

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 51/04
A61K 41/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 95194000.7

[45] 授权公告日 2005 年 9 月 21 日 [11] 授权公告号 CN 1219551C

[22] 申请日 1995.6.30 [21] 申请号 95194000.7 [30] 优先权 [32] 1994.7.14 [33] DE [31] P4424922.5 [32] 1994.12.5 [33] DE [31] P4445078.8 [86] 国际申请 PCT/EP1995/002539 1995.6.30 [87] 国际公布 WO1996/002274 英 1996.2.1 [85] 进入国家阶段日期 1997.1.7 [71] 专利权人 舍林股份公司 地址 联邦德国柏林 共同专利权人 奈克斯塔药物公司 [72] 发明人 L·丁凯尔伯格 C-S·希尔格 U·尼德巴拉 J·普拉特泽克 B·拉杜彻尔 U·斯佩克 L·戈尔德 W·派肯 审查员 盛 倩	[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利 商标事务所 代理人 李 瑛 权利要求书 5 页 说明书 66 页 附图 3 页
---	--

[54] 发明名称 由金属络合物和寡核苷酸制备的共轭物

[57] 摘要

本发明涉及经化学修饰的寡核苷酸共轭物含有经连接组分与寡核苷酸相结合的络合剂或络合物。在这种情况下，以能够防止或至少是显著抑制由天然存在的核酸酶产生的降解作用的方式修饰寡核苷酸。寡核苷酸残基可以特异地并以高结合亲和力结合靶结构，并因此能够借助被结合的络合剂或络合物产生特异的治疗或诊断效果。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 由寡核苷酸残基N和n个取代基(B-K)组成的寡核苷酸共轭物, 其具有通式(I)



其中N是具有15-100个核苷酸的寡核苷酸, 能以高结合亲和力与靶结构特异性结合, 并具有防止或至少显著降低天然存在的核酸酶所致的降解作用的修饰作用,

B是在N和K之间产生连接作用的化学键或连接组分, 而K表示放射性金属同位素的络合剂或络合物或稳定性同位素, 所述稳定性同位素,

- - 可被外部辐射作用转化成放射性同位素, 或者
- - 可将外部的辐射转化成不同质量、不同能量和/或不同波长的辐射线,

其中同位素的元素的原子数是5、21-29、31、39、42-44、49、57-83或85,

n是1至10之间的数字,

其中:

a) 寡核苷酸残基上的糖单位的2'位置可以彼此无关地为下列基团:
OR基, 其中: R表示具有1-20个碳原子的烷基, 其可选择性地含有最多2个羟基, 并可选择性地插入1-5个氧原子,

氢原子,

羟基,

氟原子,

胺基团,

氨基,

而且, 存在于3'和5'末端位置上的羟基可以彼此独立地、可选择性地被R基醚化, 和/或

b) 可以选择性地用作核苷酸间键的磷酸二酯彼此独立地可以被硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或烷基磷酸酯取代, 和/或

c) 3'和5'位的末端基团彼此由b)中所述的核苷酸间键以分子

内的方式连接, 和/或

d) 该寡核苷酸共轭物含有 b) 中所述的核苷酸间键, 连接3' - 3' 位或5' - 5' 位, 和/或

e) 含有如 b) 所述的磷酸二酯键, 由存在于3位上的C₂-C₁₀羟烷基分别酯样地连接两个胸苷, 或者是将类似取代的胸苷基团酯样地与2' 位或3' 位或5' 位上另一个糖的羟基连接, 和/或

f) 3' 位和5' 位的末端基团含有如 b) 所述可选择性修饰的核苷酸间键。

2. 权利要求1的寡核苷酸共轭物, 其中b) 中的烷基磷酸酯是磷酸甲酯。

3. 根据权利要求1的寡核苷酸共轭物, 其中N代表寡核苷酸, 能以高结合亲和力与其它靶结构特异性结合, 并能够通过下列方式获得: 使随机序列之寡核苷酸混合物与所述靶结构一起接触, 某些寡核苷酸与所述寡核苷酸混合物相比表现出与靶结构的亲和力增强, 将后者从寡核苷酸混合物剩余物中分离出来, 然后扩增具有增强了与靶结构的亲和力的寡核苷酸, 以获得显示结合在靶结构上的寡核苷酸的比例增加的寡核苷酸混合物。

4. 如权利要求1所述的寡核苷酸共轭物, 其中N为寡核苷酸, 可以高结合亲和力与其它靶结构特异性结合, 并能够经下述步骤获得:

a) 首先, 经化学合成法产生DNA链, 使得该DNA链在3' 端具有一段限定的序列, 其与RNA聚合酶的启动子互补, 并同时与聚合酶链反应PCR的引物互补; 并且还使得该DNA链在5' 端具有一段限定的序列, 其与聚合酶链反应的引物序列互补, 而被限定序列之间的序列含有一段随机序列, 而且

b) 该DNA链在RNA聚合酶的帮助下、并向聚合酶提供在核糖单位的2' 位上被修饰的核苷酸而转录为互补的RNA链, 而且

c) 使如此产生的RNA寡核苷酸与其上欲特异性结合寡核苷酸的靶结构一起接触, 并且

d) 将那些已经结合于靶结构上的寡核苷酸首先与靶结构一起与未

结合的寡核苷酸分开,然后再将结合的寡核苷酸与靶结构分开,并且

e) 将这些靶结构特异性的RNA寡核苷酸在反转录酶的帮助下转录为互补的DNA链,并且

f) 利用所定义的引物序列以聚合酶链反应扩增这些DNA链,并且

g) 然后将以这种方式扩增的DNA寡核苷酸在RNA聚合酶的帮助下和使用修饰的核苷酸再次转录为RNA寡核苷酸,并且

h) 上述的选择步骤c) - g)可以选择性地进行重复,通常直至以与靶结构有高结合亲和力为特征的寡核苷酸能被充分地选择,然后,对如此所得的寡核苷酸序列可选择性地进行测序。

5. 根据权利要求4的寡核苷酸共轭物,其中的靶结构选自大分子、高等生物动物或人的组织结构、动物或人的器官或器官部分、细胞、肿瘤细胞或肿瘤。

6. 根据权利要求1的寡核苷酸共轭物,其中的连接组分B结合于:

a) 4' 位被 $\text{CH}_2 - \text{OH}$ 基还原的寡核苷酸基团N的4' 末端和/或

b) 3' 位被氢原子还原的寡核苷酸基团N的3' 末端和/或

c) 位于每两个核苷酸之间、被 OH 基还原的磷酸二酯键和/或

d) 分别在5位和8位被氢原子还原的1-10个核酸碱基和/或2位、4位、和6位的氨基。

7. 根据权利要求6的寡核苷酸共轭物,其中在a) 或b) 中的寡核苷酸共轭物中B具有通式 $\text{X} - \text{Y} - \text{Z}^1$,其在X侧与络合剂或络合物连接,在Z侧与寡核苷酸连接,其中

X表示直接键, $-\text{NH}$ 或 $-\text{S}$ 基,

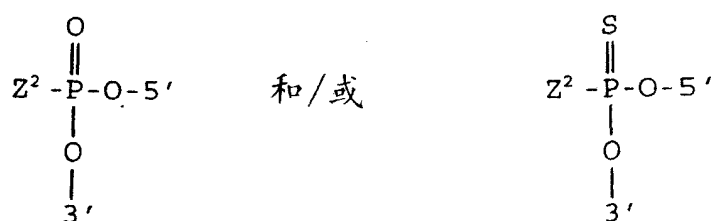
Y表示直链、支链、饱和或不饱和 $\text{C}_1 - \text{C}_{20}$ 亚烷基链,其可选择性地含有: 1-2个亚环己基、1-5个亚氨基、1-3个亚苯基、1-3个亚苯基亚氨基、1-3个亚苯氧基、1-3个亚羟苯基、1-5个酰氨基、1-2个酰肼基、1-5个羰基、1-5个亚乙氧基、脲基、硫脲基、1-2个羧基烷基亚氨基、1-2个酯基、1-3个 Ar 基,其中 Ar 表示饱和或不饱和5元环或6元环,其可选择性地含有选自氮、氧、和硫的1-2个杂原子和/或1-2个羰基; 1-10个氧、1-5个氮和/或1-5个硫原子,和/或可选择性地由

1-5个羟基、1-2个巯基、1-5个氧代、1-5个硫代、1-3个羧基、1-5个羧基-C₁-C₄烷基、1-5个酯基、1-3个氨基、1-3个羟-C₁-C₄烷基、1-3个C₁-C₇烷氧基取代, 和

Z¹表示 -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' 或 -O-P(O)R¹-O-3', 其中4' 或3' 表示与末端糖单位的键接, R¹表示O⁻、S⁻、C₁-C₄烷基或NR²R³基, 所述R²和R³表示氢或C₁-C₄烷基。

8. 根据权利要求6的寡核苷酸共轭物, 其中在c) 的寡核苷酸共轭物中B的通式为X-Y-Z², 其在X侧与络合剂或络合物连接, 在Z侧与寡核苷酸连接, 其中,

位于连接两个相邻糖单位



的桥的Z²是-NR²、-O-或-S-基,

X表示直接键, -NH或-S基,

Y表示直链、支链、饱和或不饱和C₁-C₂₀亚烷基链, 其可选择性地含有: 1-2个亚环己基、1-5个亚氨基、1-3个亚苯基、1-3个亚苯基亚氨基、1-3个亚苯氧基、1-3个亚羟苯基、1-5个酰氨基、1-2个酰肼基、1-5个羰基、1-5个亚乙氧基、脲基、硫脲基、1-2个羧基烷基亚氨基、1-2个酯基、1-3个Ar基, 其中Ar表示饱和或不饱和5元环或6元环, 其可选择性地含有选自氮、氧、和硫的1-2个杂原子和/或1-2个羰基; 1-10个氧、1-5个氮和/或1-5个硫原子, 和/或可选择性地由1-5个羟基、1-2个巯基、1-5个氧代、1-5个硫代、1-3个羧基、1-5个羧基-C₁-C₄烷基、1-5个酯基、1-3个氨基、1-3个羟基-C₁-C₄烷基、1-3个C₁-C₇烷氧基取代, 和

R²表示氢原子或C₁-C₄烷基。

9. 根据权利要求6的寡核苷酸共轭物, 其中在d) 的寡核苷酸共轭物中B具有通式 $X-Y-Z^3$, Z^3 代表 $-NH$ 基或与核酸碱基的直接键,

X 表示直接键, $-NH$ 或 $-S$ 基,

Y 表示直链、支链、饱和或不饱和 C_1-C_{20} 亚烷基链, 其可选择性地含有: 1-2个亚环己基、1-5个亚氨基、1-3个亚苯基、1-3个亚苯基亚氨基、1-3个亚苯氧基、1-3个亚羟苯基、1-5个酰氨基、1-2个酰肼基、1-5个羰基、1-5个亚乙氧基、脲基、硫脲基、1-2个羧基烷基亚氨基、1-2个酯基、1-3个 A_r 基, 其中 A_r 表示饱和或不饱和5元环或6元环, 其可选择性地含有选自氮、氧、和硫的1-2个杂原子和/或1-2个羰基; 1-10个氧、1-5个氮和/或1-5个硫原子, 和/或可选择性地由1-5个羟基、1-2个巯基、1-5个氧代基、1-5个硫代基、1-3个羧基、1-5个羧基- C_1-C_4 烷基、1-5个酯基、1-3个氨基、1-3个羟基- C_1-C_4 烷基、1-3个 C_1-C_7 烷氧基取代,

10. 根据权利要求1的寡核苷酸共轭物, 其中作为成像成分的放射性金属同位素的络合物含有选自元素铜、铋、镅、铈或钆的放射性同位素。

11. 根据权利要求1的寡核苷酸共轭物, 其中N是非天然存在的对靶分子具有特异性结合亲和力的寡核苷酸配体, 所述靶分子具有三维化学结构, 而不是通过主要依靠Watson/Crick碱基配对或三股螺旋结合机理与所述寡核苷酸配体结合的多核苷酸, 其中所述的寡核苷酸配体并非具有被所述靶分子结合之已知生理学功能的核酸。

12. 检测靶结构的方法, 其中使一种或多种根据权利要求1-10之一的寡核苷酸共轭物在体外与所研究的样品一起接触, 基于所产生的信号检测样品中是否存在其上特异性且以高结合亲和力结合了寡核苷酸N的靶结构。

13. 权利要求1-10之一的寡核苷酸共轭物在制备用于放射诊断和/或放射治疗的药物中的应用,

14. 用于体内和/或体外检测靶结构的诊断试剂盒, 其中所述的诊断试剂盒含有至少一种权利要求1-10之一所述的寡核苷酸共轭物。

由金属络合物和寡核苷酸制备的共轭物

本发明涉及的目的之特征在于权利要求,即含络合剂或络合物的寡核苷酸共轭物。这些共轭物用于诊断和治疗领域。

成像诊断在过去的几十年中已取得了巨大进步,并正在得到进一步的发展。目前,在不需较多介入的情况下已有可能看见活体内的血管系统、大部分器官和许多组织。疾病在很多情况下都能得到诊断,因为疾病导致机体解剖学结构在形态、大小和位置方面发生清楚的变化。这类来自机体内的解剖学资料可通过X光技术、超声诊断和磁共振断层X射线照相术获得。通过利用增强所得照片中组织和体液的天然对比度的药物制剂可以改善上述每种方法的效果。为了改变体腔或脉管的对比,可以将研究的药物制剂导入体腔或注射到血管中。另外,它们通过机体的血流分散,并能够改变器官和组织的可见度。在一些例外的情况下,这类物质与机体的某些结构结合和/或由后者主动运输和/或排泄。借此也可以观察到个别情况时的功能,并用于诊断疾病。

与此相反,核诊断法是以其本身可被看见的物质为基础。在这种情况下,能发射长程射线的放射性同位素被导入体内,用适宜的检测仪可以追踪这些物质在机体中的扩散。核医学方法的优点在于被称为放射性药物的发射信号的放射性物质的低剂量高效性。

如果应用释放 α 射线、 β 射线或其它组织中有毒的毒性分解产物的同位素,则放射性药物还可以用于治疗目的,例如用于破坏肿瘤。也可以通过将无害的同位素或物质导入机体内,并仅仅借助例如中子或X射线辐射、超声或无线电波而转化为有治疗作用的有效形式。

一个普遍存在的问题是如何对不能得到所研究组织和器官的形状、结构和循环之清楚改变时的病理变化进行诊断和定位。这类诊断及跟踪例如在肿瘤疾病、感染性疾病以及代谢性疾病中具有决定

意义的重要性,其中所述肿瘤疾病的诊断包括寻找癌的转移和对组织供氧不足的评价。

目前可用的治疗和成像诊断学方法主要是取决于在另外不可测病变部位积聚的药物制剂的可得性。

现在经商业途径可得的对比介质被十分流行地称为非特异性制剂。它们在通过例如注射而导入的空间中进行被动扩散。

过去,已经证实许多物质和物质种类在体内的扩散能被检测或能够预料具有特异性。这方面的例子除了抗体外,还有凝集素、所有类型的受体结合物、细胞、膜和膜成分、核酸、天然代谢物及其衍生物以及无数的药物。人们已经并正在以特别的关注力研究肽。

美国专利 4,707,352 涉及用放射性同位素标记络合分子的具体方法,但没有描述特别适于结合金属离子的络合剂。

欧洲专利 EPA0285057 描述了核苷酸—络合剂共轭物,由于所用核苷酸在体内的不稳定性,所述共轭物不适于作为体内诊断剂或治疗剂,也很难满足可容性和药代动力学的其它要求。

许多美国专利,例如美国专利 4,707,440 涉及含有可检测化学基团的被修饰的聚合物。这些聚合物可以是聚核苷酸和寡核苷酸,但它们既不能稳定地对抗天然存在的核酸酶的降解,也不能通过特别的方法进行选择,因此它们以高结合亲和力与靶结构特异性结合。在美国专利 4,843,122 和 4,943,523 中介绍了这些可检测分子的具体实施方案。美国专利 4,952,685 要求了以上述方式修饰的各种核苷酸。美国专利 4,849,208 公开了这些试剂在成像方法中的应用。

本发明的目的是制备用于靶结构检测的特异性结合诊断剂,由此有可能观察到离体和在体的器官、组织及其病变。

目前已经发现,利用寡核苷酸共轭物可以达到上述目的,该共轭物除了寡核苷酸残基外还有通过直接化学键或连接成分结合的络合剂,并且其寡核苷酸残基被修饰以致可防止天然存在的核酸酶的降解作用,或者至少明显地抑制这一降解作用。

本发明的目的是:

1. 包括寡核苷酸残基 N 和 n 个取代基(B—K)的寡核苷酸共轭

物,其中 B 代表与寡核苷酸残基连接的直接键或连接成分,而 K 表示放射性金属同位素的络合剂或络合物或稳定性同位素,其

——可被外部辐射作用转化成放射性同位素,

——可将外部的辐射转化成不同性质、不同能量和/或不同波长的辐射,

其中元素的原子数是 5、21—29、31、39、42—44、49、57—83 或 85,其特征在于寡核苷酸残基 N 存在修饰,其能阻止或至少明显抑制由天然存在的核酸酶引起的降解作用。

2. 在优选的实施方案中,本发明的寡核苷酸共轭物具有通式 (I)



其中 N 是寡核苷酸,能以高结合亲和力与其它靶结构结合,并具有明显降低天然存在的核酸酶所致的降解作用的修饰,

B 是在 N 和 K 之间产生连接作用的化学键或连接成分;

K 是络合配体,其可存在信号发射或治疗活性成分;

n 是 1 至 10 之间的数字。

3. 根据 1 或 2 的化合物,其中的 n 是具有 5—200 核苷酸的寡核苷酸,其中:

a) 糖单位的 2' 位置彼此独立地为下列基团:

基团 OR, 其中: R 表示具有 1—20 个碳原子的烷基,其可选择性地含有最多 2 个羟基,并可选择性地掺杂 1—5 个氧原子,

氢原子,

羟基,

氟原子,

胺基团,

氨基,

而且,存在于 3' 和 5' 末端位置上的羟基可以彼此独立地、可选择性地与 R 基醚化,和/或

b) 可以选择性地用作核苷酸间键的磷酸二酯,彼此独立地被硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或膦酸烷基酯取代,优选的是膦酸甲酯,和/

或

c) 3'和 5'位的末端基团彼此由 b)中所述的核苷酸间键以分子间的方式连接, 和/或

d) 其含有 b)中所述的核苷酸间键, 连接 3'-3'位或 5'-5'位, 和/或

e) 其含有如 b)中所述的磷酸二酯, 由分别存在于 3 位上的 C_2-C_{20} 羟烷基酯样地连接两个胸苷, 或者是以类似物取代的胸苷基团醚样地与 2'位或 3'位或 5'位上另一个糖的羟基连接, 和/或

f) 3'位和 5'位末端基团含有如 b)所述可选择性修饰的核苷酸间键。

4. 根据 3 的化合物, 其中的寡核苷酸 N 包括 15—100 个核苷酸。

5. 根据 1—4 的化合物, 其中 N 是寡核苷酸其以高结合亲和力与其它靶结构特异性结合, 并能够从与靶结构相接触的含随机序列之寡核苷酸混合物中获得, 某些寡核苷酸相对于寡核苷酸混合物表现出与靶结构具有增强的亲和力, 将后者从寡核苷酸混合物剩余物中分开, 然后扩增具有增强了与靶结构的亲和力的寡核苷酸, 以获得存在结合在靶结构上的寡核苷酸的增加部分的寡核苷酸混合物。

6. 如 1—5 所述的化合物, 其中 N 为寡核苷酸, 其以高结合亲和力与其它靶结构特异性结合, 并能够经下述步骤获得:

a) 首先, 经化学合成法产生 DNA 链, 使得该 DNA 链在 3'端具有一段限定的序列, 其与 RNA 聚合酶的启动子互补, 并同时与聚合酶链反应(PCR)的引物互补; 并且还使得该 DNA 链在 5'端具有一段限定的序列, 其与聚合酶链反应的引物序列互补, 而被限定序列之间的序列含有一段随机序列, 而且

b) 该 DNA 链在 RNA 聚合酶的帮助下以互补的 RNA 链转录, 并向聚合酶提供核苷酸, 其在核糖单位的 2'位上被修饰, 而且

c) 将以上述途径产生的 RNA 寡核苷酸与其上特异性结合寡核苷酸的靶结构相接触, 并且

d) 将这些已经结合于靶结构上的寡核苷酸首先与靶结构一起从

未结合的寡核苷酸中分开,然后再将结合的寡核苷酸从靶结构中分开,并且

e)将这些靶结构特异性的 RNA 寡核苷酸在反转录酶的帮助下以互补的 DNA 链转录,并且

f)利用所定义的引物序列以聚合酶链反应扩增这些 DNA 链,并且

g)然后将以上述方式扩增的 DNA 寡核苷酸在 RNA 聚合酶的帮助下并以 RNA 寡核苷酸中修饰的核苷酸再次转录,并且

h)上述的选择步骤 c)—g)可以选择性地进行重复,通常直至以与靶结构有高结合亲和力为特征的寡核苷酸能被充分地选择,然后,如此选择性获得的寡核苷酸序列可被测定。

7. 根据 6 的化合物,其中的靶结构选自大分子、高等生物如动物或人的组织结构、动物或人的器官或器官部分、细胞、肿瘤细胞或肿瘤。

8. 根据 1—7 的化合物,其中的连接成分 B 结合于:

a)4'位被 $\text{CH}_2\text{—OH}$ 基团还原的寡核苷酸基团 N 的 4'末端和/或

b)3'位被氢原子还原的寡核苷酸基团 N 的 3'末端和/或

c)位于每两个核苷酸之间、被 OH 基团还原的磷酸二酯桥和/或

d)分别在 5 位和 8 位被氢原子还原的 1—10 核酸碱基和/或 2—、4—、和 6—位的氨基。

9. 根据 8a)或 8b)的化合物,其中 B 具有通式 X—Y—Z' ,其在 X 侧与络合剂或络合物连接,在 Z 侧与寡核苷酸连接,其中

X 表示直接键, —NH 或 —S 基,

Y 表示直链、支链、饱和或不饱和 $\text{C}_1\text{—C}_{20}$ 亚烷基链,其可选择性地含有:1—2 个亚环己基、1—5 个亚氨基、1—3 个亚苯基、1—3 个亚苯基亚氨基、1—3 个亚苯氧基、1—3 个亚羟苯基、1—5 个酰氨基、1—2 个酰肼基、1—5 个羰基、1—5 个亚乙氧基、脲基、硫脲基、1—2 个羧基烷基亚氨基、1—2 个酯基、1—3 个 Ar 基团,其中 Ar 表示饱和或不饱和 5 元环或 6 元环,其可选择性地含有选自氮、氧、和硫的 1—2 个杂原子和/或 1—2 个羰基;1—10 个氧、1—5 个氮和/或 1—5

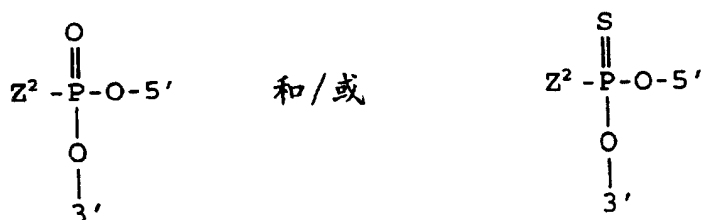
个硫原子,和/或可选择性地由1—5个羟基、1—2个硫基、1—5个氧代、1—5个硫代、1—3个羧基、1—5个羧—C₁—C₄烷基、1—5个酯基、1—3个氨基、1—3个羟基—C₁—C₄烷基、1—3个C₁—C₇烷氧基取代,而

Z¹表示—CONH—CH₂—4′、—NH—CO—4′、—O—P(O)R′—NH—CH₂—4′、—O—P(O)R′—O—CH₂—4′、—O—P(S)R′—O—3′或—O—P(O)R′—O—3′,其中4或3表示与末端糖单位的链接,R¹表示O[−]、S[−]、C₁—C₄烷基或NR²R³基,所述R²和R³表示氢和C₁—C₄烷基。

作为环结构(Ar),适合于尤其是具有3—6个碳原子,特别是5或6个碳原子的饱和或不饱和环状亚烷基其可选择性地含有杂原子,如N、S或O。作为例子可以提及的有:亚环戊基,亚吡咯基、亚呋喃基、亚苯硫基、亚咪唑基、亚噁唑基、亚噻唑基、亚吡唑基、亚吡咯烷基、亚吡啶基、亚嘧啶基、亚顺丁烯二酰亚氨基和亚邻苯二甲酰亚氨基。

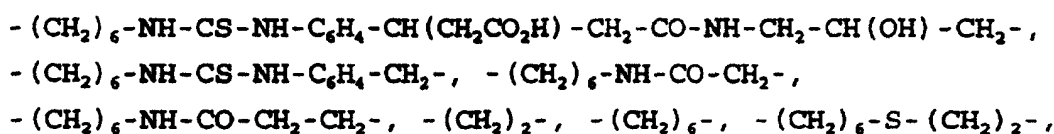
10. 根据8c)的化合物,其中B的通式为X—Y—Z²,其在X侧与络合剂或络合物连接,在Z侧与寡核苷酸连接,其中,

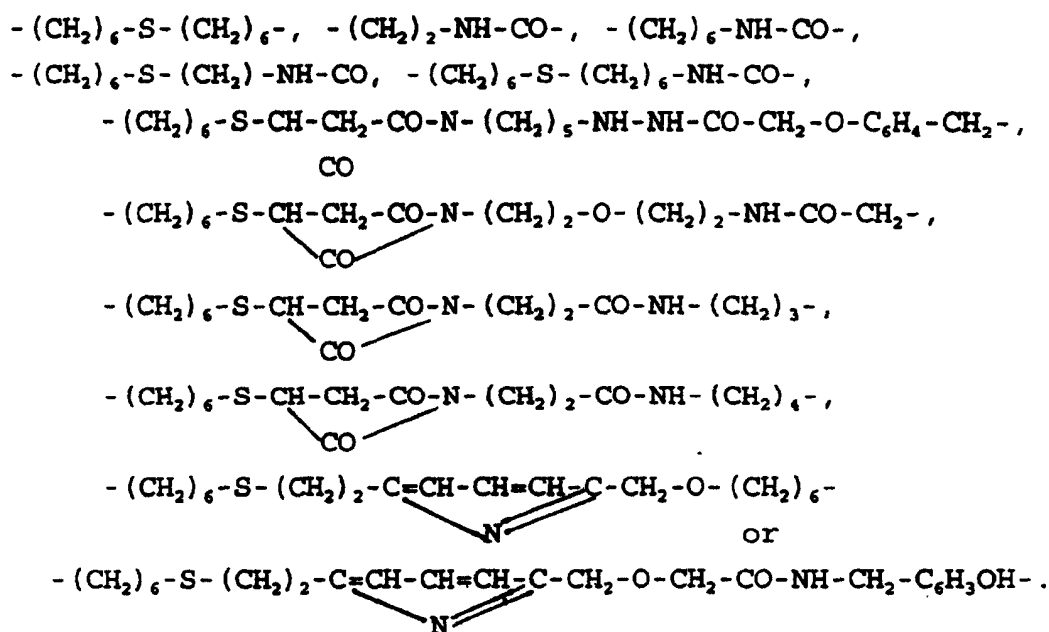
Z²在连接两个相邻糖单位的桥中



表示—NR²—、—O—或—S—基,而X、Y和R²具有第9点中指出的含义。

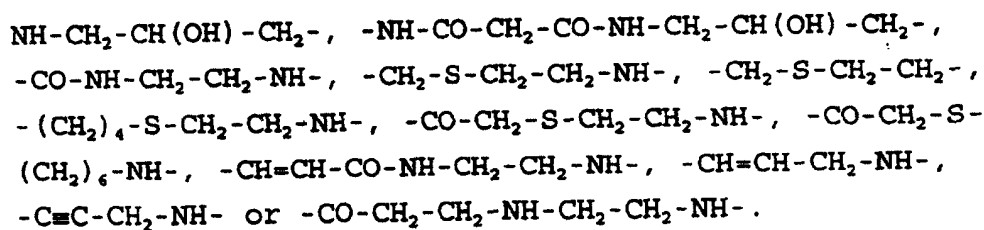
作为连接组分Z¹—Y—X(根据第9点)或Z²—Y—X(根据第10点)的基团Y,可以提及的作为所述基团的例子是





11. 根据 8d) 的化合物, 其中 B 具有通式 $X-Y-Z^3$, 这里 Z^3 代表 $-NH$ 基或与核酸碱基的直接键, 而 X 和 Y 具有权利要求 9 所指定的含义。

可以提及的作为所述基团的例子有 $-\text{CH}_2-\text{CO}-$



关于结合部位,对于嘌呤碱基而言,特别是8位是适宜的,而对于嘧啶碱基而言,5位是适宜的,单纯从形式上讲,在这种情况下,各个碱基的氢原子由B—K基团取代。但键接也能由在2位、4位或6位所选择性含有的氨基产生,因此,例如由鸟嘌呤中的2—氨基、腺嘌呤中的6—氨基或胞嘧啶中的4—氨基产生。在这种情况下,每个氨基的氢原子分别被B—K基团取代。

12. 根据在前各点之一的化合物, 其中作为成像成分的金属络合物含有放射性同位素, 其选自元素铜、铋、镅、镥或铟。

13. 本发明还包括检测靶结构的方法, 其中使一种或多种根据在

前各点之一的化合物在体内或在体外与所研究的样品相接触,基于所产生的信号检测样品中是否存在其上以特异性且高结合亲和力结合了寡核苷酸 N 的靶结构,以及

14. 一种疾病的非侵害性诊断方法,其中使一种或多种根据 1—12 点之一所述的化合物与所研究的靶结构在体内相接触,基于所产生的信号检测所研究的生物体中是否存在其上特异性地结合了寡核苷酸 N 的靶结构。

15. 本发明的目的还涉及根据 1—12 点的化合物在放射诊断和/或放射治疗中的应用,以及

16. 用于体内和/或体外检测靶结构的诊断试剂盒,其中诊断试剂盒含有至少一种根据 1—12 点的一种化合物。

17. 根据权利要求 1—4 之一的化合物,其中 N 是对靶分子具有特异性结合亲和力的非天然存在的寡核苷酸配体,所述靶分子具有三维化学结构,而不是通过主要依靠 Watson/Crick 碱基配对或三股螺旋结合机理与所述寡核苷酸配体结合的多核苷酸,其中所述的寡核苷酸配体并非具有被所述靶分子结合之已知生理学功能的核酸。

如果根据本发明的共轭物将用作诊断剂,则络合剂含有原子序数为 21、26—27、29、31、43 或 49,优选 43 或 49 的元素的成像放射性同位素。如果根据本发明的共轭物用作治疗剂,除了上述之外,原子序数为 5、22—25、28、42、44、57—83 和 85 的元素的其它同位素也是合适的。除了上述元素的放射性同位素外,适用于治疗范围的还特别包括稳定的同位素,其

a) 经外界的辐射作用转化为放射性同位素,

b) 将外界的辐射转化为具有不同性质、不同能量和/或不同波长的辐射。

与寡核苷酸残基相连的能成像或有效治疗的取代基 B—K 的数目一方面被寡核苷酸数限制,但绝不超过 10。根据本发明,优选的是 1 或 2 个 B—K 取代基。

寡核苷酸残基 N 的数目原则上不受限制。对于本发明而言,具有 5—200 个核苷酸的寡核苷酸是适用的,特别优选的是具有 15—

100 个核苷酸的寡核苷酸。

根据本发明可适用的寡核苷酸对体内存在的核酸酶的降解作用稳定。

未修饰的寡核苷酸或聚核苷酸在体内被核酸内切酶和核酸外切酶裂解。在 RNA 系列中的降解反应始于其 2'-羟基的活化。其它的降解性酶类是,例如核酶,其裂解 RNS 的磷酸二酯键(参见 Science 261, 709(1993))。RNS 衍生物的体内稳定性可以通过其它取代基对 2'-羟基的部分或完全取代而得以增加。这类取代基例如有烷氧基,特别是甲氧基(参见例如 Chem. Pharm. Bull. 13, 1273 (1965), Biochemistry 10, 2581, (1971))、氢原子、氟原子(参见例如 Can. J. Chem. 46, 1131 (1968))或氨基(参见例如 J. Org. Chem. 42, 714(1977))。利用 1994 年 6 月 22 日递交的申请号为 08/264,029 的美国专利申请所公开的方法还可以在 2'-位引入一些上述取代基以及其它的取代基。用于稳定核苷酸间键的其它可能性是在形成硫代磷酸酯(Trendr Biochem. Sci. 14, 97(1989))或二硫代磷酸酯(J. Chem. Soc., Chem. Commun. 591 (1983) 和 Nucleic Acids Res. 12, 9095(1984)时取代磷酸二酯桥中的一个或两个氧原子和利用膦酸烷基酯代替磷酸二酯(Ann. Rep. N. Y. Acad. Sci. 507, 220(1988))。

实现稳定作用可以通过对核糖单位 2'位上的羟基彼此独立地进行修饰。这一修饰作用可以通过用 OR 基、卤原子,尤其是氟原子、氢原子或胺基尤其是用氨基取代上述羟基来达到。在这种情况下,烷氧基的残基 R 代表具有 1—20 个碳原子的直链或支链烷基,如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、叔丁基、戊基或己基或具有 4—20 个碳原子的未取代或取代的环烷基,如环戊基或环己基,其可选择性地含有 1—2 个羟基,并可选择性地掺杂 1—5 个氧原子。稳定作用还可以因为选择性地醚化 3'位和 5'位现有羟基而增强。

多核苷酸其它的稳定作用产生用作核苷酸间键的磷酸二酯部分或完全且彼此独立地被硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或膦酸烷基酯取代,特别优选的是用低级膦酸烷基酯,如膦酸甲酯。这些核苷酸间键也可以与 3'位和 5'的末端残基连接,或者另外还连接 3'—3'位和 5'—5'

位。磷酸二酯键使得有可能通过存在于核酸碱基的氮原子或碳原子上的羟烷基进一步键合,因此,例如两个胸苷可以由3位上存在的羟烷基链连接,或者两个嘌呤碱基由8位上存在的残基连接。键合还可以发生在2'位、3'位或5'位的羟基。

被修饰的核苷酸间键可以任意选择地优选存在于多核苷酸的末端,其特别优选地是与胸苷结合。

根据本发明,所用的寡核苷酸残基N并非局限于特定的寡核苷酸序列。但优选的是能以高结合亲和力与除核酸以外的靶结构特异性结合的寡核苷酸。

美国专利 US 5,270,163 描述了所需要的作为本发明共轭物之起始物的适宜寡核苷酸的鉴别方法。这一称为 SELEX 的方法可用于制备针对任何所需靶分子的核酸配体。

SELEX 法涉及从候选寡核苷酸的混和物中进行选择,并利用相同的通用选择方案经逐步地重复结合、分离和扩增以切实达到任何结合亲和力和选择性的所需标准。从优选含有随机化序列片段的核酸混合物开始,SELEX 法的步骤包括将混合物与靶在适于结合的条件下接触,将未结合的核酸从已与靶分子特异性结合的核酸中分开,分离核酸—靶络合物,扩增从核酸—靶络合物中解离的核酸以产生配体富集的核酸混合物,然后经所需的多次循环重复结合、分开、解离和扩增的步骤,以产生对靶分子高特异性、高亲和力的核酸配体。

上述基本的 SELEX 法经改良可以达到许多特定目的。例如,1992 年 10 月 14 日递交的申请号为 07/960,093 的美国专利申请描述了将 SELEX 法与凝胶电泳相结合选择具有特定结构特征的核酸分子,如弯曲 DNA。1993 年 9 月 17 日递交的申请号为 08/123,935 的美国专利申请描述了用 SELEX 为基础的方法选择核酸配体,该配体含有能够与靶分子结合和/或光致交联和/或光钝化的光反应基团。1993 年 10 月 7 日递交的申请号为 08/134,028 的美国专利申请描述的鉴别能够区别密切相关分子之高特异性核酸配体(称为 Counter—SELEX)的方法。1993 年 10 月 25 日递交的申请号为 08/143,564 的美国专利申请描述了达到高效分离对靶分子具有高亲和

力和低亲和力寡核苷酸的以 SELEX 为基础的方法。1992 年 10 月 21 日递交的申请号为 07/964,624 的美国专利申请描述了在进行 SELEX 之后获得改进的核酸配体的方法。1995 年 3 月 8 日递交的申请号为 08/400,440 的美国专利申请描述了将配体与其靶共介连接的方法。

SELEX 法包括对含有赋予配体改进特征的被修饰核苷酸之高亲和力核酸配体的鉴别,所述的改进特征如改进的体内稳定性或改进的传递特征。这类修饰作用的例子包括在核糖和/或磷酸和/或碱基取代基上的化学取代。经 SELEX 鉴定的含被修饰核苷酸的核酸配体在 1993 年 9 月 8 日递交的申请号为 08/117,991 的美国专利申请中描述过,其描述了含有在嘧啶的 5 位和 2'位经化学修饰的核苷酸衍生物的寡核苷酸。上述的 08/134,028 号美国专利申请描述了一个或多个用 2'-氨基(2'-NH₂)、2'-氟(2'-F)和/或 2'-O-甲基(2'-OMe)修饰的核苷酸的高特异性核酸配体。1994 年 6 月 22 日递交的申请号为 08/264,029 的美国专利申请描述了含有各种 2'-修饰嘧啶的寡核苷酸。

SELEX 法包括将所选择的寡核苷酸与分别如 1994 年 8 月 2 日递交的申请号为 08/284,063 的和 1994 年 4 月 28 日递交的申请号为 08/234,997 的美国专利申请所述的其它所选择的寡核苷酸及非寡核苷酸功能单位相结合。上述申请使得具有其它分子所需特性之寡核苷酸的各种形状及其它特征与有效的扩增及复制特征相结合。

SELEX 方法的最基本形式或由下面一系列步骤定义:

1)制备不同序列核酸的候选混合物。该候选混合物一般包括固定序列区(即每一候选混合物成分在相同位置含有相同序列)和随机化序列区。选择固定序列区要么(a)有助于下述的扩增步骤,要么(b)模拟已知与靶结合的序列,或者(c)提高候选混合物中核酸的指定结构排列的浓度。随机化序列可以是完全随机化(即在任何位置上发现某个碱基的可能性是四分之一)或仅仅部分随机化(例如,在任何位置发现某个碱基的可能性可以在 0—100%之间任意水平选择)。

2)将候选混合物在适于靶与候选混合物之成分结合的条件下与所选择的靶接触。在这种情况下,靶与候选混合物的核酸之间的相互作用可被认为在靶和与靶有最强亲和力之核酸间形成核酸—靶对。

3)将与靶有最高亲和力的核酸和与靶有较低亲和力的核酸分开。因为只有极小量对应于最高亲和力核酸的序列(可能只有一个核酸分子)存在于候选混合物中,一般需要建立分开的标准,以使在分开过程中保留候选混合物显著量的核酸(大约5—50%)。

4)然后扩增在分离过程中以具有相对较高的靶亲和力所选择的核酸,以产生富集了具有相对较高靶亲和力之核酸的新候选混合物。

5)通过重复上述分离和扩增步骤,新形成的候选混合物含有越来越少的独特序列,并且核酸对靶的平均亲和程度通常将增加。从其极端的情况考虑,SELEX法将产生含有一种或少量代表来自具有最高靶分子亲和力之原始候选混合物的那些核酸的独特核酸的候选混合物。

SELEX专利和申请极其详细地描述并说明了该方法。所包括的有能用于所述方法的靶;分离候选混合物中核酸的方法和扩增所分离的核酸以产生富集的候选混合物的方法。SELEX专利和申请还描述了所获得的针对多种靶的配体,包括蛋白质是和不是核酸结合蛋白质两种蛋白质靶。因此,SELEX法能够用于提供靶分子的高亲和力配体。

优选的靶分子是蛋白质,但也可以包括其它的糖类、肽葡聚糖和各种小分子。正如同常规的蛋白质性抗体,核酸抗体(寡核苷酸配体)可以通过与作为生物学结构主要部分的分子发生特异性相互作用而应用于定靶生物学结构,如细胞表面或病毒。寡核苷酸的优点在于同常规抗体一样,其不受自身耐受的限制。而且核酸抗体不需要动物或细胞培养物来合成或生产,因为SELEX是一种完全的体外方法,正如所熟知的,核酸能与互补的核酸序列结合,核酸的这一特性已经被广泛地用于核酸分子的检测、定量和分离。因此,本发明的方法并不打算包括这些熟知的核酸间的结合性能。具体地说,涉

及核酸抗体用途的本发明方法并不打算包括核酸分子之间的已知结合亲和力。已知许多蛋白质通过与核酸序列结合发挥功能,如与核酸操纵基因序列结合的调节蛋白质。例如,某些核酸结合蛋白质结合其天然位点的已知能力已被应用于这些蛋白质的检测、定量、分离和纯化。涉及寡核苷酸配体应用的本发明方法并不打算包括核酸结合蛋白质和已知能与之结合的核酸序列间的已知结合亲和力。然而,利用 SELEX 可以开发能与相同的核酸结合蛋白质结合的新型非天然存在的序列。具体地说,本发明的寡核苷酸配体与包括三维化学结构的这类靶分子结合,而不是通过主要依赖于 Watson/Crick 碱基配对或三股螺旋结合的机理与所述寡核苷酸配体结合的多核苷酸,其中所述的寡核苷酸配体并不是具有被靶分子结合之已知生理学功能的核酸。

应该注意到,用 SELEX 可以迅速检测将结合蛋白质的核酸序列,因此,其可以用于确定未知操纵基因和结合部位序列的结构,然后该序列可如本文所述加以应用。SELEX 因此是核酸分子用于蛋白质检测、定量、分离和纯化的通用方法,并不知道所述蛋白质可结合核酸。此外,可由 SELEX 分离的某些核酸抗体还能用于影响,如抑制、增强或活化、特定靶分子或结构的功能。具体地说,核酸抗体可用于抑制、增强或激活蛋白质的功能。

根据下述方法可以在优选实施方案中得到用于本发明共轭物的寡核苷酸。

因此,获得适宜的寡核苷酸可以通过将含有随机序列的寡核苷酸混合物与靶结构接触,某些寡核苷酸相对于所述寡核苷酸的混合物显示出与靶结构有增加的亲和力,将后者与寡核苷酸混合物的剩余部分分开,然后扩增具有增加的靶结构亲和力的寡核苷酸,以得到存在结合靶结构之寡核苷酸增加部分的寡核苷酸混合物。

在该方法中,首先利用化学合成法以优选方式生产一股 DNA。在该股 DNA 的 3' 末端有已知序列,其用作 RNA 聚合酶的启动子,并且同时与用于聚合酶链反应(PCR)的引物序列互补。在特别优选的实施方案中,在这种情况下,包括了用于 T7 RNA 聚合酶的启动子。

然后,在启动子上合成随机序列。随机序列的获得可以通过在合成仪中以相同的比例加入适宜的四种碱基。因此,得到完全随机的DNA序列。在优选的实施方案中,随机序列的长度为大约15—100核苷酸。在具有所述随机序列的DNA片段上合成用于聚合酶链反应(PCR)的另一个DNA序列。

在该股DNA合成之后,借助RNA聚合酶以互补RNA股转录之。在优选的实施方案中,T7 RNA聚合酶用于这种情况。在转录中,向RNA聚合酶提供经修饰的核苷酸。在特别优选的方案中,核糖的2'位被修饰。在这种情况下,可以包括用烷氧基,优选甲氧基、氨基或氟。然后,将以上述方式产生的RNA寡核苷酸引入选择方法。

在选择方法中,将RNA寡核苷酸与靶结构接触。靶结构被理解为是指其上特异地并以高亲和力结合寡核苷酸的结构。

这类结构例如有大分子、高等生物如动物或人的组织结构、器官或部分器官、细胞,特别是肿瘤细胞或肿瘤。

在这种联系中,所述靶结构不必绝对是纯的形式,其也可以存在于天然存在的器官或细胞表面。通过向SELEX反应中加入聚氨基(tRNA、肝素)、血浆或全血可将严格性应用于选择方法。

如果这里涉及被分离蛋白质,则后者可被结合到固相上,例如滤器。在选择过程中,所用的靶结构相对于RNA混合物是过量的。在温育中,特定的寡核苷酸分子结合到靶结构上,而把未结合的寡核苷酸通过例如洗涤而从混合物中分开。

然后,将寡核苷酸分子与靶分子分开,或用适宜的缓冲液或溶剂通过洗涤而分出。

借助逆转录酶将发现的RNA寡核苷酸转录到互补DNA股中。

因为所得的DNA链在两端存在引物序列(或启动子序列),所以,可以简单地借助聚合酶链反应扩增发现的DNA序列。

然后,借助RNA聚合酶以RNA寡核苷酸形式再次转录如此扩增的DNA寡核苷酸,而且因此所得的RNA寡核苷酸能够用于进一步的选择步骤(如上所述)。

在第二选择步骤中获得从靶分子中分离的结合 RNA 寡核苷酸后,借助逆转录酶将后者再转录成 DNA,如此所得的互补性 DNA 寡核苷酸借助聚合酶链反应扩增,再借助 RNA 聚合酶转录成 RNA 寡核苷酸,其可用于进一步的选择步骤。

结果证明,如果将选择步骤重复数次,可以获得所需要的高特异性和高结合亲和力。极少能在早至一次或二次选择步骤之后得到所需的寡核苷酸序列。一旦得到靶结构和寡核苷酸间的所需特异性和结合亲和力,就可以对寡核苷酸测序,结果即可确定能进行特异性结合的寡核苷酸的序列。

该方法特别有利之处在于不仅能以适宜的蛋白质进行应用,而且还可在体内应用。但上述的选择方法还可以在纯化的靶结构上进行。但尤其是对于体内诊断而言,必需在活体环境中为靶结构提供寡核苷酸特异性。因而,选择方法还可以在细胞或细胞培养物、组织或组织切片、灌流的器官以及甚至是活体上进行。

这种情况下的优点是,经修饰的寡核苷酸能够抵抗几乎无所不在的 RNA 酶的降解作用。结果,所需的寡核苷酸序列在选择过程中于活的生物体上自身积累,因为相应的天然存在的寡核苷酸将被 RNA 酶降解。

寡核苷酸残基 N 可以具有一个或多个连接组分 B,或取代基 B—K,其能被彼此独立地选择。权利要求书中所要求的是寡核苷酸共轭物,其含有 1—10 个相同或 2—10 个不同的连接组分 B。特别优选的是有 1 或 2 个连接组分 B 的寡核苷酸共轭物。

连接组分 B 连接寡核苷酸残基 N 与络合剂或络合物 K。

有利的是,带有 O、S 和 N 的多齿、开链或环形络合配体可用作供体原子。

作为络合剂残基 K 的例子可以提及的有由氢原子、羟基和/或乙酸基还原的聚氨基聚羧酸、乙二胺四乙酸、二乙三胺戊乙酸、反式—1,2—环己烷二胺四乙酸、1,4,7,10—四氮杂环十二烷四乙酸、1,4,7—三氮杂环壬烷三乙酸、1,4,8,11—四氮杂四癸烷四乙酸、1,5,9—三氮杂环十二烷三乙酸、1,4,7,10—四氮杂环十二烷三乙酸和

3,6,9,15—四氮杂二环—[9.3.1]—十五—1(15), 11, 13, —三烯三乙酸。

适宜的络合剂描述在例如 EP0485045、EP0071564、EP0588229、DE4310999、DE4311023 及 US4,965,392。

为了说明本发明络合剂 K 的各种可能性,参考图 1—3,其中汇集了一些好的结构。这些图是表示一种选择,但并非以任何方式将本发明限制为所表示的络合剂。

络合剂可以含有通常用于核医学中作为诊断和治疗目的的所有的放射性同位素,以其金属离子的形式存在。还可以使用经外界辐射作用激发以发射诊断或治疗性辐射的稳定同位素,或者是经外界的辐射作用转化为放射性同位素的同位素。

根据本发明的适宜的同位素选自原子序号为 5、21—29、31、39、42—44、49、57—83 或 85 的元素。

为了将本发明的化合物用作放射性药剂,所述的络合剂含有放射性元素。所有能够在体内或在体外起到治疗或诊断作用的放射性元素都适合于这一目的。优选的是元素铜、铋、镅、铈或钷的放射性同位素。特别优选的是 ^{99m}Tc —络合物。

如果本发明通式 I 的化合物含有发射正电子的同位素,如 Sc—43、Sc—44、Fe—52、Co—55、Ga—68 或 Cn—61,则后者可用于正电子发射体层摄影术(PET)。

如果本发明通式 I 的化合物含有发射 γ 射线的同位素,如 Tc— 99m 或 In—111,则其可用于单光子发射体层摄影术(SPECT)。

本发明的化合物还可以以其与放射性同位素(例如 Tr—192)的络合物形式用于放射性治疗。

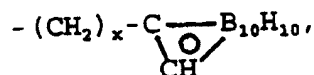
本发明的化合物还可用于放射免疫治疗或放射治疗,物者与相应诊断方法的区别仅在于所用同位素的量和类型不同。在这种情况下,其目的是用高能短波射线以最小的可能性范围破坏肿瘤细胞。适宜的发射 β 线的离子例如有 Sc—46、Sc—47、Sc—48、Ga—72、Ga—73、Y—90、Re—186 或 Re—188。适宜的发射 α 线的离子表现为很短的半衰期,例如有 At—209、At—211、Bi—211、Bi—212、Bi—

213 和 Bi—214, 而 Bi—212 是优选的。适宜的发射光子和电子的离子是 ^{158}Gd , 其可经中子俘获从 ^{157}Gd 获得。

如果本发明的所述药剂将用于由 R. L. Mills 等人 (Nature 336, 787(1988)) 提出的各种放射疗法中, 则中心离子必须从 Mossbauer 同位素衍生例如 ^{57}Fe 或 ^{151}Eu 。

并非为络合元素的原子序号为 21—29、31、39、42—44、49、57—83 或 85 之金属离子所要求的羧酸基可以选择性地以无机或有机碱的盐存在, 例如碱或碱土金属的氢氧化物和碳酸盐, 尤其是氢氧化钠和氢氧化钾, 或氨和烷基胺, 或氨基酸或酯或酰胺。

而且, 可以使用经中子激发以发射粒子和/或射线的化合物, 在这种情况下特别有效的是钷。有利的是, 那些含有同位素硼—10 的化合物也可以使用。此时, K 可以具有下列结构:



其中 X 表示 1—10 的整数。

本发明进一步涉及生产本发明共轭物的方法。

因此, 通过氨基亚磷酸酯(phosphoramidite)衍生物与寡核苷酸的反应可以得到其中的连接组分 B 结合在寡核苷酸 5'末端的共轭物 (Tetrahedron 49, 1925—1963, (1993))。结果, 寡核苷酸的 5'羟基与通过 $\text{PR}'(\text{NR}_2'')\text{OR}''$ 的氨基亚磷酸酯反应。此时, R' 代表有 1—20 个碳原子的烷基、烷氧基或芳烷氧基, 选择性地含有 N、 NO_2 、Si 或 SO_2 , 例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、苄氧基或苯乙氧基, 其可被选择性地取代。作为取代基, 特别使用的是氟基和硝基。有利的是, 例如可以使用甲氧基、 β -氟基乙氧基或硝基苯乙氧基。特别优选的是 β -氟基—乙氧基。 R'' 为 C_1 — C_4 烷基, 而特别合适的是乙基和丙基。优选的是异丙基。 R''' 是有 1—20 个碳原子的烷基或芳烷基, 可以选择性地含有 S、O、N、CN、 NO_2 或卤素。优选的是使用被保护的氨基和硫代烷基以及被保护的氨基和硫代噁烷基。特别优选的是 6-氨基—己基、6-硫代己

基、3,6,9—三氧杂—11—氨基—十一烷基和3,6—二氧杂—8—氨基—辛烷基。作为保护性基团,可以使用惯用的N或S保护基。例如,三氟乙酰基、苯二酰亚氨基和—甲氧基三苯甲基是适宜的。

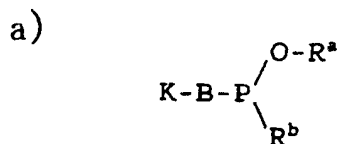
在本发明特别优选的实施方案中, β -氟乙基—N,N—二异丙氨基—6—(三氟乙酰氨基)—1—己基—氨基亚磷酸酯用作氨基亚磷酸酯的衍生物。

在本发明另外的优选实施方案中, β -氟乙基—N,N—二异丙氨基—(3,6,9—三氧杂—11—苯二酰亚氨基—1—十一烷基)—氨基亚磷酸酯用作氨基亚磷酸酯的衍生物。

在本发明另外的实施方案中,连接组分B以类似于上述由含磷基因那样结合在寡核苷酸N的3'末端。

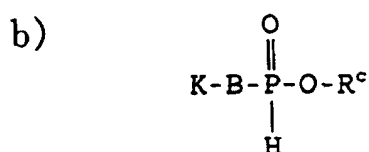
上述寡核苷酸与氨基亚磷酸酯间的反应可以以固相反应发生,而且寡核苷酸仍然存在于自动合成仪的柱上。在得到所需序列的寡核苷酸并将寡核苷酸的5'羟基与例如三氟乙酸接触后,与氨基亚磷酸酯反应,所得的反应产物被氧化并释放。然后,如此所得的寡核苷酸衍生物与络合剂或络合物K选择性地由另外的连接基团在末端氨基或巯基偶联。然后形成第一步中由含磷基团结合在寡核苷酸上的残基,以及选择性存在的其它连接基团,连接组分B。

也可以发生寡核苷酸与络合剂之间的连接以使寡核苷酸游离的5'—羟基与其最终携带一个可结合的磷基的络合剂或络合物反应。由下列通式可以描述这类情况。



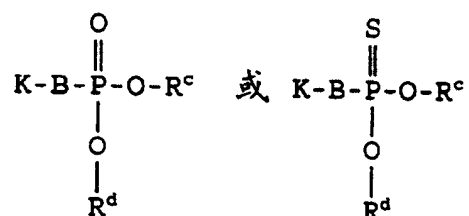
其中 R^a 代表 C_1 — C_6 烷基,可以选择性地在 β 位带有氟基; R^b 代表叔氨基而K和B具有所指示的含义

或下列通式:



其中 R^c 代表三烷基铵离子, K 和 B 具有上述含义
或者下列通式:

c)



其中 R^d 代表芳基, 可选择性地由一个或多个卤原子和/或一个或多个硝基取代, 或 C_1-C_6 烷基, 可选择性地由氟基在 β 位取代, K、B 和 R^c 具有上述的含义, 而且当使用通式 a) 的基团时, 对于磷酸的氧化步骤在完成偶联反应后进行。在两种情况下, 基团 $-OR^a$ 或 $-OR^c$ 可选择性地在水解作用中裂解掉。

寡核苷酸衍生物与络合剂或络合物 K 通过衔接的键连也可作为固相反应在自动合成仪的柱上发生。然后, 经分离步骤将本发明的化合物从固相载体中分离出来。

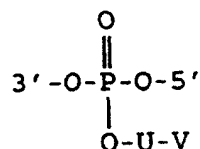
进行寡核苷酸与衔接物的键连不仅可以通过末端核苷酸糖的 5'-OH, 而且还可以通过可从 5'-OH 生成的其它官能团, 例如氨基或羧基。这类带有氨基或羧基的核苷酸是已知的, 并且很容易制备。J. Med. Chem. 22, 1273 (1979) 和 Chem. Lett. 6, 601 (1976) 描述了对 5'-脱氧-5'-氨基-尿苷的合成。4'-羧基-5'-脱氧尿苷的获得如 (J. Med. Chem. 21, 1141 (1978) 或 Nucleic Acids Symp. Ser. 9, 95 (1981) 所述。

然后, 以本领域技术人员已知的方式通过带有羧酸和氨基的衔接物进行与络合剂的连接。继而衔接物形成与 $-NH_2-CH_2-4'$ 或 $-CO-4'$ 基团一起的连接组分 B。

应该指出的是, 本发明的共轭物单纯从形式上分成核苷酸残基、连接组分和络合剂或络合物, 因此实际上的合成结构是独立。所以, 例如在上述情况下, 认为基团 $-NH-CH_2-4'$ 或者 $-CO-4'$ 属于连

接组分 B,而在 4'位被 $\text{CH}_2\text{—OH}$ 基团还原的寡核苷酸被称为寡核苷酸残基 N。

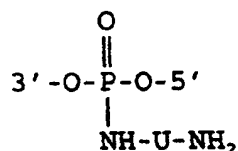
共轭物的生产方法在于头二个糖单位与二核苷酸连接(参见,例如 Chem. Lett. 1305(1993)),其中产生与经 OH 基还原的磷酸二酯或硫代磷酸酯桥连接的连接组分。在这种情况下,首先产生通式



的三酯,其中 U 表示相应的亚烷基,V 表示受保护的氨基或巯基。在例如氨基保护基的裂解后,络合剂可以以本领域技术人员已知的方式通过衔接物选择性地与氨基连接,例如以酰胺键的形式。然后,衔接物形成与 O—U—V 基(其中 V 表示 —NH 基)一起的连接组分 B。

可选择的另外的方法在于将在中间通过的磷酸二酯(例如通过与 1,5—二氨基戊烷反应)进行氨解(参见 Biochemistry 27, 7237 (1988)或 J. Am. Chem. Soc. 110, 4470(1988))。

如此所得的通式为



的化合物可以如上所述选择性地通过一个衔接物与络合剂连接。

为了偶联,二核苷—磷酸—硫代三酯也是适宜的(参见 J. Am. Chem. Soc. 111, 9117 (1983) 和 Nucl. Acid Res. 20, 5205 (1992))。

核酸碱基为连接络合剂与核苷酸提供了极大的变化。可以直接进行嘌呤 2 位和嘧啶 4 位氨基的连接。但通常更有利的是首先修饰嘧啶或嘌呤,并将这些衍生的碱基与络合剂相连(选择性地由另外的

衔接物)。适宜的衍生核酸碱基描述在例如 Biochemie [Biochemistry] 71, 319 (1989), Nucl. Acids Res. 16, 4937 (1988) 或 Nucleosides Nucleotide, 10, 633 (1991)。

由核酸碱基进行连接的另一种方法在于由钼催化的溴或碘核酸碱基与官能团的偶联 (Biogenic and Medical Chemistry Lettor v. 361 (1994))。然后, 借助这些官能团, 可以按照已知方法经其它衔接物选择性地将络合剂与核酸碱基连接。作为嘧啶 5 位和嘌呤 8 位上的官能团, 芳香酯和烯丙胺是可以提及的例子 (参见 Nucl. Acids Res. 14, 6115 (1986) 和 Nucl. Acids Res. 16, 4077 (1988))。1993 年 6 月 14 日递交的申请号为 08/076, 735 的美国专利申请描述了制备 5 位上被修饰嘧啶的另外可选择性方法, 尤其是在 5 位上引入官能团, 如羰基、链烯基或芳香基, 以及能够在嘧啶的 5 位偶联修饰基团的改进的钼催化剂。用作前体的卤素衍生物的获得可以参见例如 Biophys. J. 44, 201 (1983), J. Am. Chem. Soc. 86, 1242 (1964) 或 Commun. 17 (1967)。

DE3401052 公开了从无金属的寡核苷酸共轭物生产本发明的金属络合物的方法, 通过将所需金属同位素的金属氧化物或金属盐 (如硝酸盐、乙酸盐、碳酸盐、氯化物或硫酸盐) 溶解或悬浮于水中和/或低级醇 (如甲醇、乙醇或异丙醇) 中, 与等量的含有络合剂的寡核苷酸共轭物的溶液或悬液反应, 然后, 如果需要的话, 存在用无机和/或有机碱基或氨基酸阳离子取代的酸性氢原子, 或者被转化为氨基酸酰胺基游离羧酸基的。

可能仍然存在的游离酸基在碱的帮助下发生中和反应, 所述的碱包括例如钠、钾、锂、镁或钙的无机碱 (如氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐) 和/或有机碱, 如伯、仲、叔胺, 例如乙醇胺、吗啉、葡糖胺、N, 一甲基—葡糖胺和 N, N—二甲基—葡糖胺, 以及碱性氨基酸, 例如赖氨酸、精氨酸和鸟氨酸, 或原为中性或酸性氨基酸的酰胺。

本发明药剂的生产也可以根据本领域已知的方法, 通过选择性地加入常用于药剂中的添加剂将本发明的寡核苷酸共轭物悬浮或溶解于水性介质中, 然后经选择性地消毒或过滤消毒所述悬液或溶液。

适宜的添加剂例如有生理上无损害的缓冲液(如三甲酰胺)、络合剂的添加剂(如二乙三胺戊烷乙酸)或如果必需的话,电解质,例如氯化钠,或者如果需要的话,抗氧化剂,例如抗坏血酸或者是特别适于口服形式的,甘露糖醇或其它的渗透活性物质。

如果在水或生理性盐溶液中的本发明药剂悬液或溶液需要胃肠道给药或其它目的,其可与常用于药剂中的一种或多种辅料(如甲基纤维素、乳糖、甘露糖醇)和/或表面活性剂(如卵磷脂 Tween^{TR}、Myrij^{TR})混合。

本发明的药剂优选含有本发明的寡核苷酸共轭物 0.1 μ mol/L—3mmol/L,并通常剂量为 0.01nmol/kg—60 μ mol/kg。其可用于胃肠道和胃肠外给药。

在核医学的体内应用中,被标记的化合物通常以小于 10⁻¹⁰mol/kg 体重的量给药,并且,确切地剂量随着所研究机体区域功能的不同可以有极大的变化,但特别是随着研究所分别选择的方法的功能而变化。从平均体重 70kg 开始,诊断用的放射活性量为 40—1100MBq,优选 200—800MBq,对于治疗应用而言,放射活性量为 1—500MBq,优选每次给药 10—100MBq。通常经静脉内、动脉内、组织间隙、腹膜、肿瘤内给药,优选经静脉内用药。一般情况下,每次研究给予 0.1—20ml 的所研究药剂。

本发明进一步涉及检测靶结构的方法。在这种情况下,将一种或多种上述化合物在体内或体外与所研究的样品接触。在这种情况下,寡核苷酸残基 N 特异地并以高亲和力与待测靶结构结合。

如果靶结构存在于样品中,可以根据信号检测。该方法特别适于进行疾病的非侵害性诊断。在这种情况下,在体施用一种或多种上述化合物,通过信号检测被研究的生物体中是否存在其上特异性地并以高亲和力结合了寡核苷酸残基 N 的靶结构。

但除了仅仅检测所研究样品中的靶结构外,后者还可以被特异性地破坏。在这一方面,本发明的化合物特别适合于例如用于癌症治疗的放射疗法。

本发明另一个实施方案包括用于体内检测靶结构的诊断试剂

盒,其含有一种或多种上述化合物。

本发明的共轭物和药剂满足了对于放射治疗和诊断的药物制剂多种需要。其特点在于与所研究靶结构的高度特异性或亲和力。相对于已知的寡核苷酸共轭物,本发明的共轭物显示了特别高的体内稳定性。这是通过乙羟基的取代和在核苷酸末端羟基引入修饰的胸苷序列实现的。令人意外的是,所述寡核苷酸的特异性并不明显地受到所述修饰作用或与络合剂的偶联的损害。其它的优点在于可控的药代动力学以及所需的相容性。

本发明的各种其它目的、特征和伴随的优点在结合考虑附图而使之变得易于理解时将更全面地领略到。所述附图中,

图1表示环状络合剂K的选择,其可有利地用于本发明,“b”标示连接组分B上的结合位点。

图2和3表示开链络合剂K的选择,其可有利地用于本发明。

下面的实施例将更详细地说明本发明。

在实施例中描述的聚核苷酸含有修饰的化合物,其具有下列含义:

A、U、C、G 含 2'-OCH₃ 基的核苷酸

*: 核苷酸间键是磷酸甲酯

** : 核苷酸间键是硫代磷酸酯

***: 核苷酸间键是二硫代磷酸酯

无需进一步详细描述,可以相信本领域的技术人员利用在前的描述能够充分地利用本发明。因此,下面优选的特定实施方案被认为仅仅是说明性的,而不是以任何途径限制本发明公开内容的剩余部分。

在前文及下面的实施例中,温度是以未修正的摄氏温度提出的,而且,除非另有说明,所有的份数和百分比都是以重量计。

包括1994年7月14日递交的DE4424922,5在内的上下文所引用的全部申请、专利及公开物的所有公开内容均引入本文作为参考。

实施例

实施例 1

a) 35 体 - 寡核苷酸

5'CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUAT* T* T* T* T-3' 的 5'-(6-氨基-己基-磷酸酯)

在 Pharmacia 公司的自动合成仪中以通常方式制备以置于上游的序列 T* T* T* T* T-3' 修饰的并根据 SELEX 法鉴定的 5'CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUA - 3' (见 Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed. F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), 而且该寡核苷酸也存在于固相载体柱上。经在 二氯甲烷中与三氯乙酸溶液反应, 将 5'羟基打开, 柱上负载约 10mg 的 35 体 - 寡核苷酸。为加入接头, 将该柱在四唑存在的情况下与 50 μ mol 的 β -氯乙基-N,N-二异丙氨基-6-(三氯乙酰氨基)-1-己基-氨基亚磷酸酯(根据 Nucl. Acids. Res. 16, 2659-2669(1988)制备)之乙腈溶液反应。以溶于四氢呋喃中的碘使所生成的亚磷酸酯氧化或完全受保护的磷酸三酯。然后先后用甲醇和水冲洗柱子。为从固相载体上去除经修饰的寡核苷酸, 将该柱内容物移至多管形瓶中与 5ml 30% 氨溶液混和, 将该管密封并于 55 $^{\circ}$ C 振荡过夜。然后冷却至 0 $^{\circ}$ C, 离心, 用 5ml 水冲洗载体并且将混和的水相冷冻干燥。

为了纯化, 将固体物质溶于 2ml 水中, 与 2ml 0.5M 乙酸铵溶液混和并与 10ml 乙醇混和, 于 -20 $^{\circ}$ C 静置过夜, 离心, 残留物用 1ml 乙醇(-20 $^{\circ}$ C)冲洗且最终于室温下真空干燥。获得 8mg 标题化合物的无色粉末。

b) 10-[5-(2-羧苯基)-2-羟基-5-氧代-4-氮杂-戊基]-1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷

将 50g(144.3mmol) 1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷(DO3A)溶于 250ml 水中并以 5N 氢氧化钠溶液调节 pH 至 13。然后在 1 小时内滴入 38.12g(187.6mmol)的 N-(2,3-环氧丙基)-苯邻二甲酰亚胺于 100ml 二噁烷中的溶液, 于 50 $^{\circ}$ C 搅拌 24 小

时,并且通过加入 5N 氢氧化钠溶液保持 pH 为 13。以 10% 盐酸调节溶液 pH 至 2 并真空蒸发干燥。残余物溶于少量水中并在离子交换柱(Reillex[®]二聚-(4-乙烯基)-吡啶,以水洗脱)上纯化。主要级分真空蒸发得以浓缩且残余物于 RP-18(LichroPrep[®]流动相溶剂:梯度的四氢呋喃/甲醇/水)上的层析进行最后的纯化。通过主要级分的蒸发浓缩后,获得无定形固体 63.57g(理论值的 71%)。

水含量:8.5%

元素分析(相对于无水物):

计算值:C52.90 H6.57 N12.34

实测值:C52.65 H6.68 N12.15

c)10-(3-氨基-2-羟基-丙基)-1,4,7-三(羧基-甲基)-1,4,7-四氮杂环十二烷

将 50g(88.1mmol), 实施例 1b 的标题化合物在 300ml 浓盐酸中回流 24 小时。蒸发至干燥,残余物溶于少量水中并于离子交换柱(Reillex[®]二聚-(4-乙烯基)-吡啶(以水洗脱))上纯化。主要级分蒸发干燥。

产量:39 克透明固体(理论值的 95%)

水含量:10.3%

元素分析(相对于无水物):

计算值:C48.68 H7.93 N16.70

实测值:C48.47 H8.09 N16.55

d)10-[7-(4-硝基苯基)-2-羟基-5-氧代-7-(羧甲基)-4-氮杂-庚基]-1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷

将 9.84 克(41.8mmol)的 3-(4-硝基苯)-戊二酸酐(J. Org. Chem. 26, 3856(1961))加至溶于 200ml 二甲基甲酰胺/20ml 三乙胺中的 14.62g(34.86mmol)之实施例(c)的标题化合物中,并室温下搅拌过夜。将其真空蒸发至干燥。自异丙醇/乙酸 95:5 中将残留物重结晶。

产量:21.68g 淡黄色固体(理论值的 95%)

水含量:0.9%

元素分析(相对于无水物):

计算值:C51.37 H6.47 N12.84

实测值:C51.18 H6.58 N12.67

e)10-[7-(4-氨基苯基)-2-羟基-5-氧代-7-(羧甲基)-4-氮杂-庚基]-1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷
将 21.0g(32.07mmol)的实施例 1d)之标题化合物溶于 250ml 甲醇中并加入 5g 钯催化剂(10% Pd/C)。于室温下氢化过夜。滤除催化剂并真空蒸发干燥滤液。

产量:19.63g 的乳色固体(理论值的 98%)

水含量:0.8%

元素分析(相对于无水物):

计算值:C53.84 H6.35 N12.60

实测值:C53.73 H6.45 N12.51

f)10-[7-(4-异氰硫基苯基)-2-羟基-5-氧代-7-(羧甲基)-4-氮杂-庚基]-1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷

将 12.4g(19.27mmol)的实施例 1e)之标题化合物溶于 200ml 水中并加入溶于 50ml 氯仿之 6.64g(57.8mmol)二氰硫化碳。于 50℃ 搅拌 1 小时。冷却至室温,分离有机相并用 100ml 氯仿 2 次将水相摇出。将水相蒸发干燥并于室温将残留物吸收性地沉淀于 100ml 异丙醇中。滤除固体并以二乙醚冲洗。真空(40℃)中干燥过夜后,获得 12.74g(理论值的 97%)之乳色固体。

水含量:3.1%

元素分析(相对于无水物):

计算值:C52.24 H6.35 N12.60 S4.81

实测值:C52.37 H6.44 N12.48 S4.83

g)35 体寡核苷酸

5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAWAGCUACAUAUAT* T* T* T* T-3'的 5-(6-氨基-己基-磷酸酯与 10-[7-(4-异硫氰酸根合苯基)-2-羟基-5-氧代-7-(羧甲基)-4-氮杂庚基]-1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷的共轭物

将 8mg 实施例 1a) 所得的寡核苷酸溶于 2.5ml NaHCO₃/Na₂CO₃ 缓冲液 (pH 8.0) 中并与 1mg 10-[7-(4-异硫氰酸根合苯基)-2-羟基-5-氧代-7-(羧甲基)-4-氮杂-庚基]-1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷 (实施例 1f) 标题化合物) 混合。室温下搅拌 5 小时, 通过加入 0.01M 盐酸调节 pH 至 7.2, 然后将溶液通过排阻限为 3,000 的膜 (Amicon YM3) 进行超滤并冷冻干燥。获得 7mg 所需共轭物。

h)35 体寡核苷酸

5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT* T* T* T* T-3'的 5-(6-氨基-己基-磷酸酯) 与 10-[7-(4-异硫氰酸根合苯基)-2-羟基-5-氧代-7-(羧甲基)-4-氮杂庚基]-1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷之 ¹¹¹ 铟络合物

将 15μl 乙酸铟 (III) 溶液 (350μC) (自溶于 2M 乙酸钠溶液的氯化 ¹¹¹ 铟 (III) 制得并以 0.1M 盐酸调节 pH 至 4.0) 加入 135μl 溶于 MES 缓冲液 (pH 6.2) 之 1mg 实施例 1g) 标题化合物溶液中 (MES = 2-(N-吗啉代) 乙磺酸)。以加入 0.01M 盐酸调节 pH 至 4.2。于 pH 4.2、室温 37℃ 下搅拌 1 小时。以 2M 乙酸钠溶液调节 pH 至 6 且加入 10μl 0.1M Na₂EDTA = 乙二胺四乙酸二钠盐络合过量的 ¹¹¹ 铟。以 HPLC (排阻色谱法: TSK-400/MES 缓冲液) 对所获之标记共轭物进行最后的纯化 (1 小时)。以生理食盐溶液稀释含有标记共轭物之级分, 以 0.01 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.2 并过滤。所得到的溶液代表了放射性诊断的适宜制备物。

实施例2

a)35 体寡核苷酸

5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT* T* T* T* T-3'的 5'-(6-氨基-己基-磷酸酯)与 N-[2-氨基-3-(4-异硫氰酸根合苯基)丙基]-反式-环己烷-1,2-二胺-N, N', N'', N''-五乙酸之共轭物

将 8mg 实施例(a)所得寡核苷酸溶于 2.5ml NaHCO₃/Na₂CO₃ 缓冲液(pH8.0)中并加入 1mg N-[2-氨基-3-(对-异硫氰酸根合苯基)丙基]-反式-环己烷-1,2-二胺-N, N', N'', N''-五乙酸(按照 Bioconjugate Chem. 1, 59(1990)制得)。室温下搅拌 5 小时, 然后以 0.1M 盐酸调节 pH 至 7.2, 将溶液通过排阻限为 3,000 的膜(Amicon YM3)进行超滤。冷冻干燥后, 得到 6mg 硫脲共轭物 2a)。

b)35 体寡核苷酸

5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT* T* T* T* T-3'之 5'-(6-氨基-己基-磷酸酯)与 N-[2-氨基-3-(4-异硫氰酸根合苯基)丙基]-反式环己烷-1,2-二胺-N, N', N', N'', N''-五乙酸共轭物的²¹²铋络合物

以 2M 乙酸调节溶于 0.1M 氢碘酸之四碘化²¹²铋溶液 pH 至 4。将活性为约 3mCi 的一份该溶液加至 1mg 实施例 2a)标题化合物中, 溶于 0.5ml 0.02M MES 缓冲液中, 且加入 0.5ml 0.15M 氯化钠溶液。室温下搅拌 20 分钟。以 2M 乙酸钠溶液调节 pH 为 6 并加入 20μl 0.01M Na₂EDTA 液。搅拌 20 分钟。以 HPLC(排阻色谱法: TSK-400/MES 缓冲液)进行络合物的纯化。合并放射性共轭物级分, 以生理食盐溶液稀释并用 0.01 氢氧化钠溶液调节 pH 为 7.2。滤过后得到适于放射性治疗的制备物。

实施例3

a)35 体寡核苷酸

5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT* T* T* T*

T-3'的 5'-(6-氨基-己基-磷酸酯)与 N-[2-氨基-3-(4-异氰硫基苯基)丙基]-反式-环己烷-1,2-二胺-N,N',N'',N''-五乙酸之共轭物的¹¹¹钍络合物

将 15 μ l 乙酸¹¹¹钍(III)溶液(350 μ Ci)(由溶于 2M 乙酸钠溶液的氯化¹¹¹钍(III)制备并以 0.1M 盐酸调节 pH 至 4.0)加至 0.5ml 含 1mg 实施例 2a)标题化合物之 MES 缓冲液(pH6.2, MES=2-[N-吗啉代]乙磺酸)中。用 0.01M 盐酸调节 pH 至 5.0。于 pH5.0 和 37℃ 下搅拌 1 小时。以 2M 乙酸钠溶液调节 pH 至 6 并加入 10 μ l 0.1M Na₂EDTA= 乙二胺四乙酸二钠盐络合过量的¹¹¹钍。以 HPLC (排阻色谱法:TSK-400/MES 缓冲液)对所得标记共轭物进行最后的纯化 1 小时。用生理食盐溶液稀释含标记共轭物之级分,以 0.01M 氢氧化钠调节 pH 至 7.2 并过滤。从而产生的溶液代表放射性诊断之适宜制备物。

实施例 4

a)35 体寡核苷酸

5'-CUCAUGCAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T*T-3'之 5'-(6-氨基-1-己基-磷酸酯)与 2-(4-异硫氰酸根合苄基)-二亚乙基三胺-N,N,N',N'',N''-五乙酸的共轭物。

将 8mg 实施例 1a)所得寡核苷酸溶于 2.5ml NaHCO₃/Na₂CO₃ 缓冲液(pH8.0)中并加入 1mg 2-(4-异硫氰酸根合苄基)-二亚乙基三胺-N,N',N',N'',N''-五乙酸(根据 Bioconjugate Chem. 2, 187 (1991)制备。)室温下搅拌 5 小时,然后以 0.01M 盐酸调整 pH 为 7.2,将溶液通过排阻限为 3,000 的膜(Amicon YM3)进行超滤,冷冻干燥后得到 6mg 硫脲共轭物。

b)35 体寡核苷酸

5'-CUCAUGCAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T*T-3'之 5'-(6-氨基-1-己基-磷酸酯)与 2-(4-异硫氰酸根合苄基)-二亚乙基三胺-N,N,N',N'',N''-五乙酸的共轭物的 ⁹⁰钇

络合物

将溶于 0.05M 乙酸铵溶液的 ^{90}Sr 溶液(约 380mCi)加入溶于 0.5ml 0.05M pH6 乙酸铵溶液的 1mg 实施例 4a) 之硫脲衍生物中, 以 3M 乙酸调节 pH 至 5.2 并于室温下搅拌 1 小时。以 0.01M 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.0 并以 HPLC(TSK-400/MES 缓冲液) 纯化共轭物。混合主要组分, 以生理食盐溶液稀释并以 0.01NaOH 溶液调节 pH 为 7.2。过滤后, 得到适于放射性治疗的制备物。

实施例 5

a) 35 体寡核苷酸 5' - T* T* T* T* TAGGAGGAG-GAGGGAGAGCGCAAUGAGAUU - 3' (经修饰的丝氨酸蛋白酶配体) 之 5' - (6-巯基-1-己基-磷酸酯)

以通常方法于 (Pharmacia Company) 自动合成仪上合成经 SELEX 法鉴定、在糖单位上经过修饰并在 5 端联有 5 个胸苷的 30 体寡核苷酸 5' - AGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUGAGAUU - 3' (美国专利 5, 270, 163 中的序列号 13) (参见 Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed. F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), 且该寡核苷酸也存在于固体载体之柱上。通过与溶于二氯甲烷之三氯乙酸溶液反应, 将 5'-羟基打开。柱上负载约 10mg 35 体寡核苷酸。为连接接头, 将该柱在四唑存在下与溶于乙腈的 50 μmol β -氰乙基-N,N-二异丙胺-S-三苯甲基-6-巯基)-氨基亚磷酸酯反应。以溶于四氢呋喃中的碘将所形成的亚磷酸酯氧化成完全受保护的磷酸三酯。然后, 先后用甲醇和水冲洗柱子。为从固相载体上去除已修饰的寡核苷酸, 将该柱内容物移至多管形瓶中与 5ml 30% 氨溶液混合, 将试管密封并于 55°C 振荡过夜。然后冷却至 0°C, 离心, 用 5ml 水冲洗该载体并将混合的水相冷冻干燥。

为了纯化, 将固体物质溶于 2ml 水中, 与 2ml 0.5M 乙酸铵溶液混合并与 10ml 乙醇混合, 于 -20°C 静置过夜, 离心, 残留物用 1ml 乙醇(-20°C) 冲洗并最终于室温下真空干燥。

获得 9mgS-三苯甲基化的标题化合物。为裂解三苯甲基保护的基团,将该产物溶于 0.5ml 水中,与 0.1ml 1M 硝酸银溶液混合并于室温下搅拌 1 小时。然后,将其与 0.1ml 1M 二硫苏糖醇溶液混合。15 分钟后,离心并以乙酸乙酯提取上清液数次。冷冻干燥后,从水溶液中得到了 8mg 所希望的标题化合物。

b)4-苄氧基-N-甲磺酰基-苯丙氨酸-甲酯

于 0℃ 将 19.58g 氯化甲磺酸滴入溶于 300ml 吡啶的 50g 4-苄氧基-苯丙氨酸-甲酯-盐酸化物中并于 0℃ 搅拌 3 小时。真空蒸发干燥并将残留物溶于 500ml 二氧甲烷中。每次以 300ml 5N 盐酸振摇 2 次,于硫酸镁上干燥并于真空中蒸发浓缩。从 150ml 甲醇中重结晶出残留物。

产量:53.64g 无色的晶状粉末。

c)2-(4-苄氧苄基)-1-甲磺酰基-1,4,7-三氮杂庚-3-酮

将 37.2g 4-苄氧基-N-甲磺酰基-苯丙氨酸-甲酯与 1.2l 1,2-二氯基乙烷于 80℃ 搅拌 3 小时。残留物蒸发干燥并吸收性沉淀于 200ml 水中,吸出沉淀物,以水中性冲洗并于 60℃ 干燥过夜。

产量:37.68g 乳色、无定形粉末。

d)2-(4-苄氧基苄基)-1-甲磺酰基-7-(叔-丁氧羰基)-1,4,7-三氮杂庚-3-酮

将 16.23g 2-(4-苄氧基苄基)-1-甲磺酰基-1,4,7-三氮杂庚-3-酮及 4.76g 三乙胺溶于 200ml 氯仿的溶液于 0℃ 与溶于 50ml 氯仿之 10.27g 二碳酸二叔丁酯溶液混合。室温下搅拌 5 小时,以 5% 碳酸钠溶液和水振摇,于硫酸镁上干燥并真空蒸发浓缩。自 100ml 甲醇中使残留物重结晶。

产量:20.19g 泡沫状固体。

e)2-(4-羟苄基)-1-甲磺酰基-7-(叔-丁氧羰基)-1,4,7-

三氮杂庚-3-酮

将溶于 300ml 二氯甲烷中的 20g 2-(4-苄氧基苄基)-1-甲磺酰基-7-(叔-丁氧羰基)-1,4,7-三氮杂庚-3-酮在氢气环境下与 4g 钨-碳(10%)搅拌过夜。将其过滤并以真空蒸发进行浓缩。

产量:16.17g 透明泡沫,它于几分钟后固体化。

f) 2-[4-(3-氧杂丙酸-苄酯)-苄基]-1-甲磺酰基-7-(叔-丁氧羰基)-1,4,7-三氮杂庚-3-酮

将 15g 2-(4-羟苄基)-1-甲磺酰基-7-(叔-丁氧羰基)-1,4,7-三氮杂庚-3-酮, 8.56g 溴乙酸-苄基酯和 13.18g 碳酸钾于 300ml 乙腈中回流 24 小时。过滤并真空蒸发干燥。残留物溶于 200ml 二氯甲烷中,每次以 50ml 水振荡共 2 次。有机相在硫酸镁上干燥并真空蒸发浓缩。残留物用二氯甲烷-己烷-丙酮(20/10/1)作洗脱剂进行层析。

产量:10.06g 泡沫状固体。

g) 2-[4-(3-氧杂丙酸-苄酯)-苄基]-1-甲磺酰基-1,4,7-三氮杂庚-3-酮

将 10g 2-[4-(3-氧杂丙酸-苄酯)-苄基]-1-甲磺酰基-7-(叔-丁氧羰基)-1,4,7-三氮杂庚-3-酮与 100ml 三氟乙酸于室温下搅拌 1 小时。真空蒸发干燥。

产量:9.2g 透明泡沫,它静置时固体化。

h) 9-氯-1-甲磺酰基-2-[4-(3-氧杂丙酸-苄酯)-苄基]-1,4,7-三氮杂-3,8-二酮

将 9g 2-[4-(3-氧杂丙酸-苄酯)-苄基]-1-甲磺酰基-1,4,7-三氮杂庚-3-酮与 1.78g 三乙胺溶于 200ml 氯仿中。于 0℃,将溶于 20ml 氯仿中的 1.98g 氯乙酰氯于 30 分钟内滴入,并于 0℃搅拌 2 小时。以 100ml 5% 盐酸冲洗,每次以 50 水冲洗共两次,

在硫酸镁上干燥并在真空中蒸发至干燥。残留物以二氯甲烷-乙酸乙酯(20/1)作为洗脱剂在硅胶上进行层析。

产量:6.97g 蜡状固体。

i) 9-氯-1-甲磺酰基-2-[4-(3-氧杂丙酸-苄酯)-苄基]-1,4,7-三氮杂-3,8-二酮

将溶于 150ml 二氯甲烷中的 6.5g 9-氯-1-甲磺酰基-2-[4-(3-氧杂丙酸-苄酯)-苄基]-1,4,7-三氮杂-3,8-二酮与 2g 钨-碳(10%)在氢气环境下搅拌过夜。过滤并将溶液真空蒸发浓缩。

产量:5.33g 透明固体。

j) 10-乙酰基-2-[4-(3-氧杂丙酸)-苄基]-1-(甲磺酰基)-10-硫代-1,4,7-三氮杂癸烷-3,8-二酮

将溶于 80ml 氯仿中的 5g 9-氯-1-甲磺酰基-2-[4-(3-氧杂丙酸-苄酯)-苄基]-1,4,7-三氮杂-3,8-二酮与 1.98 克三乙胺和 0.74g 硫代乙酸回流 10 分钟。将溶液注入 200ml 冰冷的 5% 盐酸中,分离有机相,在硫酸镁上干燥并真空蒸发浓缩。在用己烷-乙酸乙酯(3/1)于硅胶上进行层析后,得到了呈透明固体状的 4.64g 所期望的化合物。

k) 10-乙酰基-2-[4-(3-氧杂丙酸)-(2,5-二氧代-吡咯烷-1-基)-酯)-苄基]-1-(甲磺酰基)-10-硫代-1,4,7-三氮杂癸烷-3,8-二酮

将 4g 10-乙酰基-2-[4-(3-氧杂丙酸)-苄基]-1-(甲磺酰基)-10-硫代-1,4,7-三氮杂癸烷-3,8-二酮、1.91g 二环己基碳二亚胺、4g N-羟基琥珀酰亚胺和 30mg 4-二甲氨基吡啶于室温下在 20ml 氯仿中搅拌 24 小时。然后将其与 20ml 乙醚混合,过滤且将残留物真空蒸发浓缩。用二氯甲烷-二噁烷(10/1)作洗脱剂于硅胶上对残留物进行层析。

产量:3.47g 乳色固体。

元素分析:

计算值:C46.15 H4.93 N9.78 S11.20

实测值:C46.03 H4.83 N9.64 S11.05

1)10-乙酰基-2-[4-[3-氧杂丙酸-(6-马来酰亚氨基-己酰基)-酰肼]-苄基]-1-甲磺酰基-10-硫代-1,4,7-三氮杂癸烷-3,8-二酮

将 3g 10-乙酰基-2-[4-(3-氧杂丙酸-(2,5-二氧代-吡咯烷-1-基)-酯)-苄基]-1-(甲磺酰基)-10-硫代-1,4,7-三氮杂癸烷-3,8-二酮与 1.17g 6-马来酰亚氨基己酸酰肼(Science261,212(1993))于 60℃ 在 40ml 二甲基甲酰胺中搅拌 5 小时。随着剧烈的搅拌,滴入 100ml 水并从已沉淀的沉淀物中滤出然后真空干燥并在硅胶柱上用二氯甲烷/二噁烷(10/1)作洗脱剂对残留物进行 FLASH 层析加以纯化。得到 2.8g 呈白色固体状的标题化合物。

元素分析(相对于无水物):

计算值:C49.25 H5.61 N12.30 S9.39

实测值:C49.33 H5.95 N12.43 S9.11

m) 35 体寡核苷酸 5'-T* T* T* T* TAGGAGGAG-GAGGGAGAGCGCAAUGAGAUU-3'的 5'-(6-巯基-1-己基-磷酸酯)与 10-乙酰基-2-[4-[3-氧杂丙酸-(6-马来酰亚氨基)-己酰基)-酰肼]-苄基]-1-甲磺酰基-10-硫代-1,4,7-三氮杂癸烷-3,8-二酮的共轭物

在 2ml 磷酸缓冲液(pH7.4)中将 5mg 根据实施例 5a)制备的含巯基的寡核苷酸与溶于 0.2ml 二甲基甲酰胺中的按照实施例 5l)制备的 1mg 马来酰亚胺衍生物混合。室温下静置 2 小时,将溶液用排阻限为 3,000 的膜(Amicon YM3)进行超滤,然后冷冻干燥。获得 5mg 所期望的共轭物。

n) 35 体寡核苷酸 5' - T* T* T* T* TAGGAGGAG-GAGGGAGAGCGCAAUGAGAUU-3' 的 5'-(6-巯基-1-己基-磷酸酯)与 10-乙酰基-2-[4-[3-氧杂丙酸-(6-马来酰亚氨基)-乙酰基)-酰肼]-苄基]-1-甲磺酰基-10-硫代-1,4,7-三氮杂癸烷-3,8-二酮的镓-99m 络合物

将溶于 0.2MNaHCO₃ 中的 D-葡萄糖二酸钾(12mg/ml)和氯化锡(II)(100mg/ml)溶液 1ml 于管形瓶中冷冻干燥并与得自 MO99/Tc-99m 产生器的 [Tc-99m]-高锝酸钠溶液(1ml, 1mCi)混合。在室温下静置 15 分钟后,移取出一份溶液并与同样体积的溶于 0.2MNaHCO₃ 液中的实施例 5m)之共轭物(1mg/ml)混合。15 分钟后,薄层层析与 HPLC 两者显示大于 98% 的放射性由共轭物获得。

实施例 6

a)35 体寡核苷酸

5' - CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUA T* T* T* T* T-3' 的 5'-(6-氨基-1-己基-磷酸酯)与 S-苯甲酰 MAG₃-2,3,5,6-四氟苯酯之共轭物

将 3mg 溶于 0.2ml 二甲基甲酰胺的 S-苯甲酰-MAG₃-2,3,5,6-四氟苯酯(按 US4,965,392 制备)加入 8mg 溶于 0.5ml 0.1M 磷酸缓冲液(pH7)的实施例 1a)之标题化合物中,室温下搅拌 3 小时。以水将其稀释并将其进行超滤(Amicon YM3, 排阻限 3,000)。冷冻干燥,得到 5mg 共轭物 6a)。

b)35 体寡核苷酸

5' - CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUA T* T* T* T* T-3' 的 5'-(6-氨基-1-己基-磷酸酯)与 S-苯甲酰 MAG₃-2,3,5,6-四氟苯酯共轭物之 99m 镓络合物

将 1mg 实施例 6a)之标题化合物溶于 200μl 水中并与 1ml pH8.5 的 0.1M 磷酸缓冲液混合。向该混合物中加入 200μl^{99m}镓-(V)

—葡萄糖酸盐(约 15mCi)并在室温下静置 15 分钟。示踪物的产量(由 HPLC 测定)约为 95%。

实施例 7

a) 35 体寡核苷酸

5' - CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT* T* T* T* T - 3' 之 5' - (6 - 氨基 - 1 - 己基 - 磷酸酯) 与 2, 3, 5, 6 - 四氟苯基 - 4, 5 - 双(巯基乙酰氨基) - 戊酸酯的共轭物

将溶于 0.6ml 磷酸缓冲液中的 3mg 实施例 1a) 标题化合物加至溶于 2ml pH7.2 磷酸缓冲液中约 100mCi 的 2, 3, 5, 6 - 四氟苯基 - 4, 5 - 双(巯基乙酰氨基) - 戊酸酯的^{99m}Tc 络合物(按 J. Nucl. Med. 32, 1445(1991) 制备)中。以 1.0M 碳酸钾缓冲液调节 pH 至 10 并于室温下搅拌 20 分钟。为进行最终纯化, 将溶液加至 Sephadex 柱 (Pharmacia) 上并以 75mmol 氯化钠溶液洗脱。合并主要级分, 以生理食盐溶液稀释并过滤。所得的溶液可用于放射性诊断研究中。

实施例 8

a) 35 体寡核苷酸 5' - T* T* T* T* TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAAUGAGAUU - 3' 的 5' - (6 - 巯基 - 1 - 己基 - 磷酸酯) 与 5' (N - 马来酰亚氨基) - 3 - 氧杂戊基 - {2 - [3 羧基苯甲酰基] - 硫代} - 乙酰基} - 甘氨酸甘氨酸甘氨酸酯之共轭物。

将 5mg 根据实施例 5a) 制备的含硫代基的寡核苷酸混于 2ml 磷酸缓冲液 (pH7.4) 中并与溶于 0.2ml 二甲基甲酰胺的 1mg 5 - (N - 马来酰亚氨基) - 3 - 氧杂戊基 - {2 - [3 - 羧基 - 苯甲酰基] - 硫代} - 乙酰基} - 甘氨酸甘氨酸甘氨酸酯(按 Bioconj. Chem. 1, 431(1990) 制备)于 N₂ 条件下混合。室温下静置 2 小时并将溶液通过膜 (Amicon YM3) 进行超滤, 再冷冻干燥。得到所期望的共轭物 5.5mg。

b) 35 体寡核苷酸 5' - T* T* T* T* TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAAUGAGAUU - 3' 的 5' - (6 - 巯基 - 1 - 己基

-磷酸酯)与 5'-(N-马来酰亚氨基)-3-氧杂戊基-{2-[3-羧苯甲酰基)-硫代]-乙酰基}-甘氨酸甘氨酸甘氨酸酯之共轭物的^{99m}Tc络合物

将 1ml 溶于 0.2MNaHCO₃ 中的 D-葡萄糖二酸钾(12mg/ml)和氯化锝(II)(100μg/ml)的溶液于一管形瓶中冷冻干燥,然后与得自 M0-99/Tc-99m 发生器的[Tc-99m]-高锝酸钠溶液(1ml, 1mCi)混合。室温静置 15 分钟后,取出 1 份样品与同体积的溶于 0.2MNaHCO₃ 溶液中的实施例 8a)之共轭物(1mg/ml)混合。冷冻干燥分离该物质。HPLC 测定的示踪物产率为大于 96%。

实施例 9

a) 35 体寡核苷酸 5' - T* T* T* T* TAGGAGGAG-GAGGGAGAGCGCAAAUGAGAUU - 3'之 5'-(6-巯基-1-己基-膦酸酯)与 1-[6-(2-乙烯基-6-己氧甲基)吡啶]-1,4,8,11-四氮杂环十四烷的共轭物

将溶于 2ml 磷酸缓冲液(pH7.4)的 4mg 由实施例 5a)制备的含硫代基的寡核苷酸之溶液在 N₂ 环境下与溶于 0.5ml 二甲基甲酰胺的 1mg 1-[6-(2-乙烯基-6-己基-甲氧基)吡啶]-1,4,8,11-四氮杂环十四烷(根据 EP0588 229 制备)混合。于 35℃ 使其搅拌 4 小时,与 10ml 乙醇混合,将产物离心分离。以反相色谱法,用 50mmol 乙酸三乙胺(pH7)乙腈梯度在 1x25cm 层析柱上进行纯化。将合并的级分冷冻干燥,溶于 1ml 水中并于 Sephadex G-10 柱上脱盐。冷冻干燥分离得到标题化合物(约 4mg)。

b) 35 体寡核苷酸 5' - T* T* T* T* TAGGAGGAG-GAGGGAGAGCGCAAAUGAGAUU - 3'的 5'-(6-巯基-1-己基-膦酸酯)与 1-[6-(2-乙烯基-1-己基甲氧基)-吡啶]-1,4,8,11-四氮杂环十四烷之共轭物的 Tc-99m 络合物

按实施例 8b)所述方法进行。HPLC 测定的示踪物产率为 92%。

实施例 10

a) 35 体寡核苷酸 5' - T* T* T* T* TAGGAGGAG-GAGGGAGAGCGCAAAUGAGAUU - 3' 之 5' - (6-巯基-1-己基-膦酸酯) 与 -N-[4-羟基-3-(1,4,8,11-四氮杂-环十四-5-基)-苄基]-2-(6-乙烯基-吡啶-2-基甲氧基)-乙酰胺的共轭物

将溶于 2ml 磷酸缓冲液 (pH8.0) 中的 6.5mg 含巯基的寡核苷酸 (按实施例 5a) 制备) 溶液与溶于 0.1ml 二甲基甲酰胺之 1.2mg N-[4-羟基-3-(1,4,8,11-四氮杂-环十四-5-基)苄基]-2-(6-乙烯基-吡啶-2-基甲氧基)-乙酰胺 (按 J. Chem. Soc, Chem. Commun, 156(1988) 制备) 混合。于 N₂ 中在 35℃ 搅拌 4 小时, 与 10ml 乙醇混合, 离心分离产物。用反相色谱纯化, 用 50mmol 乙酸三乙铵 (pH7)/乙腈梯度在 1x25cm 层析柱上进行。混合的级分于 Sephadex G-10 柱上脱盐。冷冻干燥得到了 5mg 白色粉状的标题化合物。

b) 35 体寡核苷酸 5' - T* T* T* T* TAGGAGGAG-GAGGGAGAGCGCAAAUGAGAUU - 3' 的 5' - (6-巯基-1-己基-膦酸酯) 与 N-[4-羟基-3-(1,4,8,11-四氮杂-环十四-5-基)-苄基]-2-(6-乙烯基-吡啶-2-基甲氧基)-乙酰胺之共轭物的铜-64 络合物

将 1mg 按 10a) 所得的共轭物在含 64CuCl₂ (0.2mCi) 的 1ml 磷酸缓冲液 (pH8) 中温育。1 小时 HPLC 测定的示踪物产率大于 98%。冷冻干燥分离产物。

实施例 11

a) 35 体寡核苷酸 5' - T* T* T* T* TAGGAGGAG-GAGGGAGAGCGCAAAUGAGAUU - 3' 的 5' - (6-巯基-1-己基-膦酸酯) 与 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-[(5-氮杂-8-马

来酰亚氨基-6-氧代)-辛烷]-1,4,7,10-四乙酸之共轭物

将 1mg-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-[(5-氮杂-8-马来酰亚氨基-6-氧代)-辛烷]-1,4,7,10-四乙酸(按 J. Chem. Soc., Chem. Commun, 796, (1989) 制备)于 N₂ 中, 加至溶于 2ml 磷酸盐缓冲液(pH8)的 5mg 含巯基的寡核苷酸(按实施例 5a)制备)溶液中。于 35℃ 搅拌 3 小时, 与 10ml 异丙醇混合, 离心分离产物。用反相层析法纯化, 该法应用 25mmol 乙酸三乙铵(pH7)/乙腈梯度之 1x25cm 层析柱。合并的级分在真空中蒸发轻度浓缩, 溶于少量水中并借助 Sephadex G-10 柱脱盐。冷冻干燥得到 4mg 白色粉状的标题化合物。

b) 35 体寡核苷酸 5' - T* T* T* T* TAGGAGGAG-GAGGGAGAGCGCAAUGAGAUU-3' 的 5'-(6-巯基-1-己基-膦酸酯)与-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-2-[(5-氮杂-8-马来酰亚氨基-6-氧代)-辛烷]-1,4,7,10-四乙酸之共轭物的钇-90 络合物

将溶于 1ml 0.05M 乙酸铵溶液中的 ⁹⁰Y-乙酸盐(1mCi)与 1mg 按实施例 11a) 制备的共轭物混合并加热至 85℃ 1 小时。HPLC 测定的示踪物产率大于 95% 冷冻干燥分离产物。

实施例 12

a) 35 体寡核苷酸 5' - T* T* T* T* TAGGAGGAG-GAGGGAGAGCGCAAUGAGAUU-3' 的 5'-(6-巯基-1-己基-膦酸酯)与 1,4,7-三氮杂环壬烷-2-[(5-氮杂-8-马来酰亚氨基-6-氧代)-辛烷]-1,4,7-三乙酸之共轭物

将 1mg 1,4,7,10-三氮杂环壬烷-2-[(5-氮杂-8-马来酰亚氨基-6-氧代)-辛烷]-1,4,7-三乙酸(按 J. Chem. Soc., Chem. Commun. 794, (1989), 制备)在氮气条件下加至溶于 2ml 磷酸盐缓冲液(pH8)的 5mg 含巯基寡核苷酸(按实施例 5a)制备)溶液中。35℃ 搅拌 6 小时, 与 10ml 异丙醇混合, 离心分离产物。以反相

层析法纯化,层析应用 25mmol 乙酸三乙铵(pH7)/乙腈梯度的 1x25cm 层析柱。合并的级分真空蒸发轻微浓缩,并溶于少量水中,借助 Sephadex G-10 柱脱盐。冷冻干燥获得 3mg 白色粉状标题化合物。

b) 35 体寡核苷酸 5' - T* T* T* T* TAGGAGGAG-GAGGGAGAGCGCAAAUGAGAUU - 3'的 5'-(6-巯基-1-己基-膦酸酯)与 1,4,7-三氮杂环壬烷-2-[(5-氮杂-8-马来酰亚氨基-6-氧代)辛烷]1,4,7-三乙酸之共轭物的镓-67 络合物

将 20mg 按实施例 12a)制备的共轭物溶于 0.5ml 0.1M 柠檬酸盐缓冲液(pH4.5)中并与 0.1ml 镓-67 柠檬酸盐溶液(0.2mCi)混合。室温下静置 2 小时并于 Sephadex G-10 柱上使产物脱盐。冷冻干燥后得到 17mg 白色粉状标题化合物。

实施例 13

a) 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-5-(丙-2-烯-1-酮)-2'-脱氧尿苷的亚磷酸化

将 50mg 4-二甲氨基吡啶、3ml 二异丙基乙胺和 962 μ l (4.31mmol)的 2-氰乙基-N,N-二异丙基氧氨基亚磷酸酯先后加入于 50ml 四氢呋喃的 2.1g (3.59mmol) 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-5-(丙-2-烯-1-酮)-2'-脱氧尿苷(按 Nucleosides & Nucleotides 13, 939-944, (1994)制备)中搅动着的溶液中。约 30 分钟后形成白色沉淀。将其过滤,溶液真空蒸发浓缩且残留物分布于二氯甲烷和 5%碳酸氢钠溶液之间。将二氯甲烷相于硫酸镁上干燥并真空蒸发浓缩。残留物用硅胶上的快速层析加以纯化,并将其用二氯甲烷/己烷/二异丙基乙胺(80:18:2)洗脱。得到 1.8g 白色泡沫状所需化合物。

元素分析:

计算值: C64.28 H6.29 N7.14 P3.95

实测值: C64.02 H6.60 N7.21 P4.09

b) 36 体寡核苷酸 $U^* T^* T^* T^* T^* TCUCAUG-GAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUA-3'$ 与 10-(4-氨基-2-羟基-5-亚氨基-8-巯基-辛烷)-1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷的共轭物

U^* : 5-(丙-2-烯-1-酮)-2'-脱氧尿苷

按 SELEX 法确定的 30 体寡核苷酸是以常规方法对 5' 连接的序列 $5'-T^*T^*T^*T^*T$ 加以修饰制备的, 此修饰是在 Pharmacia 公司的自动合成仪中完成的(参见 *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach*, Ed, F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), 并且该核苷酸也存在于固相载体柱上。通过与溶于二氯甲烷中的三氯乙酸溶液反应, 使 5'-羟基基团打开。上样于柱上约 10mg 35 体寡核苷酸。在四唑存在条件下 5'-羟基基团与按实施例 13a) 所得的氨基亚磷酸酯反应。然后, 借助用碘溶液处理, 将该亚磷酸盐转化成磷酸三酯, 且末端 DMT 基团通过与溶于二氯甲烷的三氯乙酸溶液反应加以裂解。为向末端 2'-脱氧尿苷上的 α, β -不饱和羰基系统加入巯基基团, 将其与溶于四氢呋喃的 10-(4-氨基-2-羟基-5-亚氨基-8-巯基-辛烷)-1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷*) 溶液反应, 且先后用甲醇和水冲洗。为从固相载体上去除已修饰的寡核苷酸, 将柱的内容物移至多管形瓶中, 与 5ml 30% 氨溶液混合, 将管密封并于 55℃ 振荡过夜。然后冷却至 0℃, 离心, 以 5ml 水冲洗载体并将合并的水相冷冻干燥。

为了纯化, 将固状物溶于 2ml 水中, 与 2ml 0.5M 乙酸铵溶液混合且与 10ml 乙醇混合, 于 -20℃ 静置过夜, 离心, 残留物用 1ml 乙醇 (-20℃) 冲洗并于室温下最后进行真空干燥。

得到 6mg 无色粉末状标题化合物。

*) 10-(4-氨基-2-羟基-5-亚氨基-8-巯基-辛烷)-1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷是按下述过程得

到的:

将 15.7ml 1N 氢氧化钠溶液和 480mg (3.49mmol) 2-亚氨基四氢嘧吩盐酸化物加至溶于 50ml 水与 50ml 甲醇混合物中的 1.46g (3.49mmol) 10-(3-氨基-2-羟基-丙基)-1,4,7-三-(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷(见实施例 1c)的溶液中, 室温下搅拌 3 小时, 真空蒸发浓缩至起始体积的约 1/4, 搅拌下与阴离子交换剂(IRA410)混合直至 pH 达到 11。将溶液过滤, 搅拌下以少量与足量的阳离子交换剂 IRC50 混合直至 pH 达到 3.5。过滤后, 将溶液冷冻干燥。得到含水量 4.9% 的白色粉末状所需物质。

元素分析(相对于无水物):

计算值: C48.45 H7.74 N16.14 S6.16

实测值: C48.30 H7.98 N16.05 S6.44

c) 36 体寡核苷酸 U* T* T* T* T* TCUCAUGGAGC-CAAGACGAAUAGCUACAUA-3' 与 10-(4-氮杂-2-羟基-5-亚氨基-8-巯基-辛烷)-1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷之共轭物的钇-90 络合物

U*: 5-(丙-2-烯-1-酮)-2'-脱氧尿苷

将溶于 0.05M 乙酸铵溶液中的⁹⁰钇溶液(约 380mCi)加至溶于 0.5ml pH6 的 0.05M 乙酸铵溶液的 1mg 实施例 13b)之硫代衍生物中, 以 3M 乙酸调节 pH 至 5.2 并于室温下搅拌 1 小时。以 0.01M NaOH 溶液调节 pH 至 7.0, 以 HPLC(TSK-400/MES 缓冲液)纯化共轭物。混合主要的级分, 以生理食盐溶液稀释并以 0.01M NaOH 溶液调节 pH 至 7.2。过滤后, 得到适用于放射性治疗的制备物。

实施例 14

a) S-(三苯基甲基-巯基乙酰)-甘氨酸-甘氨酸甲基酯

将 3.34g (10mmol) S-三苯基甲基-巯基乙酸及 1.83g (10mmol) 甘氨酸甘氨酸甲基酯盐酸化物悬浮于 250ml 无水二氯甲烷中。在加入 1.01g (10mmol) 三乙胺后, 将溶于 50ml 无水二氯甲烷

中的 2.06g(10mmol)二环己基碳化二亚胺滴入,边滴边用冰冷却。于 0℃ 搅拌 1 小时并于室温搅拌 18 小时。将其过滤,蒸发浓缩并于硅胶上进行层析(洗脱液:CH₂Cl₂/MeOH:10-30%)。

产量:3.56g(理论值的 77.0%),白色粉末

元素分析:

计算值:C67.51 H5.67 N6.06 O13.84 S11.20

实测值:C67.37 H6.02 N5.91 S6.73

b)[S-(三苯基甲基-巯基乙酰)-甘氨酸-甘氨酸胺基]-6-己醇

在氩气环境下将 4.63g(10mmol)S-(三苯基-甲基-巯基乙酰)-甘氨酸-甘氨酸甲基酯(由实施例 14a)制备)于 11.72g(100mmol)6-氨基-己醇/50ml1,4-二恶烷中加热至 100℃ 2 小时。然后,将反应物倾倒入 100ml 二氯甲烷与 100ml 水之混合物上。伴随着搅拌与用冰冷却,以 10M 盐酸调节 pH 至 6,分离有机相并于硫酸钠上干燥。蒸发溶剂后,于硅胶上纯化粗制产物(洗脱剂:CH₂Cl₂/MeOH:10%-50%)

产量:2.97g(理论值的 54.2%),白色粉末

元素分析:

计算值:C67.98 H6.81 N7.67 O11.68 S5.85

实测值:C67.72 H6.93 N7.93 S5.64

c)0-{[S-(三苯基甲基-巯基乙酰)-甘氨酸-甘氨酸胺基]-6-己-1-基}-二异丙酰胺-0-甲基-磷酸二酯

将 5.48g(10mmol)[S-(三苯基甲基-巯基乙酰)-甘氨酸-甘氨酸胺基]-6-己醇(按实施例 14b)制备)溶于 100ml 无水二氯甲烷中。于氩气环境中加入 5.17g(40mmol)二异丙基乙胺,并于 0℃ 将溶于 50ml 无水二氯甲烷中的 3.95g(20mmol)磷酸单甲基酯二异丙酰胺氯化物滴入。于 0℃ 搅拌 0.5 小时且再于室温搅拌 2 小时。为了逐步进行,将溶液于冰冷却下与 320mg(10mmol)无水甲醇

混合,且在浓缩后于硅胶上进行层析(洗脱液:CH₂Cl₂/MeOH:95%:5/5%三乙胺)。

产量:1.98g(理论值的27.9%),无色油状物

d) 35 体寡核苷酸 5' - T* T* T* T* TCUCAUG-GAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUA - 3'的由 5' - [(巯基乙酰 - 甘氨酸 - 甘氨酸 - 酰胺基) - 6 - 己 - 1 - 基] - 磷酸酯

按 SELEX 法确定的 30 体寡核苷酸是以常规方法对 5'连接的序列 5' - T* T* T* T* T 加以修饰制备的,此修饰是借助 Pharmacia 公司的自动合成仪完成的(见 Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed, F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991),且受保护形式的寡核苷酸也存在于固相载体柱上。将 15mg 35 体寡核苷酸负载于该柱上。5' - DMT - 保护基(三氯乙酸/二氯甲烷)裂解后,以标准方法将其与实施例 14c)所述的氨基亚磷酸酯偶联。在以溶于四氢呋喃中的碘氧化后,从载体上裂解下共轭物。在这种情况下,该物质与 10ml 30% 氨溶液混合,将反应管密封并于 55℃ 振荡过夜。冷却至℃,离心,以 10ml 水冲洗载体且将合并的水相冷冻干燥。

为了纯化,将该物质溶于 5ml 水中,与 4ml 0.5M 乙酸铵溶液合并与 20ml 乙醇混合。为使沉淀完成,将其冷却过夜(-20℃),离心,残留物以 1ml 乙醇(-20℃)冲洗且真空干燥。得到 9mg 白色粉末。

为裂解 S - 三苯甲基保护基,将该物质溶于 5ml 50mmol 乙酸三乙基铵溶液(pH7.0)中并与 500μl 0.1M 硝酸银溶液温育 30 分钟。然后,加入 500μl 0.14M 二硫苏糖醇并再温育 30 分钟。离心后,于 Sephadex G10 柱上对澄清之上清液脱盐处理。冷冻干燥含该产物的级分。得到 4mg 白色粉状的共轭物。

e) 35 体寡核苷酸 5' - T* T* T* T* TCUCAUG-GAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUA - 3'的 5' - [(巯基乙酰 - 甘

氨酰-甘氨酸-酰胺基)-6-己-1-基]-磷酸酯共轭物之得-99m 络合物

将 1mg 共轭物 14d)溶于 1ml 0.1M 磷酸氢二钠缓冲液(pH=9.5)。加入 10mg 酒石酸二钠后,将其与高锝酸钠溶液(1mCi)混合并再与 10ml 氯化锡(II)溶液(5mgSnCl₂/1ml 0.01M HCl)混合。由 HPLC 测定示踪物产率(约 93%)。

实施例 15

a) 0-[S-(三苯基甲基-巯基乙酰)甘氨酸-甘氨酸酰胺基]-6-己-1-基]-甲苯磺酸酯

将 5.48g(10mmol)的[S-(三苯基甲基-巯基乙酰)-甘氨酸-甘氨酸酰胺基]-6-己醇(由实施例 14b)制备)溶于 100ml 无水二氯甲烷。将 1.01g(10mmol)三乙胺和 1.91g(10mmol)对-甲苯磺酸氯化物加入并于室温下搅拌 24 小时。然后,浓缩并在硅胶上进行层析(洗脱液:CH₂Cl₂/MeOH:95:5)。

产量:4.32g(理论值的 61.5%),无色油状物

元素分析

计算值:C65.03 H6.18 N5.99 O13.68 S9.14

实测值:C64.93 H6.32 N5.78 S8.87

b) 35 体寡核苷酸 5'-T* T* T* T* TCUCAUG-GAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUA-3'的 5'-[(巯基乙酰-甘氨酸-甘氨酸酰胺基)-6-己-1-基]-磷酸酯

按 SELEX 法确认的 30 体寡核苷酸是经对 5'连接的序列 5'-T* T* T* T* T 加以修饰制备的,此修饰是借助 Pharmacia 公司的自动合成仪完成的(见 Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed - F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991),且受保护形式的寡核苷酸也存在于固相载体柱上。将 15mg35 体寡核苷酸负载于该柱上。5'-DMT-保护基(三氯乙酸/二氯甲烷)裂解后,以标准方法将其与 S-三苯甲基-6-巯

基-己基-氨基亚磷酸酯偶联在以溶于四氢呋喃的碘氧化后,三苯甲基保护的化合物从载体上裂解下来,被分离和纯化(见实施例14d))。

如实施例14d)所述进行S-三苯甲基保护基裂解、载有SH-基团寡核苷酸的分离以及纯化(6mg)。

为了偶联,将溶于500 μ l 0.1M 碳酸钠溶液的载有SH基团之35体寡核苷酸(6mg)在氢气存在的条件下与溶于500 μ l 二甲基甲酰胺中的100mg 甲苯磺酸酯15a)混合。30分钟后,将其中和并用水稀释至5ml。离心后,将澄清上清液冷冻干燥。

为裂解S-三苯甲基基团,按14d)所述进行操作。纯化后,获得4mg 共轭物。

c) 35 体 寡 核 苷 酸 5' - T* T* T* T* TCUCAUG-GAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUA - 3' 的 5' - [(巯基乙酰 - 甘氨酸 - 甘氨酸胺基) - 6 - 己 - 1 - 基] - 磷酸酯共轭物之得 - 99m 络合物

将1mg 实施例15b)描述的共轭物溶于1ml 0.1M 磷酸氢二钠缓冲液(pH=9.5)中。加入10mg 酒石酸二钠后,将其与高锝酸钠(1mCi)混合并再与10 μ l 氯化锡(II)溶液(5mg SnCl₂/1ml 0.01MHCl)混合。HPLC测定示踪物产率(约95%)。

实施例 16

a) N - [3 - 硫杂 - 5 - (三苯基甲基巯基) - 1 - 氧代 - 戊 - 1 - 基] - S - 三苯基甲基 - 半胱氨酸甲基酯

将2.69g(10mmol) N - [3 - 硫杂 - 5 - (三苯基甲基巯基) - 1 - 氧代 - 戊 - 1 - 基] - S - 三苯基甲基 - 半胱氨酸甲基酯(按DE 43 10 999 制备)与5.58g(20mmol)三苯基甲基氯化物一起溶于100ml 无水二氯甲烷中。加入2.02g(20mmol)三乙胺后,室温及氢气环境下搅拌过夜。为了使反应逐步进行,用1%柠檬酸溶液饱和碳酸钠溶液和水分别冲洗有机相,共洗3次,于硫酸钠上干燥后,蒸发浓缩并

于硅胶上纯化(洗脱液:CH₂Cl₂/MeOH;95:5)。

产量:4.53g(理论值的 60.1%),无色油状物

元素分析:

计算值:C73.27 H5.75 N1.86 O6.37 S12.76

实测值:C73.31 H5.48 N1.63 S12.49

b)N-[3-硫杂-5-(三苯基甲基巯基)-1-氧代-戊-1-基]-S-三苯基甲基-N-(6-羟基-己-1-基)半胱酰胺

在氩气条件下将 7.54g(10mmol)N-[3-硫杂-5-(三苯基甲基巯基)-1-氧代-戊-1-基]-S-半胱氨酸甲基酯(实施例 16a)所述)在 11.72g(100mmol)6-氨基己醇/50ml1,4-二噁烷中加热至 100℃2 小时。然后,将反应物倒入 100ml 二氯甲烷与 100ml 水的混合物中。伴随着搅拌和用冰冷却,以 10M 盐酸将其 pH 调节至 6,分离有机相且于硫酸钠上干燥。蒸发溶剂后,于硅胶上纯化粗制产物(洗脱液:CH₂Cl₂/MeOH;5% - 50%)

元素分析:

计算值:C72.99 H6.49 N3.34 O5.72 S11.46

实测值:C72.73 H6.62 N3.11 S11.17

c)O-||[N-[3-硫杂-5-(三苯基甲基巯基)-1-氧代-戊-1-基]-S-三苯基甲基-半胱氨酰]-2-氨基-乙-1-基}-二异丙酰胺-O'-甲基磷酸二酯

将按实施例 16b)制备的 8.39g(10mmol)N-[3-硫杂-5-(三苯基甲基巯基)-1-氧代-戊-1-基]-S-三苯基甲基-N-(6-羟基-己-1-基)半胱酰胺溶于 200ml 无水二氯甲烷中。在氩气环境中加入 5.17g(40mmol)二异丙基乙胺,且于 0℃滴入溶于 50ml 无水二氯甲烷中的 3.95g(20mmol)磷酸单甲基酯-二异丙酰胺氯化物。于 0℃搅拌 0.5 小时且于室温再搅拌 1.5 小时。为了逐步进行反应,将溶液在用冰冷却条件下与 320mg(10mmol)无水甲醇混合,且在离心后于硅胶上进行层析(洗脱液:CH₂Cl₂/MeOH;95:5/5%)

(三乙胺))。

产量:5.37g(理论值的 53.7%),淡黄色油状物。

d) 35 体寡核苷酸 5' - CUCAUGGAGCGCAA-GACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T*T-3'的 5'-[N-(3-硫杂-5-巯基-1-氧代-戊-1-基)-半胱氨酸-N'-(6-羟基-己-1-基)-酰胺]-磷酸酯

按 SELEX 法确认的 30 体寡核苷酸是经对置于上游的 T*T*T*T*T-3'序列加以修饰制备的,此修饰借助 Pharmacia 公司的自动合成仪完成(见 Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Editor F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991),且受保护形式的寡核苷酸也存在于固相载体柱上。将约 15mg 的 35 体寡核苷酸负载于该柱上,5'-DMT-保护基(三氯乙酸/二氯甲烷)裂解后,以标准方法将其与氨基亚磷酸酯(16C)偶联并氧化。

如 14d)所述进行将碱性保护基自载体上裂解以及双-S-三苯甲基保护的共轭物的纯化(约 12mg)。

为裂解 S-三苯甲基保护基,将该物质溶于 5ml50mmol 三乙氨乙酸盐溶液(pH=7.0)中并与 500 μ l0.1M 硝酸银溶液温育 30 分钟。然后,加入 500 μ l0.14M 二硫苏糖醇,再温育 30 分钟。离心后,于 Sephadex G10 上将澄清的上清液脱盐。含有产物的级分冷冻干燥。得到 5mg 白色粉末。

e) 35 体寡核苷酸 5' - CUCAUGGAGCGCAA-GACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T*T-3'之 5'-[N-3-硫杂-5-巯基-1-氧代-戊-1-基]-半胱氨酸-N'-(6-羟基-己-1-基)-酰胺]-磷酸酯共轭物之镓-99m 络合物

将 1mg 实施例 16d 所述之共轭物溶于 1ml0.1M 磷酸氢二钠缓冲液(pH=9.5)中。加入 10mg 酒石酸二钠后,将其与高镓酸钠溶液(1mCi)混合,再与 10ml 氯化锡(II)溶液(5mgSnCl₂/1ml0.01MHCl)

混合。由 HPLC 测定示踪物产率(约 96%)。

实施例 17

a) 0-[N-[3-硫杂-5-(三苯基甲基巯基)-1-氧代-戊-1-基]-S-三苯基甲基-N'-(6-羟基-己-1-基)半胱氨酰亚胺基]-对-甲苯磺酸酯

将以实施例 16b) 方法制得的 8.39g(10mmol) N-[3-硫杂-5-(三苯基甲基巯基)-1-氧代-戊-1-基]-S-三苯基甲基-N'-(6-羟基-己-1-基)半胱氨酰胺溶于 200ml 无水二氯甲烷中。加入 1.01g(10mmol) 三乙胺和 1.91g(10mmol) 对-甲苯磺酰氯并于室温下搅拌 20 小时。然后浓缩并于硅胶上进行层析(洗脱液: CH₂Cl₂/MeOH:97:3)。

产量: 6.44g(理论值的 67.0%) 淡黄色油状物

元素分析:

计算值: C72.47 H6.29 N2.91 O8.32 S10.01

实测值: C72.19 H6.47 N2.68 S9.83

b) 35 体寡核苷酸 5' - CUCAUGGAGCGCAA-GACGAAUAGCUACAUA T* T* T* T-3' 之 5'[(巯基乙酰-甘氨酸-甘氨酸胺基)-13-十三烷-7-硫代-1-基]-磷酸酯

按 SELEX 法确认的 30 体寡核苷酸是经对置于上游的序列 T* T* T* T-3' 加以修饰制备的, 此修饰借助 Pharmacia 公司的自动合成仪完成(见 Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Editor F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), 且受保护形式的寡核苷酸也存在于固相载体柱上。将约 15mg 的 35 体寡核苷酸负载于该柱上。5'-DMT-保护基(三氯乙酸/二氯甲烷)裂解后, 以标准方法将其与 S-三苯甲基-6-巯基己基-氨基亚磷酸酯偶联。

在以溶于四氢呋喃中的碘进行氧化后, 三苯甲基保护的化合物从载体上裂解下来, 并得到分离和纯化(见实施例 14d)。

如实施例 14d)所述进行 S-三苯甲基裂解、载有 SH 基团之寡核苷酸的分离以及纯化(7.5mg)。

为了偶联,于氢气环境下将溶于 550 μ l 0.1M 碳酸钠溶液之载有 SH 基团的 30 体寡核苷酸(7mg)与溶于 500 μ l 二甲基甲酰胺中的 180mg 甲苯磺酸酯 17a)混合。30 分钟后,将其中和并以水稀释至 5ml。离心后,冷冻干燥澄清的上清液。为裂解 S-三苯甲基基团,进行如实施例 14d)所述的处理过程。纯化后,得到 4.3mg 共轭物。

c) 35 体寡核苷酸 5' - CUCAUGGAGCGCAA-GACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T*T-3'之 5'-[巯基乙酰-甘氨酸-甘氨酸胺基)-13-十三烷-7-硫代-1-基]-磷酸酯共轭物的钨-99m 络合物

将 1mg 实施例 17b)所述的共轭物溶于 1ml 0.1M 磷酸氢二钠缓冲液(pH=9.5)中。加入 10mg 酒石酸二钠后,将其与高钨酸钠溶液(1Mci)混合,再与 10 μ l 氯化锡(II)溶液(5mg SnCl₂/1ml 0.01M HCl)混和,由 HPLC 测定示踪物产率(约 93%)。

实施例 18

a) 35 体寡核苷酸 5' - CUCAUGGAGCGCAA-GACGAAUAGCUACAUAUAT*T*T*T*T-3'的 5'(6-氨基-1-己基-磷酸酯)与 N-(四氢-2-氧代-噻吩-3-基)-亚硫基二乙酸单酰胺之共轭物

按 SELEX 法确认的 30 体寡核苷酸是经对置于上游的序列 T*T*T*T-3'加以修饰制备的,此修饰借助 Pharmacia 公司自动合成仪完成(见 Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Editor F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991),且受保护形式的寡核苷酸也存在于固相载体柱上。将约 15mg 的 35 体寡核苷酸负载于该柱上。5'-DMT 保护基(三氯乙酸/二氯甲烷)裂解后,以标准方法将其与 N-三氯乙酰基-氨基己基氨基亚磷酸酯偶联。

以溶于四氢呋喃中的碘氧化后,将载有氨基基团的寡核苷酸自载体上裂解下来,并如实施例 1b)所述进行分离和纯化(9.3mg)。

为与 N-(四氢-2-氧代-噻吩-3-基)-亚硫基二乙酸单酰胺(DE 43 11 023)偶联,将 5mg 载有氨基基团的寡核苷酸溶于 1ml 2M 碳酸钠溶液中。加入 100mg 硫代内酯衍生物之后,将其于室温下温育 4 小时。然后中和并通过滤膜(排阻限为 3,000, Amicon YM3)超滤使其脱盐。冻干后,将其再冷冻干燥。得到 6.3mg 所需的共轭物。

b) 35 体寡核苷酸 5' - CUCAUGGAGCGCAA-GACGAAUAGCUACAUAUAT* T* T* T* T-3' 的 5'-(6-氨基-1-己基-磷酸酯)与 N-(四氢-2-氧代-噻吩-3-基)-亚硫基二乙酸单酰胺之共轭物的得-99m 络合物

将 1mg 载有 SH 基团的实施例 18a)所述的共轭物溶于 1ml 0.1M 磷酸氢二钠缓冲液(pH=9.5)中。加入 10mg 酒石酸二钠后,将其与高锝酸钠溶液(1mCi)混合并再与 10 μ l 氯化锡(II)溶液(5mg SnCl₂/1ml 0.01M HCl)混合。由 HPLC 测定示踪物产率(94%)。

实施例 19

a) 32 体寡核苷酸 5' - CUCAUGGAGCGCAA-GACGAAUAGCUACAUAUAT-^{3'-3'}T-5' 的 5'-(6-氨基-1-己基-磷酸酯)

按 SELEX 法确认的 30 体寡核苷酸是以常规方法经对置于上游的,以 5'位与载体结合的胸苷序列-T^{3'-3'}T-5'加以修饰而制备的,该修饰是用 Pharmacia 公司自动合成仪完成的(见 Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Editor F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991),且所说寡核苷酸也存在于固相载体柱上。经与溶于二氯甲烷中的三氯乙酸溶液反应,将 5'-羟基基团打开。将约 10mg 的 32 体寡核苷酸负载于柱

上。为连接接头,将该柱与 $50\mu\text{mol}\beta$ -氯乙基-N,N-二异丙基-氨基-6-(三氯乙酰氨基)-1-己基-氨基亚磷酸酯(按 Nucl. Acids. Res. 16, 2659-2669, (1988) 制备)的乙腈溶液在四唑存在的条件下反应。用溶于四氢呋喃中的碘使已形成的亚磷酸盐氧化成完全受保护的磷酸三酯。然后,先后连续用甲醇和水冲洗该柱。为从固相载体上去掉经修饰的寡核苷酸,将柱的内容物移至多管形瓶中,与 5ml 30% 氨溶液混合,将该管密封并于 55°C 振荡过夜。然后冷却至 0°C , 离心,用 5ml 水冲洗载体并将合并的水相冷冻干燥。

为了纯化,将固体物质溶于 2ml 水中,与 2ml 0.5M 乙酸铵溶液混合,再与 10ml 乙醇混合,于 -20°C 静置过夜,离心,用 1ml 乙醇(-20°C)冲洗残留物并最终于室温下真空干燥。

得到 8mg 无色粉末状标题化合物。

b) 32 体寡核苷酸 $5' - \text{CUCAUGGAGCGCAA-GACGAAUAGCUACAUA}T-3'-3'T-5'$ 的 $5'$ -(6-氨基-1-己基-磷酸酯)与 $10-[7-(4\text{-异硫氰酸根合苯基})-2\text{-羟基}-5\text{-氧代}-7\text{-(羧甲基)}-4\text{-氮杂庚基}-1,4,7\text{-三-(羧甲基)}-1,4,7,10\text{-四氮杂环十二烷之共轭物}$

将 8mg 实施例 19a) 所得的寡核苷酸溶于 2.5ml $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 缓冲液(pH 8.0)中并与 1mg $10-[7-(4\text{-异硫氰酸根合苯基})-2\text{-羟基}-5\text{-氧代}-7\text{-(羧甲基)}-4\text{-氮杂-庚基}]-1,4,7\text{-三-(羧甲基)}-1,4,7,10\text{-四氮杂环十二烷}$ (实施例 1f 的标题化合物)混合。室温下搅拌 5 小时,加入 0.01M HCl 调节 pH 至 7.2,然后将溶液通过滤膜(排阻限为 3,000, Amicon YM3)进行超滤并冷冻干燥,获得 7mg 所需的共轭物

c) 32 体寡核苷酸 $5' - \text{CUCAUGGAGCGCAA-GACGAAUAGCUACAUA}T-3'-3'T-5'$ 的 $5'$ -(6-氨基-1-己基-磷酸酯)与 $10-[7-(4\text{-异硫氰酸根合苯基})-2\text{-羟基}-5\text{-氧代}-7\text{-(羧甲基)}-4\text{-氮杂庚基}]-1,4,7\text{-三-(羧甲基)}-1,4,7,$

10-四氮杂环十二烷之共轭物的¹²⁵I络合物

将 15 μ l 乙酸¹²⁵I(III)溶液(350 μ Ci)(由溶于 2M 乙酸钠溶液的氯化¹²⁵I(III)制得,且以 0.1MHCl 调节 pH 至 4.0)加至 135 μ l 由 1mg 实施例 19b)标题化合物溶入 MES 缓冲液(pH6.2, MES=2-(N-吗啉代)乙磺酸)制成的溶液中。加入 0.01MHCl 将 pH 调节至 4.2。于 pH4.2 和 37 $^{\circ}$ C 搅拌溶液 1 小时。以 2M 乙酸钠溶液调节其 pH 至 6 并加入 10 μ l 0.1M Na₂EDTA 溶液(Na₂EDTA=乙二胺四乙酸二钠盐)以络合过量的¹²⁵I。以 HPLC(排阻层析:TSK-400/MES 缓冲液)进行所得标记共轭物(1h)的最终纯化。以生理食盐溶液稀释含标记共轭物的级分,以 0.01M NaOH 溶液调节其 pH 至 7.2 并过滤。所制得的溶液代表了进行放射性诊断的适宜制备物。

实施例 20

a) 35 体寡核苷酸 5'-T***T***T***T***TAGGAGGAG-GAGGGAGAGCGCAAUGAGAUU-3'之 5'-(6-氨基-1-己基-磷酸酯)

按 SELEX 法鉴定的 30 体寡核苷酸 5'-TAGGAGGAG-GAGGGAGAGCGCAAUGAGAUU-3'(美国专利号 5,270,163 的 seq.No.13)是以常规方法在 Pharmacia 公司的自动合成仪中制得的(见 Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Editor F. Eckstein, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991),且该寡核苷酸也存在于固相载体柱上。最后四个胸苷是按照 G. blaton Et al. 于“Oligonucleotides and Analogues,”PP.109-135 所述的技术通过二硫代磷酸酯与现存于 5'末端的胸苷结合的。为达到这一目的,首先以三氯乙酸处理打开 5'-羟基基团。然后,以溶于 di-amidite 中的三-吡咯烷膦和四唑使 5'-DMTO-thyridine 之 3'-羟基转变,从而使其经加入 2,4-二氯苄基硫醇转变成氨基硫化亚磷酸酯(Phosphorothioamidite)。该化合物以四唑激活并与寡核苷酸的 5'-羟基基团反应生成硫代磷酸三酯。以溶于二硫化碳、吡啶、三乙胺(95:95:10)溶液中的元素硫进行向二硫代磷酸酯转化的氧化过

程。苄基基团还未去掉。以相似方式,再连接另外三个胸苷。将约10mg的35体寡核苷酸负载于柱上。然后,再次打开5'-羟基基团

为了连接接头,将该柱在四唑存在条件下与50 μ mol 2-氟乙基-N,N'-二异丙基氨基-6-(三氟乙酰氨基)-1-己基氨基亚磷酸酯(见实施例)的乙腈溶液反应。以溶于四氢呋喃中的碘使已形成的亚磷酸酯氧化成磷酸三酯。然后,先后连续用甲醇和水冲洗柱子。再用硫代苯酚/三乙胺/二噁烷(1:2:2)溶液去除连二硫酸酯键的保护基,此过程需2小时。再将该柱分别用三倍于其容积的甲醇与醚先后冲洗,然后干燥。为自固相载体上去除已修饰的寡核苷酸,将柱的内容物移至多管形瓶中,与5ml 30%氨溶液混合,将管密封并于55 $^{\circ}$ C振荡过夜。然后冷却至 $^{\circ}$ C,离心,以5ml水冲洗载体并将合并的水相冷冻干燥。

为进行纯化,将固体物质溶于2ml水中,与2ml 0.5M乙酸铵溶液混合并再与10ml乙醇混合,于-20 $^{\circ}$ C静置过夜,离心,将残留物以1ml乙醇(-20 $^{\circ}$ C)冲洗并最终室温下真空干燥。

获得8mg无色粉状标题化合物。

b) 35体寡核苷酸 5'-T***T***T***T***TAGGAGGAGGAGGGAGAGCGCAAUGAGAUU-3'的5'-(6-氨基-1-己基-磷酸酯)与10-[7-(4-异硫氰酸根合基)-2-羟基-5-氧代-7-(羧甲基)-4-氮杂-庚基]-1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷之共轭物

将实施例20a)中获得的8mg寡核苷酸溶于2.5ml NaHCO₃/Na₂CO₃缓冲液(pH8.0)中并与1mg 10-[7-(4-异硫氰酸根合苯基)-2-羟基-5-氧代-7-(羧甲基)-4-氮杂-庚基]-1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷(实施例1f标题化合物)混合。于室温搅拌5小时。以0.01M HCl调节pH至7.2并将溶液通过排阻限为3,000的滤过膜(Amicon YM3)进行超滤,然后冷冻干燥。

获得7mg所需的共轭物。

c) 35 体寡核苷酸 5'-T***T***T***T***TAGGAGGAG-GAGGGAGAGCGCAAUGAGAUU-3'的 5'-(6-氨基-1-己基-磷酸酯)与 10-[7-(4-异硫氰酸根合苯基)-2-羟基-5-氧杂-7-(羧甲基)-4-氮杂-庚基]-1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷之共轭物的¹¹¹钷络合物

将 15 μ l 乙酸¹¹¹钷(III)溶液(350 μ Ci)(由溶于 2M 乙酸钠的氯化¹¹¹钷(III)制备并以 0.1MHCl 调节 pH 至 4.0)加至 135 μ l 溶有 1mg 实施例 20b)的标题化合物的 MES 缓冲液溶液(pH6.2)中(MES=2-(N-吗啉代)乙磺酸)。以 0.01MHCl 调节 pH 至 4.2。于 37℃ 和 pH4.2, 搅拌溶液 1 小时。以 2M 乙酸钠溶液调节 pH 至 6, 并加入 10 μ l 0.1MNa₂EDTA=乙二胺四乙酸二钠盐使过量¹¹¹钷络合。以 HPLC(排阻层析:TSK-400/MES 缓冲液)对所得共轭物进行最后的纯化(1 小时)。以生理食盐溶液稀释含有标记共轭物的级分, 以 0.01MNaOH 溶液调节其 pH 至 7.2 并过滤。所得的溶液即代表了进行放射性诊断的适宜制备物。

实施例 21

a) 35 体寡核苷酸 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUA-T**T**T**T**T-3'-之 5'-(6-氨基-1-己基-磷酸酯)

按 SELEX 鉴定并对置于上游的序列 T**T**T**T**T-3'加以修饰的 30 体寡核苷酸 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUA-3'是这样获得的:首先由氰乙基磷酸基团连接的 5 个胸苷的序列是在载体上以 3'端产生的。通过将该化合物与 0.5M 溶于乙腈的四乙基二硫化四烷基秋兰姆溶液反应, 在 15 分钟内进行至硫代磷酸酯(phosphonothioate)的磺化作用, 其然后与游离的 5'-羟基基团一起成为 35 体寡核苷酸的起始物。以常规方法在 pharmacia 公司的自动合成仪中进行整个合成(见 Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Editor F. Eckstein, Ox-

ford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1991), 且寡核苷酸仍存在于固相载体柱上。经与溶于二氯甲烷的三氯乙酸溶液反应, 使 5'-羟基基团打开。将约 10mg35 体寡核苷酸负载于柱上。为连接接头, 将该柱于四唑存在条件下与含 50 μ mol 的 β -氯乙基-N,N-二异丙氨基-6-(三氯乙酰氨基)-1-己基-氨基亚磷酸酯(按 Nucl. Acids. Res. 16, 2659-2669(1988)制备)的乙腈溶液反应。以溶于四氢呋喃中的碘实现以该方式形成的亚磷酸酯向完全受保护的磷酸三酯转变的氧化过程。然后, 先后用甲醇和水冲洗该柱。为从固相载体上去除经修饰的寡核苷酸并裂解氯乙基基团, 将柱子的内容物移至多管形瓶中, 与 5ml30% 氨溶液混合, 密封该管并于 55 $^{\circ}$ C 振摇过夜。然后冷却至 $^{\circ}$ C, 离心, 以 5ml 水冲洗载体并将合并的水相冷冻干燥。

为了纯化, 将固体物质溶于 2ml 水中, 与 2ml0.5M 乙酸铵溶液混合并与 10ml 乙醇混合, 于 -20 $^{\circ}$ C 静置过夜, 离心, 残留物以 1ml 乙醇(-20 $^{\circ}$ C)冲洗并于室温下最终真空干燥。

得到 8mg 无色粉状的标题化合物。

b) 35 体寡核苷酸 5' - CUCAUGGAGCGCAA-GACGAAUAGCUACAUAUAT**T**T**T**T-3' 的 5'-(6-氨基-1-己基-磷酸酯)与 10-[7-(4-异硫氰酸根合苯基)-2-羟基-5-氧代-7-(羧甲基)-4-氮杂-庚基]-1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷之共轭物

将 8mg 于实施例 20a) 得到的寡核苷酸溶于 2.5mlNaHCO₃/Na₂CO₃ 缓冲液(pH8.0)中并与 1mg10-[7-(4-异硫氰酸根合苯基)-2-羟基-5-氧代-7-(羧甲基)-4-氮杂-庚基]-1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂十二烷(实施例 1f 标题化合物)混合。于室温搅拌 5 小时, 以 0.01MHCl 调节 pH 至 7.2 并将溶液通过排阻限为 3,000 的滤膜(Amicon YM3)进行超滤, 然后冻干。

获得 7mg 所需的共轭物。

c) 35 体寡核苷酸 5' - CUCAUGGAGCGCAA-GACGAAUAGCUACAUAUAT**T**T**T**T-3' 的 5'-(6-氨基-1-己基-磷酸酯)与 10-[7-(4-异硫氰酸根合苯基)-2-羟基-5-氧代-7-(羧甲基)-4-氮杂-庚基]-1,4,7-三(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷之共轭物的¹¹¹钍络合物

将 15 μ l 乙酸¹¹¹钍(Ⅲ)溶液(350 μ Ci)(由溶于 2M 乙酸钠的氯化¹¹¹钍(Ⅲ)制备并以 0.1MHCl 调节 pH 至 4.0)加至 135 μ l 溶有 1mg 实施例 21b)的标题化合物的 MES 缓冲液溶液(pH6.2)中(MES=2-(N-吗啉代)乙磺酸)。以 0.01MHCl 调节 pH 至 4.2。于 37℃ 和 pH4.2, 搅拌溶液 1 小时。以 2M 乙酸钠溶液调节 pH 至 6, 并加入 10 μ l 0.1M Na₂EDTA=乙二胺四乙酸二钠盐使过量¹¹¹钍络合。以 HPLC(排阻层析:TSK-400/MES 缓冲液)对所得共轭物进行最后的纯化(1 小时)。以生理食盐溶液稀释含有标记共轭物的级分, 以 0.01M NaOH 溶液调节其 pH 至 7.2 并过滤。所得的溶液即代表了进行放射性诊断的适宜制备物。

实施例 22

a)N-(5-巯基-3-硫杂-1-氧代-戊-1-基)-甘氨酸甲基酯

将 12.56g(0.1mol)的甘氨酸甲基酯盐酸盐、13.42g(0.1mol)的 2,5-二硫杂-环己酮和 10.12g(0.1mol)的三乙胺于氩气环境下溶于 500ml 无水二氯甲烷中。室温下搅拌 24 小时, 将此批溶液倾倒入 250ml 5%水性柠檬酸上。充分搅匀, 分离有机相并于硫酸钠上干燥。在真空中蒸发除去溶剂后, 于硅胶上对油性残留物进行层析(流动相:二氯甲烷/甲醇, 甲醇 0-10%)。

产率:18.9g(84.6%), 无色油状物

元素分析:

计算值:C37.65 H5.87 N6.27 O21.49 S28.71

实测值:C37.43 H6.02 N6.12 S28.48

b)N-[5-(三苯基甲基巯基)-3-硫杂-1-氧代-戊-1-基]-

甘氨酸甲基酯

将 11.17g(50mmol)的 N-(5-巯基-3-硫杂-1-氧代-戊-1-基)-甘氨酸甲基酯(实施例 22a)、13.94g(50mmol)三苯基甲基氯化物和 5.06g(50mmol)三乙胺于氩气环境下溶于 500ml 无水二氯甲烷中。室温下搅拌 16 小时,将此批溶液倾于 150ml5% 水性柠檬酸上。充分搅匀,分离有机相并于硫酸钠上干燥。真空中蒸发除去溶剂后,于硅胶上对油性残留物进行层析(流动相:二氯甲烷/甲醇,95:5)。

产量:15.7g(67.4%),无色油状物

元素分析:

计算值:C67.07 H5.85 N3.01 O10.31 S13.77

实测值:C67.01 H6.11 N2.93 S13.49

c)N-[5-(三苯基甲基巯基)-3-硫杂-1-氧代-戊-1-基]-甘氨酸-N-(6-羟己基)-酰胺

将 11.64g(25mmol)N-[5-三苯基甲基巯基)-3-硫杂-1-氧代-戊-1-基]-甘氨酸甲酯(实施例 22b)与 29.3g(250mmol)6-氨基己醇在氩气环境下于 100℃ 一起熔化 16 小时。在反应物冷却后,将其溶于 500ml 二氯甲烷中并倾倒于 250ml5% 水性柠檬酸上。于用冰冷却及不断搅动条件下,以浓盐酸调节其 pH 至 6.5。分离有机相并在硫酸钠上干燥。真空中蒸发除去溶剂后,于硅胶上对油性残留物进行层析(流动相:二氯甲烷/甲醇,0-10% 甲醇)。

产量:7.7g(56.0%),无色油状物

元素分析:

计算值:C67.60 H6.96 N5.09 O8.72 S11.64

实测值:C67.48 H7.03 N4.92 S11.43

d)N-二异丙基-0-氟乙基-0'-[7,10-二氮杂-8,11-二氧代-13-硫杂-15-(三苯基甲基-巯基)-十五烷-1-基]-磷酸酰胺

将 5.51g(10mmol)N-[5-(三苯基甲基巯基)-3-硫杂-1-氧代-戊-1-基]-甘氨酸-N-(6-羟己基)-酰基(实施例 22c)溶于 50ml 无水二氯甲烷和 50ml 无水吡啶中。将溶于 50ml 无水二氯甲烷的 4.73g(20mmol)二异丙氨基-0-氟乙基-磷酸氯化物于室温下滴入上述溶液中,4 小时后,将其倾倒入 250ml 饱和的水性碳酸氢钠溶液上,搅拌并在硫酸镁上干燥有机相。蒸发除去溶剂后,于硅胶上对油性残留物进行层析(二氯甲烷/甲醇/三乙胺 98:1:1)。

产量:4.32g(57.5%),无色泡沫样油状物

元素分析:

计算值:C63.97 H7.38 N7.46 O8.52 P4.12 S8.54

实测值:C63.81 H7.41 N7.22 P3.97 S8.31

e) 5'-CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUA-3'是借助 phar-
macia Company 的自动合成仪制备的(见 Oligonucleotides and Ana-
logues, A Practical Approach, Editor F. Eckstein, Oxford University
Press, Oxford, New York, Tokyo, 1981),且受保护形式的寡核苷
酸仍存在于固相载体柱上。将约 15mg 寡核苷酸上柱。裂解 5'-
DMT-保护基后,依标准方法将其与实施例 22d 所述的氨基亚磷
酸酯偶联。以溶于四氢呋喃中的碘氧化后,从载体上裂解下共轭物。

经 SELEX 法鉴定的并对置于上游的序列 T*T*T*T-3'加
以修饰的 30 体寡核苷酸

5'CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUA-3'是借助 phar-
macia Company 的自动合成仪制备的(见 Oligonucleotides and Ana-
logues, A Practical Approach, Editor F. Eckstein, Oxford University
Press, Oxford, New York, Tokyo, 1981),且受保护形式的寡核苷
酸仍存在于固相载体柱上。将约 15mg 寡核苷酸上柱。裂解 5'-
DMT-保护基后,依标准方法将其与实施例 22d 所述的氨基亚磷
酸酯偶联。以溶于四氢呋喃中的碘氧化后,从载体上裂解下共轭物。
为达到此目的,将该物质与 10ml 30% 氨溶液混合并于 55℃ 振荡过
夜。将其冷却至 0℃,离心,以 10ml 水冲洗载体并将合并的水相冷
冻干燥。为了纯化,将所得物溶于 5ml 水中,加入 4ml 0.5mol 乙酸
铵并与 20ml 乙醇混合。为了完成沉淀过程,将其冷却(-20℃)过
夜,离心,以 1ml 乙醇(-20℃)冲洗残留物并于真空中干燥。得到
9.5mg 白色粉末。为裂解 S-三苯甲基保护基,将所得物溶于 5ml

50mmol 乙酸三乙基铵溶液(pH=7)中并与 500 μ l 0.1M 硝酸银溶液温育 30 分钟。然后,加入 500 μ l 0.14M 二硫苏糖醇,温育另外 30 分钟。离心后,于 Sephadex G10 上对澄清的上清液脱盐处理。将含产物的级分冻干。得到 3.5mg 白色粉末。

f) 5' - CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT* T* T* T* T-3' 的 5' - [N - (3' - 氨基 - 8' - 巯基 - 1', 4' - 二氧代 - 6' - 硫杂 - 辛 - 1' - 基) - 6 - 氨基己基 - 磷酸酯] 之 Tc - 99m 络合物

将 1mg 实施例 22e) 中所述的共轭物溶于 1ml 0.1M 磷酸氢二钠缓冲液(pH=8.5)。加入 10mg 酒石酸二钠后,将溶液与高锝酸钠溶液(1mCi)混合且再与 10 μ l 氯化锡(II)溶液(5mg/1ml 的 0.01M HCl)混合。以 HPLC 测定示踪物产率(约 95%)。

实施例 23

a) 5' - CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT* T* T* T* T-3' 之 5' - [N - (6' - 氨基 - 7' - 羧基 - 9' - 巯基 - 1', 5' - 二氧代 - 3' 硫杂 - 壬 - 1' - 基) - 6 - 氨基己基磷酸酯]

首先,制备溶于 500 μ l 无水 DMF 的 N - (2 - 氧代 - 四氢噻吩 - 3 - 基) - 亚巯基二乙酸单酰胺(DE4311023)的 N - 羟基琥珀酰亚胺酯溶液。为达到该目的,将 24.9mg(0.1mmol) N - (2 - 氧代 - 四氢噻吩 - 3 - 基) - 亚巯基二乙酸单酰胺与 11.5mg(0.1mmol) 的 N - 羟基琥珀酰亚胺溶于 500 μ l 无水 DMF 中。于 0℃ 向反应液中加入 19.2mg(0.1mmol) 的 EDC。于 0℃ 搅拌 30 分钟。

将 10mg 由实施例 1 制得的 5' - CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT* T* T* T* T-3' 的 5' - (6 - 氨基 - 己基 - 磷酸酯)溶于 1ml NaHCO₃/Na₂CO₃ 缓冲液(pH=8.0)中。将预先制好的 NHS 酯 DMF 溶液加入并在室温及氩气环境下温育 16 小时,然后,将其离心,浓缩至 500 μ l 并于 Sephadex G - 25 上层析。冷冻干燥后得到 2mg 呈白色粉状的共轭物。

b) 5' - CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUT* T* T* T* T - 3' 之 5' - [N - (6 - 氨基 - 7 - 羟基 - 9 - 巯基 - 1', 5' - 二氧代 - 3' - 硫杂 - 壬 - 1' - 基) - 6 - 氨基己基 - 磷酸酯] 的 Tc - 99m 络合物

将 1mg 实施例 23a) 所述的共轭物溶于 1ml 0.1M 磷酸氢二钠缓冲液中。加入 10mg 酒石酸二钠后, 将其与高锝酸钠溶液 (1mCi) 混合并再与 10 μ l 氯化锡 (II) 溶液 (5mg/1ml 0.01M HCl) 混合。由 HPLC 测定示踪物产率 (约 92%)。

实施例 24

a) 5' - CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUT* T* T* T* T - 3' 之 5' - [N - (巯基乙酰) - 6 - 氨基己基磷酸酯]

将 10mg 实施例 1 制备的 5' - CUCAUGGAGCGCAA - GACGAAUAGCUACAUT* T* T* T* T - 3' 的 5' (6 - 氨基 - 己基 - 磷酸酯) 溶于 1ml NaHCO₃/Na₂CO₃ 缓冲液 (pH = 8.0) 中, 然后, 向溶液中加入溶于 500 μ l 无水 DMF 中的 23.1mg (0.1mmol) S - 乙酰巯基乙酸 - NHS 酯, 并于室温和氩气条件下温育 17 小时。然后离心, 浓缩至体积为 500 μ l 并于 Sephadex G - 25 上进行层析。冻干后, 得到 3mg 白色粉状的共轭物。

b) 5' - CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUT* T* T* T* T - 3' 之 5' - [N - (巯基乙酰) - 6 - 氨基 - 己基 - 磷酸酯] 的 Tc - 99m 络合物

将 1mg 实施例 24a) 所述的共轭物溶于 1ml 0.1M 磷酸氢二钠缓冲液 (pH = 8.0) 中。加入 10mg 酒石酸二钠后, 将其与高锝酸钠溶液 (1mCi) 混合, 再与 10 μ l 氯化锡 (II) 溶液 (5mg/1ml 0.01M HCl) 混合。由 HPLC 测定示踪物产率 (约 97%)。

实施例 25

a) N - [2 - (三苯基甲基巯基) - 乙 - 1 - 基] - 亚巯基二乙酸单酰胺

将 31.9g (0.1mol) 2 - (三苯基甲基巯基) - 乙胺和 10.1g (0.

1mol)三乙胺置入 500ml 无水二氯甲烷中。于 0℃ 滴入 13.2g(0.1mol)亚硫基二乙酸酐溶液,于 0℃ 搅拌 1 小时并于室温下再搅拌 16 小时。然后,倾至 250ml 5% 水性柠檬酸上,充分搅匀,分离有机相并于硫酸钠上干燥。真空蒸发溶剂后,于硅胶上对残留物进行层析(流动相:二氯甲烷/甲醇,0-20% 甲醇)。

产量:20.32g(45.0%),无色油状物。

元素分析:

计算值:C66.49 H5.58 N3.10 O10.63 S14.20

实测值:C66.21 H5.73 N2.98 S14.02

b) 5' - CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUT* T* T* T* T-3'-之 5' - [N - (1', 5' - 二氧代 - 6' - 氮杂 - 3' - 硫杂 - 8' - 硫基 - 辛 - 1 - 基) - 氨基己基磷酸酯]

首先,制备 N - [2 - (三苯基甲基硫基) - 乙 - 1 - 基] - 亚硫基二乙酸单酰胺(实施例 25a)的 NHS 酯。为达到这一目的,将 45.2mg(0.1mmol)前文所述的酸溶于 500μl 无水 DMF(0.1mmol)中并与 11.5mg(0.1mmol)NHS 混合。冷却至 0℃ 后,加入 19.2mg(0.1mmol)EDC 并于 0℃ 温育 30 分钟。

将溶于 1ml NaHCO₃/Na₂CO₃ 缓冲液(pH=8.0)的 10mg 如实施例 1 所述的 5' - CUCAUGGAGCGCAA-GACGAAUAGCUACAUT* T* T* T* T-3'-之 5' - (6 - 氮己基 - 磷酸酯)溶液与 500μl 预先制备的 NHS - 酯溶液混合。室温下温育 16 小时。然后,通过蒸发至 500μl 使其浓缩并于 Sephadex G - 25 上进行层析。得到 6mg S - 三苯甲基保护的化合物。如实施例 22e 所述进行 S - 三苯甲基保护基的裂解,载有 SH 基团的寡核苷酸的分离以及纯化。得到 4mg 白色冻干物。

c) 5' - CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUT* T* T* T* T-3'-之 5' - [N - (1', 5' - 二氧代 - 6' - 氮杂 - 3' - 硫杂 - 8' - 硫基 - 辛 - 1 - 基) - 氨基己基磷酸酯]的 Tc - 99m 络合物

将实施例 25b 制得的 1mg 共轭物溶于 1ml 磷酸氢二钠缓冲液 (pH = 8.5) 中。加入 10mg 酒石酸二钠后, 将其与高锝酸钠溶液 (1mCi) 混合, 再与 10 μ l 氯化锡(II) 溶液 (5mg/1ml 0.01M HCl) 混合。由 HPLC 测定示踪物产率 (91%)。

实施例 26

a) N,N'-二-[2-(三苯基甲基巯基)-1-氧代-乙-1-基]-3,4-二氨基苯甲酸甲酯

将 3.32g (20mmol) 的 3,4-二氨基苯甲酸甲酯与 13.38g (40mmol) S-三苯基甲基-巯基乙酸溶于 200ml 无水二氯甲烷中。于 0℃ 将溶于 100ml 无水二氯甲烷中的 8.25g (40mmol) 二环己基碳化二亚胺滴入反应液中。于 0℃ 搅拌一个多小时并最后于室温下再搅拌 16 个多小时。将其过滤, 并与 1% 水性柠檬酸一起振荡, 有机相在硫酸钠上干燥, 且真空中蒸发溶剂。于硅胶上对残留物进行层析 (流动相: 二氯甲烷/甲醇, 0-10% 甲醇)。

产量: 10.2g (63.8%), 无色油状物

元素分析:

计算值: C75.16 H5.30 N3.51 O8.01 S8.02

实测值: C75.01 H5.58 N3.30 S7.89

b) N,N'-二-[2-(三苯基甲基巯基)-1-氧代-乙-1-基]-3,4-二氨基苯甲酸

将 7.99g (10mmol) N,N'-二-[2-(三苯基甲基巯基)-1-氧代-乙-1-基]-3,4-二氨基苯甲酸甲酯 (实施例 26a) 混合于 200ml 二恶烷、20ml 水和含 4g (100mmol) NaOH 的 20ml 甲醇中。室温下搅拌 5 小时并将反应液倾于 300ml 5% 水性柠檬酸上。以二氯甲烷竭力抽提该溶液, 有机相于硫酸钠上干燥。蒸发去掉溶剂后, 于硅胶上对残留物进行层析 (流动相: 二氯甲烷/甲醇, 甲醇 0-40%)。

产量: 3.56g (45.4%), 无色油状物

元素分析:

计算值:C74.97 H5.14 N3.57 O8.15 S8.17

实测值:C74.71 H5.32 N3.31 S7.88

c) 5' - CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT* T* T* T* T - 3'之 5' - {N - [3', 4' - 二 - (2'' - 巯基乙酰胺) - 苯甲酰基] - 6 - 氨基己基磷酸酯}

首先, 制备 N, N' - 二 - [2 - (三苯基甲基巯基) - 1 - 氧代 - 乙 - 1 - 基] - 3, 4 - 二氨基苯甲酸(实施例 26b)的 NHS - 酯。为达到该目的, 将 78.5mg (0.1mmol) 的该酸溶于 500 μ l 无水 DMF 中并与 11.5mg (0.1mmol) NHS 混合。冷却至 0℃ 后, 加入 19.2mg (0.1mmol) EDC 并于 0℃ 温育 30 分钟。将实施例所述的溶于 1ml NaHCO₃/Na₂CO₃ 缓冲液 (pH = 8.0) 的含 10mg 5' - CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT* T* T* T* T - 3'之 5' - (6 - 氨基己基 - 磷酸酯) 的溶液与 500 μ l 预先制备的 NHS - 酯溶液混合。将反应液于室温下温育 17 个小时。然后, 通过蒸发将溶液浓缩至 500 μ l 并于 Sephadex G - 25 上进行层析。得到 7mg S - 三苯甲基保护的化合物。

如实施例 22e 所述进行 S - 三苯甲基保护基的裂解、载有 SH 基团的寡核苷酸的分离与纯化。得到 3mg 白色冻干物。

d) 5' - CUCAUGGAGCGCAAGACGAAUAG - CUACAUAUAT* T* T* T* T - 3'之 5' {N - [3', 4' - 二 - (2'' - 巯基 - 乙酰胺) - 苯甲酰基] - 6 - 氨基己基磷酸酯} 的 Tc - 99m 络合物

将 1mg 实施例 26c) 所述的共轭物溶于 1ml 0.1M 磷酸氢二钠缓冲液 (pH = 9.5)。加入 10mg 酒石酸二钠后, 将其与高锝酸钠溶液 (1mCi) 混合且再与 10 μ l 氯化锡 (II) 溶液 (5mg/1ml 0.01M HCl) 混合。由 HPLC 测定示踪物产率 (约 91%)。

实施例 27

a) N - [0 - 乙酰基 - 羟基乙酰] - 甘氨酸 - 甘氨酸 - 甘氨酸 - 叔丁

酯

于 0℃ 将 24.5g(0.1mol)的甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-叔丁酯及 11.8g(0.1mol)的 0-乙酰基-乙醇酸(glycolic acid)一起加至 500ml 无水二甲基甲酰胺中。将 20.6g(0.1mol)二环己基碳化二亚胺溶于 500ml 无水二甲基甲酰胺制得的溶液滴入反应液中,于 0℃ 搅拌 1 小时并于室温最终搅拌过夜。将其过滤,滤液由在油泵上的蒸发进行浓缩。自乙酸乙酯/正-戊烷中重复对其进行结晶。

产量:12.5g(36.2%),白色粉末

元素分析:

计算值:C48.69 H6.71 N12.17 O32.43

实测值:C48.43 H7.01 N11.93

b) N-[0-乙酰基-羟基乙酰]-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸

将 3.45g(10mmol)N-[0-乙酰基-羟基乙酰]-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-叔-丁酯于 50ml 三氟乙酸中搅拌 15 分钟。然后,将其倾倒在 500ml 无水二乙酯上且滤出产物。自乙酸乙酯/正-戊烷中重复对其进行结晶。

产量:1.23g(42.5%),白色粉末

元素分析:

计算值:C41.53 H5.23 N14.53 O38.72

实测值:C41.31 H5.51 N14.32

c) 5'-CUCAUGGAGCCAAGACGAAUAGCUACAUAUAT* T* T* T* T-3'-5-[N-[N-(羟基乙酰)-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸]-6-氨基己基磷酸酯

首先,制备 N-(0-乙酰羟基乙酰)-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(实施例 27b)的 NHS 酯。为达到此目的,将 28.9mg(0.1mmol)此酸溶于 500 μ l 无水 DMF 中并与 11.5mg(0.1mmol)NHS 混合。冷却至 0℃ 后,加入 19.2mg(0.1mmol)EDC 且于 0℃ 温育 30 分钟。将实施例 1 所述的溶于 1ml1M 碳酸钠溶液的 10mg5'-CUCAUGGAGCG-

CAAGACGAAUAGCUACAUAUAT* T* T* T* T-3'-之(6-氨基己基-磷酸酯)之溶液与 500 μ l 预先制备的 NHS-酯溶液混合。于室温下温育 18 小时。然后通过蒸发至 500 μ l 将其浓缩并于 Sephadex G-25 上进行层析。冻干后,得到 3mg 标题化合物。

d) 5'-CUCAUGGAGCCAAGA—CGAAUAGCUACAUAUAT* T* T* T* T-3'-之 5-[N-[N-(羟基乙酰)-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸]-6-氨基己基磷酸酯)的 tc-99m 络合物

将 1mg 实施例 27c 所述之共轭物溶于 1ml 0.1M 磷酸氢二钠缓冲液(pH=10.5)中。加入 10mg 洒石酸二钠后,将其与高锝酸钠溶液(1mCi)混合,再与 10 μ l 氯化锡(II)溶液(5mg/1ml 0.01M HCl)混合。由 HPLC 测定示踪物产率(95%)。

可以通过用一般性或具体描述的本发明的反应物和/或操作条件替代在前文实施例中所用的反应物和/或操作条件重复前文所述的实施例并同样获得成功。

从前面的描述中,本领域的技术人员可以容易地确知本发明的基本特征,且不离开其精神和范围对本发明作出许多改变和修改以使其适于多种用途和条件。

图 1

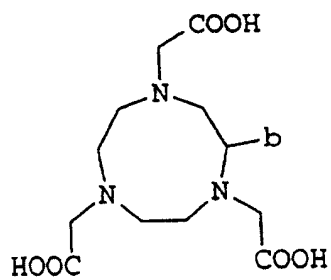
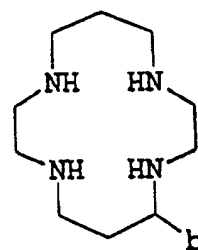
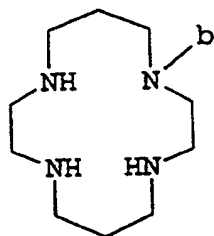
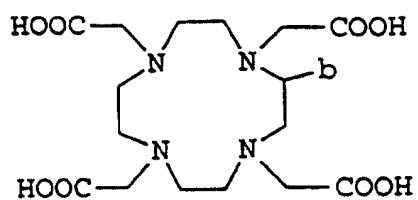
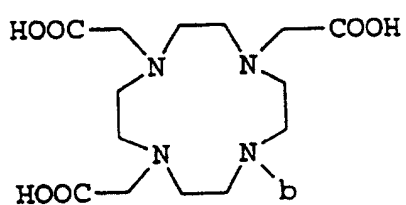


图 2

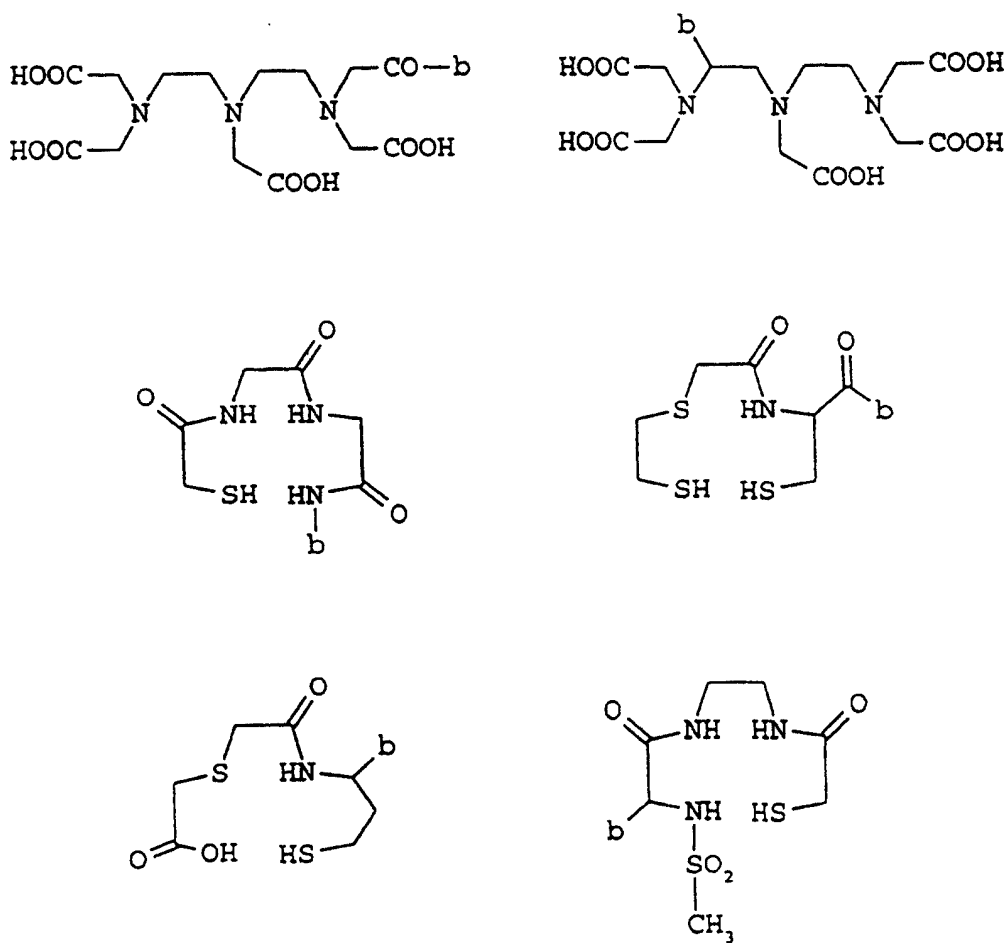


图 3

