

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041558**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.07

(21) Номер заявки
202090752

(22) Дата подачи заявки
2017.06.16

(51) Int. Cl. **C40B 40/06** (2006.01)
C40B 50/08 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)

(54) КОМБИНАТОРНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ РНК

(43) **2020.06.15**

(86) **PCT/RU2017/000423**

(87) **WO 2018/231090 2018.12.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ФАРБЕР БОРИС СЛАВИНОВИЧ;
ФАРБЕР СОФЬЯ БОРИСОВНА (RU)**

(72) Изобретатель:

**Фарбер Борис Славинович, Фарбер
Софья Борисовна (RU), Мартынов
Артур Викторович (UA)**

(74) Представитель:

Васильева Г.С. (RU)

(56) **US-A1-20140309276
US-A1-20120130060
US-B2-6867290
US-A-5614617**

(57) Изобретение относится к химии нуклеотидов и позволяет синтезировать новые комбинаторные библиотеки супрамолекулярных олигонуклеотидов для применения в медицине, косметологии и фармации, в том числе для создания средств омоложения организма, лечения таких заболеваний человека, как рак и трофические язвы, создания новых гербицидов и пестицидов. Комбинаторные производные олигонуклеотидов РНК отличаются тем, что для их получения проводят ковалентную модификацию исходных олигонуклеотидов РНК путем одновременного комбинаторного карбоксилирования и формилирования входящих в их состав экзоциклических аминогрупп аденина, гуанина, цитозина и спиртового остатка рибозы в реакции комбинаторного синтеза для получения максимального количества разных производных, а в результате синтеза образуется комбинаторная смесь производных каждого олигонуклеотида и в дальнейшем используют полученную комбинаторную смесь целиком без разделения на фрагменты для создания биологически активных композиций. Технический результат: модифицированные комплементарные защищенные олигонуклеотиды РНК с омолаживающими, противораковыми и др. свойствами, на основе которых может быть получен лекарственный, ветеринарный, агрохимический или косметический препарат с широким спектром активности. Средство имеет широкий спектр действия, мало токсично и доступно для промышленного производства.

B1**041558****041558****B1**

Область техники

Изобретение относится к химии нуклеотидов и позволяет синтезировать новые комбинаторные библиотеки супрамолекулярных олигонуклеотидов для применения в медицине, косметологии и фармации, в том числе для создания средств омоложения организма, лечения таких заболеваний человека, как рак и трофические язвы, создания новых гербицидов и пестицидов.

Предшествующий уровень техники

Комбинаторная химия, методология органического химического синтеза, имеющая своей целью синтез большого массива однотипных химических соединений (комбинаторных библиотек) наиболее быстрым и экономичным способом, используя специфические подходы и технологии. Необходимость синтеза обширных комбинаторных библиотек возникла в 1990-х гг. и была продиктована запросами тех областей промышленности, где поиск веществ с полезными свойствами нередко эффективнее вести путем эмпирического перебора свойств на больших выборках однотипных соединений. Основой для разработки нового направления химического синтеза послужил предложенный Р. Меррифилдом твердофазный пептидный синтез. Особенно интенсивно методы комбинаторной химии применяются в фармацевтике (дизайн новых лекарственных средств) при поиске эффективных катализаторов (полимеризации и пр.), дизайне наноматериалов. Для тестирования комбинаторных библиотек разработаны автоматизированные системы-роботы, производительность которых достигает 100 тыс. образцов в день (так называемый высокопроизводительный скрининг; от английского screening - просеивание).

На практике комбинаторная химия представляет собой совокупность приемов и методов комбинирования многообразных исходных химических реагентов для получения как можно более разнообразных массивов химических продуктов путем проведения десятков, сотен, а иногда и тысяч параллельных химических превращений с образованием огромного числа конечных продуктов. Комбинаторная химия решает задачи, редко возникавшие в классическом химическом синтезе, а именно быстро синтезировать много веществ, как правило, сложных по структуре и достаточно чистых. Разработка новых экономичных и скоростных технологий параллельного синтеза и параллельной очистки веществ достигается разнообразными путями. Вместо стандартного жидкофазного синтеза (одно вещество в одном сосуде за один прием) ставится множество синтезов (например, в пластиковой плашке с множеством ячеек, куда вещества вносят многоканальными пипетками). Вместо кипячения с обратным холодильником используют нагревание множества герметичных капсул (в ячеистом термостате или СВЧ-печи). Для фильтрации множества веществ используют "сосуды-фильтры" (например, плашки с пористым дном). Упаривание осуществляют вакуумным вымораживанием растворителя из центрифугируемых (для предотвращения вспенивания) плашек. Для очистки используют методы параллельной хроматографии, объединяя в блоки множество хроматографических колонок. В методах жидкофазной комбинаторной химии стараются использовать лишь те реакции, которые протекают с высокими выходами и требуют минимальных усилий по очистке веществ. Для достижения большего разнообразия продуктов обычные двухкомпонентные реакции заменяют на многокомпонентные.

Мощной технологией комбинаторной химии является твердофазный синтез - проведение реакций на модифицированной полимерной подложке. В этом случае сложная молекула (например, полипептид требуемой последовательности или сложное гетероциклическое соединение) иммобилизуется ("наращивается") на поверхность полимера в ходе последовательности реакций, а затем на заключительном этапе отщепляется с твердой подложки вследствие каких-либо химических превращений. Поэтому реакции можно проводить при большом избытке реагента, отмывая последний от полимера с целевым веществом и сводя синтез к принципу "чайного пакетика" (пористые пакеты с гранулами полимера последовательно помещают в стаканчики с реагентами). Новой технологией является замена твердых полимеров на перфторированные жидкости (не смешивающиеся с водой и стандартными растворителями). Для иммобилизации (перевода вещества в перфторированную фазу) к молекуле исходного реагента присоединяют протяженный перфторалкильный фрагмент. Это позволяет проводить синтез в эмульсиях с последующим разделением жидких фаз.

Комбинированным методом комбинаторной химии является использование твердофазных реагентов (окислитель, кислота, основание иммобилизованы на полимере). Избыток твердого реагента вносят в растворы веществ, а затем отделяют фильтрованием. Другим приемом является использование так называемых скавенджеров (от английского scavenger - мусорщик): в раствор вносят модифицированный полимер, который селективно удаляет из реакционной смеси ненужный реагент, взятый в избытке. Все шире используются программируемые промышленные роботы, выполняющие последовательность рутинных однообразных процедур по выделению и очистке веществ (автоматические синтезаторы).

Эффективность использования комбинаторной химии доказана на примерах обнаружения новых лекарственных препаратов и катализаторов.

Лит.: Accounts of Chemical Research, 1996, vol. 29, № 3; Chemical Reviews, 1997, № 3-4; Handbook of combinatorial chemistry: drugs, catalysts, materials, Weinheim, 2002, vol. 1-2; Combinatorial chemistry on solid supports. В., 2007.

Применение комбинаторных библиотек, актуальность.

Одним из новых направлений в лечении онкологических заболеваний является разработка средств

генной терапии рака. Одним из наиболее перспективным направлением генной терапии являются средства для инактивации генов на основе комплементарных полинуклеотидов. Одной из основных проблем на пути внедрения средств генной терапии рака является разрушение синтетических комплементарных нуклеотидов нуклеазами крови, ограниченность проникающей способности внутрь клеток, чувствительность к системам репарации генома клеток. Существуют разные подходы к проектированию antisense олигонуклеотидов, но принцип их взаимодействия с мишенями остается один: образование водородных связей между комплементарными нуклеотидами при увеличении степени устойчивости к нуклеазам. В одних случаях разработчики защищали от действия нуклеаз 5'-конец олигонуклеотида, в других - модифицировали 3'-

конец. Исследователи из США заменили дезоксирибозильные остатки на фрагменты морфолина с целью создать устойчивые к действию нуклеаз фрагменты ДНК (РНК). При этом принцип инактивации генов путем их комплементарного взаимодействия с antisense-нуклеотидами остался прежним - образование водородных связей. Известны также комплементарные микроРНК, селективно блокирующие синтез определенных белков в клетке.

Известна способность многих аденокарцином захватывать из межклеточного матрикса посредством пиноцитоза олигонуклеотиды и наночастицы. При этом здоровые клетки не способны захватывать малые олигонуклеотиды и липосомы. Это обеспечивает селективность накопления предлагаемых защищенных олигонуклеотидов (МАТР - модифицированная анти- тРНК) в раковых клетках и отсутствие токсичности у препарата МАТР. Для получения МАТР нами были использованы олигомерные фрагменты тРНК - распознающиеся рибосомами. Этим олигоРНК свойство комплементарности и защищенности от нуклеаз придавали путем одновременного комбинаторного формилирования и ацилирования без последующего разделения комбинаторной библиотеки на индивидуальные соединения. Селективное накопление в раковой клетке МАТР приводит к его гибридизации с комплементарными мишенями в тРНК раковой клетки и к постепенной остановке синтеза белка из-за блокады синтеза белка в фазе включения в полипептидную цепь аминокислот. Действие МАТР основано на индукции апоптоза через остановку синтеза белка. МАТР фактически не влияет на здоровые клетки, блокирует синтез всех клеточных белков, исключает адаптацию раковой опухоли к терапии и селекцию устойчивых клеток за счет избыточного количества комбинаторных фрагментов РНК и невозможности со стороны опухоли адаптироваться к такому огромному количеству фрагментов.

МАТР кроме противораковой активности *in vitro*, также проявил высокую активность *in vivo* на моделях асцитной аденокарциномы Эрлиха у мышей, карциноме Льюиса мышей (мощный антиметастатический эффект по редукции на 50% количества метастаз и уменьшения вдвое размера центральной опухоли), продлении жизни мышей.

Терминология

Комплементарность (в генетике и химии нуклеиновых кислот) - свойство азотистых оснований образовывать с помощью водородных связей парные комплексы аденин-тимин (или урацил) и гуанин-цитозин при взаимодействии цепей нуклеиновых кислот.

Комплементарные олигонуклеотиды (antisense) - цепь В, комплементарная цепь А исходного олигонуклеотида, способная специфично гибридизоваться с цепью А.

Гибридизация ДНК (РНК) - образование двуцепочечной ДНК (РНК) или дуплексов ДНК:РНК в результате взаимодействия комплементарных нуклеотидов.

Инактивация генов - отключение процесса экспрессии гена через его гибридизацию с комплементарной цепью РНК или ДНК.

Репарация ДНК - исправление повреждений молекулы ДНК, восстанавливающее ее первоначальную структуру, при этом считается, что система репарации генома раковых клеток ответственна как за резистентность раковых клеток к классическим химиопрепаратам на основе антиметаболитов мононуклеотидов, так и за выживание опухоли при массивной химиотерапии и высокой изначальной чувствительности опухоли к лечению.

Аденокарциномы - вид раковых опухолей железистого происхождения (более 80% всех видов рака).

Нуклеазы крови - ферменты крови, разрушающие свободные РНК и ДНК в крови до мононуклеотидов.

Формилирование - процесс присоединения остатка муравьиной кислоты к аминогруппам, спиртовым группам с образованием остатка альдегидной группы. Известно множество именных реакций формилирования (реакция Даффа, реакция Гаттермана, реакция Губена-Геша, реакция Гаттермана-Коха).

Ацилирование - введение ацильного остатка RCO- (ацила) в состав органического соединения, как правило, путем замещения атома водорода, введение остатка уксусной кислоты CH₃CO- называют ацетилированием, бензойной C₆H₅CO- - бензоилированием, муравьиной HCO- - формилированием. В зависимости от атома, к которому присоединяется ацильный остаток, выделяют С-ацилирование, N-ацилирование, О-ацилирование. В качестве ацилирующих агентов используют галогенангидриды и ангидриды кислот.

Алкилирование - введение алкильного заместителя в молекулу органического соединения. Типичными алкилирующими агентами являются алкилгалогениды, алкены, эпокисоединения, спирты, реже

альдегиды, кетоны, эфиры, сульфиды, диазоалканы. Катализаторами алкилирования являются минеральные кислоты, кислоты Льюиса а также цеолиты. Алкилирование широко применяется в химической и нефтехимической промышленности.

МикроРНК - малые некодирующие молекулы РНК длиной 18-25 нуклеотидов (в среднем 22), обнаруженные у растений, животных и некоторых вирусов, принимающие участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов путем РНК-интерференции. Помимо внутриклеточной обнаружена внеклеточная (циркулирующая) микроРНК.

Комбинаторный синтез - синтез методами комбинаторной химии; включает одновременную реакцию между тремя и более реагентами с образованием комбинаторного продукта синтеза, состоящего из десятков производных. Эти производные затем разделяют хроматографически, подтверждают их структуру и изучают биологическую активность.

Одновременная комбинаторная модификация двумя модификаторами - если в реакции комбинаторного синтеза используют полифункциональную молекулу, имеющую более двух доступных для модификации групп, и в реакцию сразу вводят два модифицирующих агента, например уксусный ангидрид и янтарный ангидрид. В результате реакции образуется смесь ацилированных производных в разных положениях - ацетил-сукцинил производных.

Комбинаторная библиотека (combinatorial library) [лат. *combinare* - соединять, сочетать; греч. *biblion* - книга и *theke* - хранилище] - набор большого числа всевозможных химических соединений, белков, генов или олигонуклеотидов, позволяющий осуществлять в нем быстрый поиск целевых генов или белков-мишеней. Например, набор, состоящий из миллионов различных химических веществ, или совокупность рекомбинантных молекул ДНК, полученная встраиванием в вектор кДНК легкой и тяжелой цепей различных антител и др.

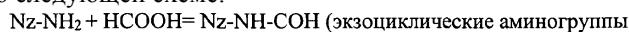
Известны олигонуклеотиды, содержащие модифицированные и неприродные нуклеотидные основания [1]. Механизм действия запатентованных олигонуклеотидов был аналогичен antisense RNA и micro RNA, а препараты могли применяться в лечении, в том числе онкологических заболеваний. Недостатком патентуемых олигонуклеотидов является сложный многостадийный и дорогостоящий синтез производных РНК, трудно воспроизводимый в промышленных условиях. Кроме того, патентуемый в прототипе способ не позволял получать комбинаторные смеси из тысяч производных, способных предотвращать эффект привыкания или мутации мишени. Применение объекта данного патента не было эффективным в экспериментах на моделях животных при онкологических заболеваниях, кроме того, данная разработка больше применима для диагностических и скрининговых исследований *in vitro*, чем для создания препаратов для лечения животных и человека в связи с тем, что предлагаемые модификации нуклеотидных оснований являются новыми ксенобиотиками и не подлежат безопасному метаболизму и биodeградации в организме. Известны модифицированные антикомплементарные олигонуклеотиды с противораковыми свойствами и способ их получения [2]. Суть изобретения: модифицированные антикомплементарные олигонуклеотиды с противораковыми свойствами и способ их получения, отличающиеся тем, что в качестве олигонуклеотидов используют смесь продуктов гидролиза полинуклеотидов, а модификацию проводят путем изменения на противоположный знак зарядов молекул нуклеотидных оснований, приобретающих при этом антикомплементарные свойства. Гидролиз полинуклеотидов проводят с применением природных или синтетических нуклеаз, кислотного или щелочного гидролиза, а модификацию структуры путем ацилирования аминогрупп мононуклеотидов в структуре олигонуклеотидов ангидридами дикарбоновых кислот или путем алкилирования галогенкарбоновыми кислотами. Разработанная смесь обладает способностью селективно связываться с тРНК и останавливать тем самым синтез белка в раковых клетках подобно действию микроРНК. Применение препарата в связи с его способностью адаптироваться к организму позволяет преодолевать привыкание опухоли к препарату. Средство имеет широкий спектр действия, малотоксично и доступно для промышленного производства, эффективно на всех стадиях ракового процесса. Недостатком данного изобретения является непостоянство состава исходной РНК для модификации и, соответственно, непостоянство фармакологического эффекта конечного продукта, сложность его стандартизации, наличие остатков фермента-рибонуклеазы, наличие только одного химического механизма взаимодействия с тРНК раковых клеток через ионные связи. В связи с этим эффект такой композиции нестойкий и рост опухоли останавливается ненадолго.

Данные недостатки устраняются путем использования сразу двух модификаторов, позволяющих взаимодействовать в комплементарных фрагментах не только ионные связи между карбоксильными и аминогруппами, но и водородные связи, значительно увеличить количество производных, исключив адаптацию опухоли к препарату; использования изначально олигонуклеотидов с четко известными последовательностями, что значительно упрощает их стандартизацию, валидацию, регистрацию и дает возможность полного химического синтеза на нуклеотидных синтезаторах; позволяет обеспечить повторяемость фармакологических эффектов между сериями. Кроме того, применение таких бинарно модифицированных олигонуклеотидов значительно продлевает фармакологический эффект препарата в виде более длительного эффекта (выживаемость мышей). Ранее двойная одновременная модификация олигонуклеотидов РНК и ДНК не использовалась.

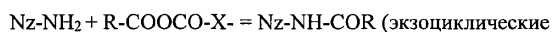
Раскрытие изобретения

В основу изобретения поставлена задача разработать биологически активные комбинаторные производные олигонуклеотидов РНК (комбинаторные библиотеки).

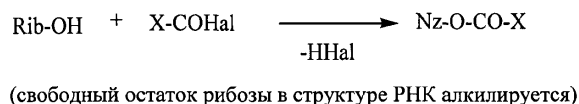
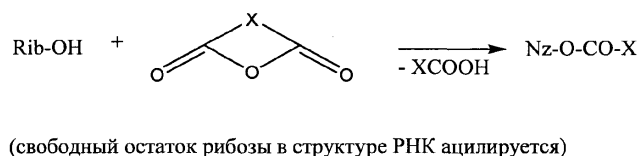
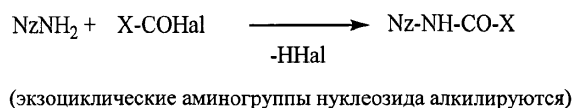
Поставленная задача решается путем получения смеси комплементарных комбинаторных производных олигонуклеотидов РНК, у которых свойство комплементарности и защиты от нуклеаз придают путем одновременного двойного комбинаторного формилирования и карбоксилирования (ацилирования или алкилирования) экзоциклических аминогрупп мононуклеозидов и спиртовых остатков в структуре рибозы в составе РНК по следующей схеме:



нуклеозида формилируются)



аминогруппы нуклеозида ацилируются)



где Nz - остаток нуклеозида в структуре олигонуклеотидов аланиновой тРНК,

Rib - остаток рибозы в структуре нуклеозидов олигонуклеотидов аланиновой тРНК,

X - замкнутая углеводородная цепь в структуре ангидридов дикарбоновых и трикарбоновых кислот.

Полученную комбинаторную смесь не очищают на отдельные компоненты, а используют целиком в качестве противоракового препарата для предотвращения адаптации опухоли либо для создания фармацевтических композиций с ранозаживляющим действием. При использовании в данном комбинаторном синтезе других комбинаций нуклеотидных последовательностей РНК наблюдается мощная стимуляция регенерации тканей у животных и подобные комбинаторные смеси могут соответственно использоваться в косметологии в качестве омолаживающих кремов. Изменение нуклеотидной последовательности исходного модифицируемого олигонуклеотида также позволяет создавать новые гербициды и пестициды, а также акарициды в связи с возможностью селективно блокировать определенные гены и синтез белка в быстрорастущих клетках.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана химическая реакция комбинаторного ацилирования и формилирования остатка аденозина с образованием суммы формил-сукцинил производных. В результате такой комбинаторной модификации образуется: 2 сукцинил аденозина (замещенные как по аминогруппе, так и по гидроксильной группе рибозы), 2 формил аденозина (замещенные как по аминогруппе, так и по гидроксильной группе рибозы), 2 сукцинил-формил аденозина, 2 моноформил аденозина (один по аминогруппе, один по спиртовой), 2 моносукцинил аденозина (один по аминогруппе, один по спиртовой). Таким образом, двойная комбинаторная модификация только одного аденозина в структуре РНК на выходе дает 10 новых производных. Именно такая комбинаторная смесь обладает максимальной активностью и предотвращает развитие резистентности у раковых опухолей к химиопрепаратам. Отдельно каждое производное мало активно и только в виде супрамолекулярной системы обладает мощной биологической активностью.

На фиг. 2 показана ВЭЖХ исходного олигонуклеотида 3'-UUGGG-5'.

На фиг. 3 - ВЭЖХ полностью сукцинированного по 8 доступным группам олигонуклеотида 3'-UUGGG-5' (контроль полного завершения реакции при избытке одного модификатора).

На фиг. 4 - ВЭЖХ полностью карбоксиметилированного по 8 доступным группам олигонуклеотида 3'-UUGGG-5' (контроль полного завершения реакции при избытке одного модификатора).

На фиг. 5 - ВЭЖХ после двойной комбинаторной неполной модификации олигонуклеотида 3'-UUGGG-5' путем одновременного сукцинирования и формилирования.

Примеры

Пример 1. Получение комплементарных производных олигонуклеотидов РНК (МАТР).

Исходную последовательность 3'-UUGGG-5' синтезируют классическим путем с применением полинуклеотидных синтезаторов и амплифицируют с применения полимеразной цепной реакции в модификации с применением РНК-РНК-полимеразы, что очевидно специалисту в данной области знания.

Для получения комплементарного олигонуклеотида РНК использовали одновременный комбинаторный синтез с двумя реагентами: янтарным ангидридом и муравьиной кислотой.

В 1 мл диоксана растворяют 10 мМ 3'-UUGGG-5', добавляют 20 мМ янтарного ангидрида и 20 мМ муравьиной кислоты, раствор перемешивают и греют при 30-100°C 1-60 мин. Раствор переливают в ампулы и лиофилизируют для удаления растворителя и непрореагировавшей муравьиной кислоты. Комбинаторную смесь используют в изучении противораковой активности.

Одна исходная молекула 3'-UUGGG-5' содержит 5 доступных для модификации спиртовых остатков рибозы и три экзоциклических аминогруппы гуанозина - всего 8 доступных групп. Неполная комбинаторная модификация только одним модификатором - или янтарным ангидридом или муравьиной кислотой - даст на выходе комбинаторную смесь из 255 производных с разной степенью замещения в разных положениях. Введение второго модификатора увеличивает на выходе количество производных одного олигонуклеотида до 380. Вместо последовательности 3'-UUGGG-5' может быть использована последовательность 3'-UUGGG-5' либо последовательность 3'-UUAAA-5', либо любая последовательность в качестве исходного олигонуклеотида РНК следующей нуклеотидной последовательности: 3'-UUN₁N₂N₃-5'; где N₁N₂N₃ соответствуют хотя бы одной из следующих последовательностей, включая их смесь: UUC; UUA; UUG; CUU; CUC; CUA; CUG; AUU; AUC; AUA; AUG; GUU; GUC; GUA; GUG; UCU; UCC; UCA; UCG; CCU; CCA; CCG; ACU; ACC; ACA; ACG; GCU; GCC; GCA; GCG; UAU; UAC; UAA; UAG; GAU; CAC; GAA; GAG; AAU; AAC; AAG; GAU; GAC; GAA; GAG; UGU; UGC; UGA; UGG; CGU; CGC; CGA; CGG; AGU; AGC; AGA; AGG; GGU; GGC; GGA. Указанные последовательности представляют собой распознающие триплеты нуклеотидов в составе тРНК для каждой из известных аминокислот. Комплементарная блокада такого(их) триплета(ов) в клетке приведет к утрате тРНК способности присоединяться к полирибосоме и соответственно к утрате синтеза белка.

Расчеты количества молей модификатора ведут согласно формулам комбинаторики

$$m=4 \times (3 \times 2^{n-2} - 1),$$

$$k = n \times (2^n - 1),$$

где m - количество разных производных молекул в комбинаторной смеси,

n - количество доступных для модификации групп (и молей) в структуре олигонуклеотида (например, для 3'-UUGGG-5' n=3 гуанозиновых аминогруппы и 5 гидроксильных групп в структуре рибозы, итого n=8),

k - количество молей каждого модификатора модификаторов (например, только для одного модификатора 3'-UUGGG-5' m=764; k=2040, а мольное соотношение равно 1:2.67).

Таким образом, имея только один олигонуклеотид 3'-UUGGG-5' после его модификации мы получаем 764 комбинаторных комплементарных производных с разной степенью афинности и гибридизуемости с исходной молекулой. Далее полученную комбинаторную смесь (условное название МАТР) используют для изучения противораковой активности и стимуляции регенерации тканей при местном применении. Производные других олигонуклеотидов из представленного выше списка обладают пестицидной, гербицидной и акарицидной активностями.

Модификаторы - янтарный ангидрид либо муравьиную кислоту - можно вводить как одновременно, так и последовательно; либо сперва ввести янтарный ангидрид, прогреть смесь до 30-100°C 1-60 мин, а затем ввести муравьиную кислоту и также прогреть смесь еще до 30-100°C 1-60 мин.

На фиг. 2 приведена хроматограмма немодифицированного олигонуклеотида структуры 3'-UUGGG-5'. На фиг. 3 и 4 показаны ВЭЖХ - хроматограммы двух производных: полностью сукцинированного и полностью формилированного нуклеотида. Как видно из графиков, время (объем) удержания производных отличается как от исходного олигонуклеотида, так и между собой. Это свидетельствует о завершении реакции ацилирования и формилирования в структуре олигонуклеотида. Также на хроматограммах отсутствуют пики других производных, что исключает гидролиз олигомера до мономерных фрагментов или открытие пуринового гетероцикла аденина.

Аналогично в этой реакции в качестве одного из модификаторов вместо янтарного ангидрида можно использовать малеиновый ангидрид, аконитовый ангидрид, глутаровый, фталевый ангидрид и уксусный ангидрид.

Аналогично в этой реакции в качестве одного из модификаторов вместо муравьиной кислоты можно использовать этиловый эфир муравьиной кислоты, монохлороуксусную кислоту, пропиолактон, этиленоксид и другие низкомолекулярные алкилирующие вещества (метилхлорид, этилхлорид, пропилхлорид).

Аналогично были синтезированы производные 3'-UUGGG-5 с другими соотношениями модификаторов (янтарного ангидрида и муравьиной кислоты) и проведен скрининг их биологической активности в отношении трех видов рака: карциномы Льюиса (КЛ), асцитного рака Эрлиха (АРЭ) и HeLa-2 (ХЛ) *in vitro*. В табл. 1 приведены результаты биологического скрининга производных. Расчеты проводили с применением мортального красителя кумаяси синего, процент гибели клеток определяли спектрофотометрически по окраске мертвых клеток против контролей (живой культуры и полностью погибшей). Погрешность спектрофотометра 3%. Полученные результаты обрабатывали с применением метода хи-квадрат для $n=5$ (5 лунок в планшете). Статистическая гипотеза о значительном отличии в эффективности структуры с максимальным количеством разных производных (№ 17 или МАТР) от других производных, полученных эмпирически, подтвердилась ($P \leq 0,05$).

Таблица 1

Противораковая активность супрамолекулярных комбинаторных производных олигонуклеотида 3'-UUGGG-5, полученных в реакции с разным мольным соотношением модификаторов

№ п/п	Мольные соотношения реагентов*			% гибели клеток**		
	m	k1	k2	КЛ	АРЭ	ХЛ
1		16320	1	0	0	0
2	764	8160	1	0	0	0
3	-/-	4080	5	0	0	0
4	-/-	2040	15	0	0	0
5	-/-	1020	31	0	0	0
6	-/-	510	63	15	20	20
7	-/-	255	127	20	17	17
8	-/-	127	255	25	25	20
9	-/-	63	510	0	0	0
10	-/-	31	1020	0	0	0
11	-/-	15	2040	0	0	0
12	-/-	5	4080	0	0	0
13	-/-	1	8160	0	0	0
14	-/-	1	16320	0	0	0
15	-/-	8160***	8160***	15	5	5
16	-/-	4080	4080	17	19	22
17 (МАТР)	-/-	2040	2040	99	95	100
18	-/-	1020	1020	15	25	27
19	-/-	510	510	0	0	0
20	-/-	255	255	0	0	0
21	-/-	127	127	0	0	0
22	-/-	63	63	0	0	0
23	-/-	31	31	0	0	0
24	-/-	15	15	0	0	0
25	-/-	5	5	0	0	0
26	-/-	1	1	0	0	0

27	-//-	16320	0	0	0	0
28	-//-	8160	0	30	44	18
29	-//-	4080	0	22	25	17
30	-//-	2040	0	20	20	15
31	-//-	1020	0	0	0	0
32	-//-	510	0	0	0	0
33	-//-	255	0	0	0	0
34	-//-	127	0	0	0	0
35	-//-	63	0	0	0	0
36	-//-	31	0	0	0	0
37	-//-	15	0	0	0	0
38	-//-	5	0	0	0	0
39	-//-	1	0	0	0	0
40	-//-	0	16320	0	0	0
41	-//-	0	8160	15	25	17
42	-//-	0	4080	30	25	27
43	-//-	0	2040	0	0	0
44	-//-	0	1020	0	0	0
45	-//-	0	510	0	0	0
46	-//-	0	255	0	0	0
47	-//-	0	127	0	0	0
48	-//-	0	63	0	0	0
49	-//-	0	31	0	0	0
50	-//-	0	15	0	0	0
51	-//-	0	5	0	0	0
52	-//-	0	1	0	0	0

* m - количество молей олигонуклеотида 3'-UUGGG-5 в реакции комбинаторного синтеза;

k1 - количество молей янтарного ангидрида в реакции;

k2 - количество молей муравьиной кислоты в реакции;

** % гибели клеток в культуре после 24 инкубации в присутствии исследуемого вещества, добавленного в предварительно подобранной концентрации ($ED_{90}=0,2$ мкг/мл);

*** максимальное мольное соотношение, при котором замещаются все группы в олигонуклеотиде; превышение этого соотношения приводит к тому, что в реакционной среде остаются непрореагировавшие модификаторы - янтарный ангидрид и муравьиная кислота.

Как видно из табл. 1, только у одного производного № 17 (МАТР) обнаружен противораковый эффект на уровне 95-100% цитотоксического эффекта на все три типа культур раковых клеток, тогда как другие мольные соотношения реагентов, в т.ч. мономодифицированное производное не обладали достаточной цитотоксической активностью в отношении раковых клеток.

Пример 2. Синтез сукцинированного аденина (контроль реакции сукцинирования).

В 1 мл диоксана растворяют 10 мМ аденина, 10 мМ янтарного ангидрида и греют с обратным холодильником 1-60 мин. Затем к колбе присоединяют вакуумный насос и отгоняют диоксан. Осадок перекристаллизуют из смеси диоксан: ледяная уксусная кислота. $m.p.=163-165^{\circ}C$. Спектр полностью подтверждает структуру сукциниладенина. Аналогично вместо янтарного ангидрида можно использовать малеиновый ангидрид, аконитовый ангидрид, глутаровый, фталевый ангидрид и уксусный ангидрид.

1H ЯМР: m 2,4-2,7 ($-CH_2-$); m 4,2-6,0 ($-CHON-$); d 8,35; 8,63 ($-CH-$); s 10,60 ($-NH-$); s 12,2 ($-COOH$); s 13,82 ($-COOH$).

Элементный анализ (по данным дериватограммы): C, 45.1; H, 3.9; N, 10.98; O, 40.09

Пример 3. Синтез формилированного аденина (контроль реакции формилирования).

В 1 мл диоксана растворяют 10 мМ аденина, 40 мМ муравьиной кислоты и греют с обратным холодильником на водяной бане 45 мин. Затем к колбе присоединяют вакуумный насос и отгоняют диоксан и избыток муравьиной кислоты. Осадок перекристаллизуют из смеси диоксан: муравьиная кислота.

m.p.=113-115°C. ^1H ЯМР спектр полностью подтверждает структуру формиладенина. Аналогично вместо муравьиной кислоты можно использовать этиловый эфир муравьиной кислоты, монохлороуксусную кислоту, пропиолактон, этиленоксид.

^1H ЯМР: d 4,22-4,40 (-CHON-); s 8,35 (=CH-); s 8,19; 8,63 (=CH-); s 10,51 (-NH-); s 8,59 (-CONH-); s 8,10 (-CONH-).

Элементный анализ (по данным дериватограммы): C, 42.70; H, 3.61; N, 22.66; O, 31.07.

Пример 4. Противораковая активность МАТР.

Определение противораковой активности МАТР в клеточной культуре проводили в культуре клеток HeLa-2. Для этого к среде 199 добавляли разное количество МАТР от 2 до 12 мкг/мл среды (см. табл. 1). Для контроля использовали культуру без МАТР. Наблюдение за культурами клеток вели в течение 5 суток с ежедневным просмотром. Минимальной активной дозой (МАД) МАТР считали такое его минимальное количество, которое вызывало дегенерацию 90-95% клеток (табл. 2).

Таблица 2
Сравнительная характеристика чувствительности культуры опухолевых клеток HeLa-2 относительно МАТР

Препарат	МАД в мкг/мл	Активность МАТР при разной кислотности среды 199 ¹ культуры клеток	
		Контроль	Опыт
МАТР	10	0	++++
Таксотер	10	0	++
Физ. раствор	-----	0	0

¹ Цитопатическое действие;

++++ - дегенерация 100% клеток;

0 - отсутствие дегенерации.

При установлении минимальной концентрации МАТР, которая тормозит рост клеток, проведено сопоставление количества клеток, которые выжили, с концентрацией МАТР в растворе.

Таблица 3

Влияние МАТР на клетки HeLa

Доза, мкг/мл	Количество клеток до инкубации, млн	Количество живых клеток после инкубации, млн, ± 1000		Количество живых клеток после инкубации, %	
		МАТР	таксотер	МАТР	таксотер
2	150000 $\pm$ 1000	72000	155000	48	100
4	152000 $\pm$ 1000	21500	150000	14	98
6	150000 $\pm$ 1200	9900	145000	7	97
8	151000 $\pm$ 1000	0	135000	0	89
10	160000 $\pm$ 1000	0	130000	0	82
12	163000 $\pm$ 1000	0	153000	0	94

Как видно из табл. 3, эффективная доза МАТР находится в пределах между 8-12 мкг/мл раствора.

МАТР приводил к 95% дегенерации опухолевых клеток. Для подтверждения противоопухолевого действия *in vivo* МАТР был исследован на модели асцитной аденокарциномы Эрлиха.

Пример 5. Исследование противоопухолевого действия МАТР на асцитной аденокарциноме Эрлиха.

Противоопухолевое действие композиций исследовали на моделях асцитной карциномы Эрлиха у молодых неимбредных мышей обоего пола массой 15-17 г (68 штук), которых выдерживали на рационе вивария.

45 мышам инокулировали от мыши с аденокарциномой инсулиновым шприцем 0,1 мл асцитной жидкости в область печени. Через 7 суток у 42 мышей появились признаки опухоли (увеличилась масса тела и размеры живота), 2 мыши погибли на второй день, 1 мышь не выявила признаков опухоли.

10 мышам вводили МАТР (см. табл. 4). Еще 10 мышам вводили субстанцию МАТР, еще 10 - 0,9% раствор натрия хлорида.

Таблица 4

Количественные биологические и статистические характеристики при исследовании противоопухолевой активности МАТР

Средство	Срок гибели животных после первой инъекции. Среднее значение (Сутки)	
	Опытные животные	Контрольные животные
МАТР	47,4±1,3	3,0±0,5
Таксотер	15±1,0	3±0,5

Примечание: n=10, p≤0,05.

МАТР вводили тем мышам, у которых брали кровь. Мыши с аденокарциномой Эрлиха после перевивки опухоли и лечения жили 47 суток при использовании МАТР, что в 12 раз дольше, чем в контроле. При достоверности больше 99,5% можно сделать вывод о значительном усилении противораковой активности МАТР против контроля - таксотера. После анатомирования животных было установлено, что в среднем количество метастаз было на 70% меньше у животных, леченных МАТР, и средняя масса метастаз составила 20% от контроля (таксотер).

Пример 6. Противоопухолевая активность МАТР на примере лейкоза Швеца.

Препараты вводили внутривенно трехкратно с интервалом в 2 ч по 0,5 мл. Для инъекций МАТР использовали водный раствор. Суммарные дозы препаратов составляли 34,0, 68,0, 84,0, 102,0 и 136 мг/кг. Количество погибших животных в каждой группе отмечали через каждые 24-48 ч. Расчет токсичной дозы, ЛД₅₀, проводили по методике. Летальную дозу, ЛД₁₀₀, определяли экспериментально. В результате проведенных опытов установлено, что для соединения МАТР ЛД₅₀=3100 мкг/кг, ЛД₁₀₀=4200 мкг/кг. Из сравнения приведенных величин следует, что токсичность водного МАТР значительно ниже, чем у соединения контроля таксотера (120 мг/кг). Согласно гистологическим исследованиям гибель животных, получавших токсические дозы препаратов, обусловлена энтеротоксичностью. Имеет место выраженная дисплазия клеток эпителия в кишечнике, нарушение его регенераторной функции, сокращение количества митозов. Незначительные изменения отмечены в почках: небольшой отек стромы, зернистая дистрофия канальцев, мелкоочаговые кровоизлияния. Противоопухолевую активность МАТР оценивали из экспериментов, проведенных на пяти группах животных (в каждой группе по 10 животных). Белым беспородным крысам весом 150-200 г под кожу бедра трансплантировали $2 \times 10^8 - 2 \times 10^{10}$ клеток перевивного штамма лейкоза Швеца. Животные I группы служили для контроля, II группа получала таксотер, III - таксотер+МАТР, IV - МАТР в растворе, V - МАТР в суспензии с ТВИН-80. Препараты вводили внутривенно трехкратно на 4-6 сутки после трансплантации опухоли, т.е. в период логарифмической фазы ее роста, второй и третий раз с интервалами 24-48 ч соответственно. Суммарные дозы препаратов составляли 27,3 мг/кг в расчете на чистый препарат.

Противоопухолевую активность оценивали по следующим физиологическим показателям:

- по объему опухоли, v (см³);
- по степени угнетения роста опухоли (Т/С, %);
- выживаемости животных на 10-е сутки (ВЖ, %);
- продолжительности жизни животных (ПЖЖ, сутки).

Расчеты производили по следующим формулам:

$$v = \frac{4}{3} \pi R^3; \quad R = \frac{m_1 + m_2 + m_3}{23}$$

где m_1 , m_2 , m_3 - три взаимно-перпендикулярных измерения опухолевого узла;

$$T/C = \frac{V_{\text{кон}} - V_{\text{оп}}}{V_{\text{кон}}}$$

где $V_{\text{кон}}$ и $V_{\text{оп}}$ - объем опухоли в контрольной и опытной группах соответственно;

$$ВЖ = \frac{A \cdot 100}{N}$$

где A - число животных на 10-е сутки после трансплантации опухоли,

N - число животных в данной группе.

ПЖЖ определяли по числу суток, прошедших от момента перевивки опухоли до гибели последнего животного в данной группе. Данные о биологической активности МАТР приведены в табл. 5.

Анализ данных, представленных в табл. 5, показывает, что препарат МАТР в чистом виде (суспензии) по сравнению с контролем тормозит рост опухоли на 94%. Его применение позволяет получить 100%-ную выживаемость животных. МАТР водного раствора тормозит рост опухоли на 95%, обеспечивает 100%-ную выживаемость животных. В то же время продолжительность их жизни увеличивается по

сравнению контролем на 7-8 суток. Сравнительный анализ данных, приведенных в таблице, позволяет заключить, что заявляемое соединение, МАТР в суспензии, более токсично, чем препарат МАТР водный раствор. По уровню противоопухолевой активности и выживаемости он не уступает соединению МАТР в истинном растворе, а по такому показателю, как продолжительность жизни, существенно превосходит его, так как увеличивает продолжительность жизни в два раза.

Таблица 5

Противораковая эффективность МАТР в разных формах - истинном растворе и концентрированной суспензии

Наименование показателя	Группа животных				
	1	2	3	4	5
	(кон- троль)	(введена МАТР сус- пензия)	(введена МАТР рас- твор)	(введена смесь таксо- тера и МАТР)	(введен чистый таксотер)
Введенная доза, мг/кг		9,1*3=27,3			
Токсичная доза, LD ₅₀ , мкг/кг		3100	1500	130	120
Летальная доза, LD ₁₀₀ , мкг/кг		4200	2700	180	180
Объем опухоли, см ³	15,0±0,75	1,00±0,05	0,60±0,03	0,75±0,03	0,73±0,03
Степень тормо- жения роста опухоли, Т/С, %	0	94	95		
Выживае- мость, %	0	100			
Продолжитель- ность жизни, сутки	14,6±0,5	11,6±1,0	21,0±1,0		

Таким образом, создание МАТР привело к получению вещества более эффективного, чем известные противоопухолевые препараты, так как по показателям физиологической активности, характеризующим его противоопухолевый эффект, предлагаемый препарат превосходит или сопоставим с известными веществами и выгодно отличается от них из-за уменьшения токсичности. Выявлен ряд новых свойств у МАТР: высокая степень торможения роста опухоли, значительная выживаемость животных и увеличение их продолжительности жизни при одновременном уменьшении токсичности, что дает сделать вывод о его перспективности для создания препаратов, эффективных в лечении злокачественных опухолей.

Пример 7. Ранозаживляющая активность.

Определение влияния композиций МАТР (combinatorial derivative of 3'-UUGGG-5') (Д1) и МАТР2 (combinatorial derivative of 3'-UUGAA-5') (Д2) на регенерацию тканей.

Изучение ранозаживляющих свойств композиций проводили на самцах белых крыс Vistar.

У 38 животных, которых анестезировали диэтиловым эфиром в течение 2-4 мин, на дорсальном боку тела, сзади правой лопатки выстригали область кожи размером 2×2 см. Кожу брали пинцетом, оттягивали ее, срезали фрагмент кожи размером 2 см, глубина раны - 2 мм, средняя площадь раны составила 4±1,0 см². Полученные раны многоугольной формы интенсивно кровоточили. Затем животным первой и второй групп (по 10 в каждой) на рану наносили Д1 и Д2. Раны крыс 3-й группы обрабатывали Декспантенолом (ДП), 4-ю группу из 8 животных составляла контрольная группа, раны этих животных не обрабатывали. Препараты наносили таким образом, чтобы образовавшиеся гели покрывали всю поверхность раны и захватывали небольшой фрагмент вокруг раны. Сверху на гель наносили клей БФ-6, высушивали и животных отпускали в клетки. Через 3, 6, 9, 11 и 13 дней от начала эксперимента (до заживления ран у животных всех групп) проводилось планиметрическое исследование, которое позволило судить об особенностях репаративных процессов. Измерение площади ран проводилось таким образом: на целлюлозную пленку, которая прикладывалась к ране, наносили ее контуры, после чего с помощью миллиметровой бумаги определяли площадь раневой поверхности.

Стимуляция роста плюрипотентных гемопоэтических клеток CD34+.

Препараты изучали в эксперименте на модели цитостатической гемоиммунодепрессии.

Эксперименты выполнены на 90 крысах-самцах линии Вистар массой 160-200 г. Животных содержали при свободном доступе к воде и пище. Две опытные и контрольную группы составили по 30 животных в каждой. В обеих группах гемоиммунодепрессия вызывалась пятикратным с интервалами в 24 ч внутрибрюшинным введением циклофосфана в дозе 10 мг/кг, рубомицина 2 мг/кг и преднизолона 2 мг/кг в 3 мл физиологического раствора. На следующие сутки после окончания введений гемоиммунодепрессивных препаратов животным опытной группы животным смазывали участок кожи на холке одним из гелей в количестве 0,5 г/животное и наносили клей БФ6. Гель меняли через день. Животным контрольной группы в те же сроки аналогично наносили на кожу плацебо - карбополовый гель без действующих веществ. Действие препарата оценивалось по показателям крови на 1, 10, 30, 60, 90 сутки эксперимента. Пролиферативная активность CD34+ стволовых клеток изучена с использованием набора CD34 Count kit [2] для цитофлюориметрии с применением проточного цитофлюориметра FACS Calibur. Цифровой материал обрабатывался методами непараметрической статистики с определением критерия "U" по Вилкоксо-Манн-Уитни.

Результаты первой серии опытов по изучению ранозаживляющих свойств (табл. 6) показали, что под влиянием композиций Д1 и Д2 значительно ускорилось заживление ран на всех стадиях исследования. Эффективность композиции Д1 была статистически выше, чем у композиции Д2 и ДП.

Таблица 6

Показатели заживления кожных ран у крыс под влиянием композиций Д1 и Д2

Препарат	n	Площадь раны* (S) за время наблюдений, см ² (M±m)				
		1-3 сутки	3-6 сутки	6-9 сутки	9-11 сутки	11-13 сутки
Д1	10	4,0±0,7	1,1±0,4	0,2±0,1	-	-
Д2	10	4,2±0,9	2,0±0,4	0,7±0,2	0,4±0,1	-
ДП	10	4,1±1,0	3,2±0,3	2,4±0,3	1,0±0,3	0,3±0,1
Контроль	8	4,0±0,6	3,6±0,6	2,6±0,6	1,5±0,5	0,5±0,2

* P≤0,05.

Как видно из табл. 6, фактически в 2 раза быстрее заживали раны у животных, раны которых, были обработаны композицией Д1 (с 13 до 6 суток), тогда как эффективность контрольного образца ДП была близка к контрольным значениям. Эпителизация ран инициировалась уже на второй день после нанесения композиции. Интересным является факт отличия варианта Д1 и Д2, хотя они по составу идентичны.

В табл. 7 приведены результаты изучения влияния композиций на количество плюрипотентных клеток CD34+ в крови крыс. Нормальный уровень клеток CD34 в крови колеблется от 3 до 6×10⁶ клеток/л.

Таблица 7

Количество плюрипотентных клеток CD34+ в крови у крыс под влиянием композиций Д1 и Д2

Препарат	n	CD34+ * 10 ⁶ клеток/л				
		1 сутки	10 сутки	30 сутки	60 сутки	90 сутки
Д1	30	1,2±0,4	4,4±0,6	12,3±0,8	15,2±0,9	15,6±1,0
Д2	30	1,0±0,3	4,3±0,7	12,0±0,7	14,3±0,8	15,0±1,1
Карбопол**	30	1,7±0,3	1,0±0,2	1,9±0,2	4,2±0,3	4,0±0,4

* P≤0,05.

** Средний показатель в контрольной группе без иммунодефицита составил 4,2±0,3.

Введение цитостатических препаратов приводило к снижению уровня CD34 к моменту начала терапии в 3-4 раза, по сравнению с исходным уровнем. При этом животные обеих групп были способны восстанавливать их до нормальных величин. Однако процессы регенерации костного мозга с восстановлением показателей периферической крови протекали по-разному. Местное применение на кожу крыс образцов Д1 и Д2 способствовало ускорению этих процессов примерно в 2 раза, о чем свидетельствовало превышение показателей крови животных опытной группы к 30-м суткам более чем в 2 раза, в то время как эти показатели у животных контрольной группы приходили к нормальным значениям только на 60-е сутки. Увеличение количества плюрипотентных клеток, которое коррелировало с ускорением регенера-

ции ран, свидетельствует о преимущественной стимуляции деления стволовых клеток на периферии, а не об усилении функций костного мозга. Максимальный эффект от применения Д1/Д2 наблюдался на 60-е сутки, а восстановление физиологического уровня плюрипотентных клеток наблюдалось уже на 10-е сутки после начала применения геля. В связи с тем что гель наносили на неповрежденную кожу, можно говорить о высоких резорбтивных свойствах геля и общем его эффекте на весь организм.

Таким образом, действие Д1/Д2 приводит к селективной стимуляции деления плюрипотентных клеток в ране и стимуляции экскреции факторов роста фибробластов, способствует 6-кратному ускорению восстановления иммунитета животных после индуцированного иммунодефицита. Также варианты композиций в форме геля Д1 и Д2 обладают значительной регенерирующей способностью на раны, ускоряя эпителизацию и заживление ран в среднем в два раза. Гели Д1 и Д2 обладают способностью всасываться через кожу и оказывать благоприятный эффект на иммунную систему всего организма через стимуляцию деления плюрипотентных клеток CD34.

Пример 8. Акарицидная активность.

Овицидное испытание на клещике паутином (Tetranychus urticae) методом погружения при использовании комбинаторной смеси МАТР на основе олигонуклеотида 3'-UUUAA-5'.

Четыре взрослых самки клещика паутинового (Tetranychus urticae), являющихся чувствительной разновидностью, поместили на каждый диск листа размером 15 мм, взрезанный из молодых листьев. После отложения яиц, продолжающегося 24 ч при 26-28°C, самок удалили, а яйца, отложенные на дисках, посчитали.

Обработку проводили путем погружения дисков листа в растворы, содержащие соответствующие концентрации активных соединений (с использованием в качестве соразтворителя ДМСО в количестве не более 5% в испытуемом растворе). Погружение продолжалось 5 с. После обработки диски сушили на сухой фильтровальной бумаге, затем сохраняли на мокрой фильтровальной бумаге при 26-28°C в чашке Петри до выведения из необработанных контрольных яиц, затем определили коэффициент выведения. Каждый эксперимент повторили четыре раза с использованием по крайней мере трех аналогичных опытов для каждой концентрации. Значения эффективности, приведенные для каждой концентрации, показывают среднее значение обработок, проведенных по крайней мере на 250 яйцах клеща. Откорректированную смертность вычисляли согласно Abbott. Результаты, выраженные в виде процентного содержания, показаны в табл. 8.

Таблица 8

Выживаемость яиц клещика паутинового после обработки разработанной комбинаторной библиотекой МАТР

Образец	% выживших яиц				
	1	2	3	4	5
Опыт, МАТР	11±2	5±1	12±2	8±1	17±3
Контроль	67±8	72±9	60±9	64±10	53±9

$P < 0,01$.

Как видно из таблицы, обработка раствором МАТР образцов приводит к достоверному снижению процента выживаемости, что свидетельствует о наличии акарицидного действия комбинаторной библиотеки МАТР на основе олигонуклеотида 3'-UUUAA-5'.

Пример 9. Гербицидная активность.

Пластиковые подносы выстилались полиэтиленовой пленкой и заполнялись пастеризованной песчаносуглинистой почвой *Sassafras* (pH 6,5, 1% О.М.). Один поднос засеивался пшеницей (*Triticum aestivum*), ячменем (*Hordeum vulgare*), овсягом (*Avena fatua*), костером кровельным (*Bromus Secalinus*), лисохвостом мышехвостниковидным (*Alopecurus myosuroides*), мятликом однолетним (*Poa annua*), щетинником зеленым (*Setaria viridis*), итальянским плевелом (*Lolium multiflorum*) и семенами рапса (*Brassica napus*). Второй поднос засеивался следующими растениями: *Matricaria inodora*, подмаренник цепкий (*Gallium aparine*), солянка русская (*Salsola kali*), пастушья сумка обыкновенная (*Capsella bursapastoria*), кочия (*Kochia scoparia*), паслен черный (*Solanum, nigrum*), вероника (*Veronica persica*), горец вьющийся (*Polygonum convolvulus*) и сахарная свекла (*Beta vulgaris*). Для послевсходовой обработки первый поднос или лоток засеивался за 14 дней до опрыскивания, а второй лоток засаживался за 24 дня до обработки. Растения при послевсходовых обработках классифицировались по высоте от 1 до 15 см в зависимости от вида. Пшеница, ячмень и овсяг находились на стадии развития 2 листа (Стадия II Ladors). Перед опрыскиванием для проведения предвсходовых обработок идентичным образом подготавливался еще один комплект лотков. Гербициды разбавлялись в нефитотоксичном растворителе и применялись по отношению к лоткам с использованием ленточного опрыскивателя. Дополнительно производилась оценка трех других видов: *Veronica hederæ folia*, звездчатки (*Stellaria media*) и *Viola arvensis*. Эти растения выращивались в пятидюймовых горшках, содержащих такую же почву, что описана ранее. Растения до обработки выращивались в течение 22 дней. Применение гербицида производилось аналогичным образом, как при скрининге лотков. Растения выращивались в теплице в течение 21 дня; за это время производилась

визуальная оценка при сравнении с необработанным контролем. Оценка основывалась на шкале от 0 - отсутствие эффекта до 100 - полная гибель. Результаты приведены в табл. 9-11.

Таблица 9

Гербицидное действие заявляемого способа МАТР

Норма расхода (г/га)	7,9	4	2
До появления всходов			
Пшеница	0	0	0
Ячмень	0	0	0
Сахарная свекла	50	1	20
Рапс	10	0	0
Овсяг	0	0	0
Костер	0	0	0
кровельный	0	0	0
Лисохвост мышехвостни-			
ковидный	0	0	0
Мятлик однолетний	0	0	0
Щетинник зеленый	0	0	0
Итальянский плевел	0	0	0
Mauetarla Inodora	0	0	0
Galium aparine	0	0	0
Солянка русская	0	0	0
Пастушья сумка обыкно-			
венная	20	10	0
Кочия	0	0	0
Паслен черный	0	0	0
Вороника	0	0	0
Горец вьющийся	0	0	0
После появления всходов			
Пшеница	0	0	0
Ячмень	0	0	0
Сахарная свекла	80	90	90
Рапс	90	80	90
Овсяг	0	0	0
Костер кровельный	0	0	0
Лисохвост мышехвостни-			
ковидный	0	0	0

Мятлик однолетний	0	0	0
Щетинник зеленый	0	0	0
Итальянский плевел	0	0	0
Matrecarta Inodore	70	60	50
Galium aparire	0	0	0
Солянка русская	90	90	70
Пастушья сумка обыкновенная.	90	90	80
Копия	80	70	50
Паслен черный	60	60	50
Вероника	50	30	30
Горец вьющийся	70	30	0
Veronica hederacfolia	0	0	0
Viola arvensis	65	50	0
Stellaria media	95	80	75
До появления всходов			
Ячмень (яровой)	0	0	0
Ячмень (озимый)	0	0	0
Паслен черный	30	0	0
Лисохвост мышехвостниковидный	0	0	0
Мятлик однолетний	0	0	0
Подмаренник цепкий	0	0	0
Костер кровельный	0	0	0
Ярутка полевая	20	0	0
Viola arvensis	0	0	0
Щетинник зеленый	0	0	0
Итальянский плевел	0	0	0
Veronica hederacfolia	0	0	0
Aegilops cylindrica	0	0	0
Kochia scoparia	60	60	0
Марь белая	70	70	0

veronica persica	30	30	20
Ране	70	40	40
Солянка русская	70	20	0
Matricaria Inodora	0	0	0
Сахарная свекла	90	90	40
Пшеница (яровая)	0	0	0
Пшеница (озимая)	0	0	0
Горец вьющийся	10	20	10
Овсяг	0	0	0
После появления всходов			
Ячмень (яровой)	0	0	0
Ячмень (озимый)	0	0	0
Паслен черный	30	0	0
Лисохвост мышехвостни-			
ковидный	20	0	0
Мятлик однолетний	0	0	0
Подмаренник цепкий	30	20	0
Костер кровельный	0	0	0
Ярука полевая	90	90	90
Viola arvensis	70	60	60
Щетинник зеленый	0	0	0
Итальянский плевел	0	0	0
Veronica hederacfolia	0	0	0
Aeqllops cyllndrica	0	0	0
Kochla scoparia	100	90	00
Марь белая	100	100	100
Veronica perslca	100	60	60
Ранс	100	100	90
Солянка русская	100	100	100
Matricaria Inodora	100	100	80
Сахарная сосклэ	100	100	100
Пшеница (яропая)	0	0	0
Пшеница (озимая)	0	0	0
Горец омощийся	70	50	30
Овсяг	0	0	0

Таблица 10

Фитотоксическое действие заявленного способа МАТР

Доза соединения г/га	% повреждения культурных растений, применяемых в качестве индикаторов		
	горох	рапс	сахарная свекла
0	0	0	0
2,18	0	5	60
4,37	0	5	25
8,75	0	5	75
17,5	0	40	90
35,0	0	75	100
35 г/га (инкубирование в течение 10 суток)	0	10	60

Таблица 11

Фитотоксическое действие прототипа

Доза соединения г/га	% повреждения культурных растений, применяемых в качестве индикаторов		
	горох	рапс	сахарная свекла
0	0	0	0
0,5	0	0	20
1,1	0	0	55
2,25	35	60	95
4,5	90	80	100
9,0	100	90	90
9 г/га (инкубирование в течение 95 суток)	95	70	85

Как видно из табл. 9-11, предложенная комбинаторная библиотека МАТР обладает гербицидной активностью на широкий спектр сорных растений, а на культурные растения имеет менее выраженное ростотормозящее действие и может с успехом применяться как гербицидное средство.

Пример 10. Пестицидная активность.

Соединения по настоящему изобретению проявляют превосходную пестицидную активность по отношению к таким вредителям, как полукрылые насекомые, чешуекрылые насекомые, жесткокрылые насекомые, двукрылые насекомые, перепончатокрылые насекомые, прямокрылые насекомые, равнокрылые насекомые, насекомые, у которых чешуйками покрыта лишь часть крыла, клещи и паразитирующие на растениях нематоды. Среди них можно назвать следующих вредителей: полукрылые насекомые клопы (Heteroptera), такие как бобовый клоп (*Riptortus clavatus*), южный зеленый клоп-щитник (*Nezara vindula*), клопы семейства *Lygus* sp., клоп белокрылый (*Bhssus leucopterus*) и клоп грушевый (*Stepha mtis nashi*), толстоголовки (*Circulifer* sp.), такие как зеленая рисовая толстоголовка (*Nephotettix cincticeps*) и толстоголовки вида *Enproasca* sp., *Erythroneura* sp., *Circulifer* sp., дельфациды (*Delphacidae*), такие как коричневая рисовая дельфацида (*Nilaparvata lugens*), белокрылая дельфацида (*Sogatella furcifera*) и малая коричневая дельфацида (*Laodelphax stnatellus*), прыгающие растительные блохи (*Psyllidae*), такие как листоблошки (*Psylla* sp.), белокрыпки (*Aleyrodidae*), такие как картофельная белокрылка (*Bemisia tabaci*) и тепличная белокрылка (*Taleurodes vaporariorum*), тли (*Aphididae*), такие как винофадная блошка (*Viteus vitifoln*), тля персиковая (*Myzus persicae*), яблочная тля (*Aphis pomi*), хлопковая тля (*Aphis gossypn*), *Aphis fabae*, тля ложно капустная (*Rhopalosiphum psedodrassicas*), тепличная картофельная тля (*Aulacorthum solani*) и тля злаковая обыкновенная (*Schizaphis graminum*), червецы мучнистые или щитовки, такие как червецы семейства *Pseudococcus comstocki*, красная восковая щитовка (*Ceroplastes rubens*), щитовка калифорнийская (*Comstockaspis pernicios*) и восточная цитрусовая щитовка (*Unaspis yanonensis*); чешуекрылые насекомые листовертки (*Tortricidae*), такие как листовертка восточная чайная (*Hormona magnanima*), летняя листовертка плодовых деревьев (*Adoxophyes orana*), листовертки семейства *Sparganothis*

pillenana, листовертка восточная персиковая (*Graphohtha molesta*), бобовый точильщик (*Legumimvora glycimvorella*), плодоярка яблонная (*Laspeyresia pomonella*), листовертки семейства *Eucosma* sp. и виноградная листовертка (*Lobesia botrana*), слизни, такие как виноградный слизень (*Eupocilha ambiquella*), мешочницы (*Psychidae*), такие как мешочницы вида *Bambahna* sp., моли (*Tmeidae*), такие как европейская зерновая моль (*Nemapogon granellus*) и платяная моль (*Tinea translucens*), моли семейства *Lyonetndae*, такие как *Lyonetia prumfohella*, пестрянки, такие как моль яблонная листовая (*Phyllonorycter ngoniello*), *Phyllocmstidae*, такие как моль цитрусовая (*Phyllocnistis cetrella*), ипонометиды, такие как моль капустная (*Plutella xylostella*) и ипонометидная моль (*Prays citn*) стеклянницы (*Synanthedon* sp.), такие как виноградная моль (*Paranthene regahs*) и стеклянницы семейства *Synanthedon* sp., моли семейства *Gelechndae*, такие как розовый коробочный червь хлопчатника (*Pectinophora gossypiella*), картофельный клубневый червь (*Phthonmaea operculella*) и *Stomopteryx* sp., *Carposimidae*, такие как листовертка персиковая (*Carposma mponensis*), слизневые ложногусеничные листовертки, такие как слизневка восточная (*Monema flavescens*), пиралидные моли, такие как огневка стеблевая рисовая (*Chilo suppressahs*), листовертка рисовая (*Snaphalocrocis medinahs*), мотылек кукурузный европейский (*Ostrmia nubilahs*), мотылек кукурузный восточный (*Ostrmia furnacahs*), огневка капустная (*Hellula undahs*), моль большая восковая (*Gallena melonella*), малый мотылек кукурузный (*Elasmopalpus hgnosellus*) и мотылек луговой (*Loxostege sticticahs*), белянки, такие как обычные гусеницы капустной белянки (*Pieris rapae*), геометридные моли, такие как полярная пяденица (*Ascotis selenana*), гусеницы коконопрядов, таких как коконопряды вида *Malacosoma neustna*, бражники, такие как бражник табачный (*Manduca sexta*), волнянки, такие как волнянка чайная (*Euproctis pseudoconspersa*) и непарный шелкопряд (*Lymantra dispar*), медведицы, такие как американская белая бабочка (*Hyphantna cunea*), совки, такие как совка табачная (*Hehothis virescens*), совка хлопковая (*Hehcoverpa zea*), свекловичный ратный червь (*Spodoptera exigua*), совка хлопковая (*Hehcoverpa armigera*), совка обычная (*Spodoptera htura*), капустный ратный червь (*Mamestra brassicae*), совка ипсилон (*Agrotis ipsilon*), рисовый ратный червь (*Pseudaletia separata*) и совка ни (*Tnchoplusiani*); жесткрылые насекомые: хрущи, такие как медный хрущ (*Anomala cuprea*), хрущик японский (*Popilha jaromca*), соевый хрущик (*Anomala rufocuprea*) и *Eutheola rugiceps*, жуки-щелкуны (*Conodeus* sp.), такие как личинки щелкуна видов *Agnotes* sp. и *Conodeus* sp., божьи коровки, такие как двадцативосьмипятнистая божья коровка (*Epilachna vigmticetopunetata*) и мексиканская божья коровка (*Epilachna vanvestis*), чернотелки, такие как красно-коричневый хрущик рисовый (*Tnbolum castaneum*), длиннорогие жуки, такие как белопятнистый длиннорогий жук (*Anoplophora malasiaca*) и усач черный (*Monochamus alternatus*), семенные жучки, такие как долгоносик фасоли (*Acanthoscehdes obtectus*) и лучистый долгоносик фасоли (*Callosotruchus chmensis*), листоеды, такие как (*Leptmotarsa decemlmeata*), блошка длинноусая (*Diabrotica* sp.), листоед рисовый (*Oulema oryzae*), свекловичный листоед мелкий (*Chaetocnema concmna*), горчичный жук (*Phaedon cochleanas*), злаковый листоед (*Oulema melanopus*) и листоеды семейства *Dicladispa armigere* *Apionidae*, такие как *Apion godmani*, долгоносики, такие как долгоносик рисовый (*Anthonomus grandis*), *Rhynchophondae*, такие как долгоносик кукурузный (*Sitophilus zeamaais*), короеды, трогиды, точильщик хлебный; двукрылые насекомые: долгоножка рисовая (*Tipra ano*), галлица рисовая (*Tanytarsus oryzae*), *Orseoha oryzae*, *Ceratitis capitata*, моль рисовая (*Hydrelha gnseola*), дрозофила вишневая (*Drosophila suzukn*), мушка шведская (*Oscmella frit*), рисовая стеблевая личинка (*Chlorops oryzae*), бобовая минирующая мушка (*Ophiomyia phascoh*), моль бобовая (*Linomyza trifoln*), муха свекловичная (*Pegomya hyoscyami*), личинка кукурузная (*Hylemia platura*), мушка *copro* (*Athengona soccata*), муха настоящая (*Musca domestica*), *Gastrophilus* sp., мухи семейства *Stomoxys* sp., *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*, *Anopheles slensis* и *Culex tntaemorhynohus*, перепончатокрылые насекомые хлебные пилильщики (*Cephus* sp), эвритомиды (*Harmohta* sp.), пилильщик капустный (*Athaha* sp.), шершни (*Vespa* sp.) и муравей Рихтера Прямокрылые насекомые таракан рыжий (*Blatella germanca*), таракан американский (*Penplaneta amencana*), медведка (*Gryllotapla afncana*), саранча перелетная (*Locusta migratona migratonodes*), и *Melanoplus sanguinipes* Термитные насекомые термиты вида *Reticulitermes speratus* и *Coptotermes formosanus*; пузыреногие насекомые: желтый чайный трипе (*Scirtothnps dorsahs*), трипе вида *Trips palmi*, тепличный трипе (*Hehothnps haemorrhohdahs*), цветочный трипе (*Frankhmella occidentahs*) и мохнатый трипе рисовый (*Harlothnps aculeatus*); клещи: клещик паутиный двупятнистый (*Tetranychus urticae*), клещик паутиный (*Tetranychus kanzawai*), клещик красный цитрусовый (*Panonychus citn*), клещ красный европейский (*Panonychus ulmi*), желтый паутиный клещик (*Eotetranychus carpm*), техасский цитрусовый клещик (*Phyllocoptruta oleivora*), клещик (*Polyhagotarsonemus latus*), клещики паутинные ложные (*Brevipalpus* sp.) клещик корневой (*Rhizoglyphus robim*) и клещик плесневый (*Tyrophagus putrescentiae*); нематоды, паразитирующие на растениях: южная корневая нематода (*Meloidogyne incognita*), корневая нематода (*Pratylenchus* sp.), соевая циста (*Heterodera glycmes*), рисовая белая нематода (*Aphelenchoides besseyi*) и нематода сосновая (*Bursaphelenchus xylophilus*); другие вредители и паразиты *Gastropoda*, такие как улитка яблонная (*Pomacea sanahculata*), слизни (*Indiana* sp.) и ахатина (*Achatina fuhca*), мокрицы (*Isopoda*), такие как равноногие и многоногие мокрицы, вши (*Liposcehs* sp.), *Ctenplepisma* sp., *Pulex* sp., *Tnchodectes* sp., *Cimex* sp., клещи, паразитирующие на животных, такие как *Boophilus microplus*, *Aemaphysahs longicorms* и *Epidermoptidae*. Далее МАТР по настоящему изобретению эффективны также против вредителей, которые устойчивы к действию фосфорорганических соединений, карбаматных соединений, синтетических пирет-

роидных соединений, производных ацилмочевины или обычных инсектицидов. Так, соединения по настоящему изобретению проявляют превосходную пестицидную активность по отношению к широкому кругу вредителей, включая полукрылых насекомых, чешуекрылых насекомых, жесткокрылых насекомых, двукрылых насекомых, перепончатокрылых насекомых, прямокрылых насекомых, равнокрылых насекомых, насекомых, у которых чешуйками покрыта лишь часть крыла, клещей и паразитирующих на растениях нематод, а также способны контролировать вредителей, которые приобрели устойчивость к действию обычных пестицидов.

Инсектицидный тест против моли капустной.

МАТР на основе олигонуклеотида 3'-UUAGA-5' разбавляют водой таким образом, чтобы концентрация активного ингредиента составила 500 ч./млн. Листья капусты погружают в полученный разбавленный раствор, сушат на воздухе и помещают в чашку из поливинилхлорида. В чашку выпускают личинки капустной моли и чашку закрывают сверху крышкой затем чашку на 6 дней помещают в термостатируемую камеру с температурой 25°C и подсчитывают количество умерших насекомых с целью определить процент смертности. Проводят два последовательных эксперимента. Средний процент смертности для данной версии МАТР составил 100%.

Инсектицидный тест против рисовой дельфациды.

МАТР на основе олигонуклеотида 3'-UUAGA-5' разбавляют водой таким образом, чтобы концентрация активного ингредиента составила 500 ч./млн. В полученный разбавленный раствор погружают стебли и листья риса, которые затем сушат на воздухе и помещают в пробирку. В пробирку выпускают 5 личинок коричневой рисовой дельфациды и отверстие пробирки затыкают пористым веществом. Затем пробирку на 6 дней помещают в термостатируемую камеру с температурой 25°C и подсчитывают количество умерших насекомых с целью определить процент смертности. Проводят два последовательных эксперимента. Средний процент смертности для данной версии МАТР составил 100%.

Инсектицидный тест против долгоносика лучистой фасоли.

МАТР на основе олигонуклеотида 3'-UUAGA-5' разбавляют водой таким образом, чтобы концентрация активного ингредиента составила 100 ч./млн. 0,75 мл полученного разбавленного раствора наносят в виде капель на фильтровальную бумагу диаметром 6 см, которую помещают в чашку из поливинилхлорида емкостью 60 мл. В чашку выпускают пять взрослых самок долгоносика лучистой фасоли и чашку закрывают крышкой. Затем чашку на 4 дня помещают в термостатируемую камеру с температурой 25°C и подсчитывают количество умерших насекомых с целью определить процент смертности. Проводят два последовательных эксперимента. Средний процент смертности для данной версии МАТР составил 100%.

Пример 11. Фармацевтические композиции.

Могут быть использованы различные способы введения супрамолекулярных комбинаторных производных олигонуклеотидов РНК (МАТР). МАТР композицию можно давать перорально или можно вводить внутрисосудистой, подкожной, внутрибрюшинной инъекцией, в форме аэрозоля, глазным способом введения, в мочевого пузырь, местно и т.д. Например, способы ингаляционного введения хорошо известны в данной области техники. Доза терапевтической композиции будет варьировать в широких пределах в зависимости от конкретного вводимого МАТР, природы заболевания (назначения), частоты введения, способа введения, клиренса используемого агента из организма хозяина и т.п. Начальная доза может быть более высокой с последующими более низкими поддерживающими дозами. Дозу можно вводить с частотой один раз в неделю или один раз в две недели или делить на меньшие дозы и вводить их один или несколько раз в сутки, два раза в неделю и т.д. для поддержания эффективного уровня дозы. Во многих случаях для перорального введения будет необходима более высокая доза, чем для внутривенного введения. Соединения по данному изобретению могут быть включены во множество композиций для терапевтического введения. Более конкретно, соединения по настоящему изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции в сочетании с подходящими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями и могут быть включены в препараты в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной формах, таких как капсулы, порошки, гранулы, мази, кремы, пены, растворы, суппозитории, инъекции, формы для ингаляционного применения, гели, микросферы, лосьоны и аэрозоли. Как таковое введение соединений может быть осуществлено различными способами, включая пероральное, трансбуккальное, ректальное, парентеральное, внутрибрюшинное, внутрикожное, чрескожное, интратрахеальное введение и т.д. МАТР по изобретению могут распределяться системно после введения или могут быть локализованы с использованием имплантата или другой композиции, удерживающей активную дозу в месте имплантации. Соединения по настоящему изобретению могут быть введены сами по себе, в комбинации друг с другом или они могут быть использованы в комбинации с другими известными соединениями (например, классическими противораковыми средствами, противовоспалительными агентами, иммуномодуляторами и т.д.). В фармацевтических лекарственных формах соединения могут быть введены в форме их фармацевтически приемлемых солей. Следующие способы и эксципиенты приведены лишь в качестве примеров и никоим образом не являются ограничивающими. Для препаратов для перорального введения соединения могут быть использованы сами по себе или в комбинации с подходящими добавками для изготовления таблеток, порошков, гранул или капсул, например, с обычными

добавками, такими как лактоза, маннит, кукурузный крахмал или картофельный крахмал; со связывающими агентами, такими как кристаллическая целлюлоза, производные целлюлозы, аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатины; с разрыхлителями, такими как кукурузный крахмал, картофельный крахмал или карбоксиметилцеллюлоза натрия; со смазывающими агентами, такими как тальк или стеарат магния; и, если желательно, с разбавителями, буферными агентами, увлажняющими агентами, консервантами и корригентами. Соединения могут быть включены в композиции для инъекций путем их растворения, суспендирования или эмульгирования в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие подобные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоля; и, если желательно, с обычными добавками, такими как солюбилизаторы, изотонические агенты, суспендирующие агенты, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты. Соединения могут быть использованы в аэрозольной композиции для ингаляционного введения. Соединения по настоящему изобретению могут быть включены в приемлемые пропелленты под давлением, такие как дихлордифторметан, пропан, азот и тому подобное. Кроме того, соединения могут быть включены в суппозитории смешиванием с множеством основ, таких как эмульгирующие основы или водорастворимые основы. Соединения по настоящему изобретению могут быть введены ректально с использованием суппозитория. Суппозиторий может содержать наполнители, такие как масло какао, карбоваксы и полиэтиленгликоли, расплавляющиеся при температуре тела, но твердые при комнатной температуре. Могут быть изготовлены стандартные лекарственные формы для перорального или ректального введения, такие как сиропы, эликсиры и суспензии, где каждая единица дозы, например, чайная ложка, столовая ложка, таблетка или суппозиторий, содержит predetermined количество композиции, содержащей одно или более соединений по настоящему изобретению. Сходным образом, стандартные лекарственные формы для инъекции или внутривенного введения могут содержать соединение по настоящему изобретению в композиции в форме раствора в стерильной воде, нормальном физиологическом растворе или другом фармацевтически приемлемом носителе. Имплантаты для длительного высвобождения композиций хорошо известны в данной области техники. Имплантаты изготавливают в форме микросфер, пластинок и т.д. с биodeградируемыми или не являющимися биodeградируемыми полимерами. Например, полимеры молочной и/или гликолевой кислот образуют деградируемый полимер, хорошо переносимый хозяином. Имплантат, содержащий противораковый МАТР по изобретению, располагают близко к опухоли, так чтобы локальная концентрация активного агента была повышенной по сравнению с остальными областями тела. При использовании здесь термин "стандартная лекарственная форма" относится к физически дискретным единицам, подходящим для использования в качестве однократных доз для субъектов людей и животных, при этом каждая единица содержит predetermined количество соединений по настоящему изобретению, которого согласно вычислениям достаточно для оказания желаемого эффекта совместно с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем. Описания стандартных лекарственных форм по настоящему изобретению зависят от конкретного используемого соединения, и эффекта, который должен быть достигнут, и фармакодинамики используемого соединения у хозяина. Фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как наполнители, адъюванты, носители или разбавители, общедоступны. Кроме того, общедоступны фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как агенты для регулирования pH и буферные агенты, агенты для регулирования тоничности, стабилизаторы, смачивающие агенты и тому подобное. Типичные дозы для системного введения варьируют от 0,1 мг до 100 мг на кг массы тела субъекта на одно введение. Типичная доза может представлять собой одну таблетку для приема от двух до шести раз в сутки или одну капсулу или таблетку с длительным высвобождением для приема один раз в сутки с пропорционально более высоким содержанием активного ингредиента. Эффект длительного высвобождения может быть обусловлен материалами, из которых изготовлена капсула, растворяющимися при различных значениях pH, капсулами, обеспечивающими медленное высвобождение под воздействием осмотического давления или любым другим известным способом контролируемого высвобождения. Специалистам в данной области техники будет ясно, что уровни доз могут варьировать в зависимости от конкретного соединения, тяжести симптомов и предрасположенности субъекта к побочным эффектам. Некоторые из конкретных соединений обладают большей активностью, чем другие. Предпочтительные дозы данного соединения могут быть легко определены специалистами в данной области техники множеством способов. Предпочтительным способом является измерение физиологической активности данного соединения. Один из интересующих способов представляет собой применение липосом в качестве наполнителя для доставки. Липосомы сливаются с клетками целевой области и обеспечивают доставку содержимого липосом внутрь клеток. Контакт липосом с клетками поддерживают в течение времени, достаточного для слияния, с использованием различных способов поддержания контакта, таких как выделение, связывающие агенты и тому подобное. В одном аспекте изобретения липосомы разработаны для получения аэрозоля для легочного введения. Липосомы могут быть изготовлены с очищенными белками или пептидами, опосредующими слияние мембран, такими как вирус Сендай или вирус гриппа и т.д. Липиды могут представлять собой любую полезную комбинацию известных липидов, образующих липосомы, включая катионные или цвиттерионные липиды, такие как фосфатидилхолин. Остальные липиды будут обычно нейтральными или кислыми липидами, такими как холестерин, фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин и т.п. Для

получения липосом может быть использован способ, описанный Kato et al. (1991), J. Biol. Chem., 266:3361. Кратко липиды и композицию для включения в липосомы, содержащую МАТР, смешивают в подходящей водной среде, подходящим образом в солевой среде, где общее содержание твердых веществ будет находиться в диапазоне приблизительно 110 мас.%. После интенсивного перемешивания в течение коротких периодов времени, приблизительно 5-60 с, пробирку помещают в теплую водяную баню при приблизительно 25-40°C и этот цикл повторяют приблизительно 5-10 раз. Затем композицию обрабатывают ультразвуком на протяжении подходящего периода времени, обычно приблизительно 1-10 с, и, возможно, дополнительно перемешивают на вихревой мешалке. Затем объем увеличивают добавлением водной среды, обычно в приблизительно 1-2 раза, с последующим взбалтыванием и охлаждением. Способ позволяет включать в липосомы супрамолекулярные структуры с высокой суммарной молекулярной массой.

Композиции с другими активными агентами.

Для применения в рассматриваемых способах МАТР по изобретению могут быть включены в композиции с другими фармацевтически активными агентами, в частности другими противораковыми, иммуномодулирующими, ранозаживляющими, противовирусными агентами. Другие интересующие агенты включают широкий спектр немодифицированных препаратов, известных в данной области техники, в том числе антибиотики. Классы антибиотиков включают пенициллины, например пенициллин G, пенициллин V, метициллин, оксациллин, карбенициллин, нафциллин, ампициллин и т.д.; пенициллины в комбинации с ингибиторами бета-лактамазы; цефалоспорины, например цефаклор, цефазолин, цефуроксим, моксалактам и т.д.; карбапенемы; монобактамы; аминогликозиды; тетрациклины; макролиды; линкомицины; полимиксины; сульфонамиды; хинолоны; хлорамфеникол; метронидазол; спектиномицин; триметоприм; ванкомицин и т.д. Также полезны противогрибковые агенты, включая полиены, например амфотерицин В, нистатин, флукозин; и азолы, например миконазол, кетоконазол, итраконазол и флуконазол. Противотуберкулезные лекарственные средства включают изониазид, этамбутол, стрептомицин и рифампин. Другие интересующие агенты включают широкий спектр антивирусных производных мононуклеотидов и других средств-ингибиторов РНК-полимераз, известных в данной области техники. Классы антивирусных средств включают интерфероны, ламивудин, рибавирин и т.д.; амантадин; ремантадин, например зинамивир, озельтавир и т.д.; ацикловир, валакцикловир, валганцикловир и т.д. Другие группы антивирусных средств включают адефовир, вбакавир, диданозин, эмтрицитабин, ламивудин, ставудин, тенофовир, эфавиренз, невирапин, индинавир, лопинавир и ритонавир, нелфинавир, ритонавир, сакинавир, даклатасвир, софовавир. В композицию МАТР по изобретению могут также быть включены цитокины, например интерферон гамма, фактор некроза опухоли альфа, интерлейкин 12 и т.д. Далее настоящее изобретение описано следующими примерами, которые не следует толковать как ограничивающие объем изобретения.

Промышленная применимость

Изобретение относится к органической химии и может быть использовано в косметологии, фармацевтике и химической промышленности для создания новых более эффективных косметических, фармацевтических композиций, пестицидов, акарицидов и гербицидов на основе комплементарных комбинаторных защищенных олигонуклеотидов РНК. Полученные таким образом средства являются полностью экологически безопасными, биodeградируемыми и полностью метаболизируемыми как в организме, так и в окружающей среде, а технологии их получения относятся к группе полностью безотходных. Производство подобных средств осуществимо на имеющемся оборудовании химических, фармацевтических и косметологических предприятий и не требует уникального оборудования. Сырьевая база доступна и не требует дополнительных усилий для выращивания или производства.

Список литературы

1. Патент США № 7579451. Oligonucleotides comprising a modified or non-natural nucleobase.
2. Евразийский патент ЕА 025625. Модифицированные антикомплемментарные олигонуклеотиды с противораковыми свойствами и способ их получения.
3. Sutherland D.R., Keeney M. Enumeration of CD34+ cells by Flow Cytometry // Cellular Therapy: Principles, Methods and Regulations. An American Association of Blood Bankers Cell Therapy Technical Manual. - The American Association of Blood Bankers (AABB), Bethesda MD, 2009. - С. 538-554.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинаторная смесь производных олигонуклеотидов РНК, отличающаяся тем, что для ее получения проводят химическую модификацию исходных олигонуклеотидов РНК и одновременно комбинаторно карбоксилируют и формилируют входящие в их состав экзоциклические аминогруппы аденина, гуанина, цитозина и спиртовой остаток рибозы в рассчитанном мольном соотношении в реакции комбинаторного синтеза для получения максимального количества разных производных с образованием комбинаторной смеси производных олигонуклеотида без дальнейшего разделения на фрагменты, при этом реагенты в комбинаторном синтезе берут в мольном соотношении компонентов, рассчитанных согласно формулам

$$k=n \times (2^n-1) \quad (1),$$

$$m=4 \times (3 \times 2^{n-2} - 1) \quad (2),$$

где n - количество доступных для замещения групп в олигонуклеотиде,

m - количество молей исходного олигонуклеотида для введения в реакцию синтеза и количество разных молекул его комбинаторных производных после синтеза,

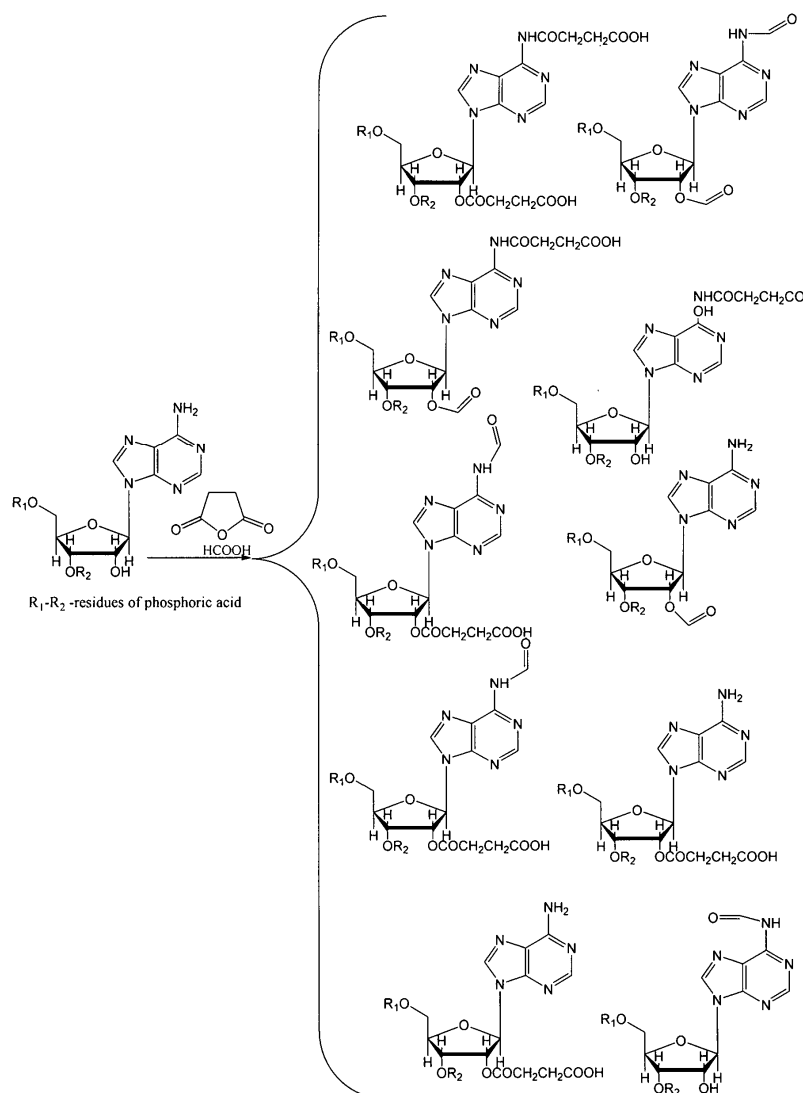
k - количество молей каждого из двух модификаторов - карбоксилирующего и формилирующего;

а в качестве исходных используют РНК - олигонуклеотиды следующей нуклеотидной последовательности: 3'-UUN₁N₂N₃-5', где N₁N₂N₃ соответствуют хотя бы одной из следующих последовательностей, включая их смесь: UUC; UUA; UUG; CUU; CUC; CUA; CUG; AUU; AUC; AUA; AUG; GUU; GUC; GUA; GUG; UCU; UCC; UCA; UCG; CCU; CCC; CCA; CCG; ACU; ACC; ACA; ACG; GCU; GCC; GCA; GCG; UAU; UAC; UAA; UAG; GAU; CAC; GAA; GAG; AAU; AAC; AAA; AAG; GAU; GAC; GAA; GAG; UGU; UGC; UGA; UGG; CGU; CGC; CGA; CGG; AGU; AGC; AGA; AGG; GGU; GGC; GGA; GGG.

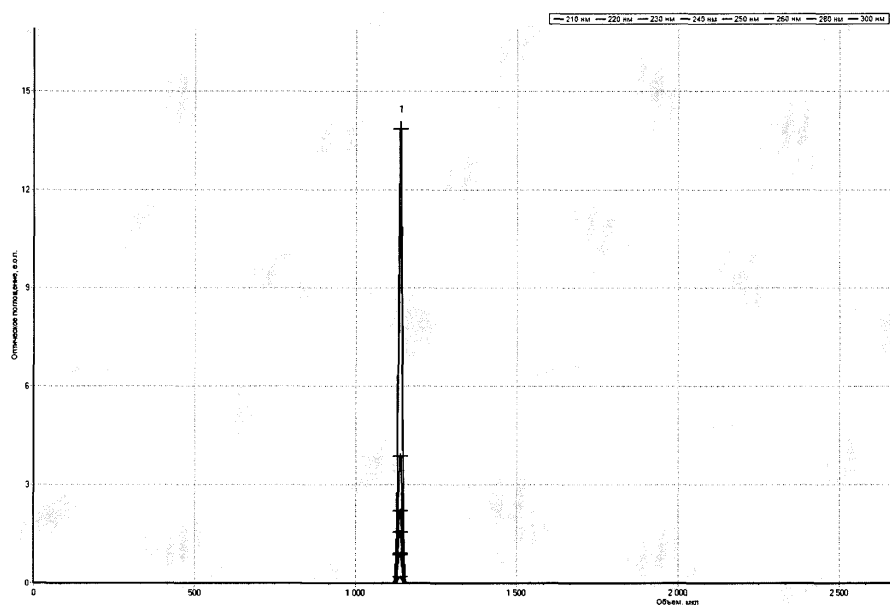
2. Комбинаторная смесь производных олигонуклеотидов РНК по п.1, отличающаяся тем, что карбоксилирование экзоциклических аминогрупп нуклеозидов А, G, C и спиртового остатка рибозы проводят путем ацилирования ангидридом дикарбоновой кислоты.

3. Комбинаторная смесь производных олигонуклеотидов РНК по п.1, отличающаяся тем, что карбоксилирование экзоциклических аминогрупп нуклеозидов А, G, C и спиртового остатка рибозы проводят путем ацилирования ангидридом трикарбоновой кислоты.

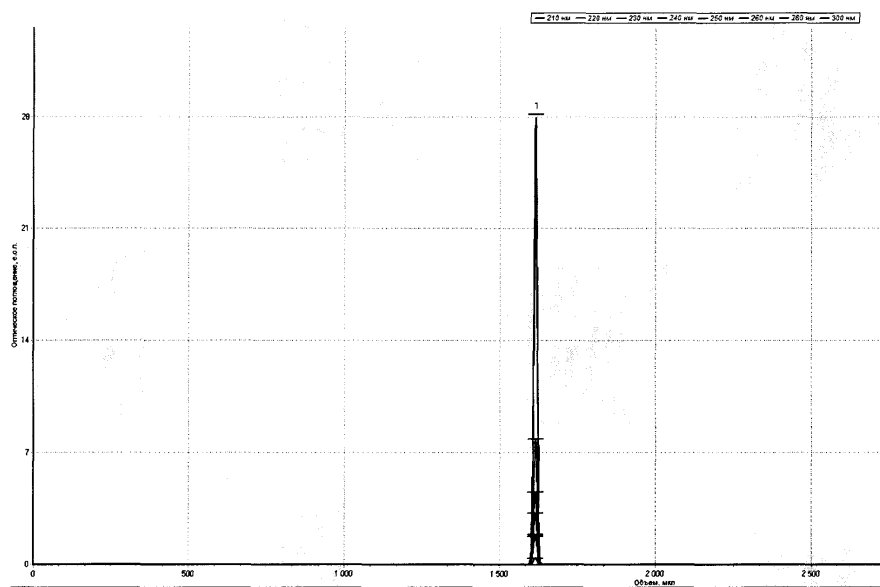
4. Комбинаторная смесь производных олигонуклеотидов РНК по п.1, отличающаяся тем, что карбоксилирование экзоциклических аминогрупп нуклеозидов А, G, C и спиртового остатка рибозы проводят путем алкилирования монохлоруксусной кислотой.



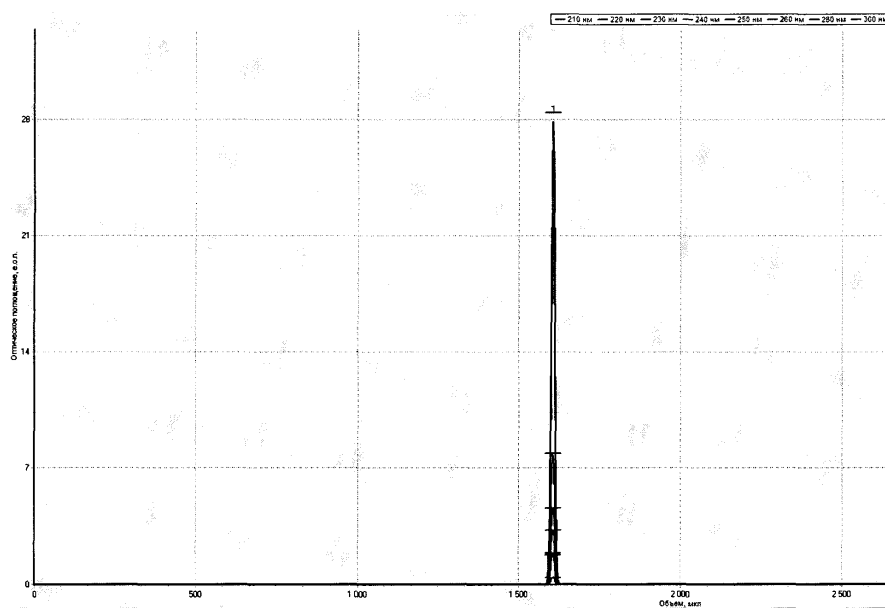
Фиг. 1



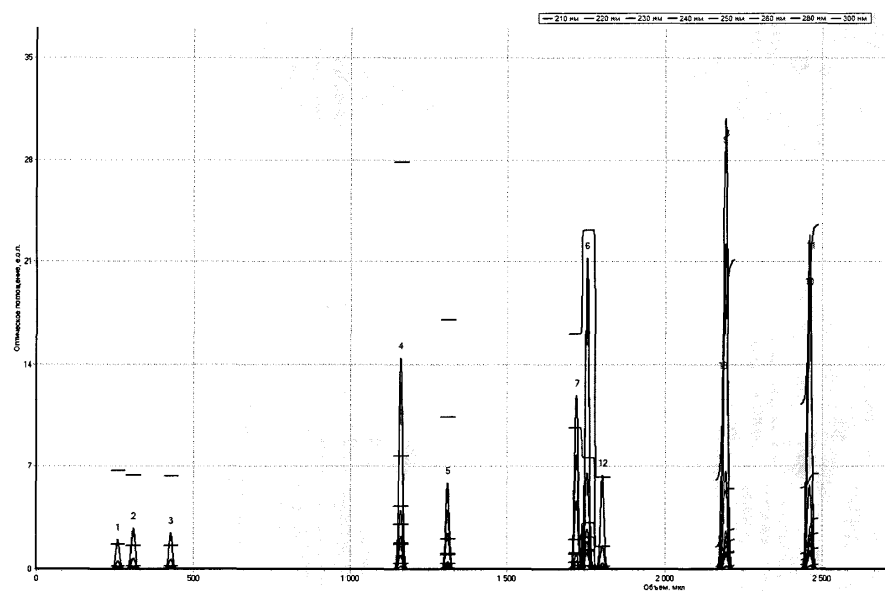
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2