



(19) **UA** (11) **48 140** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **A 61K 41/00 A, A 61K 51/04 B**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 97020642, 30.06.1995
(24) Дата начала действия патента: 15.08.2002
(30) Приоритет: 14.07.1994 DE P 4424922.5
05.12.1994 DE P 4445078.8
(46) Дата публикации: 15.08.2002
(86) Заявка РСТ:
РСТ/EP95/02539, 19950630

(72) Изобретатель:
Динкельборг Лудгер, DE,
Хильгер Кристоф-Штефан, DE,
Нидбалла Ульрих, DE,
Платцек Йоханнес, DE,
Радюхель Бернд, DE,
Шпек Ульрих, DE,
Голд Ларри, US,
Пикен Вольфганг, DE
(73) Патентовладелец:
ШЕРИНГ АГ, DE,
НЕКСТАР ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК., US

(54) ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ КОНЬЮГАТЫ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С
МЕТАЛЛАМИ, СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ СТРУКТУРЫ-МИШЕНИ, СПОСОБ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ЗАБОЛЕВАНИЙ, ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ НАБОР

(57) Реферат:
Это изобретение относится к химически модифицированным олигонуклеотидным конъюгатам, которые содержат комплексообразующий агент или комплекс, который связан соединяющим компонентом с олигонуклеотидами. В этом случае, олигонуклеотиды модифицированы, что препятствует или, по крайней мере, существенно ингибирует деградацию встречающимися в природе нуклеазами. Олигонуклеотидный радикал может связываться специфически и с высоким

средством со структурами-мишенями и тем самым может производить специфическое терапевтическое и диагностическое действие посредством связанного комплексообразующего агента или комплекса.

Официальный бюллетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2002, N 8, 15.08.2002. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

U A 4 8 1 4 0 C 2

U A 4 8 1 4 0 C 2



(19) **UA** (11) **48 140** (13) **C2**
 (51) Int. Cl.⁷ **A 61K 41/00 A, A 61K 51/04 B**

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
 UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
 PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 97020642, 30.06.1995
 (24) Effective date for property rights: 15.08.2002
 (30) Priority: 14.07.1994 DE P 4424922.5
 05.12.1994 DE P 4445078.8
 (46) Publication date: 15.08.2002
 (86) PCT application:
 PCT/EP95/02539, 19950630

(72) Inventor:
 Dinkelborg Ludger, DE,
 Hilger Kristof-Stefan, DE,
 Nidballa Ulrich, DE,
 Platcek Johannes, DE,
 Raduchel Bernd, DE,
 Spec Ulrich, DE,
 Gold Larry, US,
 Plcen Wolfgang, DE
 (73) Proprietor:
 SHERING AG, DE,
 NECKSTAR PHARMACEUTICALS, INC., US

(54) **OLIGONUCLEOTIDE CONJUGATES PREPARED AS COMPLEXES WITH METALS, METHOD FOR ASSESSING TARGET STRUCTURE, METHOD FOR NONINVASIVE DIAGNOSIS OF DISEASES, DIAGNOSTIC KIT**

(57) Abstract:

This invention relates to chemically modified oligonucleotide conjugates that contain a complexing agent or complex that is bound by a connecting component to the oligonucleotides. In this case, the oligonucleotides are modified in a way that prevents or at least significantly inhibits the degradation by naturally occurring nucleases. The oligonucleotide radical can bond specifically and with high bonding affinity to

target structures and can thus produce a specific therapeutic or diagnostic effect by the bound complexing agent or complex.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2002, N 8, 15.08.2002. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

UA 48140 C2

UA 48140 C2



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **48 140** ⁽¹³⁾ **C2**
(51)МПК ⁷ **A 61K 41/00 A, A 61K 51/04 B**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
97020642, 30.06.1995

(24) Дата набуття чинності: 15.08.2002

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької конвенції : 14.07.1994 DE P 4424922.5
05.12.1994 DE P 4445078.8

(46) Публікація відомостей про видачу патенту (декларційного патенту): 15.08.2002

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки відповідно до договору РСТ:
PCT/EP95/02539, 19950630

(72) Винахідник(и):

Дінкельборг Лудгер , DE,
Хільгер Крістоф-Штефан , DE,
Нідбалла Ульріх , DE,
Платцек Йоханнес , DE,
Радюхель Бернд , DE,
Шпек Ульріх , DE,
Голд Ларрі , US,
Пікен Вольфганг , DE

(73) Власник(и):

ШЕРІНГ АГ, DE,
НЕКСТАР ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ІНК., US

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

(57) Реферат:

Винахід стосується хімічно модифікованих олігонуклеотидних кон'югатів, які містять комплексоутворюючий агент або комплекс, зв'язаний за допомогою сполучного компоненту з олігонуклеотидами. В цьому випадку олігонуклеотиди модифіковано таким чином, що

перешкоджає або по меншій мірі суттєво гальмує їхню деградацію природними нуклеазами. Олігонуклеотидний радикал може специфічно і з високою афінністю взаємодіяти з відповідними мішенями, завдяки чому може реалізовуватись дія зв'язаного комплексоутворювача або комплексу.

U A 4 8 1 4 0 C 2

U A 4 8 1 4 0 C 2

Опис винаходу

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

Визуальная диагностика достигла большого прогресса за последние десятилетия и продолжает непрерывно развиваться. Сегодня возможно сделать видимой сосудистую систему, большинство органов и многие ткани в живом организме без особого вмешательства. Во многих случаях диагностику заболевания проводят по 10 изменениям формы, размера и положения анатомических структур в теле. Такие анатомические данные о состоянии внутренних органов тела можно получить с помощью рентгеновской техники, ультразвуковой диагностики и магнитной резонансной томографии. Эффективность каждой из упомянутых техник может быть 15 повышена путем использования фармацевтических средств для повышения естественного контраста тканей и жидкостей тела на получающейся картине. Фармацевтические средства, о которых идет речь, вводят в полости тела или инъецируют в кровеносные сосуды с целью контрастного изменения полостей или сосудов. Кроме того, они распространяются с помощью кровотока в организме и могут изменять видимость органов и тканей. В 20 исключительных случаях, такие вещества связываются с определенными структурами в теле и/или активно транспортируются и/или экс-кретируются (выделяются) последними. Таким путем, в индивидуальных случаях функции могут быть также сделаны видимыми и могут быть использованы для диагностики заболеваний.

В противоположность этому, ядерная диагностика основана на веществах, которые могут сами по себе 25 делаться видимыми. В этом случае радиоактивные изотопы, которые излучают радиацию в большом диапазоне, вводят в организм. Распространение этих веществ в организме можно проследить с помощью подходящих детекторов. Преимущество ядерного медицинского способа заключается в высокой эффективности при низкой дозе посылающих сигнал радиоактивных веществ, обозначаемых как радиофармацевтические средства.

Если используют изотопы, которые выделяют А- или В-излучение или другие токсичные продукты 30 разложения, эффективные в ткани, то радиофармацевтические средства могут быть также использованы для терапевтических целей, например, для деструкции опухолей. Такого же эффекта можно достигнуть тем, что неопасные изотопы или вещества вводят в организм и превращают только там путем, например, облучения нейтронами или рентгеновскими лучами, ультразвуком или радиоволнами, в терапевтически эффективную форму.

Общая проблема заключается в диагностике и локализации патологических изменений за имеющееся в 35 распоряжении время, при котором нет ясных изменений формы, строения и кровообращения в органах и тканях, о которых идет речь. Такая диагностика и постоянное наблюдение имеет важное значение, например, в случае опухолевых заболеваний, включая поиск метастаз, оценку дефицита снабжения тканей кислородом, и в случае некоторых инфекций, и также метаболических заболеваний.

В настоящее время имеющиеся терапевтические и визуализирующие диагностические методы значительно 40 зависят от доступности фармацевтических препаратов, которые аккумулируются в местах патологических нарушений, которые невозможно определить другим путем.

Контрастными средами, коммерчески доступными в данное время, преимущественно являются так 45 называемые неспецифические препараты. Они пассивно распространяются в пространствах, в которые их вводят, например, путем инъекции.

В прошлом были идентифицированы многие вещества и классы веществ, которые могут проявлять 50 специфичность или, как можно предположить, имеют специфичность в отношении их распространения в живом организме. Таким примерами, помимо антител, лектинов, являются все типы рецептор-связанных веществ, клетки, мембраны и компоненты мембран, нуклеиновые кислоты, природные метаболиты и их производные, а также большое количество фармацевтических веществ. Пептиды изучались и также подлежат исследованию с особым вниманием.

В Пат. США №4707352 рассматривается специальный способ маркировки комплексообразующих молекул 55 радиоактивными изотопами, но не описаны приемлемые комплексообразующие агенты для связывания ионов металла.

В EP-A-0285057 раскрываются конъюгаты-нуклеотид-комплексообразующий агент, которые не пригодны 60 из-за *In vivo* нестабильности используемых нуклеотидов в качестве *In vivo* диагностических или терапевтических средств и которые, кроме того, с трудом удовлетворяют другим требованиям совместимости и фармакокинетики.

Во многих патентах США, таких как, например, Пат. США 4707440, речь идет о модифицированных 65 полимерах, которые имеют определенную химическую группу. Полимеры могут представлять собой полинуклеотиды и олигонуклеотиды, но они ни стабилизированы против деградации встречающимися в природе нуклеазами, ни отобраны специальным способом, для этого их специфически связывают с высоким связующим средством со структурами-мишенями. Конкретные варианты воплощения этих детектируемых молекул упоминаются в Пат. США №2843122 и 4943523. Индивидуальный нуклеотид, модифицированный таким путем, заявлен в Пат. США №4952685. Использование этих средств в способах визуализации раскрывается в Пат. США 4849208.

Целью данного изобретения является получение специфически связывающихся диагностических средств 65 для обнаружения структур-мишеней, с помощью которых, например, становится возможным визуализация органов, тканей и их патологических изменений *In vitro* и *In vivo*.

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

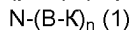
Целью изобретения являются:

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

- превращаются в радиоактивные изотопы при помощи внешнего облучения,

- превращают внешнее облучение в облучение различного качества, различного энергетического содержания и/или различной длины волны, элементов под атомными номерами 5, 21 - 29, 31, 39, 42 - 44, 49, 57 - 33 или 85, при этом олигонуклеотидный радикал N представляет модификацию, которая предотвращает или, по крайней мере, значительно ингибирует деградацию имеющимися в природе нуклеазами.

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



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

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

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

n - целое число от 1 до 10.

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

а) 2'-положение сахаридного звена, независимо одно от другого, занято следующими группами:

группа OR, в которой

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

атом водорода,

гидроксильная группа,

атом фтора,

аминовый радикал,

аминовая группа,

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

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

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

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

е) он содержит фосфодизфирную связь, описанную в б), которая соединяет, подобно сложноэфирной, два тимидина при помощи C₂-C₂₀ гидроксисахаридного радикала соответственно в 3-положении или соединяет аналогично замещенный тимидиновый радикал, подобно сложноэфирной, с гидроксильной группой другого сахара в 2' или 3'- или 5'-положении и/или

ф) концевые радикалы в 3'- и 5'-положениях содержат межнуклеотидные связи, произвольно модифицированные как описано в б).

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

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

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

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

содержит статистическую последовательность,

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

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

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

е) эти структура-мишень-специфические РНК олигонуклеотиды подвергают транскрибированию с помощью обратной транскриптазы в комплементарную ДНК цепь, и тем, что

ф) эти ДНК цепи амплифицируют полимеразно-цепной реакцией с использованием определенных праймерных последовательностей, и тем, что

g) ДНК олигонуклеотиды, амплифированные таким путем, затем подвергают транскрибированию снова с помощью РНК-полимеразы и модифицированных нуклеотидов в РНК-олигонуклеотиды, и тем, что

h) вышеупомянутые стадии отбора с) - g) произвольно повторяют до тех пор, пока олигонуклеотиды, которые отличаются высоким связывающим сродством к структуре-мишени, не будут достаточно отобраны, и тогда последовательности полученного таким путем олигонуклеотида произвольно могут быть способными к определению.

7. Соединение по п.б, в котором структуру-мишень выбирают среди макромолекул, тканевых структур высших организмов, таких как животные или люди, органы или части органов животного или человека, клетки, опухолевые клетки или опухоли.

8. Соединение по п.п.1 - 7, в котором соединяющий компонент(ы) В связан (связаны):

a) с 4'-концом олигонуклеотидного радикала N, уменьшенном в 4'-положении на $\text{CH}_2\text{-OH}$ группу и/или

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

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

d) с 1 до 10 нуклеоснованием(ями), которое(ые) уменьшено на атом водорода, соответственно, в 5-, 3-положении(ях) и/или на амино группу(ы) в 2-, 4- и 6-положении(ях).

9. Соединение по п.п.8a) или 8b), в котором В имеет общую формулу X-Y-Z^1 , который по X стороне связан с комплексообразующим агентом или комплексом и по Z стороне связан с олигонуклеотидом, в котором:

X обозначает непосредственную связь, -NH или -S группу,

Y обозначает неразветвленную-цепную, разветвленную-цепную, насыщенную или ненасыщенную $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ алкиленовую цепь, которая произвольно содержит 1 - 2 циклогексилен, 1 - 5 имино, 1 - 3 фенилен, 1 - 3 фениленимино, 1 - 3 фениленокси, 1 - 3 гидроксифенилен, 1 - 5 амиде, 1 - 2 гидразидо, 1 - 5 карбонил, 1 - 5 этиленокси, уреидо, тиоуреидо, 1 - 2 карбоксиалкилимино, 1 - 2 сложно-эфирные группы,

1 - 3 группы Ar, в которых Ar обозначает насыщенное или ненасыщенное 5- или 6-членное кольцо, которое произвольно содержит 1 - 2 гетероатома, выбранные из азота, кислорода и серы и/или 1 - 2 карбонильные группы; 1 - 10 атомов кислорода, 1 - 5 атомов азота и/или 1 - 5 атомов серы, и/или произвольно замещена 1 - 5 гидрокси, 1 - 2 меркапто, 1 - 5 оксо, 1 - 5 тиоксо, 1 - 3 карбокси, 1 - 5 карбокси- $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкильными, 1 - 5 сложноэфирными, 1 - 3 amino, 1 - 3 гидрокси- $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкильными, 1 - 3 $\text{C}_1\text{-C}_7$ алкокси группами, и

Z^1 обозначает $-\text{CONH-CH}_2\text{-4}'$, $-\text{NH-CO-4}'$, $-\text{O-P(O)R}'\text{-NH-CH}_2\text{-4}'$, $-\text{O-P(O)R}'\text{-O-CH}_2\text{-4}'$, $-\text{O-P(S)R}'\text{-O-3}'$, или $-\text{O-P(O)R}'\text{-O-3}'$, где 4' или 3' указывают на связь с концевым сахарид-ным звеном(ями) и R' обозначает O-, S-, $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкильную или NR^2R^3 группу, причем R^2 и R^3 обозначают водород и $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкильные радикалы.

В качестве циклических структур (Ar), особенно пригодными являются циклические насыщенные или ненасыщенные алкилены с 3 до 6, особенно 5 или 6 с атомами, которые произвольно содержат гетероатоми, такие как N, S или O. В качестве примеров могут быть упомянуты: циклопентилен-, пирролиллен-, фураниллен-, тиофенилен-, имидазолиллен-, тиазолиллен-, пирозолиллен-, пирролидиллен-, пиридиллен-, пиримидиллен-, малеинимидиллен- и фталиимидилленовые группы.

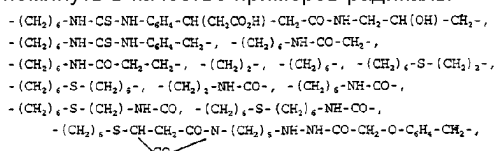
10. Соединение по п.8с), в котором В имеет общую формулу X-Y-Z^2 , который связан по X стороне с комплексообразующим агентом или комплексом и по Z стороне с олигонуклеотидом, в котором:

Z^2 , в мостике, связывающем два соседних сахаридных звена,



обозначает группу $-\text{NH}_2$ -, $-\text{O-}$ или $-\text{S-}$, и X, Y и R^2 имеют значения, указанные в пункте 9.

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



эксонуклеазами. Реакция дегградации в РНК ряде начинается с активации 2-гидроксн группы. Другнми катаболнтческнми ферментами являются, например, рнбознмы, которые расщепляют фосфоднэфнрную связь RNS (смотри Science 261, 709 (1993)). In vivo стабнльность RNS производных можно увеличнт частнчным нлн полным замещеннем 2-гндрокснльной группы другими заместнтелями. Такнми заместнтелями являются, например, алкоксн группы, особенно метоксн группа (смотри, например, Chem. Pharm. Bull. 13, 1273 (1965), Blochemlstry 10, 2581 (1971), атом водорода, атом фтора (смотри, например, Can. J. Chem. 46, 1131 (1986) нлн аамно группа (смотри, например, J. Org. Chem. 42, 714 (1977)). Некотрые нз этнх заместнтелей, а также другие, могут бьть введены в 2'-положенне, нспользуя способы, раскрываемые в заявке на Пат. США Сер. №08/264029, поданной 22 июня 1994. Другне возмозности для стабнлнзации межднуклеотндной связн заклучаются в замещеннн одного нлн двух, атомов кнслорода в фосфоднэфнрном мостнке при образованнн фосфотноатов (Trends Blochem. Sci. 14, 97 (1989)) нлн фофсфороднтноатов (J. Chem. Soc., Chem. Commun. 591 (1993) н Nuclelc Aclds Res. 12, 9095 (1984) н в нспользованнн алкнлфосфонатов вместо фосфоднэфнров. (Ann. Rep. N.Y. Acad. Sci. 507, 220 (1988)).

Стабнлнзация может бьть достнгута, когда гндрокснльные группы в 2'-положеннн рнбозных звеньев, независнмо друг от друга, моднфнцнрованы. Такую моднфнцацию можно обеспечнт замещеннем этой гндрокснльной группы OR группой, атомом галоида, особенно атомом фтора, атомом водорода нлн аамнонвым раднкалом, особенно аамно группой. Раднкал R алкоксн группы обозначает в этом случае неразветвленнй-цепной нлн разветвленнй-цепной алкнльный раднкал с 1 - 20 С атомами, такой как метнл, этнл, пропнл, нзопропнл, бутнл, трет-бутнл, пентнл нлн гекснл нлн циклнческнй незамещеннй нлн замещеннй алкнльный раднкал с 4 - 20 С атомами, такой как циклопентнл нлн циклогекснл, которые произвольно содержат 1 - 2 гндроксн группы, н произвольно прерываются 1 - 5 атомами кнслорода. Стабнлнзация также повышается, так как присутствующие гндрокснльные группы в 3'- н 5'-положенннх произвольно этернфнцнрованы.

Другая (возмозность стабнлнзации) стабнлнзация полннуклеотнда достнгается тем, что фосфоднэфнры, подлежащие нспользованню в качестве межднуклеотндной связн, замещают частнчно нлн полностью, н независнмо друг от друга, фосфоротноатами, фосфороднтноатами нлн алкнлфосфонатами, особенно предпочнтельнн низшнми алкнлфосфонатами, такнми как, например, метнлфосфонат. Этн межднуклеотндные связн могут бьть также связаны с концевнми раднкалами в 3'- н 5'-положенннх нлн же также могут соединять 3'-3'- нлн 5'-5'-положеннн. Фосфоднэфнрная связь делает возмозным дополнтельное связыванне гндрокснлалкнльными раднкалами, которые присутствуют при азотных нлн углеродных атомах нуклеоснованнй, так, например, два тнмнднна могут бьть связаны гндрокснлалкнльными цепями, присутствующнми в 3 положеннн нлн два пурнновыx основаннн раднкалами, присутствующнми в 8-положенннх. Связыванне может также происходнт с гндрокснльными группами в 2'- нлн 3'- нлн 5'-положеннн.

Моднфнцнрованные межднуклеотндные связн могут необязательно нметь место предпочнтельнн на концах полннуклеотнда, н онн особенно предпочнтельнн связывают с тнмнднном.

Согласно данному нзобретенню, нспользуемые олнгонуклеотндные раднкалы N не ограничиваются специфнческнми олнгонуклеотндными последовательностями. Но предпочнтельннми являются те олнгонуклеотнды, которые специфнчески связываются с высокнм связывающнм сродством со структурами-мншенями, за нсключеннем нуклеиновой кнслоты.

Способ ндентнфнкации подхожднх олнгонуклеотндов, которые требуются в качестве нсходных веществ для конъюгатов предлагаемого нзобретеннн, описан в Пат. США 5270163. Этот способ, названнй SELEX, может бьть нспользован для того, чтобы получнт лнгант нуклеиновой кнслоты для любой требуемой молекулы-мншенн.

SELEX способ включает отбор нз смесн кандндатов-олнгонуклеотндов н ступенчатые нтерации связываннн, разделеннн н амплнфнкации, нспользуя одну н ту же общую схему отбора для того, чтобы достнчь фактнчески требуемого критернн связывающего сродства н селекнтвностн. Исходя нз смесн нуклеиновыx кнслот, предпочнтельнн включающей сегмент статнстнческой последовательностн, SELEX способ включает стаднн контактнрованнн смесн с мншенью в условннх, благопрнятных для связываннн, разделеннн несвязанных нуклеиновыx кнслот от тех нуклеиновыx кнслот, которые специфнчески связались с молекулами-мншенями, днссоцнации комплексов нуклеиновая кнслота-мншень, амплнфнкации нуклеиновыx кнслот, днссоцнрованных нз комплексов нуклеиновая кнслота-мншень, с полученнем лнгант-обогащенной смесн нуклеиновыx кнслот, затем повторная нтерация стаднй связываннн, разделеннн, днссоцнации н амплнфнкации с таким количеством циклов, сколько требуется для того, чтобы получнт высокн специфнческне, лнганды с высокнм сродством нуклеиновой кнслоты к молекуле-мншенн.

Основной SELEX способ был моднфнцнрован, чтобы достнчь ряда конкретных целей. Например, заявка на Пат. США Сер. №07/960093, поданная 14 октября 1992, раскрывает нспользованне SELEX в конъюгации при электрофорезе в геле для отбора молекул нуклеиновой кнслоты со специфнческнми структурнми характеристнками, такую как нзогнутая ДНК. Заявка на Пат. США Сер. №08/123935, поданная 17 сентября 1993, раскрывает способ на основе SELEX для селекцнн лнгандов нуклеиновой кнслоты, содержащих фотореакцнонноспособные группы, способные к связыванню н/нлн фотосшнванню с молекулой-мншенью н/нлн способных фотоинактнвнроваться молекулой-мншенью. Заявка на Пат. США Сер. №08/134028, поданная 7 октября 1993, раскрывает способ ндентнфнкации высокоспецнфнческнх лнгандов нуклеиновой кнслоты, способных различать близкородственные молекулы, получнвшн название Couter-SELEX. Заявка на Пат. США Сер. №08/143564, поданная 25 октября 1993, раскрывает способ на основе SELEX, который обеспечнвает достаточно высокне разделенне между олнгонуклеотндами, нмеющнми высокне нлн низкне сродство к

молекулам-мишеням. Заявка на Пат. США Сер. №07/964624, поданная 21 октября 1992, раскрывает способы получения улучшенных лигандов нуклеиновой кислоты после проведения SELEX. Заявка на Пат. США Сер. №08/400440, поданная 8 марта 1995, раскрывает способы ковалентного связывания лиганда с его мишенью.

5 SELEX способ охватывает идентификацию лигандов нуклеиновой кислоты с высоким сродством, содержащих модифицированные нуклеотиды, придающие улучшенные характеристики лиганду, такие как повышенная *In vivo* стабильность или улучшенные характеристики доставки. К примерам таких модификаций относятся химические замещения на рибозном заместителе и/или фосфатном и/или основном заместителе. SELEX-идентифицированные лиганды нуклеиновой кислоты, содержащие модифицированные нуклеотиды, 10 раскрываются в заявке на Пат. США Сер. №08/117991, поданной 8 сентября 1993, которая описывает олигонуклеотиды, содержащие производные нуклеотида, химически модифицированные в 5- и 2'-положениях пиримидинов. В заявке на Пат. США Сер. №08/134028, указано выше, раскрываются высокоспецифичные лиганды нуклеиновой кислоты, содержащие один или более нуклеотидов, модифицированных 2'-амино (2-NH₂), 2-фторо (2'-F), и/или 2'-О-метилом (2'-OMe). В заявке на Пат. США Сер. №08/264029, поданной 22 июня 15 1994, раскрываются олигонуклеотиды, содержащие различные 2-модифицированные пиримидины.

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

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

1) Получают смесь нуклеиновых кислот различной последовательности. Смесь обычно включает области фиксированных последовательностей (т.е., каждый из представителей смеси содержит одни и те же последовательности в одном и том же месте расположения) и области статистических последовательностей. 25 Области фиксированных последовательностей выбирают либо: (а) чтобы помогать в стадиях амплификации, описанных ниже, (b) чтобы имитировать известную последовательность, которая связывается с мишенью, либо увеличить концентрацию данного структурного расположения (порядка чередования) нуклеиновых кислот в смеси. Статистические последовательности могут быть статистическими полностью (то есть вероятность нахождения основания в любой позиции составляет одну четвертую) или только частично статистическими (например, вероятность нахождения основания в любой позиции может быть выбрана на любом уровне между 0 и 100 процентами).

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

3) Нуклеиновые кислоты с самым сильным сродством к мишени отделяют от нуклеиновых кислот с меньшим сродством к мишени. Из-за того, что в смеси-кандидате существует лишь чрезвычайно малое число последовательностей (и возможно только одна молекула нуклеиновой кислоты), соответствующих нуклеиновым кислотам с самым высоким сродством, обычно желательно установить критерии разделения такие, что 40 существенное количество нуклеиновых кислот в смеси-кандидате (приблизительно 5 - 50%) сохраняется во время разделения.

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

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

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

Молекулы-мишени являются предпочтительно белками, но могут также включать, среди других, карбогидраты, пептидогликаны и ряд небольших молекул. Как и в случае белковых антител, антитела нуклеиновых кислот (олигонуклеотидные лиганды) могут быть применены для торпедирования биологических структур, таких как поверхности клеток или вирусы, посредством специфического взаимодействия с молекулой, которая является неотъемлемой частью той биологической структуры. Олигонуклеотидные лиганды выгодны тем, что они не ограничены собственной толерантностью, как обычные антитела. Кроме того, антитела нуклеиновых кислот не требуют животных и клеточных культур для синтеза или получения, поскольку SELEX есть полностью *In vitro* способ. Известно, нуклеиновые кислоты могут связываться с комплементарными последовательностями нуклеиновых кислот. Это свойство нуклеиновых кислот широко используют для 65

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Затем олигонуклеотидные молекулы отделяют от молекул-мишеней или удаляют промыванием

соответствующими буферами или растворителями.

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

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

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

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

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

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

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

Олигонуклеотидный радикал N может (содержать) один или более соединяющих компонентов В, или заместителей В-К, которые могут быть выбраны независимо один от другого. Здесь же заявлены олигонуклеотидные конъюгаты, которые содержат от 1 до 10 идентичных или от 210 различных соединяющих компонентов В. Особенно предпочтительны олигонуклеотидные конъюгаты с одним или двумя соединяющими компонентами В.

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

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

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

1,4,7,10-тетраазациклододекантетрауксусная кислота,

1,4,7-триазациклононтриуксусная кислота,

1,4,8,11-тетраазатетрадекантетрауксусная кислота,

1,5,9-триазациклододекантриуксусная кислота,

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

3,6,9,15-тетразабицикло-[9,3,1]-пентадека-1(15),11,13-триэтриуксусная кислота.

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

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

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

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

Для использования соединения согласно изобретению в качестве радиофармацевтического средства комплексообразующий агент содержит радиоактивный элемент. Для этой цели пригодны все радиоактивные элементы, которые способны оказывать терапевтическое или диагностическое действие *In vivo* или *In vitro*.

Предпочтительными являются радиоактивные изотопы элементов меди, висмута, технеция, рения или индия. Особенно предпочтительны ^{99m}Tc -комплексы.

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

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

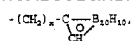
Соединения согласно изобретению могут быть использованы также в радиотерапии в виде их комплексов с радиоизотопами, такими как, например, Ir-192.

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

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

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

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



в которой X обозначает целое число от 1 до 10.

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

Так, конъюгаты, в которых соединяющий компонент В связан на 5'-конце олигонуклеотида, можно получить путем взаимодействия олигонуклеотида с фосфорамидитным производным (Tetrahedron 49, 1925 - 1963 (1993)). По этому концу 5'-гидрокси группа олигонуклеотида подвергается взаимодействию с фосфорамидитом общей формулы $\text{PR}'(\text{NR}_2)\text{OR}''$. В этом случае R' обозначает алкильную, алкокси или арилалкокси группу, произвольно содержащую N, NO₂, SI или SO₂, с 1 до 20 C атомов, такую как метил, этил, пропил, бутил, пентил, гексил, метокси, этокси, пропилокси, бутилокси, бензилокси или фенилэтокси, которая произвольно может быть замещена. В качестве заместителей особенно используют циано и нитро группы. Преимущественно, могут быть, например, использованы метокси, В-цианэтокси или нитрофенилэтокси группы. Особенно предпочтительны В-цианэтокси группы. R'' является C₁-C₂ алкильным радикалом, и особенно предпочтительными являются этильный и пропильный радикалы. R''' представляет алкильную или арилалкильную группу, произвольно содержащую S, O, N, CN, NO₂ или галоид, с 1 до 20 C атомов. Предпочтительно используют защищенные аминокислоты и тиоалкильные радикалы, а также защищенные аминокислоты и тиоалкильные радикалы. Особенно предпочтительными являются 6-амино-гексил, 6-тиогексил, 3,6,9-триокса-11-амино-ундецил и 3,6-диокса-8-амино-октанильные группы. В качестве защитных групп обычно можно использовать обыкновенную N- или S-защитную группу. Например, подходящими являются трифторацетил, фталимидо и монометокситритильные группы.

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

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

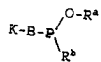
В другом варианте воплощения данного изобретения соединяющий компонент В связан на 3'-конце олигонуклеотида N путем, аналогичным пути, описанном выше, при помощи фосфорсодержащей группы.

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

олигонуклеотиде, затем образует, вместе с произвольно присутствующей дополнительной линкерной группой, соединяющий компонент В.

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

а)



где:

R^a обозначает C_1 - C_6 алкильный радикал, который произвольно несет циано группу в В-положении,

R^b обозначает вторичную амино группу и

К и В имеют указанное значение,

или формулой

б)



где

R^c обозначает катион триалкиламмоний и К и В имеют упомянутое значение,

или формулой

в)



где

R^d обозначает арильный радикал, произвольно замещенный одним или более атомами галоида и/или одной или более нитро группами, или C_1 - C_6 алкильный радикал, который произвольно замещен в В-положении циано группой, и К, В и R^c имеют упомянутое значение, и при использовании радикала формулы а) стадия окисления в фосфат имеет место после завершения реакции связывания. В обоих случаях радикал $-\text{OR}^a$ или $-\text{OR}^c$ произвольно может быть отщеплен при гидролизе.

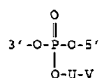
Связывание олигонуклеотидного производного с помощью линкера с комплексообразующим агентом или комплексом может также происходить на твердой фазе на колонке автоматического синтезатора. Соединение согласно изобретению может быть затем отделено от твердого носителя путем разделения.

Сцепление олигонуклеотидного производного с линкером может иметь место не только при помощи 5'-ОН группы сахара концевого нуклеотида, но также при помощи других функциональных групп, которые могут быть генерированы из 5'-ОН группы, таких как, например, amino или карбокси группа. Такие нуклеотиды, несущие amino или карбокси группы, известны и могут быть легко получены. Синтез 5'-дезоксидеокси-5'-аминоуридина описан в J. Med. Chem. 22, 1273 (1979), а также в Chem. Lett. 6, 601 (1976). 4'-Карбокси-5'-дезоксидеоксиуридин доступен, как описано в J. Med. Chem. 21, 1141, (1978), или Nucleic Acids Symp. Ser. 9, 95, (1981).

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

Следует отметить, что распределение конъюгатов согласно изобретению в нуклеотидном радикале, соединяющем компоненте и комплексообразующем агенте или комплексе происходит исключительно формально и поэтому независимо от действительной синтетической структуры. Так, например, в вышеупомянутом случае группа $-\text{NH}-\text{CH}_2-4'$ или $-\text{CO}-4'$ рассматривается как принадлежащая соединяющему компоненту В, в то время как олигонуклеотид, уменьшенный в 4-положении на CH_2-OH группу, обозначают как олигонуклеотидный радикал N.

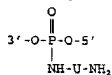
Способ получения конъюгатов, в которых соединяющий компонент с фосфордиэфирным или фосфоротиоатным мостиками, уменьшенными на ОН группы, имеет место, состоит в том, что сначала две сахаридные единицы связывают с динуклеотидом (смотри, например, Chem. Lett. 1305 (1933)). В этом случае сначала получается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



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

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

Полученные таким образом соединения формулы



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

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

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

Альтернативный способ связывания с помощью нуклеоснований заключается в палладий-катализируемом связывании бром или йод нуклеоснований с функциональными радикалами (*Biogenic and Medical Chemistry Letter* V, 361 (1994)). При помощи этих функциональных радикалов комплексообразующий агент может быть затем произвольно связан с нуклеоснованием посредством другого линкера согласно известным способам. В качестве функциональных радикалов в 5-положении пиримидина и в 8-положении пурина, могут быть упомянуты в качестве примеров акриловый сложный эфир или аллиламин (смотри *Nucl. Acids Res.* 14, 6115 (1986) и *Nucl. Acids Res.* 16, 4077 (1988)). Другой альтернативный способ получения в 5-положении модифицированных пиримидинов, особенно для введения функциональных групп, таких как карбонильная, алкенильная или арильная группы в 5-положении, и улучшенный палладиевый катализатор, способный связывать модифицированные группы в 5-положении пиримидинов, описан в заявке на Пат. США Сер. №08/076735, поданной 14 июня 1993. Галоидные производные, используемые в качестве предшественника, могут быть получены, как описано в *Biophys. J.* 44, 201 (1983), *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1242 (1964) или *Chem. Commun.* 17 (1967).

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

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

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

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

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

При *In vivo* использовании в медицине, меченые соединения обычно дозируют в количествах меньших, чем 10-10ммоль/кг веса тела, и точную дозу можно широко варьировать как функцию области тела, подлежащей исследованию, но особенно также как функцию соответственно выбранного способа исследования. Исходя из среднего веса тела 70кг, количество радиоактивности для диагностических применений находится между 40 и 1100МБк, предпочтительно 200 - 800МБк, для терапевтических применений - 1 - 500МБк, предпочтительно 10 -

100МБк на применение. Введение обычно проводят внутривенно, внутриартериально, внутритканево, перитонеально или внутрь опухоли, и внутривенное введение является предпочтительным. В общем, вводят на исследование от 0,01 до 20мл агента, о котором идет речь.

Данное изобретение относится также к способу обнаружения структур-мишеней. В этом случае, одно или более из вышеописанных соединений контактирует с образцом, подлежащим изучению *In vivo* или *In vitro*. В этом случае, олигонуклеотидный радикал N связывается специфически и с высоким связывающим сродством со структурой-мишенью, подлежащей обнаружению.

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

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

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

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

Краткое описание фигур.

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

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

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

Следующие примеры приведены для более подробной иллюстрации изобретения.

Полинуклеотиды, описанные в примерах, содержат модифицированные соединения.

Они означают:

A, U, C, G	нуклеотиды содержат 2'-OCH ₃ группу
*	нуклеотидная связь - метил фосфонат
**	нуклеотидная связь - тиофосфонат
***	нуклеотидная связь - дитиофосфонат

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

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

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

Пример 1

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

5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAAT*T*T*T-3'

30-мерный олигонуклеотид

5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUA -3', идентифицированный по SELEX способом, с модификацией последовательности T*T*T*T-3', расположенной против хода транскрипции, получают обычным путем в автоматическом синтезаторе Pharmacia company (смотри Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed. F. Eckstein, Oxford University Press. Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид также присутствует на колонке твердого носителя. Путем реакции с раствором трихлоруксусной кислоты в дихлорметане открывают 5'-гидрокси группу. Нагрузка колонки составляет около 10мг 35-мерного-олигонуклеотида. Чтобы соединить линкер, колонку подвергают взаимодействию с ацетонитрильным раствором 50мкмоль

В-циано-этил-N,N-диизопропиламино-6-(трифторацетиламино)-1-гексил-фосфорамидита (полученного согласно Nucl. Acids Res. 16, 2659 - 2669 (1988)) в присутствии тетразола. Окисление образовавшегося фосфита в

полностью защищенный фосфотриэфир проводят с помощью йода в тетрагидрофуране. Затем колонку промывают последовательно метанолом и водой. Чтобы удалить модифицированный олигонуклеотид от твердого носителя, содержимое колонки транспортируют в мультиампулу, смешивают с 5мл 30% раствора аммиака, сосуд герметизируют и встряхивают на протяжении ночи при 55°C. Затем охлаждают до 0°C, центрифугируют, носитель промывают 5мл воды, и объединенные водные фазы подвергают лиофильной сушке.

Для очистки, твердое вещество помещают в 2мл воды, смешивают с 2мл 0,5М раствора ацетата аммония и смешивают с 10мл этанола, оставляют стоять на протяжении ночи при -20°C, центрифугируют, и остаток промывают 1мл этанола (-20°C) и, наконец, сушат в вакууме при комнатной температуре. 8мг названного соединения получают в виде бесцветного порошка.

b)

10-[5-(2-карбокисфенил)-2-гидрокси-5-оксо-4-аза-пентил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаазициклододекан

50г (144,3ммоль) 1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаазициклододекана (ДОЗА) растворяют в 250мл воды и рН доводят до 13 при помощи 5 N раствора гидроксида натрия. Затем раствор 38,12г (187,6ммоль) N-(2,3-эпоксипропил)-фтальмида в 100мл диоксана прикалывают по капле в пределах одного часа, перемешивают в течение 24 часов при 50°C и рН поддерживают при 13 путем добавления 5 N раствора гидроксида натрия. Раствор доводят до рН2 с помощью 10% хлористоводородной кислоты и выпаривают досуха в вакууме. Остаток растворяют в небольшом количестве воды и очищают на ионообменной колонке (Relllex^(R) = поли-(4-винил)-пиридин, колонку элюируют водой). Основные фракции концентрируют путем испарения в вакууме, и остаток подвергают окончательной очистке при помощи хроматографии на RP-18 (LiChroPrep^(R))=/подвижный растворитель: градиент тетрагидрофуран/метанол/вода). После концентрирования испарением основных фракций, получают 63,57г (71% от теор.) аморфного твердого вещества.

Содержание воды: 8,5%

Элементный анализ (относительно безводного вещества):

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

c) 10-(3-Амино-2-гидрокси-пропил)-1,4,7-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаазициклододекан

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

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

Содержание воды: 10,3%

Элементный анализ (относительно безводного вещества):

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

d)

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

9,84г (41,8ммоль) 3-(4-нитрофенил)-глутарового ангидрида (J. Org. Chem. 26, 3856 (1961)) добавляют к 14,62г (34,86ммоль) названного соединения примера 1c) в 200мл диметилформамида/20мл триэтиламина и перемешивают на протяжении ночи при комнатной температуре. Выпаривают досуха в вакууме. Остаток перекристаллизовывают из смеси изопропанол/уксусная кислота 95:5.

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

Содержание воды: 0,9%

Элементный анализ (относительно безводного вещества):

Рассч. C 48,68 H 7,93 N 16,70

Найд. C 48,47 H 8,09 N 16,55

e)

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

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

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

Содержание воды: 0,8%

Элементный анализ (относительно безводного вещества):

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

f)

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

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

Содержание воды: 3,1%

Элементный анализ (относительно безводного вещества):

Рассч. С 52,24 Н 6,35 N 12,60 S 4,81

Найд. С 52,37 Н 6,44 N 12,48 S 4,83

g) Конъюгат 5-(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T-3' и

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

8мг олигонуклеотида, полученного в примере 1а), растворяют в 2,5мл NaHCO₃/Na₂CO₃ буфера (рН8,0) и смешивают

10-[7-(4-изотиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-аза-гептил]-1,4,7-трис(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаациклододекана (названное соединение примера 1f). Перемешивают в течение 5 часов при комнатной температуре, рН доводят до 7,2 путем добавления 0,01М хлористоводородной кислоты, и этот раствор подвергают ультрафильтрации через мембрану с пределом эксклюзии 3000 (Amicon YM3) и затем лиофильно сушат. Получают 7мг требуемого конъюгата.

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

15мкл ¹¹¹Индий (III) ацетатного раствора (350мкКи), (полученного из ¹¹¹Индий (III) хлорида в 2М растворе ацетата натрия и доведенного до рН4,0 с помощью 0,1М хлористоводородной кислоты) добавляют к 135мкл раствора 1мг названного соединения примера 1g) в MES буфере, рН6,2 (MES = 2-(N-морфолино)-этилсульфоновая кислота). рН доводят до 4,2 добавлением 0,01М хлористоводородной кислоты. Перемешивают в течение 1 часа при 37°C при рН4,2. Доводят до рН6 при помощи 2М раствора ацетата натрия и добавляют 10мкл 0,1М Na₂EDTA = динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, чтобы комплексовать избыток ¹¹¹Индий. Конечную очистку полученного таким образом меченого конъюгата (1h) проводят с помощью HPLC (ЖХВП) (вытеснительная хроматография: TSK-400/MES-буфер). Фракции, содержащие меченый конъюгат, разбавляют обычным физиологическим раствором, доведенным до рН7,2 с помощью 0,01М раствора гидроксида натрия, и фильтруют. Полученный таким образом раствор представляет препарат, пригодный для радиодиагностики.

Пример 2.

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

8мг олигонуклеотида, полученного в примере 1а), растворяют в 2,5мл NaHCO₃/Na₂CO₃ буфера (рН8,0) и добавляют 1мг N-[2-амино-3-(п-изотиоцианатофенил)пропил]-транс-циклогексан-1,2-диамин-N,N',N'',N'''-пентауксусной кислоты (полученной согласно Biosonjugate Chem. 1, 59 (1990)), перемешивают в течение 5 часов при комнатной температуре, затем доводят рН до 7,2 с помощью 0,2М хлористоводородной кислоты, и раствор подвергают ультрафильтрации через мембрану с пределом эксклюзии 3000 (Amicon YM3). После лиофильной сушки получают 6мг тиомочевинного конъюгата 2а).

б) Висмут-212 комплекс конъюгата 5'-(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота- сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T-3' и N-[2-амино-3-(4-изотиоцианатофенил)пропил]-транс-циклогексан-1,2-диамин-N,N'-N'',N'''-пентауксусной кислоты

Раствор ²¹²Висмут-тетраиодида в 0,1М йодистоводородной кислоте доводят до рН4 с помощью 2М уксусной кислоты. Аликвоту этого раствора активностью около 3мКи (mCi) добавляют к 1мг названного соединения примера 2а), растворенного в 0,5мл 0,02М MES-буфера и добавляют 0,5мл 0,15М раствора хлорида натрия. Перемешивают в течение 20 минут при комнатной температуре. Доводят до рН6 с помощью 2М раствора ацетата натрия и добавляют 20мкл 0,01М Na₂EDTA раствора. Перемешивают в течение 20 минут. Очистку комплекса проводят с помощью HPLC (ЖХВП) (вытеснительная хроматография: TSK-400/MES-буфер). Фракции радиоактивного конъюгата объединяют, разбавляют обычным физиологическим раствором и доводят до рН7,2

с помощью 0,1М раствора гидроксида натрия. После фильтрации получают препарат, пригодный для радиотерапии.

Пример 3.

а) Индий-111 комплекс конъюгата 5'-(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T-T-3' и

N-[2-амино-3-(4-изотиоцианатофенил)пропил]-транс-циклогексан-1,2-диамин-N,N',N'',N'''-пентауксусной кислоты

15мл 15мкл ¹¹¹Индий (III) ацетатного раствора (350мкКи), (полученного из ¹¹¹Индий (III) хлорида в 2М растворе ацетата натрия и доведенного до pH4,0 с помощью 0,1М хлористоводородной кислоты) добавляют к 0,5мл раствора 1мг названного соединения примера 2а) в MES буфере, pH6,2 (MES = 2-(N-морфолино)-этилсульфоновая кислота). pH доводят до pH5,0 добавлением 0,01М хлористоводородной кислоты. Перемешивают в течение 1 часа при 37°С при pH5,0. Доводят до pH6 при помощи 2М раствора ацетата натрия и добавляют 10мкл 0,1М Na₂EDTA = динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, чтобы комплексовать избыток ¹¹¹Индий. Конечную очистку подученного таким образом меченого конъюгата (1h) проводят с помощью ЖХВР (вытеснительная хроматография: TSK-400/MES-буфер). Фракции, содержащие меченый конъюгат, разбавляют обычным физиологическим раствором, доведенным до pH7,2 с помощью 0,01М раствора гидроксида натрия, и фильтруют. Полученный таким образом раствор представляет препарат, пригодный для радиодиагностики.

Пример 4.

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

5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T-T-3' и

2-(4-изотиоцианато-бензил)-диэтилентриамин- N,N,N',N'',N'''-пентауксусной кислоты

8мг олигонуклеотида, полученного в примере 1а), растворяют в 2,5мл NaHCO₃/Na₂CO₃ буфера (pH8,0) и добавляют 1мг 2-(4-изотиоцианато-бензил)-диэтилентриамин-N,N',N'',N'''-пентауксусной кислоты (полученной согласно Biosojugate Chem. 2, 187 (1991)). Перемешивают в течение 5 часов при комнатной температуре, затем pH доводят до 7,2 с помощью 0,01М хлористоводородной кислоты, и этот раствор подвергают ультрафильтрации через мембрану с пределом эксклюзии 3000 (Amicon YM3). После лиофильной сушки получают 6мг конъюгата тиомочевины.

б) Иттрий-90 комплекс конъюгата 5'-(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T-T-3' и

2-(4-изотиоцианато-бензил)-диэтилентриамин- N,N,N',N'',N'''-пентауксусной кислоты

К раствору ⁹⁰Иттрия, растворенного в 0,05М растворе ацетата аммония, (прибл. 380мКи), добавляют 1мг производного тиомочевины примера 4а) в 0,5мл 0,05М раствора ацетата аммония с pH6, доводят до pH5,2 с помощью 3М уксусной кислоты и перемешивают в течение 1 часа при комнатной температуре. Доводят до pH7,0 с помощью 0,01М раствора гидроксида натрия, и конъюгат очищают с помощью ЖХВР (TSK-400/MES-буфер). Основные фракции объединяют, разбавляют обычным физиологическим раствором и доводят до pH7,2 с помощью 0,01М раствора гидроксида натрия. После фильтрации получают препарат, пригодный для радиотерапии.

Пример 5.

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

5'-T*T*T*TAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUAGAUU-3' (модифицированный лиганд для сериновой протеазы)

30-мерный-олигонуклеотид

5'-AGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUAGAUU-3' (посл. №13 Пат. США№5270163), идентифицированный

по SELEX способу, модифицированный в сахаридных звеньях и при помощи 5'-связанной последовательности 5 тимидинов, получают обычным путем в автоматическом синтезаторе Pharmacia company (смотри Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed. F, Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид также присутствует на колонке твердого носителя. Путем реакции с раствором трихлоруксусной кислоты в дихлорметане, открывают 5'-гидрокси группу. Нагрузка колонки составляет около 10мг 35-мерного олигонуклеотида. Чтобы соединить линкер, колонку подвергают взаимодействию с раствором 50мкмоль

В-цианоэтил-N,N-диизопропил-амино-3-третил-6-(меркапто)-фосфорамидита в ацетонитриле в присутствии тетразола. Окисление образовавшегося фосфита а полностью защищенный фосфотриэфир проводят с помощью йода в тетрагилпрофуране. Затем колонку промывают последовательно метанолом и водой. Чтобы удалить модифицированный олигонуклеотид от твердого носителя, содержимое колонки транспортируют в мультитампулу, смешивают с 5мл 30% раствора аммиака, сосуд герметизируют и подвергают вибрации на протяжении ночи при 55°С. Затем охлаждают до 0°С, центрифугируют, носитель промывают 5мл воды, и объединенные водные фазы подвергают лиофильной сушке.

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

Получают 9мг S-третилированного названного соединения.

Чтобы отщепить защитную третилую группу, продукт растворяют в 0,5мл воды, смешанной с 0,2мл 1М раствора нитрата серебра и перемешивают в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем содержимое

смешивают с 0,1мл 1М дитиотреитольного раствора. Через 15 минут центрифугируют, и супернатантный раствор экстрагируют несколько раз этилацетатом. После лиофилизации из водного раствора получают 8мг требуемого названного соединения.

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

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

10 Выход: 53,64г бесцветного кристаллического порошка.

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

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

15 Выход: 37,68г кремового аморфного порошка.

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

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

Выход: 20,19г вспененного твердого вещества.

25 е) 2-(4-Гидроксибензил)-1-метансульфонил-7-(трет-бутил-оксикарбонил)-1,4,7-триазагептан-3-он

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

Выход: 16,17г стекловидной пены, которая затвердевает через несколько минут.

30 ф) 2-[4-(3-Оксапропионовая кислота-бензиловый

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

Выход: 10,06г вспененного твердого вещества

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

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

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

45 г) 9-Хлоро-1-метансульфонил-2-[4-(3-оксапропионовая кислота-бензиловый

эфир)-бензил]-1,4,7-триаза-3,8-дион
9г 2-[4-(3-оксапропионовая кислота-бензиловый эфир)-бензил]-1-метансульфонил-1,4,7-триазагептан-3-она и 1,78г триэтиламина растворяют в 200мл хлороформа. При 0°C 1,98г хлорацетил хлорида, растворенного в 20мл хлороформа, вливают по капле в течение 30 минут и затем перемешивают в течение 2 часов при 0°C. Промывают 100мл 5% хлористоводородной кислоты, дважды водой по 50мл каждый раз, сушат над сульфатом магния и выпаривают досуха в вакууме. Остаток хроматографируют на силикагеле смесью дихлорметан-этилацетат (20/1) в качестве элюента.

Выход: 6,97г воскообразного твердого вещества.

50 и) 9-Хлоро-1-метансульфонил-2-[4-(3-оксапропионовая кислота-бензиловый

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

Выход: 5,33 стекловидного твердого вещества.

60 j) 10-Аиетил-2-[4-(3-оксапропионовая

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

к) 10-Ацетил-2-[4-(3-оксапропионовая кислота)-(2,5-диоксо-пирролидин-1-ил)-эфир]-бензил]-1-(метансульфонил)-10-тиа-1,4,7-триазадекан-3,8-дион
4г 10-ацетил-2-[4-(3-оксапропионовая кислота)-бензил]-1-(метансульфонил)-10-тиа-1,4,7-триазадекан-3,8-диона, 1,91г дициклогексилкарбодиимида, 4г N-гидроксисукцинимид и 30мг 4-диметиламинопиридина перемешивают в течение 24 часов в 20мл хлороформа при комнатной температуре. Затем перемешивают с 20мл диэтилового эфира, фильтруют, и остаток концентрируют выпариванием в вакууме. Остаток хроматографируют на силикагеле смеси дихлорметан-диоксан (10/1) в качестве элюента.

Выход: 3,47г кремового твердого вещества
Элементный анализ:

Рассч.	C	46,15	H	4,93	N	9,78	S	11,20
Найд.	C	46,03	H	4,83	N	9,64	S	11,05

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

Элементный анализ (относительно безводного вещества):

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

м) Конъюгат 5'-(6-Меркапто-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-T*T*T*TAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUAGAGAUU-3' и 10-Ацетил-2-[4-(3-оксапропионовая кислота)-(6-малеимидо-гексаноил)-гидразид]-бензил]-1-метансульфонил-10-тиа-1,4,7-триазадекан-3,8-дион
5мг тиол-содержащего олигонуклеотида, полученного согласно примеру 5а), смешивают в 2мл фосфатного буфера (pH7,4) с 1мг производного малеимида, полученного согласно примеру 5i), растворенного в 0,2мл диметилформамида. Оставляют стоять в течение 2 часов при комнатной температуре, и раствор подвергают ультрафильтрации через мембрану с пределом эксклюзии 3000 (Amicon YM3) и затем лиофильно сушат. Получают 5мг требуемого конъюгата.

н) Технеций-99m комплекс конъюгата 5'-(6-Меркапто-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-T*T*T*TAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUAGAGAUU-3' и 10-ацетил-2-[4-(3-оксапропионовая кислота)-(6-малеимидо-гексаноил)-гидразид]-бензил]-1-метансульфонил-10-тиа-1,4,7-триазадекан-3,8-дион
1мл раствора калий-D-глюкората (12мг/мл) и хлорида олова (II) (100мг/мл) в 0,2М NaHCO₃ сушат вымораживанием в ампуле и затем смешивают с раствором [Tc-99m]-натрий пертехнетата (1мл, 1мКи [mCi]) из Mo-99/Tc-99m генератора. После стояния при комнатной температуре в течение 15 минут аликвоту удаляют и смешивают с таким же объемом конъюгата примера 5m) (1мг/мл), растворенного в 0,2М растворе NaHCO₃. Через 15 минут как тонкослойная хроматография, так и HPLC (ЖХВР) показывают, что >98% радиоактивности взято конъюгатом.

Пример 6.

а) Конъюгат 5'-(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T-3' и

S-бензоил-МАG₃-2,3,5,6-тетрафторфенилового эфира
3г 5-бензоил-МАG₃-2,3,5,6-тетрафторфенилового эфира (полученного согласно Пат. США 4965392), растворенного в 0,2мл диметилформамида, добавляют к 8мг названного соединения примера 1а), растворенного в 0,5мл 0,1М фосфатного буфера (pH7), и перемешивают в течение 3 часов при комнатной температуре. Разбавляют водой, и раствор подвергают ультрафильтрации (Amicon YM3, предел эксклюзии 3000). После лиофильной сушки получают 5мг конъюгата 6а).

б) ^{99m}Технеций комплекс конъюгата 5'-(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T-3' и S-бензоил-МАG₃-2,3,5,6-тетрафторфенилового эфира

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

Пример 7.

а) Конъюгат 5'-(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T-3' и ^{99m}Технеций комплекса

2,3,5,6-тетрафторфенил-4,5-бис(меркаптоацетидами)-пентановая кислота сложного эфира

3мг названного соединения примера 1а), растворенного в 0,6мл фосфатного буфера, добавляют к ^{99m}Технеций комплексу 2,3,5,6-тетрафторфенил-4,5-бис(меркаптоацетидами)-пентановая кислота сложного эфира (полученного согласно: J. Nucl. Med. 32, 1445 (1991)) прибл. 100мКи, растворенного в 2мл фосфатного буфера, рН7,2. Раствор доводят до рН10 с помощью 1,0М калий карбонатного буфера и перемешивают в течение 20 минут при комнатной температуре. Для финальной очистки раствор вводят в Сефадекс (Sephadex) колонку (Pharmacia) и элюируют раствором с 75ммоль хлорида натрия. Основные фракции объединяют, разбавляют обычным физиологическим раствором и фильтруют. Таким образом, полученный раствор может быть использован для радиодиагностических исследований.

Пример 8.

а) Конъюгат 5'-(6-Меркапто-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-Т*Т*Т*Т*ТАGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUAGAGAUU-3' и 5'(N-малеимида)-3-оксапентил-[2-[3-карбокисбензоил]-тио]-ацетил]-глицилглицилглицината

5мг тио-содержащего олигонуклеотида, полученного согласно примеру 5а), смешивают в атмосфере N₂ в 2мл фосфатного буфера (рН7,4) с 1мг 5-(N-малеимида)-3-оксапентил-[2-[3-карбокисбензоил]-тио]-ацетил]-глицилглицилглицината (полученного согласно Blosoj. Chem. 1, 431 (1990)), растворенного в 0,2мл диметилформамида. Оставляют перемешиваться в течение 2 часов при комнатной температуре, и раствор подвергают ультрафильтрации через мембрану (Amicon YM3) и затем сушат вымораживанием. Получают 5,5мг требуемого конъюгата.

б) Технеций-99т комплекс конъюгата 5'-(6-Меркапто-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-Т*Т*Т*Т*ТАGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUAGAGAUU-3' и 5'(N-малеимида)-3-оксапентил-[2-[3-карбокисбензоил]-тио]-ацетил]-глицилглицилглицината

1мл раствора калий-D-глюкарата (12мг/мл) и хлорида олова (II) (100мкг/мл) в 0,2М NaHCO₃ сушат вымораживанием в ампуле и затем смешивают с раствором [Tc-99т]-натрий пертехнетата (1мл, 1мКи [mCl]) из Mo-99/Tc-99m генератора. После стояния при комнатной температуре в течение 15 минут аликвоту удаляют и смешивают с таким же объемом конъюгата примера 8а) (1мг/мл), растворенного в 0,2М растворе NaHCO₃. Вещество можно выделить с помощью сушки вымораживанием. Выход по изотопу, определенный с помощью ЖХВР, составлял >96%.

Пример 9.

а) Конъюгат 5'-(6-Меркапто-1-гексил-фосфоновая кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-Т*Т*Т*Т*ТАGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUAGAGAUU-3' и 1-[6-(2-винил-6-гексил-оксиметил)-пиридин]-1,4,8,11-тетрааза-циклотет-радекана

Раствор 4мг тио-содержащего олигонуклеотида, полученного согласно примеру 5а), в 2мл фосфатного буфера (рН7,4) смешивают в атмосфере N₂ с 1мг 1-[6-(2-винил-6-гексил-оксиметил)-пиридин]-1,4,8,11-тетрааза-циклотетрадекана (полученного согласно EP 0588229), растворенного в 0,5мл диметилформамида. Оставляют перемешиваться в течение 4 часов при 35°C, смешивают с 10мл этанола, и продукт выделяют с помощью центрифугирования. Очистку проводят при помощи хроматографии с обращенной фазой на 1x25см колонке с градиентом 50ммоль триэтиламмоний ацетат (рН7)/ацетонитрил. Объединенные фракции сушат вымораживанием, растворяют в 1мл воды и обессоливают на Сефадекс G-10 колонке. Названное соединение (около 4мг) выделяют с помощью сушки вымораживанием.

б) Tc-99m комплекс конъюгата 5'-(6-Меркапто-1-гексил-фосфоновая кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-Т*Т*Т*Т*ТАGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUAGAGAUU-3' и 1-[6-(2-винил-6-гексил-оксиметил)-пиридин]-1,4,8,11-тетрааза-циклотет-радекана

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

Пример 10.

а) Конъюгат 5'-(6-меркапто-1-гексил-фосфоновая кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-Т*Т*Т*Т*ТАGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUAGAGAUU-3' и

N-[4-гидрокси-3-(1,4,8,11-тетрааза-циклотетрадек-5-ил)-бензил]-2-(6-винил-пиридин-2-илметокси)-ацетида
Раствор 6,5мг тиол-содержащего олигонуклеотида, полученного согласно примеру 5а), в 2мл фосфатного буфера (рН8,0), смешивают с 1,2мг N-[4-гидрокси-3-(1,4,8,11-тетрааза-циклотетрадек-5-ил)-бензил]-2-(6-винил-пиридин-2-илметокси)-ацетида (полученного согласно J. Chem. Soc., Chem. Commun. 156 (1988)), растворенного в 0,1мл диметилформамида. Перемешивают в течение 4 часов в атмосфере N₂ при 35°C, смешивают с 10мл этанола, и продукт выделяют с помощью центрифугирования. Очистку проводят при помощи хроматографии с обращенной фазой на 1x25см колонке с градиентом 50ммоль триэтиламмоний ацетат (рН7)/ацетонитрил. Объединенные фракции обессоливают на Сефадекс G-10 колонке. Путем сушки вымораживанием получают 5мг названного соединения в виде белого порошка.

б) Медь-64 комплекс 5'-(6-меркапто-1-гексил-фосфоновая кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-Т*Т*Т*Т*ТАGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUAGAGAUU-3' и N-[4-гидрокси-3-(1,4,8,11-тетрааза-циклотетрадек-5-ил)-бензил]-2-(6-винил-пиридин-2-илметокси)-ацетида

1мг конъюгата, полученного согласно 10а), инкубируют в 1мл фосфатного буфера (рН8) с ⁶⁴CuCl₂ (0,2мКи). Выход по изотопу, определенный через 1 час с помощью ЖХВР, составлял >98%. Продукт выделяют путем сушки вымораживанием.

Пример 11.

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

5'-T*T*T*TAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUGAGAUU-3' и

1,4,7,10-тетраазациклододекан-2-[(5-аза-8-малеимида-6-оксо)-октан]-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты

1 мг 1,4,7,10-тетраазациклододекан-2-[(5-аза-8-малеимида-6-оксо)-октан]-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты (полученного согласно J. Chem. Soc., Chem. Commun. 796 (1989)), добавляют к раствору 5 мг тиол-содержащего олигонуклеотида, полученного согласно примеру 5а), в 2 мл фосфатного буфера (pH8) в атмосфере N₂. Перемешивают в течение 3 часов при 35°C, смешивают с 10 мл изопропилового спирта, и продукт выделяют с помощью центрифугирования. Очистку проводят при помощи хроматографии с обращенной фазой на 1x25 см колонке с градиентом 25 ммоль триэтиламмоний ацетат (pH7)/ацетонитрил. Объединенные фракции осторожно концентрируют путем испарения в вакууме, растворяют в небольшом количестве воды и обессоливают с помощью Сефадекса G-10 колонки. Путем сушки вымораживанием получают 4 мг названного соединения в виде белого порошка.

б) Иттрий-90 комплекс конъюгата 5'-(6-меркапто-1-гексил-фосфоновая кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-T*T*T*TAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUGAGAUU-3' и

1,4,7,10-тетраазациклододекан-2-[(5-аза-8-малеимида-6-оксо)-октан]-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты

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

Пример 12.

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

5'-T*T*T*TAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUGAGAUU-3' и

1,4,7-три-азациклононан-2-[(5-аза-8-малеимида-6-оксо)-октан]-1,4,7-триуксусной кислоты

1 мг 1,4,7-триазациклононан-2-[(5-аза-8-малеимида-6-оксо)-октан]-1,4,7-триуксусной кислоты (полученного согласно J. Chem. Soc., Chem. Commun. 794 (1989)), добавляют к раствору 5 мг тиол-содержащего олигонуклеотида, полученного согласно примеру 5а), в 2 мл фосфатного буфера (pH8) в атмосфере N₂. Перемешивают в течение 6 часов при 35°C, смешивают с 10 мл изопропанола, и продукт выделяют с помощью центрифугирования. Очистку проводят при помощи хроматографии с обращенной фазой на 1x25 см колонке с градиентом 25 ммоль триэтиламмоний ацетат (pH7)/ацетонитрил. Объединенные фракции осторожно концентрируют путем испарения в вакууме, растворяют в небольшом количестве воды и обессоливают с помощью Сефадекса G-10 колонки. Путем сушки вымораживанием получают 3 мг названного соединения в виде белого порошка.

б) Галлий-67 комплекс конъюгата 5'-(6-меркапто-1-гексил-фосфоновая кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-T*T*T*TAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUGAGAUU-3' и

1,4,7-три-азациклононан-2-[(5-аза-8-малеимида-6-оксо)-октан]-1,4,7-триуксусной кислоты

20 мг конъюгата, полученного согласно примеру 12а), растворяют в 0,5 мл 0,1 М нитратного буфера pH4,5 и смешивают с 0,1 мл галлий-67-цитратного раствора (0,2 мКи). Выдерживают в течение 2 часов при комнатной температуре, и продукт обессоливают на Сефадексе G-10 колонке. После лиофильной сушки получают 17 мг названного соединения в виде белого порошка.

Пример 13.

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

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

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

б) Конъюгат 36-мерного олигонуклеотида U*T*T*T*TCUCAUGGAGCCAAGACGAAUAGCUACAUA-3' и 10-(4-аза-2-гидрокси-5-имино-8-меркапто-октан-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазациклододекана U*:

5-(проп-2-ен-1-он)-2'-дезоксигуанидин
30-мерный олигонуклеотид, идентифицированный согласно SELEX способу, получают с модификацией 5'-связанной последовательности 5'-T*T*T*T* обычным способом в автоматическом синтезаторе Pharmacia Company (смотри Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed. F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид также присутствует на колонке твердого носителя. Путем реакции с раствором трихлоруксусной кислоты в дихлорметане открывают 5'-гидрокси группу. Нагрузка на колонку составляет около 10 мг 35-мерного олигонуклеотида. 5'-гидрокси группа взаимодействует в присутствии тетразола с фосфорамидитом, полученным согласно примеру 13а). Затем фосфит превращают в фосфотриэфир путем обработки раствором иода, и концевой DMТ радикал отщепляют путем взаимодействия с раствором трихлоруксусной кислоты в дихлорметане. Для введения тиольной группы в А,В-ненасыщенную

истая кислота диэфир

5,48г (10ммоль) [S-(трифенилметил-меркаптоацетил)глицил-глицинамидил]-6-гексанола, полученного согласно примеру 14b), растворяют в 100мл абсолютного дихлорметана, 5,17г (40ммоль) диизопропилэтиламина добавляют в атмосфере аргона и вливают по каплям при 0°C 3,95г (20ммоль) фосфористая кислота монометиловый эфир диизопропиламид хлорида, растворенного в 50мл абсолютного дихлорметана. Перемешивают в течение 0,5 часа при 0°C и затем в течение 2 часов при комнатной температуре. Для завершения обработки смешивают при охлаждении льдом с 320мг (10ммоль) абсолютного метанола, и после концентрирования, хроматографируют на силикагеле (элюент: CH₂Cl₂/MeOH: 95%:5/5% триэтиламин).

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

d) 5'-[(Меркаптоацетил-глицил-глицил-амидил)-6-гекс-1-ил]-фосфорная кислота эфир 35-мерного олигонуклеотида 5'-T*T*T*T*TCUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUA-3'

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

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

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

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

1мг конъюгата 14d) растворяют в 1мл 0,1М динатриевого кислого фосфатного буфера (pH=9,5). После добавления 10мг динатрий тартрата смешивают с раствором пертехнетата (1мКи) и затем с 10мл раствора хлорида олова (II) (5мг SnCl₂/1мл 0,01М HCl). Выход по изотопу (прибл. 93%) определяют с помощью ЖХВР.

Пример 15.

a) O-[[5-(Трифенилметил-меркаптоацетил)глицил-глицинами-дил]-6-гекс-1-ил]-толуолсульфоновая кислота сложный эфир

5,48г (10ммоль) [3-(трифенилметил-меркаптоацетил)-глицил-глицинамидил]-6-гексанола, полученного в примере 14b), растворяют в 100мл абсолютного дихлорметана. Добавляют 1,01г (10ммоль) триэтиламина и 1,91г (10ммоль) хлорангидрида п-толуолсульфоновой кислоты и перемешивают в течение 24 часов при комнатной температуре. Затем концентрируют и хроматографируют на силикагеле (элюент: CH₂Cl₂/MeOH: 95:5)

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

Элементный анализ:

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

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

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

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

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

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

4мг конъюгата.

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

1мг конъюгата, описанного в примере 15b), растворяют в 1мл 0,1М динатриевого кислого фосфатного буфера (рН9,5). После добавления 10мг динатрий тартрата смешивают с раствором пертехнетата (1мКи) и затем с 10мкл раствора хлорида олова (II) (5мг SnCl₂/1мл 0,01М HCl). Выход по изотопу (прибл. 95%) определяют с помощью ЖХВР.

Пример 16.

а) N-[3-Тиа-5-(трифенилметилмеркапто)-1-оксо-пент-1-ил]-S- трифенилметил-цистеин метиловый эфир 2,69г (10ммоль) N-[3-тиа-5-(трифенилметилмеркапто)-1-оксо-пент-1-ил]-5-трифенилметил-цистеин метилового эфира (получение согласно DE 4310999) растворяют вместе с 5,58г (20ммоль) трифенилметил хлорида в 100мл абсолютного дихлорметана. После добавления 2,02г (20ммоль) триэтиламина смесь выдерживают при перемешивании на протяжении ночи в атмосфере аргона при комнатной температуре. Для завершения обработки органическую фазу промывают три раза, в каждом случае 1% раствором лимонной кислоты, насыщенным раствором бикарбоната натрия и водой. После высушивания над сульфатом натрия концентрируют путем выпаривания и очищают на силикагеле (элюент: CH₂Cl₂/MeOH: 95:5) .

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

Элементный анализ:

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

b)

N-[3-Тиа-5-(трифенилметилмеркапто)-1-оксо-пент-1-ил]-S-трифенилметил-N'-(6-гидрокси-гекс-1-ил)цистеинамид, 7,54г (10ммоль) N-[3-тиа-5-(трифенилметилмеркапто)-1-оксо-пент-1-ил]-5-цистеин метилового эфира, описанного в примере 16а), нагревают до 100°C в 11,72г (100ммоль) 6-аминогексанол/50мл 1,4-диоксана в атмосфере аргона в течение 2 часов. Затем реакционную смесь выливают на смесь 100мл дихлорметана и 100мл воды. При перемешивании и охлаждении льдом доводят рН до 6 с помощью 10М хлористоводородной кислоты, органическую фазу отделяют и сушат над сульфатом натрия. После выпаривания растворителя сырой продукт очищают на силикагеле (элюент: CH₂Cl₂/MeOH: 5% - 50%)

Элементный анализ:

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

с)

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

8,39г (10ммоль)

N-[3-тиа-5-(трифенилметилмеркапто)-1-оксо-пент-1-ил]-5-трифенилметил-N'-(6-гидрокси-гекс-1-ил)цистеинамида, полученного в примере 16b), растворяют в 200мл абсолютного дихлорметана. В атмосфере аргона добавляют 5,17г (40ммоль) диизопропилэтиламина и по каплям при 0°C вливают 3,95г (20ммоль) фосфористая кислота монометилэфир-диизопропиламид-хлорида, растворенного в 50мл абсолютного дихлорметана. Перемешивают в течение 0,5 часа при 0°C и затем перемешивают в течение 1,5 часов при комнатной температуре. Для завершения обработки смешивают при охлаждении льдом с 320мг (10ммоль) абсолютного метанола и после концентрирования хроматографируют на силикагеле (элюент:CH₂Cl₂/MeOH:95:5/5% (триэтиламин)).

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

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

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

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

Для отщепления S-третил защитных групп вещество помещают в 5мл 50ммоль раствора (рН7,0) триэтиламмоний ацетата и инкубируют с 500мкл 0,1М раствора нитрата серебра в течение 30 минут. Затем добавляют 500мкл 0,14М дитиотреитольного раствора и инкубируют в течение последующих 30 минут. После центрифугирования прозрачный супернатант обессоливают на Сефадексе G 10. Фракции, содержащие продукт, лиофилизируют. Получают 5мг конъюгата в виде белого порошка.

е) Технеций-99m комплекс конъюгата

5'-[N-(3-тиа-5-мер-капто-1-оксо-пент-1-ил)-цистеин-N'-(6-гидрокси-гекс-1-ил)-амид]-фосфорная кислота эфир 35-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T-3'

1мг конъюгата, описанного в примере 16d), растворяют в 1мл 0,1М динатриевого кислого фосфатного буфера (рН9,5). После добавления 10мг динатрий тартрата смешивают с раствором пертехнетата натрия (1мКи) и затем с 10мл раствора хлорида олова (II) (5мг SnCl₂/1мл 0,01М HCl). Выход по изотопу (прибл. 96%) определяют с помощью ЖХВР.

Пример 17.

а)

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

8,39г (10ммоль)

N-[3-тиа-5-(трифенилметилмеркапто)-1-оксо-пент-1-ил]-5-трифенилметил-N'-(6-гидрокси-гекс-1-ил)цистеинамида, полученного согласно примеру 16b, растворяют в 200мл абсолютного дихлорметана. Добавляют 1,01г (10ммоль) триэтиламина, 1,91г (10ммоль) хлорангидрида п-толуолсульфонокислоты и перемешивают в течение 20 часов при комнатной температуре. Затем концентрируют и хроматографируют на силикагеле (Элюент: CH₂Cl₂/MeOH: 97:3).

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

Элементный анализ:

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

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

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

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

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

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

с) Тахнеций-99m комплекс конъюгата 5'-[(меркаптоацетил-глицил-гдицинамидил)-13-тридека-7-тио-1-ил]-фосфорная кислота сложный эфир 35-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T-3'

1мг конъюгата, описанного в примере 17b), растворяют в 1мл 0,1М динатриевого кислого фосфатного буфера (рН9,5). После добавления 10мг динатрий тартрата смешивают с раствором пертехнетата натрия (1мКи) и затем с 10мкл раствора хлорида олова (II) (5мг SnCl₂/1мл 0,01М HCl). Выход по изотопу (прибл. 93%) определяют с помощью ЖХВР.

Пример 18.

а) Конъюгат 5'-(6-Амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T-3' и моноамида N-(тетрагидро-2-оксо-тиофен-3-ил)-тиодигликолевой кислоты

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

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

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

б) Технеций-99m комплекс конъюгата 5'-(6-Амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного

олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T-3' и моноамида N-(тетрагидро-2-оксо-тиофен-3-ил)-тиодигликолевой кислоты

1мг SH-группу-несущего конъюгата, описанного в примере 18а), растворяют в 1мл 0,1М динатриевого кислого фосфатного буфера (рН9,5). После добавления 10мг динатрий тартрата смешивают с раствором пертехнетата натрия (1мки) и затем с 10мкл раствора хлорида олова (II) (5мг SnCl₂/1мл 0,01М HCl). Выход по изотопу (94%) определяют с помощью ЖХВР.

Пример 19.

а) 5'(6-Амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир 32-мерного олигонуклеотида 5' -CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT-³³'-Т-5'

30-мерный олигонуклеотид 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUA-3', идентифицированный по SELEX способу, с модификацией тимидиновой последовательности Т-³³'-Т-5', расположенной против хода транскрипции, которая связана 5'-положением на носителе, получают обычным путем в автоматическом синтезаторе Pharmacia Company (смотри Oligo-nucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed. F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид также присутствует на колонке твердого носителя. Путем реакции с раствором трихлоруксусной кислоты в дихлорметане открывают 5'-гидрокси группу. Нагрузка на колонку, составляет около 10мг 32-мерного олигонуклеотида. Чтобы соединить линкер, колонку подвергают взаимодействию с ацетонитрильным раствором 50мкмоль В-цианоэтил-N,N-диизопропиламино-6-(трифторацетамидо)-1-гексил-фосфорамидита (полученного согласно Nucl. Acids Res. 16, 2659 - 2669 (1988)) в присутствии тетразола. Окисление образовавшегося фосфита в полностью защищенный фосфотриэфир проводят с помощью йода в тетрагидрофуране. Затем колонку промывают последовательно метанолом и водой. Чтобы удалить модифицированный олигонуклеотид от твердого носителя, содержимое колонки транспортируют в мультиампулу, смешивают с 5мл 30% раствора аммиака, сосуд герметизируют и подвергают встряхиванию на протяжении ночи при 55°C. Затем охлаждают до 0°C, центрифугируют, носитель промывают 5мл воды, и объединенные водные фазы подвергают лиофильной сушке.

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

8мг названного соединения получают в виде бесцветного порошка.

б) Конъюгат 5'(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир 32-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT-³³'-Т-5' и

10-[7-(4-изо-тиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-аза-гептил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазазацикло-додекана

8мг олигонуклеотида, полученного в примере 19а), растворяют в 2,5мл NaHCO₃/Na₂CO₃ буфера (рН8,0) и смешивают с 1мг 10-[7-(4-изотиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбок-симетил-4-азагептил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазазациклододекана (названное соединение примера 1f). Перемешивают в течение 5 часов при комнатной температуре, затем доводят рН до 7,2 с помощью 0,1М хлористоводородной кислоты, и раствор подвергают ультрафильтрации через мембрану с пределом эксклюзии 3000 (Anticon YM3) и затем лиофильно сушат. Получают 7мг требуемого конъюгата.

с) ¹¹¹Индий комплекс конъюгата 5'(6-амино-1-гексил-фос-форная кислота сложный эфир) 32-мерного олигонуклеотида 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT-³³'-Т-5' и 10-[7-(4-изо-тиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-аза-гептил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазазацикло-декана

15мкл ¹¹¹Индий (III) ацетатного раствора (350мКи), (полученного из ¹¹¹Индий (III) хлорида в 2М растворе ацетата натрия и доведенного до рН4,0 с помощью 0,1М хлористоводородной кислоты) добавляют к 135мкл раствора 1мг названного соединения примера 19b) в MES буфере, рН6,2 (MES = 2-(N-морфолино)-этилсульфоновая кислота). рН доводят до 4,2 добавлением 0,01М хлористоводородной кислоты. Перемешивают в течение 1 часа при 37°C при рН4,2. Доводят до рН6 при помощи 2М раствора ацетата натрия и добавляют 10мкл 0,1М раствора Na₂EDTA (Na₂EDTA = динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты), чтобы комплексовать избыток ¹¹¹Индий. Конечную очистку полученного таким образом меченого конъюгата (1h) проводят с помощью ЖХВР (вытеснительная хроматография: TSK-400/MES-буфер). Фракции, содержащие меченый конъюгат, разбавляют обычным физиологическим раствором, доводят до рН7,2 с помощью 0,01М раствора гидроксила натрия и фильтруют. Полученный таким образом раствор представляет препарат, пригодный для радиодиагностики.

Пример 20.

а) 5'(6-Амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир 35-мерного олигонуклеотида 5'-Т***Т***Т***Т***TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAAUGAGAAU-3'

30-мерный олигонуклеотид 5'- TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAAUGAGAAU-3' (послед. №13 Пат. США №5270163), идентифицированный по SELEX способу, получают обычным путем в автоматическом синтезаторе Pharmacia Company (смотри Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed. F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид также присутствует на колонке твердого носителя. Четыре конечных тимидина связывают фосфородитиоатами с тимидином, присутствующим на 5'-конце согласно технике, описанной G. Blaton et al. In "Oligonucleotides and Analogues", pp. 109 - 135. Для

этой цели сначала 5'-гидрокси группу открывают путем обработки с трихлоруксусной кислотой. Затем 3'-гидрокси группу 5'-DMTO-тиридина превращают с помощью трис-пирролидинофосфина и тет-разола в диамидит, который превращают в фосфоротиоамидит путем добавления 2,4-дихлорбензил меркаптана. Это соединение активируют тетразолом и подвергают взаимодействию с 5'-гидрокси группой олигонуклеотида в тиофосфаттриэфир. Окисление в фосфородитиоат происходит с помощью элементарной серы в растворе дисульфида углерода, пиридина, триэтиламина 95:95:10. Бензильные группы еще не удалены. Аналогичным путем также связывают 3 дополнительных тимидина. Нагрузка на колонку составляет около 10мг 35-мерного олигонуклеотида. Затем 5'-гидрокси группу снова открывают.

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

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

8мг названного соединения получают в виде бесцветного порошка.

б) Конъюгат 5'(6-Амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-T***T***T***T***TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUGAGAUU-3' и

10-[7-(4-изотиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-азагептил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тет-раазаациклододекана

8мг олигонуклеотида, полученного в примере 20а), растворяют в 2,5мл NaHCO₃/Na₂CO₃ буфера (рН8,0) и смешивают с 1мл

10-[7-(4-изотиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-азагептил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетра-азаациклододекана (названное соединение примера 1f). Перемешивают в течение 5 часов при комнатной температуре, затем доводят рН до 7,2 с помощью 0,1М хлористоводородной кислоты, и раствор подвергают ультрафильтрации через мембрану с пределом эксклюзии 3000 (Amicon YM3) и затем лиофильно сушат. Получают 7мг требуемого конъюгата.

с) ¹¹¹Индий комплекс конъюгата 5'(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида 5'-T***T***T***T***TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUGAGAUU-3' и 10-[7-(4-изотиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-азагептил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тет-раазаациклододекана

15мкл ¹¹¹Индий (III) ацетатного раствора (350мкКи), (полученного из ¹¹¹Индий (III) хлорида в 2М растворе ацетата натрия и доведенного до рН4,0 с помощью 0,1М хлористоводородной кислоты) добавляют к 135мкл раствора 1мг названного соединения примера 20b) в MES буфере, рН 6,2 (MES = 2-(N-морфолино)-этилсульфоновая кислота). рН доводят до 4,2 добавлением 0,01М хлористоводородной кислоты. Перемешивают в течение 1 часа при 37°C при рН4,2. Доводят до рН6 при помощи 2М раствора ацетата натрия и добавляют 10мкл 0,1М раствора Na₂EDTA = динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, чтобы комплексовать избыток ¹¹¹Индия. Конечную очистку полученного таким образом конъюгата (1h) проводят с помощью ЖХВР (вытеснительная хроматография: TSK-400/ME3-буфер). Фракции, содержащие меченый конъюгат, разбавляют обычным физиологическим раствором, доводят до рН7,2 с помощью 0,01М раствора гидроксида натрия и фильтруют. Полученный таким образом раствор представляет препарат, пригодный для радиодиагностики.

Пример 21.

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

Получают 30-мерный олигонуклеотид 3'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT***T***T***T-3', идентифицированный по SELEX способом, с модификацией последовательности T***T***T***T-3', расположенной против хода транскрипции, причем сначала получают последовательность из 5 тимидинов, соединенных цианоэтилфосфатными группами на носителе при 3'. Посредством реакции этого соединения с 0,5М раствором тетраэтилпирам дисульфида в ацетонитриле, сульфирование в фосфонотиоат происходит в течение 15 минут, что и является затем со свободной 5'-гидроксильной группой исходным веществом для 35-мерного олигонуклеотида. Полный синтез происходит обычным путем в автоматическом синтезаторе Pharmacia Company (смотри Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed. F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид все еще присутствует на колонке твердого носителя. Посредством взаимодействия с раствором трихлоруксусной кислоты в дихлорметане, 5'-гидрокси открывают. Нагрузка на колонку составляет около 10мг 35-мерного олигонуклеотида. Чтобы соединить линкер, колонку подвергают взаимодействию с ацетонитрильным раствором 50мкмоль В-цианоэтил-N,N'-диизопропиламино-6-(трифторацетамидо)-1-гексил-фосфорамидита (полученного согласно Nucl. Acids. Res. 16, 2659 - 2669 (1988)) в присутствии тетразола. Окисление полученного таким путем фосфита

в полностью защищенный фосфотриэфир проводят с помощью йода в тетрагидрофуране. Затем колонку промывают последовательно метанолом и водой. Чтобы удалить модифицированный олигонуклеотид от твердого носителя и отщепить цианоэтильные группы, содержимое колонки транспортируют в мультиампулу, смешивают с 5мл 30% раствора аммиака, сосуд герметизируют и подвергают встряхиванию на протяжении ночи при 55°C. Затем охлаждают до 0°C, центрифугируют, носитель промывают 5мл воды, и объединенные водные фазы подвергают лиофильной сушке.

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

8мг названного соединения получают в виде бесцветного порошка.

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

5' -CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAУАТ ^{***Т***Т***Т-3'} и

10-[7-(4-изотиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-азагептил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаацико-додекана

8мг олигонуклеотида, полученного в примере 20a), растворяют в 2,5мл NaHCO₃/Na₂CO₃ буфера (рН8,0) и смешивают с

10-[7-(4-изотиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-азагептил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаацико-додекана (названное соединение примера 1f). Перемешивают в течение 5 часов при комнатной температуре, затем доводят рН до 7,2 с помощью 0,1М хлористоводородной кислоты, и раствор подвергают ультрафильтрации через мембрану с пределом эксклюзии 3000 (Amicon УМ3) и затем лиофильно сушат. Получают 7мг требуемого конъюгата.

с) ¹¹¹Индий комплекс конъюгата 5'-(6-амино-1-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 35-мерного олигонуклеотида

5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAУАТ^{***Т***Т***Т***Т-3'} и

10-[7-(4-изотиоцианатофенил)-2-гидрокси-5-оксо-7-(карбоксиметил)-4-азагептил]-1,4,7-трис-(карбоксиметил)-1,4,7,10-тетраазаацико-додекана

15мкл ¹¹¹Индий (III) ацетатного раствора (350мкКи), (полученного из ¹¹¹Индий (III) хлорида в 2М растворе ацетата натрия и доведенного до рН4,0 с помощью 0,1М хлористоводородной кислоты) добавляют к 135мкл раствора 1мг названного соединения примера 21b) в MES буфере, рН6,2 (MES = 2-(N-морфолино)-этилсульфоная кислота). рН доводят до 4,2 добавлением 0,01М хлористоводородной кислоты. Перемешивают в течение 1 часа при 37°C при рН4,2. Доводят до рН6 при помощи 2М раствора ацетата натрия и добавляют 10мкл 0,1М раствора Na₂EDTA = динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, чтобы комплексовать избыток ¹¹¹Индия. Конечную очистку полученного таким образом конъюгата (1h) проводят с помощью ЖХВР (вытеснительная хроматография: TSK-400/ME3-буфер). Фракции, содержащие меченый конъюгат, разбавляют обычным физиологическим раствором, доводят до рН7,2 с помощью 0,01М раствора гидроксида натрия и фильтруют. Полученный таким образом раствор представляет препарат, пригодный для радиодиагностики.

Пример 22.

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

12,56г (0,1моль) гидрохлорида метилового эфира глицина, 13,42г (0,1моль) 2,5-дитиа-циклогексанона и 10,12г (0,1моль) триэтиламина растворяют в атмосфере аргона в 500мл абсолютного дихлорметана. Перемешивают в течение 24 часов при комнатной температуре, и затем загрузку выливают на 250мл 5% водной лимонной кислоты. Хорошо перемешивают, органическую фазу отделяют и сушат над сульфатом натрия. После выпаривания растворителя в вакууме маслянистый остаток хроматографируют на силикагеле (подвижный растворитель: дихлорметан/метанол, метанол 0 - 10%).

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

Элементный анализ:

Рассч.	C	37,65	H	5,87	N	6,27	O	21,49	S	28,71
Найд.	C	37,43	H	6,02	N	6,12			S	28,48

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

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

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

Элементный анализ:

Рассч.	C	67,07	H	5,85	N	3,01	O	10,31	S	13,77
Найд.	C	67,01	H	6,11	N	2,93			S	13,49

с) N-[5-(Трифенилметилмеркапто)-3-тиа-1-оксо-пент-1-ил]-глицин-N'-(6-гидроксигексил)-амид

11,64г (25ммоль) N-[5-(трифенилметилмеркапто)-3-тиа-1-оксо-пент-1-ил]-глицин метилового эфира (пример

22b) и 29,3г (250ммоль) 6-аминогексанола сплавляют вместе в атмосфере аргона в течение 16 часов при 100°C. После охлаждения реакционной смеси, ее помещают в 500мл дихлорметана, и затем в 250мл 5% водной лимонной кислоты. При охлаждении и перемешивании, pH доводят до 6,5 концентрированной хлористоводородной кислотой. Органическую фазу отделяют и сушат над сульфатом натрия. После выпаривания растворителя в вакууме маслянистый остаток хроматографируют на силикагеле (подвижный растворитель: дихлорметан/метанол, 0 - 10% метанол).

Выход: 7,7г (56,0%), бесцветное масло

Элементный анализ:

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

d)

N-Диизопропил-О-цианоэтил-О'-[7,9-диаза-8,11-диоксо-13-тиа-15-(трифенил-меркапто)-пентадек-1-ил]-фосфорная кислота амид

5,51г (10ммоль) N-[5-(Трифенилметилмеркапто)-3-тиа-1-оксо-пент-1-ил]-глицин-N'-(6-гидроксигексил)-амида (пример 22c) растворяют в 50мл абсолютного дихлорметана и 50мл абсолютного пиридина. 4,73г (20ммоль) хлорангидрида диизопропиламино-О-цианоэтил-фосфористой кислоты, растворенного в 50мл абсолютного дихлорметана, вливают по каплям в загрузку при комнатной температуре. Через 4 часа содержимое выливают на 250мл насыщенного водного раствора бикарбоната натрия, перемешивают, и органическую фазу сушат над сульфатом магния. После испарения растворителя маслянистый остаток хроматографируют на силикагеле (дихлорметан/метанол/триэтиламин 98:1:1).

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

Элементный анализ:

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

e) 5'-[N-(3'-Аза-8'-меркапто-1',4'-диоксо-6'-тиа-окт-1'-ил)-6-аминогексил-фосфорная кислота сложный эфир] 5' -CUC AUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T*T-3'

30-мерный олигонуклеотид 5'-CUC AUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T*T-3', идентифицированный по SELEX способом, с модификацией последовательности T*T*T*T-3', расположенной против хода транскрипции, получают с помощью автоматического синтезатора Pharmacia Company (смотри Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed. F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), и олигонуклеотид в защищенной форме все еще присутствует на колонке твердого носителя. Нагрузка на колонку составляет около 15мг 35-мерного олигонуклеотида. После отщепления 5'-DMT-защитной группы, его связывают согласно стандартным методам с фосфорамидитом, описанным в примере 22d). После окисления йодом в тетрагидрофуране, конъюгат отщепляют от носителя. Для этой цели вещество смешивают с 10мл 30% раствора аммиака и подвергают встряхиванию на протяжении ночи при 55°C. Затем охлаждают до 0°C, центрифугируют, носитель промывают 10мл воды, и объединенные водные фазы лиофилизируют. Для очистки вещество помещают в 5мл воды, добавляют 4мл 0,5моль, ацетата аммония и смешивают с 20мл этанола. Для полного осаждения охлаждают в течение ночи (-20°C), центрифугируют, и остаток промывают 1мл этанола (-20°C) и сушат в вакууме. Получают 9,5мг белого порошка. Для отщепления S-трифенил-защитной группы вещество помещают в 5мл 50 ммоль раствора ацетата триэтиламмония (pH=7) и инкубируют с 500мкл 0,1М раствора нитрата серебра в течение 30 минут. Затем добавляют 500мкл 0,14М раствора дитиотреитола и инкубируют в течение еще 30 минут. После центрифугирования прозрачный супернатант обессоливают на Сефадексе G 10. Фракции, содержащие продукт, сушат вымораживанием. Получают 3,5мг белого порошка.

f) Tc-99m Комплекс 5'-[Ы-(3'-Аза-8'-меркапто-1',4'-ди-оксо-6'-тиа-окт-1'-ил)-6-аминогексил-фосфорная кислота сложный эфир] 5'-CUC AUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T*T-3'

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

Пример 23.

a) 5'-[N-(6'-Аза-7'-гидроксикарбоксо-9'-меркапто-1',5'-диоксо-3'-тиа-нон-1'-ил)-6-аминогексил-фосфорная кислота сложный эфир] 5'-CUC AUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T*T-3'

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

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

вымораживанием получают 2мг конъюгата в виде белого порошка.

Тс-99m Комплекс

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

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

Пример 24.

а) 5'-[N-(Меркаптоацетил)-6-аминогексилфосфорная кислота сложный эфир] 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*Т*Т*Т*Т-3'

10мг 5'-(6-амино-гексил-фосфорная кислота сложный эфир) 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*Т*Т*Т*Т-3', полученного в примере 1, растворяют в 1мл бикарбонат натрия/карбонат натрия буфера (рН=8,0). Затем 23,1мг (0,1 ммоль) сложного эфира S-ацетилмеркаптоуксусной кислоты -NHS, растворенного в 500мкл абсолютного ДМФ, добавляют к загрузке и инкубируют в течение 17 часов при комнатной температуре в атмосфере аргона. Затем центрифугируют, концентрируют до объема 500мкл и хро-матографируют на Сефадексе G-25. После сушки вымораживанием получают 3мг конъюгата в виде белого порошка.

б) Тс-99m Комплекс 5'-[N-(меркаптоацетил)-6-аминогексил-фосфорная кислота сложный эфир] 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*Т*Т*Т*Т-3'

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

Пример 25.

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

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

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

Элементный анализ:

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

б) 5'-[N-(1',5'-Диоксо-6'-аза-3'-тиа-8'-меркапто-окт-1-ил)-аминогексилфосфорная кислота сложный эфир] 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*Т*Т*Т*Т-3'

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

Раствор 10мг 5'-(6-аминогексил-фосфорная кислота сложный эфир) 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*Т*Т*Т*Т-3' в 1мл бикарбонат натрия/карбонат натрия буфера (рН=8,0), описанного в примере 1, смешивают с 500мкл раствора NHS-эфира, полученного заранее. Инкубируют в течение 16 часов при комнатной температуре. Затем концентрируют путем выпаривания до объема 500мкл и хроматографируют на Сефадексе G-25. Получают 6мг S-тримитил-защищенного соединения. Отщепление S-тримитил-защитной группы, изоляцию олигонуклеотида, несущего SH группы, и очистку проводят, как описано в примере 22е. Получают 4мг белого лиофилизата.

б) Тс-99m Комплекс 5'-[N-(1',5'-Диоксо-6'-аза-3'-тиа-8'-меркапто-окт-1-ил)-аминогексилфосфорная кислота сложный эфир] 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*Т*Т*Т*Т-3'

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

Пример 26.

N,N'-Бис-[2-(трифенилметилмеркапто)-1-оксо-эт-1-ил]-3,4-диаминобензойная кислота метиловый эфир 3,32г (20ммоль) метилового эфира 3,4-диаминобензойной кислоты и 13,38г (40ммоль) S-трифенилметил-меркаптоуксусной кислоты растворяют в 200мл абсолютного дихлорметана. При 0°С 8,25г (40ммоль) дициклогексилкарбодиимида, растворенного в 100мл абсолютного дихлорметана, вливают по капле в загрузку.

Перемешивают в течение более 1 часа при 0°С и, наконец, в течение более 16 часов при комнатной температуре. Фильтруют, встряхивают с 1% водной лимонной кислотой, и органическую фазу сушат над

сульфатом натрия, и растворитель испаряют в вакууме. Остаток хроматографируют на силикагеле (подвижный растворитель: дихлорметан/метанол, 0 - 10% метанола).

Выход: 10,2г (63,8%), бесцветное масло

Элементный анализ:

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

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

Выход: 3,56г (45,4%), бесцветное масло

Элементный анализ:

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

c) 5'-(N-[3',4'-Бис-(2"-меркаптоацетиламино)-бензоил]-6-аминогексилфосфорная кислота сложный эфир} 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T-3'

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

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

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

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

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

Пример 27.

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

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

Кристаллизуют неоднократно из смеси этилацетат/н-пентан.

Выход: 12,5г (36,2%), белый порошок.

Элементный анализ:

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

b) N-[О-Ацетил-гидроксиацетил]-глицил-глицил-глицин 3,45г (10ммоль) N-[О-Ацетил-гидроксиацетил]-глицил-глицил-глицин-трет-бутилового эфира перемешивают в 50мл трифторуксусной кислоты в течение 15 минут. Затем выливают в 500мл абсолютного диэтилового сложного эфира, и продукт отфильтровывают. Неоднократно перекристаллизовывают из смеси этилацетат/н-пентан.

Выход: 1,23г (42,5%), белый порошок.

Элементный анализ:

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

c) 5-{N-[N'-Гидроксиацетил]глицил-глицил-глицил]-6-амино-гексилфосфорная кислота сложный эфир} 5'

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

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

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

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

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

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

Из вышеприведенного описания специалист в данной области техники может легко установить существенные характеристики данного изобретения, и не выходя за рамки сущности и объема его, может провести различные изменения и модификации изобретения, чтобы адаптировать его к различным использованиям и условиям.

Формула винаходу

1. Олигонуклеотидный конъюгат, состоящий из олигонуклеотидного радикала N и n заместителей (B-K), в которых

B обозначает непосредственную связь или связующий компонент с олигонуклеотидным радикалом, и K обозначает комплексобразующий агент или комплекс изотопов радиоактивного металла или стабильных изотопов, которые

- становятся радиоактивными под воздействием внешнего облучения,

- превращают внешнее облучение в облучение различной природы, различной энергии и/или различной длины волны элементов с атомными номерами 5, 21-29, 31, 39, 42-44, 49, 57-83 или 85, отличающийся тем, что олигонуклеотидный радикал N содержит модификацию, которая препятствует или, по крайней мере, ингибирует деградацию встречающимися в природе нуклеазами, и в которых олигонуклеотид связывается специфически с высоким связывающим средством со структурой-мишенью.

2. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что имеет общую формулу (I)

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

в которой N представляет собой олигонуклеотид, который связывается специфически с высоким связывающим средством с другими структурами-мишенями и имеет модификации, которые существенно понижают деградацию встречающимися в природе нуклеазами,

B представляет собой химическую связь или связующий компонент, который образует связь между N и K, и K представляет собой комплексобразующий лиганд, который может проявлять себя как сигнал-передающий или терапевтический активный элемент, и n является числом от 1 до 10.

3. Конъюгат по пп. 1 или 2, отличающийся тем, что N представляет собой олигонуклеотид с 5-200 нуклеотидами, где

a) 2'-положение сахаридного звена, независимо друг от друга, занято следующими группами:

группой -OR, в которой R представляет алкильный радикал с 1-20 углеродными атомами, который произвольно содержит до 2 гидроксильных групп и который произвольно прерывается 1-5 атомами кислорода, атом водорода, гидроксильную группу, атом фтора, аминный радикал, аминогруппу и гидроксильные группы, расположенные в концевых положениях 3' и 5', независимо друг от друга, произвольно этерифицированы радикалом R и/или

b) фосфодиэфиры, которые необязательно используются в качестве межнуклеотидной связи, независимо друг от друга, замещены фосфоритоатами, фосфордитиоатами и/или алкилфосфонатами, предпочтительно метилфосфонатом, и/или

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

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

е) он содержит фосфодиэфирную связь, описанную в б), которая соединяет, подобно сложноэфирной, два тимидина, соответственно, при помощи C₂-C₁₀ гидроксилалкильного радикала в 3-положении или соединяет аналогично замещенный тимидиновый радикал, подобно сложноэфирной, с гидроксильной группой другого сахара в 2'-, или 3'-, или 5'-положении, и/или

ф) концевые радикалы в 3'- и 5'-положениях содержат межнуклеотидные связи, произвольно модифицированные, как описано в б).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

9. Конъюгат по п. 8, отличающийся тем, что В, который связан с 4'-концом олигонуклеотидного радикала N, урезанным в 4-положении на СН -ОН группу или с 3'-концом олигонуклеотидного радикала N, уменьшенным в 3-положении на атом водорода, в котором В имеет общую формулу X-Y-Z¹, который соединен со стороны X с комплексобразующим агентом или комплексом и со стороны Z - с олигонуклеотидом, в котором

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

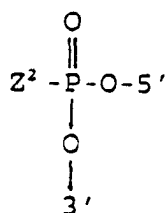
Y представляет собой неразветвленную цепь, разветвленную цепь, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкиленовую цепь, которая произвольно содержит 1-2 циклогексилена, 1-5 имино, 1-3 фенилена, 1-3 фениленимино, 1-3 фениленокси, 1-3 гидроксифенилена, 1-5 амидо, 1-2 гидразида, 1-5 карбонила, 1-5 этиленокси, уреидо, тиюреидо, 1-2 карбоксиалкилимино, 1-2 сложноэфирные группы, 1-3 группы Ag, где Ag обозначает насыщенное или ненасыщенное 5- или 6-членное кольцо, которое произвольно содержит 1-2 гетероатома, выбранных из азота, кислорода и серы и/или 1-2 карбонильные группы; 1-10 кислородов, 1-5 азотов и/или 1-5 атомов серы, и/или произвольно замещена 1-5 гидрокси, 1-2 меркапто, 1-5 оксо, 1-5 тиоксо, 1-3 карбокси, 1-5 карбокси-C₁-C₄-алкильными, 1-5 сложноэфирными, 1-3 amino, 1-3 гидрокси-C₁-C₄-алкильными, 1-3 C₁-C₇ -алкокси группами и

Z¹ представляет собой -CONH-CH₂-4', -NH-CO-4', -O-P(O)R¹-NH-CH₂-4', -O-P(O)R¹-O-CH₂-4', -O-P(S)R¹-O-3'

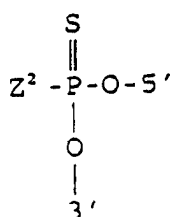
или $-O-P(O)R^1-O-3'$, в котором $4'$ или $3'$ указывает связь с концевым сахаридным звеном(ями) и R^1 представляет собой O^- , S^- , C_1-C_4 алкильную или NR^2R^3 группу, причем R^2 и R^3 означают водород или C_1-C_4 алкильные радикалы.

10. Конъюгат по п. 8, отличающийся тем, что В, который связан с фосфодиэфирным мостиком (ами), уменьшенным на OH группу (ы), каждый между двумя нуклеотидами, имеет обычную формулу $X-Y-Z^2$, который соединен со стороны X с комплексообразующим агентом или комплексом и со стороны Z с олигонуклеотидом, в котором

Z^2 в мостике, связывающем два соседних сахаридных звена,



и/или



представляют собой группу $-NR^2-$, $-O-$ или $-S-$,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15. Способ обнаружения структуры-мишени, в котором одно или более из соединений по любому из пп. 1-12 вводят вместе с образцом, подлежащим исследованию *In vivo* или *In vitro*, и основанный на сигнале, с помощью

которого определяют, присутствует ли в образце структура-мишень, с которой олигонуклеотид N связывается специфически с высоким связывающим сродством.

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

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

10

15

20

25

30

35

40

45

50

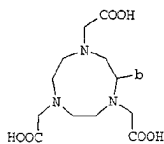
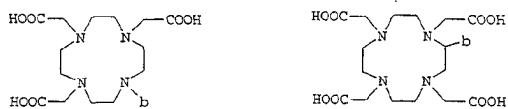
55

60

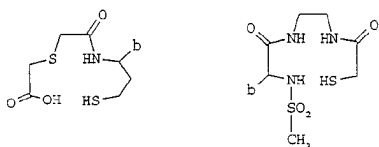
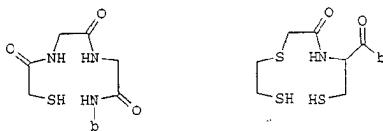
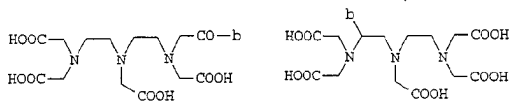
65

U A 4 8 1 4 0 C 2

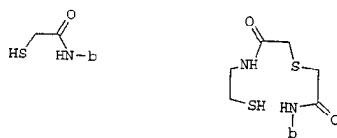
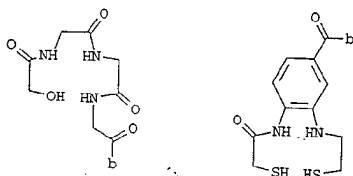
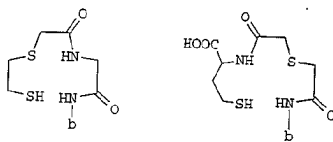
U A 4 8 1 4 0 C 2



Pr. 1.



Pr. 2.



Pr. 3.

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2002, N 8, 15.08.2002. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

U A 4 8 1 4 0 C 2

U A 4 8 1 4 0 C 2