(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C07D 487/22
C12N 15/10

(45) 공고일자 2002년12월05일
(11) 등록번호 10-0347638
(24) 등록일자 2002년07월24일

(21) 출원번호	10-1995-0705599	(65) 공개번호	특1996-0702839
(22) 출원일자	1995년12월09일	(43) 공개일자	1996년05월23일
번역문제출일자	1995년12월09일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1994/06284	(87) 국제공개번호	WO 1994/29316
(86) 국제출원일자	1994년06월09일	(87) 국제공개일자	1994년12월22일
(81) 지정국	국내특허 : 기네 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 체코 헝가리 일본 북한 대한민국 스리랑카 마다가스카르 몽고 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 루마니아 슬로바키아 우크라이나 미국 베트남 중국 그루지야 라트비아 슬로베니아 AP ARIPO특허 : 말라위 수단 EA 유라시아특허 : 벨라루스 카자흐스탄 러시아 키르기즈 몰도바 EP 유럽특허 : 오스트리아 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 핀랜드 영국 룩셈부르크 네덜란드 포르투칼 스웨덴 OA OAPI특허 : 코트디브와르		

(30) 우선권주장 08/075123 1993년06월09일 미국(US)
08/227370 1994년04월14일 미국(US)

(73) 특허권자 보드 오브 리전츠, 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템
미국 78701 텍사스주 오스틴 웨스트 7번 스트리트 201파마사이클릭스, 인코포레이티드

미국 캘리포니아주 95086-4521 서니베일 이스트 아퀘스 애브뉴 995

(72) 발명자 조나단엘.세슬러
미합중국텍사스78731오스틴웬델코브3505-에이
케빈엘.로쓰
미합중국오하이오45241블루애쉬자딘플레이스11133
메레디트라이트
미합중국캘리포니아95128산조스진저레인1057
그레고리더블유.헴미
미합중국캘리포니아94086서니베일뷰에나비스타애비뉴#1508243
윌리암씨.다우
미합중국캘리포니아94539프레몬트슬레이톤스트리트40698
다니엘에이.스미쓰
미합중국인디애나46526고쉔노쓰2번스트리트624
블라디미르에이.크랄
미합중국텍사스78731오스틴그레이스톤드라이브#254 3500
브렌트이버슨
미합중국텍사스78746오스틴타덴스코브1316
타락모디
미합중국캘리포니아94086서니베일뷰에나비스타애비뉴243아파트먼트#206
리챠드에이.밀러

미합중국캘리포니아94028포토카밸리올론8
다렌마그다
미합중국캘리포니아95014쿠퍼티노유니버시티웨이10237

(74) 대리인 이병호

심사관 : 이유형

(54) 텍사피린금속착물매개된에스테르가수분해

명세서

<1> 발명의 배경

<2> 본 발명은 에스테르 결합, 특허 생물학적 시스템과 관련이 있는 포스페이트 에스테르 결합의 분해를 위한 촉매에 관한 것이다. 효과적인 촉매는 다음의 특성을 갖는다:

<3> 1) 생리학적 온도 및 pH에서의 효능;

<4> 2) 특정한 생물학적 기질에 대한 특이성;

<5> 3) 생리학적 시스템에 대한 낮은 독성 ; 및

<6> 4) 생물학적 시스템에 대한 용이한 투여 및 용이한 후속적 제거.

<7> 생물학적으로 중요한 각종 포스페이트 에스테르는 RNA, 인지질, 인산염 무수물, UDP-글루코오즈 또는 광범위하게 사용되는 검정용 기질, p-니트로페닐포스페이트 에스테르를 포함하고 본 발명의 방법에 따라 가수분해될 수 있다.

<8> 많은 2가 및 3가 금속염이 포스페이트 에스테르 결합의 가수분해를 촉진하는 것으로 나타났다. 고미야마(Komiyama) 등(1992)은 pH 8.0, 30℃에서 아데닐릴(3'-5') 아데노신 및 우리딜(3'-5') 우리딘을 희토류 금속(III) 이온으로 가수분해시키는 방법을 보고한 바 있다. 수산화세슘(III) 복합체는 3',5'-사이클릭 아데노신 모노포스페이트를 가수분해시키는 것으로 보고된 바 있다(Sumaoka, et al. 1992). 브라우니(Browne)와 부르스(Bruice)(1992)는 2가 양이온의 존재하에서 비스(8-하이드록시퀴놀린)포스페이트의 가수분해를 발표한 바 있다. 그러나, 금속이온에 의한 촉매의 특이성 정도를 나타내기 위해, 금속과 다양한 리간드의 착물이 연구되어 왔다. 리간드는 촉매 효율의 조절 및 용액중 금속 이온의 유지를 포함하는 촉매 현상에서 다양한 역할을 하는 한편, 또한 목적하는 기질에 대해 결합 특이성을 갖는 제제의 커플링을 가능케 하는 역할을 할 수 있다.

<9> 포스페이트 에스테르 결합의 가수분해에 사용되는 리간드 착화 금속 이온에는 트리스(아미노프로필)아민(trpn), 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸(cyclen), 트리스(2-아미노에틸)아민(tren), 트리에틸렌테트라민(trien), 테트라에틸렌펜타민(tetren), 비피리딘 접합체, 이미다졸, 사이클로덱스트린 유도체, 리신, 터피리딘(trpy), 1,2--디아미노에탄, 비스(디아쿠오)착물, "메탈로미셀" 및 페난트롤린-폴리아민 트리덴테이트 착물[참조: Basile et al. 1987, Menger et al. 1987, Chung et al. 1990, Hendry and Sargeson, 1989, Shelton and Morrow, 1991, Ranganathan et al. 1993, Breslow and Huang, 1991, Modak et al. 1991, Kim and Chin, 1992, Chin et al. 1989, Chin 및 Banaszczyk, 1989 a, b, Chin and Zou, 1987]이 포함된다.

<10> 금속 착물은 생체내에서 촉매적으로 작용하기 위해서, 결합된 금속 이온을 착물이 방출하지 않아야 한다. 모로우(Morrow) 등(1992)은 란타나이드(II) 헥사민 쉬프(Schiff)-염기(HAM) 거대환식 착물에 의한 RNA의 분해를 연구하였다. 디뉴클레오티드 아데닐릴-3',5'-우리딘 3'-모노포스페이트(ApUp) 또는 아세닐산의 올리고머(A12-A18)는 수개의 란타나이드 착물에 의해 37℃에서 4시간 후에 분해되는 것으로 보고되었다. EDTA와 같은 다른 6가 리간드는 유사한 조건하에서 RNA 분해에 완전히 불활성인 란타나이드(III) 착물을 형성한다. 금속 방출에 대한 거대환식 착물의 불활성은 란타나이드 계열 전체에 걸쳐 급격하게 변화하는 것으로 보고되어 있다. 이들 착물은 HAM 리간드의 높은 독성, 란타나이드 금속의 약한 배위 및 해리를 포함하는 몇가지 심각한 결점을 갖는다. 또한, 기질 특이성을 갖는 유도체의 생성을 방해하는 리간드를 용이하게 개질시킬 수가 없다.

<11> HAM 착물의 취약점이 존재하는 상황하에서, 란타나이드 금속을 킬레이트화시켜 RNA를 분해할 수 있는 안정한 착물을 생성시킬 수 있는 신규한 거대환식 화합물을 개발하는 것이 유익하리라는 사실은 자명하다.

<12> 약어표

<13> DEPC : 디에틸피로카보네이트

<14> dm : 데시미터

<15> EDTA : 에틸렌디아민 테트라아세트산

<16> EuOAc : Eu(III)(아세테이트)$_3$

<17> Txp(txph)(TX) : 텍사피린

<18> 발명의 요약

<19> 본 발명은 다른 독성의 금속성 양이온, 구체적으로는 치료 적용시의 표적 부위에 대한 특이성 및 생체내에서 사용하기에 충분한 무독성을 위해 안정한 킬레이트화를 제공하는, 에스테르 가수분해용 텍사피린 금속 착물 및 텍사피린 금속 착물 접합체를 제공함으로써 위에 기술한 문제점을 해결하고자 한다.

<20> 본 발명은 텍사피린 금속 착물이 에스테르 결합의 가수분해를 촉진한다는 사실의 발견을 포함한다. 텍사피린은 금속을 매우 안정한 착물로 킬레이트화시키는 한편, 금속 배위 부위에 접근하여 금속의 반응성 및 포스포에스테르 결합을 가수분해시키는 이의 능력을 보존하는 유일한 분자이다. 또한, 텍사피린 분자는 다양한 생물학적 적용을 위해 유도체화될 수 있다. 게다가, 텍사피린 착물은 HAM 착물에 비해 독성이 훨씬 적다.

<21> 본원에 참고로 인용된 미합중국 특허 제5,252,720호에는 생체내에서 사용하기 위린 텍사피린 금속 착물의 안정성 및 유용성이 자기 공명 영상 프로토콜을 통해 증명되어 있다. 텍사피린의 Y^{3+}, Gd^{+3} 및 In^{3+} 착물은 탈-착화 및/또는 리간드 분해를 위한 반감기가 두 경우에 3주를 초과하는 1:1 메탄올-물 혼합물에서 가수분해적으로 안정한 것으로 밝혀졌다. T2B2 텍사피린-가돌리늄 착물은 자기 공명 영상 증강에서 낮은 독성 및 우수한 조직 선택성을 보여준다. 본 발명의 텍사피린 금속착물-접합체는 란타나이드 금속 양이온을 킬레이트화시키기 위한 유사한 안정성과 생체내 적용을 위한 유사한 낮은 독성을 가질 것으

로 기대된다.

<22> 텍사피린 금속 착물은 미합중국 특허 제5,252,720호에 기술된 바와 같은 고유의 생물국지화 특이성을 갖는다. 본 발명의 한가지 양태에서는, 텍사피린 금속 착물을 부위-지시된 분자(site-directed molecule)에 추가로 커플링시켜 표적화된 생체내 전달을 위한 접합체를 제조한다. "표적화된 부위에 대한 특이성"이란, 텍사피린 금속 착물-접합체를, 예를 들어, 이온 농도, 온도, pH 등의 생리학적 조건하에서 표적화된 부위와 접촉시키는 경우, 특이적 결합이 일어남을 의미한다. 상호작용은 당해 상호작용을 촉진시키기에 효과적인 조건하에서 접합체의 특정 잔기와 안정한 착물을 형성하는 표적의 특정한 뉴클레오티드, 아미노산 또는 당분해 잔기의 특정한 정전기적 상호작용, 소수성 상호작용, 엔트로픽성 상호작용 또는 기타 상호작용에 기인하여 발생할 수 있다. 본 발명에서, 당해 상호작용은 에스테르 결합을 특이적 결합 부근에서 분해시킬 수 있다.

<23> 본 발명에서 고려된 부위-지시된 분자의 예에는, 이로써 제한하는 것은 아니지만, 폴리뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드(예: 안티센스 올리고뉴클레오티드); 생물학적 수용체에 대해 친화도를 갖는 펩티드 및 단백질(예: 항체)을 포함하는 폴리아미드, 스테로이드 및 스테로이드 유도체; 호르몬(예: 에스트라리올, 몰핀 또는 히스타민), 및 추가의 거대환식 화합물(예: 사프피린 및 루비린)이 포함된다.

<24> 본원 및 첨부된 특허청구의 범위에 사용된 용어 "뉴클레오티드", "폴리뉴클레오티드" 및 "올리고뉴클레오티드"는 천연-발생 및 합성 뉴클레오티드, 폴리- 및 올리고뉴클레오티드, 및 이들의 동족체 및 유도체를 의미하는 것으로 이해한다.

<25> 란타나이드(III) 텍사피린에 의한 RNA의 가수분해는 텍사피린 금속 착물-접합체에 부착된 추가의 촉매 그룹에 의해 증진될 수 있다. 용어 "추가의 촉매 그룹"은 일반 산, 브뢴스테드(Brϕnsted) 산, 일반 염기, 브뢴스테드 염기, 친핵성 시약, 또는 반응에 대한 활성화 장벽을 저하시키거나 기질의 여기 상태 에너지를 증가시키는 임의의 기타 수단으로서 작용함으로써 촉매 현상에 일조하는 화학적 작용 그룹을 의미한다. 본 발명에서 고려된 촉매 그룹의 예에는, 이로씨 제한하는 것은 아니지만, 이미다졸; 구아니딘; 치환된 사카라이드(예: D-글루코스아민, D-만노사민, D-칼락토사민, D-글루카민 등), 아미노산(예: L-히스티딘 및 L-아르기민); 아미노산의 유도체(예, 히스타민); 아미노산의 중합체[예: 폴리-L-리신, $(LysAla)_n$, $(LysLeuAla)_n$(여기서, n은 1 내지 30, 바람직하게는 1 내지 10, 가장 바람직하게는 2 내지 7이다) 등]; 이들의 유도체 및 텍사피린 금속 착물이 포함된다. 용어 "텍사피린 금속 착물-접합체에 부착된"은 촉매 그룹이 텍사피린 금속 착물에 가변성 길이의 링커 또는 커플(couple)을 통해 직접 부착되거나 텍사피린 착물-리간드 접합체의 리간드 부분에 부착됨을 의미한다. 예를 들어, 텍사피린 금속 착물-올리고뉴클레오티드 접합체의 올리고뉴클레오티드 부분에 부착된 촉매 그룹은 표적화된 RNA 기질과 결합하는 경우 기질 부근에 위치한다.

<26> 부위 특이성 또는 촉매적 활성을 갖는 접합체 그룹은 거대환식 화합물의 환위에서 직접 텍사피린에 공유결합되거나 다양한 커플을 통해 텍사피린에 공유결합될 수 있다. 커플은 링커, 즉 텍사피린 거대환으로부터 일정한 거리에 있는 다른 분자를 공유결합시키는 반응성 그룹으로서 기술할 수 있다. 링커 또는 커플의 예로는 올리고뉴클레오티드와 항체의 부착에 대한 예에서 기술한 것과 같은 아미드, 티올, 티오에테르 또는 에테르 공유 결합이 있다. 가장 바람직한 양태에서, 접합체 및 부착된 그룹은 탄소-탄소, 탄소-질소 또는 탄소-산소 결합을 통해 텍사피린에 공유결합된다.

<27> 당해 기술 분야의 숙련가라면, 본 기술 내용을 통해 본 발명의 분자에 의해 다양한 에스테르 결합을 분해시킬 수 있음을 명백히 알 것이다. 본 발명의 분자에 의해 분해되는 에스테르 결합의 예에는 포스페이트 모노에스테르 및 디에스테르 결합, 특히 핵산(예: RNA)중에 존재하는 생리학적으로 중요한 포스페이트 결합; 예를 들어, 뉴클레오티드 ATP, ADP, AMP, cAMP, UDP, NADH, NADPH, FAD 또는 $FADH_2$와 같은 물질 대사의 중요한 조절인자, 및 신경 및 뇌 기능에 중요한 포스파티딜 콜린 및 스핀고미엘린과 같은 인지질이 포함된다.

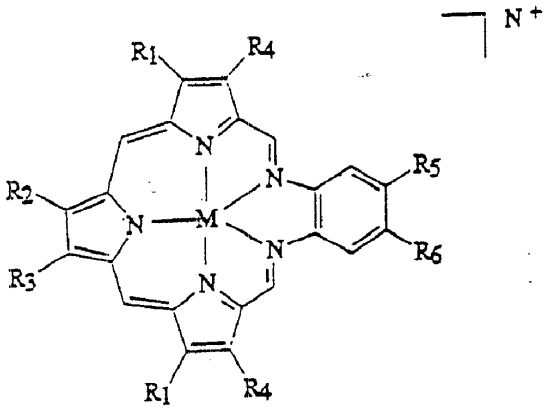
<28> 본 발명의 한가지 양태는 포스페이트 에스테르 가수분해 방법을 제공한다. 당해 방법은 포스페이트 에스테르 수용액을 수득하는 단계 및 당해 용액을 포스페르 결합 가수분해에 대해 촉매 활성을 나타내는 텍사피린 금속 착물로 항온처리시키는 단계를 포함한다. 본원에서 사용된 텍사피린 금속 착물은 작용성 그룹이 부가된, 방향족 5가 확장된 포르피린 동족체 금속 착물이다. 이러한 팬던트(pendant) 그룹은 용해도 또는 생물국지화를 증진시킬 수 있거나 부위-지시된 분자 또는 촉매 그룹에 대해 커플링 부위를 제공할 수 있다.

<29> 금속은 수용액속에서 에스테르 결합 가수분해에 대해 촉매 활성을 갖는 2가 또는 3가 금속 양이온이며, 특히 금속은 Y(III), In(III) 또는 Sc(III)와 같은 란타나이드 양이온 또는 루이스(Lewis) 산성 양이온이다. 금속의 예에는 란탄, 세륨, 프라세오디뮴, 네오디뮴, 프로메튬, 사마륨, 유로퓸, 가돌리늄, 테르븀, 디스프로슘, 홀뮴, 에르븀, 툴륨, 이터븀, 루테튬, 스칸듐 또는 이트륨이 포함된다.

<30> 특히, 금속은 La(III), Nd(III), Sm(III), Gd(III), Tm(III) 또는 Lu(III)일 수 있으나, 바람직하게는 Eu(III) 또는 Dy(III)일 수 있다.

<31> 바람직한 양태에서, 포스페이트 에스테르는 핵산 에스테르이다. 포스페이트 에스테르 수용액은 핵산의 용액 또는 현탁액, 예를 들어, RNA 또는 DNA 용액 또는 현탁액일 수 있다. RNA는 DNA보다 약 10^{12}인자까지 더 바람직하게 가수분해된다. 포스페이트 에스테르가 RNA인 경우, 금속은 Dy(III) 또는 Eu(III)인 것이 바람직하다.

<32> 텍사피린 금속 착물은 하기 일반식의 수용성 화합물일 수 있다.



<34> 본 텍사피린 금속 착물에서, M은 수용액속에서 에스테르 결합 가수분해를 촉진하는 2가 또는 3가 금속 양이온이다. R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 및 R_6은 독립적으로 수소, 하이드록실, 알킬, 하이드록시알킬, 알콕시, 하이드록시알콕시, 사카라이드, 카복시알킬, 카복시아미드알킬, 부위-지시된 분자, 촉매 그룹, 또는 부위-지시된 분자 또는 촉매 그룹에 대한 커플이다. 부위-지시된 분자는 텍사피린 금속 착물-접합체의 접합체이다. 촉매 그룹도 또한 텍사피린 금속 착물-접합체의 접합체이며, 이로써 제한하는 것은 아니지만, 이미다졸, 구아니딘 또는 텍사피린을 포함한다.

<35> N은 통상 2 이하의 정수이다. 2가 또는 3가 금속 양이온을 갖는 기본 거대환의 경우에 있어서, N은 1 또는 2이지만, 공유결합된 부위-지시된 분자의 경우, 당해 기술분야의 숙련가라면 본 발명의 기술내용을 통해 N값이 부위-지시된 분자상에 존재하는 전하, 예를 들어, 올리고뉴클레오티드상의 포스페이트 그룹의 전하에 따라 달라짐을 인식할 수 있을 것이다.

<36> R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 및 R_6는 또한 독립적으로 아미노, 카복시, 카복스아미드, 에스테르, 아미드 설포네이트, 아미노알킬, 설포네이토알킬, 아미드알킬, 아릴, 에테르아미드 또는 목적하는 특성을 제공하는 동등한 구조물일 수 있다. 바람직한 양태에서, R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 및 R_6중 하나 이상은 부위-지시된 분자이거나 부위-지시된 분자에 대한 커플일 수 있다. 항체, 펩티드 또는 올리고뉴클레오티드와 같은 분자의 벤젠환 부분상의 부피가 큰 R 그룹의 경우, 당해 기술 분야의 숙련가라면 벤젠 부분상의 한 위치에서 유도체화시키는 것이 보다 바람직함을 인지할 것이다.

<37> 하이드록시알킬은 하이드록실 그룹이 부착된 알킬 그룹을 의미한다. 알콕시는 산소에 부착된 알킬 그룹을 의미한다. 하이드록시알콕시는 에테르 또는 에스테르 결합, 하이드록실 그룹, 치환된 하이드록실 그룹, 카복실 그룹, 치환된 카복실 그룹 등을 갖는 알킬 그룹을 의미한다. 사카라이드에는 산화, 환원 또는 치환된 사카라이드가 포함된다. 카복시아미드알킬은 하이드록시 그룹, 2급 또는 3급 아미드 결합 등을 갖는 알킬 그룹을 의미한다. 카복시알킬은 하이드록실 그룹, 카복실 또는 아미드 치환된 에테르, 에스테르 결합, 에테르로부터 제거된 3급 아미드 결합 등을 갖는 알킬 그룹을 의미한다.

<38> 상기한 텍사피린에 있어서, 하이드록시알콕시는 독립적으로 하이드록시 치환체 및 에테르 측쇄를 갖는 알킬이거나 $C_{(n-x)}H_{((2n+1)-2x)}O_xO_Y$ 또는 $OC_{(n-x)}H_{((2n+1)-2x)}O_xO_y$(여기서, n은 1 내지 10의 양의 정수이고, x는 0 또는 n 이하의 양의 정수이며, y는 0 또는 ((2n+1)-2x) 이하의 양의 정수이다)일 수 있다. 하이드록시알콕시 또는 사카라이드는 $C_nH_{((2n+1)-q)}O_yR^a_q$, $OC_nH_{((2n+1)-q)}O_yR^a_q$ 또는 $(CH_2)_nCO_2R^A$(여기서, n은 1 내지 10의 양의 정수이고, y는 0 또는 ((2n+1)-q) 미만의 양의 정수이며, q는 0 또는 2n+1 이하의 양의 정수이고, R^a는 독립적으로 수소, 알킬, 하이드록시알킬, 사카라이드, $C_{(m-w)}H_{((2m+1)-2w)}O_wO_z$, $O_2CC_{(m-w)}H_{((2m+1)-2w)}O_wO_z$ 또는 $N(R)OCC_{(m-w)}H_{((2m+1)-2w)}O_wO_z$이다. 이 경우, m은 1 내지 10의 양의 정수이고, w는 0 또는 m 이하의 양의 정수이며, z는 0 또는 ((2m+1)-2w) 이하의 양의 정수이고, R은 H, 알킬, 하이드록시알킬 또는 $C_mH_{((2m+1)-r)}O_zR^b_r$(여기서, m은 1 내지 10의 양의 정수이고, z는 0 또는 ((2m+1)-r) 미만의 양의 정수이며, r은 0 또는 2m+1 이하의 양의 정수이고, R^b는 독립적으로 H, 알킬, 하이드록시알킬 또는 사카라이드이다)이다.

<39> 카복시아미드알킬은 2급 또는 3급 아미드 결합을 갖는 알킬이거나 $(CH_2)_nCONHR^a$, $O(CH_2)_nCONHR^a$, $(CH_2)_nCON(R^a)_2$ 또는 $O(CH_2)_nCON(R^a)_2$(여기서, n은 1 내지 10의 양의 정수이고, R^a는 독립적으로 H, 알킬, 하이드록시알킬, 사카라이드, $C_{(m-w)}H_{((2m+1)-2w)}O_wO_z$, $O2CC_{(m-w)}H_{((2m+1)-2w)}O_wO_z$, $N(R)OCC_{(m-w)}H_{((2m+1)-2w)}O_wO_z$, 또는 부위-지시된 분자 또는 촉매 그룹이다)일 수 있다. 이 경우, m은 1 내지 10의 양의 정수이고, w는 0 또는 m 이하의 양의 정수이며, z는 0 또는 ((2m+1-2w) 이하의 양의 정수이고, R은 H, 알킬, 하이드록시알킬 또는 $CmH_{((2m+1)-r)}O_zR^b_r$이다. 여기서, m은 1 내지 10의 양의 정수이고, z는 0 또는 ((2m+1)-r) 미만의 양의 정수이며, r은 0 또는 2m+1 이하의 양의 정수이고, R^b는 독립적으로 H, 알킬, 하이드록시알킬 또는 사카라이드이다. 바람직한 양태에서, R^a는 올리고뉴클레오티드이다.

<40> 카복시알킬은 카복실 치환된 에테르, 아미드 치환된 에테르 또는 에테르로부터 제거된 3급 아미드를 갖는 알킬일 수 있거나, $C_nH_{((2n+1)-q)}O_yR^c_q$ 또는 $OC_nH_{((2n+1)-q)}O_yR^c_a$(여기서, n은 1 내지 10의 양의 정수이

고, y는 0 또는 ((2n+1)-q) 미만의 양의 정수이며, q는 0 또는 2n+1 이하의 양의 정수이고, R^c는 $(CH_2)_nCO_2R^d$, $(CH_2)_nCONHR^d$, $(CH_2)_nCON(R^d)_2$, 또는 부위-지시된 분자 또는 촉매 그룹이다)일 수 있다. 여기서, n은 1 내지 10의 양의 정수이고, R^d는 독립적으로 H, 알킬, 하이드록시 알킬, 사카라이드, $C_{(m-w)}H_{((2m+1)-2w)}O_wO_z$, $O_2CC_{(m-w)}H_{((2m+1)-2w)}O_wO_z$ 또는 $N(R)OCC_{(m-w)}H_{(2m+1)-2w)}O_wO_z$이다. 여기서, m은 1 내지 10의 양의 정수이고, w는 0 또는 m 이하의 양의 정수이며, z는 0 또는 ((2m+1)-2w) 이하의 양의 정수이고, R은 H, 알킬, 하이드록시 알킬 또는 $C_mH_{((2m+1)-r)}O_zR^b_r$이다. 여기서, m은 1 내지 10의 양의 정수이고, z는 0 또는 ((2m+1)-r) 미만의 양의 정수이며, r은 0 또는 2m+1 이하의 양의 정수이고, R^b는 독립적으로 H, 알킬, 하이드록시알킬 또는 사카라이드이다. 바람직한 양태에서, R^c는 올리고뉴클레오티드이다.

<41> 본 발명의 양태에서, M은 Ca^{+2}, Mn^{+2}, Co^{+2}, Ni^{+2}, Zn^{+2}, Cd^{+2}, Hg^{+2}, Fe^{+2}, Sm^{+2} 및 UO_2^{+2}로 이루어진 그룹중에서 선택된 2가 금속 양이온이거나, Mn^{+3}, Co^{+3}, Ni^{+3}, Fe^{+3}, Ho^{+3}, Ce^{+3}, Y^{+3}, In^{+3}, Pr^{+3}, Nd^{+3}, Sm^{+3}, Eu^{+3}, Gd^{+3}, Tb^{+3}, Dy^{+3}, Er^{+3}, Tm^{+3}, Yb^{+3}, Lu^{+3}, La^{+3} 및 U^{+3} 이루어진 그룹 중에서 선택된 3가 금속 양이온일 수 있다.

<42> 현재의 바람직한 텍사피린에 있어서, R_1은 하이드록시알킬이고, R_2, R_3 및 R_4는 알킬이다. 다르게는, R_3은 부위-지시된 분자 또는 부위-지시된 분자에 대한 커플, 바람직하게는 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드에 대한 커플일 수 있다. 보다 바람직한 텍사피린에 있어서, R_1은 $(CH_2)_2CH_2OH$이고, R_2 및 R_3은 CH_2CH_3이며, R_4는 CH_3이고, R_5 및 r_6은 $OCH_2CH_2CH_2OH$이다. 다르게는, R_5는 부위-지시된 분자 또는 이에 대한 커플, 바람직하게는 올리고뉴클레오티드 또는 이에 대한 커플, 보다 바람직하게는 $O(CH_2)_nCO$-올리고뉴클레오티드(여기서, n은 1 내지 7, 바람직하게는 1 내지 30이다)이고, R_6은 H이다. 보다 바람직한 양태에서, R_1은 $(CH_2)_2CH_2OH$이고, R_2 및 R_3은 CH_2CH_2이며, R_4는 CH_3이고, R_5는 $O(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2OCH_3$이며, R_6은 부위-지시된 분자 또는 이에 대한 커플, 바람직하게는 올리고뉴클레오티드 또는 이에 대한 커플, 보다 바람직하게는 $O(CH_2)_nCO$-올리고뉴클레오티드(여기서, n은 1 내지 7, 바람직하게는 1 내지 30이다)이다. 다른 바람직한 양태에서, R_1 내지 R_6은 텍사피린 A1 내지 A29에 대해 표 1에 기재한 것과 같다.

<43> 본 발명의 추가 양태에서, R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 및 R_6 중의 하나 이상은 부위-지시된 분자이거나 부위-지시된 분자에 대한 커플이다. 보다 바람직한 양태에서, 부위-지시된 분자는 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드에 대한 커플이고, 가장 바람직하게는 올리고뉴클레오티드가 데옥시리보뉴클레오티드이고 분해되는 포스페이트 에스테르가 RNA이다. 올리고뉴클레오티드는 가수분해될 포스페이트 에스테르 결합에 인접한 영역에서 RNA에 대해 상보적인 결합 친화성을 갖는다. 올리고뉴클레오티드는 바이러스성 RNA, 특허 레트로바이러스성 RNA 또는 세균성 리보솜 RNA에 대해 상보적인 결합 친화성을 가지며, 이로 인해 바이러스성 RNA 또는 세균성 RNA를 분해시키고 유기체를 치사시킬 수 있다. 포스페이트 에스테르가 RNA인 경우, 금속 양이온은 바람직하게는 란타나이드 금속 양이온, 보다 바람직하게는 Eu(III) 또는 Dy(III)이다.

<44> 올리고뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드일 수 있고, 온코진에 대해 상보적인 결합 친화성을 갖는다. 올리고뉴클레오티드, 항체, 호르몬, 사프피린 또는 루비린은 처리 부위에 대한 국지화에 대해 결합 특이성을 가질 수 있으며, 생물학적 수용체를 처리 부위에 국지화시킬 수 있다.

<45> 본 발명의 다른 양태는 i) 포스페이트 에스테르 수용액을 수득하는 단계 및 ii) 당해 용액을 사프피린에 결합된 텍사피린 금속 착물로 항온처리하는 단계를 포함하는 포스페이트 에스테르 가수분해 방법이다. 사프피린은 실시예 12에 기술되어 있는 바와 같이 포스페이트 에스테르에 대해 결합 특이성을 갖는다. 항온처리는 포스페이트 에스테르를 가수분해시키기에 충분한 조건하에서 충분한 시간 동안 수행한다. 사프피린 화합물은 본원에 참조로 인용된 미합중국 특허 제5,159,065호 및 제5,120,411호에 기술되어 있다.

<46> 본 발명의 또 다른 양태는 표적화된 세포내 mRNA 가수분해 방법에 관한 것이다. 당해 방법은 표적화된 RNA에 대해 상보적인 결합 친화성을 갖는 올리고뉴클레오티드에 커플링된 텍사피린 금속 착물을 세포내로 도입하여 표적화된 mRNA의 가수 분해를 텍사피린 금속 착물에 의해 촉진시킴을 포함한다. mRNA는 온코진으로부터 전사될 수 있거나 mRNA는, 예를 들어, 성장 인자를 암호화시킬 수 있다. mRNA는 예를 들어, 부적절한 발현 시간에 기인하여 파괴시킬 필요가 있는 정상 mRNA일 수 있다.

<47> 본 발명의 또다른 양태는 동물에게 텍사피린 금속 착물-접합체를 투여함을 포함하여, 동물에서 유전자 발현을 억제하는 방법에 관한 것이다. 올리고뉴클레오티드는 유전자로부터 전사된 메신저 RNA에 대해 상보적 결합 친화성을 가질 수 있거나 유전자를 둘러싸고 있는 DNA 또는 유전자를 암호화시키는 DNA의 본쇄(strand)에 상보적일 수 있다. 유전자는 온코진일 수 있거나, 에를 들어, 성장 인자를 암호화시킬 수 있다. 본 발명의 다른 양태는 조직에 대해 특이성을 갖는 텍사피린 금속 착물-접합체를 동물에게 투여함을 포함하여 동물의 특정 조직내에서 유전자 발현을 억제하는 방법에 관한 것이다. 텍사피린 금속 착물-접합체에는 표적 유전자에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 부가시킬 수 있으며, 추가로, 예를 들어, 에스트라디올과 같은 조직-특이적 분자, 또는 해당 조직에 대해 지시된 항체 또는 해당 조직상의 생물학적 수용체에 대해 친화성을 갖는 펩티드를 부가시킬 수 있다.

<48> 본 발명의 다른 양태는 2개 이상의 독립된 텍사피린 착물이 하나는 3' 말단에서, 또다른 하나는 5' 말단에서 및 하나 이상은 내부 잔기에서 올리고뉴클레오티드에 부된 텍사피린 금속 착물-접합체에 관한 것이다. 각 텍사피린 착물의 금속이온은 동일하거나 상이할 수 있으며, 바람직하게는 란타나이드 이온이다. 이중 텍사피린 착물-접합체의 사용은 금속 착물의 협력된 활성에 기인하여 RNA 가수분해를 높은 효율로 수행할 것임에 틀림없다. 진단과 치료 목적을 위해, 에스테르 결합-가수분해 금속 종을 갖는 하나의

텍사피린 착물 및 상자성 종을 갖는 다른 텍사피린 착물과의 이러한 접합체를 투여하면, 결합, 영상화 및 가수분해가 하나의 접합체에 의해 모두 수행될 수 있다. 이 경우, 결합은 올리고뉴클레오티드에 의해 수행되고, 영상화는 상자성 금속 이온의 존재에 기인하여 MRI 또는 형광 현미경 검사법에 의해 수행되며, 가수분해는 에스테르 결합-가수분해 금속 종에 의해 수행된다. 따라서, 접합체의 생체 분포도 및 세포 투과도를 결정할 수 있다.

<49> 도면의 간단한 설명

<50> 제1A도 내지 제1C도는 B2T2TXP(1_H, 1_I) 및 B2T2의 란타나이드 금속 착물(1_J-1_W)의 합성법을 도식적으로 요약한 것이다.

<51> 제2A도 내지 제2B도는 텍사피린 금속 착물의 올리고뉴클레오티드 접합체(2_H)의 합성법을 도식적으로 요약한 것이다.

<52> 제3A도 내지 제3C도는 텍사피린 금속 착물이 아민, 티올 또는 하이드록시 결합된 올리고뉴클레오티드와 공유 결합하여 본 발명의 바람직한 화합물을 형성함을 보여주는 것이다.

<53> 제4A도 내지 제4D도는 디포르밀 모노산 트리피란(4_H) 및 올리고뉴클레오티드 접합체(4_J)의 합성법을 보여주는 것이다.

<54> 제5도는 실시예 6의 RNA 가수분해 실험을 위한, ^{32}P-표지된 2000 염기쌍 RNA 전사물을 생성시키는 재조합 플라스미드를 도시한 것이다. 여기서, R_1는 EcoRI이고 MCS는 다중-클로닝 서열이다.

<55> 제6도는 RNA 전사물을 아세트산 유로퓸과 EuOAc 및 EDTA로 항온처리한 대조실험의 방사선 사진을 보여주는 것이다. 여기서, 레인 1 내지 14는 다음을 의미한다: 레인 1, 대조군, EuOAc 비사용; 레인 2, EDTA를 사용한 대조군, EuOAc 비사용; 레인 3 내지 7, EuOAc 100μM, 50μM, 25μM, 10μM 및 5μM; 레인 인 8, EuOAc 100μM 및 EDTA 500μM; 레인 9, EuOAc 100μM 및 EDTA 300μM; 레인 10, EuOAc 100μM 및 EDTA 100μM; 레인 11, EuOAc 100μM 및 EDTA 10μM; 레인 12, MW std; 레인 13, 대조군, EuOAc 비사용; 레인 14, MW std.

<56> 제7도는 RNA 전사물을 유로퓸 B2T2 텍사피린으로 항온처리시킨 실험의 방사선 사진을 보여주는 것이다. 여기서, 레인 1 내지 13은 다음과 같다: 레인 1, 대조군, EuB2T2 txph 비사용; 레인 2, EDTA를 사용한 대조군; 레인 3 내지 7, EuB2T2 txph 100μM, 50μM, 25μM, 10μM 및 5μM; 레인 8 내지 10, EuB2T2 txph 100μM 및 EDTA 500μM, 300μM 및 100μM; 레인 11, M.W. std, 레인 12, 대조군, EuB2T2 txph 비사용; 레인 13, EuB2T2 txph 100μM 및 EDTA 10μM.

<57> 제8도는 본 발명의 바람직한 텍사피린-유로퓸 착물을 도시한 것이다.

<58> 제9도는 실시예 7의 유료퓸(III) 텍사피린(EuTx) DNA 접합체, 실시예 8의 디스프로슘(III) 텍사피린(DyTx) 접합체, 텍사피린에 3' 말단에서 접합된 올리고뉴클레오티드 및 이중 접합체, 즉 5' 및 3' 말단에 접합된 텍사피린을 갖는 올리고뉴클레오티드를 도시한 것이다. 여기서, 올리고뉴클레오티드는 5' --- 3' 방향으로 기재되었다.

<59> 제10도는 EuTx-DNA 접합체에 의한 RNA 31-머(mer)의 분해 및 Dy-Tx-DNA 접합체에 의한 RNA 36-머의 분해를 도식적으로 나타낸 것이며, 여기서 화살표는 금속-촉매화된 가수분해 부위를 나타낸다.

<60> 제11A도 및 제11B도는 EuTx-DNA 접합체 또는 유리 유로퓸 착물(8_B)에 의한 합성 RNA 30-머(10_B)의 분해를 도시한 것이다. 제11A도 및 제11B도는 3' 말단이 ^{32}P로 표지된 20% 고해상 변성 폴리아크릴아미드 겔의 방사선 사진이다. 기질 약 1.5×10^5cpm을 HEPES(pH 7.5) 50mM, NaCl 100mM, EDTA 25μM 및 송아지의 흉선 DNA 5μg/ml를 함유하는 완충액 총 용적 20μl속에서 37℃에서 약 24시간 동안 항온처리한다. 주: 레인 1, DNA 비함유 대조군, 레인 2, 변성시키지 않은 올리고데옥시뉴클레오티드(9_E)를 갖는 대조군; 레인 3, 2.5μM 8_B; 레인 4, 25μM 8_B, 레인 5 내지 7(각각), 9_E 및 250nM, 2.5μM, 및 25μM 8_B, 레인 8, 9_A; 레인 9, 9_C ; 레인 10, 9_B; 레인 11 내지 14, 9_D (각각) 2.5nM, 25nM, 250nM, 및 2.5μM. 모든 다른 올리고뉴클레오티드는 최종 농도 2.5μM로 존재한다. 뉴클레오티드 서열 분석은 염기-특이적 리보뉴클레아제를 사용하는 부분 분해에 의해 결정한다: T1(G), U2(A>G); Phy M(U+A); B, 세레우스(cereus)(U+C), HCO_3 (알칼리 가수분해); PNK(폴리뉴클레오티드 키나제-처리된 HCO_3 레인)

<61> 제12도는 EuTx-DNA 접합체[$10_A(9_D)$]에 의한 5' 말단 표지된 RNA 30-머(10_B)의 분해를 도시한 것이다. 표지된 기질을 NaCl 100mM을 함유하는 완충액속에서 37℃(레인 3 내지 6) 또는 25℃(레인 7 내지 14)에서 24시간 동안 2.5μM EuTx-DNA 접합체로 항온처리시킨다. 주: 레인 1, 항온처리시키지 않은 RNA 대조군; 레인 2, 리보뉴클레아제 T1(G) 반응; 레인 3, 8, 50mM HEPES(pH 7.5), 25μM EDTA; 레인 4, 9, 50mM HEPES(pH 7.0), 25μM EDTA; 레인 5, 10:50mM 트리스아세테이트(pH 7.5), 25μM EDTA; 레인 6, 11, 14, 50mM 트리스아세테이트(pH 7.0), 25μM EDTA; 레인 7, 50mM HEPES(PH 7.5); 레인 12, 13, 50mM 트리스아세테이트(PH 7.0); 레인 13, 5μM Fe(II), 4mM DTT, 5μM 변형시키지 않은 올리고 9_E; 레인 14, 접합체 비함유 대조군. EuTx : 접합체-유도된 분해; Bkgd : 백그라운드(background) 자가분해.

<62> 제13도는 EuTx-DNA 접합체[$10_A(9_D)$]에 의한 5'-말단 표지된 30-머(10_B)의 분해를 도시한 것이다. 표지된 기질을 NaCl 100mM, EDTA 25μM 및 송아지 흉선 DNA 5μg/ml를 함유하는 5μm HEPES(또는 트리스아세테이트, 레인 6) 완충액속에서 37℃에서 25시간 동안 항온처리한다. 주: 레인 1, DNA 비함유 대조군; 레인 2, 변형시키지 않은 올리고데옥시뉴클레오티드 9_E(2.5μM); 레인 3, 9_B (2.5μM); 레인 4, 9_C (2.5μM); 레인 5 내지 9, 9_D (10_A) (250nM). EuTx : 접합체-유도된 분해; Bkgd: 백그라운드 자가분해.

<63> 제14도는 EuTXP의 존재하에서 cUMP가 우리딘으로 가수분해되는 과정을 도시한 것이다.

<64> 제15도는 텍사피린의 아미드 결합된 유도체의 형성 과정을 도시한 것이다. 여기서, R은 사프피린, 텍사피린, 포르피린 또는 촉매 그룹이고, $(NH_2)_m$은 모노아민[$NH_2(CH_2)_x$(여기서, x는 0 내지 12이다)], 디아민[NH_2-(CH_2)$_x$-NH_2(여기서, x는 2 내지 12이다)], 트리아민[$(NH_2(CH_2)_x)_3N$(여기서, X는 2 내지 6이다)] 또는 테트라민[$(NH_2(CH_2)_x)_2N(CH_2)_yN((CH_2)_xNH_2)_2$(여기서, x는 2 내지 4이고, y는 2 내지 6이다)]을 나타낸다.

<65> 제16도는 텍사피린-사프피린 접합체의 합성법을 도시한 것이다. 여기서, R은 H, OH, 알킬, 하이드록시알킬 또는 알콕시일 수 있고, M은 Ln이고 n은 1 내지 5 이다.

<66> 제17도는 텍사피린의 이량체 또는 접합체를 도시한 것이다. 금속은 동일하거나 상이할 수 있다.

<67> 제18A도 및 제18B도는 하나의 염기를 제거하여 기질이 가수분해에 대한 민감성이 증진된 1-염기 루우프를 포함하는 올리고뉴클레오티드 접합체의 예를 도시한 것이다.

<68> 제19A도 및 제19B도는 이미다졸 촉매 그룹을 갖는 디스프로슘 텍사피린의 합성법을 도식적으로 요약한 것이다.

<69> 제20A도 및 제20B도는 히스타민 그룹이 부착된 유로퓸 텍사피린(20A) 및 아르기닌 메틸 에스테르 그룹이 부착된 유로퓸 텍사피린(20B)을 도시한 것이다.

<70> 제21도는 RNA 주형상의 동일한 가수분해 부위가 표적화된 일련의 텍사피린 금속 착물-접합체의 용도를 도시한 것이다.

<71> 제22도는 EuTx-접합체(9_B 및 9_D) 또는 DyTx-접합체(9_I 내지 9_H)에 의한 5'-말단 표지된 RNA 30-머(10_B)(레인 1 내지 9) 또는 36-머(10_D) (레인 12 내지 18)의 분해를 도시한 것이다. 제22도는 20% 변성 폴리아크릴아미드 겔의 방사선사진이다. 표지된 기질을 NaCl 100mM, HEPES(pH 7.5) 50mM 및 EDTA 25μM을 함유하는 완충액 속에서 37℃에서 24시간 동안 250nM 접합체를 사용하거나 사용하지 않고서 항온처리시킨다. 주 : 레인 1, 12, 접합체 비함유 대조군; 레인 2, 6, 13, 9_B; 레인 3, 7, 14, 9_D; 레인 4, 8, 15, 9_I; 레인 5, 9, 16, 9_H; 레인 10, 17, HCO_3 서열화; 레인 11, 18, 염기-특이적 리보뉴클레아제 U2 (A) 서열화. 레인 1 내지 5에 상응하는 반응은 불활성(아르곤) 대기하에서 수행하는 반면, 레인 12 내지 16에 상응하는 반응은 산소하에서 수행한다. LnTx, 접합체-유도된 분해; Bkgd, 백그라운드 자가분해.

<72> 바람직한 양태의 상세한 설명

<73> 본 발명은 에스테르 결합을 가수분해 절단시키기 위한 텍사피린 금속 착물, 특히 수용성 텍사피린 금속 착물의 용도를 포함한다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 하이드록실화 텍사피린의 란타나이드 금속 착물을 사용한 디에스테르, 모노에스테르 및 RNA 기질의 포스페이트 에스테르 결합의 분해를 포함한다. 란타나이드(III) 텍사피린 착물의 조사 결과, 조사된 모든 금속 착물이 RNA를 가수분해적으로 분해시킬 수 있는 것으로 나타나긴 했지만, 유로퓸(III) 및 디스프로슘(III)의 착물은 지금까지 시험된 다른 란타나이드의 착물에 비해 보다 빨리 RNA를 분해한다.

<74> 유기 합성 기술분야의 숙련가라면, 본 기술 내용에 비추어, 중요한 생물학적 물질인 포스페이트 에스테르를 가수분해적으로 분해할 것으로 기대되는 매우 다양한 란타나이드 텍사피린을 제조할 수 있다. 본 방법의 가능한 특정 적용예에는 RNA의 특이적 분해 및 가능한 후속적 재조합, 바이러스성 RNA의 파괴, 포스파티딜콜린 및 스핑고미엘린과 같은 세포막 성분의 분해, ATP, ADP, NADH, NADPH, FAD 또는 $FADH_2$의 가수분해에 의한 세포내 유리 에너지의 이동 방해, 글리코겐 형성의 예방에 의한 간 질환의 치료, cAMP의 가수분해에 의한 호르몬 조절, 용매로서 통상 사용되는 돌연변이유발성 및 발암성 디- 및 트리알킬 포스페이트의 가수분해, 및 포스페이트 에스테르 결합의 가수분해에 의한 포스페이트 에스테르 신경 가스 및 살충제의 해독이 포함된다.

<75> 텍사피린 화합물 및 이의 제조방법은 각각 본원에 참조로 인용된 미합중국 특허 제4,935,498호, 제5,162,509호, 제5,252,720호, 제5,272,142호 및 제5,256,399호에 기술되어 있다.

<76> 통상적으로, 텍사피린 분자의 B(벤젠 환) 부분에 대한 하이드록시 치환체의 도입은 당해 하이드록시 치환체를 분자의 페닐 아단위의 4 및 5 위치에서 페닐렌디아민에 부착시킴으로써 수행하거나, 하이드록시 치환체를 상기 특허 문헌에 기술되어 있는 바와 같이 거대환 금속 착물을 형성하는 축합 단계후의 합성 단계에서 가할 수 있다. 분자의 T(트리피롤 또는 트리피란) 부분에 대한 하이드록시 치환체의 도입은 치환된 페닐렌디아민과 축합시키기 전에 합성 단계에서 피롤 환의 3 및/또는 4 위치에서 알킬 치환체를 적절히 작용화시킴으로써 수행한다. 에스테르 가수분해와 같은 표준 탈보호 방법을 사용하여 유리 하이드록실 치환체를 차폐시키지 않을 수 있다. 다르게는, 에스테르 환원의 결과로서 이들을 제조할 수도 있다. 이들 유도체는 수성 매질속에서 1mM 이상의 현저한 용해도를 나타내고, 지질이 풍부한 영역에 대한 친화성을 보유하여 생물학적 환경에서도 사용될 수 있다.

<77> 텍사피린의 2가 및 3가 금속 착물은 관례에 따라 각각 N^+(여기서, N은 1 또는 2이다)의 형식 전하를 사용하여 나타낸다. 당해 기술 분야의 숙련가라면, 본 발명에 기술된 착물이 금속 이온에 대해 전하 중화 및/또는 배위 포화를 제공하는 1개 이상의 추가 리간드를 가짐을 이해할 것이다. 이러한 리간드에는, 그 중에서도 클로라이드, 니트레이트, 아세테이트 및 하이드록사이드가 포함된다.

<78> 본 발명의 텍사피린의 예는 표 1에 기재한 바와 같다.

표 1

본 발명의 텍사피린 거대환에 대한 대표적인 치환체

TXP	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
A1	$CH_2(CH_2)_2OH$	CH_2CH_3	CH_2CH_3	CH_3	$O(CH_2)_3OH$	$O(CH_2)_3OH$
A2	"	"	"	"	$O(CH_2CH_2O)_3CH_3$	$O(CH_2CH_2O)_3CH_3$
A3	"	"	"	"	$O(CH_2)_nCON$-링커-부위-지시된 분자, n=1-7	"
A4	"	"	"	"	$O(CH_2)_nCON$-링커-부위-지시된 분자	H
A5	"	"	"	"	OCH_2CO-폴리-L-라신	"
A6	"	"	"	"	OCH_2-CO-호르몬	"
A7	"	"	"	"	$O(CH_2CH_2O)_3CH_3$	"
A8	"	"	"	"	OCH_2CON-링커-부위-지시된 분자	$O(CH_2CH_2O)_3CH_3$
A9	"	"	"	"	OCH_2CO-호르몬	"
A10	"	"	"	"	OCH_2CON-올리고	$O(CH_2CH_2O)_3CH_2$-CH_2-N-이미다졸

표 1(계속)

TXP	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
A11	"	"	"	"	$O(CH_2CH_2O)_{120}CH_3$	"
A12	"	"	"	"	사카라이드	H
A13	"	"	"	"	$OCH_2CON(CH_2CH_2OH)_2$	"
A14	"	"	"	"	$CH_2CON(CH_3)CH_2(CHOH)_4CH_2OH$	"
A15	"	COOH	COOH	"	"	"
A16	"	$COOCH_2CH_3$	$COOCH_2CH_3$	"	"	"
A17	$CH_2CH_2CON(CH_2CH_2OH)_2$	CH_2CH_3	CH_2CH_3	"	"	"
A18	$CH_2CH_2ON(CH_3)CH_2-(CHOH)_4CH_2OH$	"	"	"	OCH_3	OCH_3
A19	CH_2CH_3	"	"	"	OCH_2CO_2-글루코스아민	H
A20	$CH_2(CH_2)_2OH$	"	"	"	$O(CH_2)_nCOOH$, n=1-7	"
A21	"	"	"	"	$(CH_2)_n$-CON-링커-부위-지시된 분자, n=1-7	"

표 1(계속)

TXP	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
A22	"	"	"	"	$YCOCH_2$-링커-부위-지시된 분자, Y=NH, O	"
A23	CH_2CH_3	CH_3	CH_2CH_2COOH	"	$O(CH_2)_2CH_2OH$	$O(CH_2)_2CH_2OH$
A24	"	"	CH_2CH_2CON-올리고	"	"	"
A25	$CH_2(CH_2)_2OH$	CH_2CH_3	CH_2CH_3	"	OCH_2COOH	$O(CH_2CH_2O)_3CH_2-CH_2-N$-이미다졸
A26	"	"	"	"	$O(CH_2)_3CO$-히스타민	H
A27	"	"	"	"	$O(CH_2)_3CO$-아르기닌 메틸 에스테르	"
A28	"	"	"	"	$O(CH_2)_nCO$-아미노산, n=1-7	"
A29	"	"	"	"	$O(CH_2)_nCON$-촉매 그룹, n=1-7	"

<82> 달리 한정하지 않는한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 숙련가가 통상적으로 이해하고 있는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 방법 및 물질과 유사하거나 동일한 방법 및 물질을 본 발명을 실시 또는 시험하는데 사용할 수 있긴 하지만, 바람직한 방법 및 물질은 아래에 기술하는 바와 같다. 달리 언급하지 않는한, 본원에 사용된 기술은 해당 기술 분야의 통상의 숙련가에게 널리 공지되어 있는 표준 방법이다.

<83> 실시예 1

<84> B2T2 TXP의 합성(제1A도 내지 제1C도 참조)

<85> 2,5-비스[(5-벤질옥시카보닐-4-메틸-3-메톡시카보닐에틸피롤-2-일)메틸]-3,4-디에틸피롤(1c, 제1A도)

<86> 500ml들이 환저 플라스크에 개봉하지 않은 병에서 꺼낸 에탄올 250ml를 넣은 다음 이를 무수 질소로 10분 동안 퍼징한다. 3,4-디에틸피롤(1_B)(1.29g, 0.01mol) 및 2-아세톡시메틸-5-벤질옥시카보닐-4-메틸-3-에톡시카보닐에틸피롤(1_A)(7.83g, 0.02mol)을 가하고, 혼합물을 모든 피롤이 용해될 때까지 가열한다. p-톨루엔설폰산(65mg)을 가하고 반응 온도를 65℃에서 유지시킨다. 반응이 진행됨에 따라 용액으로부터 생성물이 침전되면서 반응물의 색상이 투명한 황색에서 암적색으로 서서히 변화한다. 10시간

후, 반응물을 실온으로 냉각시키고, 회전 증발기상에서 용적을 반으로 줄인 다음 냉동기속에 수시간 동안 정치시킨다. 여과하여 생성물을 수집하고 소량의 차가운 에탄올로 세척하여 회백색의 미세 분말 4.61g(61%)을 수득한다:

<87> ^{1}H NMR($CDCl_3$, 250MHz), δ 1.14(6H, t, CH_2CH_3), 2.23(6H, s, 피롤 $-CH_3$), 2.31(4H, t, $CH_2CH_2CO_2CH_3$), 2.50(4H, q, CH_2CH_3), 2.64(4H, t, $CH_2CH_2CO_2CH_3$), 3.60(10H, br s, CH_3CO_2- 및 (피롤)$_2-CH_2$), 4.44(4H, br s, $C_6H_5CH_2$), 6.99-7.02(4H, m, 방향족), 7.22-7.26(6H, m, 방향족), 8.72(1H, s, NH), 10.88(2H, br s, NH); ^{13}C NMR($CDCl_3$, 250MHz): δ 10.97, 16.78, 17.71, 19.40, 22.07, 35.09, 51.46, 65.32, 117,37, 119.34, 122.14, 126,58, 125,79, 127.36, 128.19, 133.55, 136.62, 162.35, 173.49 ; CI MS(M+H)$^+$ 750; HRMS 749.3676).

<88> $C_{44}H_5N_3O_5$에 대한 계산치: 749.3676.

<89> 2,5-비스[(5-벤질옥시카보닐-3-(3-하이드록시프로필)-4-메틸피롤-2-일)메틸[-3,4-디에틸피롤(1_D, 제1A도)

<90> 2,5-비스[(5-벤질옥시카보닐-4-메틸-3-메톡시카보닐에틸피롤-2-일)메틸]-3,4-디에틸피롤(1_C) (5.00g, 0 007mol)을 100ml들이 3구 환저 플라스크에 넣은 다음 최소한 30분 동안 진공 건조시킨다. 플라스크에 온도계, 부가 깔때기, 질소 주입 튜브 및 자기 교반봉을 장착시킨다. 트리피란을 무수 THF 10ml에 부분적으로 용해시킨 다음, 보란(THF중의 1M BH_3) 29ml를 교반하에 적가한다. 반응이 온화하게 발열반응으로 되면, 반응물을 차가운 수욕으로 냉각시킨다. 트리피란을 서서히 용해시켜 오렌지색의 균질한 용액을 생성시키는데, 당해 용액은 반응이 완료되어감에 따라 밝은 형광 오렌지색으로 변화한다. 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반한 후, 격렬한 비등이 멈출때까지 메탄올을 적가하여 반응물을 켄칭시킨다. 감압하에서 용매를 제거하고, 생성된 백색 고체를 CH_2Cl_2에 다시 용해시킨다. 트리피란을 0.5M HCl로 3회 (총 200ml) 세척하고, 무수 K_2CO_3로 세척하여 여과한 다음, 감압하에서 트리피란의 결정이 형성되기 시작할 때까지 CH_2Cl_2를 제거한다. 헥산(50ml)을 가하고 트리피란을 냉동기속에서 수시간 동안 결정화시킨다. 생성물을 여과한 다음 CH_2Cl_2/에탄올로부터 다시 재결정화시킨다. 여과하여 생성물을 수집한 다음, 진공 건조시켜 오랜지색을 띤 백색 고체 3.69g(76%)을 수득한다:

<91> 융점 172 내지 173℃;

<92> ^{1}H NMR($CDCl_3$, 300MHz): δ 1.11(6H, t, CH_2CH_3), 1.57(4H, P, $CH_2CH_2CH_2OH$), 2.23(6H, s, 피롤-CH_3), 2.39-2.49(8H, m, CH_2CH_3 및 $CH_2CH_2CH_2OH$), 3.50(4H, t, $CH_2CH_2CH_2OH$), 3.66(4H, s, (피롤)$_2-CH_2$), 4.83(4H, s, $C_6H_5-CH_2$), 7.17-7.20(4H, m, 방향족), 7.25-7.30(6H, m, 방향족), 8.64(1H, s, NH), 9.92(2H, s, NH); ^{13}C($CDCl_3$, 300MHz): δ 10.97, 16.72, 17.68, 20.00, 22.38, 33.22, 62.01, 65.43, 117.20, 119.75, 120.72, 122.24, 127.23, 127.62, 128.30, 132.95, 136.60, 162.13 ; FAB MS(M^+) 693.

<93> 2,5-비스[(3-(3-하이드록시프로필)-5-카복실-4-메틸피롤-2-일)메틸]-3,4-디에틸피롤(1_F, 제1B도)

<94> 2,5-비스[(3-(3-하이드록시프로필)-5-벤질옥시카보닐-4-메틸피롤-2-일)메틸]-3,4-디에틸피롤(1_D) (15.0g, 0.02mol)을 1ℓ들이 환저 플라스크에 넣고 진공중에서 약 30분 동안 건조시킨다. 트리피란을 트리에틸아민(10방울) 및 탄소상 10% Pd(600mg)과 함께 무수 THF(600ml)에 용해시키고, 반응물을 H_2 1기압하에 실온에서 교반한다. 15시간후, 현탁액을 셀라이트를 통해 여과하여 촉매를 제거하고, 생성된 투명한 용액을 감압하에서 농축시켜 밝은 핑크색 고체를 수득한다. 거의 정량적 수율로 수득된 당해 물질을 추가의 정제없이 다음 단계에 사용한다.

<95> 2,5-비스-[(5-포르밀-3-(3-하이드록시프로필)-4-메틸피롤-2-일)메틸]-3,4-디에틸피롤(1_F, 제1B도)

<96> 2,5-비스[(3-(3-하이드록시프로필)-5-카복실-4-메틸피롤-2-일)메틸]-3,4-디에틸피롤(1_E)(10g, 0.02mol)을 250ml들이 환저 플라스크에 넣은 다음 약 1시간 동안 진공 건조시킨다. 질소하에 실온에서 트리플루오로아세트산(31ml, 0.40mol)을 주사기를 통해 적가한다. 트리피란을 CO_2 방출을 육안으로 관찰하면서 용해시켜 균질한 황색 용액을 수득한다. 반응물을 실온에서 약 15분 동안 교반한 다음, 드라이 아이스/CCl_4 욕을 사용하여 -20℃로 냉각시킨다. 새로 증류한 트리에틸오르토포르메이트(31ml, 0.20mol, CaH_2로 건조시킴)를 주사기를 통해 가하여 어두운 오랜지색/황색 용액을 수득한다. 당해 혼합물을 -20℃에서 추가로 10분 동안 교반한 다음 냉각욕을 제거하고, 용액에 증류수 100ml를 적가한다. 생성된 갈색 현탁액을 실온에서 15분 동안 교반한다. 생성물을 여과하여 수집하고, 물로 수회 세척한 다음 50ml/100ml/50ml(H_2O/EtOH:NH_4OH, v/v) 혼합물에 재현탁시킨다. 황색/갈색 현탁액을 1시간 동안 교반하고, 여과하여 물로 수회 세척한 다음 소량의 차가운 95% 에탄올로 세정한다. 이 시점에서, TLC 분석 결과는 트리피란의 혼합물을 보여준다. 따라서, 조악한 디알데히드 트리피란 및 $LiOH \cdot H_2O$(2.10g, 0.05mol)를 탈기된 95% MeOH 400ml에 가하고, 현탁액을 N_2 대기하에서 가열하여 환류시킨다. 가열하여 반응물이 균질해지면, 약 1시간 후 반응물을 서서히 실온으로 냉각시킨다. 반응 혼합물을 감압하에서 75ml로 농축시키고, 생성된 슬러리를 냉동기속에 수시간 동안 넣어 준다. 생성물을 여과한 다음, 메탄올 400ml와 물 50ml를 사용하여 슬러리를 제조하고 거의 비등할때까지 가열함으로써 정제한다. 현탁액을 실온으로 서서히 냉각시키고, 감압하에서 150ml로 감소시킨 다음 냉동기속에 수시간 동안 넣어둔다. 정제된 디알데히드 트리피란을 여과하고, 물로 세정한 다음 24시간 동안 진공 건조시켜 밝은 갈색 분말 7.65g(80%)을 수득한다.

<97> 1_F의 경우: 융점 164 내지 166℃; ^{1}H NMR(CD_3OD): δ 0.96(t, 6H, CH_2CH_3), 1.49(p, 4H, $CH_2CH_2CH_2OH$), 2.25(s, 6H, pyrr-CH_3), 2.32-2.43(m, 8H, CH_2CH_3 및 $CH_2CH_2CH_2OH$), 3.46(t, 4H, $CH_2CH_2CH_2OH$), 3.85(s, 4H, $(pyrr)_2$-CH_2), 9.34(s, 2H, CHO); CI MS, M^+: m/e 480; HR MS, M^+: m/e 481.2942

<98> $C_{28}H_{39}N_3O_4$에 대한 계산치, 481.2941

<99> 4,5-디에틸-10,23-디메틸-9,24-비스(3-하이드록시프로필)-16,17-비스(3-하이드록시프로필옥시)-13,20,25,26,27-펜타아자펜타사이클로[20.2.1.1^{3,6}.1^{8,11}.0^{14,19}]헵타코사-3,5,8,10,12,14,16,18,20,22,24-운데카엔(1_H, 제1B도)

<100> 2,5-비스[(5-포르밀-3-(3-하이드록시프로필)-4-메틸피롤-2-일)메틸]-3,4-디에틸피롤(1_F)(1.00g, 0.002mol) 및 1,2-디아미노-4,5-비스(3-하이드록시프로필옥시) 벤젠(1_G) (0.52g, 0.002mol)을 톨루엔 1,000ml 및 메탄올 200ml와 함께 2ℓ 들이 환저 플라스크에 넣는다. 용매를 사용하기 전에 질소로 퍼징한다. 진한 HCl(0.5ml)을 가하고, 반응물을 질소하에 가열하여 환류시킨다. 반응이 진행됨에 따라, 반응물은 출발 물질의 투명한 현탁액에서 암적색의 균질한 용액으로 변한다. 5시간후, 반응물을 실온으로 냉각시키고, 용액으로부터 생성물이 침전될 때까지 감압하에서 용매를 제거한다. 나머지 용매를 경사분리하여 제거하고, 거대환 화합물을 진공 건조시킨다. 암적색 생성물을 메탄올/디에틸에테르로부터 재결정화시켜 1.4 내지 1.5g(90 내지 100%)을 수득한다.

<101> ^{1}H의 경우: 융점 190℃(분해); ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 1.11(t, 6H, CH_2CH_3), 1.76(p, 4H, pyrr-$CH_2CH_2CH_2OH$), 2.03(p, 4H, $OCH_2CH_2CH_2OH$), 2.36(s, 6H, pyrr-CH_3), 2.46(q, 4H, CH_2CH_3), 2.64(t, 4H, pyrr-$CH_2CH_2CH_2OH$), 3.61(t, 4H, pyrr-$CH_2CH_2CH_2OH$), 3.77(t, 4H, $OCH_2CH_2CH_2OH$), 4.10(s, 4H, $(pyrr)_2$-CH_2), 4.22(t, 4H, $OCH_2CH_2CH_2OH$), 7.41(s, 2H, PhH), 8.30(s, 2H, HC=N); ^{13}C NMR(CD_3OD): δ 10.0, 17.2, 18.6, 20.9, 24.5, 33.2, 33.5, 59.6, 61.9, 67.8, 107.1, 120.7, 123.8, 125.0, 125.8, 128.7, 144.8, 145.0, 150.7, 154.6, UV/vis(CH_3OH) [λ_{max}, nm] 365; FAB MS, $(M+H)^+$: m/e 703; HRMS, M^+: m/e 701.4120($C_{40}H_{55}N_5O_6$에 대한 계산치: 701.4152).

<102> $C_{40}H_{55}N_5O_6(HCl)(CH_3OH)$에 대한 원소분석 :

<103> 계산치: C, 63.92; H, 7.85; N, 9.09; Cl, 4.60,

<104> 실측치: C, 64 17; H, 7.68; N, 9.39; Cl, 4.70.

<105> 수용성 란타나이드 (III) 4,5-디에틸-10,23-디메틸-9,24-비스(3-하이드록시프로필)-16,17-(3-하이드록시프로필옥시)-13,20,25,26,27-펜타아자펜타사이클로[20.2.1.1.^{3,6}.1^{8,11},0^{14,19}] 헵타코사-1,3,5,7,9,11(27),12,14,16,18,20,22(25),23-트리데카엔, B2T2TXP (1_I, 제1C도)의 합성을 위한 일반 공정.

<106> 거대환 화합물인 4,5-디에틸-10,23-디메틸-9,24-비스(3-하이드록시프로필)-16,17-비스(3-하이드록시프로필옥시)-13,20,25,26,27-팬타아자펜타사이클로[20.2.1.1.^{3,6}.1^{8,11}.0^{14,19}]헵타코사-3,5,8,10,12,14,16,18,20,22,24-운데카엔(1_H)의 하이드로클로라이드 염 1당량, $Ln(NO_3)_3 \cdot XH_2O$ 금속염 1.5당량, 테트라부틸암모늄 니트레이트($TBANO_3$) 2 내지 3당량 및 트리에틸아민(약 1ml)을 메탄올속에서 함께 혼합한 다음 공기하에서 가열하여 환류시킨다. 반응 완료후(반응 혼합물의 UV/가시광선 스펙트럼에 의해 판단함), 진한 녹색 용액을 실온으로 냉각시키고, 감압하에서 용매를 제거한 다음 조악한 착물을 수시간 동안 진공 건조시킨다. 조악한 착물에 디클로로메탄/메탄올(99:1 v/v)의 용액을 가하고, 현탁액을 수분 동안 초음파 처리한다. 녹색 현탁액을 여과하여 여액중의 적색/갈색 불순물(불완전 산화 생성물 및 과량의 트리에틸아민)을 제거한다. 생성된 진녹색 고체를 먼저 메탄올에 용해시킨 다음, 클로로포름을 가하여 혼합물(1:2 v/v)의 극성을 감소시킨다. 당해 용액을 셀라이트를 통해 여과한 다음 (예비 처리된/예비 세척된 1M $NaNO_3$) 중성 알루미나컬럼(10cm)에 적재한다. 먼저, 컬럼을 중력에 의해 1:10(v/v)메탄올/클로로포름 용액으로 용출시켜 적갈색 불순물을 제거한다. 이어서, 컬럼을 증가량의 메탄올을 함유하는 클로로포름으로 용출시켜 금속 착물을 수득한다(20 내지 50%). 정제된 란타나이드(III) 텍사피린 착물을, 당해 착물을 메탄올/클로로포름에 용해시킨 다음, 암녹색 용액을 소량의 메탄올, 이어서 디에틸에테르로 조심스럽게 층화시킴으로써 재결정화시킨다. 층화된 용액을 실온의 암실에서 수일 동안 정치시킨다. 몇몇 란타나이드(III) 텍사피린 착물이 본 방법에 의해 단일 결정을 형성한다. 다른 착물은 분석학적으로 순수한 측정 및 특징화를 위해 2회 재결정화시킨다.

<107> 란탄(III) 착물(1_J)

<108> 메탄올 350ml중의 거대환 화합물(1_H)의 하이드로클로라이드 염(300mg, 0.407mmol), $La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$(350mg, 0.814mmol), $TBANO_3$(305mg, 1.0mmol) 및 트리에틸아민(약 0.5ml)을 공기중에서 10시간 동안 가열하여 환류시킨다. 위에서 개략적으로 기술한 일반 공정을 사용하여 후처리한 후, 착물 132mg을 수득한다(34%). 1_J의 경우: ^{1}H NMR(CD_3OD): δ 1.68(t, 6H, CH_2CH_3), 2.22-2.30(m, 4H, pyrr-($CH_2CH_2CH_2OH$) 및 4H, $OCH_2CH_2CH_2OH$), 3.20(s, 6H, pyrr-CH_3), 3.72-3.78(m, 4H, CH_2CH_3 및 4H, pyrr-$CH_2CH_2CH_2OH$ 및 pyrr-$CH_2CH_2CH_2OH$), 3.94(t, 4H, $OCH_2CH_2CH_2OH$), 4.78(m, 4H, $OCH_2CH_2CH_2OH$), 9.37(s, 2H, ArH), 9.87(s, 2H, $(pyrr)_2C$=CH), 11.71(s,2H, HC=N); ^{13}C NMR(CD_3OD): δ 11.0, 18.9, 20.3, 23.0, 33.3, 36.3, 59.7, 62.2, 68.1, 101.5, 118.5, 137.1, 140.3, 144.5, 147.5, 148.2, 152.9, 154.9, 159.4; UV/vis: [(MeOH) λ_{max},

nm(log ε)]: 355(4.34), 417(4.73), 476(5.06), 685.5(4.08), 746(4.59); FAB MS, M^+: m/e 835; HRMS, $(M+H)^+$: m/e 836.2919($C_{40}H_{51}N_5O_6{}^{139}La$에 대한 계산치, 836.2903).

<109> $[C_{40}H_{50}N_5O_6La](NO_3)_2(H_2O)_2$에 대한 원소분석 :

<110> 계산치: C, 48.23; H, 5.47, N, 9.85.

<111> 실측치: C, 47.93; H, 5.41; N, 9.77.

<112> 세륨(III) 착물(1_K)

<113> 메탄올 350ml중의 거대환 화합물(1_H)의 하이드로클로라이드 염(300mg, 0.407mmol), $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$(265mg, 0.611mmol), $TBANO_3$(305mg, 1.0mmol) 및 트리에틸아민(약 0.5ml)을 공기중에서 7시간 동안 가열하여 환류시킨다. 반응 혼합물이 초기에는 현탁액을 형성하나, 생성물이 형성됨에 따라 용액이 균질해짐을 주지하는 것이 중요하다. 위에 개략적으로 기술한 일반 공정을 사용하여 후처리한 후, 암녹색 결정 143mg을 수득한다(37%). 본 물질은 X-선 회절 분석에 적합하다. 1_K의 경우: UV/vis: [(MeOH) λ_{max}, nm(log ε)]: 349.5(4.34), 416.5(4.70), 476.5(5.05), 684(4.07), 741(4.56); FAB MS, M^+: m/e 836; HRMS, $(M+H)^+$: m/e 836.2807($C_{40}H_{51}N_5O_6{}^{140}$Ce에 대한 계산치, 836,2816).

<114> $[C_{40}H_{50}N_5O_6Ce](NO_3)_2(H_2O)_3$에 대한 원소분석 :

<115> 계산치: C, 47.32, H, 5.56; N, 9.66.

<116> 실측치: C, 46.98; H, 5.23, N, 9.63.

<117> 프라세오디뮴(III) 착물(1_L)

<118> 메탄올 350ml중의 거대환 화합물(1_H)의 하이드로클로라이드 염(300mg, 0.407mmol), $Pr(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$(255mg, 0.611mmol), $TBANO_3$(305mg, 1.0mmol) 및 트리에틸아민(약 0.5ml)을 공기중에서 10시간 동안 가열하여 환류시킨다. 위에 개략적으로 기술한 일반 공정을 사용하여 후처리한 후, 착물 200mg을 수득한다(51%). 1_L의 경우: UV/vis: [(MeOH) λ_{max}, nm(log ε)]: 352(4.32), 416.5(4.69), 476.5(5.04), 689(4.07), 744.5(4.57); FAB MS, M^+: m/e 838; HRMS, M^+: m/e 837,2823

<119> ($C_{40}H_{50}N_5O_6{}^{141}$Pr에 대한 계산치, 837.2838).

<120> $[C_{40}H_{50}N_5O_6Pr](NO_3)_2(CH_3OH)(H_2O)$에 대한 원소분석:

<121> 계산치: C, 48.65; H, 5.58; N, 9.69

<122> 실측치: C, 48.75; H, 5.52; N, 9.71.

<123> 네오디뮴(III) 착물(1_M)

<124> 메탄올 350ml중의 거대환 화합물(1_H)의 하이드로클로라이드 염(300mg, 0.407mmol), $Nd(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$(267mg, 0.611mmol), $TBANO_3$(305mg, 1.0mmol) 및 트리에틸아민(약 0.5ml)을 공기하에서 12시간 동안 가열하여 환류시킨다. 위에 개략적으로 기술된 일반 공정을 사용하여 후처리한 후, 착물 125mg을 수득한다. 1_M의 경우 UV/vis: [(MeOH) λ_{max}, nm(log ε)]: 353.5(4.32), 416(4.68), 476(5.05), 688(4.06), 742.5(4.56); FAB MS, M^+: m/e 839; HRMS, M^+: m/e 838.2828($C_{40}H_{50}N_5O_6{}^{142}$Nd에 대한 계산치, 838,2838).

<125> $[C_{40}H_{50}N_5O_6Nd](NO_3)_2(CH_3OH)$에 대한 원소분석 :

<126> 계산치: C, 49.48; H, 5.47; N, 9.86,

<127> 실측치: C, 49.23; H, 5.49; N, 9.83.

<128> 사마륨(III) 착물(1_N)

<129> 메탄올 350ml중의 거대환 화합물(1_H)의 하이드로클로라이드 염(300mg, 0.407mmol), $Sm(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$(270mg, 0.611mmol), $TBANO_3$(305mg, 1.0mmol) 및 트리에틸아민(약 0.5ml)을 공기하에서 7시간 동안 가열하여 환류시킨다. 위에 개략적으로 기술한 일반 공정을 사용하여 후처리한 후, 암녹색 결정성 고체 183mg을 수득한다(46%). 본 물질은 X-선 회절될 수 있다. 1_N의 경우: UV/vis: [(MeOH) λ_{max}, nm(log ε)]: 354.5(4.36), 415.5(4.71), 475.5(5.09), 682(4.09), 741(4.61), FAB MS, M^+: m/e 849; HRMS, M^+: m/e 848.2957($C_{40}H_{50}N_5O_6{}^{152}$Sm에 대한 계산치, 848.2959).

<130> $[C_{40}H_{50}N_5O_6Sm](NO_3)_2(CH_3OH)$에 대한 원소분석 :

<131> 계산치: C, 48.99; H, 5.42; N, 9.76,

<132> 실측치: C, 48.79; H, 5.64; N, 9.43.

<133> 유로퓸(III) 착물(1_O)

<134> 메탄올 350ml중의 거대환 화합물(1_H)의 하이드로클로라이드 염(400mg,로 조심스럽게 층화시켜 X-선 특성 단일 결정을 수득한다. 층화된 용액을 실온의 암실에서 수일 동안 정치시킨다. 1_p의 경우: UV/vis: [(MeOH) λ_{max}, nm(log ε)]: 358(4.33), 416(4.72), 478(5.12), 678(4.03), 737.5(4.64); [(H_2O) λ_{max}, nm(log ε)]: 347(4.43), 419(4.75), 469(5.08), 740(4.60), IR(KBr, cm^{-1}, 주요 피크): υ 3299(OH), 1647(C=N), 1601 (C=N), 1507, 1456, 1437, 1385 (NO_3-), 1290, 1221, 1098, 1082. FAB MS, M^+: m/e 854; HRMS, M^+: m/e 854.2989($C_{40}H_{50}N_5O_6{}^{158}Gd$에 대한 계산치, 854.300).

<135> $[C_{40}H_{50}N_5O_6Gd](NO_3)_2(CH_3OH)(H_2O)$에 대한 원소분석:

<136> 계산치: C, 47.85; H, 5.49; N, 9.53.

<137> 실측치: C, 47.62; H, 5.37; N, 9.54.

<138> 주: 알루미나를 $NaNO_3$ 세척액으로 예비 처리하지 않은 경우, GO(III)는 2개의 니트레이트 카운터 음이온을 가지지 않는 대신, 하나의 니트레이트와 하나의 클로라이드 카운터 음이온을 가질 것이다:

<139> $[C_{40}H_{50}N_5O_6Gd](NO_3)Cl(H_2O)_2$에 대한 원소분석:

<140> 계산치: C, 48.65; H, 5.51; N, 8.51; Cl, 3.59.

<141> 실측치: C, 48.21; H, 5.58; N, 8.34; Cl, 3.62.

<142> 테르븀(III) 착물(1_Q)

<143> 메탄올 350ml중의 거대환 화합물(1_H)의 하이드로클로라이드 염 (300mg, 0.407mmol), $Tb(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$(276mg, 0.611mmol), $TBANO_3$(305mg, 1.64mmol) 및 트리에틸아민(약 0.5ml)을 공기하에서 12시간 동안 가열하여 환류시킨다. 위에 개략적으로 기술된 일반 공정을 사용하여 후처리한 후, 착물 152mg을 수득한다(38%). 1_Q의 경우: UV/vis: [(MeOH) λ_{max}, nm(log ε)]: 353(4.35), 414(4.71), 474.5(5.09), 680(4.08), 737(4.62) ; FAB MS, M^+: m/e 856; HRMS, M^+: m/e 855.3017($C_{40}H_{50}N_5O_6{}^{159}Tb$에 대한 계산치, 855.3015).

<144> $[C_{40}H_{50}N_5O_6Td](NO_3)_2(CH_3OH)(H_2O)$에 대한 원소분석:

<145> 계산치: C, 47.80; H, 5.48; N, 9.52.

<146> 실측치: C, 48.11; H, 5.28; N, 9.75.

<147> 디스프로슘(III) 착물(1_R)

<148> 메탄올 350ml중의 거대환 화합물(1_H)의 하이드로클로라이드 염(300mg, 0.407mmol), $Dy(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$(266mg, 0.611mmol), $TBANO_3$(305mg, 1.64mmol) 및 트리에틸아민(약 0.5ml)을 공기하에서 5시간 동안 가열하여 환류시킨다. 위에 개략적으로 기술한 일반 공정을 사용하여 후처리한 후, 착물 250mg을 수득한다(62%). 1_R의 경우: UV/vis: [(MeOH) λ_{max}, nm(log ε)]: 354(4.32), 414(4.68), 475(5.07), 677.5(4.03), 735.5(4.60); FAB MS, $(M+H)^+$: m/e 861; HRMS, M^+: m/e 850.3048($C_{40}H_{50}N_5O_6{}^{164}Dy$에 대한 계산치, 860.3053).

<149> $[C_{40}H_{50}N_5O_6Dy](NO_3)_2(H_2O)$에 대한 원소분석:

<150> 계산치: C, 47.89; H, 5.23; N, 9.78.

<151> 실측치: C, 47.97; H, 5.22; N, 9.72.

<152> 홀뮴(III) 착물(1_S)

<153> 메탄올 350ml중의 거대환 화합물(1_H)의 하이드로클로라이드 염(300mg, 0.407mmol), $Ho(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$(269mg, 0.611mmol), $TBANO_3$(305mg, 1.64mmol) 및 트리에틸아민(약 0.5ml)을 공기하에서 12시간 동안 가열하여 환류시킨다. 위에 개략적으로 기술한 일반 공정을 사용하여 후처리한 후, 착물 220mg을 수득한다(55%), 1_S의 경우: UV/vis: [(MeOH) λ_{max}, nm(log ε)]: 354(4.35), 414(4.72), 475.5(5.12), 677(4.08), 734(4.65); FAB MS, M^+: m/e 862; HRMS, M^+: m/e 861.3044($C_{40}H_{50}N_5O_6{}^{165}Ho$에 대한 계산치, 861.3064).

<154> $[C_{40}H_{50}N_5O_6Ho](NO_3)_2(CH_3OH)(H_2O)$에 대한 원소분석:

<155> 계산치: C, 47.52; H, 5.45; N, 9.47.

<156> 실측치: C, 47.55; H, 5.26; N, 9.30.

<157> 에르븀(III) 착물(1_T)

<158> 메탄올 350ml중의 거대환 화합물(1_H)의 하이드로클로라이드 염(300mg, 0.407mmol), $Er(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$(270mg, 0.611mmol), $TBANO_3$(305mg, 1.64mmol) 및 트리에틸아민(약 1.5ml)을 공기하에서 12시간 동안

가열하여 환류시킨다. 위에 개략적으로 기술한 일반 공정을 사용하여 후처리한 후, 착물 143mg을 수득한다(36%). 1_T의 경우: UV/vis [(MeOH) λ_{max}, nm(log ε)]: 355.5(4.36), 414.5(4.72), 477(5.13), 672(4.08), 732(4.66); FAB MS, M^+: m/e 863. HRMS, M^+: m/e 865.3110($C_{40}H_{50}N_5O_6{}^{166}Er$에 대한 계산치, 862.3064).

<159> $[C_{40}H_{50}N_5O_6Er](NO_3)_2(CH_3OH)$에 대한 원소분석:

<160> 계산치: C, 48.32; H, 5.34; N, 9.63.

<161> 실측치: C, 48.14; H, 5.14; N, 9.55

<162> 툴륨(III) 착물(1_U)

<163> 메탄올 350ml중의 거대환 화합물(1_H)의 하이드로클로라이드 염(300mg, 0.407mmol), $Tm(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$(274mg, 0.611mmol), $TBANO_3$(305mg, 1.64mmol) 및 트리에틸아민(약 0.5ml)을 공기하에서 22시간 동안 가열하여 환류시킨다. 위에 개략적으로 기술한 일반 공정을 사용하여 후처리한 후, 착물 150mg을 수득한다(37%). 본 착물은 이의 메탄올/클로로포름 용액중에서의 낮은 용해도에 기인하여 정제하기가 더욱 어려우며, 따라서 수율 또한 낮아진다. 1_U의 경우: UV/vis. [(MeOH) λ_{max}, nm(log ε)]: 355.5(4.36), 414.5(4.72), 477(5.13), 672(4.08), 732(4.66); FAB MS, M^+: m/e 566; HRMS, M^+: m/e 865.3110($C_{40}H_{50}N_5O_6{}^{169}Tm$에 대한 계산치, 865.3103).

<164> $[C_{40}H_{50}N_5O_6Tm](NO_3)_2(H_2O)_2$에 대한 원소분석:

<165> 계산치: C, 46.82; H, 5.31, N, 9.56.

<166> 실측치: C, 46.85; H, 5.23; N, 9.38.

<167> 이터븀(III) 착물(1_V)

<168> 메탄올 350ml중의 거대환 화합물(1_H)의 하이드로클로라이드 염(300mg, 0.407mmol), $Yb(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$(274mg, 0.611mmol), $TBANO_3$(305mg, 1.64mmol) 및 트리에틸아민(약 0.5ml)을 공기하에서 24시간 동안 가열하여 환류시킨다. 위에 개략적으로 기술된 일반 공정을 사용하여 후처리한 후, 착물 220mg을 수득한다(54%). 1_V의 경우: FAB MS, M^+: m/e 870; HRMS, M^+: m/e 870.3132($C_{40}H_{50}N_5O_6{}^{174}Yb$에 대한 계산치, 870.3149).

<169> 루테튬(III) 착물(1_W)

<170> 메탄올 350ml중의 거대환 화합물(1_H)의 하이드로클로라이드 염(300mg, 0.407mmol), $Lu(NO_3)_2 \cdot H_2O$(220mg, 0.611mmol), $TBANO_3$(305mg, 1.64mmol) 및 트리에틸아민(약 0.5ml)을 공기하에서 24시간 동안 가열하여 환류시킨다. 위에 개략적으로 기술한 일반 공정을 사용하여 후처리한 후, 착물 150mg을 수득한다(37%). 본 착물은 메탄올/클로로포름 용액중에서 매우 낮은 용해도를 나타낸다. 거의 절반의 생성물이 정제하는 동안 컬럼상에 잔류한다. 1_W의 경우: FAB MS, M^+: m/e 872; HRMS, M^+: m/e 871.3154($C_{40}H_{50}N_5O_6{}^{175}Lu$에 대한 계산치, 871.3169).

<171> 1_G와 1_F 사이의 산-촉매화된 쉬프-염기 축합반응은 이른바 "Sp^3" 비방향족 거대환 화합물(1_H)을 정량적 수율로 생성시킨다. 거대환 화합물(1_H)은 매우 안정하여, 냉동기에 저장하는 경우에도 수개월에 걸쳐 약간만 분해된다. 란타나이드(III) 금속 염 1.5당량, 트리에틸아민 및 공기의 존재하에 비등 메탄올속에서 1_H를 산화 및 금속화시키면 3 내지 24시간의 반응시간(UV-Vis로 판단함) 이내에 진녹색 금속 착물이 생성된다. 모든 란타나이드(III)[La-Lu, Pm은 제외함] 텍사피린 착물(1_J-1_W)은 34 내지 75% 범위의 최적화되지 않은 수율로 분리된다. 모든 신규한 화합물에 대해 만족스러운 스펙트럼 분석 및 질량 분광분석 데이타가 수득된다. 각 착물을 MeOH/$CHCl_3$에 용해시킨 다음 디에틸 에테르로 층화시킴으로써 각각 Eu(III) 및 Gd(III) 착물(1_Q 및 1_P)의 X-선 회절 분석에 적합한 단일 결정을 수득한다.

<172> 실시예 2

<173> 유로퓸(III) T2B1 TXP-올리고 접합체의 합성

<174> 본 실시예는 상보성 핵산의 에스테르 결합의 부위-지시된 가수분해에 유용한 텍사피린 금속 착물-올리고뉴클레오티드 접합체의 합성법을 제공한다(제2A도 및 제2B도 참조.

<175> 4-아미노-1-[1-(에틸옥시)아세틸-2-옥시]-3-니트로벤젠(2_B, n=1)

<176> 탄산칼륨(14.0g, 101mmol) 및 4-아미노-3-니트로페놀(2_A)(10.0g, 64.9mmol)을 무수 아세토니트릴 150ml에 현탁시킨다. 에틸-2-요오도아세테이트(10ml, 84.5mmol)(또는 n이 3인 경우에는 에틸 요오도부티레이트를 사용할 수 있다)를 주사기를 통해 가하고, 현탁액을 주위 온도에서 약 21시간 동안 교반한다. 클로로포름(약 375ml)을 가하고, 현탁액을 분리 깔때기에 옮기는데 사용하며, 이때 물로 세척한다(2X 약 100ml). 수세척물을 다시 $CHCl_3$(약 100ml)로 세척한 다음 합한 $CHCl_3$추출물을 물(약 100ml)로 세척한다. 회전 증발기상에서 용매를 제거하고, 잔사를 $CHCl_3$(약 500ml)에 재용해시킨 다음 헥산(1.5ℓ) 속에서 침전시킨다. 2일 동안 정치시킨 후, 조악한 프릿팅(fritting)된 깔때기를 사용하여 침전물을 여과한 다음 진

공 건조시켜 화합물(2_B, n=1) 14.67g을 수득한다(94.1%). TLC: Rf=0.43, $CHCl_3$.

<177> 4-아미노-1-[1-(하이드록시)아세틸-2-옥시]-3-니트로벤젠(2_C, n=1)

<178> 4-아미노-1-[1-(에틸옥시)아세틸-2-옥시]-3-니트로벤젠(2_B, n=1) (10.00g, 37.3mmol)을 테트라하이드로푸란(100ml)에 용해시키고, 수성 수산화나트륨(1M 용액, 50ml)을 가한 다음 용액을 주위 온도에서 약 21시간 동안 교반한다. 회전 증발기상에서 테트라하이드로푸란을 제거하고, 물(100ml)을 가한다. 용액을 $CHCl_3$(약 200ml)로 세척한 다음 염산(1M 용액, 50ml)을 가하여 중화시킨다. 수분 동안 정치시킨, 생성된 침전물을 여과하여 물로 세척한 다음, 진공 건조시켜 화합물(2_C, n=1) 8.913g을 수득한다(99.5%). TLC: Rf=0.65, 10% 메탄올/$CHCl_3$.

<179> 16-[1-하이드록시)아세틸-2-옥시]-9,24-비스(3-하이드록시프로필)-4,5-디에틸-10,23-디메틸-13,20,25,26,27-펜타아자펜타-사이클로[20.2.1.$1^{3,6}$.$1^{8,11}$.$0^{14,19}$]헵타코사-3,5,8,10,12,14(19),15,17,20,22,24-운데카엔(2_F, n=1)

<180> 4-아미노-1-[1-(하이드록시)아세틸-2-옥시]-3-니트로벤젠(2_C, n=1) (1.800g, 8.49mmol)을 1ℓ 들이 플라스크속에서 메탄올(100ml)에 용해시킨다. 탄소상 팔라듐(10%, 180mg)을 가하고, 플라스크의 내부 대기를 주위압에서 수소로 대체시킨다. 약 3시간후, 회색 침전물이 생성되며, 상층액은 투명하다. 메탄올을 산소에 노출되지 않도록 주의하면서 진공중에서 제거한 다음, 화합물을 진공중에서 밤새 건조시킨다. 이소프로필 알콜(500ml) 및 HCl(12M, 400㎕)을 가하고, 현탁액을 약 15분동안 교반시킨다. 2,5-비스[(3-하이드록시프로필-5-포르밀-4-메틸피롤-2-일) 메틸]-3,4-디에틸피롤(2_D, n=1) (4.084g, 8.49mmol)을 가한 다음 반응물을 아르곤하에 실온에서 3시간 동안 교반한다. 다시 염산(12M, 400㎕)을 가하고, 반응물을 추가로 3.5시간 동안 교반한다. 생성된 적색 용액을 셀라이트를 통해 여과한 다음, 여액이 무색으로 될 때까지 필터케이크를 이소프로필알콜로 세척한다. 회전 증발기를 사용하여 용매를 용적 약 50ml로 감소시키며, 이때 용액을 신속하게 교반되는 Et_2O(약 700ml)속에서 침전시킨다. 진공중에서 여과하여 건조시키면 화합물(2_E, n=1)가 적색 고체(5.550g, 98.4%)로서 수득된다. TLC: Rf=0.69, 20% 메탄올/$CHCl_3$ (줄무늬, I_2를 갖는 폴레이트상에서 녹색으로 변한다).

<181> 16-[1-(하이드록시)아세틸-2-옥시]-9,24-비스(3-하이드록시프로필)-4,5-디에틸-10,23-디메틸-13,20,25,26,27-펜타아자펜타사이클로[20.2.1.$1^{3,6}$.$1^{8,11}$.$0^{14,19}$]헵타코사-1,3,5,7,9,11(27),12,14(19),15,17,20,22(25),23-트리데카엔의 유로퓸(III) 착물(2_F, n=1)

<182> 메탄올 150ml중의 거대환 화합물인 16-[1-(하이드록시)아세틸-2-옥시]-9,24-비스(3-하이드록시프로필)-4,5-디에틸-10,23-디메틸-13,20,25,26,27-펜타아자펜타사이클로[20.2.1.$1^{3,6}$.$1^{8,11}$.$0^{14,19}$]헵타코사-3,5,8,10,12,14(19),15,17,20,22,24-운데카엔 하이드로클로라이드(2_E, n=1)의 양성자화된 형태(500mg, 753μmol), 유로퓸(III) 아세테이트 5수화물(334mg, 797μ mol) 및 트리에틸아민(1.33ml, 8.0mmol)을 공기하에서 5.5시간 동안 가열하여 환류시킨다. 반응물을 실온으로 냉각시킨 다음 -20℃에서 밤새 보관한다. 회전 증발기상에서 용매를 제거하고, 아세톤(200ml)을 가한 다음 현탁액을 회전 증발기상에서 2시간 동안 교반한다. 현탁액을 여과하고, 침전물을 단시간 진공 건조시킨 다음, 메탄올(약 250ml) 및 물(25ml) 속에서 용액을 형성시킨다. HCl(1M)을 사용하여 pH를 4.0으로 조절하고, HCl-세척된 제올라이트 LZY54(약 5g)를 가한 다음 현탁액을 회전 증발기상에서 약 6시간 동안 교반한다. 암버라이트(Amberlite™) IRA-900 이온 교환 수지(NaF 처리됨, 약 5g)를 가하고, 현탁액을 추가로 1시간 동안 교반한다. 현탁액을 여과하고, 수지를 메탄올(약 100ml)로 세척한 다음 HCl(1M)을 사용하여 여액의 pH를 4.0으로 조절한다. 에탄올(무수)을 사용하여 미량의 물를 제거하기 위해 회전 증발기상에서 용매를 제거한다. 진공 건조시킨 후, 화합물을 메탄올(25ml)에 용해시킨 다음, 급속하게 교반되는 Et_2O(300ml)속에서 침전시킨다. 여과하여 진공 건조시킨 후, 화합물(2_F, n=1)을 올리브색 침전물(303mg, 48.4%)로서 수득한다. 메탄올(25ml)에 용해된 2_F(n=1) 50mg을 아세트산-세척된 제올라이트, 이어서 아세트산-세척된 암버라이트™으로 약 1시간 동안 처리하여 분석 샘플을 제조한다. 메탄올을 최소 용적으로 감소시킨 후, 용액을 급속하게 교반되는 Et_2O(70ml)속에서 침전시키고, 여과한 다음 진공 건조시킨다.

<183> $(C_{36}H_{39}N_5O_5Eu)(CH_3CO_2)(H_2O)$에 대한 원소분석:

<184> 계산치: C, 53.66; H, 5.21, N, 8.23

<185> 실측치: C, 53.39, H, 5.50, N, 8.25.

<186> HR FAB 질량 스펙트럼, M^+: $C_{36}H_{40}N_5O_5Eu$에 대한 계산치: 773.2228.

<187> 실측치: 773.2239. UV/vis (MeOH) [λ_{max}, nm(log ε)]: 330.0(4.47), 464.0(4.72), 708.0(3.90), 762.0(4.35).

<188> 올리고데옥시뉴클레오티드아민($2_G(9_F)$)과 유로퓸(III) 착물(2_F, n=1)의 합성 후 변형

<189> 16-[1-(하이드록시)아세틸-2-옥시]-9,24-비스(3-하이드록시프로필)-4,5-디에틸-10,23-디메틸-13,20,25,26,27-펜타아자펜타사이클로[20.2.1.$1^{3,6}$.$1^{8,11}$.$0^{14,19}$]헵타코사-1,3,5,7,9,11(27),12,14(19),15,17,20,22(25),23-트리데카엔의 유로퓸(III) 착물(2_F, n=1) (25mg, 30.1μmol) 및 N-하이드록시석신이미드(5mg, 43μ mol)를 함께 진공중에서 밤새 건조시킨다. 화합물을 디메틸포름아미드(무수, 500㎕)에 용해시킨 다음, 디사이클로헥실-카보디이미드(10mg, 4 mol)를 가한다. 생성된

용액을 광선으로부터 보호시키면서 아르곤하에서 8시간 동안 교반시킨 후, 분취액 110㎕를 1.6ml들이 에펜도르프(eppendorf) 튜브속의 0.4M 중탄산나트륨 완충액 350㎕ 용적 중의 올리고데옥시뉴클레오티드(2_G)(87nmol) 용액에 가한다. 단시간 와동시킨 후, 용액을 광 보호하에 23시간 동안 정치시킨다. 형성된 현탁액을 0.45μm 나일론 미세여과 튜브를 통해 여과한 다음, 에펜도르프 튜브를 멸균수 250㎕ 세척한다. 합한 여액을 2개의 에펜도르프 튜브에 나누어 넣은 다음, 각 튜브에 글리코겐(20mg/ml, 2㎕) 및 아세트산나트륨(3M, pH 5.4, 30㎕)을 가한다. 와동시킨 후 에탄올(무수, 1ml)을 각 튜브에 가하여 DNA를 침전시킨다. 원심분리한 후, 에탄올을 경사분리하고, DNA를 추가의 에탄올 분취액 1ml로 세척한 다음 공기 건조시킨다. 펠렛을 50% 포름아미드 겔 부하 완충액(20㎕)에 용해시키고, 90℃에서 약 2분 동안 변성시킨 다음 20% 변성 폴리아크릴아미드 겔에 부하시킨다. 접합체(2_H, n=1) (9_D, 10_A)에 상응하는 황색 밴드를 겔로부터 절단하여 분쇄한 다음, 1X TBE 완충액(약 7ml)에 1 내지 2일 동안 침지시킨다. 현탁액을 나일론 여과기(0.45μm)를 통해 여과한 다음, 셉-파크(Sep-pak™) 역상 카트리지를 사용하여 탈염시킨다. 40% 아세토니트릴을 사용하여 카트리지로부터 접합체를 용출시키고, 밤새 동결 건조시킨 다음 1mM HEPES 완충액(pH 7.0, 500㎕)에 용해시킨다 UV/vis 분광 분석법을 사용하여 측정한 용액 농도(계산된 ε^{260}=187,110)는 접합체(2_H, n=1) (9_D, 10_A)중에서 21.6μM(12%)이다.

<190> 실시예 3

<191> 아민, 티올 또는 하이드록시 결합된 올리고뉴클레오티드를 사용한 텍사피린 금속착물의 합성(제3A도 내지 제3C도 참조)

<192> 아미드, 에테르 및 티오에테르는 올리고뉴클레오티드와 같은 부위-지시된 분자를 텍사피린 금속착물에 커플링시키는데 사용될 수 있는 대표적인 결합이다(제3A도 내지 제3C도 참조), 5'-말단, 3'-말단, 또는 내부적으로 당 또는 염기 잔기에서 아민에 의해 작용성화된 올리고뉴클레오티드 또는 기타의 부위-지시된 분자를 텍사피린 착물의 활성하 카복실산 에스테르 유도체로 합성후에 변형시킨다. 다르게는, 하나 이상의 티오포스페이트 또는 티올 그룹을 함유하는 올리고뉴클레오티드 동족체를 텍사피린 착물의 알킬 할라이드 유도체로 황 원자(들)에서 선택적으로 알킬화시킨다. 올리고데옥시뉴클레오티드-착물 접합체를 표적화된 RNA 포스포에스테르 주쇄와 텍사피린-결합된 란타나이드 양이온(들) 사이에 최적의 촉매적 상호작용이 제공되도록 설계한다.

<193> 올리고뉴클레오티드를 사용하여 실질적 상보성 서열을 함유하는 상보성 뉴클레오티드 또는 올리고- 또는 폴리-뉴클레오티드를 포함하는 화합물을 선택적으로 결합시킨다. 본원에서 사용된 "실질적 상보성 서열"은 뉴클레오티드가 통상 상보성 뉴클레오티드와 염기쌍을 이루고 있으며 잘못 짝지워진 염기쌍이 거의 없는 것을 의미한다.

<194> 올리고뉴클레오티드는 예를 들어, 블롯(blot) 분석에서 하이브리드화 프로브로서, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 증폭용 프라이머(primer)로서 및 부위-특이적 돌연변이원에 대한 프라이머로서 사용된다. 올리고뉴클레오티드-유도된 생성물은 유전 질환의 검출 및 후천성 면역 결핍증(AIDS)의 유발제인 프로바이러스성 HIV에 사용된다. 당해 생성물은 또한, 예를 들어, 유전자 치료 및 안티센스 수용력에 효능있는 화학치료제로서 고려된다.

<195> 올리고뉴클레오티드는 상보성 핵산의 뉴클레오티드 약 9개 이상을 결합시키기에 충분한 정도로 클 수 있다.

<196> 다양한 길이와 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 제조하는 일반적 방법은 문헌[참조: Caracciolo et al. (1989). Science, 245: 1107]에 기술되어 있다.

<197> 일반적으로, 통상적인 5'-3' 결합을 함유하는 올리고뉴클레오티드를 합성하는 데에는 중간체 포스포아미디트를 포함하는 고체 상-기본 접근법과 중간체 포스포네이트 결합을 포함하는 고체 상-기본 접근법의 2가지가 통상 사용된다. 포스포아미디트 합성에서는, 커플링된 위치에 시아노에틸포스포르아미데이트를 갖는 적합하게 보호된 뉴클레오티드를 고체 지지체로 유도화된 성장 뉴클레오티드 쇄의 유리하이드록실과 반응시킨다. 당해 반응은 각 중간 단계에서 결합이 시아노에틸포스페이트로 산화되어야 하는 시아노에틸포스파이트를 제공하는데, 이는 환원된 형태가 산에 불안정하기 때문이다.

<198> 포스포네이트계 합성은 산에 안정한 포스포네이트 에스테르 결합을 수득하기에 적합한 활성화제의 존재하에서 커플링될 위치에 포스포네이트 부분을 함유하는 적합하게 보호된 뉴클레오티드를 유리 하이드록실 그룹을 갖는 고체상-유도화된 뉴클레오티드와 반응시켜 수행할 수 있다. 따라서, 포스페이트 또는 티오포스페이트로의 산화는 올리고뉴클레오티드의 합성중 또는 올리고뉴클레오티드의 합성이 완료된 후 임의의 시점에서 수행할 수 있다.

<199> 포스포네이트를 사염화탄소의 존재하에 1급 또는 2급 아민과 반응시켜 포스포르아미데이트 유도체로 전환시킬 수 있다. 2가지 접근법을 총칭적으로 나타내기 위해, 도입 뉴클레오티드를 "활성화" 포스파이트/포스페이트 그룹을 갖는 것으로서 간주한다. 통상적으로 사용되는 고체상 합성 기술을 사용하는 것 이외에도, 트리에스테르 합성과 같은 액상 방법을 사용하여 합성할 수도 있다. 당해 방법은 실행가능하나, 일반적으로 임의의 상당한 길이의 올리고뉴클레오티드에 대해서는 덜 효과적이다.

<200> 생체내 가수분해에 내성인 바람직한 올리고뉴클레오티드는 각 염기에 포스포로티오에이트 치환을 함유할 수 있다[참조: J. Org. Chem., 55:4693-4699, (1990) 및 Agrawal, (1990)] 올리고데옥시뉴클레오티드 또는 이들의 포스포로티오에이트 동족체는 어플라이드 바이오시스템 380B DNA 합성기(Applied Biosystem 380B DNA synthesizer)(제조회사: Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)를 사용하여 합성할 수 있다.

<201> 실시예 4

<202> 디포르밀 모노산 트리피란(4_H) 및 올리고뉴클레오티드 접합체(4_J)의 합성(제4A도 내지 제4D도 참조)

<203> 디메틸에스테르 디벤질에스테르 디피로메탄(4_B)

<204> 자기 교반봉, 온도계, 가열 맨틀 및 아르곤 라인에 부착된 환류 콘덴서가 장착되어 있는 1,000ml들이 3구 환저 플라스크에 메틸에스테르 아세톡시피롤(4_A)(100.00g, 267.8mmol), 200도의 에틸 알콜(580ml) 및 탈이온수(30ml)를 충전시킨다. 반응 혼합물을 가열한 다음, 생성된 용액이 환류하기 시작하면, 12N 수성염산(22ml)을 즉시 모두 가한다. 플라스크 내용물을 2시간 동안 환류하에 교반한다. 가열 환경을 0℃욕으로 대체하고, 생성된 진한 혼합물을 2시간 동안 교반한 후 냉동기속에 밤새 넣어 둔다.

<205> 혼합물을 매질 프릿팅된 유리 깔때기상에서 여과하고, 고무 댐(dam)으로 압축시킨 다음, 여액이 무색으로 될 때까지 헥산으로 세척한다. 수집한 산을 30℃에서 밤새 고진공 건조시켜 담황색 고체(65.85g, 214.3mmol, 80.0% 수율)를 수득한다.

<206> 디메틸에스테르 디산(diacid) 디피로메탄(4_C)

<207> 모든 유리 제품을 오븐 건조시킨다. 자기 교반봉, 수소 라인 및 진공 라인이 장착된 2,000ml들이 3구 환저 플라스크에 디메틸에스테르 디벤질에스테르 디피로메탄(4_B)(33.07g, 53.80mmol), 무수 테트라하이드로푸란(1,500ml), 및 목탄상 10% 팔라듐(3.15g)을 충전시킨다. 플라스크 대기를 수차례 퍼징한 후 플라스크를 무수 수소 가스로 충전시킨 다음, 반응 현탁액을 수소 대기하에서 24시간 동안 교반한다.

<208> 감압하에서 반응 현탁액의 용매를 제거한다. 생성된 고체를 고진공하에서 밤새 건조시킨다.

<209> 무수 고체를 포화 수성 중탄산나트륨(1,500ml) 및 에틸 알콜(200ml)의 혼합물에 현탁시킨 다음 이의 비점에서 5분 동안 교반한다. 뜨거운 현탁액을 셀라이트를 통해 여과한다. 여액을 실온으로 냉각시킨 다음, 12N 수성 염산을 사용하여 6으로 산성화시킨다. 생성된 혼합물을 매질 프릿팅된 유리상에서 여과한다. 수집한 고체를 고진공하에서 일정한 중량(21.63g, 49.78mmol, 92.5% 수율)으로 건조시킨다.

<210> 메틸에스테르 디벤질에스테르 트리피란(4_E)

<211> 가열 맨틀, 자기 교반봉, 온도계 및 아르곤 라인에 부착된 환류 콘덴서가 장착된 2,000ml들이 3구 환저 플라스크에 디메틸에스테르 디산 디피로메탄(4_C)(21.00g, 48.33mmol), 에틸 아세톡시 피롤(4_D)(30.50g), p-톨루엔설폰산 1수화물(1.94g), 트리플루오로아세트산(39ml) 및 메틸 알콜(1,350ml)을 충전시킨다. 플라스크 내용물을 2시간 동안 환류하에 가열하고 교반시킨다. 가열 환경을 0℃로 바꾸고, 생성 혼합물을 냉동기 속에 밤새 넣어두기 전에 30분 동안 계속 교반시킨다.

<212> 차가운 혼합물을 매질 프릿팅된 유리상에서 여과한다. 수집한 고체를 헥산으로 세척한 다음, 고진공하에서 밤새 건조시킨다(13.05g, 19.25mmol, 39.8% 수율).

<213> 디메틸에스테르 디산 트리피란(4_F)

<214> 모든 유리 제품을 오븐 건조시킨다. 자기 교반봉, 수소 라인 및 진공 라인이 장착된 500ml들이 3구 환저 플라스크에 메틸에스테르 디벤질에스테르 트리피란(4_E)(12.97g, 19.13mmol), 무수 테트라하이드로푸란(365ml) 및 목탄상 10% 팔라듐(1.13g)을 충전시킨다. 플라스크 대기를 수차례 퍼징한 후 플라스크에 무수 수소가스를 충전시킨 다음, 반응 현탁액을 수소 대기하에 실온에서 24시간 동안 교반한다.

<215> 반응 현탁액을 셀라이트를 통해 여과한다. 감압하에서 여액의 용매를 제거하여 포움을 수득한 다음, 이를 고진공하에서 밤새 건조시킨다(10.94g, 21.99mmol, 87.0% 순도).

<216> 모노산 트리피란(4_H)

<217> 모든 유리 제품을 오븐 건조시킨다. 자기 교반기, 온도계, 0℃ 욕 및 아르곤 라인에 고정된 부가 깔때기가 장착된 500ml들이 3구 환저 플라스크에 메틸에스테르 디산 트리피란(4_F)(10.20g, 17.83mmol)을 충전시킨다. 플라스크 내용물을 5℃ 이하로 유지시키면서 45분에 걸쳐 트리플루오로아세트산(32.5ml)을 부가 깔때기로부터 반응 플라스크속으로 적가한다. 생성된 반응 용액을 0℃에서 15분 동안 교반한 다음, 다시 20℃에서 3시간 동안 교반한다. 드라이 아이스/에틸렌 글리콜 욕을 사용하여 플라스크 내용물을 -25℃ 이하로 유지시키면서 20분에 걸쳐 트리에틸오르토포르메이트(32.5ml)를 부가 깔때기로부터 플라스크속으로 적가한다. 반응 용액을 -25℃에서 1시간 동안 교반한 다음 0℃ 욕을 설치한다. 탈이온수(32.5ml)를 플라스크 내용물을 10℃ 이하로 유지시키면서 부가 깔때기로부터 반응 플라스크속으로 적가한다. 생성된 2상 혼합물을 실온에서 75분 동안 교반한 다음 1-부탄올(200ml)을 가한다. 감압하에서 용매를 제거한다. 생성된 어두운색 오일을 고진공하에서 밤새 건조시켜 검은색 고체(11.64g)을 수득한다.

<218> 온도계, 가열 맨틀, 자기 교반봉, 및 아르곤 라인에 부착된 환류 콘덴서가 장착된 2,000ml들이 3구 환저 플라스크에 조악한 메틸에스테르 디포르밀 트리피란(4_G)(11.64g), 메틸 일콜(900ml), 탈이온수(60ml) 및 수산화리튬 1수화물(4.7g)을 충전시킨다. 플라스크 내용물을 가열하고, 환류하에 2시간 동안 교반하며, 실온으로 냉각시킨 다음 탈이온수(250ml)를 가하고, 12N 수성 HCl을 사용하여 pH 5로 산성화시킨 후 0℃에서 1시간 동안 교반한다. 생성된 혼합물을 매질 프릿팅된 유리깔때기상에서 여과한다. 수집한 고체를 고진공하에서 일정한 중량으로 건조시킨 후, 컬럼 크로마토그래피하여 정제한다(실리카 겔, CH_2Cl_2 중의 MeOH, 0 내지 10%; 3.64g, 8.06mmol, 45.2% 수율).

<219> 모노산 트리피란(4_H)을 유도체화된 오르토-페닐렌 디아민, 예를 들어, 1_G와 축합시켜 비방향족 전구체를 생성시킨 다음, 방향족 금속 착물, 예를 들어, 4_I로 산화시킨다. 올리고뉴클레오티드 아민을 카복실산 유도체화된 텍사피린(4_I)과 반응시켜 분자의 B 부분보다는 T 부분상에 부위-지시된 분자를 갖는 접합체(4_J)를 형성할 수 있다.

<220> 실시예 5

<221> 란타나이드(III) T2B2 텍사피린에 의한 모노에스테르의 가수분해

<222> 본 실시예는 모에스테르의 가수분해, 특히 UpU, cUMP, 3'-UMP 및 2'-UMP의 가수분해에 텍사피린 금속 착물을 사용하는 경우의 본 발명의 유용성을 제공한다.

<223> 시토신, 우리딘, 우리딘-2' 및 3'-모노포스페이트 이나트륨염(2'-UMP 및 3'-UMP), 우리딘-2',3'-사이클릭모노포스페이트 나트륨염(cUMP), 및 우리딜릴(3'→5') 우리딘 암모늄염(UpU)은 시그마사(Sigma, St. Louis, MO)로부터 구입하여 추가의 정제없이 사용한다. 란타나이드 텍사피린은 상기 실시예에서와 같이 제조한다. 달리 언급하지 않는한, 모든 용액은 pH 7.0으로 조절된 밀리(Milli)-Q 정제수중의 5.0mM N-(2-하이드록시에틸)피페라진-N'-에탄설폰산(HEPES)의 저장 용액으로부터 제조한다. 용액을 저장하고, 120℃의 오토클레이브속에서 20분 동안 가열함으로써 추가로 멸균시킨 RNAse 유리 플라스틱 바이알 속에서 반응을 수행한다. 용액 제조 및 반응 샘플링 동안 계속 글러브(glove)를 씌워놓는다. 모든 동역학적 실행은 수욕속에서 37℃로 온도조절한다.

<224> 254nm 모니터링하는 워터즈(Waters) 모델 440 흡수 검출 장착된 워터즈 501상에서 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 수행한다. YMC 인코포레이티드(USA)의 ODS-AQ 컬럼(150mm × 4.6mm I.D.)을 사용한다. 유속 1.0ml/분의 이소크래틱(isocratic) 구배(1% 메탄올을 사용하여 pH 5.5으로 조절한 NaH_2PO_4 10mM)를 사용하여 만족스러운 분리를 수행한다. 벡크만(Beckman) DU-7 분광계를 사용하여 EuB2T2 txp의 농도를 확인한다.

<225> $Eu(NO_3)_3$. 대조 실험으로서, UpU(2.94mM) 100μl, $Eu(NO_3)_3$ (3.5μm) 25μl 및 내부 표준물로서의 시토신(0.423mM) 100μl를 5.0mM HEPES 용액 375μl으로 희석시킴으로써 반응 용액을 제조한다. E272 txp에서와 같이 반응을 수행한다. 대조 반응의 유사-0차 속도 상수(k)는 (2.2 ± 0.8) × 10^{-4}mM/h로 측정되었다.

<226> EUB2T2 txp. 전형적인 동역학 실험으로서. UpU (2.94mM) 100μl, EuB2T2 txp(7.8mM) 50μl 및 내부 표준물로서의 시토신(0.423M) 100μl를 5.0mM HEPES 용액 350μl로 희석시킴으로써 반응 용액을 제조한다. HPLC 분석이 가능해질 때까지 동결된 분취액 15μl를 제거함으로써 UpU 가수분해 속도를 모니터링한다. 모든 샘플을 HPLC 상에 주입시키기 전에 미세여과(0.2μm)한다. 모든 실행은 3회 수행한다. 금속 착물을 함유하지 않는 동일한 대조군으로부터 측정한 백그라운드는 무시 가능한 정도이다. 반응의 유사-0차 속도 상수(k)는 37℃ 및 pH 7.0에서 (9.1±1.6) × 10^{-4}mM/h로 측정되었다.

<227> 수용성 EuB2T2 텍사피린의 니트레이트 염에 의한 리보디뉴클레오티드의 가수분해에 대한 유사-0차 속도 상수를 조사한다. 조사 결과, $Eu(B2T2\ txph)^{2+}$의 0.15mM 수용액은 우리딜릴 (3'→ 5') 우리딘 (UpU) (0.49mM)을 37℃ 및 pH 7.0에서 (9.1±1.6) × 10^{-4}mM/h의 유사-0차 속도 상수로 가수분해시키는 것으로 나타났다. 금속 착물의 부재하에서는 HPLC에 의해 RNA 분해의 어떠한 증거도 찾아내지 못했다. HPLC에 이어 우리딘 형성을 모니터링하는 반응을 수행한다. 우리딘-2'-모노포스페이트, 우리딘-3'-모노포스페이트 및 우리딘-2':3'-사이클로모노포스페이트(cUMP)도 또한 HPLC에 의해 관측되며, 이는 분해 반응의 메카니즘이 산화성 메카니즘이라기 보다는 가수분해성 메카니즘임을 나타내는 것이다. 우리딘-2':3'-사이클로모노포스페이트는 안정한 상태 농도에 도달하는데, 이는 텍사피린 착물이 cUMP를 또한 가수분해시킴을 의미한다. 동일한 조전하에서, $Eu(NO_3)_3$의 0.15mM 수용액의 유사-0차 속도 상수는 (2.2±0.35)×10^{-4} mM/h이다. 따라서, 극미량의 유리 금속 이온은 텍사피린 금속 착물의 존재하에서 관찰된 가수분해에 기인할 수 없다. 이러한 조건하에서, HAM의 Eu(III) 착물은 4.1×10^{-4}mM/h의 유사-0차 속도 상수를 나타낸다. 따라서, 텍사피린 착물은 HAM 시스템보다 더욱 효과적인 것으로 밝혀졌다.

<228> B2T2 텍사피린과 기타 란타나이드(III) 착물에 대한 조사 결과, 이들 착물들도 또한 RNA를 가수분해시킬 수 있는 것으로 나타났다. 결과는 표 2에 요약한 바와 같다.

표 2

란타나이드(III) B2T2 텍사피린 착물[a]에 의한 UpU 가수분해의 속도 상수(유사-0차)

란타나이드 양이온	k mM/h
La(III)	1.16×10^{-4}
Nd(III)	4.69×10^{-4}
Sm(III)	6.3×10^{-4}
Eu(III)	4.99×10^{-3}
Gd(III)	1.44×10^{-4}
Dy(III)	6.0×10^{-3}
Tm(III)	4.16×10^{-4}
Lu(III)	1.91×10^{-4}

[a]란타나이드(III) B2T2 txph$(NO_3)_2$의 농도는 모두 대략 0.25mM이다.

<230> 텍사피린 금속 착물의 촉매 효과를 지지하는 추가의 증거는 우리딘-2',3'-사이클릭모노포스페이트(cUMP)의 Eu(T2B2Txp)$^{+2}$ 촉매화된 분해로부터 생성되는 우리딘의 형성을 모니터링함으로써 수득한다. 37℃ 및 pH 7.0에서 항온처리(5mM HEPES 완충액)하는 경우, Eu(T2B2Txp)$^{+2}$ (0.15mM)에 의해 촉매화된 cUMP(0.10mM)의 분해는 우리딘 생성에 대한 유사-0차 속도가 6.94×10^{-5} mMh^{-1}이다. HPLC에 의해 반응 생성물을 조사한 결과, 먼저 cUMP가 우리딘-3'-모노포스페이트(3'-UMP) 및 우리딘-2'-모노포스페이트(2'-UMP)로 이성체화된 다음, 후속적으로 가수분해되어 우리딘을 생성하는 것으로 나타났다(제14도).

<231> 실시예 6

<232> 텍사피린 금속 착물을 사용한 RNA의 일반화된 가수분해

<233> 본 실시예는 유로퓸 B2T2 텍사피린을 사용하여 균질한 모집단의 RNA 분자를 분해시키는 방법을 기술한다. 분리된 클론으로부터의 P^{32}-표지된 RNA 전사물은 균질한 RNA 기질이다. 전사물 및 이의 분해 산물을 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 및 방사선 사진술로 가시화한다.

<234> pGEM?-3Z 벡터 및 리보프로브(Riboprobe?) RNA 전사물 시스템을 프로메가코포레이션(Promega Corporation, Madison, Wisconsin)으로부터 구입한다. 마우스 1b 다중 약제 내성 유전자(MDR) 4.3kb 단편을 pGem 32 벡터의 EcoRI 부위에 클론닝시킨 다음, 이의 배향을 결정한다(제5도 참조). 플라스미드는 전사 반응에 사용되며, BamHI로 분해시키는 경우, T7 RNA 폴리머라제가 염기 길이가 대략 2,000인 당해 주형으로부터 전사물을 만든다. 전사 반응물은 BamHI 분해된 pGem 3Z/4.3 MDR#3 100ng, 5X 전사 완충액 20㎕, 500㎛M 트리포스페이트 뉴클레오티드(A, C, G), 100㎛M UTP, ^{32}-P α-UTP (3000 Ci/mmol) 50αC, DTT 10mmol, RNasin 120단위 및 RNA 폴리머라제 70 내지 100단위로 이루어진다. 당해 반응물을 DEPC 처리된 이중 증류수를 사용하여 총 100㎕ 용적으로 만든다. 반응물을 37℃에서 1.5시간 동안 항온처리시킨다. 이어서, 전체 반응물 용액을 20mM 트리스(pH 7.0), 2mM EDTA 및 0.1% SDS로 예비-평형화시킨 G-50 세파덱스(Sephadex) 컬럼(Nick Column, Pharmilcia) 위로 넣는다. 컬럼에 두번째로 400㎕ 용적을 적용한 상태에서 컬럼으로부터 전사물을 용출시킨다. 임의의 도입되지 않은 뉴클레오티드가 컬럼상에 잔류한다.

<235> 전사물 분취액 10㎕를 별개의 튜브에 넣은 다음, Eu(III) B2T2 txp(1_0), EDTA 또는 Eu(III) 아세테이트의 저장 용액을 가하여 최종 용적이 20㎕로 되게 한다. 튜브를 37℃에서 2시간 동안 항온처리한다. 각 튜브에 염료 혼합물(포름아미드, 0.2% 브롬페놀 블루) 30㎕를 가한다. 튜브를 혼합하여 60℃에서 5분 동안 가열한 다음, 반응물 전체를 5% 8M 우레아 폴리아크릴아미드 겔상에 부하시켜 전기영동을 수행한다.

<236> 2000 염기 길이의 전사물을 EuB2T2 txp로 분해시킨 결과를 제7도에 제시한다. 대조군 및 EDTA를 사용한 대조군인 레인 1, 2 및 12에 하나의 밴드가 존재한다. 당해 밴드는 EuB2T2 txp 10 M을 사용한 레인인 레인 3에는 존재하지 않는다. 저분자량 물질, 즉 분해 산물의 증가는 레인 3 전체에 걸쳐 흘림무늬로서 나타난다. 전사물은 보다 낮은 EuB2T2 txp 농도, 레인 4 내지 7에서 본래대로 남아 있다. 전사물을 50 ㎛M, 30 ㎛M, 10 ㎛M 및 1 M의 EDTA의 존재하에서 EuB2T2 txp 100㎛M로 분해시킨다(레인 8 내지 10 및 13). 본 실험은 B2T2 txp 용액중의 유리 금속이 분해를 유발시킬 가능성을 제거한다. 레인 11은 1,418 및 679 염기의 분자량 표준물을 함유한다. 제6도는 100, 50, 25, 10 및 5㎛M 농도의 유리 유로퓸 금속염(EuOAc)이 전사물을 분해시키지 못함을 보여준다(레인 3 내지 7). 이들 결과는 EDTA의 존재에 의해 영향

을 받지 않는다(레인 8 내지 11).

<237> 전체 RNA(우선적으로 K562 세포로부터의 28s 및 18s 리보좀 RNA)를 EuOAc, EuT2B2 txp 및 GdT2B2 txp로 분해시킨 결과, 모두가 전체 RNA를 가수분해시킬 수 있는 것으로 나타났다. 분해는 50% DMSO 및 H_2O 속에서 수행하고, 겔은 10μM 포스페이트 완충액(pH 6.8)을 사용하여 전기영동시킨다. EuOAc는 본 실시예에서 사용된 농도보다 높은 EuOAc 농도에서 균질한 전사물을 분해시킬 가능성이 있다.

<238> 명백하게, EuB2T2 txph는 RNA 기질을 가수분해시킬 수 있다. 텍사피린은 작용성화에 대해 이러한 다양성을 가지므로, 당해 결과는 하기 실시예에서 추가로 논의된 핵산 및 기타 분자에 대한 부위-특이적 분해제의 작제에 상당히 밀접한 관계를 가진다.

<239> 실시예 7

<240> 합성 올리고데옥시리보뉴클레오티드에 접합된 유로퓸(III)-텍사피린에 의한 RNA의 부위-특이적 가수분해

<241> 본 실시예는 텍사피린 금속 착물-올리고뉴클레오티드 접합체의 RNA 상보체를 가수분해시키는 텍사피린 금속 착물-올리고뉴클레오티드 접합체를 사용하여 안티센스제를 제공한다. 따라서, 이러한 안티센스제는 내인성 뉴클레아제의 관여없이 생체내에서 작용할 수 있다. DNA-EuTx-올리고뉴클레오티드 접합체는 작용성화된 텍사피린(8_B, 제8도)을 기본으로 하여 합성한다(2_F, 제2도). 당해 "리보자임 동족체"(참조 : 8_C)는 상보성 RNA 올리고머의 올리고데옥시뉴클레오티드-지시된, 금속 촉매화된 가수분해의 일례를 제공한다.

<242> 2개의 20-머 올리고뉴클레오티드를 내부 티민 잔기의 5-위치 또는 5'-말단포스페이트에 알킬아민 그룹을 함유하도록 기계 합성한다. 티민의 5-위치상에서 변형된 올리고데옥시뉴클레오티드-아민은 올리고사(Oligo's Etc., Wilsonville, Oregon)로부터 구입하고, 5' 말단상에서 변형된 올리고데옥시뉴클레오티드-아민은 키스톤 라보라토리즈사(Keystone Laboratories, Inc., Menlo Park, California)로 부터 구입한다. 올리고뉴클레오티드는 사용전에 HPLC 정제시킨 다음 LiCl을 사용하여 침전시킨다. 카복실산 작용성화된 유로퓸(III) 텍사피린 착물(8_B)을 카보디이미드 및 N-하드록시석신이미드와 반응시켜 상응하는 활성화 에스테르를 제조한 다음, 이를 선택된 올리고데옥시뉴클레오티드 아민 용액에 직접 가한다. 생성된 DNA-EuTx 접합체(제9도, 9_{A-D})를 전기영동에 의해 정제한다.

<243> 합성 RNA 30-머(10_B, 제10도)를 다중 약제 내성용 유전자 전사물내의 독특한 부위중에서 선택된 서열을 갖는 기질(Keystone Labs, Inc., Menlo Park, California)로서 수득한다. 서열은 마우스 다중 약제 내성 단백질 mRAN중의 1562 염기 후전사 출발 부위에서 상보성이다. 3'-^{32}p-표지된 기질을 완충액 염 용액속에서 37℃에서 18 내지 24시간 동안 과량의 올리고데옥시뉴클레오티드 접합체로 배양시키고, 에탄올 침전시킨 다음 20% 변성 폴리아크릴아미드 겔 상에서 검정한다. 제10도에 도식적으로 예시하고 제11A도 및 제11B도에 나타낸 바와 같이, 접합체(10_A)를 사용한 하이브리드화시 유로퓸(III) 텍사피린 착물의 예상된 위치 근처에서 약 30%의 분해가 일어난다. 밀도 측정법으로 분해 수율을 측정한 다음 본래의 물질에 대한 분해 밴드의 비로서 계산한다. 동일한 당해 기질을 서열이 상보성이지 않거나, 변형시키지 않았거나 착물로 내부적으로 변형시킨 올리고뉴클레오티드로 배양시키는 경우, 상응하는 분해 밴드가 관찰되지 않는다(제11A도 및 제11B도, 레인 8 내지 10). 대조 반응은 주위 광선, 송아지 흉선 DNA 또는 완충액의 유형(트리스 아세테이트 또는 HEPES, EDTA, pH 6.0 내지 8.0)이 분해 효율에 명백한 영향을 미치지 못함을 보여준다. EDTA는 모로우 등(1992)에 의해 관찰된 바와 같이, 유리 란타나이드(III) 양이온에 의한 분해를 억제한다.

<244> 제12도 및 제13도는 EuTx-접합체(10_A)에 의한 5'-말단 표지된 RNA 30-머(10_B)의 가수분해를 입증한다. 제12도의 레인 3 내지 6을 레인 7 내지 14와 비교한 결과, 가수분해는 25℃ 보다는 37℃에서 보다 용이하게 일어나는 것으로 나타났다. 제13도의 레인 3은 비상보성인 올리고(9_B)가 10_B의 가수분해에 영향을 미치지 못함을 나타내고, 레인 4는 내부 T 잔기에 결합된 상보성 올리고 및 EuTx를 갖는 접합체가 RNA 기질의 가수분해에 영향을 미치지 못함을 증명한다. 레인 5 내지 9는 10_A, 즉 기질(10_B)에 상보성인 올리고뉴클레오티드를 갖는 5' EuTx 접합체에 의한 RNA 기질의 가수분해를 보여준다.

<245> 분해 단편은 알칼리성 조건하에서 기질을 배양시켜 제조하거나 일련의 염기-특이적 리보뉴클레아제로 부분 분해시킨 서열화 레인에서 밴드와 함께 이동한다[유사한 최종-생성물 분석의 일례는 단쥐(Dange) 등(1990)의 문헌을 참조한다]. 이러한 관찰 결과는 2'-하이드록실 그룹의 분자간 공격을 촉진하여 분해에 영향을 미치는 루이스 산으로서 작용하는 EuTx를 포함할 것으로 추정되는 가수분해 메카니즘과 일치한다. 임의의 첨가된 분해제의 부재하에서 리보뉴클레오티드 표적 서열의 부위-특이적 분해를 나타내는 밴드가 존재한다(제11A도의 레인 1), 이러한 백그라운드 분해의 공급원은 공지되지 않았지만, 이는 올리고뉴클레오티드의 고차 구조[즉, 헤어핀(hairpin)]의 직접적 결과인 것으로 사료되는데, 이는 임의의 상보성 올리고뉴클레오티드를 사용한 하이브리드화가 분해를 현저히 억제하기 때문이다[참조예 : 제11A도의 레인 2, 5 내지 7, 9). 이러한 유형의 구조-의존적 분해 거동은 올리고리보뉴클레오티드와 관련하여 이미 알려진 바 있다[참조 : Dange et al., 1990, Kazabov et al., 1992].

<246> Eu(III) Txp-올리고뉴클레오티드의 최대 분해 활성은 접합체 25nM까지 내려가는 것으로 관찰되었다. 당해 수준 이하의 감소된 분해는 (약 1nM 농도에서 존재하는 표적 RNA의 증가된 백그라운드 분해로부터 판단하건대) 하이브리드화된 물질의 감소에 기인할 수 있다. 비교하면, 유리 유로퓸 착물은 25μM에서 RNA 기질을 비특이적으로 가수분해시킨다(제11A도의 레인 4). 착물과 유도체화되지 않은 상보성 DNA 올리고머를 함유하는 대조 반응(제11A도의 레인 7)에서는 분해가 단일 표준 영역에서 우세하게 일어나긴 하나, 2.5nM에서 Eu-Tx-DNA 접합체 보다 효율이 낮다. 이와 같이, DNA 프로브에 EuTx를 부착시키면 이의 유효 농도가 약 10,000배 증가한다. 이때 관찰된 2차 구조를 가지지 않는 표적 RNA는 낮은 DNA-EuTx 농도에서 분해될 가능성이 있다. 이들 데이타는 안티센스 적용에 있어서 이러한 접합체의 유용성을 보여주는

것이다.

<247> 본 실시예에서 증명된 바와 같이, 올리고뉴클레오티드를 거대환 주위에 공유 결합시키면 텍사피린 착물의 선택성이 증진된다. 금속 착물은 DNA보다 RNA를 우선적으로 분해하므로, DNA 부가물은 가수분해 실험중에 본래의 상태로 남아 있는다. DNA 팔(arm)을 인지하여 적절한 RNA 단편에 결합시킴으로써 용액중의 전체 금속 농도와 비교하여 이들 위치에서의 금속 농도를 효과적으로 증가시킨다. 따라서, 포스페이트 에스테르 가수분해는 RNA 주쇄를 따라 특정 위치에서 상당히 증가할 것이다. 한가지 양태로, PCR을 위한 프라이머(공지되었거나 추정됨)를 가수분해된 2가 또는 3가 텍사피린 착물에 커플링시켜 인접 RNA의 가수분해를 유도할 수 있다.

<248> 텍사피린 금속 착물-접합체에 의한 RNA 가수분해의 증진은 데옥시리보뉴클레오티드가 RNA 표적물에 결합하여 가수분해에 대한 감수성을 증가시킬 수 있는 일본 쇄 루우프를 생성하도록 설계함으로써 수행할 수 있다. 루우프는 하나 이상의 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 이 경우, 올리고데옥시리보뉴클레오티드는 RNA 표적물에 대한 이의 결합 에너지를 사용함으로써 표적화된 포스페이트 디에스테르의 바닥 상태 에너지를 증가시키는 촉매 그룹으로서 작용한다. 제18A도 및 제18B도에 그 예가 예시되어 있다. 제18A도는 이의 5' 말단에서 Dy(III) 텍사피린 착물에 접합되고 "U"자로 루우핑된 염기 쌍에 대한 뉴클레오티드가 결실된 DNA 12-머를 도시한 것이다. RNA 기질에 대한 결합은 Dy(III) Txp 착물에 의한 가수분해에 대한 감수성이 향상된 부위인 1-염기 루우프 구조를 생성시킨다. 제18B도는 이의 3' 말단에서 Dy(III)Txp에 접합되고 이의 5' 말단에서 제2 Dy(III)Txp에 접합되며, RNA 기질에 결합하여 동일한 1-염기 루우프 구조를 생성시키며, 동일한 뉴클레오티드가 결실된 DNA 10-머를 도시한 것이다. 루우프는 결합시 루우프 구조물상의 한 점에 모이는 2개의 Dy(III)Txp 착물에 의해 가수분해에 대한 감수성이 향상된 부위이다. 본 실시예에서, 하나의 Dy(III)Txp는 일반적인 산으로서 작용할 수 있고, 제2의 Dy(III)Txp는 RNA의 가수분해를 활성화시키기 위한 Dy(III)-Txp 결합된 하이드록실 그룹에 의해 일반적인 염기로서 작용할 수 있다.

<249> 실시예 8

<250> 다양한 길이의 합성 올리고데옥시리보뉴클레오티드에 접합된 디스프로슘(III)-텍사피린 및 유로퓸(III) 텍사피린에 의한 RNA의 부위-특이적 가수분해

<251> 실시예 7의 공정에 이어, 5' 말단에서 변형된, 뉴클레오드의 길이가 다양한 올리고데옥시리보뉴클레오티드-아민(구입처 : Keystone Labs, Menlo Park, California)을 카복실산 작용성화된 디스프로슘(III)-텍사피린 착물(8_B)과 반응시켜 DyTx 올리고-접합체(9_F-9_I)를 수득한다(제9도). 상응하는 EuTx 올리고-접합체도 또한 제조한다.

<252> 이어서, 실시예 7의 공정에 이어 위에 기술한 접합체 각각을 3-표지된 합성 RNA 30-머(10_B)로 항온처리한다. 올리고 말단에 상보성 DAN 및 텍사피린 착물을 갖는 접합체 모두가 RNA를 가수분해시키는 것이 사실이긴 하지만, RNA는 Dy 접합체에 의해서 Eu 집합체에 의한 가수분해 속도의 약 2배의 속도(RNA의 약 60%를 분해시키면서)로 가수분해된다(제22도). 사용된 RNA 250nM 농도에서, 12-머 접합체는 20-머 접합체와 마찬가지로 효과적인 것으로 밝혀졌으며, 9-머 접합체는 덜 효과적이고, EuTx-9-머 접합체를 사용한 경우에는 소량의 분해만이 관찰되었다. 9-머 접합체의 존재하에서 RNA 기질의 증가된 백그라운드 분해는, 기질에 대한 어닐링의 낮은 특이성이 보다 짧은 올리고뉴클레오티드에 의해 제공됨을 보여준다.

<253> 이들 데이타는 12 염기 정도의 낮은 염기수를 갖는 올리고뉴클레오티드가 정확하고 완전한 가수분해 활성에 요구되는 특이성을 제공함을 보여준다. 이러한 측면은 약제 설계에서 중요한데, 이는 세포막을 통과하는 올리고뉴클레오티드 동족체의 능력이 일반적으로 당해 동족체의 길이에 반비례하는 것으로 밝혀졌기 때문이다.

<254> 실시예 9

<255> 합성 올리고데옥시리보뉴클레오티드에 접합된 디스프로슘(III)-텍사피린에 의한 36-머 RNA의 부위-특이적 가수분해

<256> 실시예 7의 공생에 이어서 3'-표지된 합성 RNA 36-머(10_D)(Promega Corp., Madison, WI)(제10도)를 과량의 DyTx-올리고 접합체[10_C(9_I)]로 항온처리한 다음 가수분해를 관찰한다. 제10도에 도식적으로 예시된 바와 같이, DyTx-올리고 접합체는 화살표로 지시된 부분에서 RNA를 가수분해시킨다. 이와 같은 추가의 결과는 에스테르 결합 가수분해에서 텍사피린-올리고뉴클레오티드 접합체의 다양한 유용성을 뒷받침한다.

<257> 실시예 10

<258> 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 부착된 텍사피린을 갖는 텍사피린-올리고뉴클레오티드 접합체의 합성

<259> 3' 말단 포스페이트에 알킬아민 그룹을 함유하도록 12 염기의 올리고데옥시리보뉴클레오티드 2개 각각을 합성한다(Keystone Labs, Menlo Park, California). 이들 올리고머를 실시예 7의 공정에 이어서 카복실산 작용성화된 Eu(III)-텍사피린 착물(8_B) 또는 Lu(III) 텍사피린 착물과 반응시켜 접합체, 9_J, 9_K 및 9_N 을 수득한다(제9도).

<260> 이들 3접합체는 본 발명의 특정 양태에서 특히 중요할 수 있는데, 이는 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 커다란 그룹(예 : 본 발명의 텍사피린 착물)의 부착으로 올리고뉴클레오티드가 세포 뉴클레아제에 대해 내성을 갖게 되기 때문이다.

<261> 유사한 방식으로, 본 발명의 한가지 양태는 5' 말단에서 텍사피린에 접합된 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 특정한 리간드를 부가하는 것이다. 3' 리간드의 기능은 세포내로의 접합체 흡수에 일조하는 것이다. 이러한 리간드는 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 이로써 제한하는 것은 아니지만, 콜레스테롤 및 폴리리신을 포함한다.

<262> 텍사피린 금속 착물-올리고뉴클레오티드 접합체를 사용한 RNA의 가수분해에서 본 발명의 또다른 양태는 올리고머의 5' 말단에 접합된 텍사피린 금속 착물을 갖는 접합체와 올리고머의 3' 말단에 접합된 텍사피린 금속 착물을 갖는 접합체 2개로 이루어진 한 세트의 접합체를 사용하는 것이며, 이때 올리고머는 제21도에 도시된 바와 같이 2개의 텍사피린 금속 착물이 표적화된 가수분해 부위에 인접하여 위치하도록 다른 RNA 기질의 바로 상부에 있는 동일한 RNA 기질에 대해 상보적이다. 2개의 촉매 그룹의 분리 거리는 다양한 길이의 올리고머-5'-접합체의 포개진 세트를 제조한 다음 RNA 주형에 대한 2개의 접합체의 동시 결합을 유발하는 가수분해 효율을 비교함으로써 변화시킬 수 있다.

<263> 실시예 11

<264> Eu(III) 텍사피린-올리고뉴클레오티드 이중 접합체의 합성

<265> 3' 및 5' 말단에 알킬아민 그룹을 함유하도록 12 염기를 갖는 올리고데옥시리보뉴클레오티드를 합성한다(Keystone Labs, Menlo Park, California). 실시예 7의 공정에 이어서 당해 올리고머를 과량의 카복실산 작용성화된 Eu(III)-텍사피린 착물(8_B)과 반응시켜 12-머의 3'- 및 5'-말단에 Eu(III) Tx 금속 착물을 가지는 이중 접합체(9_L, 제9도)를 수득한다.

<266> 각 말단에 하나씩, 동일한 올리고뉴클레오티드에 접합된 2개의 텍사피린-금속 착물의 사용은 금속 착물의 협력된 활성에 기인하여 증가된 효율로 RNA를 가수 분해시킨다. 본 양태에서는, 텍사피린 착물 둘다가 동일한 금속, 바람직하게는 란타나이드 금속 양이온, 및 더욱 바람직하게는 유로퓸(III) 또는 디스프로슘(III)을 함유하는 것이 바람직하다. 텍사피린 금속 착물중 하나는 산으로서 작용할 수 있고, 다른 하나는 염기로서 작용하여 RNA의 가수분해를 더욱 활성화시킬 수 있다.

<267> 또한, 이중 접합체는 당해 한 분자에 의해 성취될 수 있는 기능에 다양성을 제공한다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드 결합 특이성을 제공하고, 하나의 텍사피린 금속 착물(예를 들어, 금속 이온으로서 Gd(III)를 갖음)은 영상화를 제공하며, 다른 텍사피린 금속 착물은 에스테르 가수분해를 제공한다. 이러한 이중 접합체는 하나의 분자로 영상화와 가수분해의 2가지 기능을 수행할 수 있다.

<268> 치료 공정으로서 RNA를 생체내 분해시키기 위한 텍사피린 금속 착물의 용도는 목적하는 분해 부위에 착물을 효과적으로 국지화시키는 것에 따라 달라진다. 목적하는 분해 부위는 건강 보호 측면에서 목적하지 않은 유기체에 대한 신규한 위치일 수 있다. 목적하는 분해 부위는 숙주에 유해한 생성물을 암호화하는 메신저 RnA이거나, 몇 가지 면에서 유해한 정상 RNA일 수 있다.

<269> 실시예 6 내지 11의 데이타는 란타나이드 텍사피린 착물을 RNA 안티센스제로 개발할 수 있음을 증명한다. 안티센스 접근법은 단백질 발현을 조절하는데 효과적이다. 하나의 메신저 RNA 분자로부터 특정한 폴리펩티드의 많은 복제물이 제조되므로, 세포 진행의 수준을 이동시키고 메세지를 넉아웃(knck out) 시키면 보다 적은 표적 부위가 존재하게 되기 때문에 보다 적은 공격제가 필요하게 된다. 안티센스법은, 안티센스 프로브를 이의 표적 분자에 하이브리드화시키는 한가지 필요 조건만을 가지기 때문에, 신규한 약제 설계를 위한 명쾌하고 합리적인 방법을 제공한다. 하이브리드화 필요 조건은 상보성 와트슨-크릭(Watson-Crick) 염기 짝짓기를 통해 매우 잘 이해된다. 본 방법과 달리, 수개의 화합물의 선별과 X-선 결정 구조 분석을 요하는 선행 기술에서는 안티센스 기술에 요구되는 정보가 표적 서열이다. 이러한 신규한 텍사피린 착물로 천연 RNA를 처리하면, 부가된 올리고뉴클레오티드를 통해 텍사피린 착물이 상보성 RNA 서열에 결합한다. 이어서, 란타나이드 텍사피린 착물은 당해 특이적 부위에 인접한 RNA를 분해한다. 1개 또는 2개의 텍사피린 분자를 DNA에 부착시켜 유전자 스플라이싱제로서의 가능성을 만들어낼 수 있다.

<270> 텍사피린 올리고 착물은 항바이러스성 및 항세균성 치료 뿐만 아니라 암(예를 들어, 온코진에 대해 상보성 올리고뉴클레오티드) 및 특정 단백질의 과발현에 의해 유발되는 염증성 반응에 즉시 적용될 수 있다. 안티센스 기술은 모두가 본원에 참조로 인용된 미합중국 특허 제5,194,428호, 제5,110,802호 및 제5,216,141호에 언급되어 있다.

<271> 실시예 12

<272> 에스테르 분해용 텍사피린-사프피린 접합체 및 막을 통한 수송

<273> 선택성을 수득하기 위한 다른 방법은 사프피린(Sap) 분자에 텍사피린 착물을 공유 결합시키는 것이다[참조 : Sessler et al., 1992; Furuta et al., 1991; Sessler et al., 1991; 미합중국 특허 제5,159,065호, 미합중국 특허 제5,120,411호, 미합중국 특허 제5,041,078호(모두가 본원에 참조로 인용됨)]. 사프피린이 포스페이트와 결합(pH 7의 물속에서 $K=20M^{-1}$)하기 때문에, 결합된 텍사피린-사프피린 착물(txph-sap)은 사프피린 결합 부위에 인접한 위치에서 금속 농도를 효과적으로 증가시킬 수 있다. txph-sap 분자는 상당히 크기 때문에, RNA의 3차 구조가 유리한 결합 부위의 수를 제한할 것으로 기대된다. 따라서, RNA 가수분해에 대한 구조적 선택도는 기질 분자의 구조를 기본으로 할 것으로 기대된다.

<274> (Eu) 텍사피린-사프피린 접합체의 합성(제15도 및 제16도)

<275> 활성화 (Eu) 텍사피린 카복실산과 아미노-치환된 사프피린 사이에 형성된 아미드 결합에 의해 합성을 수행한다. 동일한 방법으로, 다른 금속성 양이온을 텍사피린 부분에 도입시킬 수 있는 접합체를 포함하는 다양한 텍사피린-사프피린 접합체를 제조할 수 있다. 제15도는 텍사피린의 아미드 결합된 유도체의 형성예를 도시 한 것이다.

<276> (Eu) 텍사피린산 EuT2B1($O(CH_2)_3CO_2H$)의 합성(16_B, $R=CH_2OH$, 제16도)

<277> 텍사피린 유도체[T2B1($O(CH_2)_3CO_2H$)·HCl, 0.694g, 1mmol]을 무수 메탄올 80ml에 용해시킨다. $Eu(OAc)_3 \cdot H_2O$(0.329g, 1mmol)를 가한 다음 다시 트리에틸아민(0.5ml)을 가한다. 반응 혼합물을 금속화 및 후속적으로 가시광선 스펙트럼을 진행시키면서 6시간 동안 환류시킨다(환류 콘덴서는 공기에 개방시킨다). 감압하에서 메탄올을 증발시켜 어두운 색의 무수 고체를 수득한 다음, 이를 격렬하게 교반하면서 2시간 동안 디클로로메탄으로 세척한다. 생성물을 여과하여 MeOH(25ml)에 다시 용해시킨 다음, 용액을 제

올라이트로 처리(유리 유로퓸 염을 제거하기 위한 표준 공정에 따름)한다. 생성물에 디에틸에테르를 가하여 메탄올로부터 2회 침전시킨다. 수집한 암녹색 고체를 고진공하에서 밤새 건조시킨다. 수율 91.0%, 특성데이터:

<278> $C_{38}H_{44}N_5O_5Eu \cdot 2(OAc)$에 대한 원소분석(F,W, 920.855):

<279> 계산치 C 54.78%, H 5.47%, N 7.61%;

<280> 실측치 C 54.46%, H 5.50%, N 7.55%.

<281> FAB HR MS:

<282> $C_{38}H_{43}N_5O_5Eu$에 대한 계산치 802.24626; 실측치 802.247752.

<283> UV-Vis(EtOH, λ_{max}): 420, 469, 760nm.

<284> Eu 텍사피린-사프피린 유도체의 합성(16_C, 제16도)

<285> 위에 기술한 텍사피린 디하이드록실 카실레이트 유도체(0.093g, 0.1mmol)를 무수 디메틸포름아미드(디메틸아민 비함유 용매) 10ml에 용해시킨다. 용액을 얼음위에서 0℃로 냉각시킨다. 활성화제(카보디이미드, EDC, 95.5mg, 0.5mmol) 및 하이드록시벤조트리아졸(5mg)을 가하고, 혼합물을 0℃에서 45분 동안 정치시킨다. 아미노사프피린 유도체(16_A)를 제조하기 위해, 사프피린 모노카복실산을 DCC로 활성화시킨 후에 t-BOC 단일 보호된 에틸렌디아민과 반응시키고, 이어서 후속적으로 실온에서 TFA로 1시간 동안 처리하여 탈보호시킨다. 동일한 온도에서 디메틸포름아미드 5ml 및 무수 피리딘 0.1ml 중의 아미노사프피린 유도체 3,8,17,22-테트라에틸-12- [N-(2-아미노에틸)아미노카보닐에틸-2,7,13,18,23-펜타메틸사프피린(16_A, 0.067g, 0.1mmol)의 용액을 가한다. 반응 혼합물을 0℃에서 30분 동안 정치시키고, 실온으로 가온시킨 다음 3일 동안 교반한다. 감압하에서 용매를 증발시킨다. 조악한 생성물을 세척하여 EtOH(10ml)에 용해시킨 다음 디에틸에테르를 서서히 가한다. 침전된 생성물을 진공 건조시킨다. 수율 68%,특성 데이타 :

<286> UV-Vis λ_{max}(EtOH): 358, 431, 450, 618, 761nm.

<287> (H_2O, pH 7) : 358, 408, 455, 623, 675, 765nm.

<288> FAB MS: $C_{80}H_{95}N_{12}O_5Eu$에 대한 계산치 1456.67539; 실측치 1457.

<289> 유사한 헤테로이량체에 대한 또다른 합성 접근법은 아미노-치환된 텍사피린[텍사피린 카복실레이트 음이온을 단일 보호된 에틸렌디아민{$H_2N(CH_2)_2NHR$)(여기서, R은$(CH_3)_3COCO$-(t-BOC)이다)}과 반응시킨 다음 180℃에서 가열하여 탈보호시킴으로써 제조함]을 활성화 사프피린 모노카복실산 유도체[예: 사프피린 산 클로라이드, 또는 디사이클로헥실카보디이미드(DCC)로 처리하여 수득한 생성물]와 커플링시키는 것을 포함할 수 있다.

<290> 본 화합물(16_C)을 벌크(bulk) 액체 막을 통한 ADP 및 ATP의 수송(a)에 대해 시험한다. 중성 pH에서 효율적 수송이 관찰되며, (b) 포스포디에스테르 가수분해-ATP 수송 동안, AMP가 가수분해의 결과로서 형성된다. H_2O-CH_2Cl_2-H_2O 3상 프레스만(Pressman)형, 튜브형 모델 막 시스템(Araki et al., 1990)을 사용하여 수송을 연구한다. 수성상 I(공급상)은 ADP(pH 7.0에서 ATP)의 5mM 용액이고, 유기상은 (Eu)텍사피린-사프피린 접합체의 0.1mM 용액이다. 수성상 II(수용상)은 물(pH 7.0)이다. 시간이 경과함에 따라 막 수송의 결과로서 수용상내의 ADP 및 ATP의 농도가 증가한다. 내부 표준물(들)로서 시토신 및/또는 아데노신을 사용하여 수용상을 HPLC 분석(역상 분석 컬럼, 10mM 포스페이트 완충액, pH 5.6)하여 수송된 양을 측정한다. 이러한 법으로, ADP 및 ATP의 막 투자 수송의 초기 수송률을 도출해낸다. 결과는 ADP의 초기 수송률이 5×10^{-9} mol/cm^2h 범위내로서 ATP 초기 수송률보다 약 5배 정도 낮음을 보여준다. 또한, 상기한 ADP 및 ATP의 막 투과 수송이 진행되는 동안, 확실한 샘플과의 비교를 통해 AMP로 측정된, 수용상 중의 신규한 화합물의 형성이 관찰된다. 당해 AMP 물질은 공급 상중에서 존재하지 않으며, 또한 담체-유리 대조 실험의 수행에서도 관찰되지 않으므로, (Eu)텍사피린-사프피린 접합체 매개된 수송 과정의 결과로서의 이의 생성은 접합체가 포스포디에스테르 결합의 가수분해를 수행할 수 있음을 의미하는 것으로 간주한다.

<291> 텍사피린-사프피린 접합체 또는 이의 동족체는 안티센스 적용에 매우 유용하며, 사프피린은, 예를 들어, DNA의 포스페이트 디에스테르와 같은 포스페이트 디에스테르에 높은 특이성 및 친화도로 결합한다. Ln(III) 텍사피린은 음이온성 포스페이트에 결합하여 RNA 및 관련 종의 가수분해를 수행한다. 따라서, 텍사피린-사프피린 접합체는 유도된 "인접 그룹 영향"의 측면에서 RNA/DNA의 향상된 인지 및 가수분해 속도의 증진을 제공한다.

<292> RNA의 특이적 분해가능성에 더하여, 텍사피린 분자를 당해 분자가 세포막을 통과하여 바이러스성 RNA를 선택적으로 공격하도록 설계할 수 있다. 이러한 분자는 HIV를 포함하는 다양한 바이러스에 감염된 사람 환자를 치료하고, 바이러스 감염에 대하여 혈액을 생체내 또는 생체외에서 처리하여 혈액을 퍼징 또는 정제할 수 있는 능력을 가진다.

<293> 실시예 13

<294> 이미다졸 촉매 그룹을 갖는 Dy(III)-텍사피린의 합성(제19A도 및 제19B도)

<295> 16-[1(하이드록시)아세틸-2-옥실-17-[2-[2-[2-[2-(N-이미다졸릴)에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]-9,24-비스(3-하이드록시프로필)-4,5-디에틸-10,23-디메틸-13,20,25,26,27-펜타아자펜타사이클로-[20,2,1,1^{36},$1^{8.11}$,$0^{14.19}$]헵타코시-1,3,5,7,9,11(27),12,14(19),15,17,20,22(25),23-트리데카엔의 디스프로슘(III) 착물(19_H, 제19B도)

<296> 4,5-디니트로카테콜(1)을 염화칼륨 및 메탄올의 존재하에서 트리에틸렌 글리콜 디토실레이트(1당량)와 반응시킨다. 생성된 혼합물로부터 모노토실레이트(19_B)를 분리한 다음, 이를 탄산칼륨 및 메탄올의 존재하에서 이미다졸(1당량)과 반응시켜 4,5-디니트로-2-[2-[2-[2-[2-(N-이미다졸릴)에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]페놀(19_C)를 수득한다. 제2A도의 합성 도식에 기술된 공정에 따라, 및 제19A도 및 제19B도에 개략적으로 기술된 바와 같이 화합물(19_C)을 에틸-2-요오도아세테이트와 반응시키고, 생성된 화합물(19_D)을 비누화시킨 다음 환원시켜 상응하는 디아미노 화합물(19_E)을 수득한 후, 이를 트리피롤(19_F)과 반응시킨다. 생성된 비방향족 거대환 화합물 16-[1-(하이드록시)아세틸-2-옥시]-17-[2-[2-[2-[2-(N-이미다졸릴)에톡시]에톡시]에톡시]에톡시]-9,24-비스(3-하이드록시프로필)-4,5-디에틸-10,23-디메틸-13,20,25,26,27-펜타아자펜타사이클로-[20,2,1,$1^{3.6}$,$1^{8.11}$,$0^{14.19}$]헵타코사-3,5,8,10,12,14(19),15,17,20,22,24-운데카엔(19_G)을 금속화시켜 촉매 그룹으로서 이미다졸을 갖는 Dy(III)Tx 착물(19_H)을 수득한다.

<297> 상기한 Dy(III)-Tx 착물은 텍사피린 금속 착물에 트리(에틸렌 글리콜) 링커를 통해 부착된 부가 촉매 그룹인 이미다졸을 갖는 텍사피린 착물의 한가지 예이다. 이러한 촉매 그룹은 RNA 표적물의 부위-특이적 가수분해에서 일반 염기로서 일조할 수 있다. 본 목적을 위해, 텍사피린 금속 착물을 분해할 RNA에 대한 서열이 상보성인 올리고데옥시리보뉴클레오티드에 접합시킨다. 본원에 기술된 공정에 이어서 올리고를 Dy(III)Tx 화합물(19_H)의 16-위치에서 링커 그룹(예: 카복시 그룹)을 통해 텍사피린에 접합시킨다.

<298> 실시예 14

<299> 아미노산 또는 아미노산 유도체 촉매 그룹을 갖는 Eu(III)-텍사피린의 합성

<300> Eu(III)-Tx 카복실산 착물(2_F)(n=3, 92mg; 0.1mmol)을 무수 정제된 DMF 5ml에 용해시켜 0℃로 냉각시킨 다음, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC; 57mg, 0.3mmol) 및 피리딘 0.5ml를 가한다. 생성된 활성화 반응을 0℃에서 1시간 동안 진행시킨다. 이어서, 히스타민 클로라이드(55mg, 0.3mmol)를 물 3ml중의 1-하이드록시벤즈트리아졸(5mg) 및 디메틸아미노피리딘(5mg)과 함께 가한다. 이어서, 반응 혼합물을 0℃에서 1시간 동안 교반한 다음, 다시 실온에서 5일 동안 교반한다. 실온의 진공에서 용매를 증발시키고, 생성물을 메탄올-벤젠 혼합물로부터 재결정화시켜 제20A도에 나타낸 것과 같은 최종 Eu(III)Tx-히스타민 접합체를 수득한다. 역상 컬럼 크로마토그래피에 의해 분석 샘플을 제조한다.

<301> UV-Vis(H_2O, pH 7) : λ_{max}(nm) : 457.5, 761.5;

<302> FAB HR MS : $C_{43}H_{51}N_8O_4Eu$에 대한 계산치 896.324571, 실측치 896.323476.

<303> 상술한 공정에 이어서, L-아르기닌 메틸 에스테르 디하이드로클로라이드(78mg, 0.3mmol)을 활성화 Eu(III)Tx 카복실산(2_F)와 반응시킨다. 반응 혼합물을 0℃에서 1시간 동안 교반한 다음, 다시 실온에서 5일 동안 교반한다. 용매를 증발시킨 다음, 생성물을 재결정화시켜 제20B도에 제시할 최종 Eu(III)Tx를 수득한다.

<304> UV-Vis(H_2O, pH 7) : λ_{max}(nm) : 457.0, 761.0;

<305> FAB HR MS : $C_{45}H_{58}ClN_9O_6Eu$에 대한 계산치 1008.341102, 실측치 1008.34004,

<306> 유사한 공정에 이어서, 텍사피린 착물의 활성화 산을 아민-함유 치환체의 아민 성분과 반응시킴으로써 아민 그룹을 함유하는 치환체를 갖는 텍사피린의 금속착물을 제조할 수 있다. 제15도는 일반적 합성 도식을 나타낸다. 이들 아민 치환체는 에스테르 가수분해의 촉매화시 텍사피린 금속 착물을 보조하는 촉매 그룹으로서 작용할 수 있다. 아민-함유 치환체에는 아민-함유 사카라이드, 폴리사카라이드, 아미노산, 아미노산 유도체, 폴리아미노산 등이 포함된다.

<307> 실시예 15

<308> 텍사피린-텍사피린 접합체(제17도)

<309> 텍사피린을 커플링시켜 실시예 12에 기술된 텍사피린-사프피린 접합체와 유사한 텍사피린-텍사피린 접합체를 형성할 수 있다. 카복실레이트 텍사피린 유도체를 디아미노 화합물(예: $NH_2(CH_2)_nNH_2$)과 커플링시키거나 $NH_2(CH_2)_nNHR$(여기서, R은 다양한 보호 그룹일 수 있고, n은 1 내지 7의 정수. 바람직하게는 1 내지 3의 정수이다) 유형의 단일 보호된 화합물과 커플링시켜 아미노 유도체로 전환시킬 수 있다. 텍사피린-텍사피린 접합체내의 개개의 Tx 금속 착물은 다른 Tx 금속 착물과 동일하거나 상이한 킬레이트화된 금속성 양이온을 가질 수 있다. 제17도는 메탈로 텍사피린(예: Eu-Tx) 카복실산 2당량을 활성화제(예: EDC)와 반응시킨 다음 아미노 성분(예: 에틸렌디아민)과 커플링시켜 제조한 텍사피린-텍사피린 접합체를 도시한 것이다.

<310> 텍사피린 금속 착물, 특히 상자성 금속 착물은 이들 화합물의 결합에 의해 유도된 ^{1}H-NMR 스펙트럼에서 200ppm 이하의 이동에 의해 나타나는 바와 같이 포스페이트 음이온, 뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드와 결합한다. 메탄올/클로로포름중의 디페닐포스페에트 모노음이온을 사용한 모노부가물의 형성에 대한 겉보기 결합 상수는 290dm^3/mol이고, 디부가물 생성에 대한 겉보기 결합 상수는 74dm^3/mol이다. 페닐 포스페이트 디음이온, 페닐포스포네이트 모노음이온, 우리딘 5'-모노포스페이트, 우리딘 2',3'-모노포스페이트, 구아노신 5'-모노포스페이트 및 올리고뉴클레오티드 혼합물의 결합으로부터도 스펙트럼 패턴의 유사한 변화가 관찰된다. 텍사피린-텍사피린 접합체의 란타나이드 부가물은 디- 또는 트리포스페이트종(예: ATP)의 가수분해, 포스페이트 폴리에스테르(예: RNA) 내의 여러 부위에서의 가수분해를 수행하거나, 이리한 RNA형 기질의 동시 결합 및 가수분해를 수행하는데 유용할 수 있다. MRI 및 PDT의 경우, 합한

반자성/상자성 물질은 가수분해 및 광-활성화를 통해 결합, 영상화 및 이중 분해 가능성을 제공할 수 있다.

<311> 2개의 인접한 텍사피린을 사용하여 금속 착물의 협력된 활성에 기인하는 증가된 효율로 RNA를 가수분해시킨다. 예를 들어, 하나의 착물은 루이스산으로 작용할 수 있는 한편, 다른 하나는 중성 pH에서 금속-결합된 하이드록사이드 일반 염기를 생성시키도록 작용한다. DNA 폴리머라제의 3'-5' 엑소뉴클레아제 활성과 같은 DNA 가수분해 효소의 단일 결정으로부터 수득된 결정학적 데이타를 근거로 하는 유사한 메카니즘이 제안된 바 있다.

<312> 실시예 16

<313> 부위-지시된 분자에 커플링된 란타나이드 텍사피린의 추가 용도

<314> 특허 제5,252,720호에는 생체내에서 B2T2 가돌리늄 착물을 사용한 자기 공명 영상화 실험이 기술되어 있다. 결과는 B2T2 가돌리늄 착물이 생체내에서 지질 함량이 높은 조직, 아테롬, 간, 신장 및 종양에 대해 친화성을 나타내고, 설치류에서 낮은 독성을 가짐을 보여준다. 본원에 예시된 바와 같이, 당해 텍사피린류의 거대환식 리간드의 화학적 특성은 생물학적 특성을 생분포, 약물동력학 및 독성 측면에서 최적화시킬 수 있는 주위 치환에 의해 변화시킬 수 있다.

<315> 텍사피린 금속 착물은 다양한 표적화된 치료 섭생에서 이작용성 킬레이트제로서 작용하기에 특히 적합하다. 텍사피린-금속 착물은 항체 접합체-기본 치료에 유효한데, 이는 이들이 항체에 접합시키기에 적합한 작용성 그룹을 가지기 때문이다. 이들 착물은 항체의 면역학적 경쟁을 파괴하지 않는, 생체내에서 안정한 공유결합을 형성하고, 비교적 무독성이며, 생리학적 환경에서 쉽게 용해된다. 이들 텍사피린의 추가의 장점은 많은 텍사피린이 추가의 작용성화에 적합할 수 있다는 점이다. 카복실화된 텍사피린을 티오닐 클로라이드 또는 p-니트로페놀 아세테이트로 처리하면, 모노클로날 항체 또는 기타 관련 생물분자에 부착시키기에 적합한 활성화 아실 종이 생성된다. 표준 커플링 방법[예: 1,1'-카보닐디이미다졸(CDI)]을 접합에 사용할 수 있다.

<316> 많은 세포막은 부분적으로 인지질로 구성된다. 따라서, 란타나이드 텍사피린을 합성 특이적인 포스포리파제로 개발할 수 있다. 당해 기술 분야의 숙련가라면, 본 발명의 기술 내용에 비추어, 소정의 인지질내의 포스페이트 에스테르 결합을 통해 연결된 지질 측쇄를 정확하게 결정할 수 있을 것이다. 당해 방법을 연장하여 포스파티딜 콜린 및 스핑고미엘린과 같은 세포막 성분을 분해시킬 수 있다. 이는 세포막 성분이 신경 및 뇌 기능에 관여하기 때문에 중요하다.

<317> ATP, ADP, NADH 또는 $FADH_2$를 특이적으로 가수분해하는 제제를 개발하여 란타나이드 텍사피린으로부터 효능 있는 세포독소를 개발할 수 있다. 당해 세포독소는 생물학적으로 특이적인 방법으로 세포내 자유 에너지의 유동을 분열시키고 실질적으로는 유기체를 절명시킨다. 이는 목적하지 않는 식물 및 동물의 사망, 또는 포유 동물의 암 치료를 가능케 한다.

<318> 글리코겐의 축적을 유발시키는 간 질환은 우리딘 디포스페이트 글루코오즈(UDP)인 포스포디에스테르 전구체를 글리코겐으로 가수분해시킴으로써 치료할 수 있다. 본 발명은 우리딘 포스페이트가 란타나이드 텍사피린에 의해 가수분해적으로 분해됨을 증명하고, 텍사피린을 사용한 이전의 연구(미합중국 특허 제5,252,720호)는 당해 텍사피린이 간에 국지화됨을 보여준다. 따라서, 당해 기술 분야의 숙련가라면, 본 접근법의 기본적 특징이 실험에 의해 이미 증명되었음을 인지할 것이다.

<319> 환식 아데노신 모노포스페이트(cAMP)는 각종 호르몬 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다. cAMP를 선형 아데노신 모노포스페이트(AMP)로 가수분해시키면, 특정 호르몬의 조절이 방해된다. 따라서, 텍사피린 착물은 호르몬 조절 약제로서 사용될 수 있다.

<320> 텍사피린 금속 착물은 또한 디- 및 트리알킬 포스페이트 에스테르의 무독화를 위한 가수분해제로서 사용될 수 있다. 알킬 포스페이트 에스테르는 화학 반응시의 용매, 살충제(예: 파라티온) 및 화학 신경 가스(예: 디이소프로필 포스포플루오리데이트, DIPF)를 포함하는 광범위한 용도를 갖는다. 당해 환경에서의 이들 제제의 가수분해 및 무독화는 종종 자연 공정에 의해 느려지게 된다. 알킬 포스페이트 에스테르의 가수분해용 촉매를 개발함으로써, 많은 사람들의 삶을 상당히 개선시킬 수 있다. 또한, 텍사피린 착물을 이러한 신경제에 노출된 적이 있는 환자를 위한 치료제로서 개발할 수 있다. 여기서, 중요한 특징은 텍사피린이 포스페이트 에스테르를 신속하게 가수분해시키는 것으로 공지되어 있다는 사실이다.

<321> 하기 문헌을 본원에 참고로서 관련 부분에 인용하였다[참조 : Agrawal, S., and Tang, J.Y., Tetrahedron Letters, 31:7541, 1990;

<322> Araki, T. et al., Liquid Membranes: Chemical Applications, CRC Press, Boca Raton, 1990;

<323> Basile, L.A. et al., J. Am. Chem. Soc. 109:7550, 1987;

<324> Breslow, Ronald and Huang, Deeng-Lih, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 :4080, 1991;

<325> Browne, Kenneth A. and Bruice, Thomas C., J. Am. Chem. Soc., 114(13) :4951, 1992;

<326> Chin, Jik and Banaszczyk, Mariusz, J. Am. Chem. Soc., 111:4103-4105, 1989;

<327> Chin, Jik and Banaszczyk, Mariusz, J. Am. Chem. Soc., 111:2724, 1989;

<328> Chin, Jik et al. J. Am. Chem. Soc., 111:186-190, 1989;

<329> Chin, Jik and Zou, Xiang, Can J. Chem., 65:1882, 1987;

<330> Dange, et al., Science, 248:585-588, 1990;

<331> Eichhorn, G. L., Butzow, J. J Biopolymers, 3:79-94, 1965;

<332> England, T. E.; Uhlenbeck, O. C, Biochemistry, 17:2069-2076, 1978;

<333> Furuta et al., J. Amer. Chem. Soc., 113:6677, 1991;

<334> Hayashi, N., et al., Inorg, Chem., 32:5899-5900, 1993;

<335> Hendry, Philip and Sargeson, Alan M., J. Amer. Chem. Soc., 111:2521, 1989;

<336> Kazakov, S.; Altman, S. Proc, Natl. Acad. Sci. USA 89:7939:7943, 1992;

<337> Kim, Jung Hee and Chin, Jik, J. Am. Chem. Soc., 114:9792-9795, 1992;

<338> Kolasa, et al., Inorg. Chem., 32:3983-3984, 1993;

<339> Komiyama, Makoto et al., J. Chem. Soc., Chem. Commun., pp, 640-641, 1992;

<340> Kuchino, Y. Methods in Enymology, 180:154-163, 1989;

<341> Menger, F. M. et al., J. Am. Chem. Soc., 109:2800, 1987;

<342> Modak, Anil S. et al., J. Am. Chem. Soc., 113:283, 1991:

<343> Morrow, J. R. et al., J. Am. Chem. Soc., 114:1903, 1992;

<344> Morrow, et al., Inorg. Chem., 32:4566-4572, 1993;

<345> Ranganathan, Darshan et al., J. Chem. Soc., Chem. Commun, 4:337, 1993;

<346> Schneider, et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 32:1716-1719, 1993:

<347> Sessler et al., Synlett, pp. 127, 1991;

<348> Sessler, J. L. and Burrell, A. K., Top. Curr. Chem. Rev., 161:179, 1991;

<349> Sessler et al., Tetredron, 48:9661, 1992;

<350> Shelton, Valerie and Morrow, Janet R., Inorg. Chem., 30:4295, 1991;

<351> Stern, Michael K. et al., J. Am. Chem. Soc., 112:5357, 1990;

<352> Sumaoka Jun et al., J. Chem. Soc. Chem. Commun., pp. 1707-1708, 1992,

<353> Chung, Yongseog et al., Tetrahedron Letters, 31:5413, 1990;

<354> 미합중국 특허 제5,159,065호; 미합중국 특허 제5,120,411호; 및 미합중국 특허 제5,041,078호]

<355> 본원에 기술된 실시예 및 양태는 단지 예시를 목적으로 하고, 발명의 양태내의 다양한 변형이 당해 기술분야의 숙련가에 의해 제안될 것이며, 이러한 다양한 변형이 본 특허원의 범주 및 범위, 및 첨부된 특허청구의 범위에 포함됨을 주지한다.

<356> 서열 목록

<357> (1) 일반 정보 :

<358> (i) 출원인 :

<359> 성명 : 보오드 오브 리전츠, 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템(BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM)

<360> 거리명 : 웨스트 7번 스트리트 201

<361> 도시명 : 오스틴

<362> 주명 : 텍사스

<363> 국명 : 미합중국

<364> 우편 번호 : 78701

<365> 전화 번호 : (512)499-4462

<366> FAX : (512)499-4523

<367> 성명 : 파마사이클릭스, 인코포레이티드(PHARMACYCLICS, INC)

<368> 거리명 : 이스트 아르쿠에스 애비뉴 995

<369> 도시명 : 서니베일

<370> 주명 : 캘리포니아

<371> 국명 : 미합중국

<372> 우편 번호 : 94086-4593

<373> 전화 번호 : (408)774-0330

<374> FAX : (408)774-0340

<375> (ii) 발명자 : 조나단 엘. 세슬러
<376> 다니엘 에이. 스미쓰
<377> 리챠드 밀러
<378> 케빈 로쓰
<379> 메레디트 라이트
<380> 그레고리 더블유. 헴미
<381> 월리암 씨. 다우
<382> 블라디미르 크랄
<383> 브렌트 이버슨
<384> 다렌 마그다
<385> 타락 모디
<386> (iii) 발명의 명칭 : 텍사피린 금속 착물 매개된 에스테르 가수분해
<387> (iv) 서열 번호 : 16
<388> (v) 서신 왕래 주소 :
<389> (A) 주소 : 아놀드, 화이드 앤드 두키
<390> (B) 거리명 : 피.오.박스 4433
<391> (C) 도시명 : 휴스톤
<392> (D) 주명 : 텍사스
<393> (E) 국가명 : 미합중국
<394> (F) 우편 번호 : 77210
<395> (vi) 컴퓨터 판독 형태 :
<396> (A) 매체 형태 : 플로피 디스크
<397> (B) 컴퓨터 : IBM PC 호환
<398> (C) 운영 시스템 : PC-DOS/MS-DOS/ASCII
<399> (vii) 현재의 출원 자료 :
<400> (A) 출원 번호 : 미확인
<401> (B) 출원일 : 본원과 동시
<402> (C) 분류 번호 : 미확인
<403> (viii) 선행 출원 자료 :
<404> (A) 출원 번호 : USSN 08/075,123
<405> (B) 출원일 : 1993. 6. 9.
<406> (C) 분류 번호 : 미확인
<407> (A) 출원 번호 : USSN 08/227,370
<408> (B) 출원일 : 1994. 4. 14.
<409> (C) 분류 : 미확인
<410> (ix) 변리사/대리인 정보 :
<411> (A) 성명 : 데이비드 엘. 파커
<412> (B) 등록 번호 : 32,165
<413> (C) 참조 문헌/ 서류 번호 : UTFB570P--
<414> (ix) 전화 통신 정보 :
<415> (A) 전화 : 512/320-7200
<416> (B) FAX : 713/789-2679
<417> (C) 텔렉스 : 79-0924
<418> (2) 서열 확인 번호 1에 대한 정보 :
<419> (i) 서열 특징 :

<420> (A) 길이 : 20개 염기 쌍
<421> (B) 유형 : 핵산
<422> (C) 본쇄성 : 일본쇄
<423> (D) 형태 : 선형
<424> (ii) 분자 유형 : DNA(게놈성)
<425> (xi) 서열 기술 : 서열 확인 번호 1 :

CTCGGCCATA GCGAATGTTC 20

<427> (2) 서열 확인 번호 2에 대한 정보 :
<428> (i) 서열 특징 :
<429> (A) 길이 : 20개 염기 쌍
<430> (B) 유형 : 핵산
<431> (C) 본쇄성 : 일본쇄
<432> (D) 형태 : 선형
<433> (ii) 분자 유형 : DNA(게놈성)
<434> (xi) 서열 기술 : 서열 확인 번호 2 :

CATCTGTGAG CCGGGTGTTG 20

<436> (2) 서열 확인 번호 3에 대한 정보 :
<437> (i) 서열 특징 :
<438> (A) 길이 : 31개 염기 쌍
<439> (B) 유형 : 핵산
<440> (C) 본쇄성 : 일본쇄
<441> (D) 형태 : 선형
<442> (ii) 분자 유형 : RNA(게놈성)
<443> (xi) 서열 기술 : 서열 확인 번호 3 :

GAACAUUCGC UAUGGCCGAG AAGAUGUCAC C 31

<445> (2) 서열 확인 번호 4에 대한 정보 :
<446> (i) 서열 특징 :
<447> (A) 길이 : 26개 염기 쌍
<448> (B) 유형 : 핵산
<449> (C) 본쇄성 : 일본쇄
<450> (D) 형태 : 선형
<451> (ii) 분자 유형 : RNA(게놈성)
<452> (xi) 서열 기술 : 서열 확인 번호 4 :

GAACAUUCGC UAUGGCCGAG AAGAUG 26

<454> (2) 서열 확인 번호 5에 대한 정보 :
<455> (i) 서열 특징 :
<456> (A) 길이 : 12 염기 쌍
<457> (B) 유형 : 핵산
<458> (C) 본쇄성 : 일본쇄
<459> (D) 형태 : 선형
<460> (ii) 분자 유형 : RNA(게놈성)
<461> (xi) 서열 기술 : 서열 확인 번호 제5번 :

CTCGGCCATA GC 12

<463> (2) 서열 확인 번호 6에 대한 정보 :

<464> (i) 서열 특징 :
<465> (A) 길이 : 9개 염기 쌍
<466> (B) 유형 : 핵산
<467> (C) 본쇄성 : 일본쇄
<468> (D) 형태 : 선형
<469> (ii) 분자 유형 : RNA(게놈성)
<470> (xi) 서열 기술 : 서열 확인 번호 6 :

CTCGGCCAT 9

<472> (2) 서열 확인 번호 7에 대한 정보 :
<473> (i) 서열 특징 :
<474> (A) 길이 : 12개 염기 쌍
<475> (B) 유형 : 핵산
<476> (C) 본쇄성 : 일본쇄
<477> (D) 형태 : 선형
<478> (ii) 분자 유형 : RNA(게놈성)
<479> (xi) 서열 기술 : 서열 확인 번호 7 :

ATAGCGATGT TC 12

<481> (2) 서열 확인 번호 8에 대한 정보 :
<482> (i) 서열 특칭 :
<483> (A) 길이 : 30개 염기 쌍
<484> (B) 유형 : 핵산
<485> (C) 본쇄성 : 일본쇄
<486> (D) 형태 : 선형
<487> (ii) 분자 유형 : RNA(게놈성)
<488> (xi) 서열 기술 : 서열 확인 번호 8 :

GAACAUUCGC UAUGGCCGAG AAGAUGUCAC 30

<490> (2) 서열 확인 번호 9에 대한 정보 :
<491> (i) 서열 특징 :
<492> (A) 길이 : 10개 염기 쌍
<493> (B) 유형 : 핵산
<494> (C) 본쇄성 : 일본쇄
<495> (D) 형태 : 선형
<496> (ii) 분자 유형 : RNA(게놈성)
<497> (xi) 서열 기술 : 서열 확인 번호 9 :

ATAGCGATGT 10

<499> 2) 서열 확인 번호 10에 대한 정보 :
<500> (i) 서열 특징 :
<501> (A) 길이 : 13개 염기 쌍
<502> (B) 유형 : 핵산
<503> (C) 본쇄성 : 일본쇄
<504> (D) 형태 : 선형
<505> (ii) 분자 유형 : DNA(게놈성)

<506> (xi) 서열 기술 : 서열 확인 번호 10 :

TAGCGAATCT TTC 13

<508> (2) 서열 확인 번호 11에 대한 정보 :

<509> (i) 서열 특징 :

<510> (A) 길이 : 36개 염기 쌍

<511> (B) 유형 : 핵산

<512> (C) 본쇄성 : 일본쇄

<513> (D) 형태 : 선형

<514> (ii) 분자 유형 : RNA(게놈성)

<515> (xi) 서열 기술 : 서열 확인 번호 11 :

ACACACCCGG CUCACAGAUG AAGUCUCCAA AAUAAA 36

<517> (2) 서열 확인 번호 12에 대한 정보 :

<518> (i) 서열 특징 :

<519> (A) 길이 : 17개 염기 쌍

<520> (B) 유형 : 핵산

<521> (C) 본쇄성 : 일본쇄

<522> (D) 형태 : 선형

<523> (ii) 분자 유형 : DNA(게놈성)

<524> (xi) 서열 기술 : 서열 확인 번호 12 :

CTGTGAGCCG GGTGTTG 17

<526> (2) 서열 확인 번호 13에 대한 정보 :

<527> (i) 서열 특징 :

<528> (A) 길이 : 16개 염기 쌍

<529> (B) 유형 : 핵산

<530> (C) 본쇄성 : 일본쇄

<531> (D) 형태 : 선형

<532> (ii) 분자 유형 : DNA(게놈성)

<533> (xi) 서열 기술 : 서열 확인 번호 13 :

TTTATTTTGG AGACTT 16

<535> (2) 서열 확인 번호 14에 대한 정보 :

<536> (i) 서열 특징 :

<537> (A) 길이 : 16개 염기 쌍

<538> (B) 유형 : 핵산

<539> (C) 본쇄성 : 일본쇄

<540> (D) 형태 : 선형

<541> (ii) 분자 유형 : DNA(게놈성)

<542> (xi) 서열 기술 : 서열 확인 번호 14 :

TGGACGGGG GTGTTG 16

<544> (2) 서열 확인 번호 16에 대한 정보 :

<545> (i) 서열 특징 :

<546> (A) 길이 : 18개 염기 쌍

<547> (B) 유형 : 핵산

<548> (C) 본쇄성 : 일본쇄

<549> (D) 형태 : 선형

<550> (ii) 분자 유형 : RNA(게놈성)

<551> (xi) 서열 기술 : 서열 확인 번호 15 :

TCTGTGAGCC GGGTGTTG 18

<553> (2) 서열 확인 번호 16에 대한 정보 :

<554> (i) 서열 특징 :

<555> (A) 길이 : 19개 염기 쌍

<556> (B) 유형 : 핵산

<557> (C) 본쇄성 : 일본쇄

<558> (D) 형태 : 선형

<559> (ii) 분자 유형 : DNA(게놈성)

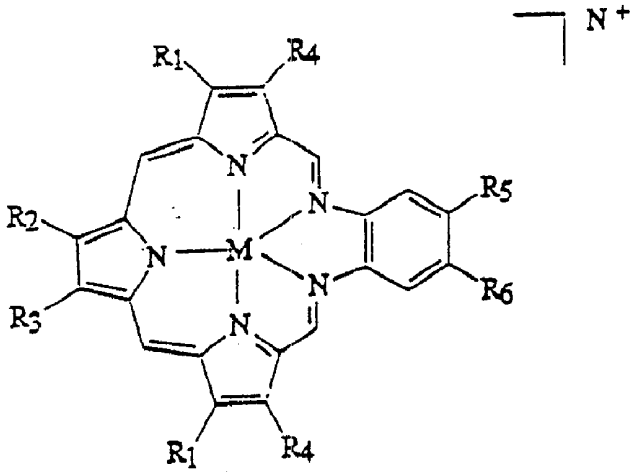
<560> (xi) 서열 기술 : 서열 확인 번호 16 :

ATCTGTGAGC CGGGTGTTG 19

(57) 청구의 범위

청구항 1

하기 일반식의 텍사피린,



상기 식에서,

M은 Ca^{+2}, Mn^{+2}, Co^{+2}, Ni^{+2}, Zn^{+2}, Cd^{+2}, Hg^{+2}, Fe^{+2}, Sm^{+2} 및 UO_2^{+2}로 이루어진 그룹중에서 선택된 2가 금속 양이온 또는 Mn^{+3}, Co^{+3}, Ni^{+3}, Fe^{+3}, Ho^{+3}, Ce^{+3}, Y^{+3}, In^{+3}, Pr^{+3}, Nd^{+3}, Sm^{+3}, Eu^{+3}, Gd^{+3}, Tb^{+3}, Dy^{+3}, Er^{+3}, Tm^{+3}, Yb^{+3}, Lu^{+3}, La^{+3} 및 U^{+3}으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 3가 금속 양이온이고,

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 및 R_6은 독립적으로 수소, 하이드록실, 알킬, 하이드록시 알킬, 알콕시, 하이드록시알콕시, 사카라이드, 카복시알킬, 카복시아미드알킬, 또는 올리고뉴클레오티드, 호르몬, 항체 및 사프피린 분자로부터 선택되는 부위-지시된 분자, 또는 이미다졸, 구아니딘, 아미노산, 아미노산 유도체, 폴리아미노산, 아미노-치환된 사카라이드 및 텍사피린 금속 착물로부터 선택되는 촉매 그룹, 또는 상기 부위-지시된 분자 또는 촉매 그룹에 결합된, 아미드, 티올, 티오 에테르 및 에테르 공유 결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 커플이며, R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 및 R_6 중의 하나 이상은 상기 부위-지시된 분자, 촉매 그룹, 또는 부위-지시된 분자 또는 촉매 그룹에 결합된 커플이고,

N은 2 이하의 정수이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 부위-지시된 분자가 올리고뉴클레오티드인 텍사피린.

청구항 3

제1항에 있어서, 부위-지시된 분자가 이미다졸, 구아니딘, 아미노산, 아미노산 유도체, 폴리아미노산, 아미노-치환된 사카라이드 및 텍사피린 금속 착물로부터 선택되는 촉매 그룹에 접합된 올리고뉴클

레오티드인 텍사피린.

청구항 4

제2항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 온코진에 대해 상보적 결합 친화성을 갖는 텍사피린.

청구항 5

제2항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 가수분해될 포스페이트 에스테르 결합에 인접한 영역에서 RNA에 대해 상보적 결합 친화성을 갖는 텍사피린.

청구항 6

제1항에 있어서, R_3, R_5 및 R_6중의 하나가 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드에 결합된 아미드, 티올, 티오에테르 및 에테르 공유 결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 커플인 텍사피린.

청구항 7

제1항에 있어서, R_1이 $(CH_2)_2CH_2OH$이고, R_2 및 R_3이 CH_2CH_3이며, R_4가 CH_3이고, R_5가 올리고뉴클레오티드, 호르몬, 항체 및 사프피린 분자로부터 선택된 부위-지시된 분자, 또는 이미다졸, 구아니딘, 아미노산, 아미노산 유도체, 폴리아미노산, 아미노- 치환된 사카라이드 및 텍시피린 금속 착물로부터 선택된 촉매 그룹, 또는 상기 부위--지시된 분자 또는 촉매 그룹에 결합된 아미드, 티올, 티오에테르 및 에테르 공유결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 커플이며, R_6이 H인 텍사피린.

청구항 8

제7항에 있어서, R_5이 $O(CH_2)_nCO$-올리고뉴클레오티(여기서, n은 1 내지 7이다)인 텍사피린.

청구항 9

제1항에 있어서, R_1이 $(CH_2)_2CH_2OH$이고, R_2 및 R_3이 CH_2CH_3이며, R_4가 CH_3이고, R_5가 $(커플)_t$-부위 지시된 분자-촉매 그룹 접합체(여기서, 커플은 아미드, 티올, 티오에테르 및 에테르 공유결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 부위 지시된 분자는 올리고뉴클레오티드, 호르몬, 항체 및 사프피린 분자로부터 선택되며, 촉매 그룹은 이미다졸, 구아니딘, 아미노산, 아미노산 유도체, 폴리아미노산, 아미노-치환된 사카라이드 및 텍사피린 금속 착물로부터 선택되고, t는 0 또는 1이다)이며, R_6이 H인 텍사피린.

청구항 10

제9항에 있어서, R_5가 $O(CH_2)_nCO$-올리고뉴클레오티드-텍사피린 금속 착물 접합체(여기서, n은 1 내지 7이다)인 텍사피린.

청구항 11

제1항에 있어서, R_1이 $(CH_2)_2CH_2OH$이고, R_2 및 R_3이 CH_2CH_3이며, R_4가 CH_3이고, R_5가 $O(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2OCH_3$이며, R_6이 올리고뉴클레오티드, 호르몬, 항체 및 사프피린 분자로부터 선택된 부위-지시된 분자, 또는 이미다졸, 구아니딘, 아미노산, 아미노산 유도체, 폴리아미노산, 아미노-치환된 사카라이드 및 텍사피린 금속 착물로부터 선택된 촉매 그룹, 또는 상기 부위-지시된 분자 또는 촉매 그룹에 결합된 아미드, 티올, 티오에테르 및 에테르 공유결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 커플인 텍사피린.

청구항 12

제11항에 있어서, R_6이 $O(CH_2)_nCO$-올리고뉴클레오티드(여기서, n은 1 내지 7이다)인 텍사피린.

청구항 13

제1항에 있어서, R_1이 $(CH_2)_2CH_2OH$이고, R_2 및 R_3이 CH_2CH_3이며, R_4가 CH_3이고, R_5가 이미다졸, 구아니던, 아미노산, 아미노산 유도체, 폴리아미노산, 아미노-치환된 사카라키드 및 텍사피린 금속 착물로부터 선택된 촉매 그룹, 또는 이들 촉매 그룹에 결합된 아미드, 티올, 티오에테르 및 에테르 공유결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 커플이며, R_6이 올리고뉴클레오티드, 호르몬, 항체 및 사프피린 분자로부터 선택된 부위-지시된 분자 또는 상기 부위-지시된 분자에 결합된 아미드, 티올, 티오에테르 및 에테르 공유결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 커플인 텍사피린.

청구항 14

제1항에 있어서, R_1 내지 R_6이, 하기 표에 기재한 텍사피린 A3 내지 A6, A8 내지 A12, A19, A21, A22 및 A24 내지 A29에 대해 정의한 바와 같은 텍사피린.

TXP	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
A3	$CH_2(CH_2)_2OH$	CH_2CH_3	CH_2CH_3	CH_3	$O(CH_2)_nCON$-링커-부위-지시된 분자, n=1-7	$O(CH_2CH_2O)_3CH_3$
A4	"	"	"	"	$O(CH_2)_nCON$-링커-부위-지시된 분자	H
A5	"	"	"	"	OCH_2CO-폴리-L-리신	"
A6	"	"	"	"	OCH_2CO-호르몬	"
A8	"	"	"	"	OCH_2CON-링커-부위-지시된 분자	$O(CH_2CH_2O)_3CH_3$
A9	"	"	"	"	OCH_2CO-호르몬	"
A10	"	"	"	"	OCH_2CON-올리고뉴클레오티드	$O(CH_2CH_2O)_3CH_2$-CH_2-N-이미다졸
A11	"	"	"	"	$O(CH_2CH_2O)_{120}CH_3$	"

TXP	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
A12	"	"	"	"	사카라이드	H
A19	CH_2CH_3	"	"	"	OCH_2CO_2-글루코스아민	H
A21	$CH_2(CH_2)_2OH$	"	"	"	$(CH_2)_n$-CON-링커-부위-지시된 분자, n=1-7	"
A22	"	"	"	"	$YCOCH_2$-링커-부위-지시된 분자, Y=NH,O	"
A24	CH_2CH_3	CH_3	CH_2CH_2CON-올리고뉴클레오티드	"	$O(CH_2)_2CH_2OH$	$O(CH_2)_2CH_2OH$
A25	$CH_2(CH_2)_2OH$	CH_2CH_3	CH_2CH_3	"	OCH_2COOH	$O(CH_2CH_2O)_3CH_2$-CH_2-N-이미다졸
A26	"	"	"	"	$O(CH_2)_3CO$-히스타민	H
A27	"	"	"	"	$O(CH_2)_3CO$-아르기닌 메틸 에스테르	"
A28	"	"	"	"	$O(CH_2)_nCO$-아미노산, n=1-7	"
A29	"	"	"	"	$O(CH_2)_nCON$-촉매 그룹, n=1-7	"

상기 표에서,

부위-지시된 분자는 올리고뉴클레오티드, 호르몬, 항체 및 사프피린 분자로 부터 선택되고,

촉매 그룹은 이미다졸, 구아니딘, 아미노산, 아미노산 유도체, 폴리아미노산, 아미노-치환된 사카라이드 및 텍사피린 금속 착물로부터 선택되며,

링커는 아미드, 티올, 티오에테르 및 에테르 공유결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

청구항 15

제1항, 제6항 내지 제12항, 제13항 및 제14항 중의 어느 한 항에 있어서, 금속이 란타나이드 양이온인 텍사피린.

청구항 16

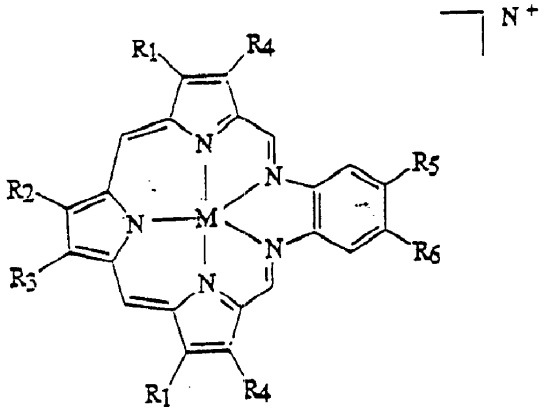
제1항, 제6항 내지 제12항, 제13항 및 제14항 중의 어느 한 항에 있어서, 금속이 Eu(III) 또는 Dy(III)인 텍사피린.

청구항 17

텍사피간 금속 착물을 포함하는 포스페이트 에스테르 가수분해제.

청구항 18

제17항에 있어서, 텍사피린 금속 착물이 하기 일반식을 갖는 가수분해제.



상기 식에서,

M은 수용액에서 에스테르 결합 가수분해를 촉매하는 2가 또는 3가 금속 양이온이고,

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 및 R_6은 독립적으로 수소, 하이드록실, 알킬, 하이드록시알킬, 알콕시 하이드록시알콕시, 사카라이드, 카복시알킬, 카복시아미드알킬, 또는 올리고뉴클레오티드, 호르몬, 항체 및 사프피린 분자로부터 선택된 부위-지시된 분자, 또는 이미다졸, 구아니딘, 아미노산, 아미노산 유도체, 폴리아미노산, 아미노-치환된 사카라이드 및 텍사피린 금속 착물로부터 선택된 촉매 그룹, 또는 상기 부위-지시된 분자 또는 촉매 그룹에 결합된 아미드, 티올, 티오에테르 및 에테르 공유결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 커플이며,

N은 2 이하의 정수이다.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 포스페이트 에스테르가 RNA인 가수분해제.

청구항 20

제18항에 있어서, R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 및 R_6 중의 하나 이상이 올리고뉴클레오티드, 호르몬, 항체 - 및 사프피린 분자로부터 선택된 부위-지시된 분자, 또는 이미다졸, 구아니딘, 아미노산, 아미노산 유도체, 폴리아미노산, 아미노-치환된 사카라이드 및 텍사피린 금속 착물로부터 선택된 촉매 그룹, 또는 상기 부위-지시된 분자 또는 촉매 그룹에 결합된 아미드, 티올, 티오에테르 및 에테르 공유결합으로 이루어진 그룹으로-부터 선택된 커플인 가수분해제.

청구항 21

제20항에 있어서, 부위-지시된 분자가 올리고뉴클레오티드인 가수분해제.

청구항 22

제20항에 있어서, 부위-지시된 분자가 올리고데옥시리보뉴클레오티드인 가수분해제.

청구항 23

제21항에 있어서, 포스페이트 에스테르가 RNA이고, 올리고뉴클레오티드가 가수분해될 포스페이트 에스테르 결합에 인접한 영역에서 RNA에 대해 상보적 결합 친화성을 갖는 것인 가수분해제

청구항 24

제20항에 있어서, R_3, R_5 및 R_6중의 하나가 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드에 결합된 아미드, 티올, 티오에테르 및 에테르 공유결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 커플인 가수분해제.

청구항 25

제18항에 있어서, R_1이 $(CH_2)_2CH_2OH$이고, R_2 및 R_3이 CH_2CH_3이며, R_4가 CH_3이고, R_5 및 R_6 이 $OCH_2CH_2CH_2OH$인 가수분해제.

청구항 26

제18항에 있어서, R_1이 $(CH_2)_2CH_2OH$이고, R_2 및 R_3이 CH_2CH_3이며, R_4가 CH_3이고, R_5가 이미다졸, 구아니딘, 아미노산 아미노산 유도체 폴리아미노산, 아미노-치환된 사카라이드 및 텍사피린 금속 착물로부터 선택된 촉매 그룹, 또는 이들 촉매 그룹에 결한된 아미드, 티올, 티오에테르 및 에테르 공유결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 커플이며, R_6이 올리고뉴클레오티드, 호르몬, 항체 및 사프피린 분자로부터 선택된 부위-지시된 분자 또는 이들 부위-지시된 분자에 결합된 아미드, 티올, 티오에테르 및 에테르 공유결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 커플인 가수분해제.

청구항 27

제18항에 있어서, R1 내지 R6가 하기 표의 텍사피린 A1 내지 A29에 대해 기재한 바와 같은 것인 가수분해제.

TXP	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
A1	$CH_2(CH_2)_2OH$	CH_2CH_3	CH_2CH_3	CH_3	$O(CH_2)_3OH$	$O(CH_2)_3OH$
A2	〃	〃	〃	〃	$O(CH_2CH_2O)_3CH_3$	$O(CH_2CH_2O)_3CH_3$
A3	〃	〃	〃	〃	$O(CH_2)_nCON$-링커-부위-지시된 분자, n=1-7	〃
A4	〃	〃	〃	〃	$O(CH_2)_nCON$-링커-부위 지시된 분자	H
A5	〃	〃	〃	〃	OCH_2CO-폴리-L-리신	〃
A6	〃	〃	〃	〃	OCH_2CO-호르몬	〃
A7	〃	〃	〃	〃	$O(CH_2CH_2O)_3CH_3$	〃
A8	〃	〃	〃	〃	OCH_2CON-링커-부위 지시된 분자	$O(CH_2CH_2O)_3CH_3$
A9	〃	〃	〃	〃	OCH_2CO-호르몬	〃
A10	〃	〃	〃	〃	OCH_2CON-올리고뉴클레오티드	$O(CH_2CH_2O)_3CH_2-CH_2$-N-이미다졸

TXP	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
A11	"	"	"	"	$O(CH_2CH_2O)_{120}CH_3$	"
A12	"	"	"	"	사카라이드	H
A13	"	"	"	"	$OCH_2CON(CH_2CH_2OH)_2$	"
A14	"	"	"	"	$CH_2CON(CH_3)CH_2-(CHOH)_4CH_2OH$	"
A15	"	COOH	COOH	"	"	"
A16	"	$COOCH_2CH_3$	$COOCH_2CH_3$	"	"	"
A17	$CH_2CH_2CON(CH_2CH_2OH)_2$	CH_2CH_3	CH_2CH_3	"	"	"
A18	$CH_2CH_2ON(CH_3)CH_2-(CHOH)_4CH_2OH$	"	"	"	OCH_3	OCH_3
A19	CH_2CH_3	"	"	"	OCH_2CO_2-글루코스아민	H
A20	$CH_2(CH_2)_2OH$	"	"	"	$O(CH_2)_nCOOH$, n=1-7	"
A21	"	"	"	"	$(CH_2)_n$-CON-링커-부위 지시된 분자, n=1-7	"

TXP	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
A22	"	"	"	"	$YCOCH_2$-링커-부위 지시된 분자, Y=NH,O	"
A23	CH_2CH_3	CH_3	CH_2CH_2COOH	"	$O(CH_2)_2CH_2OH$	$O(CH_2)_2CH_2OH$
A24	"	"	CH_2CH_2CON- 올리고 뉴클레오티드	"	"	"
A25	$CH_2(CH_2)_2OH$	CH_2CH_3	CH_2CH_3	"	OCH_2COOH	$O(CH_2CH_2O)_3CH_2-CH_2-N-$이미다졸
A26	"	"	"	"	$O(CH_2)_3CO-$히스타민	H
A27	"	"	"	"	$O(CH_2)_3CO-$아르기닌 메틸 에스테르	"
A28	"	"	"	"	$O(CH_2)_nCO-$아미노산 n=1-7	"
A29	"	"	"	"	$O(CH_2)_nCON-$촉매 그룹, n=1-7	"

상기 표에서,

부위-지시된 분자는 올리고뉴클레오티드, 호르몬, 항체 및 사프피린 분자로 부터 선택되고,

촉매 그룹은 이미다졸, 구아니딘, 아미노산, 아미노산 유도체, 폴리아미노산, 아미노-치환된 사카라이드 및 텍사피린 금속 착물로부터 선택되며,

링커는 아미드, 티올, 티오에테르 및 에테르 공유결합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

청구항 28

제1항에 있어서, R_5 및 R_6이 알콕시, 하이드록시알킬 또는 하이드록시알콕시 그룹인 텍사피린.

청구항 29

제28항에 있어서, 하이드록시알콕시 그룹이 에테르 또는 에스테르 결합, 하이드록실 그룹, 치환된 하이드록실 그룹, 카복실 그룹 또는 치환된 카복실 그룹을 갖는 알킬 그룹인 텍사피린.

청구항 30

제29항에 있어서, R_5 및 R_6이 각각 화학식 $-O-(CH_2CH_2O)_3CH_3$을 갖는 하이드록시알콕시 그룹인 텍사피린.

요약

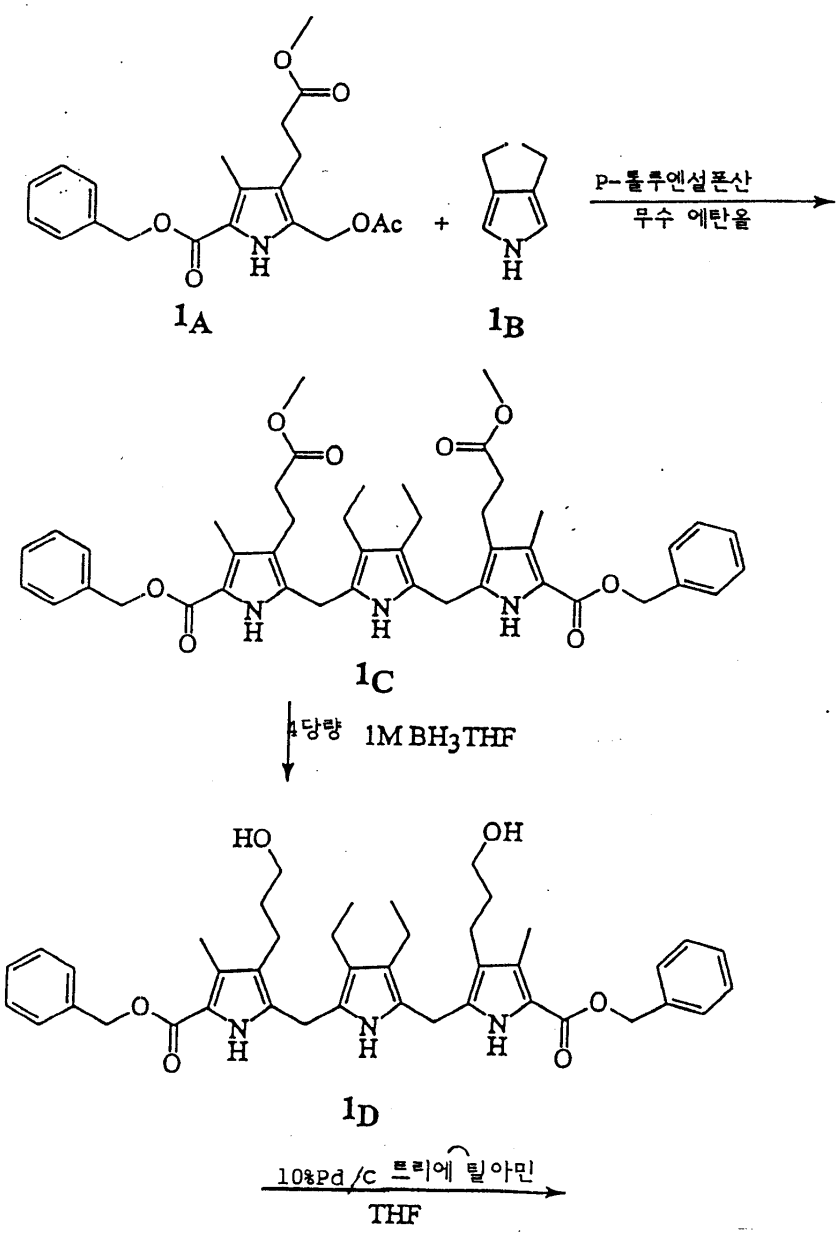
본 발명은 포스페이트 에스테르 수용액을 텍사피린 금속 착물로 항온처리함을 포함하는 포스페이트 에스테르 가수분해 방법에 관한 것이다. 금속은 수용액속에서 에스테르 결합 가수분해에 촉매 활성을 나타내는 금속 양이온, 특히 란타나이드 금속 양이온, 바람직하게는 Eu(III) 또는 Dy(III)이다. 바람직한 기질은 RNA이며, 바람직한 텍사피린은 결합 특이성을 갖는 유도화된 텍사피린, 특히 부위-지시된 분자, 바람직하게는 올리고뉴클레오티드에 공유 결합된 텍사피린이다.

대표도

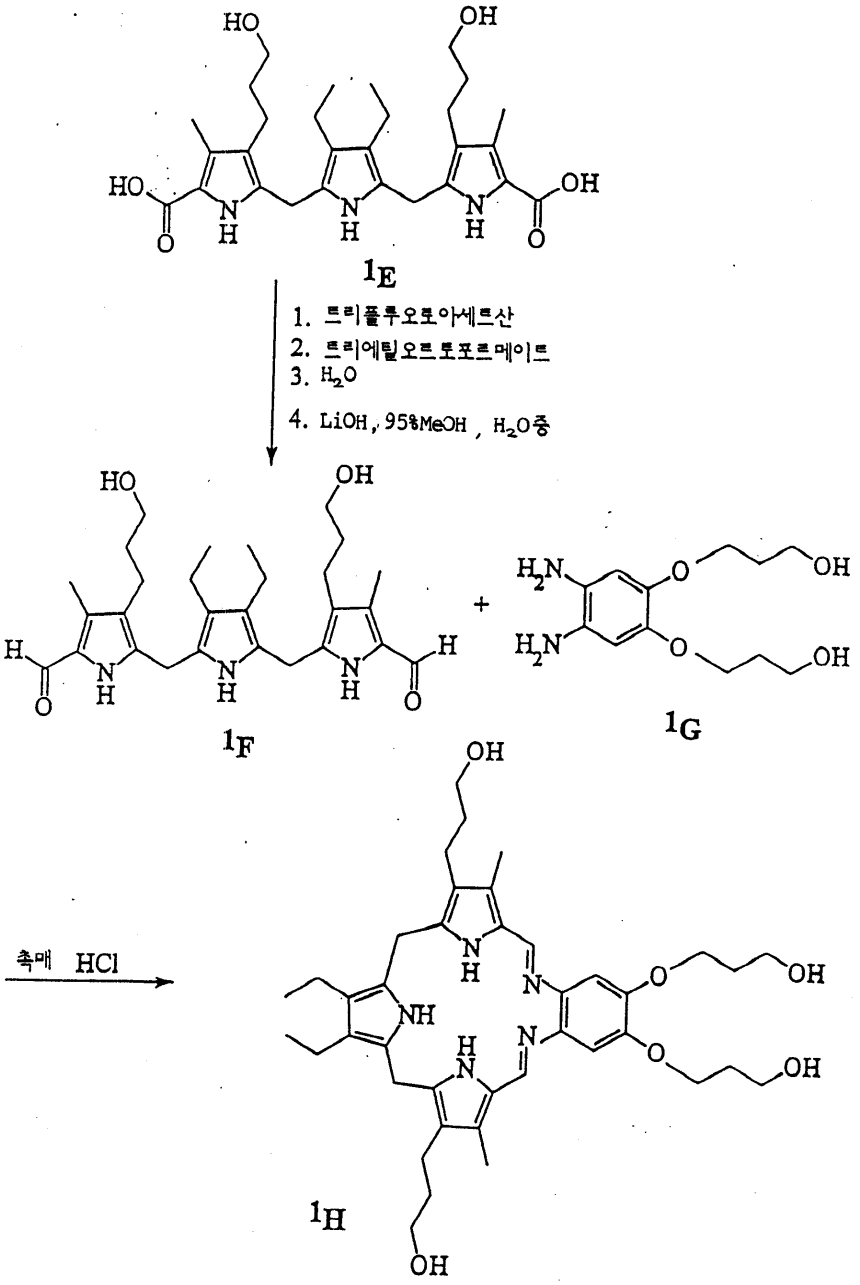
도1a

도면

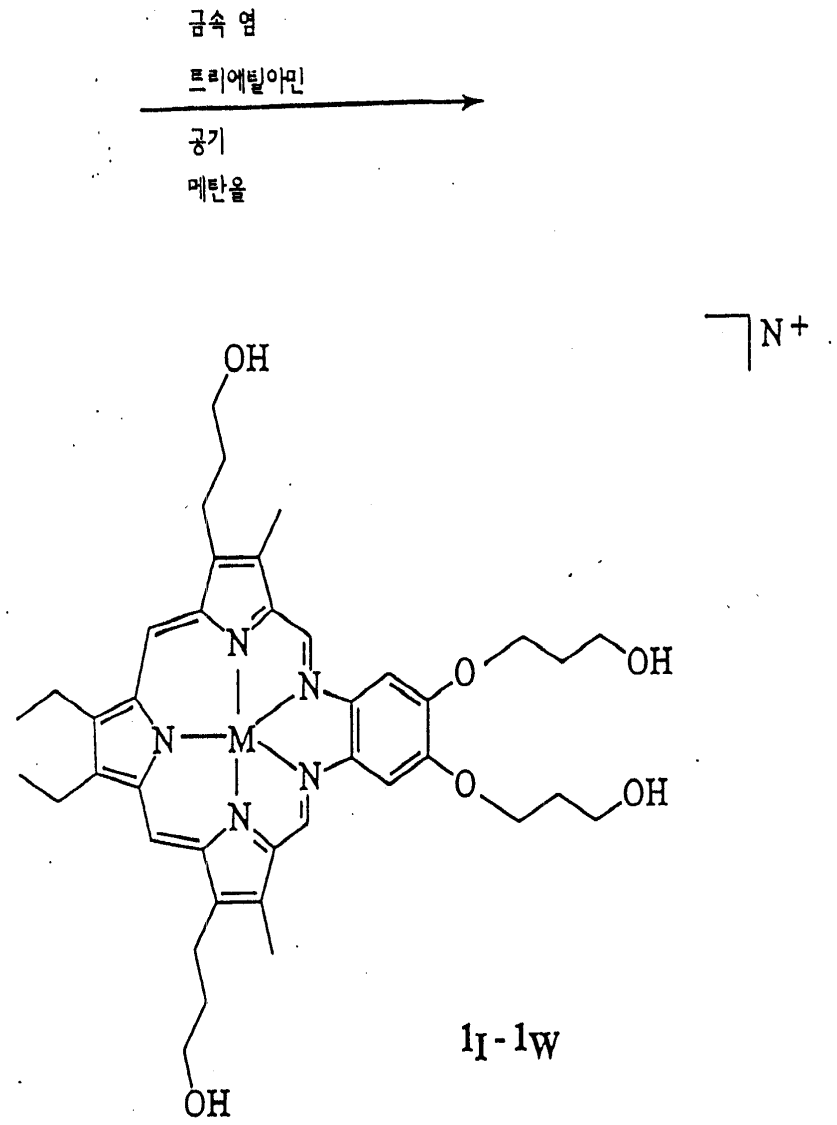
도면1a



도면1b

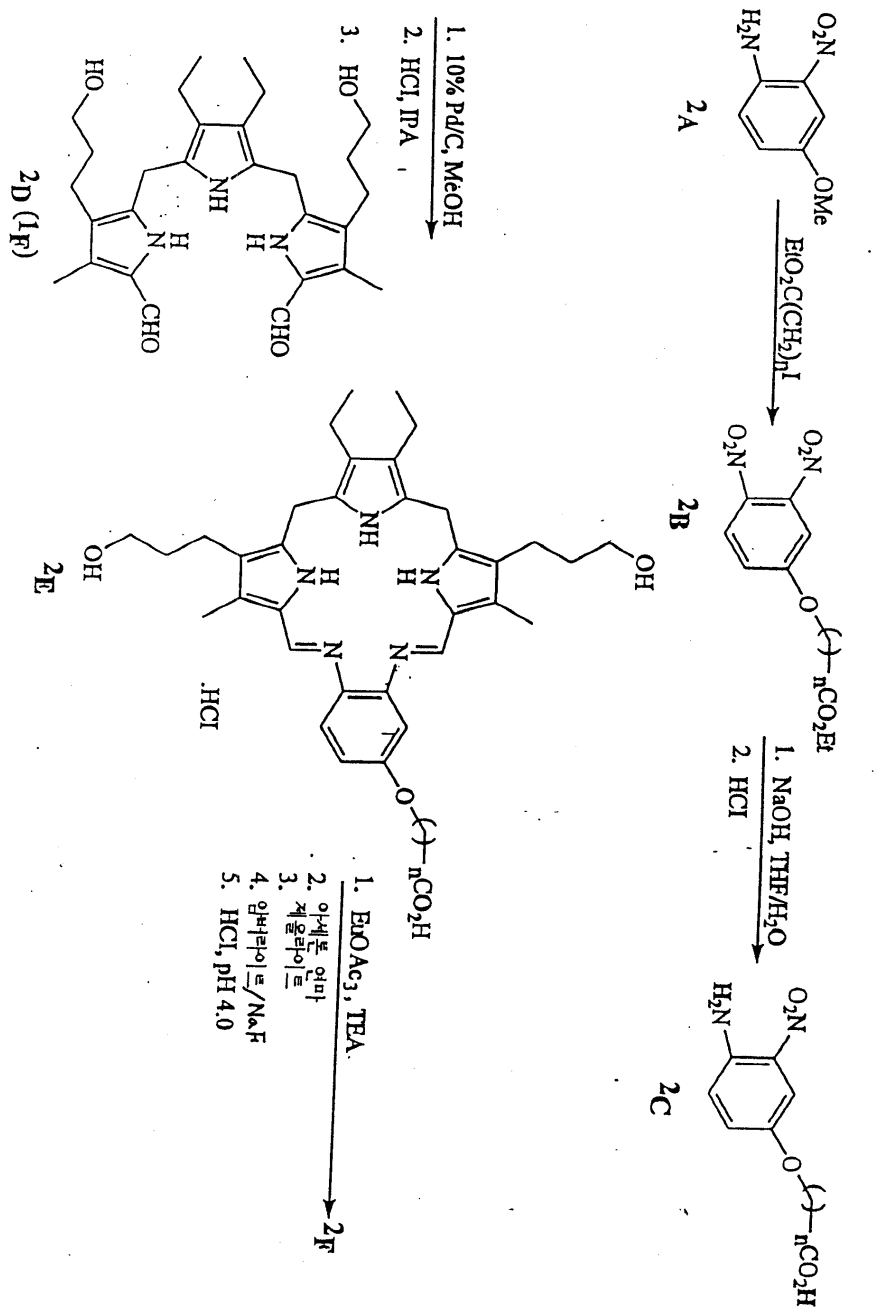

HO
OH
HO
OH
N
H
O
1E
1. 트리플루오로아세트산
2. 트리에틸오르토포르메이트
3. H2O
4. LiOH, 95%MeOH, H2O중
H
1F
+
H2N
O
OH
1G
촉매 HCl
NH
1H

도면1c

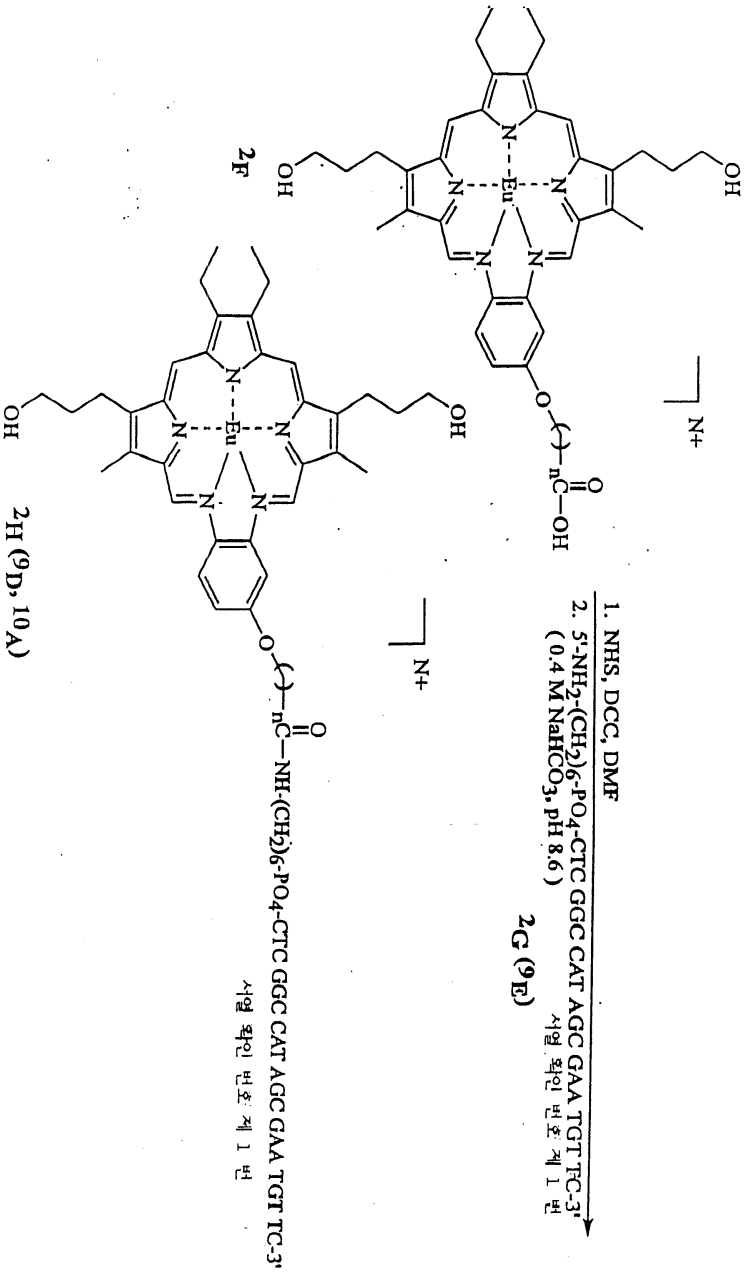


1I - 1W

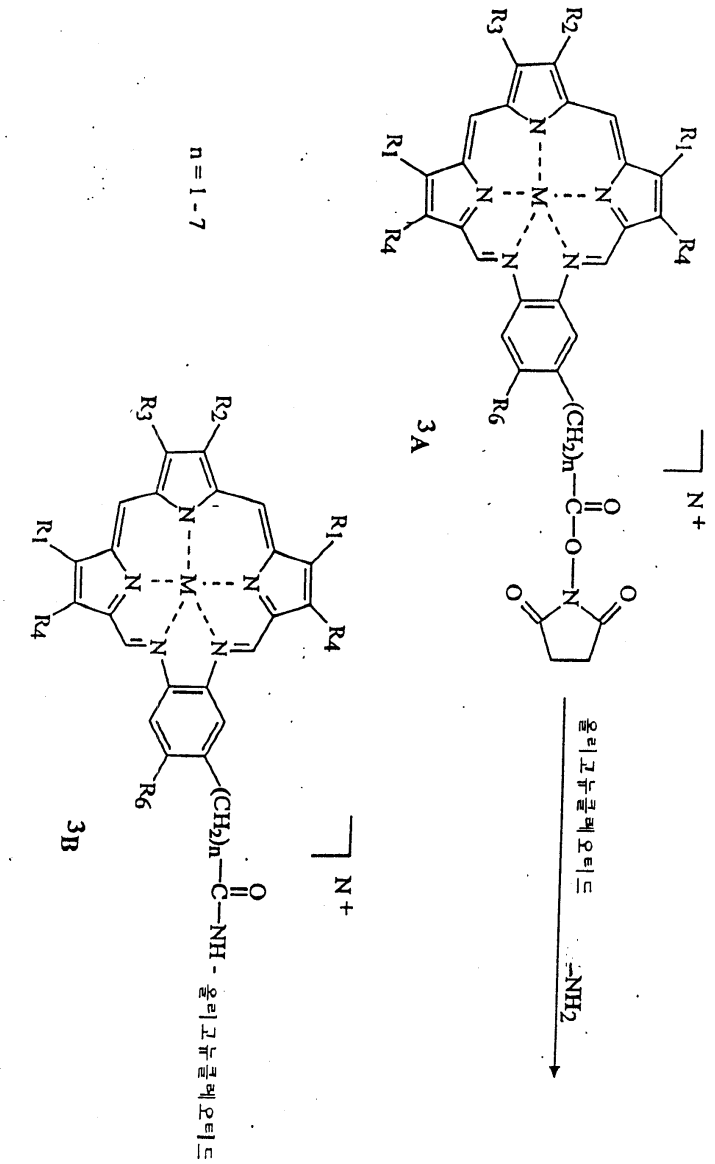
도면2a


2A
2B
2C
2D (1F)
2E
2F
EtO2C(CH2)nI
1. NaOH, THF/H2O
2. HCl
1. 10% Pd/C, MeOH
2. HCl, IPA
3. HO
1. EuOAc3, TEA
2. 아세톤 엔마
3. 제올라이트
4. 암버라이트/NaF
5. HCl, pH 4.0

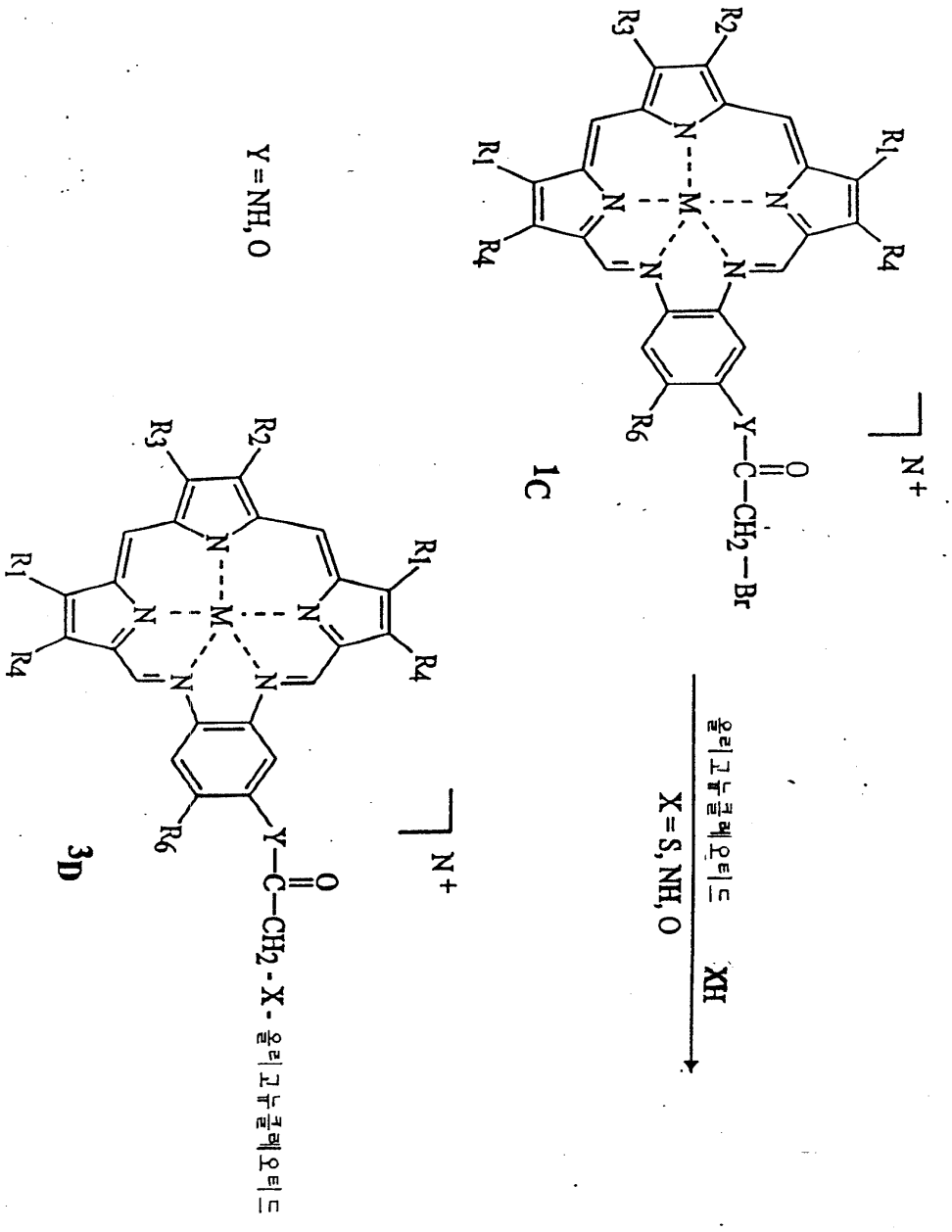
도면2b


1. NHS, DCC, DMF
2. 5'-NH2-(CH2)6-PO4-CTC GGC CAT AGC GAA TGT TC-3'
(0.4 M NaHCO3, pH 8.6)
서열 확인 번호 제 1 번
2G (9E)
2F
2H (9D, 10A)
서열 확인 번호 제 1 번
5'-NH2-(CH2)6-PO4-CTC GGC CAT AGC GAA TGT TC-3'

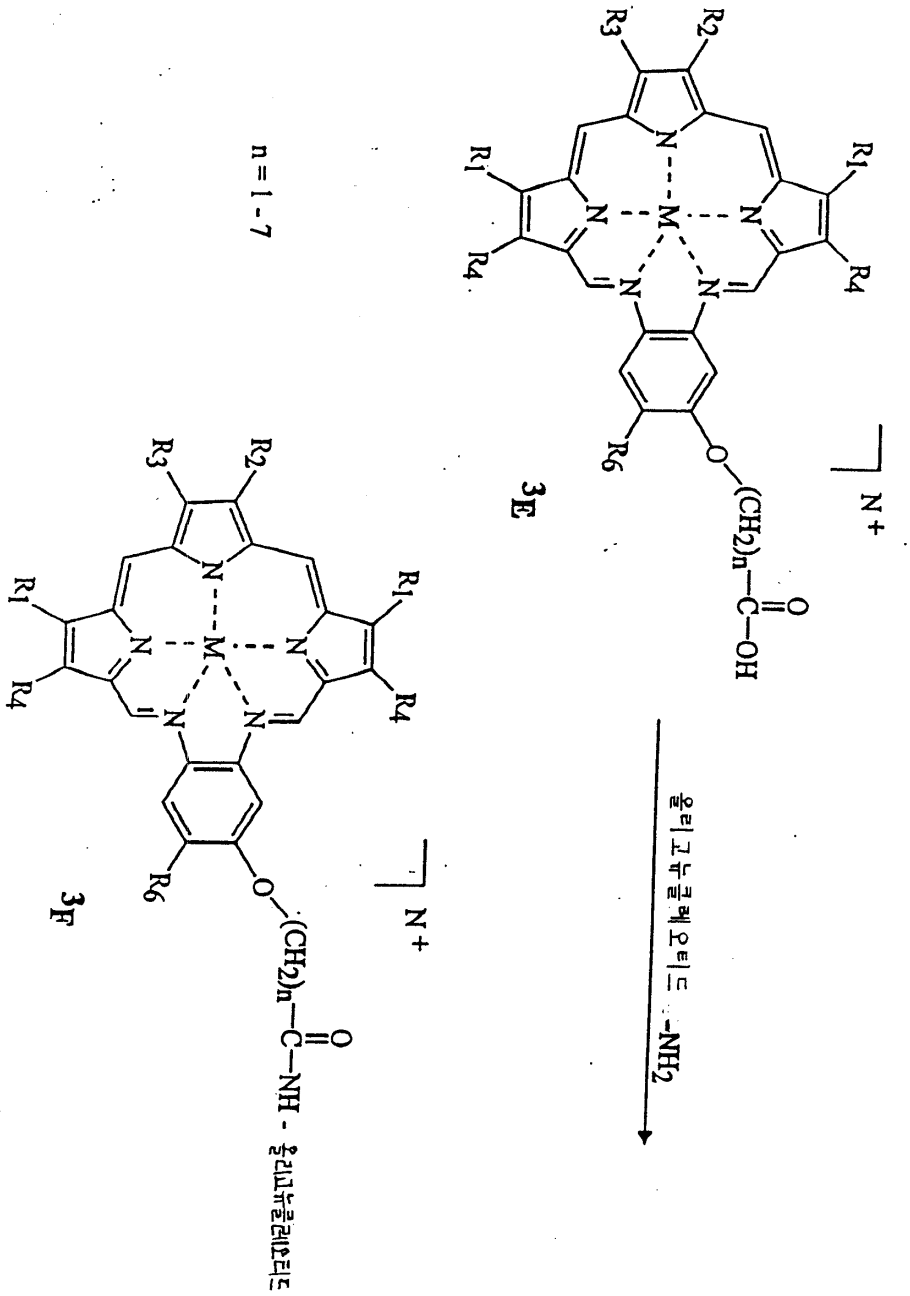
도면3a



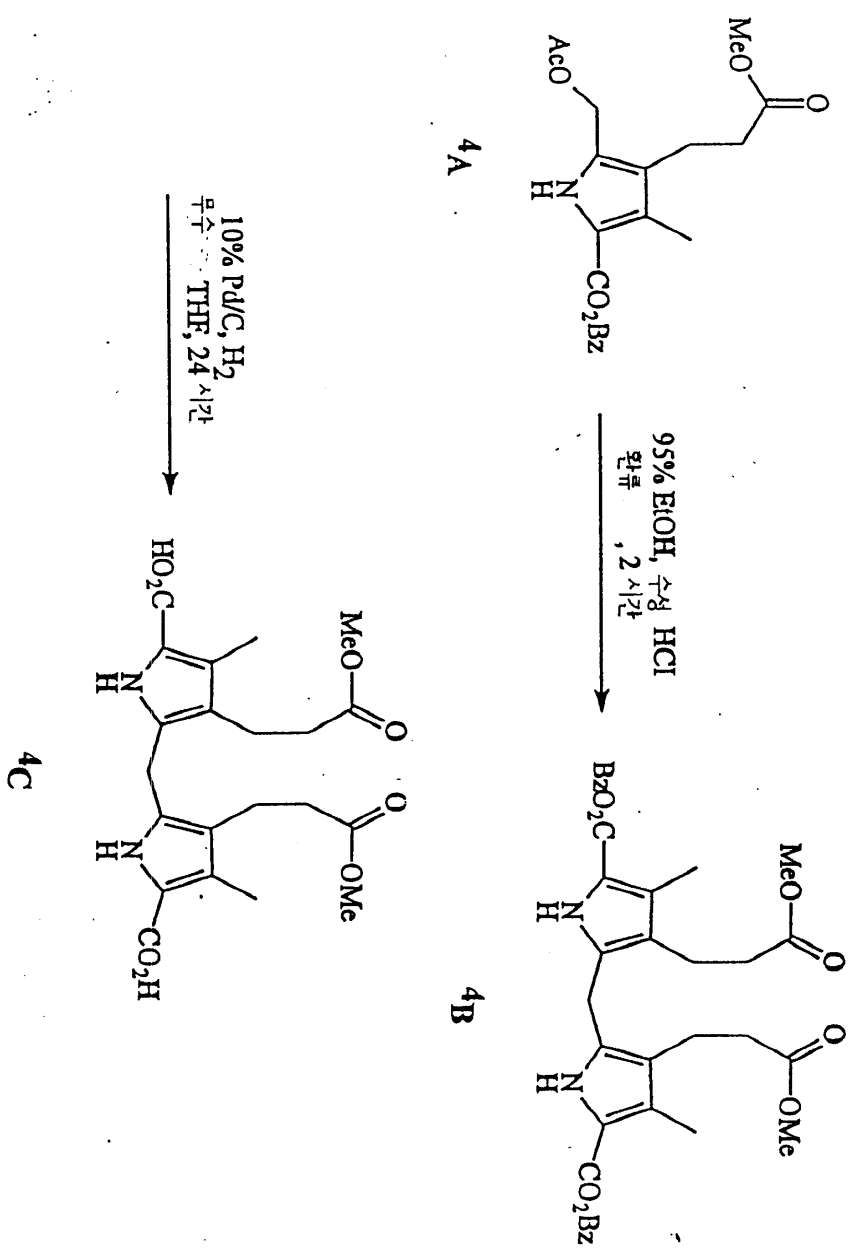
도면3b



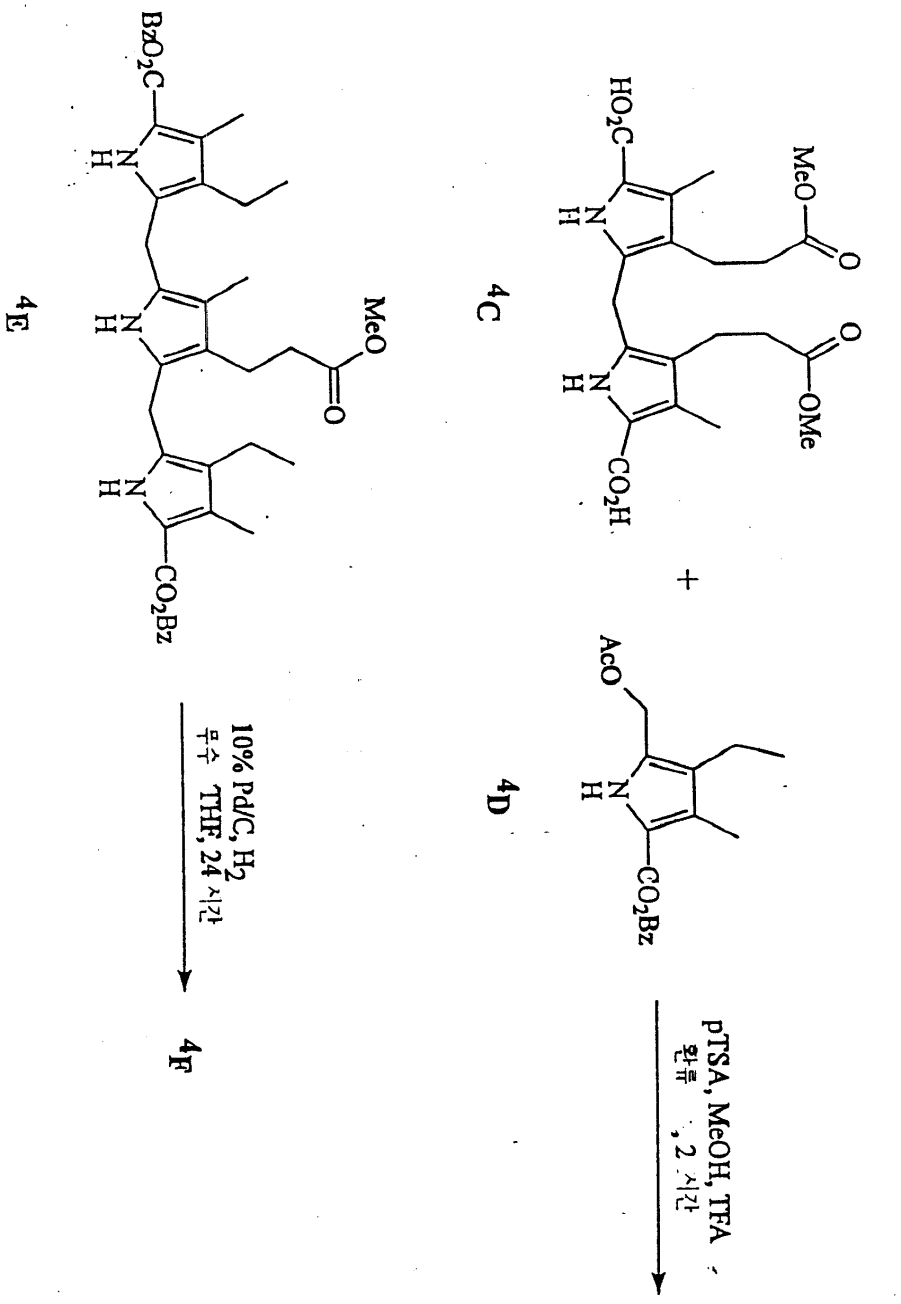
도면3c



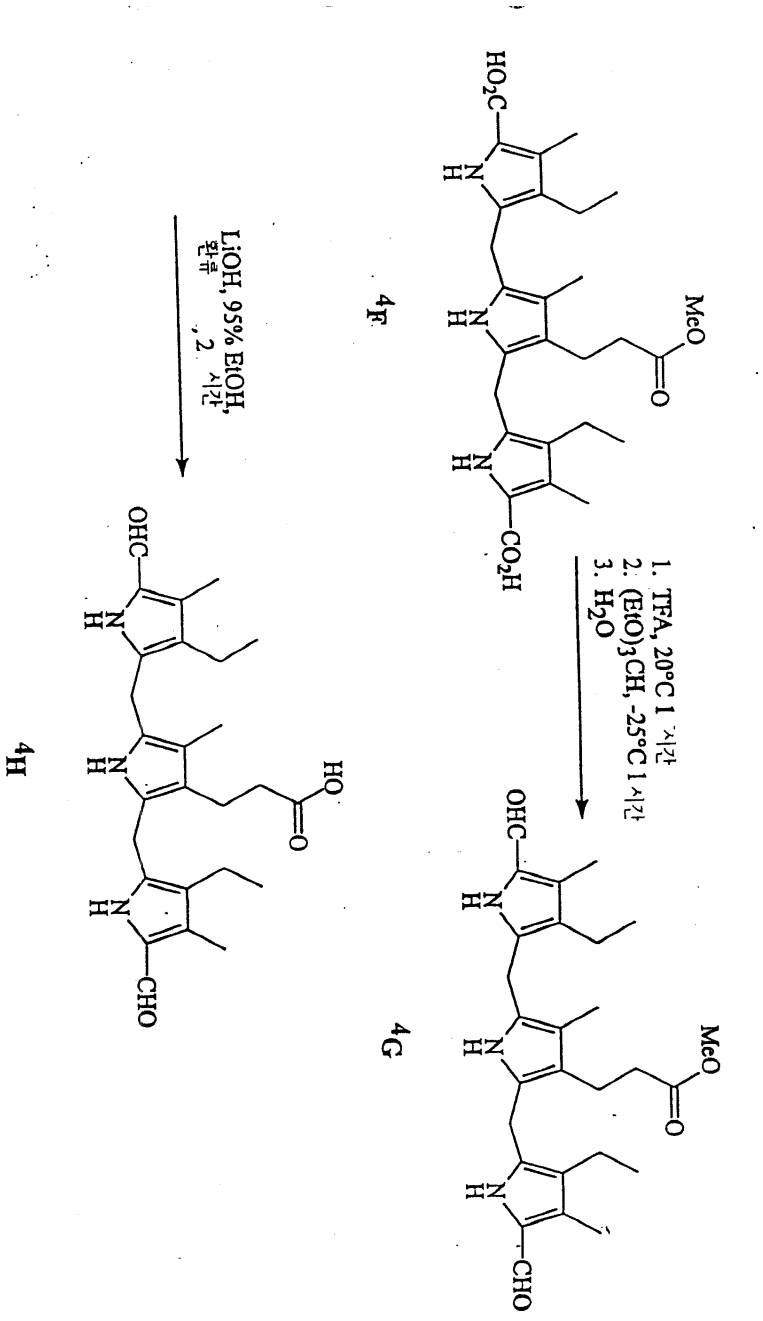
도면4a



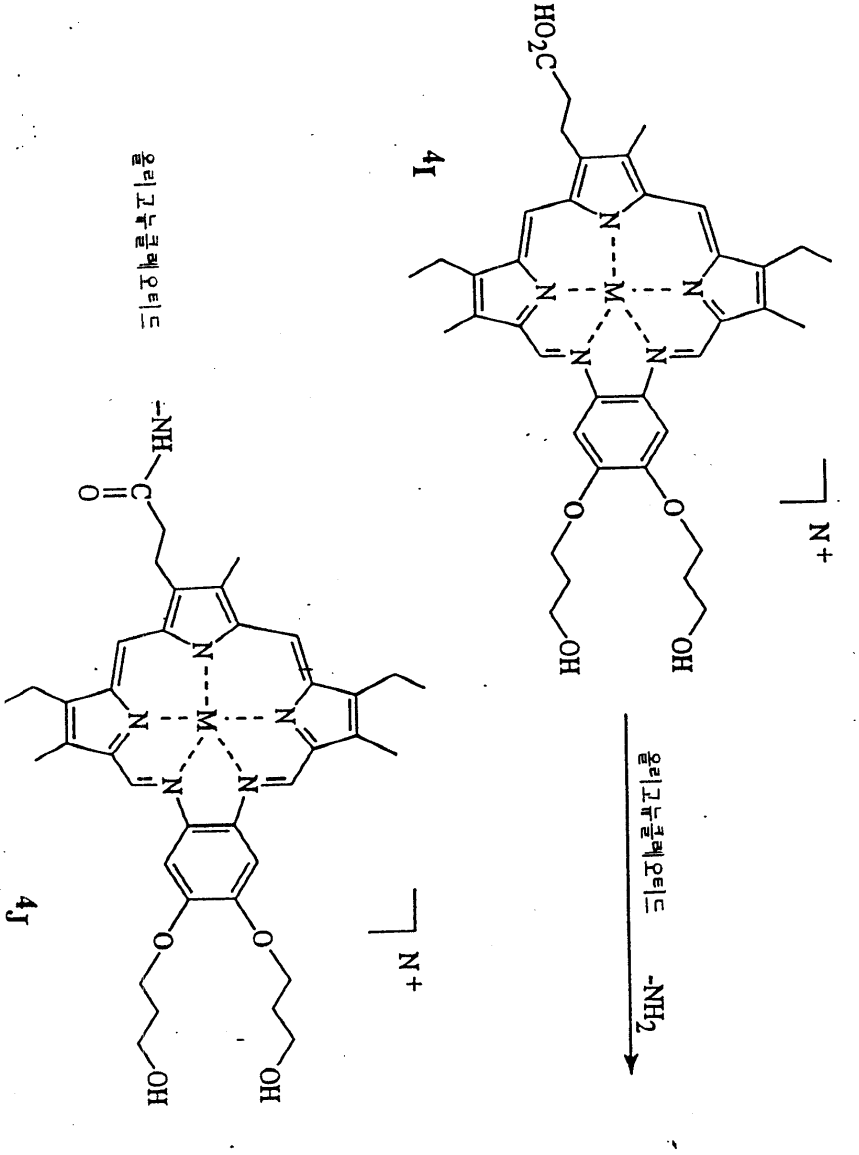
도면4b



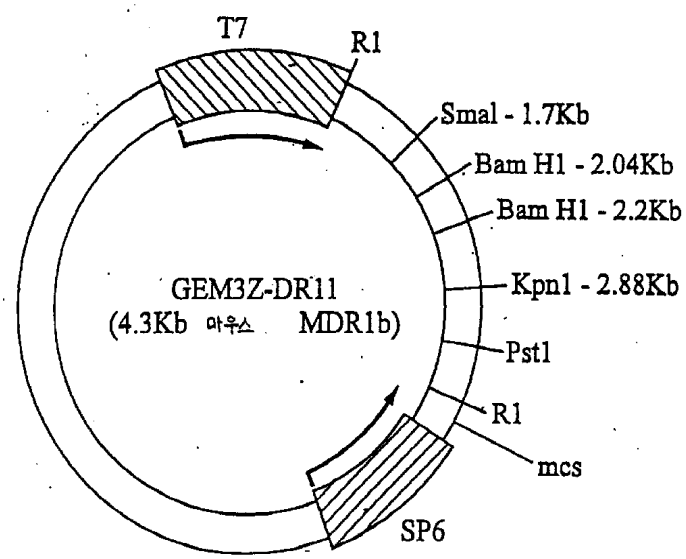
도면4c



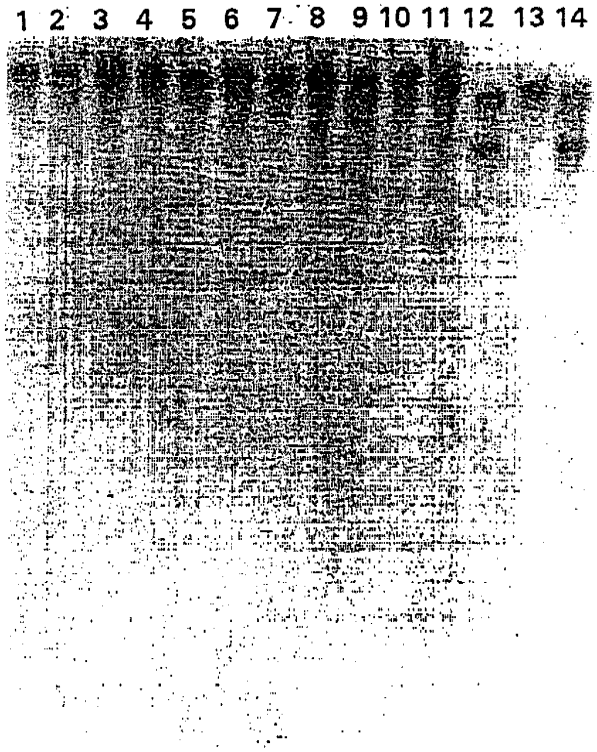
도면4d



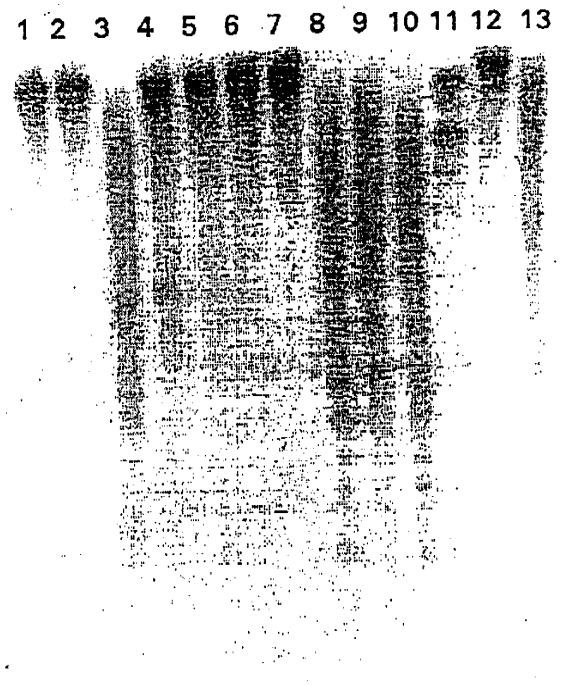
도면5


T7
R1
SmaI - 1.7Kb
Bam H1 - 2.04Kb
Bam H1 - 2.2Kb
GEM3Z-DR11
(4.3Kb 마우스 MDR1b)
Kpn1 - 2.88Kb
Pst1
R1
mcs
SP6

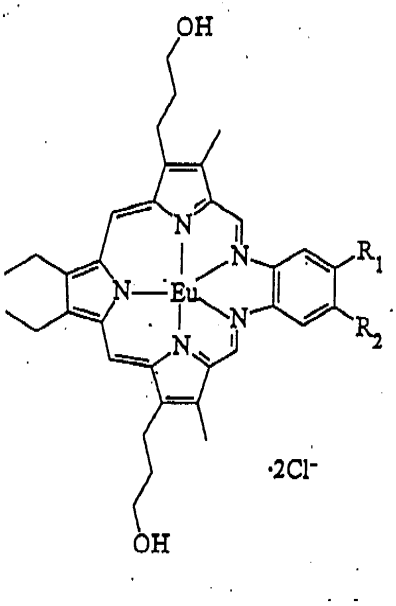
도면6


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

도면7



도면8

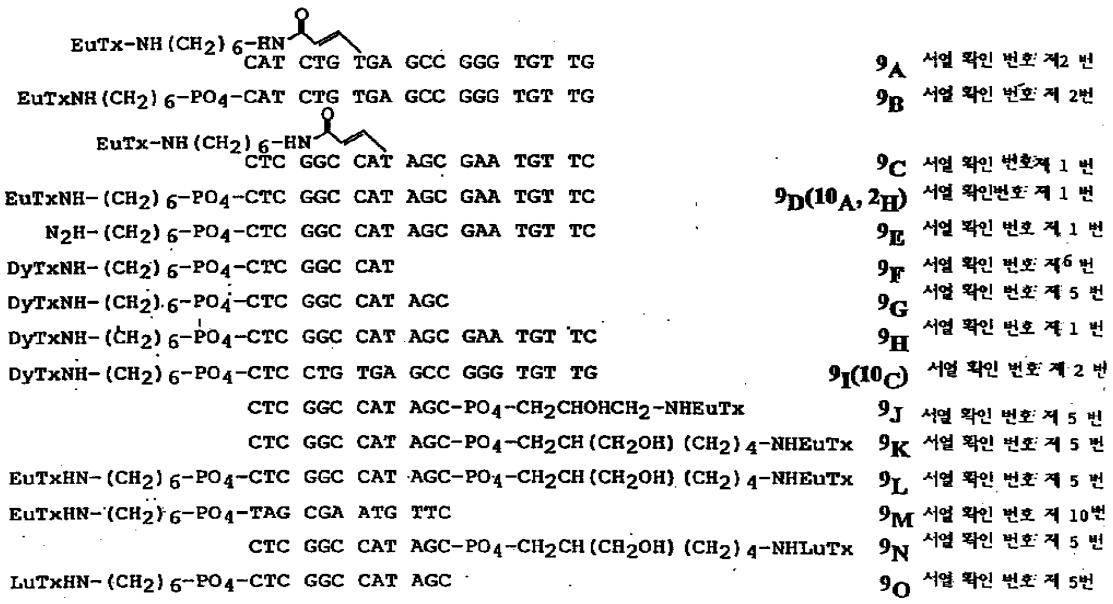


8A $R_1 = R_2 = OCH_2CH_2CH_2OH$

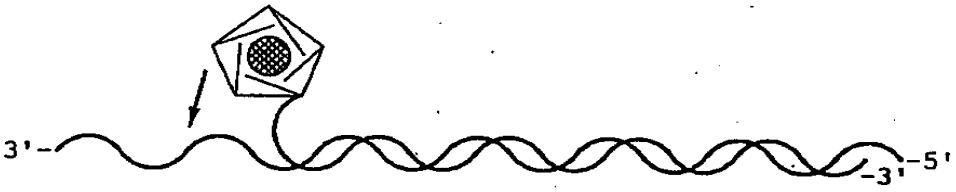
8B $R_1 = OCH_2CO_2H$, $R_2 = H$

8C $R_1 = OCH_2CO\text{-}DNA$, $R_2 = H$

도면9



도면10



서열 확인 번호 제 1 번

5'-EuTx-NH-(CH2)6-PO4-CTC GGC CAT AGC GAA TGT TC-3' 10A (9D, 2H)

3'-pC*C ACU GUA GAA GAG CCG GUA UCG CUU ACA AG-5' 10B

서열 확인 번호 제 3 번

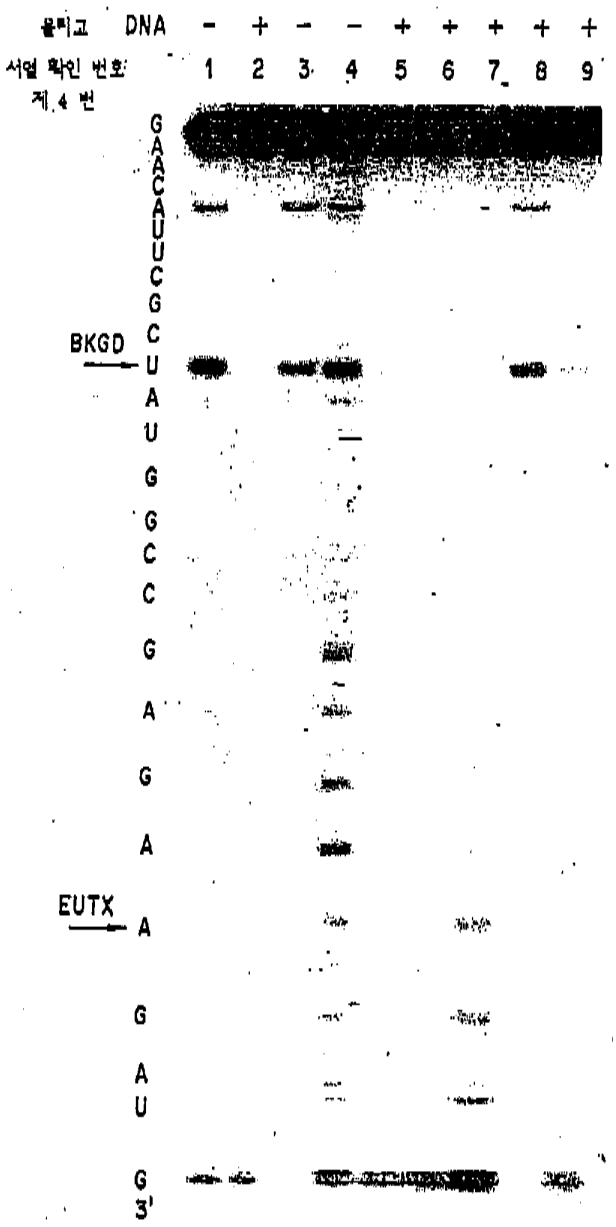
SEQ. ID. NO. 2

5'-DyTxNH-(CH2)6-PO4-CAT CTG TGA GCC GGG TGT TG-3' 10C (9I)

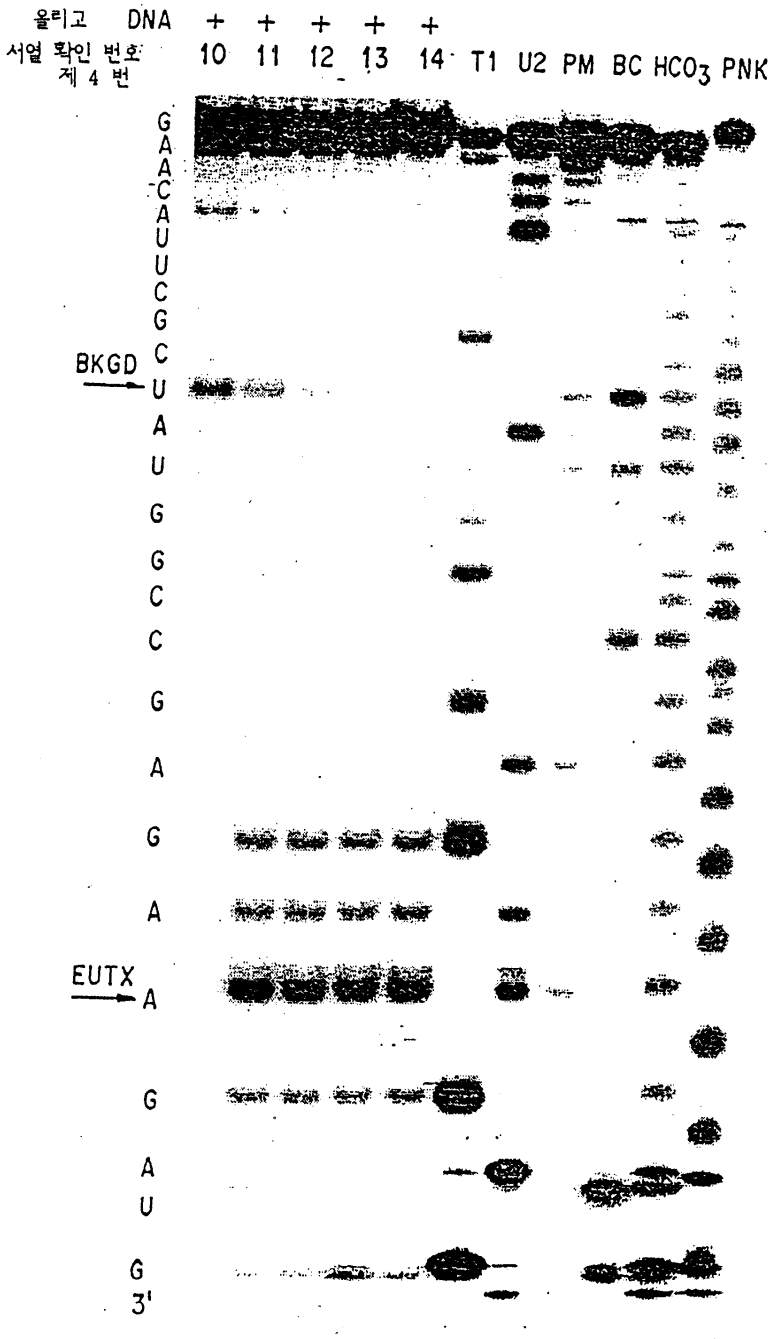
3'-A AAU AAA ACC UCU GAAGUA GAC ACU CGG CCC ACA AC-5' 10D

서열 확인 번호 제 11 번

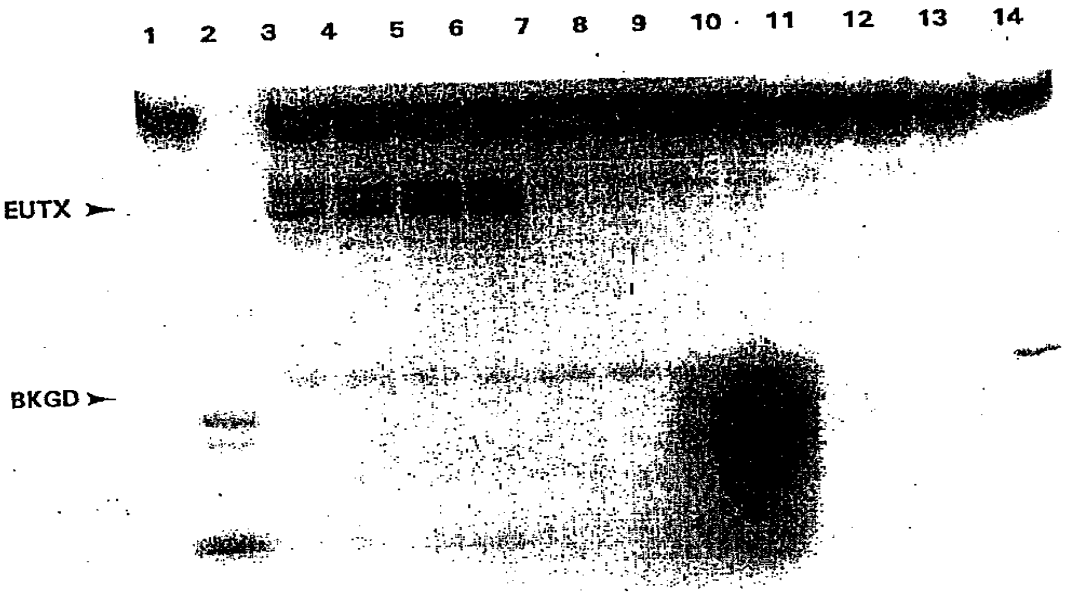
도면11a


폴리고 DNA - + - - + + + + +
서열 확인 번호 1 2 3 4 5 6 7 8 9
제 4 번
BKGD
EUTX
G
A
A
C
A
U
U
C
G
C
U
A
U
G
G
C
C
G
A
G
A
A
U
G
3'

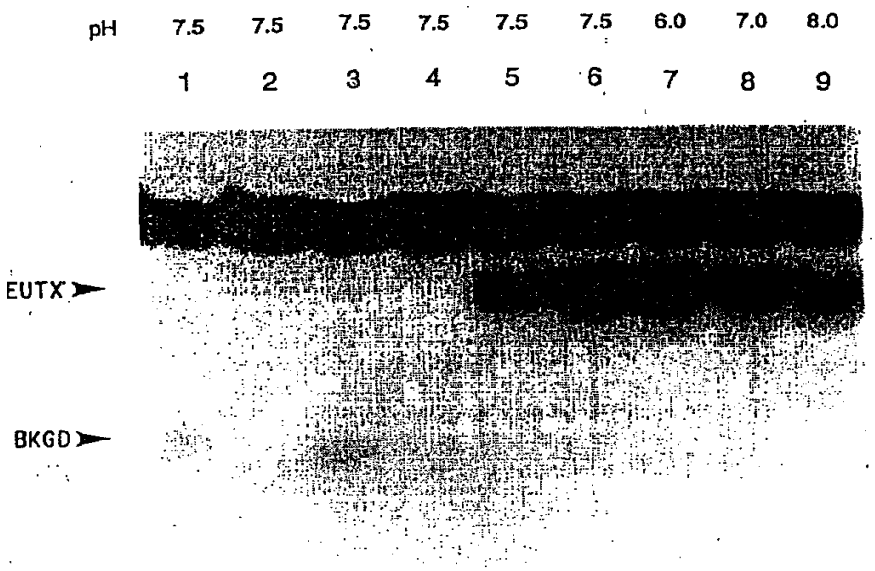
도면11b


올리고 DNA + + + + +
서열 확인 번호 제 4 번
10 11 12 13 14 T1 U2 PM BC HCO_3 PNK
G
A
A
C
A
U
U
C
G
C
BKGD
U
A
U
G
G
C
C
G
A
G
A
EUTX
A
G
A
U
G
3'

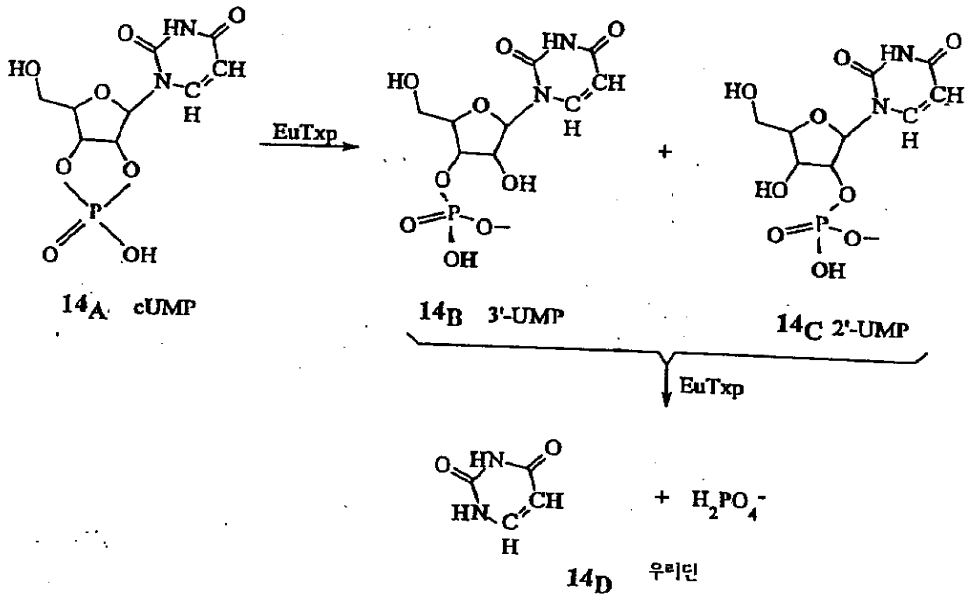
도면12


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
EUTX
BKGD

도면13

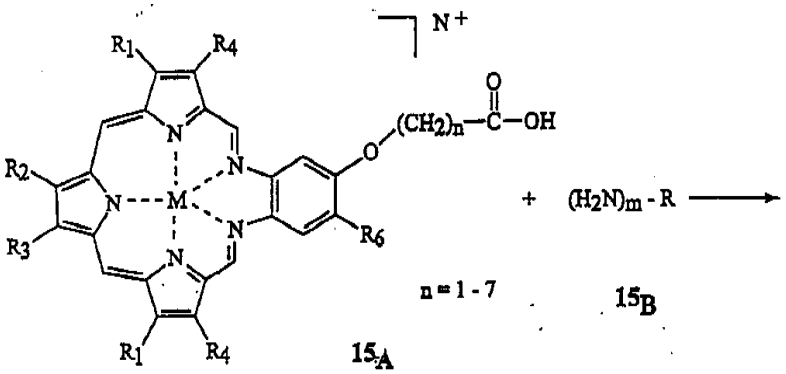

pH 7.5 7.5 7.5 7.5 7.5 7.5 6.0 7.0 8.0
1 2 3 4 5 6 7 8 9
EUTX
BKGD

도면14

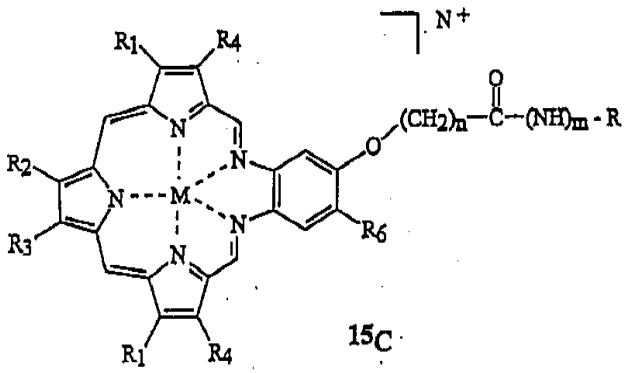


14_A cUMP 14_B 3'-UMP 14_C 2'-UMP 14_D 우리딘

도면15

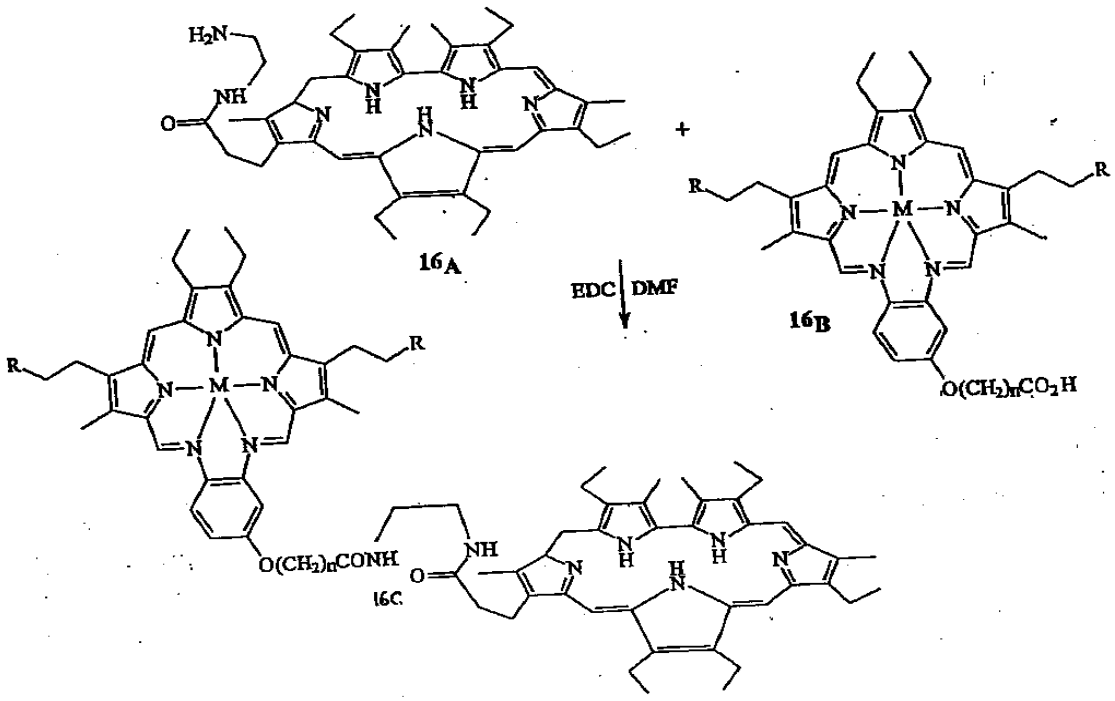


15_A 15_B

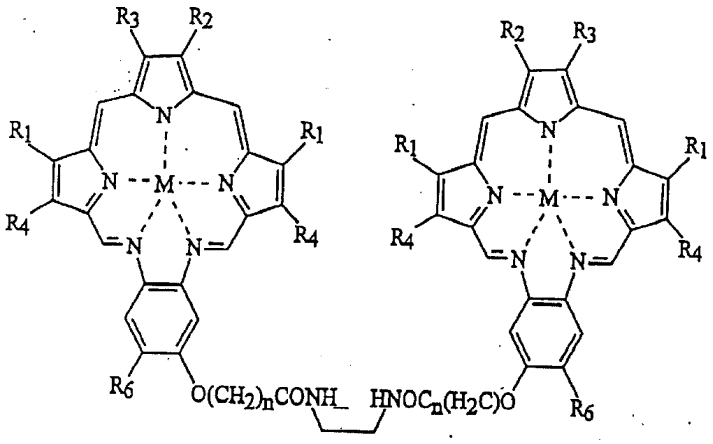


15_C

도면16



도면17



도면18a

서열 확인 번호 제 7 번

5'-AT AGC G A TGT TC-3'

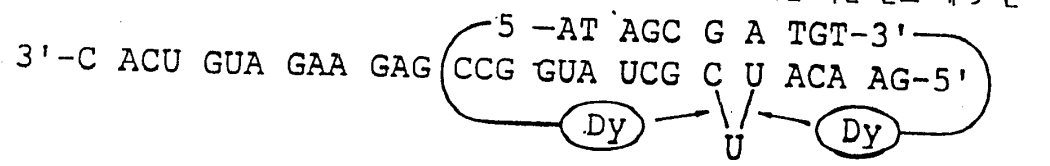
3'-C ACU GUA GAA GAG CCG GUA UCG C U ACA AG-5'

Dy

서열 확인 번호 제 8 번

도면18b

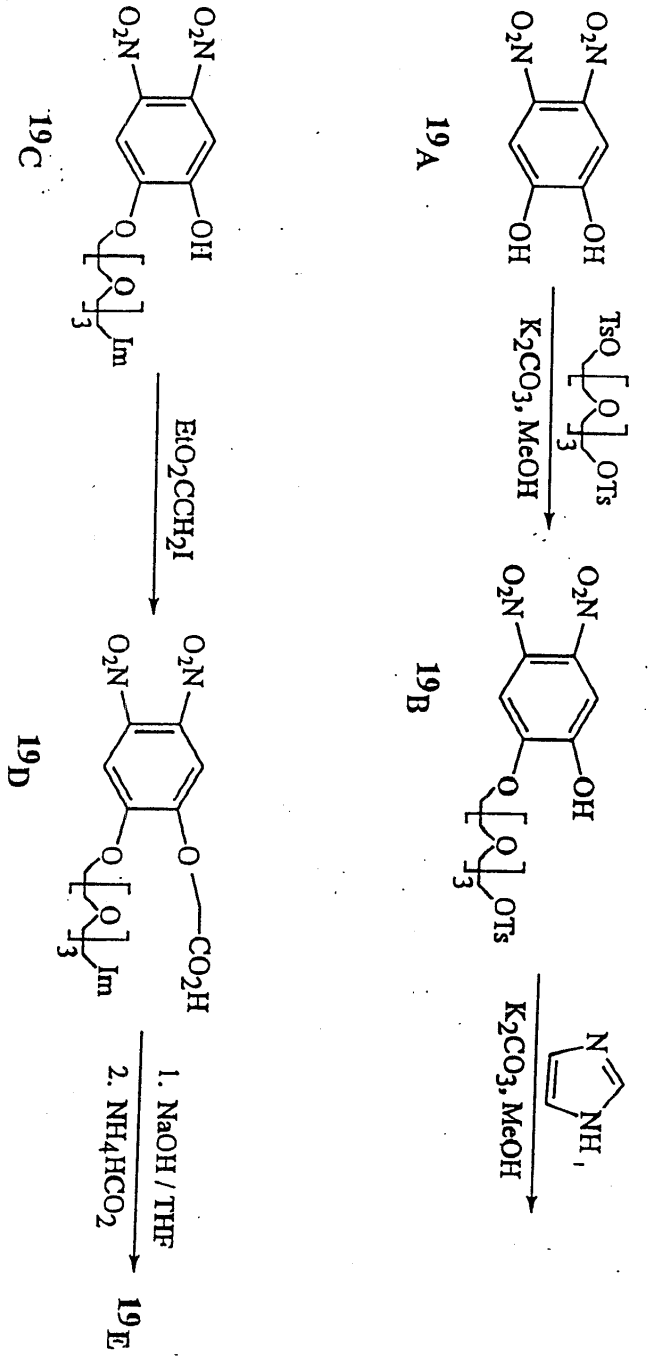
서열 확인 번호 제 9 번



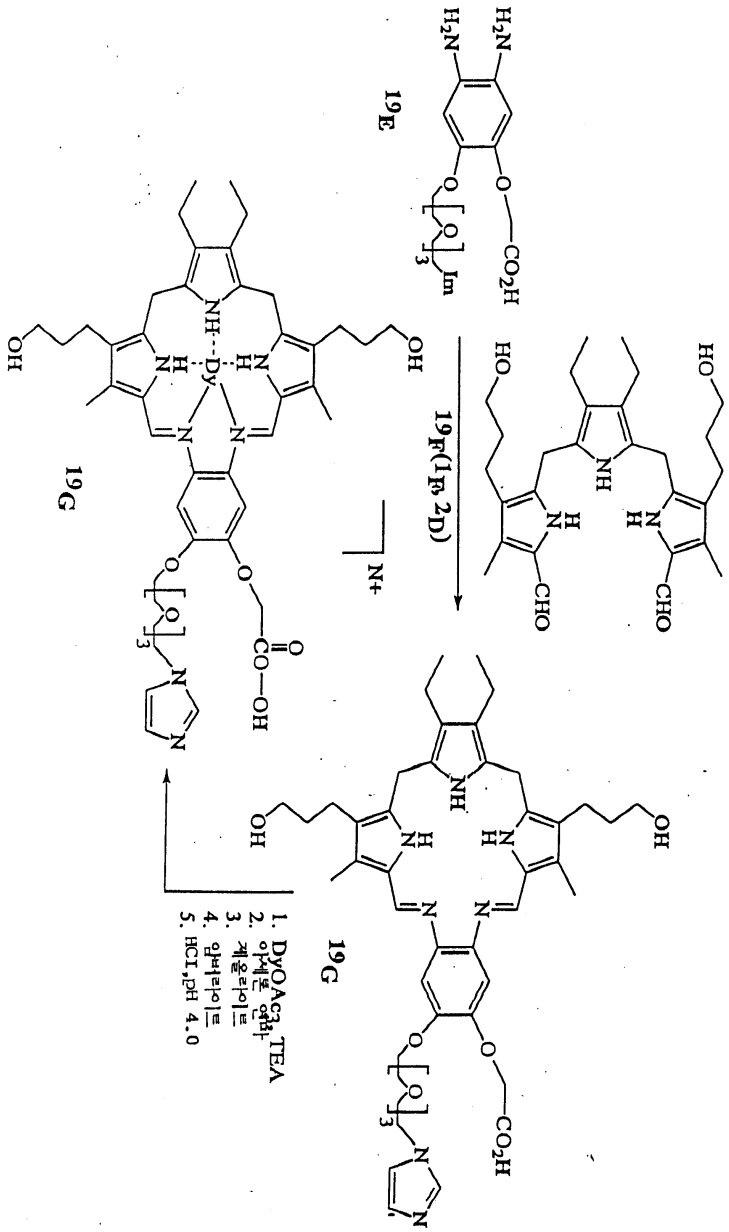
제 18B 도

서열 확인 번호 제 8 번

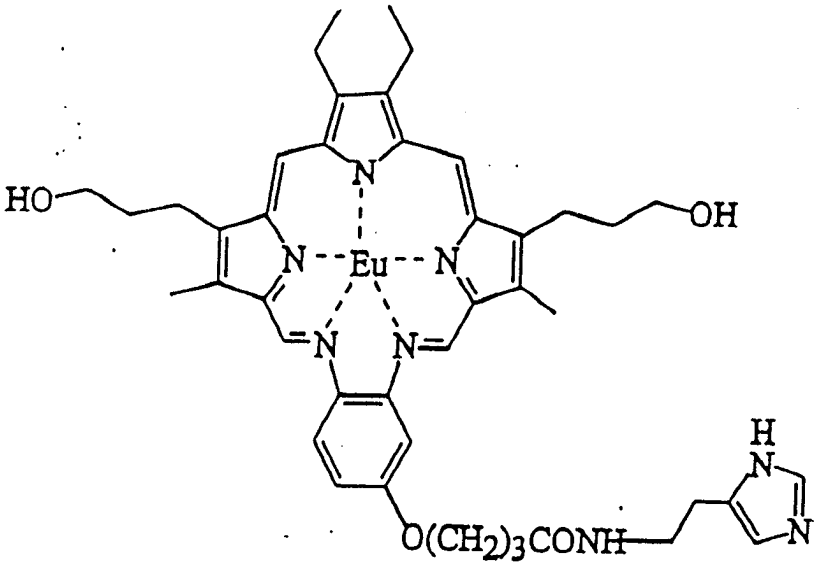
도면19a


19A
19B
19C
19D
19E
K_2CO_3, MeOH
K_2CO_3, MeOH
EtO_2CCH_2I
1. NaOH / THF
2. NH_4HCO_2

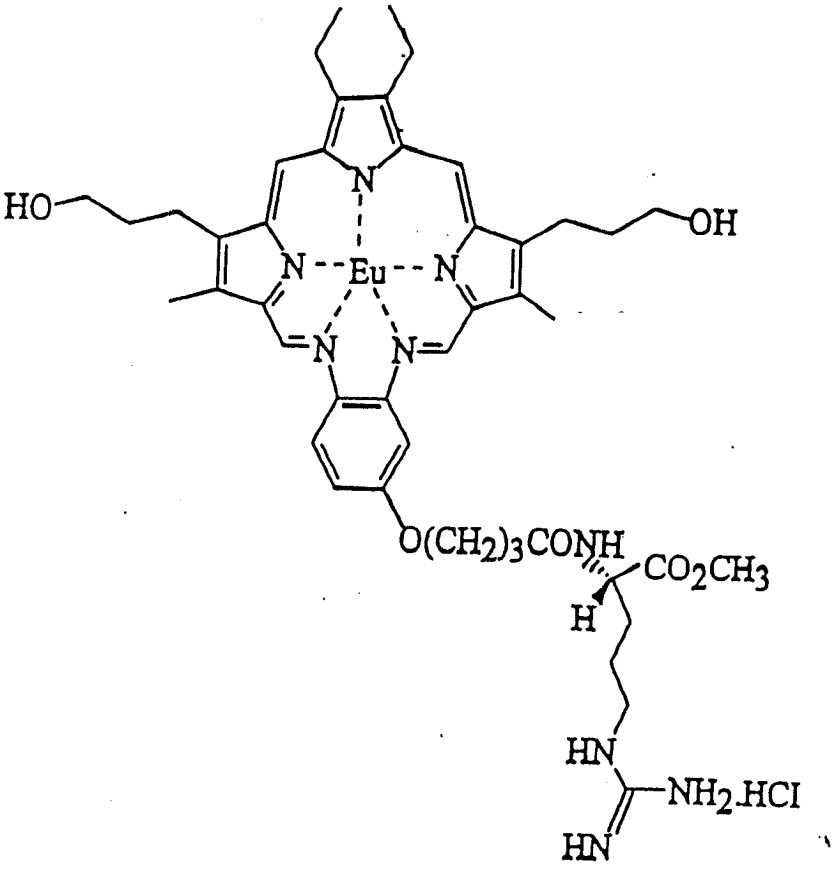
도면19b



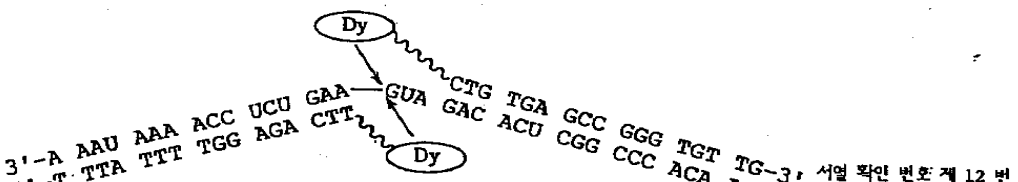
도면20a


HO
OH
N
Eu
N
N
N
N
H
N
N
O(CH2)3CONH

도면20b


HO
OH
N
Eu
N
N
N
N
O(CH2)3CONH
CO2CH3
H
HN
NH2.HCl
HN

도면21



서열 확인 번호 제 12 번
서열 확인 번호 제 11 번

5'-DyTxNH-$(CH_2)_6$-PO_4-TG TGA GCC GGG TGT TG-3' 서열 확인 번호 제 14 번
5'-DyTxNH-$(CH_2)_6$-PO_4-CTG TGA GCC GGG TGT TG-3' 서열 확인 번호 제 12 번
5'-DyTxNH-$(CH_2)_6$-PO_4-T CTG TGA GCC GGG TGT TG-3' 서열 확인 번호 제 15 번
5'-DyTxNH-$(CH_2)_6$-PO_4-AT CTG TGA GCC GGG TGT TG-3' 서열 확인 번호 제 16 번
5'-DyTxNH-$(CH_2)_6$-PO_4-CAT CTG TGA GCC GGG TGT TG-3' 서열 확인 번호 제 2 번
3'-A AAU AAA ACC UCU GAA GUA GAC ACU CGG CCC ACA AC-5' 서열 확인 번호 제 11 번
5'-T TTA TTT TGG AGA CTT-PO_4-$CH_2CHOHCH_2$-NHDyTx-3' 서열 확인 번호 제 13 번
5'-T TTA TTT TGG AGA CTT-PO_4-$CH_2CH(CH_2OH)(CH_2)_4$-NHDyTx-3' 서열 확인 번호 제 13 번

도면22

