



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 202 555** ⁽¹³⁾ **C2**
 (51) МПК⁷ **C 07 F 5/02, G 01 N 33/53, 33/72**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
 ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 96117248/04, 27.01.1995
 (24) Дата начала действия патента: 27.01.1995
 (30) Приоритет: 28.01.1994 US 08/188,460
 28.01.1994 US 08/188,531
 28.01.1994 US 08/188,958
 28.01.1994 US 08/189,176
 (43) Дата публикации заявки: 27.11.1998
 (46) Дата публикации: 20.04.2003
 (56) Ссылки: SU 1839171, A1 30.12.1993. WO 92/08722 A1, 29.05.1992. WO 90/13818 A1, 15.11.1990. US 4496722 A1 29.01.1985.
 (85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: 28.08.1996
 (86) Заявка PCT: US 95/01004 (27.01.1995)
 (87) Публикация PCT: WO 95/20591 (03.08.1995)
 (98) Адрес для переписки: 101000, Москва, М.Златоустинский пер., д.10, кв.15, "ЕВРОМАРКПАТ", И.А.Веселицкой, рег.№ 0011

(71) Заявитель: ПРОЛИНКС, ИНК. (US)
 (72) Изобретатель: СТОЛОВИЦ Марк (US)
 (73) Патентообладатель: ПРОЛИНКС, ИНК. (US)
 (74) Патентный поверенный: Веселицкая Ирина Александровна

(54) БИОКОНЪЮГАЦИОННЫЕ КОМПЛЕКСЫ, СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ (ВАРИАНТЫ), ФЕНИЛБОРНОКИСЛЫЕ КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩИЕ РЕАГЕНТЫ, ФЕНИЛБОРНОКИСЛЫЕ ПОПЕРЕЧНО-СШИВАЮЩИЕ РЕАГЕНТЫ, НАБОР СРЕДСТВ ИЛИ СИСТЕМА, СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ТРЕБУЕМОЙ ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК

(57) Изобретение относится к группе новых биоконъюгационных комплексов общей формулы А
 $BAS-L-Bc-L'-(Bc'-L'')n-BAS'$,
 где BAS, BAS', BAS''- биоактивные ингредиенты, которые могут быть как одинаковыми, так и различными; Bc и Bc' - комплексы фенилборной кислоты; L, L', L'' - линкеры; n = 0 или 1, трем способам их

получения, промежуточным продуктам, используемым в их синтезе и представляющим собой фенилборнокислые комплексообразующие реагенты и фенилборнокислые поперечно-сшивающие реагенты, способу выделения требуемой популяции клеток, а также набору или системе, содержащей биоконъюгат А, для выделения требуемой популяции клеток. 8 с. и 1 з.п. ф-лы.

RU
2
2
0
2
5
5
5
C
2

RU
?
2
2
0
2
5
5
5
C
2



(19) **RU**⁽¹¹⁾ **2 202 555**⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 07 F 5/02, G 01 N 33/53,**
33/72

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 96117248/04, 27.01.1995
(24) Effective date for property rights: 27.01.1995
(30) Priority: 28.01.1994 US 08/188,460
28.01.1994 US 08/188,531
28.01.1994 US 08/188,958
28.01.1994 US 08/189,176
(43) Application published: 27.11.1998
(46) Date of publication: 20.04.2003
(85) Commencement of national phase: 28.08.1996
(86) PCT application:
US 95/01004 (27.01.1995)
(87) PCT publication:
WO 95/20591 (03.08.1995)
(98) Mail address:
101000, Moskva, M.Zlatoustinskij per., d.10,
kv.15, "EVROMARKPAT", I.A.Veselitskoj, reg.№
0011

(71) Applicant:
PROLINKS, INK. (US)
(72) Inventor: STOLOVITs Mark (US)
(73) Proprietor:
PROLINKS, INK. (US)
(74) Representative:
Veselitskaja Irina Aleksandrovna

(54) BIOCONJUGATIVE COMPLEXES, METHOD OF THEIR SYNTHESIS (VARIANTS), PHENYLBORATE COMPLEX- FORMING CROSS-LINKING REAGENTS, KIT OF AGENTS OR SYSTEM, METHOD OF ISOLATION OF REQUIRED CELL POPULATION

(57) Abstract:
FIELD: organic chemistry, cellular biology. SUBSTANCE: invention relates to group of novel bioconjugative complexes of the general formula a: BAS-L-Bc-L'-(Bc'-L'')_n-BAS' where BAS, BAS', BAS'' are bioactive components that can be both similar and different; Bc and Bc' are complexes of phenylboric acid; L, L', L'' are linkers; n = 0 or 1. Invention relates

also to three methods of their synthesis, intermediate substances used in their synthesis and representing complexforming reagents and phenylborate cross-linked reagents, method of isolation of required cells population and also to kit or system containing bioconjugate A for isolation of required cells population. EFFECT: improved methods of synthesis and isolation. 9 cl, 26 ex

RU
2
2
0
2
5
5
5
C
2

RU
2
2
0
2
5
5
5
C
2

Изобретение относится к области биоконъюгационных препаратов, в частности к классу комплексных соединений (далее - комплексов) фенилборной кислоты, используемых при конъюгации биологических макромолекул, и к способам получения и использования таких комплексов.

Описательный термин биоконъюгация означает связывание химическими или биологическими средствами молекул двух или более видов, из которых по меньшей мере одна молекула является биологической макромолекулой. Это включает конъюгацию протеинов, пептидов, полисахаридов, лецитинов, гормонов, нуклеиновых кислот, липосом и клеток между собой или молекулами любых других видов, способными привести полезные свойства, включая радионуклиды, токсины, гаптены, ингибиторы, флуорофоры, лиганды и т.д. Особой разновидностью конъюгации является иммобилизация биологических макромолекул, когда их подвергают обратимой или необратимой конъюгации с нерастворимым носителем. Биоконъюгацию широко используют в исследованиях в области биохимии, иммунохимии и молекулярной биологии. Применения биоконъюгации многочисленны и включают аффинную хроматографию, аффинную цитохимию, гистохимию, обнаружение патологий в пробах, диагностику, усиление сигналов, иммуноанализ, гибридную технологию, технологию блоттирования, лиоаффинные сенсоры, детектирование генов в пробах, поперечно-сшивающие реагенты, определение сродства или его нарушения, транспорт лекарств, реагенты для встраивания генов, иммобилизующие реагенты, селективное извлечение, селективное выключение, цитометрию в потоке и анализ цитологических проб.

Существующие способы приготовления биоконъюгатов включают системы Avidin-Biotin и Digoxigenin-anti-Digoxigenin.

Итак функциональными группами для конъюгации перечисленных биоактивных ингредиентов являются следующие:

а) для протеинов, известно, что конъюгаты, в основном, получают с помощью лизина и цистеина на боковой цепи макромолекулы, посредством реакции с терминальным амином и сульфонильной группой соответствующей аминокислоты (D3-D5);

б) для гликопротеинов, включая иммуноглобулин, известно, что конъюгаты могут быть получены с помощью протеиновых групп, как описано выше, или посредством активации в отношении гидразида диольных групп простерического промежуточного углеводорода на боковой цепи макромолекулы, соседних с альдегидным остатком (D6-D7, описывающие ковалентное присоединение гликопротеинов к дегидроксиборонильному остатку на соседних гидроксильных группах гликопротеинов);

в) для пептидов, известно, что конъюгаты, в основном, получают подобно описанным выше конъюгатам протеинов, посредством реакции с расположенным на боковой цепи аминными и тиольными группами (D3);

г) для полисахаридов, хорошо известно, что конъюгаты, в основном, получают взаимодействием с соседними диольными

группами молекулы (D8);

д) для токсинов, лигандов и гаптен, включая лекарства и гормоны, известно, что конъюгаты, в основном, получают подобно описанным выше конъюгатам протеина, посредством взаимодействия с расположенным на боковой цепи макромолекулы аминными и тиольными группами (D3);

и) для нуклеиновых кислот, известно, что конъюгаты, в основном, получают посредством модификации олигонуклеотидов в 5-положении пиримидина или в 8 положении пурина (D9-D10);

к) для липосом и клеток хорошо известно, что конъюгаты, в основном, получают посредством модификации через конденсацию реактивных групп протеина (т.е. амина или тиола) на фосфатной группе липосом (D8);

л) для радионуклидов известно, что нуклиды можно сделать реактивными с помощью многих функциональных групп, включая аминные и тиольные группы протеинов (D4);

м) для ингибиторов ферментов хорошо известно, что конъюгаты, в основном, получают подобно описанным выше протеиновым конъюгатам, посредством взаимодействия расположенных на боковой цепи макромолекулы аминных и тиольных групп (D3);

о) для флуорофоров, известно, что флуоресцирующие протеины присоединяются аналогично протеинам, все флуорофоры имеют амины или модифицированы до содержания аминов и могут быть конъюгированы аналогично протеинам (D11, описаны свойства известных флуорофоров).

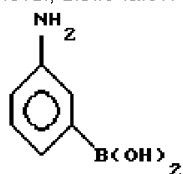
р) для твердофазной подложки, известно что подложка может быть реактивирована для многих функциональных групп, включая аминные и тиольные группы протеинов (D3).

Известно, что фенилборные кислоты взаимодействуют с имеющими реквизиционные свойства полярными молекулами многих видов. Известно, что комплексы различной устойчивости, содержащие 1,2-диолы, 1,3-диолы, 1,2-гидроксикислоты, 1,3-гидроксикислоты, 1,2-гидроксиамины, 1,3-гидроксиамины, 1,2-дикетоны и 1,3-дикетоны, могут быть образованы либо с нейтральной фенилборной кислотой, либо с фенилборатанионом. Иммобилизованная фенилборная кислота подобно (сорбентам для) хроматографии может быть использована для селективного извлечения из проб комплексных соединений биологических молекул, обладающих реквизиционными функциональными свойствами. Многие важные биологические молекулы, включая углеводы, катехоламиновые простагландины, рибонуклеотиды и стероиды, обладают реквизиционными свойствами и, следовательно, могут быть выделены таким путем.

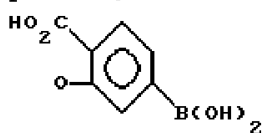
Фенилборная кислота подобно борной кислоте является кислотой Льюиса и ионизируется не прямой депротонизацией, а гидратацией, образуя тетраэдрический фенилборатанион ($pK_a=8,86$). Фенилборная кислота в три раза сильнее борной. Ионизация фенилборной кислоты - важный фактор образования комплексов, поскольку

после ионизации треугольная конфигурация боратаниона (со средним углом между связями 120° и средней длиной связей $1,37$ ангстрем) переходит в тетраэдрическую (со средним углом между связями 109° при средней длине связей $1,48 \text{ \AA}$). Разработка

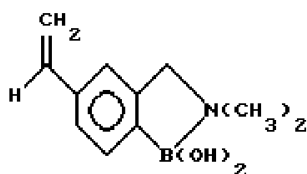
систем, использующих фенолборные кислоты со значениями pK_a ниже, чем у наиболее распространенной из ее коммерчески доступных производных (3-аминофенил)борной кислоты (pK_a $8,75$), была бы желательна, поскольку сделала бы возможной фиксацию различных биомолекул при физиологических условиях (pH $7,2$), существенно увеличивая тем самым количество соединений, пригодных для анализа этим методом. Фенолборные кислоты с pK_a ниже, чем у (3-аминофенил) борной кислоты, включают:



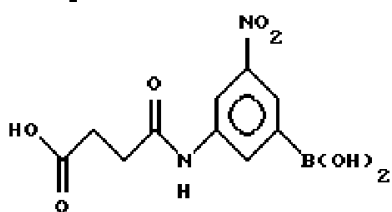
$pK_a = 8,75$



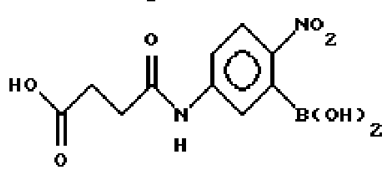
$pK_a = 8,35$



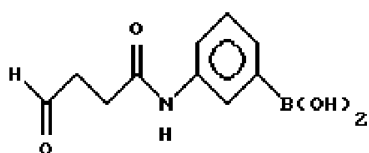
$pK_a = 5,20$



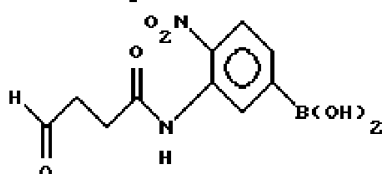
$pK_a = 7,30$



$pK_a = 7,15$



$pK_a = 9,20$



$pK_a = 9,20$

Ныне известно, что соединения, имеющие *цис-* или *коаксиальные* 1,2-диол- и 1,3-диолфункциональные группы и, в особенности, углеводы могут образовывать комплексы с иммобилизованным фенолборатанионом в виде циклических эфиров только в водно-щелочной среде. Известно, что подкисление 1,2-диол- и 1,3-диолсодержащих комплексов высвобождает диолы, вследствие предположительно обусловленного напряженностью цикла гидролиза пятичленного циклического эфира фенолборной кислоты, включающего треугольно-координационный атом бора. Компланарные ароматические 1,3-диолы, подобно 1,8-дигидроксинафталину, как известно, образуют комплексы даже в кислой среде благодаря гидролитической стабильности шестичленных циклических эфиров фенолборной кислоты. Известно также, что замещенные фенолы с боковыми остатками 1,3-гидроксиламида, 1,3-гидроксиамидина и 1,3-гидроксиоксима вступают в водно-щелочной среде в обратимые реакции комплексообразования с боратным буфером аналогично тому, как вступают в такие реакции фенолборные кислоты.

Несмотря на значительный объем посвященных биоконъюгации исследований и крупные капиталовложения в этой области, селективность фенолборной кислоты не была до сих пор использована для конъюгации с биологическими макромолекулами одного или нескольких молекулярных типов, способными придать продуктам полезные функциональные свойства. Более того, новым является использование способных к комплексообразованию иммобилизованных компонентов для получения комплексов с остатками фенолборной кислоты. Такое использование представляет особый интерес, например, в случаях, когда остаток фенолборной кислоты связан с такой биологической макромолекулой, как антитело, которое может быть связано с комплексообразующим компонентом путем использования селективности остатка фенолборной кислоты при комплексообразовании.

Используемые здесь термины имеют следующие значения:

Термин биоактивный ингредиент (Bioactive species, BAS) означает соединение, выбранное из группы, содержащей (но не ограниченной ими) протеины, пептиды, полисахариды, гормоны, нуклеиновые кислоты, липосомы, клетки, лекарственные препараты, радионуклиды, токсины, гаптены, ингибиторы, флюорофоры, лиганды и антитела (например, моноклональные антитела со специфичным воздействием на эпителии конкретных популяций клеток, например, кроветворных клеточных популяций, в особенности анти-CD34 антитела). К биоактивным ингредиентам, как это отмечено ниже, могут принадлежать также твердофазные подложки. Вообще говоря, биоактивные ингредиенты служат реагентами, придающими биоконъюгационным комплексам биологическую активность или детектирующие свойства. Когда биоактивный ингредиент соединяют с полуконъюгационным или биоконъюгационным комплексом согласно

изобретению (например, соответствующим BAS, BAS', BAS* или BAS** XI, XII, XIV, XVI или XVII из приведенных ниже формул), например после реакции с электрофильным или нуклеофильным реакционноспособным радикалом (т.е. соответствующим "R" в приведенных ниже формулах XI, XII, XIV, XVI или XVII), то он может в дальнейшем содержать остаток упомянутого электрофильного или нуклеофильного реакционноспособного радикала.

Термин твердофазная подложка означает пригодные для связи с фенилборнокислым комплексообразующим реагентом или фенилборнокислым реагентом твердую нерастворимую поверхность или частицу в описанной ниже форме (т.е. в виде металлических или пластмассовых шариков, которые могут быть покрыты, например углеводом или протеином, чтобы обеспечить возможность соединения с фенилборнокислым комплексообразующим реагентом или фенилборнокислым реагентом, как это описано ниже), пригодные, например: для изолированного использования, или в системе очистки, или при количественном анализе, в частности в системе, использующей присоединенное к твердофазной подложке моноклональное антитело в виде биоконъюгационного комплекса, как это описано ниже.

Термин фенилборнокислый комплексообразующий реагент означает реагент, состоящий из комплексообразующего остатка фенилборной кислоты и реакционноспособной группы для присоединения комплексообразующего остатка фенилборной кислоты к биоактивному ингредиенту или твердофазной подложке.

Термин фенилборнокислый реагент означает реагент, состоящий из остатка фенилборной кислоты и реакционноспособной группы, способной присоединять остаток фенилборной кислоты к биоактивному ингредиенту.

Термин поперечно-сшивающий фенилборнокислый реагент означает реагент, состоящий из двух остатков фенилборной кислоты со спейсером между ними.

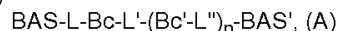
Термин фенилборнокислый комплексообразующий полуконъюгат означает биоактивный ингредиент или твердофазную подложку, имеющую боковой фенилборнокислый комплексообразующий остаток и являющийся продуктом реакции биоактивного ингредиента или твердофазной подложки с фенилборнокислым комплексообразующим реагентом.

Термин фенилборнокислый полуконъюгат означает биоактивный ингредиент, имеющий боковой фенилборнокислый остаток и являющийся продуктом реакции биоактивного ингредиента с фенилборнокислым реагентом.

Термин биоконъюгационный комплекс означает: два биоконъюгационно-связанных биоактивных ингредиента (которые могут быть как одинаковыми, так и различными), или биоактивный ингредиент и твердофазную подложку, которые связаны по меньшей мере одним атомом бора, например: по меньшей мере один комплекс фенилборной кислоты; в частности, продукт, полученный реакцией фенилборнокислого комплексообразующего полуконъюгата с фенилборнокислым полуконъюгатом, или полученный в итоге

реакции фенилборнокислого комплексообразующего полуконъюгата с поперечно-сшивающим фенилборнокислым реагентом.

В целом биоконъюгационные комплексы согласно изобретению, как это показано ниже, соответствуют (приведенным ниже) формулам от (I) до (X), т.е. общей формуле (A)



где BAS и BAS' обозначают биоактивные ингредиенты (которые могут быть как одинаковыми, так и различными);

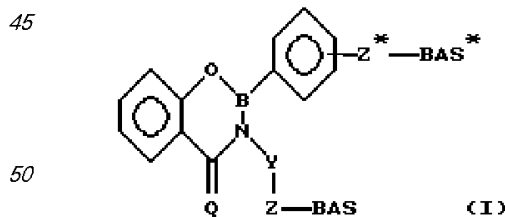
L, L' и L'' обозначают линкеры (которые могут быть одинаковыми или различными, например, соответствующими группам Z, Z', Z'', Z'', Y, Y* в формулах I-X);

Bc и Bc' обозначают комплексы фенилборной кислоты (которые могут быть одинаковыми или различными) формул D-E или E-D, где: D обозначает остаток фенилборной кислоты (предпочтительно полученный из, например, производного или аналога фенилборной кислоты) и E обозначает комплексообразующий остаток фенилборной кислоты (предпочтительно полученный из, например, производного или аналога салициловой кислоты);

n = 0 или 1.

В случае, когда BAS - твердофазная подложка, предпочтительно Bc E-D, и/или n=1, и/или BAS' - антитело.

Таким образом, согласно изобретению предложены новый класс биоконъюгационных комплексов, являющихся производными комплексов фенилборной кислоты, и способы получения и применения таких биоконъюгационных комплексов. Согласно изобретению взамен известных систем Avidin-Biotin и Digoxigenin-anti-Digoxigenin для химической конъюгации биоактивных ингредиентов без участия промежуточных биологических макромолекул использованы комплексы фенилборной кислоты. Например, формулы I-VI представляют биоконъюгационные комплексы, связывающие два биоактивных ингредиента, в которых бора комплексирован с азотом, который в свою очередь связан спейсером с биоактивным ингредиентом.



В биоконъюгационных комплексах формулы (I):

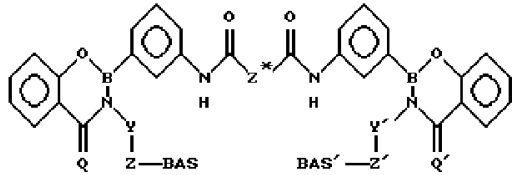
(функциональная) группа Q выбрана из O, S, NH, N-алкила, N-арила, NCH₂-арила, где алкил - углеводородный радикал, например, длиной от C₁ до C₄, возможно до C₆, в котором цепи могут быть разветвлены, а арил представляет собой ароматическое кольцо, либо замещенное ароматическое кольцо, либо конденсированные ароматические кольца;

(функциональная) группа Y выбрана из O, NH, CH₂, алкила и арила, где алкил - углеводородный радикал длиной, например, от C₂ до C₆, а арил - ароматическое кольцо,

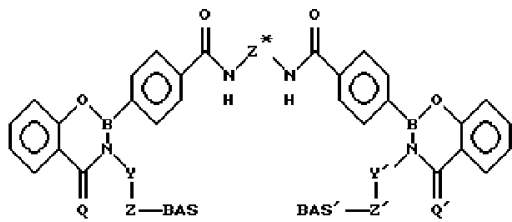
либо замещенное ароматическое кольцо, либо конденсированные ароматические кольца;

BAS и BAS* одинаковые или различные биоактивные ингредиенты.

В предпочтительных биоконъюгационных комплексах формулы (I): группа Q выбрана из O, NH, NC₆H₅; группа Y - из O или CH₂, а группы Z и Z* могут быть независимо выбраны из (CH₂)_n (n=1-5) и (CH₂CH₂O)_n (n=2-4); BAS и BAS* - различные биоактивные ингредиенты, из которых, например, один - твердофазная подложка, другой - антителио.



(II)



(III)

В биоконъюгационных комплексах формул (II) и (III):

(функциональные) группы Q и Q' независимо выбраны из O, S, NH, N-алкила, N-арила, NCH₂-арила, где алкил - углеводородный радикал, например с цепями C₁-C₄ и, возможно C₆, которые могут быть разветвлены, а арил - ароматическое кольцо, либо замещенное ароматическое кольцо, либо конденсированные ароматические кольца;

(функциональные) группы Y и Y' независимо выбраны из O, NH, CH₂, алкила и арила, где алкил - углеводородный радикал, например с цепями C₁-C₆, а арил - ароматическое кольцо, либо замещенное ароматическое кольцо, либо конденсированные ароматические кольца;

Z, Z' и Z* - спейсеры, содержащие алкильную или полиэфирную (например, полиэтиленгликолевую) цепь, длина которой эквивалентна 1-16 (атомам) углерода и которая при желании может содержать одну или более амидных и/или дисульфидных связей;

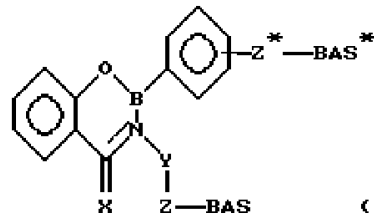
группа Z* добавлена к двум остаткам фенолборной кислоты;

BAS и BAS* - одинаковые или различные биоактивные ингредиенты. Предпочтительно, если BAS и BAS' одинаковы, то Q и Q', Y и Y', Z и Z' также одинаковы.

В предпочтительных биоконъюгационных комплексах формул (II) и (III):

группы Q и Q' независимо выбраны из O, NH, NC₆H₅; группы Y и Y' независимо выбраны из O или CH₂; группы Z, Z' и Z* могут быть независимо выбраны из (CH₂)_n (n=1-5) и (CH₂CH₂O)_n (n=2-4); BAS и BAS* - различные биоактивные ингредиенты, например, один из них - твердофазная подложка, а другой не является таким

носителем и представляет собой, в частности, антителио.



(IV)

В биоконъюгационных комплексах формулы (IV):

(функциональная) группа X выбрана из H, CH₃, C₆H₅;

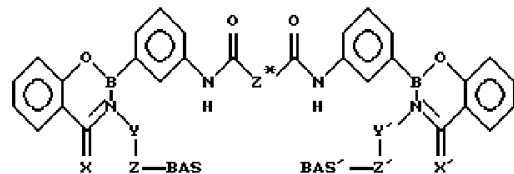
(функциональная) группа Y выбрана из O, NH, CH₂, алкила и арила, где алкил - углеводородный радикал, например с цепями C₁-C₆, а арил - ароматическое кольцо, либо замещенное ароматическое кольцо, либо конденсированные ароматические кольца;

(функциональные) группы Z и Z* могут быть одинаковыми или различными, служат спейсерами и содержат алкильную или полиэфирную (например, полиэтиленгликолевую) цепь, длина которой эквивалентна 1-16 (атомам) углерода и которая при желании может содержать одну или более амидных и/или дисульфидных связей;

BAS и BAS* - одинаковые или различные биоактивные ингредиенты.

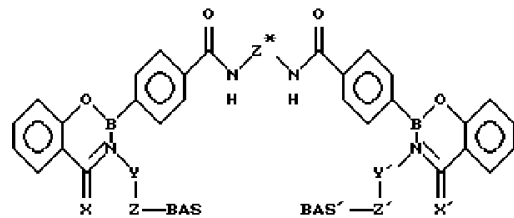
В предпочтительных биоконъюгационных комплексах формулы (IV):

группа X выбрана (но не ограничена этим) из H или C₆H₅; группа Y выбрана (но не ограничена этим) из O или CH₂; группы Z и Z* могут быть одинаковы или различны и предпочтительно выбраны (но не ограничены этим выбором) из (CH₂)_n (n= 1-5) и (CH₂CH₂O)_n (n=2-4); BAS и BAS* - различные биоактивные ингредиенты, например, один из них - предпочтительно твердофазная подложка, а другой не является ею и представляет собой, в частности, антителио.



(V)

В биоконъюгационных комплексах формул (V) и (VI):



(VI)

(функциональные) группы X и X' независимо выбраны из H, CH₃, C₆H₅;

(функциональные) группы Y и Y' независимо выбраны из O, NH, CH₂, алкила и арила, где алкил - углеводородный радикал, например, C₁-C₆, а арил - ароматическое, либо замещенное ароматическое кольцо,

либо конденсированные ароматические кольца;

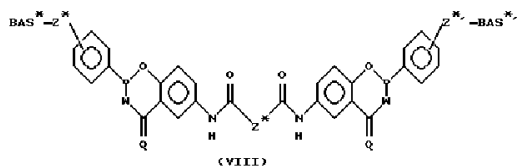
Z, Z' и Z* - спейсеры, содержащие алкильную или полиэфирную (например, полиэтиленгликолевую) цепь, длина которой эквивалентна 1-16 (атомам) углерода и которая при желании может содержать одну или более амидных и/или дисульфидных связей;

группа Z связана с двумя остатками фенолборной кислоты;

BAS и BAS* - одинаковые или различные биоактивные ингредиенты. Предпочтительно, когда BAS и BAS' одинаковы, то X и X', Y и Y', Z и Z' также одинаковы.

В предпочтительных биоконъюгационных комплексах формул (V) и (VI):

группы X и X' выбраны из O или CH₂; группы Z, Z' и Z* могут быть независимо выбраны из (CH₂)_n (n=1-5) и (CH₂CH₂O)_n (n=2-4); BAS и BAS* - биоактивные ингредиенты, например, один - твердофазная подложка, а другой не является ею и может быть, например, антителом.



В биоконъюгационных комплексах формулы (VIII):

(функциональная) группа W выбрана из O, NH, N-алкила, N-арила, NCH₂-арила, NC₆H₅, NCH₂CH₂OH, NCOCH₂CH₂OH, NOH, NO-алкила, NOCH₂-арила, где алкил - углеводородный радикал, например, C₁-C₄ и, возможно до C₆, в котором цепь может быть разветвлена, а арил - ароматическое, либо замещенное ароматическое кольцо, либо конденсированные ароматические кольца;

(функциональная) группа Q выбрана из O, S, NH, N-алкила, N-арила, NCH₂-арила, где алкил и арил соответствуют предыдущему определению;

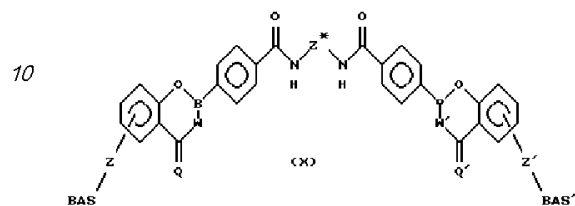
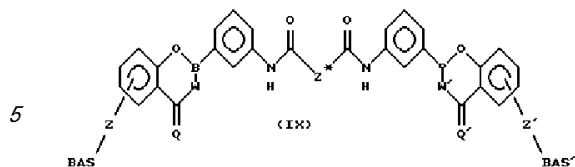
(функциональные) группы Z, Z* и Z** - одинаковые или различные спейсеры, содержащие алкильную или полиэфирную (например, полиэтиленгликолевую) цепь, которая эквивалентна 1-16 (атомам) углерода и которая при желании может содержать одну или более амидных и/или дисульфидных связей;

(функциональная) группа Z добавлена к двум комплексобразующим остаткам фенолборной кислоты;

BAS и BAS* - одинаковые или различные биоактивные ингредиенты.

В предпочтительных биоконъюгационных комплексах формулы (VIII):

группа W выбрана из O, NH, NCH₃, NC₆H₅, NCH₂CH₂OH, NCOCH₂CH₂OH, NOH, NOCH₃; группа Q - предпочтительно O; группы Z, Z* и Z** (одинаковые или различные) выбраны предпочтительно из (CH₂)_n (n=1-5) и (CH₂CH₂O)_n (n=2-4); BAS и BAS* - одинаковые либо различные биоактивные ингредиенты, например, один из них - твердофазная подложка, а другой не является ею и может быть, например, антителом.



В биоконъюгационных комплексах формул (IX) и (X):

(функциональные) группы W и W' независимо выбраны из O, NH, N-алкила, N-арила, NCH₂-арила, NC₆H₅, NCH₂CH₂OH, NCOCH₂CH₂OH, NOH, NO-алкила, NOCH₂-арила, где алкил углеводородный радикал, например, C₁-C₄ и, возможно до C₆, в котором цепь может быть разветвлена, а арил - ароматическое, либо замещенное ароматическое кольцо, либо конденсированные ароматические кольца;

(функциональная) группа Z* добавлена к двум остаткам фенолборной кислоты. Если BAS и BAS* одинаковы, то предпочтительно, чтобы BAS и BAS', Q и Q', Y и Y', Z и Z' также были одинаковы.

В предпочтительных биоконъюгационных комплексах формул (IX) и (X): группы W и W' выбраны из O, NH, NCH₃, NC₆H₅, NCH₂CH₂OH, NCOCH₂CH₂OH, NOH, NOCH₃; группа Q предпочтительно O; группы Z, Z* и Z** (одинаковые или различные) выбраны предпочтительно из (CH₂)_n (n=1-5) и (CH₂CH₂O)_n (n=2-4); BAS и BAS* одинаковые либо различные биоактивные ингредиенты, например, один из них твердофазная подложка, другой не является ею и может быть, например, антителом.

Биоконъюгационные комплексы, имеющие единственное комплексное соединение фенолборной кислоты, например, как в формулах I, IV и VII, служат предпочтительно для конъюгации двух различных биоактивных ингредиентов, например, для конъюгации энзима с антителом для использования в ферментном иммуносорбентном анализе, для конъюгации пробы нуклеиновой кислоты с флюорофором, необходимой для выявления последовательности генома, для конъюгации токсина с моноклональным антителом, что необходимо при "прицельной" транспортировке лекарства. В частности, такие биоконъюгационные комплексы могут быть использованы для конъюгации антитела (например, моноклонального антитела, способного к селективной связи с эпитопом кровяной клетки, к примеру, анти-CD 34 антитела) с твердой фазой (например, металлическими или пластмассовыми шариками, которые могут иметь органическое, например углеводное или белковое покрытие), например, когда антитело - BAS, а твердая поверхность - BAS*, или антитело - BAS*, а твердая поверхность - BAS.

Биоконъюгационные комплексы, имеющие два комплексных соединения фенолборной кислоты, например, как в формулах II, III,

V, VI, VIII, IX и X, используют предпочтительно для конъюгации идентичных биоактивных ингредиентов их поперечным сшиванием в макромолекулярные агрегаты биоактивными ингредиентами, имеющими боковые остатки или комплексообразующие остатки фенолборной кислоты. Агрегаты такого типа, включающие ферменты, могут быть использованы для повышения разрешающей способности ферментного иммуносорбентного и связанных с ним анализов благодаря значительному увеличению эффективной концентрации фермента, необходимого для превращения бесцветного субстрата в легко обнаруживаемое вещество. Помеченные флюорофором протеины, имеющие боковые комплексообразующие остатки фенолборной кислоты, могут быть аналогичным образом агрегированы с целью облегчения визуального или спектрофотометрического обнаружения. Агрегаты с избыточными остатками фенолборной кислоты могут быть далее конъюгированы с другими биоактивными ингредиентами, имеющими боковые комплексообразующие остатки фенолборной кислоты (с фенолборнокислыми комплексообразующими полуконъюгатами). Этот общий подход аналогичен подготовке препаратов типа "сэндвич" для количественного анализа с применением системы Avidin Biotin.

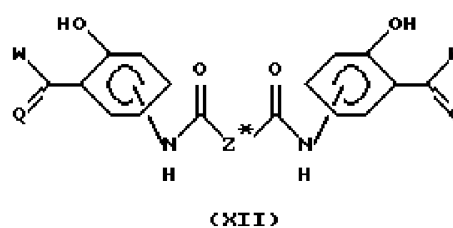
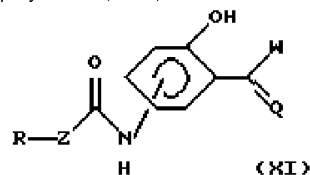
Поперечно-сшивающие фенолборнокислые реагенты, вводимые в большом избытке с последующим удалением избыточного реагента, могут быть использованы в реакциях превращения биоактивных ингредиентов с боковыми комплексообразующими остатками фенолборной кислоты (фенолборнокислыми комплексообразующими полуконъюгатами) в биоактивные ингредиенты с боковыми группами фенолборной кислоты (в фенолборнокислые полуконъюгаты), и обратно.

Обычно компонент-спейсер соединяет биоактивный ингредиент с фенолом фенолборной кислоты (например, Z* или Z** в формулах I, VII или VIII, или Z* в XIV или XV *infra*). Однако в некоторых случаях биоактивные ингредиенты могут иметь конфигурацию, допускающую непосредственную (без участия спейсера) сшивку с фенолом через электро- или нуклеофильный радикал (R) в формуле XIV. Таким образом, в объем изобретения включены и соединения формул I, VII, VIII, XIV или XV, где Z и Z* отсутствуют.

Биоконъюгационные комплексы формул (I)-(X) получают как в водных буферных растворах, так и в органических растворителях и в водных растворах с добавлением органических растворителей. Комплексообразование происходит за несколько минут при комнатной температуре. Образование биоконъюгационного комплекса нечувствительно к значительным колебаниям ионной силы и температуры и к присутствию хаотропов (денатурантов протеинов), что недопустимо в ранее известных системах, в которых для сохранения требуемых связывающих свойств необходимо сохранение структуры биологической макромолекулы. В большинстве случаев ограничения, определяющие получение биоконъюгационных комплексов

описываемым здесь способом, сводятся к выбору требуемого pH и наложению дополнительных ограничений, диктуемых требованиями жизнеспособности биоактивных ингредиентов.

Кроме того, согласно изобретению предложены реагенты, необходимые для модификации биоактивных ингредиентов с целью внедрения комплексообразующего остатка фенолборной кислоты для последующей конъюгации с другими биоактивными ингредиентами, имеющими боковые остатки фенолборной кислоты, например, при получении биоконъюгата формулы VII, VIII, IX или X.



Здесь группы W, Q, Z и Z' аналогичны определенным для любой из формул VII, VIII, IX или X, где

(функциональная) группа W выбрана предпочтительно из H, OH, NH₂, NHCH₃, NHOH, NHOCH₃;

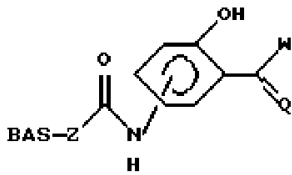
(функциональная) группа Q выбрана из O, S, NH;

(функциональные) группы Z и Z' - спейсеры, независимо выбранные из алкильной или полиэфирной (например, полиэтиленгликолевой) цепей, длина которых эквивалента 1-16 (атомам) углерода и которые при желании могут содержать одну или более амидных и/или дисульфидных связей;

(функциональная) группа R в формуле XI - реакционноспособный электрофильный или нуклеофильный радикал, способный обеспечить реакцию между комплексообразующим реагентом фенолборной кислоты и биоактивным ингредиентом.

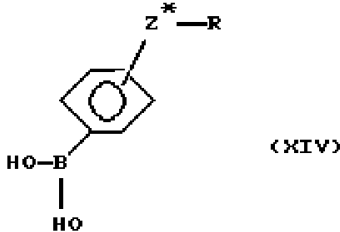
Предпочтительные реагенты формул X и XI включают: группу W, выбираемую из OH, NHOH, NHOCH₃; группу Q - O; группы Z и Z', выбираемые обычно из (CH₂)_n (n=1-5), (CH₂CH₂O)_n (n=2-4).

Из реагентов формулы XI предпочтительны те, в которых радикал R выбран (но без ограничения только ими), из amino- или гидразидных групп, N-гидроксисукцинимидилового эфира, N-гидроксисульфосукцинимидилового эфира, изотиоцианата, бромацетамида, иодацетамида, малеимида и тиола. При реакции реагента общей формулы XI с биоактивным ингредиентом получают полуконъюгат формулы XIII с боковыми (одним или более) комплексообразующими остатками фенолборной кислоты, где символом BAS обозначен биоактивный ингредиент, а группы W, Q и Z аналогичны определенным для формулы VII.



(XIII)

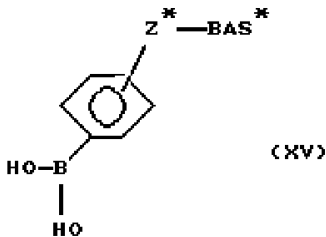
Аналогичны им фенолборнокислые реагенты (например, такие, как согласно формуле XIV):



(XIV)

в которых Z* обозначает спейсер, аналогичный определенному для любой из формул I, IV, VII или VIII, а

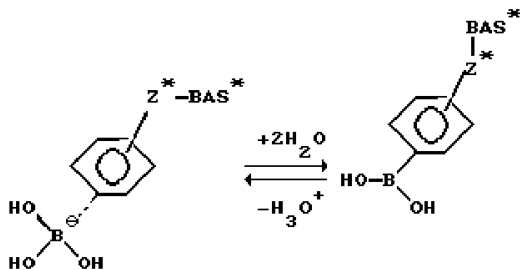
R обозначает реакционноспособный электрофильный или нуклеофильный радикал, аналогичный определенному для формулы XI могут быть присоединены к биоактивным ингредиентам для получения полуконъюгата формулы XV с (одним или более) боковыми остатками фенолборной кислоты:



(XV)

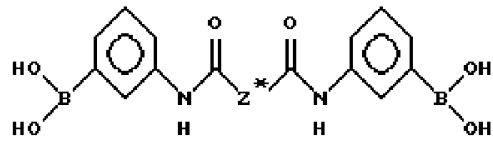
Здесь символ BAS* обозначает биоактивный ингредиент, идентичный обозначенному BAS (или отличный от него), а группа Z* была определена для формулы VII.

Заметим, что полуконъюгаты формулы XV и другие описанные здесь фенолборнокислые реагенты и полуконъюгаты имеют либо тетраэдрический фенолборатанион в щелочной, либо фенолборную кислоту треугольной конфигурации в нейтральной или кислой среде, например:



причем обе формы включены в объем изобретения.

Поперечно-сшивающие фенолборнокислые реагенты соответствуют формуле (XVI):



(XVI)

где Z* обозначает линкер, определенный для любой из формул II, V, IX или формуле (XVII):

5

10

15

20

25

30

35

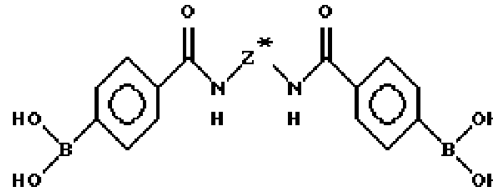
40

45

50

55

60



(XVII)

где Z* обозначает линкер, определенный для любой из формул III, VI, X.

Для получения полуконъюгата формулы XIII, приготовленный из биоактивного ингредиента BAS и из имеющего боковые группы комплексообразующего остатка фенолборной кислоты, может быть введен в реакцию комплексообразования с полуконъюгатом формулы XV, приготовленным из второго биоактивного ингредиента BAS* и из имеющего боковые группы остатка фенолборной кислоты. Таким путем биологические макромолекулы могут быть конъюгированы между собой и с другими функциональными группами, приносящими полезные свойства.

Аналогично, реагент формулы XII можно ввести в реакцию комплексообразования с полуконъюгатом формулы XIV, приготовленным из биоактивного ингредиента BAS*, и получить в итоге биоконъюгат формулы VIII. Этим способом могут быть конъюгированы два или более идентичных биоактивных ингредиента BAS*. Этот способ может быть использован для приготовления агрегатов энзимов для высокочувствительного определения при ферментном иммуносорбентном анализе.

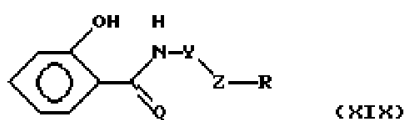
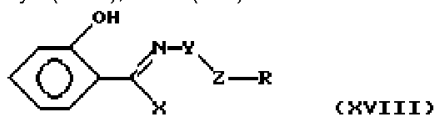
Биоконъюгаты получают в буферных водных или водно-органических растворах. Они образуются за несколько минут при комнатной температуре. Стабильность конкретного биоконъюгата при данном pH зависит от вида заместителей W и Q. Биоконъюгаты формул VII и VIII, в которых обе группы W и Q представлены O, стабильны в кислых водных растворах с pH ниже 4,5. Биоконъюгаты формул VII и VIII, в которых группа W выбрана из NH и NCH, а группа Q - из O и S, стабильны в буферных водно-щелочных растворах с pH в пределах примерно от 8,5 до 11,5. Аналогично, биоконъюгаты формул VII и VIII, в которых обе группы W и Q представлены NH, стабильны в буферных водно-щелочных растворах с pH в пределах примерно от 8,5 до 11,5. Биоконъюгаты формул VII и VIII, в которых группа W выбрана из NON и NOCH, а группа Q - из O и S, стабильны в буферных водных растворах с pH в широких пределах примерно от 2,5 до 11,5.

Реакция биоконъюгации (образования

-9-

комплексов фенолборной кислоты) нечувствительна к значительным колебаниям ионной силы и температуры, присутствию органических растворителей и хаотропов (денатурантов протеинов), что недопустимо в известных системах, в которых для сохранения требуемых связывающих свойств необходимо сохранение структуры биологических макромолекул. В большинстве случаев ограничения, определяющие получение биоконъюгационных комплексов описываемым здесь способом, сводятся к выбору требуемого pH и дополнительных ограничений, диктуемых требованиями жизнеспособности биоактивных ингредиентов.

В следующем воплощении согласно изобретению предусмотрены фенолборнокислые реагенты (например, такие, которые пригодны для модификации биоактивных ингредиентов встраиванием комплексообразующего остатка фенолборной кислоты, например, для получения биоконъюгационных комплексов формул I, II, III, IV, V или VI), т.е. реагенты общих формул (XVIII), либо (XIX):

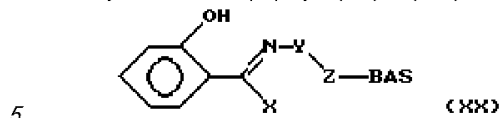


В формуле (XVIII) X, Y и Z определены так же, как и для формул IV, V или VI. Для формулы (XVIII) X предпочтительно выбран из H, CH₂, C₆H₅, а Y - из O и CH₂. Для формулы (XIX) Q, Y и Z заданы такими же, как для формул I, II, или III, причем группа Y предпочтительно выбрана из O и CH₂, а Q - O. В обеих формулах (XVIII и XIX) R - электрофильный или нуклеофильный радикал, способный обеспечить реакцию фенолборнокислого комплексообразующего реагента с биоактивным ингредиентом.

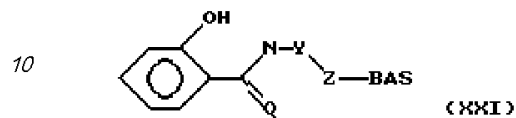
Для общей формулы XVIII наиболее предпочтительно выбирать группу X из H и CH₃, а для группы Y принимать O. Для общей формулы XVI как Y предпочтительно выбирать O. В обеих формулах XVIII и XIX как Z предпочтительно выбирать либо алкильную, либо полиэфирную (например, полиэтиленгликолевую) цепь, эквивалентную по длине 1-16, предпочтительно 2-12 атомам углерода, причем цепь может содержать одну или более амидных и/или дисульфидных функциональных групп, предпочтительно (CH)_n при n=2-6, или (CH₂CH₂O)_n при n=2-4. В обеих формулах XVIII и XIX предпочтительно выбирать радикал R (не ограничивая выбор только ими) из остатков гидразида, N-гидроксисукцинимидилового эфира, N-гидроксисульфосукцинимидилового эфира, изотиоцианата, эфира имидата, 2,2,2-трифторэтансульфонилбромацетамида, иодацетамида, малеимида и 2-цианэтил-М,М-диизопропилфосфорамидинового эфира.

Реагенты формул XVIII или XIX вступают в реакцию с биоактивными ингредиентами BAS (или BAS*) или, соответственно, образуют

полуконъюгаты формул (XX) и (XXI):



где X, Y и Z определены, как для формулы XVIII.



где X, Y и Z определены, как для формулы XIX.

15 Таким образом, согласно изобретению предложены:

1. Биоконъюгационные комплексы, описанные выше, например, формул от (I) до (X);

20 2. Фенолборнокислые комплексообразующие полуконъюгаты, описанные выше, например, формул XII, XX и XXI;

3. Фенолборнокислые полуконъюгаты согласно формуле XV;

25 4. Фенолборнокислые комплексообразующие реагенты, описанные выше, например, формул XI, XVIII и XIX.

5. Фенолборнокислые реагенты, описанные выше, например, формулы XIV;

30 6. Поперечно-сшивающие фенолборнокислые реагенты (кросслинкеры), описанные выше, например, формул XII, XVI и XVII.

Кроме того, согласно изобретению предложены способы использования получаемых соединений в любом из описанных приложений для биоконъюгации, в частности, в количественном анализе, основанном на использовании антител, и в системах очистки, а также способы использования получаемых полуконъюгатов, кросслинкеров и реагентов (например, формул XI-XXI) для получения биоконъюгационных комплексов (например, формул I-X).

45 В конкретном воплощении согласно изобретению предложены набор средств или система для выделения или очистки клеток, например, кроветворных клеток, в частности, клеток CD 34⁺, состоящие из биоконъюгационного комплекса (соответствующего любой из формул I-X), связывающего первый и второй биоактивные ингредиенты, из которых первый - твердофазная подложка, например, металлический или пластмассовый шарик (возможно), покрытый углеводом, протеином или другим органическим веществом, обеспечивающим реакционную способность и возможность образовывать связь с реагентом согласно изобретению, например, R в формулах XI, XIV, XVIII и XIX, а второй биоактивный ингредиент - антитело, способное, например, распознавать и закрепляться на эпитопе, присутствующем в конкретной популяции клеток, например, клеток CD 34⁺; предложен также указанный выше способ выделения и очистки клеток, предусматривающий:

55 контакт носителя требуемых клеток с биоконъюгационным комплексом согласно изобретению, содержащим второй

биоактивный ингредиент, селективный, как уже отмечено, к популяции требуемых клеток, отделение выделенных этим путем клеток от носителя, и при необходимости - отделение выделенных клеток от биоконъюгационного комплекса.

Биоконъюгационные комплексы формул I, IV или VII получают в три стадии:

(1) Фенилборнокислый

комплексообразующий реагент, полученный предпочтительно из салициловой кислоты, аминсалициловой кислоты или дитиосалициловой кислоты, конденсируют совместно с биоактивным ингредиентом для получения фенилборнокислого

комплексообразующего полуконъюгата; (2) Фенилборнокислый реагент, полученный из (3-аминофенил) борной кислоты, либо из (4-карбоксифенил) борной кислоты (или из иного соединения), соответствующий, например, формуле XIV, конденсируют совместно с биоактивным ингредиентом для получения фенилборнокислого полуконъюгата;

(3) Фенилборнокислый

комплексообразующий полуконъюгат, полученный на стадии (1), и фенилборнокислый полуконъюгат, полученный на стадии (2), вводят в реакцию для получения биоконъюгационного комплекса, например, формулы I, IV или VII.

Биоконъюгационные комплексы формул II, V или IX получают в две стадии:

(1) Фенилборнокислый

комплексообразующий реагент формулы XI, XVIII или XIX конденсируют совместно с биоактивным ингредиентом для получения фенилборнокислых комплексообразующих полуконъюгатов;

(2) Фенилборнокислые

комплексообразующие полуконъюгаты, полученные на стадии (1), вводят в реакцию с поперечно-сшивающим фенилборнокислым реагентом, предпочтительно полученным из (3-аминофенил) борной кислоты, например, согласно формуле XVI.

Биоконъюгационные комплексы формул III, VI или X получают в две стадии:

(1) Фенилборнокислый

комплексообразующий реагент формулы XI, XVIII или XIX вводят в реакцию с биоактивным ингредиентом для получения фенилборнокислых комплексообразующих полуконъюгатов;

(2) Фенилборнокислые

комплексообразующие полуконъюгаты, приготовленные на стадии (1), вводят в реакцию с поперечно-сшивающим фенилборнокислым реагентом, предпочтительно полученным из (4-карбоксиметил) борной кислоты, например, согласно формуле XVII, для получения требуемого комплекса.

Биоконъюгационные комплексы формулы VIII получают в две стадии:

(1) Фенилборнокислый реагент формулы

XIV вводят в реакцию с биоактивным ингредиентом для получения полуконъюгатов формулы XV;

(2) Полуконъюгаты формулы XV вводят в

реакцию с поперечно-сшивающим фенилборнокислым реагентом согласно формуле XII, предпочтительно полученным из салициловой, аминсалициловой или

дитиосалициловой кислот для получения требуемого комплекса.

Реагенты формулы XIV получают из производных и аналогов фенилборной кислоты, например, соединений, предпочтительно выбираемых (но не ограничиваемых таким выбором) из группы, состоящей из (3-аминофенил) борной кислоты, (4-карбоксифенил) борной кислоты, N-(6-нитро-3-дигидроксиборилфенил)аминоянтарной кислоты, (3-изотиоцианатфенил) борной кислоты, (5-карбокси-3-изотиоцианатфенил) борной кислоты, (3-иодацетамидфенил) борной кислоты, (3-малеимидфенил) борной кислоты, сукцинимидилового эфира (3-дигидроксиборилфенил) янтарной кислоты и гидразида (3-дигидроксиборилфенил) янтарной кислоты, которые могут быть закуплены или синтезированы способами, описанными (или аналогичными описанным), например, Linder K.E., Wen M.D., Nowotnik D.P., Malley M.F., Gougoutas J.Z., Nunn A.D. и Eckelman W.C. (1991) Bioconjugate Chem., 2, 160-170, и Linder R.T., Wen M.D., Nowotnik D.P., Ramalingam K., Sharkey R.M., Yost P., Narra R.K., Nunn A.D. и Eckelman W.C. (1991) Bioconjugate Chem., 2, 407-415.

Фенилборнокислые реагенты формулы XVI получают конденсацией (3-аминофенил) борной кислоты в присутствии активированной дикарбоновой кислоты, предпочтительно выбираемой (но без ограничений) из группы, состоящей из сукцинилхлорида, адипоилхлорида, адипиновой кислоты, диизобутилкарбоната, субериолхлорида, 3,3'-дитиопропионилхлорида, 3,6,9-триокса-ундецилдиоилхлорида и диизобутилкарбоната 3,6,9-триоксаундецилдиоидной кислоты, аналогично способу, описанному Burnett T.J., Peebles H.C and Hageman J.H. (1980) Biochem. Biophys. Research Commun., 96, 157-162.

Фенилборнокислые реагенты формулы XVII получают активацией (4-карбоксифенил) борной кислоты N,N-дициклогексилкарбодимидом с последующей конденсацией в присутствии диамина, предпочтительно выбираемого (но без ограничения) из группы, состоящей из 1,4-бутандиамина, 1,6-гександиамина и 2,2'-дитиодиаминоэтана ($H_2NCH_2CH_2SSCH_2CH_2NCH_2$).

Биоконъюгационные комплексы получают в буферных водных растворах соединений, предпочтительно выбираемых (но без ограничения этим выбором) из группы, состоящей из ацетат-, цитрат-, фосфат- и карбонатных буферов. Не следует использовать боратные и трис-буферы из-за их способности к комплексообразованию, соответственно, с комплексообразующими остатками фенилборной кислоты и остатками фенилборной кислоты. Биоконъюгационный комплекс образуется в течение 1-15 мин при комнатной температуре. Реакция нечувствительна к колебаниям ионной силы в пределах от 0,01 до 2 молярностей. Стабильность комплекса повышается с ростом температуры и ограничена лишь летучестью буфера. Добавление органических растворителей, включая ацетонитрил, метанол, этанол, изопропанол, бутанол, N,N-диметилформамид и

диметилсульфоксид, способствует стабилизации биоконъюгатов. Хаотропные реагенты (денатуранты протеина) включая мочевины, гидрохлорид гуанидина и формамид, также способствуют дальнейшей стабилизации биоконъюгатов, если и поскольку биоактивные ингредиенты толерантны к их присутствию. Биоконъюгационные комплексы можно очищать высаливанием, диализом, хроматографической классификацией по размеру и электрофорезом. Биоконъюгационные комплексы стабильны при хранении после удаления воды и могут быть лиофилизированы.

Ионизация фенолборной кислоты - важный фактор образования биоконъюгационных комплексов, ибо после ее боратанион изменяет конфигурацию с треугольной (со средним значением угла между связями 120° и средней длиной связей $1,37 \text{ \AA}$) на тетраэдрическую (со средним значением угла между связями 109° и средней длиной связей $1,48 \text{ \AA}$). Фенолборные кислоты имеют pK_a , изменяющийся в пределах примерно от 5,2 до 9,2. Биоконъюгационные комплексы общих формул I, III, IV, VI, VII, VIII и IX, полученные из (4-карбоксифенил) борной кислоты имеют значения pK_a в пределах приблизительно от 6,5 до 7,5. Биоконъюгационные комплексы общих формул I, II, IV, V, VI, VII и VIII, полученные из (3-аминофенил) борной кислоты имеют значения pK_a в пределах приблизительно от 8 до 9. Комплексы общих формул I, II, IV, V, VII и IX, полученные из (3-амино-2-нитрофенил)борной кислоты, (3-амино-5-нитрофенил)борной кислоты или (3-амино-6-нитрофенил) борной кислоты имеют промежуточные значения pK_a . Как правило, pK_a комплексов общих формул I-X примерно на одну единицу pH ниже, чем у фенолборной кислоты, из которой этот комплекс был получен.

Биоконъюгационные комплексы формул I, II и III (т.е. таких, в которых Q и Q' предпочтительно выбраны из O, S и NH, а Y и Y' предпочтительно O или NH) и в которых фенолборнокислый реагент был получен из (3-аминофенил) борной кислоты, стабильны в буферных водно-щелочных растворах с pH в пределах примерно 8,5-11,5. Аналогично, биоконъюгационные комплексы общих формул IV, V и VI (т.е. в которых группы X и X' выбраны предпочтительно из H, CH₂ и C₆H₅, а группы Y и Y' - из O и NH) и в которых фенолборнокислый реагент был получен из (3-аминофенил) борной кислоты, стабильны в буферных водно-щелочных растворах с pH в пределах примерно 8,5-11,5. Стабильность в таких пределах pH обусловлена тем, что только фенолборатанион создает устойчивый комплекс. Тем не менее, при pH выше 11,5 комплекс нестабилен из-за катализируемого основаниями гидролиза. Биоконъюгационные комплексы, стабильные только в щелочной среде, могут быть использованы для обратимой конъюгации, при которой эти комплексы могут быть разложены заданием соответствующего pH.

Биоконъюгационные комплексы формул I, II и III (т.е. когда в качестве Q, Q', Y и

Y' предпочтительно взяты O), в которых фенолборнокислый реагент был получен либо из (3-аминофенил) борной кислоты, либо из (4-карбоксифенил)борной кислоты, представляют особый случай, когда комплексы стабильны в буферном водном растворе в широком диапазоне pH, составляющем приблизительно от 2,5 до 11,5. Считается, что стабильность в столь широком диапазоне pH обусловлена присутствием компланарного 1,3-диольного остатка, ассоциированного с енольной формой остатка 2-гидроксибензогидроксаминокислоты. С другой стороны стабильность в широком диапазоне pH может быть результатом низкого эффективного pK_a фенолборной кислоты в комплексе, обусловленного реакцией аниона гидроксаминокислоты (CON⁻OH) с фенолборной кислотой и возникновением в итоге донорной связи, заполняющей внешнюю электронную оболочку атома бора. Образование биоконъюгационных комплексов этого типа обычно необратимо, так как их можно разложить только при pH выше 11,5 или ниже 2,5, либо конкурентным разложением в боратном буферном растворе.

Фенолборнокислые комплексообразующие полуконъюгаты с протеином в качестве биоактивного ингредиента могут быть охарактеризованы количеством боковых фенолборнокислых комплексообразующих остатков, приходящихся на одну молекулу протеина (степенью замещения). Полуконъюгаты можно обработать избытком флюоресцентного фенолборнокислого реагента в буферном водном растворе с соответствующим pH, чтобы получить описанные выше биоконъюгационные комплексы формул I, IV или VII, в которых BAS* - флюоресцентный компонент. Аналогично, для полуконъюгатов фенолборной кислоты может быть характерной реакция с избытком флюоресцентного фенолборнокислого комплексообразующего реагента в буферном водном растворе с соответствующим pH, в итоге которой получают биоконъюгационные комплексы формул I, IV или VII, где BAS* - флюоресцентный радикал (флюорофор).

Подходящие флюорофоры предпочтительно выбирать (но не ограничиваясь выбором) из группы, содержащей флюоресцеин, родамин X, тетраметилпродамин, Техасский красный, фикоэритрин и аллофикоцианин. После удаления избыточного реагента высаливанием, диализом или хроматографической классификацией по размеру биоконъюгационный комплекс подвергают спектрографическому анализу и определяют число комплексообразующих остатков фенолборной кислоты или остатков фенолборной кислоты по отношению поглощения при 280 нм, определяющего полную концентрацию протеинов, к поглощению при длине волны, характерной для флюорофора (1 max). Полуконъюгаты, полученные с другими высокомолярными биоактивными ингредиентами, которые можно очищать высаливанием, диализом или хроматографической классификацией по размеру, могут быть охарактеризованы аналогичным образом.

Пример I. Приготовление реагента

сукцинимидилового эфира N-(3-дигидроксисборилфенил)аминоянтарной кислоты формулы XIV, реакционноспособного по отношению к амину.

5,00 г, (0,05 моля) янтарного ангидрида и 7,75 г (0,05 моля) (3-аминофенил) борной кислоты растворяют в 40 мл обезвоженного пиридина и оставляют на ночь при комнатной температуре. Добавляют 20 мл воды, полученный раствор выдерживают в течение 1 ч, и затем концентрируют в роторном испарителе при 85-90°C. Полученный в итоге водный раствор вымораживают в кашице из сухого льда и ацетона, лиофилизируют в течение ночи, растворяют в 50 мл воды и подкисляют концентрированной HCl до pH около 1,0. Подкисленный раствор охлаждают в ледяной ванне в течение 1 ч, и отфильтровывают осадок, который рекристаллизуют из кипящей воды (200 мл) и высушивают в течение ночи в вакууме над гранулами NaOH, получая в итоге 8,60 г (70%-й выход)

N-(3-дигидроксисборилфенил)аминоянтарной кислоты. Гомогенность по данным тонкослойной хроматографии (CHCl₂/CH₃OH/CH₂COOH; 60: 35: 5), R_f=0,5. Точка плавления 186-188 °C. Структура подтверждена ¹H-ЯМР спектроскопией при 300 МГц в диметилсульфоксиамидине.

16,0 г (0,063 моля) N-(3-дигидроксисборилфенил)аминоянтарной кислоты растворяют в 80 мл сухого диметилформамида. К раствору добавляют 14,3 г, (0,069 моля) N,N-дициклогексилкарбодиимида, а затем 8,05 г, (0,070 моля) N-гидроксисукцинимидина. Реакцию проводят в течение ночи при помешивании при комнатной температуре. Из раствора отфильтровывают N,N-дициклогексилмочевину, и фильтрат экстрагируют 200 мл этилацетата. Экстракт промывают водой (3•400 мл) и насыщают NaCl (400 мл). Использованную для промывки воду экстрагируют 200 мл этилацетата, экстракты соединяют, высушивают над обезвоженным Na₂SO₄ и концентрируют в роторном испарителе, получая в итоге 12,5 г (выход 57%) сукцинимидилового эфира N-(3-дигидроксисборилфенил)аминоянтарной кислоты. Чистота (98%) оценена тонкослойной хроматографией (CHCl₂/CH₃OH/CH₂COOH; 85: 10: 5), R_f= 0,7. Структура подтверждена ¹H-ЯМР спектроскопией при 300 МГц в диметилсульфоксиде (DMCO).

Пример II. Применение реагента общей формулы XIV, реакционноспособного по отношению к аминам.

Протеины для получения полуконъюгатов, имеющих боковые остатки фенилборной кислоты, ковалентно связанные с протеином стабильными амидными связями, могут быть модифицированы реакцией реакционноспособного по отношению к аминам фенилборнокислого реагента формулы XIV с ε-аминогруппами остатков лизина в боковой цепи. В качестве растворителей могут быть взяты N,N-диметилформамид или диметилсульфоксид. Для депротонизации аминогруппы и, одновременно, минимизации гидролиза N-гидроксисукцинимидилового эфира следует использовать слабощелочные водные буферы с pH в пределах от 7,8 до 8,8

и, предпочтительно бикарбонатный буфер (100 ммоль) с pH 8,2. Было отмечено, что активированные N-гидроксисукцинимидиловые эфиры взаимодействуют с фенилборными кислотами в водно-щелочных растворах, что приводит к значительному снижению их реакционноспособности. Чтобы справиться с этим затруднением, водные реакции с участием сукцинимидилового эфира N-(3-дигидроксисборилфенил)аминоянтарной кислоты следует проводить только в присутствии по меньшей мере 10-кратного молярного избытка комплексообразующего лиганда фенилборной кислоты. Соединения, полезные в этом отношении, включают маннитол и катехол. Комплексы фенилборатов, временно приготовленные для этой цели, могут быть легко разложены после нейтрализации раствора. Следует избегать буферов, содержащих первичные амины, включая Трис и глицин, из-за их потенциальной реакционноспособности. Твердофазным подложкам, имеющим боковые первичные аминогруппы, включая блоттирующие мембраны и микротитровальные платы, могут быть приданы необходимые функциональные свойства путем введения в реакцию с фенилборнокислыми реагентами формулы XIV и получения в итоге твердофазных подложек с боковыми остатками фенилборной кислоты.

Пример III. Приготовление реагента (3-малеимидфенил) борной кислоты общей формулы XIV, реакционноспособного по отношению к тиолу.

400 мл этилацетата охлаждают в ледяной ванне примерно до 0°C. В охлажденный растворитель, помешивая, добавляют 7,76 г малеимида, а затем 10,19 г N-этилморфолина. Из отдельной воронки по каплям, поддерживая температуру реакции ниже 3°C, добавляют 6,26 г метилхлороформиата. По окончании добавления реакцию продолжают при помешивании еще в течение 30 мин, поддерживая температуру ниже 3 °C. Полученную в итоге смесь фильтруют через воронку Бюхнера, и осадок промывают небольшим количеством этилацетата. Фильтрат и промывную воду смешивают и промывают 100 мл ледяной воды. Органическую фазу высушивают над обезвоженным Na₂SO₄ и затем концентрируют в роторном испарителе. Полученное вещество растворяют в 75 мл смеси этилацетата и изопропилового эфира (40: 60 по объему) на водяной бане при 60°C. По окончании рекристаллизации при комнатной температуре кристаллы N-метоксикарбонилмалеимида промывают изопропиловым эфиром (2•20 мл) и сушат в вакууме в течение ночи.

1,26 г (0,01 моля) (3-аминофенил) борной кислоты растворяют в 50 мл насыщенного NaHCO₃ при кратковременном подогреве смеси на горячей плитке. Раствор охлаждают в ледяной ванне до примерно 0 °C и при энергичном помешивании добавляют 1,55 г (0,01 моля) N-метоксикарбонилмалеимида. Через 10 мин раствор разбавляют 200 мл воды и перемешивают при комнатной температуре в течение 30-40 мин pH доводят примерно до 5,5 добавлением 1 моля

H_2SO_4 и отфильтровывают осадок, который промывают 1 молем H_2SO_4 (2•50 мл) и затем сушат в течение ночи в вакууме над гранулами NaOH, получая в итоге 1,39 г (выход 64%) (3-малеимидфенил) борной кислоты. Структура подтверждена ¹H-ЯМР спектроскопией при 300 МГц в ДМСО.

Пример IV. Применение реагента общей формулы XIV, реакционноспособного по отношению к тиолу.

Протеины, содержащие дисульфидные связи (цистиновые остатки) или цистеиновые остатки, могут быть модифицированы реакционноспособными по отношению к тиолу фенолборнокислыми реагентами формулы XIV. Вначале, если требуется, реакцией с 2-меркаптоэтанолом или дитиотреитолом в водно-щелочном буфере восстанавливают дисульфидные связи. Избыток восстанавливающего реагента удаляют диализом или высаливанием, а протеин вводят в

реакцию с (3-малеимидфенил) борной кислотой в 25-100 М фосфатном буфере при pH от 7,0 до 7,5 в течение 1 ч при температуре 4°C, получая в итоге полуконъюгат с боковым остатком фенолборной кислоты, ковалентно связанным с протеином. Протеинам без тиольных групп могут быть приданы функциональные свойства с помощью реакции с тиолирующим реагентом с последующей модификацией, как описано выше. Тиолирующие реагенты, которые, как установлено, могут быть использованы для этой цели, включают N-гидроксисукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)п ропионат, N-гидроксисукцинимидил-3-ацетилтиоацетат и 2-иминотиолан.

Пример V. Приготовление гидразидного реагента N-(3-дигидроксиборилфенил)аминоянтарной кислоты общей формулы XIV, реакционноспособного по отношению к альдегиду.

10 мл метанола охлаждают в ледяной ванне примерно до 0°C и медленно добавляют 1 мл тионилхлорида. К полученному раствору при помешивании добавляют 1,25 г, (0,005 моля) N-(3-дигидроксиборилфенил)аминоянтарной кислоты, полученной, как в примере I, и проводят реакцию при помешивании в течение ночи при комнатной температуре. Раствор концентрируют в роторном испарителе, получая в итоге белое кристаллическое вещество, которое дважды упаривают с метанолом (2•10 мл) для удаления остатка тионилхлорида. Вещество растворяют в 5 мл метанола с добавлением 1 мл гидразингидрата. Полученный раствор перемешивают в течение ночи при комнатной температуре. Через несколько часов образуется осадок, который отфильтровывают, промывают холодным метанолом и сушат в вакууме в течение суток над гранулами NaOH, получая в итоге 1,11 г (выход 88%) гидразида N-(3-дигидроксиборилфенил)аминоянтарной кислоты. Структура подтверждена ¹H-ЯМР спектроскопией при 300 МГц в ДМСО.

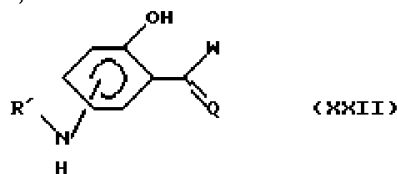
Пример VI. Применение реагента формулы XIV, реакционноспособного по отношению к альдегиду.

Гликопротеины, в частности антитела,

могут быть конъюгированы с гидразидным фенолборнокислым реагентом, реакционноспособным по отношению к альдегиду, после обработки протеина метапериодатом натрия $NaIO_4$ (в количестве от 5 до 20 ммолей) в течение от 30 мин до 4 ч при температуре 0°C в (0,1-0,5) М буферном растворе ацетата натрия с pH от 5 до 6, содержащем до 0,2 М NaCl. Избыток периодата удаляют высаливанием, и активированный протеин с прилегающими боковыми альдегидными группами, появившимися в итоге окисления периодатом остатков углеводов, имеющих 1,2-диольные компоненты, конденсируют в присутствии гидразидного реагента в течение от 1 до 24 ч при комнатной температуре, получая в итоге полуконъюгат с боковыми остатками фенолборной кислоты, ковалентно связанными с протеином основной связью Шиффа (иминного типа). Стабильность связи с протеином при желании можно увеличить, восстанавливая основание Шиффа слабым цианбороводородом до соответствующего алкамина. Важно отметить, что окисление гликопротеина периодатом активирует протеин для реакции с реагентом гидразидного типа, одновременно удаляя образовавшиеся естественным путем комплексообразующие остатки фенолборной кислоты (коаксиальные 1,2-диоли), ассоциированные с гликопротеинами.

Пример VIa (в оригинале номер VI, использованный повторно - прим. переводчика). Синтез фенолборнокислых комплексообразующих реагентов общей формулы XI.

Реагенты общей формулы XI, где группа W выбрана из NH_2 , $NHCH_3$, $NHOH$, а группа Q - O, получают либо из 4-аминосалициловой, либо из 5-аминосалициловой кислоты. Соответственно, 4- или 5-аминосалициловую кислоту вначале этерифицируют для получения либо метил-4-, либо метил-5-аминосалицилата. Эфир нейтрализуют и затем амидируют реакцией с амином, выбранным из группы, содержащей аммиак, метиламин и гидроксилламин, получая в итоге 4- или 5-аминосалициламид формулы (XXII):



где R' - H, W выбраны из NH_2 , $NHCH_3$, $NHOH$, а Q - H.

Это соединение затем конденсируют в присутствии активированной карбоновой кислоты, предпочтительно (но без ограничения) выбранной из группы, содержащей янтарный ангидрид, метилсукцинилхлорид, малеиновый ангидрид, N-метоксикарбонилмалеимид, 3-бромпропионилхлорид, 3-иодпропионилхлорид, иодацетилхлорид, бромацетилхлорид и хлорацетилхлорид, и получают соответствующий 4- или 5-амидосалициламид, в котором Q - O, W - NH_2 , $NHCH_3$ или $NHOH$, а R становится амидом формулы $Z''-CO-$, где $Z''-CH_2CH_2COOH$, $CH_2CH_2COOCH_3$, $CH=$

CHCOOH, CH₂CH₂Br, CH₂CH₂I, CH₂I, CH₂Br или CH₂Cl.

Соединения, в которых Z" - CH₂I, либо CH₂Br, могут быть использованы как реакционноспособные по отношению к тиолу реагенты, способные связывать комплексообразующие остатки фенолборной кислоты с биоактивными ингредиентами, имеющими боковые тиольные группы. Соединения, в которых Z" - CH=CHCOOH, могут быть далее функционализированы замыканием кольца, благодаря чему получают реакционноспособный по отношению к тиолу малеимидный реагент, способный связывать комплексообразующий остаток фенолборной кислоты с биоактивными ингредиентами, имеющими боковые тиольные группы. Если Z" - CH₂CH₂COOCH₃, то такое соединение может быть далее функционализировано реакцией с гидразингидратом, в итоге чего получают гидразидный реагент, в котором Z" - CH₂CH₂CONHNH₂, способный связывать комплексообразующий остаток фенолборной кислоты с биоактивным ингредиентом, имеющим боковые альдегидные группы (возникшие в итоге окисления углеводных остаток периодатом). Если Z" выбрано из группы, содержащей CH₂CH₂Br и CH₂CH₂I, то такое соединение может быть далее функционализировано реакцией с тиолацетатом калия, в итоге чего получают промежуточное соединение, из которого после депротонизации получают тиолсодержащее соединение с Z" - CH₂CH₂SH. Тиолсодержащее соединение может быть активировано реакцией с реагентом, предпочтительно (но без ограничения) выбранным из группы, содержащей 2,2'-дитиодипиридин, 4,4'-дитиодипиридин и 2,2'-дитиоди(3-нитропиридин), для получения активированного дисульфида, содержащего реагент, способный связывать расщепляемой дисульфидной связью комплексообразующий остаток фенолборной кислоты с имеющим боковые тиольные группы биоактивным ингредиентом.

Если в формуле XXII W - NH₂ или NHCH₃, а группа Z" - CH₂CH₂COOH, дальнейшая функционализация возможна при обработке дициклогексилкарбодимидом (DCC) и реагентом, предпочтительно (но без ограничения) выбранным из группы, содержащей N-гидроксисукцинимид (NHS) и N-гидроксисульфосукцинимид (SNHS), с получением в итоге активированного эфирного реагента, способный связывать комплексообразующий остаток фенолборной кислоты с имеющим боковые аминогруппы биоактивным ингредиентом. Активированные эфиры формулы XXII, где W - NH₂ или NHCH₃, а Z" - CH₂CH₂CO-NHS, могут быть использованы как промежуточные соединения для синтеза реагентов формулы XI, где группа Z - алкильная или полиэтиленгликольная цепь, эквивалентная по длине по меньшей мере 6 (атомам) углерода.

Соединения, где W - NHOH, не могут быть непосредственно использованы для получения реагентов с активированными эфирными остатками из-за проблем, возникающих при активации карбоксильной группы в присутствии одновременно NHS и бензогидроксиамидной кислотной группы, связанной с комплексообразующим остатком

фенилборной кислоты. Это создает ограничения из-за распространенности N-гидроксисукцинимидных реагентов и того обстоятельства, что только реагенты формулы XI, где группа W - либо NHOH, либо NHOCH₃, образуют стабильные комплексные соединения в широком диапазоне pH. Чтобы снять это ограничение, для получения активированных эфирных реагентов формулы XI используют другой способ синтеза, для которого группа W - NHOCH₃, а Q - O. 4- или 5-аминосалициловую кислоту конденсируют с метилсукцинилхлоридом с получением соединения формулы XXII, где группа W - OH, а группа Z" - CH₂CH₂COOCH₃. Последующая реакция с N,N-карбонилдиимидазолом и добавление метоксиламингидрохлорида дают соединение, в котором W - NHOCH₃, а Z' - CH₂CH₂COOCH₃. Щелочной гидролиз сложноэфирной группы дает соединение со свободной карбоксильной группой. Далее активация карбоксильной группы обработкой DCC и реагентом, предпочтительно (но без ограничений) выбранным из NHS и SNHS, дает активированный эфирный реагент, в котором W - NHOCH₃, а Z" - сукцинимидоксил и который пригоден для присоединения комплексообразующего остатка фенолборной кислоты к имеющему аминогруппы биоактивному ингредиенту. Такие N-сукцинимидиловые эфиры служат промежуточными реагентами для синтеза реагентов формулы XI, в которых Z содержит алкильную или полиэтиленгликолевую цепь, эквивалентную по меньшей мере 6 атомам углерода.

N-гидроксисукцинимидиловые эфиры могут быть далее функционализированы обработкой реагентом, предпочтительно (но без ограничения) выбранным из группы, содержащей 6-аминогексанойную или 4-аминобутанойную кислоту, N-трет-бутоксикарбонил-1,6-диаминогексан, (N-Вос-1,6-диаминогексан) и N-Вос-1,4-диаминобутан, в итоге чего после удаления (если это необходимо) защитной Вос-группы получают соединение с удлиненным спейсером и концевой либо карбоксильной, либо аминогруппой. Вышеупомянутые реагенты с боковыми карбоксильными группами можно использовать для приготовления NHS-эфира, SNHS-эфира и гидразида, содержащих реагенты с длинными спейсерами, полезными при устранении стерических проблем, как известно, присущих биомолекулам с большой молекулярной массой. Аналогично, вышеупомянутые реагенты с боковыми аминогруппами могут быть использованы для получения иодацетамида, малеимида и активированного дисульфида, содержащих соединения с длинными спейсерами. Кроме того, вышеупомянутые реагенты с боковыми карбоксильными или аминогруппами могут быть использованы как промежуточные соединения при приготовлении твердофазных подложек.

Пример VII. Синтез фенолборнокислых комплексообразующих реагентов формулы XII.

Реагенты формулы XII, где группа W выбрана из NH₂, NHCH₃ и NHOH, а Q - O получают из либо 4-, либо

5-аминосалициловой кислоты аналогично тому, как это делают при получении реагентов формулы XI. 4- или 5-аминосалициламиды, приготовленные, как описано выше, конденсируют в присутствии активированной дикарбоновой кислоты, предпочтительно (но без ограничений) выбранной из группы, содержащей сукцинилхлорид, адипоилхлорид, диизобутилкарбонат адипиновой кислоты, субериолхлорид, 3,3'-дитиопропионилхлорид, 3,6,9-триоксаундецилдиоилхлорид, и диизобутилкарбонат

3,6,9-триоксаундецилдиоидной кислоты, получая в итоге соединение формулы XII, в котором группа W выбрана из NH₂, NHCH₃ и NHOH, группа Q - O, а группа Z* (но без ограничений) - из (CH₂)₂, (CH₂)₄, (CH₂)₆, (CH₂)₂SS(CH₂)₂ и CH₂(OCH₂CH₂)₂OCH₂.

Реагенты формулы XII, где группа W - NHOCH₂, а группа Q - O получают альтернативным путем аналогично получению реагентов формулы XI, где группа W - NHCOH₃. 4- или 5-аминосалициловую кислоту конденсируют в присутствии активированной дикарбоновой кислоты, предпочтительно (но без ограничения) выбранной из группы, содержащей сукцинилхлорид, адипоилхлорид, диизобутилкарбонат адипиновой кислоты, субериолхлорид, 3,3'-дитиопропионилхлорид, 3,6,9-триоксаундецилдиоилхлорид, и диизобутилкарбонат

3,6,9-триоксаундецилдиоидной кислоты, получая в итоге соединение формулы XII, в котором группа W - OH, группа Q - O, а группу Z* выбирают (но не ограничивают выбором) из элементов (CH₂)₂, (CH₂)₄, (CH₂)₆, (CH₂)₂SS(CH₂)₂ и CH₂(OCH₂CH₂)₂OCH₂.

Последующая реакция соединения формулы XII, где W - OH, Q - O, а Z* выбрано (но без ограничения) из (CH₂)₂, (CH₂)₄, (CH₂)₆, (CH₂)₂SS(CH₂)₂ и CH₂(OCH₂CH₂)₂OCH₂, с CDI с последующим добавлением метоксиамингидрохлорида дает соединение, в котором W - NHOCH₃, а группы Q и Z* соответствуют определенным заранее.

Пример VIII. Приготовление 4-амино-2-гидроксибензогидроксиаминокислоты.

100 мл абсолютного метанола и свежеконцентрированную H₂SO₄ осторожно смешивают в 250 мл круглодонной колбе при постоянном помешивании (процесс экзотермический). Добавляя 10,0 г, (65,4 ммоль) 4-аминосалициловой кислоты, получают темный раствор, который нагревают с обратным холодильником в течение 6 ч. Полученному веществу дают остыть и затем упаривают в ротонном испарителе до уменьшения объема примерно вдвое. После этого появляется твердый осадок. Концентрат вливают в 400 мл воды и полученную суспензию титруют до pH примерно 3 добавлением вначале (до pH 6,5) 5 N NaOH, а затем твердого Na₂CO₃ с выделением газа CO₂. Концентрат охлаждают на льду и выпавший осадок отфильтровывают. Фильтрат промывают холодной водой и затем сушат в вакууме над гранулами NaOH, получая в итоге 9,6 г (выход 88%) бледно-лавандовый порошок

метил-4-аминосалицилата с температурой плавления 115-117 °C. Структура подтверждена ¹H-ЯМР спектроскопией в d₆-ацетоне.

5 4,0 г NaOH в 16 мл воды осторожно добавляют к 2,8 г (40 ммоль) гидроксиламингидрохлорида и 20 г льда. После растворения добавляют вначале 0,4 г Na₂SO₃, затем 3,35 г (20 ммоль) метил-4-аминосалицилата. Полученный раствор перемешивают в течение 24 ч при комнатной температуре, проверяя ход реакции каждые несколько часов с помощью ВЭЖХ. Полученный раствор охлаждают на льду и подкисляют добавлением 25%-й H₂SO₄. Осадок образуется вначале при pH примерно равном 6. В конце концов pH доводят до 4, и светло-коричневый осадок выделяют фильтрованием. Полученное вещество сушат в вакууме над P₂O₅, получая в итоге 3,0 г (выход 89%)

20 4-амино-2-гидроксибензогидроксиаминокислоты (t_{пл} = 180-181 °C). Структура подтверждена ¹H-ЯМР спектроскопией при 300 МГц в DMSO.

4-амино-2-гидроксибензогидроксиаминокислота является ключевым промежуточным соединением при приготовлении реагентов обеих формул I и II, в которых группа X-NHOH, а группа Y - O. Реагенты с остатками 2-гидроксибензогидроксиаминокислоты могут образовывать биоконъюгаты, стабильные в буферных водных растворах с pH в пределах примерно от 2,5 до 11,5.

25 Пример IX. Приготовление фенолборнокислых комплексообразующих реагентов формулы XI, реакционноспособных по отношению к альдегиду.

35 К приготовленному, как описано выше, охлажденному на льду и содержащему 7,0 г (0,02 моля) NaHCO₃ раствору 8,4 г (0,05 моля)

40 4-амино-2-гидроксибензогидроксиаминокислоты в 150 мл воды при перемешивании по каплям в течение 15 мин добавляют 9,0 г (0,06 моля)

45 3-карбометоксипропионилхлорида. После перемешивания в течение 1 ч при температуре 0-5 °C раствор подкисляют холодной 5 N HCl. Осадок отделяют и высушивают в вакууме над гранулами NaOH, получая в итоге 13,5 г (выход 96%) сырой N-4-(3-карбометоксипропионамидо)-2-гидроксибензогидроксиаминокислоты, которую используют без дальнейшей очистки.

50 К раствору 10 г (0,035 моля) N-4-(3-карбометоксипропионамидо)-2-гидроксибензогидроксиаминокислоты в 50 мл метанола добавляют 12 мл гидразингидрата. Реакция протекает в продолжение ночи при комнатной температуре. Полученное вещество отфильтровывают, промывают эфиром, дважды рекристаллизуют из диметилформамида и получают в итоге 7,3 г (выход 78%)

55 N-4-(3-карбометоксипропионамидо)-2-гидроксибензогидроксиаминокислоты.

60 Пример X. Применение фенолборнокислых комплексообразующих реагентов, реакционноспособных по отношению к альдегиду.

Гликопротеины и, в частности, антитела могут быть конъюгированы с реакционноспособными по отношению к альдегиду гидразидными

фенилборнокислыми комплексообразующими реагентами после обработки протеина 5-20 ммольями метапериодата натрия (NaIO_4), в содержащем до 0,2 молей NaCl 0,1-0,5 М буферном растворе ацетата натрия при pH от 5 до 6 и температуре 0°C в течение от 30 мин до 4 ч. Избыточный периодат удаляют диализом или высаливанием, и активированный протеин с прилегающими боковыми альдегидными группами, образовавшимися при окислении углеводных остатков периодатом, и прилегающими коаксиальными 1,2-диольными остатками конденсируют с гидразидным реагентом в течение от 1 до 24 ч при комнатной температуре, получая в итоге полуконъюгат с боковыми комплексообразующими остатками фенилборной кислоты, ковалентно связанными с протеином связью типа основания Шиффа (иминного типа).

Стабильность связи с протеином можно при желании увеличить, восстанавливая основание Шиффа до соответствующего алкиламина слабым цианборгидридом натрия. Важно отметить, что окисление гликопротеина метапериодатом натрия активирует протеин для реакции с реагентом гидразидного типа, одновременно удаляя образовавшиеся естественным путем комплексообразующие остатки фенилборной кислоты (коаксиальные 1,2-диоли), ассоциированные с гликопротеинами.

Пример XI. Приготовление комплексообразующих реагентов фенилборной кислоты формулы XI, реакционноспособных по отношению к тиолу.

К охлажденному на льду перемешиваемому раствору 10,0 г (0,073 моля) 5-аминосалициламида в 150 мл воды, содержащей 42,0 г (0,5 моля) NaHCO_3 , в течение 15 мин прикапывают 18,4 г (0,09 моля) иодацетилхлорида. После перемешивания в течение 1 ч при температуре $0-5^\circ\text{C}$ раствор подкисляют холодной 6 N HCl . Осадок отделяют и высушивают в вакууме над гранулами NaOH , получая в итоге 21,3 г (выход 96%) сырого 5-(иодацетамид)салициламида.

Пример XII. Применение комплексообразующих реагентов фенилборной кислоты, реакционноспособных по отношению к тиолу.

Протеины, содержащие дисульфидные связи (цистиновые остатки) или цистеиновые остатки, могут быть модифицированы таким реакционноспособным по отношению к тиолу комплексообразующим реагентом фенилборной кислоты, как 5-(иодацетамид)салициламид. В начале, если требуется, дисульфидные связи восстанавливают обработкой 2-меркаптоэтанолом или дитиотреитолом в тщательно обезгаженном водно-щелочном растворе. Избыток восстановителя реагента удаляют диализом или высаливанием, а протеин вводят в реакцию с алкилирующим реагентом в нейтральном водном растворе в течение 1 ч при 4°C , получая в итоге полуконъюгат с боковым комплексообразующим остатком фенилборной кислоты, ковалентно связанным с протеином. По окончании реакции избыточный реагент удаляют высаливанием.

Пример XIII. Приготовление комплексообразующих реагентов

фенилборной кислоты формулы XI, реакционноспособных по отношению к амину.

К приготовленному, как описано выше, охлажденному на льду содержащему 7,0 г (0,02 моля) NaHCO_3 раствору 7,7 г (0,05 моля) 4-аминосалициловой кислоты в 150 мл воды при перемешивании по каплям в течение 15 мин добавляют 9,0 г (0,06 моля) 3-карбометоксипропионилхлорида. После перемешивания в течение 1 ч при температуре $0-5^\circ\text{C}$ раствор подкисляют холодной 6 N HCl . Осадок отделяют и высушивают в вакууме над гранулами NaOH , получая в итоге 11,9 г (выход 89%) сырой N-4-(3-карбометоксипропионамидо)салициловой кислоты, которую используют без очистки.

К энергично перемешиваемому раствору 10,0 г (0,036 моля) N-4-(3-карбометоксипропионамидо)салициловой кислоты в 50 мл тетрагидрофурана порциями добавляют 5,84 г (0,036 моля) 1,1'-карбонилдидимидазола и 3,0 г (0,036 моля) метоксиамингидрохлорида. Сосуд снабжают осушающей трубкой, и реакцию проводят при энергичном помешивании в течение 30 мин при комнатной температуре. Выделившийся при реакции имидазолгидрохлорид отфильтровывают. Фильтрат упаривают в роторном испарителе до получения янтарного масла, которое растворяют в 10 мл теплого тетрагидрофурана и затем добавляют к 150 мл 2 N H_2SO_4 . Осадок отфильтровывают, промывают 2 N H_2SO_4 и водой и сушат в течение ночи в вакууме над гранулами NaOH , получая в итоге 10,0 г (выход 94%) N-4-(3-карбометоксипропионамидо)-2-гидрокс и-О-метилбензогидроксиаминокислоты.

7,4 г (0,025 моля) N-4-(3-карбометоксипропионамидо)-2-гидрокс и-О-метилбензогидроксиаминокислоты растворяют в 25 мл 0,2 N метанольного LiOH . Раствор перемешивают в течение ночи при комнатной температуре под азотом. Метанол удаляют в роторном испарителе, а остаток растворяют в 150 мл воды. Раствор подкисляют 2 N H_2SO_4 до pH примерно 2 и экстрагируют 100 мл эфира. После повторной экстракции смесь эфирных экстрактов сушат над обезвоженным Na_2SO_4 . Полученное вещество концентрируют в роторном испарителе, затем в течение ночи сушат в вакууме над P_2O_5 , получая в итоге 6,28 г (выход 89%)

N-4-(3-карбометоксипропионамидо)-2-гидрокс и-О-метилбензогидроксиаминокислоты.

5,65 г (0,02 моля) N-4-(3-карбометоксипропионамидо)-2-гидрокс и-О-метилбензогидроксиаминокислоты растворяют в 50 мл горячего диметилформамида и дают остыть до комнатной температуры. К раствору при перемешивании добавляют сначала 2,3 г (0,02 моля) N-гидроксиуксусинимида, а затем только что приготовленный раствор 4,1 г (0,02 моля) дициклогексилкарбодимида в 10 мл диметилформамида. Полученную суспензию перемешивают в течение ночи при комнатной температуре отфильтровывают от раствора дициклогексилмочевину, а фильтрат концентрируют в роторном испарителе до минимального объема. Остаток осаждают эфиром, осадок отфильтровывают,

промывают эфиром и 2-пропанолом и недолго сушат в вакууме над P_2O_5 , получая в итоге 5,6 г (выход 74%) сукцинимидилового эфира N-4-(3-карбометоксипропионамидо)-2-гидрокс

и-О-метилбензогидроксаминокислоты,

которую хранят в морозильнике при $-15^\circ C$.

Пример XIV. Применение комплексобразующих реагентов фенолборной кислоты, реакционноспособных по отношению к амину.

Протеины могут быть конъюгированы с комплексобразующими реагентами фенолборной кислоты, реакционноспособными по отношению к амину, реакцией с ϵ -аминогруппами лизиновых остатков в боковой цепи с получением в итоге полуконъюгата с боковыми комплексобразующими остатками фенолборной кислоты, ковалентно связанными с протеином стабильными амидными связями. Для отщепления водорода от аминогрупп с одновременной минимизацией гидролиза NHS-эфира следует использовать слабощелочные водные буферы с pH в пределах от 7,8 до 8,8 за исключением буферов, содержащих первичные амины, включая Трис и глицин, чтобы не допустить перекрестных реакций. Твердофазные подложки с боковыми первичными аминогруппами могут быть функционализированы аналогичным способом реакцией с фенолборнокислым комплексобразующим реагентом с получением в итоге твердофазных подложек с комплексобразующими остатками фенолборной кислоты.

Пример XV. Приготовление фенолборнокислого комплексобразующего реагента формулы XII.

6,4 г (0,038 моля)

4-амино-2-гидроксibenзогидроксаминокислоты растворяют в 50 мл сухого дихлорметана. Добавляют 5,3 мл (0,038 моля) триэтиламина, после чего в течение 2 ч прикапывают раствор 5,0 г (0,019 моля) 3,6,9-триоксаундецилдиолхлорида в 50 мл сухого дихлорметана.

Триэтиламмонийгидрохлорид удаляют фильтрованием, фильтрат промывают водой (2•100 мл), затем насыщенным $NaHCO_3$ (2•100 мл) и насыщенным $NaCl$ (100 мл) и сушат над обезвоженным Na_2SO_4 . Растворитель удаляют в роторном испарителе, и остаток рекристаллизуют из 100 мл метанола, получая 6,0 г (выход 61%) бесцветных кристаллов. Структура подтверждена 1H -ЯМР спектроскопией в ДМСО.

Пример XVI. Применение комплексобразующего реагента фенолборной кислоты формулы XII.

Протеины, конъюгированные с фенолборной кислотой, могут быть поперечно связаны реагентами формулы XII. Это может оказаться особенно полезным при приготовлении протеиновых агрегатов, используемых для модификации таких свойств протеина, как стабильность и растворимость. Кроме того, агрегаты ферментов, полученные поперечным сшиванием, используют для повышения чувствительности ферментного иммуносорбентного анализа. Этот принцип используют в системе Avidin-Biotin, применяя авидинбиотиновые комплексы (АБК), в которых

биотинилированные ферменты вначале используют для получения высокомолекулярного комплекса с авидином (поперечным сшиванием), а затем вводят этот комплекс в ферментный иммуносорбентный анализ с целью высокочувствительного обнаружения биотинилированного антигена.

Пример XVII. Общий синтез фенолборнокислых комплексобразующих реагентов формулы XVIII.

Реагенты формулы XVIII, например, в которых X выбран из группы H, CH_3 и C_6H_5 , а Y - O, получают конденсацией N-гидроксифталимидов с соединением общей формулы R_1-Z-R_2 , где R_1 выбраны из Br, Cl и I (предпочтительно Br), R_2 - из Br, Cl, I, CO_2H и CO_2CH_3 (предпочтительно из Br, CO_2H и CO_2CH_3), а Z определен, как в формуле XVIII, т.е. предпочтительно как спейсер, в виде либо алкильной, либо полиэфирной цепи, которая эквивалентна по длине 2-12 атомам углерода и может иметь промежуточные амидные функциональные группы, т.е. предпочтительно цепи $(CH_2)_n$ ($n=1-5$) или $(CH_2CH_2O)_n$ ($n=2-4$).

(а) В начальной реакции вещество общей формулы R_1-Z-R_2 подогревают в диметилформамиде с одним эквивалентом N-гидроксифталимидов при температуре от $60^\circ C$ до $100^\circ C$ до получения раствора. Затем раствору дают остыть до комнатной температуры, добавляя один эквивалент триэтиламина и получая в итоге темно-красный цвет, обусловленный анионом гидроксифталимидов. Раствор перемешивают при комнатной температуре в течение от 1 до 4 дней, проверяя течение реакции тонкослойной хроматографией (ВЖХ). По окончании реакции добавляют воду, чтобы вызвать осаждение, осадок промывают водой и сушат при комнатной температуре, получая в итоге вещество, в котором R_1 - фталимидо, а R_2 - как определено ранее. Вещество, в котором R_2 выбрано из Br, Cl и I, конденсируют вместе с реагентом, предпочтительно выбираемым (но без ограничения) из $C_6H_4(CO)_2NK$, CH_3COONa и CH_2COSK . Условия можно изменять в зависимости от выбора желаемого продукта, но обычно бывает необходимо добавить 1,1 эквивалента одного из соединений $C_6H_4(CO)_2NK$, CH_3COONa , CH_2COSK в полярном растворителе, выбираемом из группы, содержащей уксусную кислоту, диметилформамид, метанол или этанол, при кипячении с обратным холодильником в течение от 1 до 24 ч.

(б) Полупродукт из (а) подвергают кислому каталитическому гидролизу по фталимидной группе так, что R_1 превращается в NH_2 , R_2 ацетируется до R_2Ac , где R_2Ac выбран из $N(CO)_2C_6H_4$, $OCOCH_3$ и $SCOCH_3$, а Z - как определено ранее. Кислый каталитический гидролиз по фталимидной группе при условии $R_2 - CO_2CH_3$ дает в итоге вещество, в котором R_2 - либо CO_2H , либо CO_2CH_3 , а Z - как определено ранее. Фталимидную группу обрабатывают концентрированной HCl, или концентрированной HCl в уксусной кислоте, или 30%-й HBr, или 48%-й HBr с обратным холодильником в течение от 15 до 60 мин. В

каждом случае после охлаждения до комнатной температуры фталевую кислоту как побочный продукт отфильтровывают от полученного раствора после охлаждения до комнатной температуры. Объем уменьшают и вещество нейтрализуют либо NaOH, либо NaHCO₃, либо NaCO₃. Конечный продукт выделяют экстракцией эфиром, либо этилацетатом с последующей концентрацией в вакууме.

(с) Полупродукт из (b), конденсируют с реагентом, являющимся либо салицилальдегидом, либо 2-гидроксиацетофеноном, либо 2-гидроксидифенилкетонном для получения соответствующего карбонимидоильного остатка в R₁. Эту конденсацию проводят в среде метанола, либо 90%-м метанола при кипячении с обратным холодильником в течение от 4 до 12 ч при 60°C, наблюдая за реакцией с помощью ТСХ. Продукт концентрируют в вакууме и затем сушат в эксикаторе в течение ночи.

(d) С продукта из (с) снимают защиту щелочным каталитическим гидролизом в теплом водном растворе K₂CO₃ или NaOH в течение от 8 до 24 ч, получая в итоге полупродукт общей формулы P5, в которой R₃ и Q таковы, как определено ранее. Полученный продукт подкисляют HCl, экстрагируют этилацетатом, сушат над обезвоженным MgSO₄ и концентрируют в вакууме. Защитную группу удаляют реакцией с гидразингидратом в среде этанола при кипячении с обратным холодильником в течение от 12 до 24 ч. Выпавший фталгидразид отфильтровывают от раствора, который концентрируют. Продукт экстрагируют этилацетатом, высушивают над обезвоженным MgSO₄ и концентрируют в вакууме.

(e) Конечный продукт получают активацией amino-, гидроксильных, тиольных или карбоксильных групп, ассоциированных с продуктами. Аминогруппы могут быть активированы обработкой реагентом, предпочтительно (но без ограничения) выбранным из группы, содержащей бромуксусный ангидрид, иодуксусный ангидрид и малеиновый ангидрид. Гидроксильные группы могут быть активированы обработкой реагентом, предпочтительно (но без ограничения) выбранным из группы, содержащей 2,2,2-трифторэтансульфонилхлорид, пентафторбензолсульфонилхлорид и 2-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорами дин. Тиольные группы могут быть активированы обработкой реагентом, предпочтительно (но без ограничения) выбранным из группы, содержащей 2-тиопиридон, 4-тиопиридон и 3-нитро-2-меркаптопиридин. Карбоксильные группы могут быть активированы обработкой реагентом, предпочтительно выбранным из дициклогексилкарбодиимида, и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида, в присутствии реагента предпочтительно (но без ограничения) выбранного из группы, содержащей N-гидроксисукцинимид и N-гидроксисульфосукцинимид. С другой стороны, карбоксильные группы могут быть этерифицированы спиртом, предпочтительно метанолом или этанолом, и затем

функционализованы реакцией либо с гидразингидратом, либо с гидроксилмином.

Вещества общей формулы XVIII, в которой X выбраны из H, CH₃ и C₆H₅, а Y - CH₂, получают, как описано ранее, с замещением N-гидроксифталимида фталимидом натрия на первой стадии синтеза.

Пример XVIII. Общий синтез фенолборнокислых комплексобразующих реагентов формулы XIX.

(a) Реагенты общей формулы XIX, где Y - O, получают способом, аналогичным описанному выше, причем на стадиях (a) и (b) синтез проводят в точности так, как это описано в предыдущем примере. Продукт, полученный на стадии (b) предыдущего примера, конденсируют с реагентом, предпочтительно (но без ограничения) выбранным из группы, содержащей 2-ацетоксибензоилхлорид и 2-бензилоксибензоилхлорид, получая в итоге соответствующий амид. Конденсацию полученных продуктов совместно с реагентом, предпочтительно (но без ограничения) выбранным из группы, содержащей 2-ацетоксибензоилхлорид и 2-бензилоксибензоилхлорид, проводят в дихлорметане, содержащем 1 эквивалент триэтиламина, при перемешивании в течение 1 ч при комнатной температуре, проверяя ход реакции с помощью ТСХ. От раствора отфильтровывают триэтиламмонийгидрохлорид, фильтрат промывают водой, сушат над обезвоженным MgSO₄ и концентрируют в вакууме.

(b) С продуктов предыдущей стадии удаляют защиту (т.е. деацетируют R₂) щелочным каталитическим гидролизом в теплом растворе K₂CO₃ или NaOH в течение от 8 до 24 ч. Полученное вещество окисляют HCl, экстрагируют этилацетатом, сушат над обезвоженным MgSO₄ и концентрируют в вакууме. Если при приготвлении продукта для защиты фенольной гидроксильной группы была использована ацетоксильная группа, она также будет удалена, что исключит потребность в последующей стадии синтеза. Защитную группу удаляют реакцией с гидразингидратом (N₂H₂•H₂O) в этаноле при кипячении с обратным холодильником в течение от 12 до 48 ч. Выпавший фталгидразид отфильтровывают от раствора, который концентрируют. Продукт экстрагируют этилацетатом, сушат над обезвоженным MgSO₄ и концентрируют в вакууме.

(с) Далее с продуктов стадии (b) снимают, при потребности, защиту, удалением защитной бензилоксигруппы каталитической гидрогенизацией, которую проводят с палладированным угольным катализатором в обезвоженном абсолютном этаноле в течение 2-12 ч. Катализатор отфильтровывают, и полученное вещество концентрируют в вакууме.

(d) Конечный продукт получают активацией amino-, гидроксильных, тиольных или карбоксильных групп, ассоциированных с полупродуктами. Аминогруппы могут быть активированы реагентом, предпочтительно (но без ограничения) выбранным из группы, содержащей бромацетатангидрид, иодацетатангидрид и малеиновый ангидрид. Гидроксильные группы могут быть

активированы реагентом, предпочтительно (но без ограничения) выбранным из группы, содержащей

2,2,2-трифторэтансульфонилхлорид, пентафторбензолсульфонилхлорид и 2-цианэтил-N,N-диизопропилхлорофосфорамидин. Тиольные группы могут быть активированы реакцией с реагентом, предпочтительно (но без ограничения) выбранным из группы, содержащей 2-тиопиридон, 4-тиопиридон и 3-нитро-2-меркаптопиридин. Карбоксильные группы могут быть активированы реакцией с реагентом, предпочтительно либо дициклогексилкарбодиимидом, либо 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом в присутствии реагента предпочтительно (но без ограничения) выбранного из группы, содержащей N-гидроксисукцинимид и N-гидроксисульфосукцинимид. С другой стороны, карбоксильные группы могут быть этерифицированы спиртом, предпочтительно либо метанолом, либо этанолом, и затем функционализированы реакцией либо с гидразингидратом, либо с гидроксиламином.

Вещества общей формулы XII, в которой Z - CH_2 , получают, как описано ранее, с замещением N-гидроксифталимида фталимидом натрия на начальной стадии синтеза.

Пример XIX. Приготовление комплексообразующих реагентов фенолборной кислоты формулы XVIII, реакционноспособных по отношению к альдегиду.

В начальной стадии синтеза метил 6-бромгексаноат конденсируют с N-гидроксифталимидом при помешивании в диметилформамиде, содержащем 1 эквивалент триэтиламина, в течение 24 ч. Полученный полупродукт осаждают вливанием в воду, отфильтровывают, промывают водой, сушат в вакуумном эксикаторе и используют без дальнейшей очистки.

Во второй стадии синтеза полученный сырой продукт недолго кипятят с обратным холодильником в смеси уксусной и концентрированной соляной кислот. После охлаждения выпавшую в осадок фталевую кислоту отфильтровывают, фильтрат концентрируют и затем несколько раз выпаривают из небольшого количества воды для удаления следов кислот. Далее полученный аминоксигидрохлорид нейтрализуют NaHCO_3 , экстрагируют этилацетатом, высушивают над MgSO_4 и концентрируют в вакууме.

На третьей стадии синтеза полученный аминоксигидрохлорид конденсируют в присутствии 1 эквивалента 2-гидроксibenзальдегида кипячением с обратным холодильником в 90%-ном этаноле и затем концентрируют в вакууме, получая в итоге альдоксим.

Наконец, полученный альдоксим обрабатывают в метаноле избытком гидразингидрата при помешивании в течение ночи. Выпавший в осадок гидразидальдоксим охлаждают на ледяной ванне, отфильтровывают от раствора, вновь растворяют в метаноле и затем концентрируют в вакууме.

Пример XX. Применение фенолборнокислых комплексообразующих

реагентов, реакционноспособных по отношению к альдегиду.

Гликопротеины и, в частности, моноклональные антитела могут быть конъюгированы с гидразидным фенолборнокислым реакционноспособным по отношению к альдегиду комплексообразующим реагентом после обработки протеина метапериодатом натрия в водощелочном растворе в течение от 1 до 12 ч. Избыточный периодат удаляют диализом или высаливанием, а активированный протеин, имеющий прилегающие боковые альдегидные группы, образовавшиеся при окислении периодатом углеводных остатков с прилегающими коаксиальными 1,2-диольными остатками, конденсируют с гидразидным реагентом в течение 1 ч при комнатной температуре, получая в итоге полуконъюгат с боковыми комплексообразующими остатками фенолборной кислоты, ковалентно связанными с протеином связью типа основания Шиффа. Стабильность связи с протеином можно при желании повысить, восстанавливая основание Шиффа до соответствующего амина раствором NaCNBH_3 . Важно отметить, что окисление гликопротеина метапериодатом натрия активирует протеин для реакции с реагентом гидразидного типа, одновременно удаляя большинство образовавшихся естественным путем комплексообразующих остатков фенолборной кислоты (коаксиальных 1,2-диолов), ассоциированных с гликопротеинами.

Пример XXI. Приготовление фенолборнокислых комплексообразующих реагентов общей формулы XIX, реакционноспособных по отношению к тиолу.

На начальной стадии синтеза 1,2-бис-(2-иодозтоксид)этан конденсируют с N-гидроксифталимидом кипячением с обратным холодильником в диметилформамиде, содержащем 1 эквивалент триэтиламина, в течение 3 суток. Полученное вещество осаждают, вливая в воду, отфильтровывают, промывают водой, высушивают в вакуумном эксикаторе и используют без дальнейшей очистки.

На второй стадии синтеза полученный продукт обрабатывают избытком тиоацетата натрия в абсолютном этаноле и полученную желтую суспензию нагревают с обратным холодильником в течение 1 ч. Смесь охлаждают, фильтруют, концентрируют в вакууме и затем разделяют между этилацетатом и водой. Этилацетатные слои отмывают насыщенным водным раствором NaHCO_3 и водой, сушат над обезвоженным MgSO_4 и концентрируют в вакууме.

В третьей стадии синтеза полученный продукт недолго кипятят с обратным холодильником в смеси уксусной и концентрированной соляной кислот. После охлаждения выпавшую в осадок фталевую кислоту отфильтровывают, фильтрат концентрируют, и затем несколько раз выпаривают из небольшого количества воды для удаления следов кислот. Далее полученный аминоксигидрохлорид нейтрализуют NaHCO_3 , экстрагируют этилацетатом, высушивают над MgSO_4 и концентрируют в вакууме.

На четвертой стадии синтеза аминоксигидрохлорид конденсируют с

2-ацетоксибензоилхлоридом при перемешивании в дихлорметане, содержащем 1 эквивалент триэтиламина, в течение 1 ч при комнатной температуре, проверяя ход реакции с помощью ТСХ. Из раствора отфильтровывают

триэтиламмонийгидрохлорид, фильтрат промывают водой, сушат над обезвоженным $MgSO_4$ и концентрируют в вакууме.

На пятой стадии синтеза полученную 2-ацетоксибензогидроксиаминокислоту в абсолютном метаноле тщательно обезгаживают азотом, обрабатывают 1 эквивалентом обезвоженного K_2CO_3 и полученную желтую суспензию энергично перемешивают в течение 12 ч. Суспензию фильтруют и концентрируют в вакууме. Наконец,

маркапто-2-гидроксибензогидроксиаминокислоту обрабатывают раствором (метоксикарбонил)сульфенилхлорида в сухом обезгаженном метаноле, помешивая при $0^\circ C$ в течение 1 ч, после чего в вакууме удаляют метанол. Полученное вещество вновь растворяют в обезгаженном метаноле и обрабатывают одним эквивалентом 3-нитро-2-меркаптопиридина, помешивая, при комнатной температуре в течение 12 ч. Фильтрованием из смеси удаляют непрореагировавший 2-нитро-2-меркаптопиридин, и полученное вещество концентрируют в вакууме.

Пример XXII. Применение фенолборнокислого комплексобразующего реагента, реакционноспособного по отношению к тиолу.

Протеины, содержащие дисульфидные связи, могут быть конъюгированы с реакционноспособными по отношению к тиолу фенолборнокислыми реагентами. Вначале восстанавливают дисульфидные связи, используя реакцию с 2-меркаптоэтанолом или дитиотреитолом в тщательно обезгаженном водно-щелочном растворе. Избыток восстановителя удаляют диализом или высаливанием, а протеин вводят в реакцию с фенолборнокислыми реакционноспособными по отношению к тиолу реагентами в течение 1 ч при температуре $4^\circ C$, получая в итоге полуконъюгат с боковым остатком фенолборной кислоты, ковалентно связанным с протеином дисульфидными связями. Избыточные реагенты удаляют высаливанием или тиолообменной хроматографией. Комплексобразующие остатки фенолборной кислоты могут быть отщеплены от полуконъюгата путем восстановления дисульфидной связи, как это описано выше. Таким способом можно расщеплять биоконъюгаты, включающие полуконъюгаты, приготовленные из фенолборнокислых реакционноспособных по отношению к тиолу реагентов.

Пример XXIII. Приготовление фенолборнокислых комплексобразующих реагентов формулы XIX, реакционноспособных по отношению к амину.

На первой стадии синтеза 2-[2-(2-хлорэтокси)этокси]этанол конденсируют с N-гидроксифталимидом кипячением с обратным холодильником в диметилформамиде, содержащем один эквивалент триэтиламина, в течение 2 суток. Полученное вещество осаждают, вливая в воду, отфильтровывают, промывая водой,

высушивают в вакуумном эксикаторе и используют без дальнейшей очистки.

Во второй стадии синтеза полученный сырой продукт недолго кипятят с обратным холодильником в смеси уксусной и концентрированной соляной кислот. После охлаждения выпавшую в осадок фталевую кислоту отфильтровывают, фильтрат концентрируют и затем несколько раз выпаривают из небольшого количества воды для удаления следов кислот. Наконец, полученный аминоксигидрохлорид нейтрализуют $NaHCO_3$, экстрагируют этилацетатом, высушивают над $MgSO_4$ и концентрируют в вакууме.

На третьей стадии синтеза полученный аминоксигидрохлорид конденсируют с 1 эквивалентом 2-бензилоксибензоилхлорида при перемешивании в течение 1 ч при комнатной температуре в дихлорметане, содержащем 1 эквивалент триэтиламина, и проверяя ход реакции с помощью ТСХ. Триэтиламмонийгидрохлорид отфильтровывают, фильтрат промывают водой, сушат над обезвоженным $MgSO_4$ и концентрируют в вакууме.

На четвертой стадии синтеза полученную гидрокси-2-бензилоксибензогидроксиаминокислоту конденсируют с одним эквивалентом 2,2,2-трифторэтансульфонилхлорида при перемешивании в течение 1 ч в ацетонитриле, содержащем 1 эквивалент триэтиламина, при комнатной температуре.

Триэтиламмонийгидрохлорид отфильтровывают, фильтрат промывают водой, сушат над обезвоженным $MgSO_4$ и концентрируют в вакууме.

Наконец, каталитической гидрогенизацией с палладированным угольным катализатором в обезвоженном абсолютном этаноле в течение 8 ч удаляют защитную бензилоксигруппу. Катализатор отфильтровывают, и полученное вещество концентрируют в вакууме.

Пример XXIV. Применение фенолборнокислого комплексобразующего реагента, реакционноспособного по отношению к амину.

Протеины могут быть конъюгированы с комплексобразующим фенолборнокислым реакционноспособным по отношению к амину реагентом реакцией с ϵ -аминогруппами лизиновых остатков в боковой цепи для получения полуконъюгатов, имеющих боковые остатки фенолборной кислоты, ковалентно связанные с протеином стабильными сульфонамидными связями. Для отщепления водорода от аминогрупп следует использовать щелочные водные буферы, избегая тех из них, которые первичные амины, включая Трис и глицин, чтобы не допустить перекрестных реакций. Твердофазные подложки, имеющие боковые первичные аминогруппы, могут быть функционализированы реакцией с фенолборнокислыми комплексобразующими реагентами с получением в итоге твердофазных подложек с боковыми комплексобразующими остатками фенолборной кислоты.

Пример XXV. Приготовление фенолборнокислых комплексобразующих реагентов формулы XIX, реакционноспособных по отношению к олигонуклеотидам.

На первой стадии синтеза 2-[2-(2-хлорэтокси)этокси]этанол конденсируют с N-гидроксифталимидом кипячением с обратным холодильником в диметилформамиде, содержащем один эквивалент триэтиламина в течение 2 суток. Полученное вещество осаждают, вливая в воду, отфильтровывают, промывают водой, высушивают в вакуумном эксикаторе и используют без дальнейшей очистки.

На второй стадии синтеза полученный сырой продукт недолго кипятят с обратным холодильником в смеси уксусной и концентрированной соляной кислот. После охлаждения выпавшую в осадок фталевую кислоту отфильтровывают, фильтрат концентрируют и затем несколько раз выпаривают из небольшого количества воды для удаления следов кислот. Наконец, полученный аминоксигидрохлорид нейтрализуют NaHCO_3 , экстрагируют этилацетатом, высушивают над MgSO_4 и концентрируют в вакууме.

На третьей стадии синтеза полученный аминоксигидрохлорид конденсируют с 1 эквивалентом 2-бензилоксибензоилхлорида при перемешивании в течение 1 ч при комнатной температуре в дихлорметане, содержащем 1 эквивалент триэтиламина, проверяя ход реакции с помощью ТСХ. Триэтиламонийгидрохлорид отфильтровывают, фильтрат промывают водой, сушат над обезвоженным MgSO_4 и концентрируют в вакууме.

На четвертой стадии синтеза полученную гидрокси-2-бензилоксибензогидроксиаминокислоту конденсируют с одним эквивалентом 2-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидина при перемешивании в течение 1 ч в ацетонитриле, содержащем 1 эквивалент триэтиламина, при комнатной температуре. Триэтиламонийгидрохлорид отфильтровывают, фильтрат промывают водой, сушат над обезвоженным MgSO_4 и концентрируют в вакууме.

На пятой стадии синтеза полученный 2-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидин-2-ацетоксибензогидроксиаминокислоту растворяют в ацетонитриле, вносят во вспомогательный резервуар автоматического синтезатора олигонуклеотидов и конденсируют со свободными 5'-ОН окончаниями иммобилизованного синтетического олигонуклеотида, синтезируемого пиридин-каталитической реакцией с 2-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидиновым реагентом в ацетонитриле. Таким способом завершают синтез твердой фазы. На конечной стадии синтеза продукт отщепляют от стеклянной твердофазной подложки концентрированным гидроксидом аммония в течение ночи при 50-60 °С. Аммиачный лизис отщепляет вещество от твердофазной подложки, а также удаляет все ацильные защитные группы, включая ацетоксигруппу, ассоциированную с функциональной группой 2-ацетоксибензогидроксиаминокислоты. Полученное вещество концентрируют, удаляя аммиак в скоростном вакуумном аппарате, и затем очищают обратно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ).

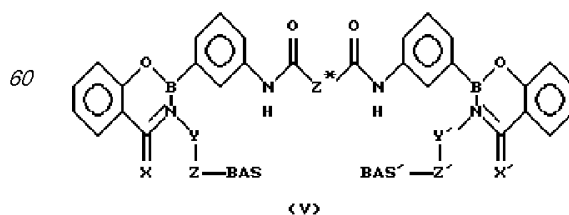
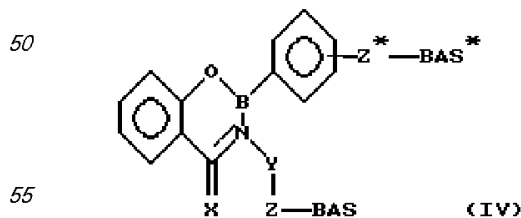
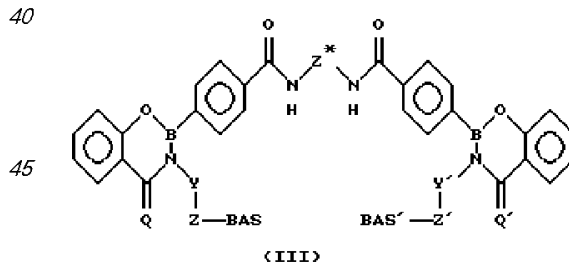
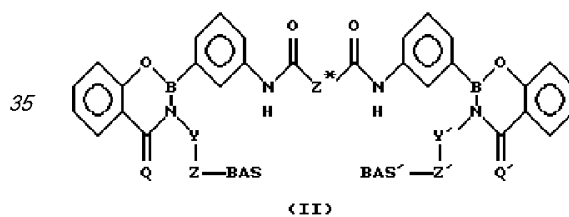
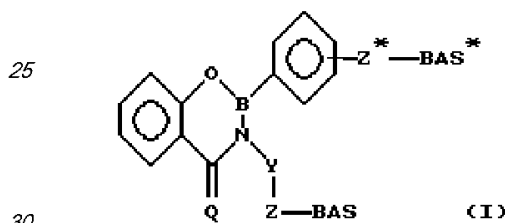
Пример XXVI. Применение фенолборнокислых комплексообразующих реагентов формулы XIX, реакционноспособных по отношению к олигонуклеотидам.

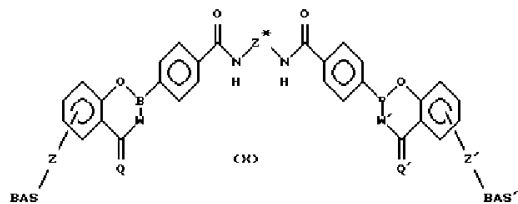
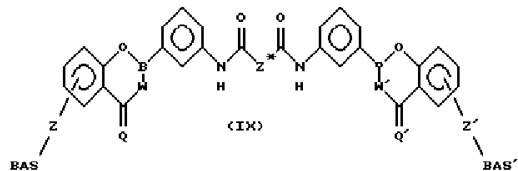
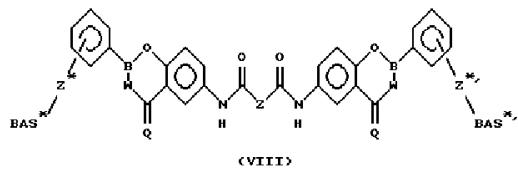
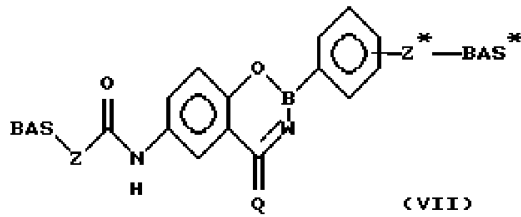
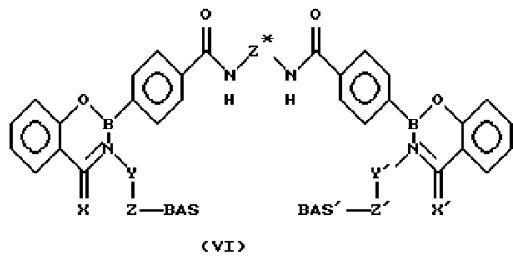
5 На завершающей стадии автоматического синтеза синтетические олигонуклеотиды могут быть конъюгированы с 2-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидиновыми фенолборнокислыми комплексообразующими реагентами с образованием в итоге синтетических олигонуклеотидов с 5'-боковыми комплексообразующими остатками фенолборной кислоты.

10 15 Ниже приведены экспериментальные данные, подтверждающие, что комплексообразующие конъюгаты фенолборной кислоты являются эффективными.

Формула изобретения:

20 1. Биоконъюгационные комплексы общей формулы (A)
 $\text{BAS-L-Bc-L}^1(\text{Bc}^1\text{-L}^n)_n\text{-BAS}$; (A)
 выбранные из формул (I) - (X)





где Q и Q' независимо выбраны из O, S, NH, N-алкила, N-арила и NCH₃-арила;

Y и Y' независимо один от другого выбраны из O, NH, N-алкила, алкила и арила;

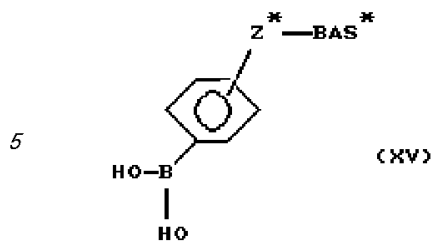
Z, Z', Z* и Z'' - спейсеры, независимо выбранные из алкильной или полиэфирной цепи, длина которой эквивалентна 1-16 атомам углерода и которая может содержать промежуточные амидные и дисульфидные связи;

BA3, BAS', BAS*, BAS'' - биоактивные ингредиенты, которые могут быть как одинаковы, так и различны;

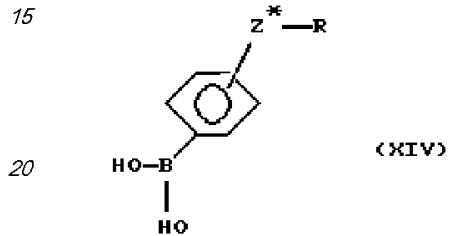
X и X' независимо выбраны из H, CH₃ и C₆H₅;

W и W' независимо выбраны из O, NH, N-алкила, NC₆H₅, N-арила, NCH₂-арила, NCH₂CH₂OH, NCOCH₂CH₂OH, NOH, NO-алкила и NOCH₂-арила, где, если не дано иного определения, алкил-углеводородный радикал вплоть до C₆, а арил-ароматическое кольцо, либо замещенное ароматическое кольцо, либо конденсированные ароматические кольца.

2. Способ получения биоконъюгационных комплексов согласно п.1, отличающийся тем, что для получения биоконъюгационных комплексов используют фенолборноокислые полуконъюгаты формулы (XV)

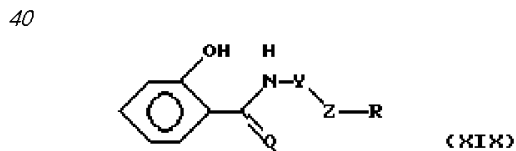
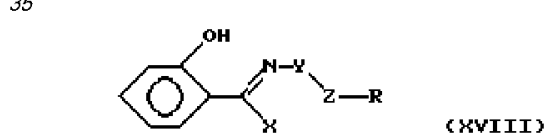
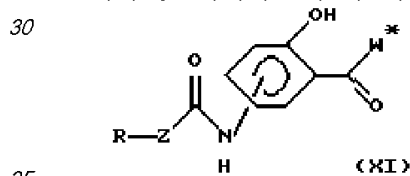


5 в которой Z* и BA3* определены в п.1.
3. Способ получения биоконъюгационных комплексов согласно п.1, отличающийся тем, что для получения биоконъюгационных комплексов используют фенолборноокислые реагенты формулы (XIV)



15 где Z* определен в п.1;
R - электрофильный или нуклеофильный остаток, способный вступать в реакцию с биоактивными ингредиентами.

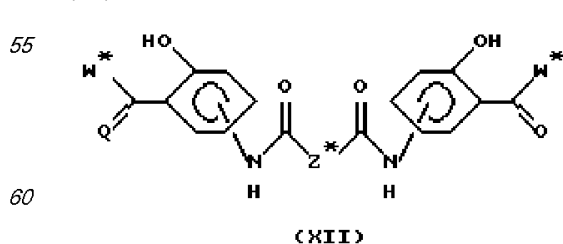
20 4. Фенолборноокислые комплексообразующие реагенты, выбранные из формулы (XI), (XVIII) и (XIX)



30 в которых Q, X, Y и Z определены в п.1;
W* выбран из группы, включающей H, OH, NH₂, NHCH₃, NHOH и NHOCH₃;

35 R - электрофильный или нуклеофильный остаток, способный вступать в реакцию с биоактивными ингредиентами.

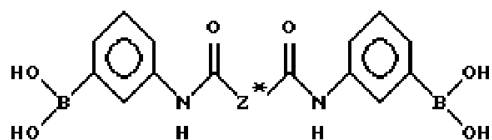
40 5. Фенолборноокислые поперечно-сшивающие реагенты формулы (XII)



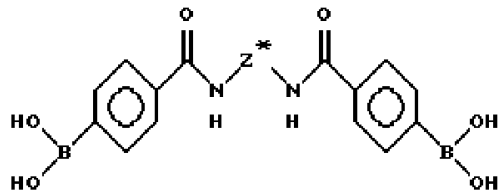
55 где Q и Z* определены в п.1;
W* определен в п.4.

60 6. Способ получения биоконъюгационных комплексов согласно п.1, отличающийся тем, что для получения биоконъюгационных

комплексов используют фенолборнокислые поперечно-сшивающие реагенты формулы (XVI) или (XVII)



(XVI)



(XVII)

где Z* определен в п.1.

7. Биоконъюгационные комплексы или полуконъюгаты по п. 1 или 2, отличающиеся тем, что по меньшей мере один из биоактивных ингредиентов является антителом.

8. Набор средств и система для выделения требуемой популяции клеток, содержащие биоконъюгат или полуконъюгат по п.7.

9. Способ выделения требуемой популяции клеток, включающий введение в контакт содержащего клетки средства с биоконъюгационным комплексом, в котором антитело распознает и связывается с эпитопом, характерным для требуемой популяции клеток, и отделение клеток от средства.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

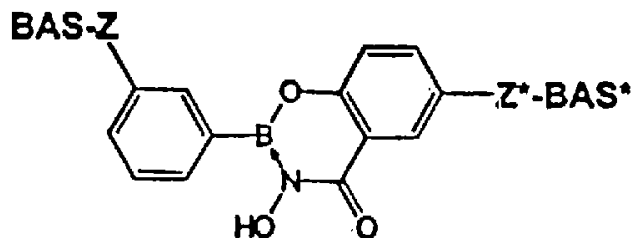
50

55

60

RU 2 2 0 2 5 5 5 C 2

RU ? 2 0 2 5 5 5 C 2



BAS	Z	Z'	BAS'	Замеч.
Флуоресцен		$-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_7\text{CO}-$	W6/32	MLS 3/31/94 RJK 6/7/93

W6/32

модифицировали эфиром метил-5-сукцинамидосалицилат-NHS и затем конвертировали до соответствующей гидроксамовой кислоты гидроксиамидом. Удаляли соли и затем проводили анализ содержания салицилгидроксамовой кислоты (SHA) посредством связывания Флуоресцен-аминоэтил-РВА (Флуоресцин-АЕ-РВА, полученный из аминоэтил-тиореидил-флуоресцен и NHS-эфир-РВА-сукцинамовой кислоты). Значение надлежащего связывания определяли спектрофотометрически. Значение надлежащего связывания определяли после удаления соли спектрофотометрически.

Флуоресцен			HSA	MLS 2/1-7/94
------------	--	--	-----	-----------------

HSA

функционализируют эфиром метил-5-сукцинамидосалицилат-NHS и конвертировали до соответствующей гидроксамовой кислоты гидроксиамидом. Удаляли соли и затем проводили анализ содержания салицилгидроксамовой кислоты (SHA) посредством связывания Флуоресцен-аминоэтил-РВА (Флуоресцин-АЕ-РВА, полученный из аминоэтил-тиореидил-флуоресцен и NHS-эфир-РВА-сукцинамовой кислоты). Значение надлежащего связывания определяли после удаления соли спектрофотометрически.

Карбокси-тетраметил-родамин				RJK 6/7/93
-----------------------------	--	--	--	---------------

Конъюгат карбокситетраметилродамин-РВА получали из эфира карбокситетраметилродамин-РВА и гидразида РВА-сукцинамовой кислоты в диметилформамиде (DMF). Выделение осуществляли посредством ЖХВР с обратной фазой.

Карбокси-Х-родамин				RJK 6/7/93
--------------------	--	--	--	---------------

Конъюгат карбокси-Х-родамин-РВА получали из эфира карбокси-Х-родамин-NHS и гидразида РВА-сукцинамовой кислоты в диметилформамиде. Выделение осуществляли с помощью ЖХВР с обратной фазой.