мл хлороформа. Водную фазу выпаривают досуха, и остаток абсорбционно осаждают в 100мл изопропанола при комнатной температуре. Твердое вещество отфильтровывают и промывают эфиром. После сушки на протяжении ночи в вакууме (40°C) получают 12,74г (97% от теор.) твердого вещества кремового цвета.

Содержание воды 3,1%

Элементный анализ (относительно безводного вещества)

Рассч.	C	52,24	H	6,35	N	12,60	S	4,81
Найд.	C	52,37	H	6,44	N	12,48	S	4,83

г) Конъюгат 5-(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*TT\*TT\*TT-3' и 10-[7-(4-Изотиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-аза-гептил]-1,4,7-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаациклододекана

8мг олигонуклеотида, полученного в примере



1а), растворяют в 2,5мл  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  буфера (рН8,0) и смешивают с 1мг 10-[7-(4-изотиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-аза-гептил]-1,4,7-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекана (названное соединение примера 1f) Перемешивают в течение 5 часов при комнатной температуре, рН доводят до 7,2 путем добавления 0,01М хлористоводородной кислоты, и этот раствор подвергают ультрафильтрации через мембрану с пределом эксклюзии 3000 (Amicon YM3) и затем лиофильно сушат. Получают 7мг требуемого конъюгата

h)  $^{111}\text{Индий}$  комплекс тиомочевинного конъюгата 5'-(6-Амино-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T\*T-T-3' и 10-[7-(4-Изотиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-аза-гептил]-1,4,7-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекана

15мкл  $^{111}\text{Индий}$  (III) ацетатного раствора (350мкКи), (полученного из  $^{111}\text{Индий}$  (III) хлорида в 2М растворе ацетата натрия и доведенного до рН4,0 с помощью 0,1М хлористоводородной кислоты) добавляют к 135мкл раствора 1мг названного соединения примера 1g) в MES буфере, рН6,2 (MES = 2-(N-морфолино)-этилсульфоная кислота) рН доводят до 4,2 добавлением 0,01М хлористоводородной кислоты. Перемешивают в течение 1 часа при 37°C при рН4,2. Доводят до рН6 при помощи 2М раствора ацетата натрия и добавляют 10мкл 0,1М  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  = динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, чтобы комплексовать избыток  $^{111}\text{Индий}$ . Конечную очистку полученного таким образом меченого конъюгата (1h) проводят с помощью HPLC (ЖХВР) (вытеснительная хроматография TSK-400/MES-буфер). Фракции, содержащие меченый конъюгат, разбавляют обычным физиологическим раствором, доведенным до рН7,2 с помощью 0,01М раствора гидроксида натрия, и фильтруют. Полученный таким образом раствор представляет препарат, пригодный для радиодиагностики

#### Пример 2

а) Конъюгат 5'-(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир)35-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T\*T-T-3' и N-[2-амино-3-(4-изотиоцианатофенил)пропил]-транс-циклогексан-1,2-диамин-N,N',N'',N'''-пентауксусной кислоты

8мг олигонуклеотида, полученного в примере 1а), растворяют в 2,5мл  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  буфера (рН8,0) и добавляют 1мг N-[2-амино-3-(п-изотиоцианатофенил)пропил]-транс-циклогексан-1,2-диамин-N,N',N'',N'''-пентауксусной кислоты (полученной согласно Bioconjugate Chem 1, 59 (1990)), перемешивают в течение 5 часов при комнатной температуре, затем доводят рН до 7,2 с помощью 0,2М хлористоводородной кислоты, и раствор подвергают ультрафильтрации через мембрану с пределом эксклюзии 3000 (Amicon YM3) После лиофильной сушки получают 6мг тиомочевинного конъюгата 2а)

б) Висмут-212 комплекс конъюгата 5'-(6-

амино-1-гексил-фосфорная кислота- сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T\*T-T-3' и N-[2-амино-3-(4-изотиоцианатофенил)пропил]-транс-циклогексан-1,2-диамин-N,N',N'',N'''-пентауксусной кислоты

Раствор  $^{212}\text{Висмут}$ -тетраиодида в 0,1М йодистоводородной кислоте доводят до рН4 с помощью 2М уксусной кислоты. Аликвоту этого раствора активностью около 3мКи (mCi) добавляют к 1мг названного соединения примера 2а), растворенного в 0,5мл 0,02М MES-буфера и добавляют 0,5мл 0,15М раствора хлорида натрия. Перемешивают в течение 20 минут при комнатной температуре. Доводят до рН6 с помощью 2М раствора ацетата натрия и добавляют 20мкл 0,01М  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  раствора. Перемешивают в течение 20 минут. Очистку комплекса проводят с помощью HPLC (ЖХВР) (вытеснительная хроматография TSK-400/MES-буфер). Фракции радиоактивного конъюгата объединяют, разбавляют обычным физиологическим раствором и доводят до рН7,2 с помощью 0,1М раствора гидроксида натрия. После фильтрации получают препарат, пригодный для радиотерапии

#### Пример 3

а)  $^{111}\text{Индий}$ -111 комплекс конъюгата 5'-(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T\*T-T-3' и N-[2-амино-3-(4-изотиоцианатофенил)пропил]-транс-циклогексан-1,2-диамин-N,N',N'',N'''-пентауксусной кислоты

15мкл 15мкл  $^{111}\text{Индий}$  (III) ацетатного раствора (350мкКи), (полученного из  $^{111}\text{Индий}$  (III) хлорида в 2М растворе ацетата натрия и доведенного до рН4,0 с помощью 0,1М хлористоводородной кислоты) добавляют к 0,5мл раствора 1мг названного соединения примера 2а) в MES буфере, рН6,2 (MES = 2-(N-морфолино)-этилсульфоная кислота) рН доводят до рН5,0 добавлением 0,01М хлористоводородной кислоты. Перемешивают в течение 1 часа при 37°C при рН5,0. Доводят до рН6 при помощи 2М раствора ацетата натрия и добавляют 10мкл 0,1М  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  = динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, чтобы комплексовать избыток  $^{111}\text{Индий}$ . Конечную очистку полученного таким образом меченого конъюгата (1h) проводят с помощью ЖХВР (вытеснительная хроматография TSK-400/MES-буфер). Фракции, содержащие меченый конъюгат, разбавляют обычным физиологическим раствором, доведенным до рН7,2 с помощью 0,01М раствора гидроксида натрия, и фильтруют. Полученный таким образом раствор представляет препарат, пригодный для радиодиагностики

#### Пример 4

а) Конъюгат 5'-(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T\*T-T-3' и 2-(4-изотиоцианато-бензил)-диэтилентриамин-N,N',N'',N'''-пентауксусной кислоты

8мг олигонуклеотида, полученного в примере

1а), растворяют в 2,5мл  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  буфера (рН8,0) и добавляют 1мг 2-(4-изотиоцианато-бензил)-диэтилентриамин- $\text{N},\text{N}',\text{N}'',\text{N}'''$ -пентауксусной кислоты (полученной согласно Bioconjugate Chem 2, 187 (1991)). Перемешивают в течение 5 часов при комнатной температуре, затем рН доводят до 7,2 с помощью 0,01М хлористоводородной кислоты, и этот раствор подвергают ультрафильтрации через мембрану с пределом эксклюзии 3000 (Amicon YM3). После лиофильной сушки получают 6мг конъюгата тиомочевина.

б) Иттрий-90 комплекс конъюгата 5'-(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T\*T-T-3' и 2-(4-изотиоцианато-бензил)-диэтилентриамин- $\text{N},\text{N}',\text{N}'',\text{N}'''$ -пентауксусной кислоты

К раствору <sup>90</sup>Иттрия, растворенного в 0,05М растворе ацетата аммония, (прибл 380мКи), добавляют 1мг производного тиомочевина примера 4а) в 0,5мл 0,05М раствора ацетата аммония с рН6, доводят до рН5,2 с помощью 3М уксусной кислоты и перемешивают в течение 1 часа при комнатной температуре. Доводят до рН7,0 с помощью 0,01М раствора гидроксида натрия, и конъюгат очищают с помощью ЖХВР (T5K-400/MES-буфер). Основные фракции объединяют, разбавляют обычным физиологическим раствором и доводят до рН7,2 с помощью 0,01М раствора гидроксида натрия. После фильтрации получают препарат, пригодный для радиотерапии.

Пример 5

а) 5'-(6-Меркапто-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-

T\*T\*T\*TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAAUGA GAUU-3' (модифицированный лиганд для сериновой протеазы)

30-мерный-олигонуклеотид

5'-

AGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAAUGAGAUU-3' (посл №13 Пат. США №5270163), идентифицированный по SELEX способу, модифицированный в сахаридных звеньях и при помощи 5'-связанной последовательности 5 тимидинов, получают обычным путем в автоматическом синтезаторе Pharmacia company (смотри Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид также присутствует на колонке твердого носителя. Путем реакции с раствором трихлоруксусной кислоты в дихлорметане, открывают 5'-гидроксильную группу. Нагрузка колонки составляет около 10мг 35-мерного олигонуклеотида. Чтобы соединить линкер, колонку подвергают взаимодействию с раствором 50мкмоль β-цианоэтил-N,N-диизопропил-амино-3-третил-6-(меркапто)-фосфорамидита в ацетонитриле в присутствии тетразола. Окисление образовавшегося фосфита а полностью защищенный фосфор-этирфид проводят с помощью йода в тетрагидрофуране. Затем колонку промывают последовательно метанолом и водой. Чтобы удалить модифицированный олигонуклеотид от твер-

дого носителя, содержимое колонки транспортируют в мультиампулу, смешивают с 5мл 30% раствора аммиака, сосуд герметизируют и подвергают вибрации на протяжении ночи при 55°C. Затем охлаждают до 0°C, центрифугируют, носитель промывают 5мл воды, и объединенные водные фазы подвергают лиофильной сушке.

Для очистки твердое вещество помещают в 2мл воды, смешивают с 2мл 0,5М раствора ацетата аммония и смешивают с 10мл этанола, оставляют на всю ночь при -20°C, центрифугируют, и остаток промывают 1мл этанола (-20°C) и, наконец, сушат в вакууме при комнатной температуре.

Получают 9мг S-третилированного названного соединения.

Чтобы отщепить защитную третиловую группу, продукт растворяют в 0,5мл воды, смешанной с 0,2мл 1М раствора нитрата серебра и перемешивают в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем содержимое смешивают с 0,1мл 1М дитиотреитольного раствора. Через 15 минут центрифугируют, и супернатантный раствор экстрагируют несколько раз этилацетатом. После лиофилизации из водного раствора получают 8мг требуемого названного соединения.

б) 4-Бензилокси-N-метансульфонил-фенилаланин-метилловый эфир

19,58г хлорида метансульфоново́й кислоты вливают по капле в 50г 4-бензилокси-фенилаланин-метилловый эфир-гидрохлорида в 300мл пиридина при 0°C и перемешивают в течение 3 часов при 0°C. Выпаривают досуха в вакууме, и этот остаток растворяют в 500мл дихлорметана. Дважды встряхивают, каждый раз с 300мл 5N хлористоводородной кислоты, сушат сульфатом магния и концентрируют выпариванием в вакууме. Остаток перекристаллизовывают из 150мл метанола.

Выход 53,64г бесцветного кристаллического порошка.

с) 2-(4-Бензилоксибензил)-1-метансульфонил-1,4,7-триазагептан-3-он

37,2г 4-бензилокси-N-метансульфонил-фенилаланин-метилового эфира и 1,2л 1,2-диаминоэтана перемешивают в течение 3 часов при 80°C. Остаток выпаривают досуха и абсорбционно осаждают 200мл воды, осадок отсасывают, промывают до нейтральной реакции водой и сушат в течение ночи при 60°C.

Выход 37,68г кремового аморфного порошка.

д) 2-(4-Бензилоксибензил)-1-метансульфонил-7-(трет-бутил-оксикарбонил)-1,4,7-триазагептан-3-он

Раствор 16,23г 2-(4-бензилоксибензил)-1-метансульфонил-1,4,7-триазагептан-3-она и 4,76г триэтиламина в 2(30мл хлороформа смешивают при 0°C с раствором 10,27г ди-трет-бутил-дикарбоната в 50мл хлороформа. Перемешивают в течение 5 часов при комнатной температуре, встряхивают с 5% раствором карбоната натрия и водой, сушат над сульфатом магния и концентрируют выпариванием в вакууме. Остаток рекристаллизуют из 100мл метанола.

Выход 20,19г вспененного твердого вещества.

е) 2-(4-Гидроксибензил)-1-метансульфонил-7-

(трет-бутил-оксикарбонил)-1,4,7-триазагептан-3-он  
20г 2-(4-бензилоксибензил)-1-метансульфонил-7-(третбутилоксикарбонил)-1,4,7-триазагептан-3-она, растворенного в 300мл дихлорметана, перемешивают с 4г палладий-углерода (10%) в течение ночи в атмосфере водорода. Фильтруют, и раствор концентрируют выпариванием в вакууме.

Выход 18,17г стекловидной пены, которая затвердевает через несколько минут.

г) 2-[4-(3-Оксапропионовая кислота-бензиловый эфир)-бензил]-1-метансульфонил-7-(третбутилоксикарбонил)-1,4,7-триазагептан-3-он

15г 2-(4-гидроксибензил)-1-метансульфонил-7-(третбутил-оксикарбонил)-1,4,7-триазагептан-3-она, 8,56г бромуксусная кислота-бензильного эфира и 13,18г карбоната калия нагревают с обратным холодильником в 300мл ацетонитрила в течение 24 часов. Фильтруют и выпаривают досуха в вакууме. Остаток растворяют в 200мл дихлорметана, дважды встряхивают, каждый раз с 50мл воды. Органическую фазу сушат над сульфатом магния и концентрируют выпариванием в вакууме. Остаток хроматографируют смесью дихлорметан-гексан-ацетон (20/10/1) в качестве элюента.

Выход 10,06г вспененного твердого вещества.

д) 2-[4-(3-Оксапропионовая кислота-бензиловый эфир)-бензил]-1-метансульфонил-1,4,7-триазагептан-3-он

10г 2-[4-(3-Оксапропионовая кислота-бензиловый эфир)-бензил]-1-метансульфонил-7-(трет-бутилоксикарбонил)-1,4,7-триазагептан-3-она перемешивают в течение 1 часа при комнатной температуре со 100мл трифторуксусной кислоты. Выпаривают досуха в вакууме.

Выход 9,2г стекловидной пены, которая отверждается при стоянии.

е) 9-Хлоро-1-метансульфонил-2-[4-(3-Оксапропионовая кислота-бензиловый эфир)-бензил]-1,4,7-триаза-3,8-дион

9г 2-[4-(3-Оксапропионовая кислота-бензиловый эфир)-бензил]-1-метансульфонил-1,4,7-триазагептан-3-она и 1,78г триэтиламина растворяют в 200мл хлороформа. При 0°C 1,98г хлорацетил хлорида, растворенного в 20мл хлороформа, вливают по капле в течение 30 минут и затем перемешивают в течение 2 часов при 0°C. Промывают 100мл 5% хлористоводородной кислоты, дважды водой по 50мл каждый раз, сушат над сульфатом магния и выпаривают досуха в вакууме. Остаток хроматографируют на силикагеле смеси дихлорметан-этилацетат (20/1) в качестве элюента.

Выход 6,97г воскообразного твердого вещества.

ж) 9-Хлоро-1-метансульфонил-2-[4-(3-Оксапропионовая кислота-бензиловый эфир)-бензил]-1,4,7-триаза-3,8-дион

6,5г 9-Хлоро-1-метансульфонил-2-[4-(3-Оксапропионовая кислота-бензиловый эфир)-бензил]-1,4,7-триаза-3,8-диона, растворенного в 150мл дихлорметана, перемешивают с 2г палладий-углерода (10%) в течение ночи в атмосфере водорода. Фильтруют, и раствор концентрируют выпариванием в вакууме.

Выход 5,33 стекловидного твердого вещества.

з) 10-Ацетил-2-[4-(3-Оксапропионовая кислота)-бензил]-1-(метансульфонил)-10-тиа-1,4,7-триазадекан-3,8-дион

5г 9-хлоро-1-метансульфонил-2-[4-(3-Оксапропионовая кислота-бензиловый эфир)-бензил]-1,4,7-триаза-3,8-диона, растворенного в 80мл хлороформа, кипятят с обратным холодильником с 1,98г триэтиламина и 0,74г тиосукусной кислоты в течение 10 минут. Раствор выливают в 200мл охлаждаемой льдом 5% хлористоводородной кислоты, органическую фазу отделяют, сушат над сульфатом магния и концентрируют выпариванием в вакууме. После хроматографирования на силикагеле смесью гексан-этилацетат (3/1) получают 4,64г требуемого соединения в виде стекловидного твердого вещества.

к) 10-Ацетил-2-[4-(3-Оксапропионовая кислота)-(2,5-диоксо-пирропидин-1-ил)-эфир]-бензил]-1-(метансульфонил)-10-тиа-1,4,7-триазадекан-3,8-дион

4г 10-ацетил-2-[4-(3-Оксапропионовая кислота)-бензил]-1-(метансульфонил)-10-тиа-1,4,7-триазадекан-3,8-диона, 1,91г дициклогексилкарбодиимида, 4г N-гидроксисукцинимид и 30мг 4-диметиламинопиридина перемешивают в течение 24 часов в 20мл хлороформа при комнатной температуре. Затем перемешивают с 20мл диэтилового эфира, фильтруют, и остаток концентрируют выпариванием в вакууме. Остаток хроматографируют на силикагеле смесью дихлорметан-диоксан (10/1) в качестве элюента.

Выход 3,47г кремового твердого вещества.

Элементный анализ

Рассч	C	46,15	H	4,93	N	9,78	S	11,20
Найд	C	46,03	H	4,93	N	9,64	S	11,05

1) 10-Ацетил-2-[4-(3-Оксапропионовая кислота-(6-малеимида-гексаноил)-гидразид)-бензил]-1-метансульфонил-10-тиа-1,4,7-триазадекан-3,8-дион

3г 10-ацетил-2-[4-(3-Оксапропионовая кислота)-(2,5-диоксо-пирропидин-1-ил)-эфир]-бензил]-1-(метансульфонил)-10-тиа-1,4,7-триазадекан-3,8-диона и 1,17г гидразида 6-малеимидапропионовая кислота (Science 261, 212 (1993)) перемешивают в 40мл диметилформамида в течение 5 часов при 60°C. При интенсивном перемешивании вливают по капле 100мл воды и отфильтровывают от осаждаемого осадка. Сушат в вакууме, и остаток очищают с помощью Флеш (FLASH) хроматографии на силикагелевой колонке смесью дихлорметан/диоксан (10/1) в качестве элюента. Получают 2,8г названного соединения в виде белого твердого вещества.

Элементный анализ (относительно безводного вещества)

Рассч	C	49,25	H	5,61	N	12,30	S	9,39
Найд	C	49,33	H	5,95	N	12,43	S	9,11

м) Конъюгат 5'-(6-Меркапто-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-

T\*T\*T\*TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAAUGA GAUU-3' и 10-Ацетил-2-[4-(3-Оксапропионовая ки-

слота)-(6-малеимидо-гексансил)-гидразид]-бензил]-1-метансульфонил-10-тиа-1,4,7-триазадекан-3,8-дион

5мг тиол-содержащего олигонуклеотида, полученного согласно примеру 5а), смешивают в 2мл фосфатного буфера (pH7,4) с 1мг производного малеимида, полученного согласно примеру 5и), растворенного в 0,2мл диметилформамида. Оставляют стоять в течение 2 часов при комнатной температуре, и раствор подвергают ультрафильтрации через мембрану с пределом эксклюзии 3000 (Amicon YM3) и затем лиофильно сушат. Получают 5мг требуемого конъюгата

н) Технеций-99m комплекс конъюгата 5'-(6-Меркапто-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-T\*T\*T\*T\*TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUGA GAUU-3' и 10-ацетил-2-[4-[3-оксапропионовая кислота)-(6-малеимидо-гексансил)-гидразид]-бензил]-1-метансульфонил-10-тиа-1,4,7-триазадекан-3,8-дион

1мл раствора калий-D-глюкарата (12мг/мл) и хлорида олова (II) (100мкг/мл) в 0,2М NaHCO<sub>3</sub> сушат вымораживанием в ампуле и затем смешивают с раствором [Tc-99m]-натрий пертехнетата (1мл, 1мКи [mCi]) из Mo-99/Tc-99m генератора. После стояния при комнатной температуре в течение 15 минут аликвоту удаляют и смешивают с таким же объемом конъюгата примера 5м) (1мг/мл), растворенного в 0,2М растворе NaHCO<sub>3</sub>. Через 15 минут как тонкослойная хроматография, так и HPLC (ЖХВР) показывают, что >98% радиоактивности взято конъюгатом

#### Пример 6

а) Конъюгат 5'-(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T\*T-T-3' и S-бензоил-MAG<sub>3</sub>-2,3,5,6-тетрафторфенилового эфира

3г 5-бензоил-MAG<sub>3</sub>-2,3,5,6-тетрафторфенилового эфира (полученного согласно Пат. США 4965392), растворенного в 0,2мл диметилформамида, добавляют к 8мг названного соединения примера 1а), растворенного в 0,5мл 0,1М фосфатного буфера (pH7), и перемешивают в течение 3 часов при комнатной температуре. Разбавляют водой, и раствор подвергают ультрафильтрации (Amicon YM3, предел эксклюзии 3000). После лиофильной сушки получают 5мг конъюгата 6а)

б) <sup>99m</sup>Технеций комплекс конъюгата 5'-(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T\*T-T-3' и S-бензоил-MAG<sub>3</sub>-2,3,5,6-тетрафторфенилового эфира

1мг названного соединения примера 6а) растворяют в 200мкл воды и смешивают с 1мл 0,1М фосфатного буфера pH8,5. К этой смеси добавляют 200мкл раствора <sup>99m</sup>Технеций-(Y)-глюконат (прибл. 15мКи) и оставляют стоять в течение 15 минут при комнатной температуре. Выход по изотопу (определено с помощью ЖХВР) составляет около 95%

#### Пример 7

а) Конъюгат 5'-(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T\*T-T-3' и <sup>99m</sup>Технеций комплекса 2,3,5,6-тетрафторфенил-4,5-бис(меркаптоацетида)-пентановая кислота сложного эфира

3мг названного соединения примера 1а), растворенного в 0,6мл фосфатного буфера, добавляют к <sup>99m</sup>Технеций комплексу 2,3,5,6-тетрафторфенил-4,5-бис(меркаптоацетида)-пентановая кислота сложного эфира (полученного согласно J Nucl Med 32, 1445 (1991)) прибл. 100мКи, растворенного в 2мл фосфатного буфера, pH7,2. Раствор доводят до pH10 с помощью 1,0М калий карбонатного буфера и перемешивают в течение 20 минут при комнатной температуре. Для финальной очистки раствор вводят в Сефадекс (Sephadex) колонку (Pharmacia) и элюируют раствором с 75ммоль хлорида натрия. Основные фракции объединяют, разбавляют обычным физиологическим раствором и фильтруют. Таким образом, полученный раствор может быть использован для радиодиагностических исследований

#### Пример 8

а) Конъюгат 5'-(6-Меркапто-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-T\*T\*T\*T\*TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUGA GAUU-3' и 5'(N-малеимидо)-3-оксапентил-2-[3-карбокисбензоил]-тио]-ацетил]-глицилглицилглицината

5мг тиол-содержащего олигонуклеотида, полученного согласно примеру 5а), смешивают в атмосфере N<sub>2</sub> в 2мл фосфатного буфера (pH7,4) с 1мг 5-(N-малеимидо)-3-оксапентил-2-[3-карбокисбензоил]-тио]-ацетил]-глицилглицилглицината (полученного согласно Biosonj Chem 1, 431 (1990)), растворенного в 0,2мл диметилформамида. Оставляют перемешиваться в течение 2 часов при комнатной температуре, и раствор подвергают ультрафильтрации через мембрану (Amicon YM3) и затем сушат вымораживанием. Получают 5,5мг требуемого конъюгата

б) Технеций-99т комплекс конъюгата 5'-(6-Меркапто-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-T\*T\*T\*T\*TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUGA GAUU-3' и 5'(N-малеимидо)-3-оксапентил-2-[3-карбокисбензоил]-тио]-ацетил]-глицилглицилглицината

1мл раствора калий-D-глюкарата (12мг/мл) и хлорида олова (II) (100мкг/мл) в 0,2М NaHCO<sub>3</sub> сушат вымораживанием в ампуле и затем смешивают с раствором [Tc-99т]-натрий пертехнетата (1мл, 1мКи [mCi]) из Mo-99/Tc-99m генератора. После стояния при комнатной температуре в течение 15 минут аликвоту удаляют и смешивают с таким же объемом конъюгата примера 8а) (1мг/мл), растворенного в 0,2М растворе NaHCO<sub>3</sub>. Вещество можно выделить с помощью сушки вымораживанием. Выход по изотопу, определенный с помощью ЖХВР, составлял >96%

#### Пример 9

а) Конъюгат 5'-(6-Меркапто-1-гексил-фосфоновая кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-

T\*T\*T\*TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUAUGA GAUU-3' и 1-[6-(2-винил-6-гексил-оксиметил)-пиридин]-1,4,8,11-тетрааза-циклотетрадекана

Раствор 4мг тио-содержащего олигонуклеотида, полученного согласно примеру 5а), в 2мл фосфатного буфера (pH7,4) смешивают в атмосфере N<sub>2</sub> с 1мг 1-[6-(2-винил-6-гексил-оксиметил)-пиридин]-1,4,8,11-тетрааза-циклотетрадекана (полученного согласно EP 0588229), растворенного в 0,5мл диметилформамида. Оставляют перемешиваться в течение 4 часов при 35°C, смешивают с 10мл этанола, и продукт выделяют с помощью центрифугирования. Очистку проводят при помощи хроматографии с обращенной фазой на 1х25см колонке с градиентом 50ммоль триэтиламмоний ацетат (pH7)/ацетонитрил. Объединенные фракции сушат вымораживанием, растворяют в 1мл воды и обессоливают на Сефадекс G-10 колонке. Названное соединение (около 4мг) выделяют с помощью сушки вымораживанием.

б) Тс-89m комплекс конъюгата 5'-(6-Меркапто-1-гексил-фосфоновая кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-T\*T\*T\*TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUAUGA GAUU-3' и 1-[6-(2-винил-6-гексил-оксиметил)-пиридин]-1,4,8,11-тетрааза-циклотетрадекана

Процедуру осуществляют, как описано в примере 8b). Выход по изотопу, определенный с помощью ЖХВР, составлял 92%.

Пример 10

а) Конъюгат 5'-(6-меркапто-1-гексил-фосфоновая кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-

T\*T\*T\*TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUAUGA GAUU-3' и N-[4-гидрокси-3-(1,4,8,11-тетрааза-циклотетрадек-5-ил)-бензил]-2-(6-винил-пиридин-2-илметокси)-ацетамида

Раствор 6,5мг тиол-содержащего олигонуклеотида, полученного согласно примеру 5а), в 2мл фосфатного буфера (pH8,0), смешивают с 1,2мг N-[4-гидрокси-3-(1,4,8,11-тетрааза-циклотетрадек-5-ил)-бензил]-2-(6-винил-пиридин-2-илметокси)-ацетамида (полученного согласно J Chem Soc, Chem Commun 156 (1988)), растворенного в 0,1мл диметилформамида. Перемешивают в течение 4 часов в атмосфере N<sub>2</sub> при 35°C, смешивают с 10мл этанола, и продукт выделяют с помощью центрифугирования. Очистку проводят при помощи хроматографии с обращенной фазой на 1х25см колонке с градиентом 50ммоль триэтиламмоний ацетат (pH7)/ацетонитрил. Объединенные фракции обессоливают на Сефадекс G-10 колонке. Путем сушки вымораживанием получают 5мг названного соединения в виде белого порошка.

б) Медь-64 комплекс 5'-(6-меркапто-1-гексил-фосфоновая кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-

T\*T\*T\*TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUAUGA GAUU-3' и N-[4-гидрокси-3-(1,4,8,11-тетрааза-циклотетрадек-5-ил)-бензил]-2-(6-винил-пиридин-

2-илметокси)-ацетамида

1мг конъюгата, полученного согласно 10а), инкубируют в 1мл фосфатного буфера (pH8) с <sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub> (0,2мКи). Выход по изотопу, определенный через 1 час с помощью ЖХВР, составлял >98%. Продукт выделяют путем сушки вымораживанием.

Пример 11

а) Конъюгат 5'-(6-меркапто-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-

T\*T\*T\*TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUAUGA GAUU-3' и 1,4,7,10-тетрааза-циклододекан-2-[(5-аза-8-малеимидо-6-оксо)-октан]-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты

1мг 1,4,7,10-тетрааза-циклододекан-2-[(5-аза-8-малеимидо-6-оксо)-октан]-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты (полученного согласно J Chem Soc, Chem Commun 796 (1989)), добавляют к раствору 5мг тиол-содержащего олигонуклеотида, полученного согласно примеру 5а), в 2мл фосфатного буфера (pH8) в атмосфере N<sub>2</sub>. Перемешивают в течение 3 часов при 35°C, смешивают с 10мл изопропилового спирта, и продукт выделяют с помощью центрифугирования. Очистку проводят при помощи хроматографии с обращенной фазой на 1х25см колонке с градиентом 25ммоль триэтиламмоний ацетат (pH7)/ацетонитрил. Объединенные фракции осторожно концентрируют путем испарения в вакууме, растворяют в небольшом количестве воды и обессоливают с помощью Сефадекс G-10 колонки. Путем сушки вымораживанием получают 4мг названного соединения в виде белого порошка.

б) Иттрий-90 комплекс конъюгата 5'-(6-меркапто-1-гексил-фосфоновая кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-T\*T\*T\*TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUAUGA GAUU-3' и 1,4,7,10-тетрааза-циклододекан-2-[(5-аза-8-малеимидо-6-оксо)-октан]-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты

<sup>90</sup>Y-ацетат (1мКи), растворенный в 1мл 0,05М раствора ацетата аммония, смешивают с 1мг конъюгата, полученного согласно примеру 11а), и нагревают в течение 1 часа при 85°C. Выход по изотопу, определенный с помощью ЖХВР, составлял >95%. Продукт выделяют с помощью сушки вымораживанием.

Пример 12

а) Конъюгат 5'-(6-меркапто-1-гексил-фосфоновая кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-

T\*T\*T\*TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUAUGA GAUU-3' и 1,4,7-триаза-циклононан-2-[(5-аза-8-малеимидо-6-оксо)-октан]-1,4,7-триуксусной кислоты

1мг 1,4,7-триаза-циклононан-2-[(5-аза-8-малеимидо-6-оксо)-октан]-1,4,7-триуксусной кислоты (полученного согласно J Chem Soc, Chem Commun 794 (1989)), добавляют к раствору 5мг тиол-содержащего олигонуклеотида, полученного согласно примеру 5а), в 2мл фосфатного буфера (pH8) в атмосфере N<sub>2</sub>. Перемешивают в течение 6 часов при 35°C, смешивают с 10мл изопропанола, и продукт выделяют с помощью центрифугирования.

ния Очистку проводят при помощи хроматографии с обращенной фазой на 1х25см колонке с градиентом 25ммоль триэтиламмоний ацетат (рН7)/ацетонитрил Объединенные фракции осторожно концентрируют путем испарения в вакууме, растворяют в небольшом количестве воды и обессоливают с помощью Сефадекс G-10 колонки Путем сушки вымораживанием получают 3мг названного соединения в виде белого порошка

б) Галлий-67 комплекс конъюгата 5'-(6-меркапто-1-гексил-фосфоновая кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-T\*T\*T\*T\*TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUGA GAUU-3' и 1,4,7-три-аза-циклононан-2-[(5-аза-8-малеимидо-6-оксо)-октан]-1,4,7-триуксусной кислоты

20мг конъюгата, полученного согласно примеру 12а), растворяют в 0,5мл 0,1М нитратного буфера рН4,5 и смешивают с 0,1мл галлий-67-цитратного раствора (0,2мКи) Выдерживают в течение 2 часов при комнатной температуре, и продукт обессоливают на Сефадекс-G-10 колонке После лиофильной сушки получают 17мг названного соединения в виде белого порошка

Пример 13

Фосфитилирование 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5-(проп-2-ен-1-он)-2'-дезоксидеоксиридина

50мг 4-диметиламинопиридина, 3мл лизо-пропилэтиламина и 962мкл (4,31ммоль) 2-цианоэтил-N,N-диизопропилхлорофосфорамидита добавляют один за другим к перемешиваемому раствору 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5-(проп-2-ен-1-он)-2'-дезоксидеоксиридина (полученного согласно Nucleosides & Nucleotides 13, 939 - 944) в 50мл тетрагидрофурана После приблизительно 30мин образуется белый осадок Его отфильтровывают, раствор концентрируют выпариванием в вакууме, и остаток распределяют между дихлорметаном и 5% раствором бикарбоната натрия Дихлорметановую фазу сушат над сульфатом магния и концентрируют выпариванием в вакууме Остаток очищают быстрой хроматографией на силикагеле и элюируют смесью дихлорметан/гексан/диизопропилэтиламин (80/18/2) 1,8г требуемого соединения получают в виде белой пены Элементный анализ

Рассч	C	64,	28	H	6,	29	N	7,	14	P	3,95
Найд	C	64,	02	H	6,	60	N	7,	21	P	4,09

б) Конъюгат 36-мерного олигонуклеотида U\*T\*T\*T\*T\*TCUCAUGGAGCCAAAGACGAAUAGCUA CAUA-3' и 10-(4-аза-2-гидрокси-5-имино-8-меркапто-октан-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетрааза-циклододекана U\* 5-(проп-2-ен-1-он)-2'-дезоксидеоксидеоксиридин

30-мерный олигонуклеотид, идентифицированный согласно SELEX способу, получают с модификацией 5'-связанной последовательности 5'-T\*T\*T\*T\*T\* обычным способом в автоматическом синтезаторе Pharmacia Company (смотри Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид также присутствует на колонке твердого носителя Путем

реакции с раствором трихлоруксусной кислоты в дихлорметане открывают 5'-гидрокси группу Нагрузка на колонку составляет около 10мг 35-мерного-олигонуклеотида 5'-гидрокси группа взаимодействует в присутствии тетразола с фосфорамиди-том, полученным согласно примеру 13а) Затем фосфит превращают в фосфотриэфир путем обработки раствором иода, и концевой DMT радикал отщепляют путем взаимодействия с раствором трихлоруксусной кислоты в дихлорметане Для введения тиольной группы в α,β-ненасыщенную карбоильную систему, присутствующую на концевом 2'-дезоксидеоксиде, проводят взаимодействие с раствором 10-(4-аза-2-гидрокси-5-имино-8-меркапто-октан-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетрааза-циклододекана\*) в тетрагидрофуране и промывают последовательно метанолом и водой Чтобы удалить модифицированный олигонуклеотид от твердого носителя, содержащее колонки транспортируют в мультиампулу, смешивают с 5мл 30% раствора аммиака, сосуд герметизируют и встряхивают на протяжении ночи при 55°C Затем охлаждают до 0°C, центрифугируют, носитель промывают 5мл воды, и объединенные водные фазы подвергают лиофильной сушке

Для очистки твердое вещество помещают в 2мл воды, смешивают с 2мл 0,5М раствора ацетата аммония и смешивают с 10мл этанола, дают возможность отстояться на протяжении ночи при -20°C, центрифугируют, и остаток промывают 1мл этанола (-20°C) и, наконец, сушат в вакууме при комнатной температуре

6мг названного соединения получают в виде бесцветного порошка

\*) 10-(4-Аза-2-гидрокси-5-имино-8-меркапто-октан-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетрааза-циклододекана получают, как описано ниже

15,7мл 1N раствора гидроксида натрия и 430мг (3,49ммоль) 2-иминотетрагидротиофенгидрохлорида добавляют к раствору 1,46г (3,49ммоль) 10-(3-амино-2-гидрокси-пропил)-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетрааза-циклододекана (смотри пример 1с) в смеси 50мл воды и 50мл метанола и перемешивают в течение 3 часов при комнатной температуре, концентрируют выпариванием в вакууме до приблизительно 1/4 начального объема и смешивают при перемешивании с анионообменной смолой (IRA 410) до тех пор, пока не достигнут рН11 Раствор фильтруют и смешивают при перемешивании с малыми порциями катионообменной смолы IRC 50 до тех пор, пока не достигнут рН3,5 После фильтрации раствор лиофильно сушат 1,39г требуемого вещества получают в виде белого порошка с содержанием воды 4,9%

Элементный анализ (относительно безводного вещества)

Рассч	C	48,45	H	7,74	N	16,14	S	6,16
Найд	C	48,30	H	7,98	N	16,05	S	6,44

с) Иттрий-90 комплекс конъюгата 36-мерного олигонуклеотида U\*T\*T\*T\*T\*TCUCAUGGAGCCAAAGACGAAUAGCUA

CAUA-3' и 10-(4-аза-2-гидрокси-5-имино-8-меркапто-октан-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаациклододекана U\* 5-(проп-2-ен-1-он)-2'-дезоксигуанидин

К раствору Иттрия, растворенного в 0,05М растворе ацетата аммония (прибл 380мКи), добавляют 1мг тио производного примера 13b) в 0,5мл 0,05М раствора ацетата аммония с pH6, доводят до pH5,2 с помощью 3М уксусной кислоты и перемешивают в течение 1 часа при комнатной температуре. Доводят до pH7,0 0,01М раствором гидроксида натрия, и конъюгат очищают с помощью ЖХВР (TSK-400/MES-буфер). Основные фракции объединяют, разбавляют обычным физиологическим раствором и доводят до pH7,2 с помощью 0,01М раствора гидроксида натрия. После фильтрации получают препарат, пригодный для радиотерапии.

Пример 14

а) 3-(Трифенилметил-меркаптоацетил)-глицил-глицин метиловый эфир

3,34г (10ммоль) S-трифенилметил меркапто-уксусной кислоты и 1,83г (10ммоль) глицилглицин метиловый эфир гидрохлорида суспендируют в 250мл абсолютного дихлорметана. После добавления 1,01г (10ммоль) триэтиламина вливают по каплям при охлаждении льдом 2,06г (10ммоль) дициклогексилкарбодиимида, растворенного в 50мл абсолютного дихлорметана. Перемешивают в течение 1 часа при 0°C и в течение 18 часов при комнатной температуре. Фильтруют, концентрируют путем выпаривания и хроматографируют на силикагеле (элюент CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 10% - 50%).

Выход 3,56г (77,0% от теор.), белый порошок. Элементный анализ

Рассч	C	67,51	H	5,87	N	6,06	013,84	S	11,20
Найд	C	67,37	H	6,02	N	5,91		S	6,73

б) 3-(Трифенилметил-меркаптоацетил)глицил-глицинамидил]-6-гексанол 4,63г (10ммоль) 3-(трифенилметил-меркаптоацетил)глицилглицин метилового эфира, полученного в примере 14а), нагревают до 100°C в 11,72г (100ммоль) 6-амино-гексанол/50мл 1,4-диоксана в атмосфере аргона в течение 2 часов. Затем реакционную загрузку выпаривают на смесь 100мл дихлорметана и 100мл воды. При перемешивании и охлаждении льдом до pH6 доводят с помощью 10М хлористоводородной кислоты, органическую фазу отделяют и сушат над сульфатом натрия. После испарения растворителя сырой продукт очищают на силикагеле (элюент CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 10% - 50%).

Выход 2,97г (54,2% от теор.), белый порошок. Элементный анализ

Рассч	C	67,98	H	6,81	N	7,67	011,68	S	5,85
Найд	C	67,72	H	6,93	N	7,93		S	5,84

с) O-[[S-(Трифенилметил-меркаптоацетил)глицил-глицинамидил]-6-гекс-1-ил]-диизопропиламид-O'-метил-фосфористая кислота диэфир

5,48г (10ммоль) [S-(трифенилметил-меркаптоацетил)глицил-глицинамидил]-6-гексанола, полученного согласно примеру 14b),

растворяют в 100мл абсолютного дихлорметана, 5,17г (40ммоль) диизопропилэтиламина добавляют в атмосфере аргона и вливают по каплям при 0°C 3,95г (20ммоль) фосфористая кислота моно-метиловый эфир диизопропиламид хлорида, растворенного в 50мл абсолютного дихлорметана. Перемешивают в течение 0,5 часа при 0°C и затем в течение 2 часов при комнатной температуре. Для завершения обработки смешивают при охлаждении льдом с 320мг (10ммоль) абсолютного метанола, и после концентрирования, хроматографируют на силикагеле (элюент CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95% 5/5% триэтиламин).

Выход 1,98г (27,9% от теор.), бесцветное масло.

д) 5'-[(Меркаптоацетил-глицил-глицил-амидил)-6-гекс-1-ил]-фосфорная кислота эфир 35-мерного олигонуклеотида 5'-T\*T\*T\*T\*TCUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUA CAUA-3'

30-мерный олигонуклеотид, идентифицированный согласно SELEX способу, получают модификацией 5'-связанной последовательности 5'-T\*T\*T\*T\* с помощью автоматического синтезатора Pharmacia Company (смотри Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed, F Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид в защищенной форме также присутствует из колонки твердого носителя. Нагрузка на колонку составляет около 15мг 35-мерного олигонуклеотида. После отщепления 5'-DMT-защитной группы (трихлоруксусная кислота/дихлорметан), его соединяют согласно стандартным методам с фосфорамидитом, описанным в примере 14с). После окисления и йодом в тетрагидрофуране, конъюгат отщепляется от носителя. В этом случае вещество смешивают с 10мл 30% раствора аммиака, сосуд герметизируют и встряхивают на протяжении ночи при 55°C. Содержимое охлаждают до 0°C, центрифугируют, носитель промывают 10мл воды, и соединенные водные фазы подвергают сушке замораживанием.

Для очистки твердое вещество помещают в 5мл воды, смешивают с 4мл 0,5М раствора ацетата аммония и смешивают с 20мл этанола. Для завершения осаждения смесь охлаждают на протяжении ночи (-20°C), центрифугируют, и остаток промывают 1мл этанола (-20°C) и сушат в вакууме. Получают 9мг белого порошка.

Для отщепления S-третил защитной группы вещество помещают в 5мл раствора (pH7,0) с 50ммоль триэтиламоний ацетата и инкубируют с 500мкл 0,1М раствора нитрата серебра в течение 30 минут. Затем добавляют 500мкл 0,14М дитиотрейтольного раствора и инкубируют последующие 30 минут. После центрифугирования прозрачный супернатант обессоливают на Сефадексе G-10. Фракции, содержащие продукт, лиофилизируют. Получают 4мг конъюгата в виде белого порошка.

е) Технеций-99m комплекс конъюгата 5'-[(меркаптоацетил-глицил-глицил-амидил)-6-гекс-1-ил]-фосфорная кислота эфир 35-мерного олигонуклеотида 5'-T\*T\*T\*T\*TCUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUA CAUA-3'

1мг конъюгата 14d) растворяют в 1мл 0,1М

динатриевого кислого фосфатного буфера (pH=9,5) После добавления 10мг динатрий тартрата смешивают с раствором пертехнетата (1мКи) и затем с 10мл раствора хлорида олова (II) (5мг  $\text{SnCl}_2$ /1мл 0,01M HCl) Выход по изотопу (прибл 93%) определяют с помощью ЖХВР

Пример 15

а) O-[[5-(Трифенилметилмеркаптоацетил)глицил-глицинамидил]-6-гекс-1-ил]-толуолсульфоновая кислота сложный эфир

5,48г (10ммоль) [3-(трифенилметилмеркаптоацетил)-глицил-глицинамидил]-6-гексанола, полученного в примере 14b), растворяют в 100мл абсолютного дихлорметана Добавляют 1,01г (10ммоль) триэтиламина и 1,91г (10ммоль) хлорангидрида п-толуолсульфоновой кислоты и перемешивают в течение 24 часов при комнатной температуре Затем концентрируют и хроматографируют на силикагеле (элюент  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  95/5)

Выход 4,32г (61,5% от теор), бесцветное масло

Элементный анализ

Рассч	C	65,03	H	6,18	N	5,99	01,68	S	9,14
Найд	C	64,93	H	6,32	N	5,78		S	8,87

б) 5'[(Меркаптоацетил-глицил-глицинамидил)-6-гекс-1-ил]-фосфорная кислота сложный эфир 35-мерного олигонуклеотида 5'-T\*T\*T\*TCUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUA CAUA-3'

30-мерный олигонуклеотид, идентифицированный согласно SELEX способу, получают модификацией 5'-связанной последовательности 5'-T\*T\*T\*T с помощью автоматического синтезатора Pharmacia Company (смотри Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed F Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид в защищенной форме также присутствует на колонке твердого носителя Нагрузка на колонку составляет около 15мг 35-мерного олиго-нуклеотида После отщепления 5'-ОМТ-защитной группы (трихлоруксусная кислота/дихлорметан), его соединяют согласно стандартным способам с 3-третил-6-меркаптогексил-фосфорамидом После окисления йодом в тетрагидрофуране, третил-защищенное соединение отщепляют от носителя, изолируют и очищают (смотри пример 14d)

Отщепление S-третил защитной группы, изоляцию SH-группу-несущего олигонуклеотида и очистку проводят, как описано в примере 14d) (6мг)

Для связывания, SH-группу-несущий 35-мерный олигонуклеотид (6мг) в 500мкл 0,1M раствора карбоната натрия смешивают в атмосфере аргона со 100мг сложного эфира толуолсульфокислоты 15а), растворенной в 500мкл диметилформамида Через 30 минут нейтрализуют и разбавляют водой до объема 5мл После центрифугирования прозрачный супернатант лиофильно сушат

Для отщепления S-третил защитных групп процедуру проводят, как описано в 14d) После очистки получают 4мг конъюгата

с) Технеций-99m комплекс конъюгата 5'[(меркаптоацетил-глицил-глицинамидил)-6-гекс-1-ил]-фосфорная кислота сложный эфир 35-мерного олигонуклеотида 5'-T\*T\*T\*TCUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUA CAUA-3'

1мг конъюгата, описанного в примере 15b), растворяют в 1мл 0,1M динатриевого кислого фосфатного буфера (pH9,5) После добавления 10мг динатрий тартрата смешивают с раствором пертехнетата (1мКи) и затем с 10мл раствора хлорида олова (II) (5мг  $\text{SnCl}_2$ /1мл 0,01M HCl) Выход по изотопу (прибл 95%) определяют с помощью ЖХВР

Пример 16

а) N-[3-Тиа-5-(трифенилметилмеркапто)-1-оксо-пент-1-ил]-S- трифенилметил-цистеин метиловый эфир

2,69г (10ммоль) N-[3-тиа-5-(трифенилметилмеркапто)-1-оксо-пент-1-ил]-5-трифенилметил-цистеин метилового эфира (получение согласно DE 4310999) растворяют вместе с 5,58г (20ммоль) трифенилметил хлорида в 100мл абсолютного дихлорметана После добавления 2,02г (20ммоль) триэтиламина смесь выдерживают при перемешивании на протяжении ночи в атмосфере аргона при комнатной температуре Для завершения обработки органическую фазу промывают три раза, в каждом случае 1% раствором лимонной кислоты, насыщенным раствором бикарбоната натрия и водой После высушивания над сульфатом натрия концентрируют путем выпаривания и очищают на силикагеле (элюент  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  95/5)

Выход 4,53г (60,1% от теор), бесцветное масло

Элементный анализ

Рассч	C	73,27	H	5,75	N	1,86	06,37	S	12,76
Найд	C	73,31	H	5,48	N	1,63		S	12,49

б) N-[3-Тиа-5-(трифенилметилмеркапто)-1-оксо-пент-1-ил]-S-трифенилметил-N'-(6-гидроксигекс-1-ил)цистеинамид

7,54г (10ммоль) N-[3-тиа-5-(трифенилметилмеркапто)-1-оксо-пент-1-ил]-5-цистеин метилового эфира, описанного в примере 16а), нагревают до 100°C в 11,72г (100ммоль) 6-аминогексанол/50мл 1,4-диоксана в атмосфере аргона в течение 2 часов Затем реакционную смесь выливают на смесь 100мл дихлорметана и 100мл воды При перемешивании и охлаждении льдом доводят pH до 6 с помощью 10M хлористоводородной кислоты, органическую фазу отделяют и сушат над сульфатом натрия После выпаривания растворителя сырой продукт очищают на силикагеле (элюент  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  5% - 50%)

Элементный анализ

Рассч	C	72,99	H	6,49	N	3,34	05,72	S	11,46
Найд	C	72,73	H	6,62	N	3,11		S	11,17

с) O-[[N-[3-Тиа-5-(трифенилметилмеркапто)-1-оксо-пент-1-ил]-5-трифенилметил-цистеинил]-2-амино-эт-1-ил]-диизопропиламид-O'-метилфосфористая кислота сложный эфир

8,39г (10ммоль) N-[3-тиа-5-



(трифенилметилмеркапто)-1-оксо-пент-1-ил]-5-трифенилметил-N'-(6-гидрокси-гекс-1-ил)цистеинамида, полученного в примере 16b), растворяют в 200мл абсолютного дихлорметана. В атмосфере аргона добавляют 5,17г (40ммоль) диизопропилэтиламина и по каплям при 0°C вливают 3,95г (20ммоль) фосфористая кислота монометилэфир-диизопропиламид-хлорида, растворенного в 50мл абсолютного дихлорметана. Перемешивают в течение 0,5 часа при 0°C и затем перемешивают в течение 1,5 часов при комнатной температуре. Для завершения обработки смешивают при охлаждении льдом с 320мг (10ммоль) абсолютного метанола и после концентрирования хроматографируют на силикагеле (элюент  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  95/5/5% (триэтиламин)).

Выход 5,37г (53,7% от теор.) желтоватого масла

d) 5'-[N-(3-Тиа-5-меркапто-1-оксо-пент-1-ил)-цистеин-N'-(6-гидрокси-гекс-1-ил)-амид]-фосфорная кислота эфир 35-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T\*T-3'

30-мерный олигонуклеотид, идентифицированный согласно SELEX способу, получают модификацией последовательности T\*T\*T\*T-3', расположенной против хода транскрипции, с помощью автоматического синтезатора Pharmacia Company (смотри *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach*, Ed F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид в защищенной форме также присутствует на колонке твердого носителя. Нагрузка на колонку составляет около 15мг 35-мерного олигонуклеотида. После отщепления 5'-DMT-защитной группы (трихлоруксусная кислота/дихлорметан), его соединяют согласно стандартным способам с фосфорамидитом (16c) и затем окисляют.

Отщепление от носителя основных защитных групп и очистку бис-S-тритил-защищенного конъюгата проводят, как описано в 14d) (около 12мг).

Для отщепления S-тритил защитных групп вещество помещают в 5мл 50ммоль раствора (pH7,0) триэтиламмоний ацетата и инкубируют с 500мкл 0,1М раствора нитрата серебра в течение 30 минут. Затем добавляют 500мкл 0,14М дитиотреитольного раствора и инкубируют в течение последующих 30 минут. После центрифугирования прозрачный супернатант обессоливают на Сефадексе G 10. Фракции, содержащие продукт, лиофилизируют. Получают 5мг конъюгата в виде белого порошка.

е) Технеций-99m комплекс конъюгата 5'-[N-(3-тиа-5-меркапто-1-оксо-пент-1-ил)-цистеин-N'-(6-гидрокси-гекс-1-ил)-амид]-фосфорная кислота эфир 35-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T\*T-3'

1мг конъюгата, описанного в примере 16d), растворяют в 1мл 0,1М динатриевого кислого фосфатного буфера (pH9,5). После добавления 10мг динатрий тартрата смешивают с раствором пертехнетата натрия (1мКи) и затем с 10мл раствора хлорида олова (II) (5мг  $\text{SnCl}_2/1\text{мл}$  0,01M HCl). Выход по изотопу (прибл. 96%) определяют с

помощью ЖХВР

Пример 17

а) O-{N-[3-Тиа-5-(трифенилметилмеркапто)-1-оксо-пент-1-ил]-5-трифенилметил-N'-(6-гидрокси-гекс-1-ил)цистеинимидил}-п-толуолсульфокислота сложный эфир

8,39г (10ммоль) N-[3-тиа-5-(трифенилметилмеркапто)-1-оксо-пент-1-ил]-5-трифенилметил-N'-(6-гидрокси-гекс-1-ил) цистеинамида, полученного согласно примеру 16b), растворяют в 200мл абсолютного дихлорметана. Добавляют 1,01г (10ммоль) триэтиламина, 1,91г (10ммоль) хлорангидрида п-толуолсульфокислоты и перемешивают в течение 20 часов при комнатной температуре. Затем концентрируют и хроматографируют на силикагеле (Элюент  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  97/3).

Выход 6,44г (67,0% от теор.) желтоватого масла

Элементный анализ

Рассч	C	72	47	H	6,29	N	2,91	O	8,32	S	10,01
Найд	C	72	19	H	6,47	N	2,68			S	9,83

b) 5'-[(Меркаптоацетил-глицил-гидинамидил)-13-тридек-7-тио-1-ил]-фосфорная кислота сложный эфир 35-мерного олиго-нуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T\*T-3'

30-мерный олигонуклеотид, идентифицированный согласно SELEX способу, получают модификацией последовательности T\*T\*T\*T-3', расположенной против хода транскрипции, с помощью автоматического синтезатора Pharmacia Company (смотри *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach*, Ed F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид в защищенной форме также присутствует на колонке твердого носителя. Нагрузка на колонку составляет около 15мг 35-мерного олигонуклеотида. После отщепления 5'-DMT-защитной группы (трихлоруксусная кислота/дихлорметан), его соединяют согласно стандартным способам с 3-тритил-6-меркаптогексил-фосфорамидитом.

После окисления йодом в тетрагидрофуране тритил-защищенное соединение отщепляют от носителя, изолируют и очищают (смотри пример 14d).

Отщепление S-тритил-защищенной группы, изоляцию SH-группу-несущего олигонуклеотида и очистку проводят, как описано в 14d) (7,5мг).

Для связывания, SH-группу-несущий 30-мерный олигонуклеотид (7мг) в 550мкл 0,1М раствора карбоната натрия смешивают в атмосфере аргона со 180мг сложного эфира толуолсульфокислоты 17а), растворенного в 500мкл диметилформамида. Через 30 минут нейтрализуют и разбавляют водой до объема 5мл. После центрифугирования прозрачный супернатант лиофильно сушат. Для отщепления S-тритил групп процедуру проводят, как описано в 14d). После очистки получают 4,3мг конъюгата.

с) Технеций-99m комплекс конъюгата 5'-[(меркаптоацетил-глицил-гидинамидил)-13-тридек-7-тио-1-ил]-фосфорная кислота сложный эфир 35-мерного олигонуклеотида 5'-

CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*<sup>33</sup>-T\*<sup>33</sup>T-3'

1мг конъюгата, описанного в примере 17b), растворяют в 1мл 0,1М динатриевого кислого фосфатного буфера (pH9,5). После добавления 10мг динатрий тартрата смешивают с раствором пертехнетата натрия (1мКи) и затем с 10мкл раствора хлорида олова (II) (5мг SnCl<sub>2</sub>/1мл 0,01M HCl). Выход по изотопу (прибл. 93%) определяют с помощью ЖХВР.

Пример 18

а) Конъюгат 5'-(6-Амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-

CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*<sup>33</sup>-T\*<sup>33</sup>T-3' и моноамида N-(тетрагидро-2-оксо-тиофен-3-ил)-тиодигликолевой кислоты

30-мерный олигонуклеотид, идентифицированный согласно SELEX способу, получают модификацией последовательности T\*<sup>33</sup>T\*<sup>33</sup>T-3', расположенной против хода транскрипции, с помощью автоматического синтезатора Pharmacia Company (смотри Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид в защищенной форме также присутствует на колонке твердого носителя. Нагрузка на колонку составляет около 15мг 35-мерного олигонуклеотида. После отщепления 5'-DMT-защитной группы (трихлоруксусная кислота/дихлорметан), его соединяют согласно стандартным способам с N-трифторацетиламиногексилфосфорамидитом.

После окисления йодом в тетрагидрофуране, амино группу-несущий олигонуклеотид отщепляют от носителя, изолируют и очищают, как описано в 1b) (9,3мг).

Для связывания с моноамидом N-(тетрагидро-2-оксо-тиофен-3-ил)-тиодигликолевой кислоты (DE 4311023) 5мг амино группу-несущего олигонуклеотида растворяют в 1мл 0,2М раствора карбоната натрия. После добавления 100мг производного тиолактона, содержимое инкубируют в течение 4 часов при комнатной температуре. Затем нейтрализуют, и обессоливание производят с помощью ультрафильтрации через мембрану с пределом эксклюзии 3000 (Amicon YM3). После лиофилизации его подвергают сушке вымораживанием. Получают 6,3мг требуемого конъюгата.

б) Технеций-99m комплекс конъюгата 5'-(6-Амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*<sup>33</sup>-T\*<sup>33</sup>T-3' и моноамида N-(тетрагидро-2-оксо-тиофен-3-ил)-тиодигликолевой кислоты

1мг SH-группу-несущего конъюгата, описанного в примере 18a), растворяют в 1мл 0,1М динатриевого кислого фосфатного буфера (pH9,5). После добавления 10мг динатрий тартрата смешивают с раствором пертехнетата натрия (1мКи) и затем с 10мкл раствора хлорида олова (II) (5мг SnCl<sub>2</sub>/1мл 0,01M HCl). Выход по изотопу (94%) определяют с помощью ЖХВР.

Пример 19

а) 5'-(6-Амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир 32-мерного олигонуклеотида 5' -

CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT-<sup>33</sup>-T-5'

30-мерный олигонуклеотид 5'-

CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUA-3', идентифицированный по SELEX способу, с модификацией тимидиновой последовательности T-<sup>33</sup>-T-5', расположенной против хода транскрипции, которая связана 5'-положением на носителе, получают обычным путем в автоматическом синтезаторе Pharmacia Company (смотри Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид также присутствует на колонке твердого носителя. Путем реакции с раствором трихлоруксусной кислоты в дихлорметане открывают 5'-гидроксигруппу. Нагрузка на колонку, составляет около 10мг 32-мерного олигонуклеотида. Чтобы соединить линкер, колонку подвергают взаимодействию с ацетонитрильным раствором 50мкмоль β-цианоэтил-N,N-диизопропиламино-6-(трифторацетиламино)-1-гексил-фосфорамидита (полученного согласно Nucl. Acids Res. 16, 2659 - 2669 (1988)) в присутствии тетразола. Окисление образовавшегося фосфита в полностью защищенный фосфотриэфир проводят с помощью йода в тетрагидрофуране. Затем колонку промывают последовательно метанолом и водой. Чтобы удалить модифицированный олигонуклеотид от твердого носителя, содержимое колонки транспортируют в мультиампулу, смешивают с 5мл 30% раствора аммиака, сосуд герметизируют и подвергают встряхиванию на протяжении ночи при 55°C. Затем охлаждают до 0°C, центрифугируют, носитель промывают 5мл воды, и объединенные водные фазы подвергают лиофильной сушке.

Для очистки твердое вещество помещают в 2мл воды, смешивают с 2мл 0,5М раствора ацетата аммония и смешивают с 10мл этанола и оставляют стоять на протяжении ночи при -20°C, центрифугируют, и остаток промывают 1мл этанола (-20°C) и, наконец, сушат в вакууме при комнатной температуре.

8мг названного соединения получают в виде бесцветного порошка.

б) Конъюгат 5'-(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир 32-мерного олигонуклеотида

5'-

CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT-<sup>33</sup>-T-5' и 10-[7-(4-изо-тиоцианатофенил)-2-гидроксис-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-аза-гептил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетрааза-цикло-додекана

8мг олигонуклеотида, полученного в примере 19a), растворяют в 2,5мл NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> буфера (pH8,0) и смешивают с 1мг 10-[7-(4-изотиоцианатофенил)-2-гидроксис-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-азагептил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетрааза-циклододекана (названное соединение примера 1f). Перемешивают в течение 5 часов при комнатной температуре, затем доводят pH до 7,2 с помощью 0,1М хлористоводородной кислоты, и раствор подвергают ультрафильтрации через мембрану с пределом эксклюзии 3000 (Amicon YM3) и затем лиофильно сушат. Получают 7мг требуемого конъюгата.

с)  $^{111}$ Индий комплекс конъюгата 5'(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 32-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT-3'. Т-5' и 10-[7-(4-изо-тиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-аза-гептил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаациклодо-декана 15мкл  $^{111}$ Индий (III) ацетатного раствора (350мКи), (полученного из  $^{111}$ Индий (III) хлорида в 2М растворе ацетата натрия и доведенного до pH4,0 с помощью 0,1М хлористоводородной кислоты) добавляют к 135мкл раствора 1мг названного соединения примера 19b) в MES буфере, pH6,2 (MES = 2-(N-морфолино)-этилсульфоновая кислота) pH доводят до 4,2 добавлением 0,01М хлористоводородной кислоты. Перемешивают в течение 1 часа при 37°C при pH4,2. Доводят до pH6 при помощи 2М раствора ацетата натрия и добавляют 10мкл 0,1М раствора  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$  = динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты), чтобы комплексовать избыток  $^{111}$ Индий. Конечную очистку полученного таким образом меченого конъюгата (1h) проводят с помощью ЖХВР (вытеснительная хроматография TSK-400/MЕЗ-буфер). Фракции, содержащие меченый конъюгат, разбавляют обычным физиологическим раствором, доводят до pH7,2 с помощью 0,01М раствора гидроксида натрия и фильтруют. Полученный таким образом раствор представляет препарат, пригодный для радиодиагностики.

#### Пример 20

а) 5'(6-Амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир 35-мерного олигонуклеотида 5'-T\*\*\*T\*\*\*T\*\*\*T\*\*\*TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAA AUGAGAUU-3'

30-мерный олигонуклеотид 5'-TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUAGAGAUU-3' (послед №13 Пат США №5270163), идентифицированный по SELEX способу, получают обычным путем в автоматическом синтезаторе Pharmacia Company (смотри *Oligonucleotides and Analogues*, A Practical Approach, Ed F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид также присутствует на колонке твердого носителя. Четыре конечных тимидина связывают фосфородитиоатами с тимидином, присутствующим на 5'-конце согласно технике, описанной G. Blaton et al. in "Oligonucleotides and Analogues", pp 109 - 135. Для этой цели сначала 5'-гидрокси группу открывают путем обработки с трихлоруксусной кислотой. Затем 3'-гидрокси группу 5'-DMTO-тиридина превращают с помощью триспирролидинофосфина и тет-разола в диамидит, который превращают в фосфоротиоамидит путем добавления 2,4-дихлорбензил меркаптана. Это соединение активизируют тетразолом и подвергают взаимодействию с 5'-гидрокси группой олигонуклеотида в тиофосфаттриэфир. Окисление в фосфородитиоат происходит с помощью элементарной серы в растворе дисульфида углерода, пиридина, триэтиламина 95/95/10. Бензильные группы еще не удалены. Аналогичным путем также связывают 3 дополнительных тимидина. Нагрузка на колонку составляет около 10мг 35-мерного олигонуклеотида. Затем 5'-гидрокси группу снова открывают.

Чтобы соединить линкер, колонку подвергают взаимодействию с ацетонитрильным раствором 50мкмоль 2-цианэтил-N,N'-диизопропил-амино-6-(трифторацетида)-1-гексил фосфорамидита (лит в примере а) в присутствии тетразола. Окисление образовавшегося фосфита в фосфотриэфир проводят с помощью иода в тетрагидрофуране. Затем колонку промывают последовательно метанолом и водой. Затем защитные группы дитионатных связей удаляют раствором тиофенол/триэтиламин/диоксан 1/2/2, что происходит в течение 2 часов. После чего колонку промывают, в каждом случае тройным объемом колонки, метанолом, затем эфиром и сушат. Чтобы удалить модифицированный олигонуклеотид от твердого носителя, содержимое колонки транспортируют в мультиампулу, смешивают с 5мл 30% раствора аммиака, сосуд герметизируют и подвергают встряхиванию на протяжении ночи при 55°C. Затем охлаждают до 0°C, центрифугируют, носитель промывают 5мл воды, и объединенные водные фазы подвергают лиофильной сушке.

Для очистки твердое вещество помещают в 2мл воды, смешивают с 2мл 0,5М раствора ацетата аммония и смешивают с 10мл этанола, и оставляют на протяжении ночи при -20°C, центрифугируют, и остаток промывают 1мл этанола (-20°C) и, наконец, сушат в вакууме при комнатной температуре.

8мг названного соединения получают в виде бесцветного порошка.

б) Конъюгат 5'(6-Амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-T\*\*\*T\*\*\*T\*\*\*T\*\*\*TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAA AUGAGAUU-3' и 10-[7-(4-изотиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-азагептил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаациклодекана

8мг олигонуклеотида, полученного в примере 20а), растворяют в 2,5мл  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  буфера (pH8,0) и смешивают с 1мг 10-[7-(4-изотиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-азагептил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаациклодекана (названное соединение примера 1f). Перемешивают в течение 5 часов при комнатной температуре, затем доводят pH до 7,2 с помощью 0,1М хлористоводородной кислоты, и раствор подвергают ультрафильтрации через мембрану с пределом эксклюзии 3000 (Amicon YM3) и затем лиофильно сушат. Получают 7мг требуемого конъюгата.

с)  $^{111}$ Индий комплекс конъюгата 5'(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-T\*\*\*T\*\*\*T\*\*\*T\*\*\*TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAA AUGAGAUU-3' и 10-[7-(4-изотиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-азагептил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаациклодекана

15мкл  $^{111}$ Индий (III) ацетатного раствора (350мКи), (полученного из  $^{111}$ Индий (III) хлорида в 2М растворе ацетата натрия и доведенного до pH4,0 с помощью 0,1М хлористоводородной кислоты) добавляют к 135мкл раствора 1мг назван-

ного соединения примера 20b) в MES буфере, pH 6,2 (MES = 2-(N-морфолино)-этилсульфоновая кислота) pH доводят до 4,2 добавлением 0,01M хлористоводородной кислоты. Перемешивают в течение 1 часа при 37°C при pH 4,2. Доводят до pH 6 при помощи 2M раствора ацетата натрия и добавляют 10мкл 0,1M раствора Na<sub>2</sub>EDTA = динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, чтобы комплексовать избыток <sup>111</sup>Индия. Конечную очистку полученного таким образом конъюгата (1h) проводят с помощью ЖХВР (вытеснительная хроматография TSK-400/ME3-буфер). Фракции, содержащие меченый конъюгат, разбавляют обычным физиологическим раствором, доводят до pH 7,2 с помощью 0,01M раствора гидроксида натрия и фильтруют. Полученный таким образом раствор представляет препарат, пригодный для радиодиагностики.

#### Пример 21

а) 5'-(6-Амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*\*T\*<sup>111</sup>T\*\*T\*\*T-3'

Получают 30-мерный олигонуклеотид 3'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*\*T\*<sup>111</sup>T\*\*T\*\*T-3', идентифицированный по SELEX способу, с модификацией последовательности T\*\*T\*\*T\*\*T\*\*T-3', расположенной против хода транскрипции, причем сначала получают последовательность из 5 тимидинов, соединенных цианоэтилфосфатными группами на носителе при 3'. Посредством реакции этого соединения с 0,5M раствором тетраэтилтиурам дисульфида в ацетонитриле, сульфирование в фосфонотиоат происходит в течение 15 минут, что и является затем со свободной 5'-гидроксильной группой исходным веществом для 35-мерного олигонуклеотида. Полный синтез происходит обычным путем в автоматическом синтезаторе Pharmacia Company (смотри Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed F Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид все еще присутствует на колонке твердого носителя. Посредством взаимодействия с раствором трихлоруксусной кислоты в дихлорметане, 5'-гидрокси открывают. Нагрузка на колонку составляет около 10мг 35-мерного олигонуклеотида. Чтобы соединить линкер, колонку подвергают взаимодействию с ацетонитрильным раствором 50мкмоль β-цианоэтил-N,N-диизопропиламино-6-(трифторацетамидо)-1-гексил-фосфорамидита (полученного согласно Nucl Acids Res 16, 2659 - 2669 (1988)) в присутствии тетразола. Окисление полученного таким путем фосфита в полностью защищенный фосфотриэфир проводят с помощью йода в тетрагидрофуране. Затем колонку промывают последовательно метанолом и водой. Чтобы удалить модифицированный олигонуклеотид от твердого носителя и отщепить цианоэтильные группы, содержимое колонки транспортируют в мультимампулу, смешивают с 5мл 30% раствора аммиака, сосуд герметизируют и подвергают встряхиванию на протяжении ночи при 55°C. Затем охлаждают до 0°C, центрифугируют, носитель промывают 5мл воды, и объединенные водные фазы подвергают лиофильной сушке.

Для очистки твердое вещество помещают в 2мл воды, смешивают с 2мл 0,5M раствора ацетата аммония и смешивают с 10мл этанола, и оставляют стоять на протяжении ночи при -20°C, центрифугируют, и остаток промывают 1мл этанола (-20°C) и, наконец, сушат в вакууме при комнатной температуре.

8мг названного соединения получают в виде бесцветного порошка.

б) Конъюгат 5'-(6-Амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*\*T\*<sup>111</sup>T\*\*T\*\*T-3' и 10-[7-(4-изотиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-азагептил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазацикло-додекана

8мг олигонуклеотида, полученного в примере 20а), растворяют в 2,5мл NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> буфера (pH 8,0) и смешивают с 1мг 10-[7-(4-изотиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-азагептил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекана (названное соединение примера 1f). Перемешивают в течение 5 часов при комнатной температуре, затем доводят pH до 7,2 с помощью 0,1M хлористоводородной кислоты, и раствор подвергают ультрафильтрации через мембрану с пределом эксклюзии 3000 (Amicon YM3) и затем лиофильно сушат. Получают 7мг требуемого конъюгата.

с) <sup>111</sup>Индий комплекс конъюгата 5'-(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*\*T\*<sup>111</sup>T\*\*T\*\*T-3' и 10-[7-(4-изотиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-азагептил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазацикло-додекана

15мкл <sup>111</sup>Индий (III) ацетатного раствора (350мкКи), (полученного из <sup>111</sup>Индий (III) хлорида в 2M растворе ацетата натрия и доведенного до pH 4,0 с помощью 0,1M хлористоводородной кислоты) добавляют к 135мкл раствора 1мг названного соединения примера 21b) в MES буфере, pH 6,2 (MES = 2-(N-морфолино)-этилсульфоновая кислота) pH доводят до 4,2 добавлением 0,01M хлористоводородной кислоты. Перемешивают в течение 1 часа при 37°C при pH 4,2. Доводят до pH 6 при помощи 2M раствора ацетата натрия и добавляют 10мкл 0,1M раствора Na<sub>2</sub>EDTA = динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, чтобы комплексовать избыток <sup>111</sup>Индия. Конечную очистку полученного таким образом конъюгата (1h) проводят с помощью ЖХВР (вытеснительная хроматография TSK-400/ME3-буфер). Фракции, содержащие меченый конъюгат, разбавляют обычным физиологическим раствором, доводят до pH 7,2 с помощью 0,01M раствора гидроксида натрия и фильтруют. Полученный таким образом раствор представляет препарат, пригодный для радиодиагностики.

#### Пример 22

а) N-(5-Меркапто-3-тиа-1-оксо-пент-1-ил)-глицин метиловый эфир

12,56г (0,1моль) гидрохлорида метилового

эфира глицина, 13,42г (0,1моль) 2,5-дитиациклогексана и 10,12г (0,1моль) триэтиламина растворяют в атмосфере аргона в 500мл абсолютного дихлорметана. Перемешивают в течение 24 часов при комнатной температуре, и затем загрузку выливают на 250мл 5% водной лимонной кислоты. Хорошо перемешивают, органическую фазу отделяют и сушат над сульфатом натрия. После выпаривания растворителя в вакууме маслянистый остаток хроматографируют на силикагеле (подвижный растворитель дихлорметан/метанол, метанол 0 - 10%)

Выход 18,9г (84,6%), бесцветное масло  
Элементный анализ

Рассч	C	37,65	H	5,87	N	8,27	021,49	S	28,71
Найд	C	37,43	H	6,02	N	8,12		S	28,48

b) N-[5-(Трифенилметилмеркапто)-3-тиа-1-оксо-пент-1-ил]-глицин метиловый эфир

11,17г (50ммоль) N-(5-Меркапто-3-тиа-1-оксо-пент-1-ил)-глицин метилового эфира (пример 22a)), 13,94г (50ммоль) трифенилметил хлорида и 5,06г (50ммоль) триэтиленамина растворяют в атмосфере аргона в 500мл абсолютного дихлорметана. Перемешивают в течение 16 часов при комнатной температуре, и загрузку затем выливают в 150мл 5% водной уксусной кислоты. Хорошо перемешивают, органическую фазу отделяют и сушат над сульфатом натрия. После выпаривания растворителя в вакууме маслянистый остаток хроматографируют на силикагеле (подвижный растворитель дихлорметан/метанол, 95/5)

Выход 15,7г (67,4%), бесцветное масло  
Элементный анализ

Рассч	C	67,07	H	5,85	N	3,01	010,31	S	13,77
Найд	C	67,01	H	6,11	N	2,93		S	13,49

c) N-[5-(Трифенилметилмеркапто)-3-тиа-1-оксо-пент-1-ил]-глицин-N'-(6-гидроксигексил)-амид 11,64г (25ммоль) N-[5-(трифенилметилмеркапто)-3-тиа-1-оксо-пент-1-ил]-глицин метилового эфира (пример 22b) и 29,3г (250ммоль) 6-аминогексанола сплавляют вместе в атмосфере аргона в течение 16 часов при 100°C. После охлаждения реакционной смеси, ее помещают в 500мл дихлорметана, и затем в 250мл 5% водной лимонной кислоты. При охлаждении и перемешивании, pH доводят до 6,5 концентрированной хлористоводородной кислотой. Органическую фазу отделяют и сушат над сульфатом натрия. После выпаривания растворителя в вакууме маслянистый остаток хроматографируют на силикагеле (подвижный растворитель дихлорметан/метанол, 0 - 10% метанол)

Выход 7,7г (56,0%), бесцветное масло  
Элементный анализ

Рассч	C	67,60	H	6,96	N	5,09	08,72	S	11,64
Найд	C	67,48	H	7,03	N	4,92		S	11,43

d) N-Диизопропил-О-цианоэтил-О'-[7,9-диаза-8,11-диоксо-13-тиа-15-(трифенил-меркапто)-пентадек-1-ил]-фосфористая кислота амид 5,51г (10ммоль) N-[5-(Трифенилметилмеркапто)-3-тиа-1-оксо-пент-1-

ил]-глицин-N'-(6-гидроксигексил)-амида (пример 22c) растворяют в 50мл абсолютного дихлорметана и 50мл абсолютного пиридина. 4,73г (20ммоль) хлорангидрида диизопропиламино-О-цианоэтил-фосфористой кислоты, растворенного в 50мл абсолютного дихлорметана, вливают по каплям в загрузку при комнатной температуре. Через 4 часа содержимое выливают на 250мл насыщенного водного раствора бикарбоната натрия, перемешивают, и органическую фазу сушат над сульфатом магния. После испарения растворителя маслянистый остаток хроматографируют на силикагеле (дихлорметан/метанол/триэтиламин 98/1/1)

Выход 4,32г (57,5%), бесцветное вспененное масло  
Элементный анализ

Рассч	C	63,97	H	7,38	N'	7,46	08,52	P	4,12	S	8,54
Найд	C	63,81	H	7,41	N'	7,22		P	3,97	S	8,31

e) 5'-[N-(3'-Аза-8'-меркапто-1',4'-диоксо-6'-тиа-окт-1'-ил)-6-аминогексил-фосфорная кислота сложный эфир] 5' - CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*<sup>†</sup>T\*<sup>†</sup>T-3'

30-мерный олигонуклеотид 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*<sup>†</sup>T\*<sup>†</sup>T-3', идентифицированный по SELEX способом, с модификацией последовательности T\*<sup>†</sup>T\*<sup>†</sup>T-3', расположенной против хода транскрипции, получают с помощью автоматического синтезатора Pharmacia Company (смотри Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид в защищенной форме все еще присутствует на колонке твердого носителя. Нагрузка на колонку составляет около 15мг 35-мерного олигонуклеотида. После отщепления 5'-DMT-защитной группы, его связывают согласно стандартным методам с фосфорамидитом, описанным в примере 22d. После окисления йодом в тетрагидрофуране, конъюгат отщепляют от носителя. Для этой цели вещество смешивают с 10мл 30% раствора аммиака и подвергают встряхиванию на протяжении ночи при 55°C. Затем охлаждают до 0°C, центрифугируют, носитель промывают 10мл воды, и объединенные водные фазы лиофилизуют. Для очистки вещество помещают в 5мл воды, добавляют 4мл 0,5моль, ацетата аммония и смешивают с 20мл

этанол. Для полного осаждения охлаждают в течение ночи (-20°C), центрифугируют, и остаток промывают 1мл этанола (-20°C) и сушат в вакууме. Получают 9,5мг белого порошка. Для отщепления S-третил-защитной группы вещество помещают в 5мл 50 ммоль раствора ацетата триэтиламиния (pH=7) и инкубируют с 500мкл 0,1М раствора нитрата серебра в течение 30 минут. Затем добавляют 500мкл 0,14М раствора дитиотреитола и инкубируют в течение еще 30 минут. После центрифугирования прозрачный супернатант обессоливают на Сефадексе G 10. Фракции, содержащие продукт, сушат вымораживанием. Получают 3,5мг белого порошка.

f) Tc-99m Комплекс 5'-[Ы-(3'-Аза-8'-меркапто-1',4'-ди-оксо-6'-тиа-окт-1'-ил)-6-аминогексил-

фосфорная кислота сложный эфир] 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T-T-3'

1мг конъюгата, описанного в примере 22е), растворяют в 1мл 0,1М динатрий кислого фосфатного буфера (pH=8,5) После добавления 10мг динатрий тартрата, раствор смешивают с раствором пертехнетата натрия (1мКи) и затем с 10мкл раствора хлорида опова (II) (5мг/1мл 0,01М HCl) Выход по изотопу (прибл 95%) определяют с помощью ЖХВР

Пример 23

а) 5'-[N-(6'-Аза-7'-гидроксикарбокси-9'-меркапто-1',5'-диоксо-3'-тиа-нон-1'-ил)-6'-аминогексил-фосфорная кислота сложный эфир] 5'-

CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T-T-3'

Сначала получают раствор N-гидросукцинимид сложный эфир моноамида N-(2-оксо-тетрагилпропиофен-3-ил)тиодигликолевой кислоты (DE 4311023) в 500мкл абсолютного ДМФ (DMF) Для этой цели 24,9мг (0,1ммоль) моноамида N-(2-оксо-тетрагидропиофен-3-ил)тиодигликолевой кислоты и 11,5мг (0,1ммоль) N-гидросукцинимид растворяют в 500мкл абсолютного ДМФ При 0°C к загрузке добавляют 19,2мг (0,1ммоль) EDC Перемешивают в течение 30 минут при 0°C

10мг 5'-(6-амино гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T-T-3', полученного в примере 1, растворяют в 1мл бикарбонат натрия/карбонат натрия буфера (pH=8,0) Добавляют ДМФ раствор NHS сложного эфира, полученного заранее, и инкубируют в течение 16 часов при комнатной температуре в атмосфере аргона Затем центрифугируют, концентрируют до объема 500мкл и хроматографируют на Софадексе G-25 После сушки вымораживанием получают 2мг конъюгата в виде белого порошка

Tc-99m Комплекс 5'-[N-(6'-Аза-7'-гидроксикарбокси-9'-меркапто-1',5'-диоксо-3'-тиа-нон-1'-ил)-6'-аминогексил-фосфорная кислота сложный эфир] 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T-T-3'

1мг конъюгата, описанного в примере 23а), растворяют в 1мл 0,1М динатрий кислого фосфатного буфера После добавления 10мг динатрий тартрата, его смешивают с раствором пертехнетата натрия (1мКи) и затем с 10мкл раствора хлорида опова (II) (5мг/1мл 0,01м HCl) Выход по изотопу (прибл 92%) определяют с помощью ЖХВР

Пример 24

а) 5'-[N-(Меркаптоацетил)-6'-аминогексилфосфорная кислота сложный эфир] 5'-

CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T-T-3'

10мг 5'-(6-амино-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T-T-3', полученного в примере 1, растворяют в 1мл бикарбонат натрия/карбонат натрия буфера

(pH=8,0) Затем 23,1мг (0,1 ммоль) сложного эфира S-ацетилмеркаптоуксусной кислоты -MHS, растворенного в 500мкл абсолютного ДМФ, добавляют к загрузке и инкубируют в течение 17 часов при комнатной температуре в атмосфере аргона Затем центрифугируют, концентрируют до объема 500мкл и хро-матографируют на Софадексе G-25 После сушки вымораживанием получают 3мг конъюгата в виде белого порошка

б) Tc-99m Комплекс 5'-[N-(меркаптоацетил)-6'-аминогексил-фосфорная кислота сложный эфир] 5'-

CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T-T-3'

1мг конъюгата, описанного в примере 24а), растворяют в 1мл 0,1М динатрий кислого фосфатного буфера (pH=8,5) После добавления 10мг динатрий тартрата, его смешивают с раствором пертехнетата натрия (1мКи) и затем с 10мкл раствора хлорида опова (II) (5мг/1мл 0,01М HCl) Выход по изотопу (прибл 97%) определяют с помощью ЖХВР

Пример 25

а) N-[2-(Трифенилметилмеркапто)-эт-1-ил]-тиодигликолевая кислота моноамид

31,9г (0,1ммоль) 2-(Трифенилметилмеркапто)-этиламина и 10,1г (0,1ммоль) триэтиламина вводят в 500мл абсолютного дихлорметана При 0°C вливают по каплям раствор 13,2г (0,1ммоль) ангидрида тиодигликолевой кислоты, перемешивают в течение 1 часа при 0°C и в течение 16 часов при комнатной температуре Затем выливают на 250мл 5% водной лимонной кислоты, хорошо перемешивают, органическую фазу отделяют и сушат над сульфатом натрия После выпаривания растворителя в вакууме остаток хроматографируют на силикагеле (подвижный растворитель дихлорметан/метанол, 0 - 20% метанола)

Выход 20,32г (45,0%), бесцветное масло

Элементный анализ

Рассч	C	66,	49	H	5,58	N	3,10	O	10,63	S	14,20
Найд	C	66,	21	H	5,73	N	2,98			S	14,02

б) 5'-[N-(1',5'-Диоксо-6'-аза-3'-тиа-8'-меркапто-окт-1-ил)-аминогексилфосфорная кислота сложный эфир] 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T-T-3'

Сначала получают NHS-эфир моноамида N-[2-(трифенилметил-меркапто)-эт-1-ил]-тиодигликолевой кислоты (пример 25а) Для этой цели 45,2мг (0,1ммоль) ранее упомянутой кислоты растворяют в 500мкл абсолютного ДМФ (0,1ммоль) и смешивают с 11,5мг (0,1ммоль) NHS После охлаждения до 0°C добавляют 19,2мг (0,1ммоль) EDC и инкубируют в течение 30 минут при 0°C

Раствор 10мг 5-(6-аминогексил-фосфорная кислота сложный эфир) 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T-T-3' в 1мл бикарбонат натрия/карбонат натрия буфера (pH=8,0), описанного в примере 1, смешивают с 500мкл раствора NHS-эфира, полученного заранее Инкубируют в течение 16 часов при комнатной температуре Затем концентрируют путем выпаривания до объема 500мкл и хроматографи-

руют на Сефадексе G-25. Получают 6мг S-третил-защитного соединения. Отщепление S-третил-защитной группы, изоляцию олигонуклеотида, несущего SH группы, и очистку проводят, как описано в примере 22е. Получают 4мг белого лиофилизата

b) Tc-99m Комплекс 5'-[N-(1',5'-Диоксо-6'-аза-3'-тиа-8'-меркапто-окт-1-ил)-аминогексилфосфорная кислота сложный эфир] 5'-  
CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*  
T\*T\*T-3'

1мг конъюгата, описанного в примере 25b), растворяют в 1мл 0,1М динатрий кислого фосфатного буфера (pH=8,5). После добавления 10мг динатрий тартрата, его смешивают с раствором пертехнетата натрия (1мКи) и затем с 10мкл раствора хлорида олова (II) (5мг/1мл 0,01М HCl). Выход по изотопу (91%) определяют с помощью ЖХВР

Пример 26

N,N'-Бис-[2-(трифенилметилмеркапто)-1-оксо-эт-1-ил]-3,4-диаминобензойная кислота метило-вый эфир

3,32г (20ммоль) метилового эфира 3,4-диаминобензойной кислоты и 13,38г (40ммоль) S-трифенилметил-меркаптоуксусной кислоты растворяют в 200мл абсолютного дихлорметана. При 0°C 8,25г (40ммоль) дициклогексилкарбодиимида, растворенного в 100мл абсолютного дихлорметана, вливают по капле в загрузку

Перемешивают в течение более 1 часа при 0°C и, наконец, в течение более 16 часов при комнатной температуре. Фильтруют, встряхивают с 1% водной лимонной кислотой, и органическую фазу сушат над сульфатом натрия, и растворитель испаряют в вакууме. Остаток хроматографируют на силикагеле (подвижный растворитель дихлорметан/метанол, 0 - 10% метанола)

Выход 10,2г (63,8%), бесцветное масло

Элементный анализ

Рассч	75,16	H	5,30	N	3,51	08,01	8,02
Найд	75,01	H	5,58	N	3,30		7,89

b) N,N'-Бис-[2-(трифенилметилмеркапто)-1-оксо-эт-1-ил]-3,4-диаминобензойная кислота

7,99 (10ммоль) метилового эфира N,N'-Бис-[2-(трифенилметилмеркапто)-1-оксо-эт-1-ил]-3,4-диаминобензойной кислоты (пример 26а) смешивают в 200мл диоксана, 20мл воды и 20мл метанола с 4г (100ммоль) гидроксида натрия. Перемешивают в течение 5 часов при комнатной температуре, и загрузку выливают в 300мл 5% водной лимонной кислоты. Полностью экстрагируют дихлорметаном, органическую фазу сушат над сульфатом натрия. После испарения растворителя остаток хроматографируют на силикагеле (подвижный растворитель дихлорметан/метанол, 0 - 40% метанола)

Выход 3,56г (45,4%), бесцветное масло

Элементный анализ

Рассч	C	74,97	H	5,14	N	3,57	08,15	S	8,17
Найд	C	74,71	H	5,32	N	3,31		S	7,88

c) 5'-(N-[3',4'-Бис-(2"-меркаптоацетиламино)-бензоил]-6-аминогексилфосфорная кислота сложный эфир) 5'-

CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*  
T\*T\*T-3'

Сначала получают NHS-эфир N,N'-Бис-[2-(трифенилметил-меркапто)-1-оксо-эт-1-ил]-3,4-диаминобензойной кислоты (пример 26b). Для этой цели 78,5мг (0,1ммоль) кислоты растворяют в 500мкл абсолютного ДМФ и смешивают с 11,5мг (0,1ммоль) NHS. После охлаждения до 0°C добавляют 19,2мг (0,1ммоль) EDC и инкубируют в течение 30 минут при 0°C

Раствор 10мг 5'-(6-аминогексил-фосфорная кислота сложный эфир) 5'-  
CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*  
T\*T\*T-3' в 1мл бикарбонат натрия/карбонат натрия буфера (pH=8,0), описанном в примере 1, смешивают с 500мкл раствора NHS-эфира, полученного заранее. Инкубируют в течение 17 часов при комнатной температуре. Затем концентрируют упариванием до 500мкл и хроматографируют на Сефадексе G-25. Получают 7мг S-третил-защитного соединения

Отщепление S-третил-защитной группы, изоляцию олиго-нуклеотида, несущего SH-группы, и очистку проводят, как описано в примере 22е. Получают 3мг белого лиофилизата

d) Tc-99m Комплекс 5'-{N-[3',4'-Бис-(2"-меркаптоацетиламино)-бензоил]-6-аминогексилфосфорная кислота сложный эфир} 5'-  
CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*  
T\*T\*T-3'

1мг конъюгата, описанного в примере 26с), растворяют в 1мл 0,1М динатрий кислого фосфатного буфера (pH=9,5). После добавления 10мг динатрий тартрата, его смешивают с раствором пертехнетата натрия (1мКи) и затем с 10мкл раствора хлорида олова (II) (5мг/1мл 0,01М HCl). Выход по изотопу (прибл 91%) определяют с помощью ЖХВР

Пример 27

a) N-[O-Ацетил-гидроксиацетил]-глицил-глицил-глицин-трет-бутиловый эфир

24,5г (0,1моль) глицил-глицил-глицин-трет-бутилового эфира и 11,8г (0,1моль) O-ацетил-гликолевой кислоты вместе добавляют при 0°C в 500мл абсолютного диметилформамида. Раствор 20,6г (0,1моль) дициклогексилкарбодиимида в 500мл абсолютного диметилформамида добавляют по каплям к загрузке, перемешивают в течение 1 часа при 0°C и, наконец, в течение ночи при комнатной температуре. Фильтруют, и фильтрат концентрируют выпариванием на масляном насосе (форвакуумный насос)

Кристаллизуют неоднократно из смеси этилацетат/н-пентан

Выход 12,5г (36,2%), белый порошок

Элементный анализ

Рассч	C	48,69	H	6,71	N	12,17	032,43
Найд	C	48,43	H	7,01	N	11,93	

b) N-[O-Ацетил-гидроксиацетил]-глицил-глицил-глицин

3,45г (10ммоль) N-[O-Ацетил-гидроксиацетил]-глицил-глицил-глицин-трет-бутилового эфира перемешивают в 50мл трифторуксусной кислоты в

течение 15 минут. Затем выливают в 500мл абсолютного диэтилового сложного эфира, и продукт отфильтровывают. Неоднократно перекристаллизовывают из смеси этилацетат/н-пентан.

Выход 1,23г (42,5%), белый порошок.  
Элементный анализ

Рассч	C	41,53	H	5,23	N	14,53	038,72
Найд	C	41,31	H	5,51	N	14,32	

с) 5-[N-[N'-Гидроксиацетил]глицил-глицил-глицил]-6-амино-гексилфосфорная кислота сложный эфир} 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T\*T-T-3'

Сначала получают NHS-эфир N-[O-ацетил-гидроксиацетил]-1-глицил-глицил-глицин (пример 27b). Для этой цели 28,9мг (0,1ммоль) кислоты растворяют в 500мл абсолютного ДМФ и смешивают с 11,5мг (0,1ммоль) NHS. После охлаждения до 0°C добавляют 19,2мг (0,1ммоль) EDC и инкубируют в течение 30 минут при 0°C. Раствор 10мг (6-аминогексил-фосфорная кислота сложный эфир) 5'-

CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T\*T-T-3' в 1мл раствора бикарбоната натрия, описанного в примере 1, смешивают с 500мл раствора NHS-эфира, полученного заранее. Инкубируют в течение 18 часов при комнатной температуре. Затем концентрируют упариванием до 500мкл и хроматографируют на Сефадексе G-25. После лиофилизации получают 3мг названного соединения.

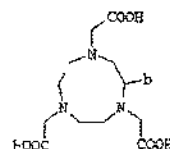
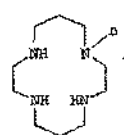
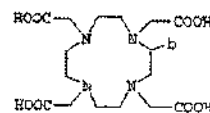
д) Tc-99m Комплекс 5-[N-[N'-Гидроксиацетил]глицил-глицил-глицил]-6-аминогексил-фосфорная кислота сложный эфир} 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT\*T\*T\*T-T-3'

1мг конъюгата, описанного в примере 27с), растворяют в 1мл 0,1М динатрий кислого фосфатного буфера (pH=10,5). После добавления 10мг динатрий тартрата, его смешивают с раствором пертехнетата натрия (1мКи) и затем с 10мкл раствора хлорида олова (II) (5мг/1мл 0,01М HCl). Выход по изотопу (95%) определяют с помощью ЖХВР.

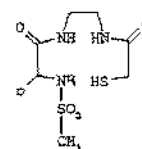
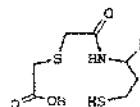
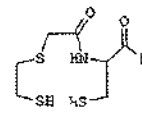
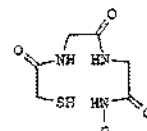
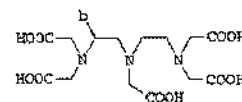
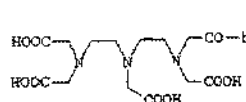
Предшествующие примеры можно повторить с тем же самым успехом путем замены используемых в предшествующих примерах взаимодействующих веществ и/или рабочих условий на описанные в общем или конкретно взаимодействующие вещества и/или рабочие условия данного изобретения.

Из вышеприведенного описания специалист в данной области техники может легко установить существенные характеристики данного

изобретения, и не выходя за рамки сущности и объема его, может провести различные изменения и модификации изобретения, чтобы адаптировать его к различным использованиям и условиям.

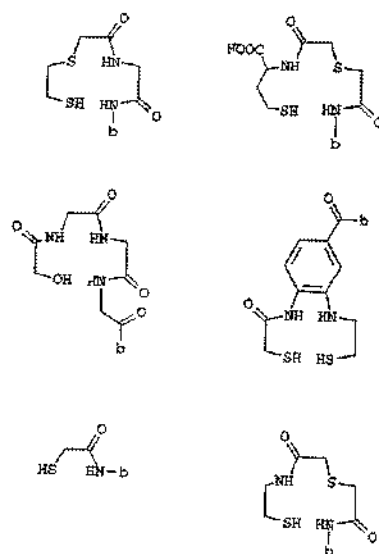


Фиг 1



Фиг 2





Фиг. 3

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)  
вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна  
(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»  
вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна  
(044) 216 – 32 – 71