

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035885**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.27

(21) Номер заявки
201791753

(22) Дата подачи заявки
2016.04.21

(51) Int. Cl. **C07H 21/00** (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПОЗИЦИЙ СОЛЕЙ ПОЛИВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ

(31) **62/151,891**

(32) **2015.04.23**

(33) **US**

(43) **2018.04.30**

(86) **PCT/US2016/028657**

(87) **WO 2016/172346 2016.10.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЖЕРОН КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
Рамия Премчандран Х. (US)

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В. (RU)**

(56) **WO-A2-2005023994**

SAWADOGO M. ET AL.: "A RAPID METHOD FOR THE PURIFICATION OF DEPROTECTED OLIGODEOXYNUCLEOTIDES", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, INFORMATION RETRIEVAL LTD, GB, vol. 19, no. 3, 1 January 1991 (1991-01-01), page 674, XP001246546, ISSN: 0305-1048, page 674, left-hand column

WO-A2-2008127305

US-A1-2012329858

RICHARD J. BASTIN ET AL.: "Salt Selection and Optimisation Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities", ORGANIC PROCESS RESEARCH AND DEVELOPMENT, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 4, no. 5, 19 July 2000 (2000-07-19), pages 427-435, XP008154792, ISSN: 1083-6160, DOI: 10.1021/OP000018U [retrieved on 2000-07-19], the whole document

GRYAZNOV SERGEI M.: "Oligonucleotide n3'-->p5' phosphoramidates and thio-phosphoramidates as potential therapeutic agents", CHEMISTRY & BIODIVERSITY MAR 2010, vol. 7, no. 3, March 2010 (2010-03), pages 477-493, XP002759310, ISSN: 1612-1880, the whole document

WO-A1-2014088785

JP-A-2002060341

WO-A1-2015168310

(57) Аспекты данного изобретения включают способы получения полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения способ включает приведение в контакт первой полинуклеотидной композиции, содержащей полинуклеотид, имеющий последовательность из 7 или более нуклеозидных субъединиц, где по меньшей мере две из нуклеозидных субъединиц соединены между собой межсубъединичной N3'→P5' тиофосфорамидатной связью; а также нецелевые продукты и реагенты синтеза, с солью поливалентного катиона для осаждения соли полинуклеотида, содержащей по меньшей мере один поливалентный катионный противоион; и отделение соли полинуклеотида от контактирующей первой полинуклеотидной композиции для получения второй полинуклеотидной композиции, содержащей эту соль полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает приведение соли полинуклеотида в контакт с носителем хроматографии на обращенной фазе; элюирование с хроматографического носителя третьей полинуклеотидной композиции, содержащей этот полинуклеотид. Также предложены композиции, содержащие соль полинуклеотида, содержащую по меньшей мере один поливалентный катионный противоион.

B1**035885****035885****B1**

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Согласно 35 U.S.C. § 119(e), заявка на данный патент испрашивает приоритет по дате подачи предварительной заявки США с серийным номером 62/151891, поданной 23 апреля 2015 г., содержание которой включено в данное описание посредством ссылки.

Введение

Химия полимеров нуклеиновых кислот играет важную роль во многих развивающихся технологиях в области фармацевтики, диагностики и химического анализа и, более конкретно, в подобластях анти-смысловых и антигенных терапевтических средств, комбинаторной химии, усиления сигналов на основе разветвленной ДНК и диагностики и химического анализа на основе матриц ДНК. Часть указанной химии полимеров направлена на улучшение прочности связывания, специфичности и устойчивости к действию нуклеаз природных полимеров нуклеиновых кислот, таких как ДНК. Пептидные нуклеиновые кислоты (PNA), тиофосфатные, метилфосфонатные и фосфорамидатные межнуклеозидные связи представляют собой примеры некоторых химических особенностей полимеров, которые используют в отношении полинуклеотидов для получения одного или более желаемых свойств, таких как устойчивость к действию нуклеаз, клеточное поглощение и растворимость. Полинуклеотидные N3'→P5' фосфорамидаты могут образовывать стабильные дуплексы с комплементарными ДНК- и РНК-цепями, а также стабильные триплексы с ДНК-дуплексами, и являются устойчивыми к действию нуклеаз. Полинуклеотидные N3'→P5' тиофосфорамидаты нашли применение в качестве эффективных антисмысловых агентов как *in vitro*, так и *in vivo*. Соединения, содержащие поленуклеотиды, которые ингибируют активность теломеразы, могут быть использованы для лечения опосредованных теломеразой нарушений, таких как рак, поскольку раковые клетки экспрессируют теломеразу, а нормальные соматические клетки человека не обладают теломеразной активностью биологически значимого уровня. Таким образом, способы получения и выделения таких полинуклеотидов представляют интерес.

Сущность изобретения

Аспекты данного изобретения включают способы получения полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения способ включает контактирование первой полинуклеотидной композиции, включающей полинуклеотид, имеющий последовательность из 7 или более нуклеозидных субъединиц, где по меньшей мере две из нуклеозидных субъединиц соединены между собой субъединичной N3'→P5' тиофосфорамидатной связью; нецелевые продукты и реагенты синтеза; поливалентную катионную соль для осаждения соли полинуклеотида, содержащей по меньшей мере один поливалентный катионный противоион; отделение соли полинуклеотида от контактирующей первой полинуклеотидной композиции для получения второй полинуклеотидной композиции, содержащей соль полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает связывание соли полинуклеотида с носителем хроматографии на обращенной фазе; элюирование с хроматографического носителя третьей полинуклеотидной композиции, содержащей полинуклеотид. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает контактирование первой соли полинуклеотида с носителем хроматографии на обращенной фазе; элюирование с хроматографического носителя третьей полинуклеотидной композиции, содержащей вторую соль полинуклеотида. Также предлагаются композиции, включающие соль полинуклеотида, содержащую по меньшей мере один поливалентный катионный противоион. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере один поливалентный катионный противоион выбран из группы, состоящей из магния, цинка, алюминия и кальция.

Краткое описание фигур

Квалифицированному специалисту будет понятно, что графические материалы, описанные ниже, представлены здесь только для иллюстрационных целей. Графические материалы никоим образом не предназначены для ограничения объема данного принципа.

На фиг. 1 показаны ВЭЖХ хроматограммы иметелстат-Mg в 1 М растворе NaCl при различных значениях pH.

На фиг. 2 показаны результаты элементного анализа иметелстата натрия, обработанного различными солями.

На фиг. 3 показаны результаты элементного анализа иметелстата натрия, обработанного с увеличением эквивалентов соли хлорида магния.

На фиг. 4 показаны результаты элементного анализа иметелстата триэтаноламина, обработанного с увеличением эквивалентов соли хлорида магния.

Определения

Прежде чем более подробно описывать типовые варианты реализации изобретения, изложены следующие определения, иллюстрирующие и определяющие смысл и объем терминов, используемых в описании.

Следующие термины имеют следующие значения, если не указано иное. Любые неопределенные термины имеют значение, принятое в данной области техники. В данном контексте термины полинуклеотид и олигонуклеотид используются взаимозаменяемо для обозначения соединения, содержащего множество нуклеозидных субъединиц или нуклеозидных фрагментов, которые связаны межнуклеозид-

ными или межнуклеотидными связями. Всякий раз, когда полинуклеотид представлен последовательностью букв, таких как "ATGUCCTG", понимается, что нуклеотиды находятся в 5'→3' порядке слева направо и что "А" обозначает дезоксиаденозин, "С" обозначает дезоксицитидин, "G" обозначает дезоксигуанозин, "Т" обозначает тимидин, а "U" обозначает дезоксиуридин, если не указано иное.

В данном контексте "нуклеозид" включает природные нуклеозиды, включая 2'-дезоксиды и 2'-гидроксильные формы, например, описанные в Kornberg and Baker, ДНК Replication, 2-е изд. (Freeman, Сан-Франциско, 1992). "Аналоги" в отношении нуклеозидов включают синтетические нуклеозиды, имеющие фрагменты модифицированных оснований и/или фрагменты модифицированных сахаров, например, описанные в целом автором Scheit, Nucleotide Analogs (John Wiley, Нью-Йорк, 1980). Такие аналоги включают синтетические нуклеозиды, предназначенные для усиления связывающих свойств, например, стабильности, специфичности или т.п., такие как описаны авторами Uhlmann и Peyman (Chemical Reviews, 90:543-584, 1990). В некоторых вариантах реализации нуклеозид или аналоги нуклеозида содержат 3'-гидроксильную группу или 3'-аминогруппу.

Термины "основание" и "азотистое основание" использованы в данном контексте взаимозаменяемо и включают (i) обычные основания ДНК и РНК (урацил, тимин, аденин, гуанин и цитозин) и (ii) модифицированные основания или аналоги оснований (например, 5-метилцитозин 5-бром урацил или инозин). Аналог основания представляет собой химическое соединение, молекулярная структура которого имитирует структуру обычного основания ДНК или РНК.

В данном контексте "пиримидин" означает пиримидины, встречающиеся в природных нуклеозидах, включая цитозин, тимин и урацил и их распространенные аналоги, такие как аналоги, содержащие окси, метил, пропинил, метокси, гидроксид, амино, тио, галоген и т.п. заместители. Указанный в данном контексте термин дополнительно включает пиримидины с присоединенными распространенными защитными группами, такими как N4-бензоилцитозин. Другие представляющие интерес пиримидиновые защитные группы включают, но не ограничиваются ими, которые описаны в Beaucage and Iyer Tetrahedron 48: 2223-2311 (1992).

В данном контексте "пурин" означает пурины, встречающиеся в природных нуклеозидах, включая аденин, гуанин и гипоксантин, и их распространенные аналоги, такие как содержащие окси, метил, пропинил, метокси, гидроксид, амино, тио, галоген и т.п. заместители. Указанный в данном контексте термин дополнительно включает пурины с присоединенными обычными защитными группами, такими как N2-бензоилгуанин, N2-изобутирилгуанин, N6-бензоиладенин и т.п. Другие обычные группы защитных пуринов описаны Beaucage and Iyer Tetrahedron 48: 2223-2311 (1992). В данном контексте термин "защищенный" как часть химического названия относится к известным в данной области техники защитным группам для конкретного фрагмента соединения, например, "5'-защищенный гидроксил" в отношении нуклеозида включает трифенилметил (т.е. тритил), п-анизилдифенилметил (т.е. монометокситритил или ММТ), ди-п-анизилдифенилметил (т.е. диметокситритил или DMT) и т.п.; и защищенное азотистое основание относительно азотистого основания, содержащего гетероатом с защищенной группой, такой как диметиламиноформамидин (DMF), бензоил (Bz), изобутирил и т.п. Известные в данной области техники защитные группы включают группы, описанные в следующих ссылках: Gait, editor, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1984); Amarnath and Broom, Chemical Reviews, 77:183-217, 1977; Pon et al., Biotechniques, 6:768-775, 1988; Ohtsuka et al., Nucleic Acids Research, 10:6553-6570, 1982; Eckstein, editor, Oligonucleotides, and Analogues: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1991), Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Second Edition, (John Wiley & Sons, New York, 1991), Narang, editor, Synthesis and Applications of ДНК and РНК (Academic Press, New York, 1987), Beaucage and Iyer Tetrahedron 48: 2223- 2311 (1992) и тому подобным.

В данном контексте "полинуклеотидный N3'→P5' тиофосфорамидат" означает олигомер, обычно линейный, из нуклеозидных субъединиц, связанных по меньшей мере одной N3'→P5' тиофосфорамидатной связью. В общем нуклеозидные субъединицы содержат нуклеозиды или аналоги нуклеозидов, но могут также содержать более общие фрагменты, имеющие совместимую химию, такие как абразивные сахара и другие углеводородные фрагменты, и описаны в следующих ссылках: Newton et al., Nucleic Acids Research, 21: 1155-1162 (1993); Griffin et al., J. Am. Chem. Soc, 114: 7976-7982 (1992); Jaschke et al., Tetrahedron Letters, 34: 301-304 (1992); Ma et al., International application PCT/CA92/00423; Zon et al., International application PCT/US 90/06630; Durand et al., Nucleic Acids Research, 18: 6353-6359 (1990); Salunkhe et al., J. Am. Chem. Soc, 114: 8768-8772 (1992); и т.п. В некоторых случаях этот термин означает полинуклеотид, где все межнуклеозидные связи заменяются N3'→P5' тиофосфорамидатными связями. Как таковой, термин включает частично, а также полностью "амидированные" олигомеры. В некоторых случаях этот термин означает полинуклеотид, где все межнуклеозидные связи заменены на N3'→P5' тиофосфорамидатные связи и где нуклеозидные субъединицы являются естественными нуклеозидами или их аналогами. Этот полинуклеотид N3'→P5' тиофосфорамидат, в котором каждая связь представляет собой N3'→P5' тиофосфорамидатную связь ("полностью амидированную"), может быть встроен или присоединен к другим олигонуклеотидам или полинуклеотидам с образованием более крупного олигомера, который "частично амидирован". Этот полинуклеотид N3'→P5' тиофосфорамидат может включать любые

подходящие 3'- и/или 5'-концевые группы. В некоторых вариантах реализации изобретения, полинуклеотид N3'→P5' тиофосфорамидат включает 3'-гидроксильную концевую группу или 3'-амино концевую группу.

Используемые здесь термины "фосфат" и "фосфатная группа" охватывают тиофосфатные и оксофосфатные группы.

Используемый здесь термин "аминогруппа фосфорамидита" относится к аминогруппе $-NR^4R^5$, присоединенной к атому фосфора фосфорамидитной группы, а термин "фосфорамидитовый азот" относится к атому азота аминогруппы фосфорамидита.

"Алкил" относится к одновалентным насыщенным алифатическим гидрокарбильным группам, имеющим от 1 до 10 атомов углерода: от 1 до 6 атомов углерода (например, "алкил с 1-6 атомами углерода") или от 1 до 5 (например, "алкильный от 1 до 5 атомов углерода") или от 1 до 4 (например, "алкил с 1-4 атомами углерода") или от 1 до 3 атомов углерода (например, "алкил с 1 до 3 атомами углерода"). Этот термин включает линейные и разветвленные гидрокарбильные группы, такие как метил (CH_3-), этил (CH_3CH_2-), н-пропил ($CH_3CH_2CH_2-$), изопропил ($(CH_3)_2CH-$), н-бутил ($CH_3CH_2CH_2CH_2-$), изобутил ($(CH_3)_2CHCH_2-$), втор-бутил ($(CH_3)(CH_3CH_2)CH-$), трет-бутил ($(CH_3)_3C-$), н-пентил ($CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2-$) и неопентил ($(CH_3)_3CCCH_2-$).

Термин "замещенный алкил" относится к алкильной группе, как определено здесь, в которой один или несколько атомов углерода в алкильной цепи опционально замещены гетероатомом, таким как $-O-$, $-N-$, $-S-$, $-S(O)_n-$ (где n от 0 до 2), $-NR-$ (где R представляет собой водород или алкил) и имеет от 1 до 5 заместителей, выбранных из группы, состоящей из алкокси, замещенного алкокси, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, ацила, ациламина, ацилокси, амина, аминоацила, аминоацилоксила, оксиаминоацила, азидо, циано, галогена, гидроксила, оксо, тиокето, карбоксила, карбоксилалкила, тиоарилокси, тиогетероарилокси, тиогетероциклоокси, тиола, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, арилокси, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гетероциклоокси, гидроксиамино, алкоксиамино, нитро, $-SO-$ алкила, $-SO-$ арила, $-SO-$ гетероарила, $-SO_2-$ алкила, $-SO_2-$ арила, $-SO_2-$ гетероарила и $-NR^aR^b$, причем R^a и R^b могут быть одинаковыми или различными и выбраны из водорода, необязательно замещенного алкила, циклоалкила, алкенила, циклоалкенила, алкинила, арила, гетероарила и гетероциклила. В некоторых случаях "замещенный алкил" относится к алкильной группе, как определено здесь, имеет от 1 до 5 заместителей, выбранных из группы, состоящей из алкокси, циклоалкила, циклоалкенила, ацила, ациламино, ацилокси, амина, аминоацила, аминоацилокси, оксиаминоацила, азидо, циано, галогена, гидроксила, карбоксила, карбоксилалкила, тиола, тиоалкокси, арила, арилокси, гетероарила, гетероарила, гетероциклила, гетероциклоокси, сульфонида и $-NR^aR^b$, где R^a и R^b могут быть одинаковыми или различными и выбраны из водорода, алкила, циклоалкила, алкенила, циклоалкенила, алкинила, арила, гетероарила и гетероцикла.

"Алкокси" относится к группе $-O-$ алкила, причем алкил имеет значения, указанные здесь. Алкокси включает, например, метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, н-бутокси, трет-бутокси, втор-бутокси, н-пентокси и т.п. Термин "алкокси" также относится к группам алкенил- $O-$, циклоалкил- $O-$, циклоалкенил- $O-$ и алкинил- $O-$, где алкенил, циклоалкил, циклоалкенил и алкинил являются такими, как определено здесь.

Термин "замещенный алкокси" относится к группам замещенного алкил- $O-$, замещенного алкенил- $O-$, замещенного циклоалкил- $O-$, замещенного циклоалкенил- $O-$ и замещенного алкинил- $O-$, где замещенный алкил, замещенный алкенил, замещенный циклоалкил, замещенный циклоалкенил и замещенный алкинил являются такими, как определено здесь.

"Ацил" относится к группам $H-C(O)-$, алкил- $C(O)-$, замещенного алкил- $C(O)-$, алкенил- $C(O)-$, замещенного алкенил- $C(O)-$, алкинил- $C(O)-$, замещенного алкинил- $C(O)-$, циклоалкил- $C(O)-$, замещенного циклоалкил- $C(O)-$, циклоалкенил- $C(O)-$, замещенного циклоалкенил- $C(O)-$, арил- $C(O)-$, замещенного арил- $C(O)-$, гетероарил- $C(O)-$, замещенного гетероарил- $C(O)-$, гетероциклил- $C(O)-$ и замещенного гетероциклил- $C(O)-$, причем алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклил и замещенный гетероцикл являются такими, как определено здесь. Например, ацил включает "ацетильную" группу $CH_3C(O)-$.

Термин "замещенный амино" относится к группе $-NRR$, где каждый R независимо выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, замещенного алкила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, алкенила, замещенного алкенила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, гетероарила и гетероциклила, при условии, что по меньшей мере один из R не является водородом.

"Гало" или "галоген" относится к фтору, хлору, бром и йоду. "Гидроксид" или "гидроксил" относится к группе $-OH$.

"Гетероарил" относится к ароматической группе от 1 до 15 атомов углерода, такой, которая состоит от 1 до 10 атомов углерода и от 1 до 10 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из кислорода, азота и серы внутри кольца. Такие гетероарильные группы могут иметь одно кольцо (такое как пиридин, имидазол или фурил) или несколько конденсированных колец в кольцевой системе (например,

как в группах, таких как индолизинил, хинолинил, бензофуран, бензимидазолил или бензотиенил), причем по меньшей мере одно кольцо в кольцевой системе является ароматическим, при условии, что точка прикрепления проходит через атом ароматического кольца. В некоторых вариантах реализации изобретения атом(ы) азота и/или серного кольца (серных колец) гетероарильной группы необязательно окисляется с образованием N-оксидных ($N \rightarrow O$), сульфинильных или сульфонильных остатков. Этот термин включает, например, пиридинил, пирролил, индолил, тиофенил и фуранил. Если иное не отмечено для гетероарильного заместителя, такие гетероарильные группы могут быть опционально замещены от 1 до 5 заместителями или от 1 до 3 заместителями, выбранными из ацилокси, гидроксид, тиола, ацила, алкила, алкокси, алкенила, алкинила, циклоалкила, циклоалкенила, замещенного алкила, замещенного алкокси, замещенного алкенила, замещенного алкинила, замещенного циклоалкила, замещенного циклоалкенила, амина, замещенного амина, аминацила, ациламина, алкарила, арила, арилокси, азидо, карбоксила, карбоксилалкила, циано, галогена, нитро, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гетероциклоокси, аминацилокси, оксиамина, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, тиоарилокси, тиогетероарилокси, -SO-алкила, -SO-замещенного алкила, -SO-арила, -SO-гетероарила, -SO₂-алкила, -SO₂-замещенного алкила, -SO₂-арила и -SO₂-гетероарила и тригалогенметила. В таких случаях гетероарильную группу, которая замещена от 1 до 5 заместителями (например, как описано здесь), упоминают как "замещенный гетероарил".

"Гетероцикл", "гетероциклический", "гетероциклоалкил" и "гетероциклил" относятся к насыщенной или ненасыщенной группе, имеющей одно кольцо или несколько конденсированных колец, включая конденсированные мостиковые и спиро-кольцевые системы и имеют от 3 до 20 кольцевых атомов, включая 1-10 гетероатомов. Эти кольцевые атомы выбраны из группы, состоящей из азота, серы или кислорода, где в конденсированных кольцевых системах одно или несколько колец могут быть циклоалкилом, арилом или гетероарилом, при условии, что точка прикрепления проходит через неароматическое кольцо. В некоторых вариантах реализации изобретения азот и/или атом(ы) серы гетероциклической группы опционально окисляются с образованием N-оксидных, -S(O)- или -SO₂-групп.

Примеры гетероциклов и гетероарилов включают, но не ограничиваются, азетидин, пиррол, имидазол, пиразол, пиридин, пиразин, пиримидин, пиридазин, индолизин, изоиндол, индол, дигидроиндол, индазол, пурин, хинолизин, изохинолин, хинолин, фталазин, нафтилпиридин, хиноксалин, хиназолин, цинолин, птеридин, карбазол, карболин, фенантридин, акридин, фенантролин, изотиазол, феназин, изоксазол, феноксазин, фенотиазин, имидазолидин, имидазолин, пиперидин, пиперазин, индолин, фталимид, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин, 4,5,6,7-тетрагидробензо[b]тиофен, тиазол, тиазолидин, тиофен, бензо[b]тиофен, морфолинил, тиоморфолинил (также называемый тиаморфолинил), 1,1-диоксотииоморфолинил, пиперидинил, пирролидин, тетрагидрофуранил и т.п.

Если иное не отмечено для гетероциклического заместителя, такие гетероциклические группы могут быть опционально замещены от 1 до 5 или от 1 до 3 заместителями, выбранными из алкокси, замещенного алкокси, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, ацила, ациламина, ацилокси, амина, замещенного амина, аминацила, аминацилокси, оксиаминацила, азидо, циано, галогена, гидроксид, оксо, тиокето, карбоксила, карбоксилалкила, тиоарилокси, тиогетероарилокси, тиогетероциклоокси, тиола, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, арилокси, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гетероциклоокси, гидроксид, алкоксиамина, нитро, -SO-алкила, -SO-замещенного алкила, -SO-арила, -SO-гетероарила, -SO₂-алкила, -SO₂-замещенного алкила, -SO₂-арила, -SO₂-гетероарила и конденсированного гетероцикла.

"Нитро" относится к группе -NO₂.

"Оксо" относится к атому (=O).

"Тиол" относится к группе -SH.

"Тиоксо" или термин "тиокето" относится к атому (=S).

В дополнение к описанному здесь, термин "замещенный" при использовании для модификации указанной группы или радикала также может означать, что один или несколько атомов водорода указанной группы или радикала каждый независимо друг от друга заменяется одними и теми же или различными группами заместителей, как указано ниже.

В дополнение к группам, описанным в отношении индивидуальных терминов здесь, заместители для замещения одного или нескольких атомов водорода (любые два атома водорода одного углерода могут быть заменены на =O, =NR⁷⁰, =N-OR⁷⁰, =N₂ или =S) в указанных группах или радикалах, если не указано иное: -R⁶⁰, гало, =O, -OR⁷⁰, -SR⁷⁰, -NR⁸⁰R⁸⁰, тригалометил, -CN, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -SO²R⁷⁰, -SO₂OM⁺, -SO₂OR⁷⁰, -OSO₂R⁷⁰, -OSO₂OM⁺, -OSO₂OR⁷⁰, -P(O)(O)₂(M⁺)₂, -P(O)(OR⁷⁰)OM⁺, -P(O)(OR⁷⁰)₂, -C(O)R⁷⁰, -C(S)R⁷⁰, -C(NR⁷⁰)R⁷⁰, -C(O)O⁺M⁺, -C(O)OR⁷⁰, -C(S)OR⁷⁰, -C(O)NR⁸⁰R⁸⁰, -C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰, -OC(O)R⁷⁰, -OC(S)R⁷⁰, -OC(O)O⁺M⁺, -OC(O)OR⁷⁰, -OC(S)OR⁷⁰, -NR⁷⁰C(O)R⁷⁰, -NR⁷⁰C(S)R⁷⁰, -NR⁷⁰CO₂-M⁺, -NR⁷⁰CO₂R⁷⁰, -NR⁷⁰C(S)OR⁷⁰, -NR⁷⁰C(O)NR⁸⁰R⁸⁰, -NR⁷⁰C(NR⁷⁰)R⁷⁰ и -NR⁷⁰C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰, причем R⁶⁰ выбран из группы, включающей опционально замещенный алкил, циклоалкил, гетероалкил, гетероциклоалкилалкил, циклоалкилалкил, арил, арилалкил, гетероарил и гетероарилалкил, каждый R⁷⁰ независимо представляет собой водород R⁶⁰, каждый R⁸⁰ независимо представляет собой R⁷⁰ или, альтернативно, два R⁸⁰ взятые вместе с атомом азота, с которым они связаны, формируют

5-, 6- или 7-членный гетероциклоалкил, который может необязательно включать от 1 до 4 одинаковых или разных дополнительных гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S, из которых N может иметь -H или C₁-C₃ алкильное замещение; и каждый M⁺ является противоионом с чистым конечным положительным зарядом.

Каждый M⁺ может быть независимо, например, щелочным ионом, таким как K⁺, Na⁺, Li⁺; ионом аммония, таким как ⁺N(R⁶⁰)₄; или щелочноземельным ионом, таким как [Ca₂₊]_{0.5}, [Mg²⁺]_{0.5} или [Ba²⁺]_{0.5} ("индекс 0,5 означает, что один из противоионов для таких двухвалентных щелочноземельных ионов может быть ионизированной формой соединения и другой противоион, такой как хлорид, или два ионизированных соединения, описанные здесь, могут служить в качестве противоионов для таких двухвалентных ионов щелочноземельных металлов, или дважды ионизированное соединение по изобретению может служить в качестве противоиона для таких двухвалентных ионов щелочноземельных металлов). В качестве конкретных примеров, -NR⁸⁰R⁸⁰ предполагает включение -NH₂, -NH-алкила, N-пирролидинила, N-пиперазинила, 4N-метилпиперазин-1-ил и N-морфолинила.

В дополнение к описанному здесь, в определенном варианте реализации изобретения, группа, которая замещена, имеет 1, 2, 3 или 4 заместителя, 1, 2 или 3 заместителя, 1 или 2 заместителя либо 1 заместитель.

Принято, что во всех замещенных группах, определенных выше, полимеры устанавливают путем определения заместителей с другими заместителями на себя (например, замещенный арил, имеющий замещенную арильную группу в качестве заместителя, который сам замещен замещенной арильной группой, который в дальнейшем замещен замещенной арильной группой и т.д.) не предназначены для включения здесь.

В подобных случаях максимальное количество подобных замещений равняется трем. Например, последовательные замены замещенных арильных групп, конкретно рассматриваемых здесь, ограничены замещенным арил-(замещенным арил)-замещенным арилом.

Если не указано иначе, номенклатура заместителей, которые явно не определены здесь, устанавливается путем наименования терминальной части функциональности, за которой следуют смежные функциональные возможности, к точке присоединения.

Что касается любой из описанных здесь групп, которые содержат один или несколько заместителей, понятно, что такие группы не содержат никакой замены или схемы замещения, которые являются стерически непрактичными и/или синтетически неосуществимыми. Кроме того, указанные соединения включают все стереохимические изомеры, возникающие в результате замещения этих соединений.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" означает соль, приемлемую для введения пациенту, такому как млекопитающее (соли с противоионами, обладающие приемлемой безопасностью для млекопитающих при заданном режиме дозирования). Такие соли могут быть получены из фармацевтически приемлемых неорганических или органических оснований и из фармацевтически приемлемых неорганических или органических кислот. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к фармацевтически приемлемым солям соединения, соли которых получены из различных органических и неорганических противоионов, хорошо известных в данной области, и включают, например, только натрий и тому подобное; и когда молекула содержит основную функцию, соли органических или неорганических кислот, такие как гидрохлорид и т.п. Фармацевтически приемлемые соли, представляющие интерес, включают, но не ограничиваются, алюминием, аммонием, аргинином, барием, бензатином, кальцием, холинатом, этилендиамином, лизином, литием, магнием, меглумином, прокаином, калием, натрием, трометамием, N-метилглюкамином, N,N'-дибензилэтилендиамином, хлорпрокаином, диэтаноламином, этаноламином, пиперазином, цинком, диизопропиламином, триэтиламином, диизопропилэтиламином и солями триэтанолamina.

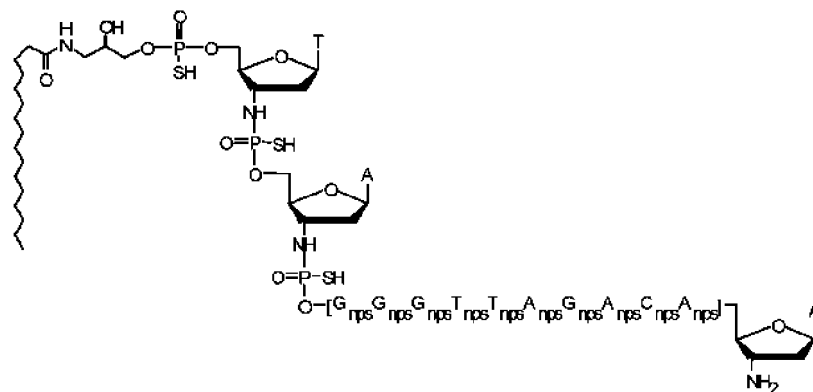
Термин "соль того" означает соединение, образованное, когда протон кислоты заменен катионом, таким как катион металла или органическим катионом и тому подобным. Где это применимо, соль является фармацевтически приемлемой солью, хотя это не требуется для солей промежуточных соединений, которые не предназначены для введения пациенту. В качестве примера соли настоящих соединений включают соединения, в которых соединение протонировано неорганической или органической кислотой с образованием катиона с конъюгированным основанием неорганической или органической кислоты в качестве анионного компонента соли. Соли, представляющие интерес, включают, но не ограничиваются, алюминием, аммонием, аргинином, барием, бензатином, кальцием, цезием, холинатом, этилендиамином, литием, магнием, меглумином, прокаином, N-метилглюкамином, пиперазином, калием, натрием, трометамием, цинком, N,N'-дибензилэтилендиамином, хлорпрокаином, диэтаноламином, этаноламином, пиперазином, диизопропиламином, триэтиламином, диизопропилэтиламином и солями триэтанолamina. Понятно, что для любой из описанных здесь полинуклеотидных структур, которые включают основную цепь межнуклеозидных связей, такие полинуклеотиды могут также включать любые удобные формы соли. В некоторых вариантах реализации изобретения кислотные формы межнуклеозидных связей изображены для простоты. В некоторых случаях соль целевого соединения представляет собой одновалентную катионную соль. В некоторых случаях соль целевого соединения представляет собой двухвалентную соль катиона. В некоторых случаях соль целевого соединения представляет собой трехвалент-

ную катионную соль.

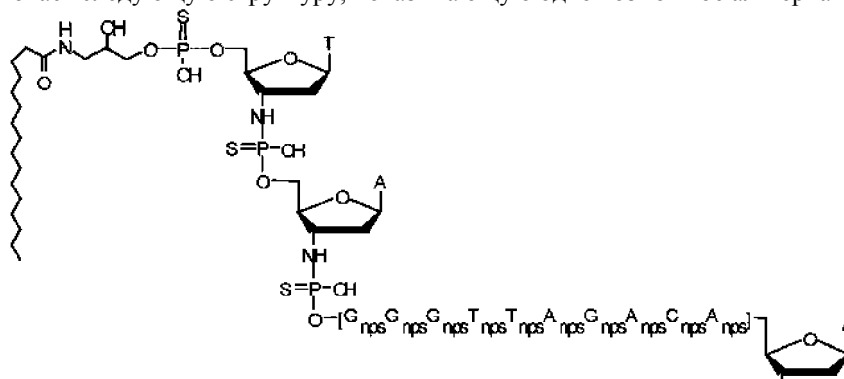
"Сольват" относится к комплексу, образованному комбинацией молекул растворителя с молекулами или ионами растворенного вещества. Растворителем может быть органическое соединение, неорганическое соединение или смесь обоих. Некоторые примеры растворителей включают, но не ограничиваются, метанолом, N,N-диметилформамидом, тетрагидрофураном, диметилсульфоксидом и водой. Когда растворителем является вода, образовавшийся сольват представляет собой гидрат.

"Стереизомер" и "стереоизомеры" относятся к соединениям, которые имеют одинаковую атомную связность, но различаются атомарным расположением в пространстве. Стереизомеры включают цис-транс-изомеры, изомеры E и Z, энантиомеры и диастереомеры.

"Таутомер" относится к альтернативным формам молекулы, которые отличаются только электронной связью атомов и/или в положении протона, таким как энол-кето и имин-энаминовые таутомеры, -NH-P(=S)(OH)-O- и -NH-P(=O)(SH)-O- или таутомерные формы гетероарильных групп, содержащих гетероциклическую группу -N=C(H)-NH- кольца, таким как пиразолы, имидазолы, бензимидазолы, триазолы и тетразолы. Специалисту в данной области техники будет понятно, что возможны другие таутомерные формы описанных здесь групп. Например, понятно, что полинуклеотид, описанный следующей структурой:



также включает следующую структуру, показывающую одно возможное альтернативное:



где "nps" представляет собой тиофосфорамидатную связь (-NH-P(=O)(SH)-O- или -NH-P(=S)(OH)-O-), соединяющую 3'-углерод одного нуклеотида с 5'-углеродом соседнего нуклеотида. Понятно, что все таутомерные формы целевого соединения охватываются структурой, в которой описано одно возможное таутомерное расположение групп соединения, даже если это не указано конкретно. Любое подходящее таутомерное расположение групп исследуемых соединений может быть использовано при описании соединений.

Понятно, что термин "или соль или сольват или его стереоизомер" включает все перестановки солей, сольватов и стереоизомеров, такие как сольват фармацевтически приемлемой соли стереоизомера данного соединения. Понятно, что термин "или его соль" предназначен для включения всех перестановок солей. Понятно, что термин "или его фармацевтически приемлемая соль" предназначен для включения всех перестановок солей. Понятно, что термин "или его сольват" предназначен для включения всех перестановок сольватов. Понятно, что термин "или его стереоизомер" предназначен для включения всех перестановок стереоизомеров. Понятно, что термин "или его таутомер" предназначен для включения всех перестановок таутомеров. Так, например, следует, что предполагается включать сольват фармацевтически приемлемой соли таутомера стереоизомера данного соединения.

Используемый здесь термин "выделенный" предназначен для описания представляющего интерес соединения, которое находится в окружающей среде, отличной от среды, в которой соединение происходит естественным образом. "Выделенный" предполагает включение соединений образцах, которые существенно обогащены представляющим интерес соединением и/или в которых интересующее соединение

частично или существенно очищено.

В данном контексте "существенно очищенное" относится к соединению, которое извлечено из его естественной среды и является чистым по меньшей мере на 60%, чистым по меньшей мере на 75%, чистым по меньшей мере на 80%, чистым по меньшей мере на 81%, чистым по меньшей мере на 82%, чистым по меньшей мере на 83%, чистым по меньшей мере на 84%, чистым по меньшей мере на 85%, чистым по меньшей мере на 86%, чистым по меньшей мере на 87%, чистым по меньшей мере на 88%, чистым по меньшей мере на 89%, чистым по меньшей мере на 90%, чистым по меньшей мере на 91%, чистым по меньшей мере на 92%, чистым по меньшей мере на 93%, чистым по меньшей мере на 94%, чистым по меньшей мере на 95%, чистым по меньшей мере на 96%, чистым по меньшей мере на 97%, чистым по меньшей мере на 98%, чистым по меньшей мере на 99% или чистым более чем на 99% от других компонентов, с которыми оно было связано естественным образом.

Термин "физиологические условия" охватывает те условия, которые совместимы с живыми клетками, например, преимущественно водные условия, температура, pH, солёности и т.д., которые совместимы с живыми клетками.

Если представлен диапазон величин, следует понимать, что каждое промежуточное значение, до десятой части единицы нижнего предела диапазона, если из контекста явно не следует иное, между верхним и нижним пределом этого интервала и любое другое заданное или промежуточное значение в этом заданном интервале, находятся в рамках изобретения. Верхний и нижний пределы этих меньших интервалов могут независимо быть включены в меньшие интервалы и также находятся в рамках изобретения, кроме любого специально исключённого предела в заданном интервале. Если заданный интервал включает один или оба предела, то интервалы без одного или обоих пределов также включены в изобретение.

Следует отметить, что при использовании в данном документе и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста очевидно не следует иное. Дополнительно следует отметить, что может быть составлен план формулы изобретения, чтобы исключить любой необязательный элемент. В связи с этим предполагается, что данное утверждение служит в качестве предшествующего основания для таких исключающих терминов, как "исключительно", "только" и тому подобных в связи с перечислением элементов формулы изобретения, или для использования "отрицательных" ограничений.

Другие определения терминов могут появляться во всей спецификации.

Описание типовых вариантов реализации изобретения

Как резюмировано выше, аспекты раскрытия включают способы получения полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения способ включает приведение в контакт первой полинуклеотидной композиции, содержащей полинуклеотид, имеющий последовательность из 7 или более нуклеозидных субъединиц, в которой по меньшей мере две из нуклеозидных субъединиц соединены связью N3'→P5' тиофосфорамидата между субъединицами; а также нецелевые синтетические продукты и реагенты; с поливалентной катионной солью для осаждения первой соли полинуклеотида, содержащей по меньшей мере один поливалентный катионный противоион; отделение первой соли полинуклеотида от контактирующей первой полинуклеотидной композиции для получения второй полинуклеотидной композиции, содержащей первую соль полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает связывание соли полинуклеотида с носителем хроматографии на обращенной фазе; элюирование с хроматографического носителя третьей полинуклеотидной композиции, содержащей полинуклеотид. В некоторых случаях третья полинуклеотидная композиция содержит вторую соль полинуклеотида. Также представлены композиции, содержащие соль полинуклеотида, содержащую, по меньшей мере, один поливалентный катионный противоион. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере один поливалентный катионный противоион выбран из группы, состоящей из магния, цинка, алюминия и кальция.

Прежде чем описывать различные варианты реализации изобретения, следует понимать, что это описание не ограничивается конкретными описанными вариантами осуществления и, как таковые, могут, разумеется, меняться. Следует также понимать, что используемая здесь терминология предназначена только для описания конкретных вариантов реализации изобретения и не предназначена для ограничения, поскольку объем данного изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Заголовки разделов, используемые здесь, предназначены только для организации и не должны толковаться как ограничивающие предмет, описанный каким-либо образом. Хотя данное изобретение описано в сочетании с различными вариантами реализации, не предполагается, что настоящее учение ограничено такими вариантами осуществления. Напротив, настоящее учение охватывает различные альтернативы, модификации и эквиваленты, как будет понятно специалистам в данной области техники.

Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которому относится данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным здесь, также могут быть использованы в практике или испытаниях данного изобретения, здесь описаны способы и материалы, представляющие интерес. Все публикации, упомянутые здесь, включены сюда посред-

ством ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми цитируются публикации.

Ссылка на любую публикацию предназначена для ее описания до даты подачи заявки и не должна толковаться как признание того, что настоящие притязания не имеют права препроводить такую публикацию в силу предшествующего изобретения. Кроме того, даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут быть независимо подтверждены.

Понятно, что некоторые особенности изобретения, которые для ясности, описанные в контексте отдельных вариантов реализации изобретения, также могут быть представлены в комбинации в одном варианте реализации. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости, описанные в контексте одного варианта осуществления, также могут быть предоставлены отдельно или в любой подходящей подкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящихся к изобретению, конкретно охватываются настоящим изобретением и раскрыты здесь точно так же, как если бы каждая комбинация была индивидуально и явно раскрыта в той степени, в которой такие комбинации охватывают предмет, который представляет собой, например, соединения, которые представляют собой стабильные соединения (т.е. соединения, которые могут быть получены, выделены, охарактеризованы и испытаны на наличие биологической активности). Кроме того, все подкомбинации различных вариантов осуществления и их элементов (например, элементы химических групп, перечисленных в вариантах осуществления, описывающих такие переменные), также целенаправленно охватываются настоящим изобретением и раскрыты здесь точно так же, как если бы каждая такая подгруппа - комбинация была индивидуально и явно раскрыта здесь.

Все патенты и публикации, включая все упоминаемые здесь последовательности, описанные в таких патентах и публикациях, специально включены путем ссылки.

В дальнейшем, описывая данное изобретение, способы получения полинуклеотида описаны сначала более подробно. Затем рассматриваются полинуклеотидные композиции, представляющие интерес для практических методов.

Способы получения

Аспекты данного описания включают способы получения полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения способ включает приведение в контакт первой полинуклеотидной композиции, содержащей в себя полинуклеотид (например, как описано здесь), продукты и агенты нецелевого синтеза, поливалентную соль катиона для осаждения соли полинуклеотида, содержащей по меньшей мере один поливалентный противоион. Осаждение соли полинуклеотида с использованием надлежащих методов обеспечивает удаление всех растворимых нецелевых продуктов и агентов нецелевого синтеза. В некоторых вариантах реализации изобретения способ включает отделение соли полинуклеотида от связанной первой полинуклеотидной композиции для получения второй полинуклеотидной композиции, содержащей соль полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения первая полинуклеотидная композиция, полинуклеотидная соль и вторая полинуклеотидная композиция содержат целевой полинуклеотид, имеющий последовательность из 7 или более нуклеозидных субъединиц, в которой по меньшей мере две из нуклеозидных субъединиц соединены с помощью N3'→P5' тиофосфорамидатной связи (например, как описано здесь).

Вторая полинуклеотидная композиция может иметь меньшее количество продуктов и агентов нецелевого синтеза по сравнению с первой полинуклеотидной композицией. Под меньшим количеством продуктов и агентов нецелевого синтеза подразумевается, что во второй полинуклеотидной композиции по сравнению с первой полинуклеотидной композицией будет меньше на 10% или более по весу продуктов и агентов нецелевого синтеза, либо меньше на 15% или более по весу, либо меньше на 20% или более по весу, либо меньше на 25% или более по весу, либо меньше на 30% или более по весу, либо меньше на 35% или более по весу, либо меньше на 40% или более по весу, 45% или более, 50 мас.%, более 50 мас.%, более 55 мас.%, более 60 мас.%, более 65 мас.%, более 70 мас.%, более 75 мас.%, более 80 мас.%, более 85 мас.%, либо меньше на 90% или более по весу или меньше на 95% или более по весу. Как таковые, рассматриваемые способы могут обеспечивать селективное осаждение целевого полинуклеотида перед нецелевыми продуктами и агентами синтеза. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаемые способы обеспечивают повышенную селективность осаждения по сравнению с контрольным методом полинуклеотидного осаждения с использованием органического растворителя, такого как чистый этанол или этанольный раствор (см., например, Crouse J., Amorese D (1987). "Ethanol Precipitation: Ammonium Acetate as an Alternative to Sodium Acetate". Focus 9 (2): 3-5). Под повышенной селективностью осаждения подразумевается, что 5% или более продуктов и агентов нецелевого синтеза удаляются от второй полинуклеотидной композиции по сравнению с контрольной композицией, либо более на 10% или более по весу, либо более на 15% или более по весу, 20% или более по весу, 25% или более по весу, 30% или более по весу, 35% или более по весу, 40% или более по весу, 45% или более по весу, 50% или более по весу, 55% или более по весу, 60% или более по весу, 65% или более по весу, 70% или более по весу, 75% или более по весу, 80% или более по весу, 85% или более по весу, 90% или более по весу, или 95% или более по весу продуктов и агентов нецелевого синтеза. Уменьшенное количество продуктов и агентов нецелевого синтеза по сравнению с первой полинуклеотидной композицией может быть опреде-

лено с использованием любых удобных способов, например, с использованием методов ВЭЖХ.

Здесь термины "целевой синтетический полинуклеотид" и "целевой полинуклеотид" используются взаимозаменяемо и относятся к полинуклеотиду, имеющему определенную желаемую последовательность нуклеотидов, которая синтезируется на носителе с помощью любого удобного поэтапного способа синтеза полинуклеотидов на твердой фазе (например, как описанный здесь) и где полинуклеотид лишен каких-либо защитных групп, которые используются исключительно для целей реализации синтеза целевого полинуклеотида. Такие защитные группы могут быть удалены из полинуклеотида на заключительных стадиях твердофазного синтеза, например, во время окончательного снятия защиты и отщепления полинуклеотида от носителя для получения целевого полинуклеотида. Используемый здесь термин "нецелевой" относится к любому подходящему компоненту, например, к соединению, полинуклеотиду или его производному, агенту и т.д. или их смесям, которые не являются желаемым целевым продуктом синтеза.

Целевой полинуклеотид может включать любое удобное количество нуклеозидных субъединиц, например от 7 до 500 нуклеозидных субъединиц, от 7 до 100 нуклеозидных субъединиц, от 7 до 75 нуклеозидных субъединиц, от 7 до 50 нуклеозидных субъединиц, от 7 до 40 нуклеозидных субъединиц, от 7 до 30 нуклеозидных субъединиц, от 7 до 20 нуклеозидных субъединиц, от 7 до 15 нуклеозидных субъединиц, от 10 до 15 нуклеозидных субъединиц или от 13 до 15 нуклеозидных субъединиц. В некоторых случаях целевой полинуклеотид имеет от 7 до 100 нуклеозидных субъединиц, либо например от 7 до 50 нуклеозидных субъединиц, от 10 до 50 нуклеозидных субъединиц, от 10 до 40 нуклеозидных субъединиц, от 10 до 30 нуклеозидных субъединиц, от 10 до 25 нуклеозидных субъединиц, от 10 до 20 нуклеозидных субъединиц, от 12 до 18 нуклеозидных субъединиц или от 12 до 16 нуклеозидных субъединиц. В некоторых случаях целевой полинуклеотид имеет 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеозидных субъединиц.

Используемый здесь термин "продукты и агенты нецелевого синтеза" относится в совокупности к множеству нецелевых компонентов, которые могут присутствовать в сыром синтетическом продукте синтеза полинуклеотидов в твердой фазе, включая, но не ограничиваясь, нецелевой полинуклеотид, продукты синтеза, такие как усеченные полинуклеотиды, усеченные полинуклеотидные фрагменты (т.е. последовательности, которые были усечены после неудачной субъединичной связи), полинуклеотиды, включающие делецию(и) (т.е. отсутствие одного или нескольких нуклеозидных мономеров или димеров нуклеозидов, например, как описано здесь) и дериватизированные полинуклеотиды (например, полинуклеотидные последовательности, которые подвергаются нежелательной побочной реакции во время синтеза или расщепления); агенты, такие как расщепленные линкеры, продукты депротекции, например, удаленные продукты защитной группы, такие как продукты защитных групп фосфора и продукты защитной группы основания (например, продукты защитной группы экзоциклических аминов), реагенты для расщепления и/или акцепторы расщепления и остаточные синтетические реагенты, такие как мономеры, димеры, связующие, защитные или деблокирующие реагенты.

В некоторых вариантах реализации изобретения способы обеспечивают избирательное осаждение целевого полинуклеотида перед продуктами и агентами, не являющимися целевыми, которые включают полинуклеотиды, имеющие 6 нуклеозидных субъединиц или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее либо 2 нуклеозидных субъединицы. В некоторых случаях все продукты и агенты, не являющиеся целевыми продуктами синтеза, которые не являются полинуклеотидами, остаются растворимыми на стадии селективного осаждения в соответствии с предлагаемыми способами и поэтому могут быть легко удалены из полученного осадка соли полинуклеотида.

Рассматриваемые способы могут включать осаждение и отделение целевого полинуклеотида от неочищенного синтетического препарата с получением полинуклеотидной композиции, которая имеет несколько желательных свойств, таких как уменьшенное количество нецелевых продуктов и агентов синтеза (например, синтетические реагенты, реагенты расщепления, поглотители, удаленные защитные группы, побочные продукты расщепления (линкеры, защитные группы и т.д.) и мелкие полинуклеотидные фрагменты).

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаемые способы включают осаждение полинуклеотида из неочищенного синтетического препарата в виде соли поливалентного катиона перед хроматографической очисткой. В некоторых случаях данные методы являются методами очистки целевого полинуклеотида. Осаждение неочищенной полинуклеотидной композиции с использованием соли поливалентных катионов вызывает осаждение соли полинуклеотида, содержащей по меньшей мере один поливалентный катионный противоион. В некоторых случаях осадок соли полинуклеотида содержит смесь моновалентных и поливалентных катионных противоионов, которые образуют пары ионов с полианионным полинуклеотидным скелетом. Используемые здесь термины "соль поливалентного катиона" и "поливалентная соль", когда они используются в отношении полинуклеотида, взаимозаменяемы для обозначения соли полинуклеотида, которая включает по меньшей мере один поливалентный катионный противоион, который является ионным соединением с анионной внутрисубъединичной связывающей группой полинуклеотидного скелета. В некоторых случаях соль поливалентного катиона полинуклеотида включает смесь одновалентных и поливалентных катионов. В некоторых вариантах реализации изобретения

поливалентный катион может обеспечивать агрегацию целевого полинуклеотида путем ионного спаривания с анионными группами межсубъединичных связей двух или более полинуклеотидных скелетов. В некоторых случаях двухвалентный ион-катион с двумя различными полинуклеотидами образует димер. В некоторых случаях дальнейшая агрегация полинуклеотидов может быть достигнута дополнительными поливалентными взаимодействиями, опосредованными дополнительными поливалентными катионами. Как таковые, в некоторых случаях данные методы могут обеспечивать селективную агрегацию и осаждение целевых полинуклеотидов перед продуктами и агентами нецелевого синтеза.

В некоторых вариантах реализации способа по меньшей мере один поливалентный катионный противоион является двухвалентным. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере один поливалентный катионный противоион выбран из группы, состоящей из магния, цинка и кальция. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере один поливалентный катионный противоион является трехвалентным. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере один противовалентный катион представляет собой алюминий. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотидная соль дополнительно включает в себя поливалентный катионный противоион. В таких случаях полинуклеотидная соль представляет собой смешанную соль, например соль, содержащую два или более различных противоиона катиона.

Любые удобные способы осаждения полинуклеотида могут найти применение в исследуемых методах. Стадия контактирования первой полинуклеотидной композиции с поливалентной катионной солью для осаждения соли полинуклеотида, содержащей по меньшей мере один поливалентный катионный противоион, может быть достигнута с использованием любых удобных способов. Любые подходящие поливалентные катионы и их соли (например, как описано здесь) могут быть использованы на стадии контактирования для получения осадка. В некоторых случаях соль полинуклеотида, включающего по меньшей мере один катионный противоион, образуется в фазе раствора, например, путем добавления поливалентной катионной соли к раствору, включающему полинуклеотид. После добавления в раствор поливалентной катионной соли может образовываться осадок. В некоторых случаях на ионообменном носителе может быть образована соль полинуклеотида, включающая по меньшей мере один катионный противоион. Любые удобные ионообменные носители могут быть использованы на стадии контактирования. В некоторых случаях ионообменный носитель является сильной катионообменной смолой. В некоторых вариантах осуществления способа стадия контактирования включает элюирование первой полинуклеотидной композиции с катионообменного носителя, которая включает в себя поливалентные катионные противоионы. Используемый здесь термин "катионообменный носитель" относится к носителю, который сам по себе является анионным и способен к ионному спариванию с катионным аналитом, таким как представляющий интерес поливалентный катион. Любой подходящий элюант может быть использован на стадии элюирования с катионообменного носителя. В некоторых случаях осадок образуется в элюате, после того как полинуклеотидная соль элюируется с катионообменного носителя.

Предложенные методы могут быть проведены на любом удобном неочищенном синтетическом препарате целевого синтетического полинуклеотида. В некоторых случаях первая полинуклеотидная композиция представляет собой неочищенный синтетический препарат целевого синтетического полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения первая полинуклеотидная композиция представляет собой композицию, которая является продуктом отщепления целевого полинуклеотида от носителя после синтеза. Таким образом, первая полинуклеотидная композиция может включать множество продуктов и агентов нецелевого синтеза. Предложенные способы обеспечивают селективное осаждение соли полинуклеотида перед нецелевыми продуктами и агентами синтеза, которые остаются в растворе и, следовательно, могут быть легко удалены из полученного осадка.

Любые подходящие способы синтеза (например, описанные в данном документе) могут быть использованы для синтеза целевого полинуклеотида. После синтеза целевой полинуклеотид отщепляется от носителя, на котором выполняется ступенчатый синтез. После расщепления целевой полинуклеотид полной длины может быть очищен для удаления нежелательных синтетических и расщепляющих реагентов и для удаления нецелевых полинуклеотидных фрагментов и их производных. Данные методы, включающие осаждение соли полинуклеотида, содержащей по меньшей мере один поливалентный катионный противоион, и могут быть выполнены на любой удобной стадии получения целевого полинуклеотида, такого как постсинтез и до очистки с помощью хроматографии с обращенной фазой.

В данном контексте термины "неочищенный синтетический препарат", "неочищенная композиция" и "неочищенный полинуклеотид" относятся к композиции, содержащей синтетические продукты синтеза полинуклеотидов в твердой фазе, которые собираются после синтеза путем отщепления от подложки твердофазного синтеза, где композиция является неочищенной, т.е. хроматографическая очистка не проводилась. Хроматографическая очистка относится к любому подходящему способу очистки, который включает абсорбцию целевого полинуклеотида на хроматографической подложке с последующим элюированием целевого полинуклеотида от нецелевых полинуклеотидов. В некоторых случаях хроматографическая очистка подразумевает хроматографию с обращенной фазой.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает в себя получение первой полинуклеотидной композиции, где композицию получают путем постсинтезного отщепления от

твердофазной подложки. Любые дополнительные стадии, такие как стадии испарения, разбавления или концентрации, также могут быть выполнены на неочищенном синтетическом препарате до использования полученной композиции в указанных способах. В некоторых случаях способ дополнительно включает синтез целевого полинуклеотида (например, как описано в данном документе на твердофазной подложке). В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает отщепление полинуклеотида от носителя для получения первой полинуклеотидной композиции.

Твердый осадок, включающий соль полинуклеотида, может быть отделен от первой полинуклеотидной композиции, которая контактирует с поливалентной солью (т.е. с контактирующей первой полинуклеотидной композицией) с использованием любого подходящего способа. Способы разделения включают, но не ограничиваются ими, центрифугирование, фильтрацию, декантирование и т.п.

В некоторых случаях отделение осадка, включающего соль полинуклеотида, достигается центрифугированием, когда применение центробежной силы на контактирующую первую полинуклеотидную композицию, например, в центрифуге, вызывает образование осадка, например, в нижней части контейнера. Образование осадка путем центрифугирования можно назвать откручиванием осадка. В некоторых вариантах реализации изобретения способ отличается тем, что этап разделения включает центрифугирование связанной первой полинуклеотидной композиции для осаждения соли полинуклеотида. Супернатант декантируют из трубки без нарушения целостности осадка или отбирают из контейнера, например, с помощью пипетки Пастера. Процесс центрифугирования может быть повторен с промычным раствором.

В некоторых случаях отделение осадка, включающего соль полинуклеотида, достигается фильтрацией. В некоторых вариантах реализации этап разделения включает фильтрацию соли полинуклеотида от связанного первого полинуклеотида. В рассматриваемых способах могут быть использованы любые подходящие фильтры и фильтрационные среды. В некоторых случаях разделение достигается путем глубокой фильтрации с использованием фильтрующего материала, выбранного в соответствии с целевым полинуклеотидом.

В некоторых вариантах реализации способ включает контактирование первой полинуклеотидной композиции, содержащей полинуклеотид, имеющий последовательность из 7 или более нуклеозидных субъединиц, где по меньшей мере две из нуклеозидных субъединиц, соединены между собой субъединичной $N3' \rightarrow P5'$ тиофосфорамидатной связью; нецелевые продукты и реагенты синтеза; поливалентную катионную соль для осаждения первой соли полинуклеотида, содержащей по меньшей мере один поливалентный катионный противоион; и отделение первой соли полинуклеотида от контактирующей первой полинуклеотидной композиции для получения второй полинуклеотидной композиции, содержащей первую соль полинуклеотида.

Отделение осадка от контактирующей первой полинуклеотидной композиции дает вторую полинуклеотидную композицию, включающую первую соль полинуклеотида. В некоторых случаях селективное осаждение первой соли полинуклеотида с использованием соли поливалентного катиона посредством данных методов дает вторую полинуклеотидную композицию, которая включает в себя уменьшенное количество продуктов и агентов нецелевого синтеза.

После избирательного осаждения целевые полинуклеотидные соли затем могут быть превращены в растворимую соль полинуклеотида путем катионного обмена, по меньшей мере, одного поливалентного катионного противоиона от полинуклеотида и замены на другой интересующей катион (например, как описано в данном документе). Рассматриваемые способы обеспечивают обратимое образование первой соли полинуклеотида, содержащей по меньшей мере один поливалентный катионный противоион. Используемые в данном контексте термины "обратимая формация" и "обратимый обмен" используются взаимозаменяемо и относятся к получению соли полинуклеотида путем, например, селективного осаждения (например, как описано в данном документе), где образовавшаяся соль также может быть затем диссоциирована для замены по меньшей мере одной соли поливалентного катиона. В некоторых случаях соли полинуклеотидов, которые нерастворимы в любом растворителе, могут упоминаться как необратимые соли. В некоторых вариантах реализации способ включает в себя обмен по меньшей мере одного поливалентного катионного противоиона первой соли полинуклеотида с получением растворимой второй соли полинуклеотида, где обмен включает диссоциацию поливалентного катионного противоиона и с образованием ионных пар с представляющим интерес катионом растворимой соли. В некоторых случаях растворимая вторая полинуклеотидная соль представляет собой одновалентную соль. В некоторых случаях растворимая вторая полинуклеотидная соль представляет собой натриевую соль. В некоторых случаях растворимая вторая полинуклеотидная соль представляет собой соль триэтиламония. В некоторых случаях первый и второй полинуклеотиды отличаются друг от друга, т.е. включают различные катионные противоионы. Диссоциация целевых полинуклеотидных солей и обмен по меньшей мере одного поливалентного катионного противоиона может быть достигнута с использованием любых подходящих способов. В некоторых случаях диссоциация достигается с использованием хроматографии с обращенной фазой, например, как описано в данном документе. В некоторых случаях ионообменная хроматография может быть использована для диссоциации. В некоторых вариантах осуществления диссоциация первой соли полинуклеотида достигается растворением соли в растворителе, включающем представ-

ляющий интерес катионный противоион.

После разделения дополнительные стадии очистки могут быть выполнены для второй полинуклеотидной композиции. В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает контактирование первой соли полинуклеотида с носителем хроматографии с обращенной фазой; и элюирование с хроматографического носителя третьей полинуклеотидной композиции, содержащей полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления третья полинуклеотидная композиция включает вторую соль полинуклеотида.

Для очистки соли полинуклеотида могут быть использованы любые подходящие способы хроматографии с обращенной фазой. Методы хроматографии на обращенной фазе и представляющие интерес носители включают, но не ограничиваются ими, хроматографическую очистку с использованием ионно-парной хроматографии с обращенной фазой, хроматографию с обращенной фазой C18 и те способы и носители, которые описаны Chen et al. *Journal of Chromatography A*, Volume 1288, 3 May 2013, pages 73-81; и Zimmermann et al., *Journal of Chromatography A*, Volume 1354, 8 August 2014, pages 43-55. В некоторых вариантах реализации вторая полинуклеотидная композиция загружается непосредственно на носитель хроматографии на обращенной фазе. Под загрузкой непосредственно на носитель подразумевается, что вторая полинуклеотидная композиция, полученная с использованием данного способа, добавляется непосредственно, например, в виде изолированного твердого осадка, на носитель хроматографии с обращенной фазой. В некоторых случаях носитель хроматографии на обращенной фазе представляет собой смолу, сконфигурированную как колонку, и полинуклеотидная композиция добавляется к верхней части слоя смолы. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает растворение второй полинуклеотидной композиции в растворителе. Могут быть использованы любые удобные растворители, включая, но не ограничиваясь ими, водные буферы, органические растворители, смешивающиеся с водой и их смеси. В таких случаях раствор второй полинуклеотидной композиции можно контактировать с носителем хроматографии на обращенной фазе для абсорбирования полинуклеотида к носителю перед элюированием.

В некоторых случаях контактирование включает в себя связывание полинуклеотида на носителе хроматографии на обращенной фазе и последующее элюирование полинуклеотида для обеспечения высокой чистоты целевого полинуклеотида с отделением от нецелевого полинуклеотида и остаточных синтетических агентов, которые присутствуют в композиции. Элюат, содержащий целевой полинуклеотид, собирают. Любые подходящие элюанты могут быть использованы для элюирования полинуклеотида от носителя хроматографии на обращенной фазе. Раствор для элюции может быть выбран в соответствии с различными факторами, такими как характер хроматографического носителя, целевого олигонуклеотида, конкретных желаемых солей целевого полинуклеотида и т.д. В некоторых случаях по меньшей мере один поливалентный катионный противоион первой соли полинуклеотида подвергают ионному обмену на носителе хроматографии с обращенной фазой с другим катионовым противоионом, представляющим интерес, который включен в элюант. В таких случаях, когда полинуклеотид элюируется с носителя хроматографии с обращенной фазой, он находится в другой форме соли (т.е. второй соли полинуклеотида), чем тогда, когда он был загружен, поскольку по меньшей мере один поливалентный катионный противоион был заменен полинуклеотидом. В некоторых случаях солевая форма полинуклеотида, которая элюируется с носителя в третьей полинуклеотидной композиции, является более водорастворимой, чем первая полинуклеотидная соль, включающая по меньшей мере один поливалентный катионный противоион.

В некоторых вариантах реализации третья полинуклеотидная композиция включает в себя вторую соль полинуклеотида, которая является фармацевтически приемлемой солью полинуклеотида. В некоторых случаях третья композиция включает в себя вторую соль полинуклеотида, которая является одновалентной катионной солью полинуклеотида. В некоторых случаях третья композиция включает вторую соль полинуклеотида, которая представляет собой триэтиламмониевую соль полинуклеотида. В некоторых случаях третья композиция включает вторую соль полинуклеотида, которая является натриевой солью полинуклеотида. Следует понимать, что после того, как полинуклеотид очищают с помощью хроматографии с обращенной фазой, любое количество дополнительных стадий катионного обмена может быть выполнено на соли полинуклеотида для получения желаемой формы соли полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает ионообменные катионные противоионы из второй соли полинуклеотида для получения третьей соли полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления третья полинуклеотидная соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль полинуклеотида. В некоторых случаях третья полинуклеотидная соль представляет собой одновалентную катионную соль полинуклеотида. В некоторых случаях третья полинуклеотидная соль представляет собой натриевую соль полинуклеотида (например, как описано в данном документе).

В некоторых случаях первая композиция включает одновалентную катионную соль полинуклеотида. В некоторых случаях одновалентная катионная соль выбирается из группы, состоящей из натрия, аммония и алкиламмония. В некоторых случаях алкиламмоний выбирают из группы, состоящей из диметиламмония, метиламмония, этиламмония и триэтиламмония. В некоторых случаях первая композиция включает аммонийную соль полинуклеотида. В некоторых случаях первая композиция включает алкиламмониевую соль полинуклеотида. В некоторых случаях первая композиция включает триэтилаmmo-

ниевую соль полинуклеотида. В некоторых случаях первая композиция включает натриевую соль полинуклеотида. Первую полинуклеотидную композицию может быть приведена в контакт с солью поливалентного катиона для осаждения первой соли полинуклеотида, содержащей по меньшей мере один поливалентный катионный противоион. В некоторых вариантах реализации контактирующая первая полинуклеотидная композиция включает первую соль полинуклеотида, включающую по меньшей мере один поливалентный катионный противоион.

Рассматриваемые в рамках данного изобретения варианты реализации любого из вышеупомянутых вариантов способа охвачены, в случае, если полинуклеотид является таким, как описано в данном документе.

Способы синтеза

Любые подходящие способы, стратегии и химические методы синтеза полинуклеотидов могут быть использованы для получения неочищенных синтетических полинуклеотидных композиций, которые могут найти применение в указанных способах получения. Методы и способы синтеза полинуклеотидов, которые могут быть адаптированы для использования в исследуемых способах, включают, но не ограничиваются ими, фосфорамидит, Н-фосфонат, фосфодиэфир, фосфотриэфир, фосфит-триэфир. Полинуклеотидные компоненты соединений изобретения могут быть синтезированы путем адаптации любых обычных протоколов для выбранного химического состава. Способы, представляющие интерес для синтеза олигонуклеотидов, содержащих химические соединения $N3' \rightarrow P5'$ тифосфорамидатов, включают, но не ограничиваются ими, способы, описанные в U.S. 5824793, McCurdy et al. (1997), Tetrahedron Letters, 38:207-210; Pongracz & Gryaznov (1999), Tetrahedron Letters, 49:7661-7664; US 6835826, US 7494982, US 7485717 и US 5684143.

В некоторых случаях представляющий интерес полинуклеотид синтезируется с помощью последовательных присоединений, начиная с 5'-конца и продолжая до 3'-конца целевой полинуклеотидной последовательности. В некоторых случаях представляющий интерес полинуклеотид синтезируют с помощью последовательных присоединений, начиная с 3'-конца, и переходит к 5'-концу целевой полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид синтезируют посредством последовательных присоединений мономерных фосфорамидитов к удлиняющемуся концу полинуклеотида. 5'-концевая нуклеозидная субъединица может быть присоединена к любой подходящей твердой подложке посредством необязательной связывающей группы или 5'-концевой группы. После присоединения первой субъединицы к твердой подложке с указанной субъединицы может быть снята защита с получением свободной, иммобилизованной 5'-концевой группы. Затем связывание субъединицы с растущей олигонуклеотидной цепью может быть достигнуто. В некоторых случаях способ включает в себя связывание 3'-концевой группы с мономером 3'-защищенным-нуклеотидом-5'-фосфорамидит. В некоторых вариантах реализации 3'-концевая группа представляет собой 3'-гидроксильную группу. В некоторых вариантах реализации 3'-концевая группа представляет собой 3'-аминогруппу.

В некоторых случаях способ синтеза полинуклеотидов включает стадии (а) снятие защиты с защищенной 3'-аминогруппы концевого нуклеозида, присоединенного к твердофазной подложке, указанное снятие защиты приводит к образованию свободной 3'-аминогруппы; (b) приведение в контакт свободной 3'-аминогруппы с мономером 3'-защищенный аминоклеозид-5'-фосфорамидит в присутствии нуклеофильного катализатора с образованием межнуклеозидной $N3' \rightarrow P5'$ фосфорамидитной связи; и (с) окисление связи для получения $N3' \rightarrow P5'$ тифосфорамидитной связи. В некоторых вариантах осуществления способ включает (d) повторение этапов (а)-(с) до тех пор, до тех пор не синтезируется полинуклеотид.

В некоторых случаях этот способ включает связывание 3'-концевой группы с носителем с 3'-защищенным динуклеотидом-5'-фосфорамидитным димером. Представляющие интерес способы синтеза полинуклеотидов включают, но не ограничиваются ими, те методы твердофазного синтеза, которые включают по меньшей мере одно соединение динуклеотидного димера, как описано в публикации РСТ No. WO 2015/168310, заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США серийный № 61/987396. Целевая полинуклеотидная последовательность может быть синтезирована с помощью ретро-синтетической стратегии, которая включает последовательные связи как димерных, так и мономерных субъединиц с 3'-концевой группой растущей олигонуклеотидной цепи. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид синтезируют с использованием способа, включающего по меньшей мере одно соединение динуклеотидного димера со свободной 3'-концевой группой растущей полинуклеотидной цепи.

В некоторых случаях способ синтеза полинуклеотидов включает стадии (а) снятие защиты с защищенной 3'-аминогруппы концевого нуклеозида, присоединенного к твердофазной подложке, указанное снятие защиты приводит к образованию свободной 3'-аминогруппы; (b) контактирование свободной 3'-аминогруппы с 3'-защищенным аминоклеозидом тифосфорамидатом или фосфорамидит-5'-фосфорамидитным димером в присутствии нуклеофильного катализатора с образованием межнуклеозидной $N3' \rightarrow P5'$ фосфорамидитной связи; и (с) окисление связи для получения $N3' \rightarrow P5'$ тифосфорамидитной связи. В некоторых вариантах осуществления способ включает в себя (d) повторение стадий (а)-(с) до тех пор, пока не будет синтезирован полинуклеотид, причем на стадии (b) 3'-защищенный димер

аминодинуклеотида тиофосфорамидат-5'-фосфорамидит или 3'-защищенный моонуклеотид-5'-фосфорамидит могут быть использованы.

В рассматриваемых способах могут быть использованы любые подходящие стратегии применения защитных групп для защиты оснований, фосфорамидита, фосфорамидата, 5', 2' и/или 3' групп полинуклеотида. Защитные группы, представляющие интерес, включают, но не ограничиваются ими, защитные группы, описанные в публикации Ohkubo et al., *Org. Lett.*, 2010, 12 (11), pp 2496-2499; и Beaucage и Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992).

В данном контексте термин "фосфатная защитная группа" относится к защитной группе, которая может быть присоединена к фосфорсодержащей междолинной связи олигонуклеотида. При ее наличии, фосфатная защитная группа может препятствовать (т.е. блокировать) взаимодействию фосфорсодержащей связи в том положении, в котором присоединена фосфатная защитная группа. Рассматриваемым фосфатными защитными группами могут быть защищены любые подходящие фосфорсодержащие междолинные связи (например, связи Р (III) и Р (V)), включая, но не ограничиваясь ими, фосфорамидитные, оксофосфорамидатные, тиофосфорамидатные, фосфатные сложноэфирные, тиофосфатные сложноэфирные, фосфодиэфирные связи и т.п. Фосфатная защитная группа может быть присоединена к доступному атому кислорода фосфорсодержащей междолинной связи. В качестве фосфатной защитной группы могут быть использованы любые подходящие защитные группы. В некоторых вариантах реализации фосфатная защитная группа представляет собой метил или β -цианоэтил.

В некоторых случаях 3'-концевая группа растущей цепи полинуклеотида может включать 3'-гидроксил, 3'-аминогруппу или их защищенные версии. Во время синтеза олигонуклеотида в 3'-концевой группе могут быть использованы любые подходящие гидроксильные и/или аминозащитные группы. В некоторых вариантах реализации 3'-концевая группа представляет собой защищенную 3'-аминогруппу, и указанный способ включает снятие защиты или удаление защитной группы с получением свободной 3'-аминогруппы. В данном контексте термин "свободная аминогруппа" в отношении мономеров и димеров означает аминогруппу, способную взаимодействовать с фосфорамидитной группой поступающего мономера или димера. В некоторых вариантах реализации свободная аминогруппа представляет собой первичный амин. После стадии снятия защиты (например, детритилирования) аминогруппа может быть в форме соли (например, соли сопряженного основания кислоты, использованной для детритилирования). Указанная соль может быть необязательно нейтрализована основным раствором, таким как 2% триэтиламин или пиридин в ацетонитриле, после стадии детритилирования.

3'-защита поступающих субъединичных фосфорамидитов препятствует нежелательной полимеризации цепи. В некоторых вариантах реализации 3'-концевая группа представляет собой защищенную 3'-гидроксильную группу, и указанный способ включает снятие защиты или удаление защитной группы с получением свободной 3'-гидроксильной группы. В некоторых вариантах реализации 3'-концевая группа представляет собой защищенную 3'-аминогруппу, и указанный способ включает снятие защиты или удаление защитной группы с получением свободной 3'-аминогруппы. Защищенная 3'-амино или 3'-гидроксильная группа может быть защищена тритильной защитной группой. В некоторых вариантах реализации тритильная защитная группа представляет собой трифенилметил (Tr или Trr, Ph₃C-). В некоторых вариантах реализации тритильная защитная группа представляет собой 4,4'-диметокситритил (DMT). Снятие защиты с 3'-концевой амино или гидроксильной группы может быть осуществлено с помощью любых подходящих способов. Способы, представляющие собой интерес, включают, но не ограничиваются ими, способы, описанные в публикации Beaucage и Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992). В некоторых случаях снятие защиты с защищенной 3'-аминогруппы концевой нуклеозида включает детритилирование с получением свободной 3'-концевой группы, например, катализируемое кислотой детритилирование. В некоторых случаях, димерные или мономерные субъединичные фосфорамидиты содержат защищенную 3'-гидроксильную или 3'-аминогруппу, которая является такой же, как 3'-концевая группа концевой нуклеозида, присоединенного к твердой подложке.

В рассматриваемых способах синтеза полинуклеотидов могут быть использованы любые подходящие твердофазные подложки. Рассматриваемые твердые подложки включают, но не ограничиваются ими, микрочастицы, полученные из стекла с контролируемым размером пор (CPG), полистирола с высокой степенью поперечной сшивки (например, NittoPhase HL 400 или GE Primer 350), акриловых сополимеров, целлюлозы, нейлона, декстрана, латекса, полиакролеина и т.п., такие как описаны в следующих иллюстративных ссылках: *Meth. Enzymol.*, Section A, pages 11-147, vol. 44 (Academic Press, New York, 1976); U.S. Pat. Nos. 4678814; 4413070 и 4046720; и Pon, Chapter 19, in Agrawal, editor, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 20, (Humana Press, Totowa, N.J., 1993). Дополнительные подложки, представляющие собой интерес, включают полистирольные гранулы; полистирол, привитый полиэтиленгликолем (например, TentaGel™, Rapp Polymere, Тюбинген, Германия); и т.п. Выбор характеристик подложки, таких как материал, пористость, размер пор, форма и т.п., и типа используемого связывающего фрагмента зависит от множества факторов, таких как используемые защитные группы, длина конечного продукта, количество конечного продукта и т.п. Иллюстративные связывающие фрагменты описаны в Pon et al., *Biotechniques*, 6:768-775 (1988); Webb, U.S. Pat. No. 4659774; Barany et al., International patent application

PCT/US91/06103; Brown et al., *J. Chem. Soc. Commun.*, 1989: 891-893; Damha et al., *Nucleic Acids Research*, 18: 3813-3821 (1990); Beattie et al., *Clinical Chemistry*, 39: 719-722 (1993); Maskos and Southern, *Nucleic Acids Research*, 20: 1679-1684 (1992); и т.п.

В некоторых вариантах реализации твердые подложки, которые находят применение в рассматриваемых способах, включают CPG и полистирол, привитый полиэтиленгликолем и имеющий концевую аминогруппу (например, TentaGel-NH₂TM, Rapp Polymere, Тюбинген, Германия). Аминопропильная группа может быть использована в качестве вставки между CPG и нуклеозидной связью. В некоторых случаях связь с 5'-гидроксилом первого нуклеозида представляет собой сукцинильную группу, которая обеспечивает подвижную в основных условиях сложноэфирную связь, которая может быть расщеплена после синтеза с помощью водного аммиака.

После снятия защиты связанный с подложкой нуклеозид может взаимодействовать с димерным или мономерным субъединичным фосфорамидитом с образованием межнуклеозидной связи. Следует понимать, что связанный с подложкой нуклеозид может относиться к одному остатку, присоединенному к твердой подложке, или может относиться к концевому остатку олигонуклеотидной цепи, присоединенной к подложке. В рассматриваемых способах могут быть использованы любые подходящие химические приемы связывания, связывающие реагенты и способы. Любой подходящий подбор условий связывания, защитных групп, твердофазных подложек, связывающих групп, реагентов для снятия защиты, реагентов для отщепления продуктов от твердофазных подложек, очистки продукта и т.п., в контексте рассматриваемых способов в соответствии с Gait, editor, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1984); Amarnath and Broom, *Chemical Reviews*, Vol. 77, p. 183-217 (1977); Pon et al., *Biotechniques*, Vol. 6, p. 768-775 (1988); Ohtsuka et al., *Nucleic Acids Research*, Vol. 10, p. 6553-6570 (1982); Eckstein, editor *Oligonucleotides, and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991), Greene and Wuts "Protective Groups in Organic Synthesis", Third edition, Wiley, New York 1999, Narang, editor, *Synthesis and Applications of ДНК and РНК* (Academic Press, New York, 1987), Beaucage and Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992), и подобных ссылках.

После связывания непрореагировавшие 3'-аминогруппы связанной с подложкой растущей цепи полинуклеотида могут быть необязательно экпированы подходящим экпирующим агентом до проведения следующей стадии снятия защиты (например, стадии детритилирования) для обеспечения их инертности на последующих стадиях связывания. Указанная стадия экпирования может улучшать ВЭЖХ профиль такого получения для облегчения очистки, а также может улучшать общий выход продукта. Экпирующие реагенты, подходящие для рассматриваемых способов, включают электрофильные реагенты, такие как уксусный ангидрид и изомасляный ангидрид, хлорангидриды кислот, такие как адамантилкарбонилхлорид, пивалоилхлорид и т.п., изотиоцианаты, хлорформилаты и т.д. Также подходят фосфорамидиты в сочетании с активатором и с последующим окислением, а также Н-фосфонатные соли, такие как изопропил-Н-фосфонат триэтиламмония, используемые в сочетании с хлорангидридом кислоты, таким как пивалоилхлорид или адамантилкарбонилхлорид.

В некоторых вариантах реализации способ включает окисление межнуклеозидной N3'→P5' фосфорамидитной связи. В данном контексте термины "окислять", "окисление", "окислительный" и т.п. в отношении фосфорсодержащей межнуклеозидной связи означают процесс или обработку для превращения атома фосфора, находящегося в указанной связи, из формы фосфора(III) в форму фосфора(V). Окисление межнуклеозидных связей может быть осуществлено в любой подходящий момент синтеза, с применением любых подходящих способов. В некоторых вариантах реализации окисление проводят поэтапно, например, во время каждого цикла связывания. В других вариантах реализации окисление нескольких межнуклеозидных связей проводят в конце синтеза. В некоторых случаях окисление N3'→P5' фосфорамидитной связи (например, с применением окислительного агента на основе йода/вод) приводит к получению оксофосфорамидатной связи. В других случаях окисление N3'→P5' фосфорамидитной связи включает сульфирование с получением тиофосфорамидатной связи. Сульфирование может быть осуществлено любыми подходящими способами. Рассматриваемые способы сульфирования включают способы, описанные в публикации Gryazonov et al., в WO 2001018015 и US 6114519. Сульфорирующие агенты представляющие интерес включают, но не ограничиваются ими, элементарную серу, тиурамдисульфиды, такие как тетраэтилтиурамдисульфид, ацилдисульфиды, такие как фенацилдисульфид, фосфинотиоилдисульфиды, такие как S-TetraTM, и 1,1-диоксо-3Н-1,2-бензодитиол-3-он. В некоторых вариантах осуществления сульфурация может быть осуществлена с использованием фенилацетилдисульфида в 2,6-лутидине. В некоторых вариантах реализации сульфирование может быть проведено с применением реагента Бокажа, по способам, описанным Iyer et al., *J. Organic Chemistry* 55:4693-4699, 1990.

Отщепление полинуклеотида от носителя для твердофазного синтеза может быть достигнуто с использованием любых подходящих способов и реагентов, которые могут быть выбраны в зависимости от множества факторов, таких как природа носителя, химер линкера и стратегия защитной группы, используемая во время синтеза. Выбор, сделанные в синтезе и расщеплении целевого полинуклеотида, могут определять природу продуктов и агентов нецелевого синтеза, присутствующих в первой полинуклеотидной композиции.

В некоторых вариантах осуществления перед расщеплением защитные группы фосфора полинуклеотида удаляют, чтобы избежать образования любых потенциальных нежелательных аддуктов расщепленной защитной группы (например, β -цианоэтилзащитной группы) с полинуклеотидом. Способы, представляющие интерес, которые могут быть адаптированы для использования в депротектирующих и расщепляющихся полинуклеотидах, включают в себя те, которые описаны в патенте US 7199236. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид отщепляется от носителя с использованием раствора аммиака для удаления любых защитных групп основания (например, экзоциклических аминокислотных групп) и любых оставшихся защитных групп фосфора. Любые подходящие условия могут быть использованы в реакции полинуклеотидного расщепления. В некоторых случаях расщепление проводят при температуре в диапазоне 40-60°C. В некоторых случаях расщепление выполняется в течение продолжительного периода времени, таком как 12-24 ч. После расщепления полинуклеотида подложку можно удалить фильтрацией и промыть. Объединенные фильтраты и растворы для полоскания, которые теперь содержат синтетический препарат полинуклеотида, могут быть использованы в исследуемых способах приготовления перед переходом к дальнейшим этапам очистки. В некоторых случаях очистка раствора полинуклеотида включает препаративную обращенную высокоэффективную жидкостную хроматографию (RP-HPLC), например, с использованием Kromasil C18 при 45-55°C. В некоторых случаях полинуклеотидные композиции исследуемых способов могут подвергаться любому количеству подходящих этапов обессоливания и концентрирования, например, с использованием аппарата Tangential Flow Filtration (TFF), снабженного мембранами из полиэфирсульфона с размером отсеки диаметра пор 1000 Да.

Полинуклеотидные композиции

Аспекты данного описания включают композиции полинуклеотидных солей, в том числе поливалентные катионные противоионы. В некоторых вариантах реализации композиция содержит соль полинуклеотида, включающую, по меньшей мере, один поливалентный катионный противоион, где полинуклеотид имеет последовательность из 7 или более нуклеозидных субъединиц и по меньшей мере две из нуклеозидных субъединиц соединены с помощью субъединичной N3'→P5' тιοфосфорамидатной связью. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид имеет последовательность из 7 или более нуклеозидных субъединиц, комплементарную РНК компоненту человеческой теломеразы.

Поливалентные катионные противоионы.

Любые подходящие поливалентные катионы могут найти применение в качестве противоиона в целевых полинуклеотидных солях. Как таковой, поливалентный катион может образовывать ионную пару с анионной частью полинуклеотидной цепи в целевых полинуклеотидных композициях. Полинуклеотиды могут включать нуклеозидные субъединицы, связанные фосфорсодержащими межсубъединичными связями (например, связи Р (V)), такие как фосфорамидитные, тιοфосфорамидатные, фосфатные сложноэфирные, фосфодиэфирные связи и т.п. Следует понимать, что межсубъединичные связи полинуклеотида могут быть отрицательно заряжены (например, в водном растворе) и ион находится в паре с катионным противоионом. Такие межсубъединичные связи можно назвать анионными группами полинуклеотидной цепи.

Используемый в данном контексте термин "поливалентный катион" относится к катиону, способному образовывать несколько ионных пар, например многозарядный катион, такой как дважды или трижды заряженный катион. Любые удобные поливалентные катионы могут найти применение в композициях полинуклеотидных солей. В некоторых вариантах осуществления поливалентный ион-катион соединяется с двумя или более смежными анионными группами полинуклеотидного скелета. В некоторых вариантах реализации поливалентный ион катиона соединяется с одной анионной группой полинуклеотидного скелета. В некоторых вариантах реализации изобретения один поливалентный катионный противоион является трехвалентным. Двухвалентные катионные противоионы, представляющие интерес, включают, но не ограничиваются ими, магний, цинк и кальций. В некоторых вариантах реализации изобретения поливалентный катионный противоион является трехвалентным. Тривалентные катионные противоионы включают, но не ограничиваются ими, алюминий. В некоторых вариантах реализации композиции по меньшей мере один поливалентный катионный противоион выбран из группы, состоящей из магния, цинка, алюминия и кальция. В некоторых вариантах осуществления композиции по меньшей мере один поливалентный катионный противоион представляет собой магний. В некоторых вариантах осуществления композиции по меньшей мере один поливалентный катионный противоион представляет собой цинк. В некоторых вариантах осуществления композиции по меньшей мере один поливалентный катионный противоион представляет собой алюминий. В некоторых вариантах осуществления композиции по меньшей мере один поливалентный катионный противоион представляет собой кальций.

Следует понимать, что количество катионных противоионов, которые присутствуют в соли полинуклеотида, зависит от множества факторов, таких как длина полианионного скелета, валентность катионов в солях, pH раствора, агрегация полинуклеотидов в композиции и т.д. Указанные композиции могут включать по меньшей мере один поливалентный катионный противоион полианионного полинуклеотидного скелета в целевых полинуклеотидных композициях, таких как 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 15 или более, 20 или

более, 30 или более, 40 или более, 50 или более, 100 или более или даже более поливалентных катионных противоионов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, имеющий n нуклеозидных субъединиц, может включать между 1 и $(n-1)/2$ (если n - нечетное целое число) двухвалентный катионный противоион(ов) или от 1 до $(n-2)/2$ (если n представляет собой четное целое) двухвалентных катионных противоионов. В некоторых случаях полинуклеотидная соль, которая включает по меньшей мере один поливалентный катион, может дополнительно включать множество других катионов противоионов, которые могут быть одновалентными, двухвалентными или трехвалентными. В некоторых случаях n находится в диапазоне от 7 до 50, например от 7 до 40, от 10 до 40, от 10 до 30, от 10 до 25, от 10 до 20 или от 12 до 15 нуклеозидных субъединиц.

В некоторых вариантах реализации композиции полинуклеотидная соль может включать 3 мол.% или более поливалентного катионного противоиона относительно полианионной основы полинуклеотидов (т.е. относительно теоретического максимального количества катионных противоионов к полианионному скелету), таких как 4 мол.% или более, 5 мол.% или более, 6 мол.% или более, 7 мол.% или более, 8 мол.% или более, 9 мол.% или более, 10 мол.% или более, 11 мол.% или более, 12 мол.% или более, 13 мол.% или более, 14 мол.% или более, 15 мол.% или более, 16 мол.% или более, 17 мол.% или более, 18 мол.% или более, 19 мол.% или более, 20 мол.% или более, 23% мол.% или более, 25 мол.% или более, 30 мол.% или более, 35 мол.% или более, 40 мол.% или более, 45 мол.% или более, 50 мол.% или более, 55 мол.% или более, 60 мол.% или более, или даже больше, поливалентного катионного противоиона относительно полианионного скелета полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации указанных композиций полинуклеотид может включать 10 мол.% или более поливалентного катионного противоиона относительно полианионного скелета полинуклеотида. Например, полинуклеотидная соль, которая включает в себя полианионный скелет, состоящий из 10 межнуклеотидных субъединичных связей, и включает один двухвалентный катионный противоион, соединенный с двумя связями, описывается как включающая 20 мол.% двухвалентного катионного противоиона. Если один двухвалентный катионный противоион, соединен только с одной связью вместо двух, то полинуклеотидная соль описывается как включающая 10 мол.% двухвалентного катионного противоиона. Таким образом, значение мол.% относится к уровню заполнения полианионного полинуклеотидного скелета поливалентными катионными противоионами, которые присутствуют в соли полинуклеотида. Например, один катион Mg^{2+} в 13-членной соли полинуклеотида с 12 межнуклеотидными связями имеет 16,7 мол.% основной цепи. Следует понимать, что в некоторых вариантах реализации полинуклеотидная соль может включать дополнительные сайты ионного соединения на концевых частях полинуклеотида (например, 5'-тиофосфатную группу), и, если они присутствуют, такие сайты должны быть включены в значение мол.% соединения.

В некоторых вариантах реализации композиции полинуклеотидная соль включает 90 мол.% или менее противовалентного катиона относительно полианионного скелета полинуклеотида, такого как 70 мол.% или менее, 65 мол.% или менее, 60 мол.% или менее, 50 мол.% или менее, или даже меньше, от поливалентного катионного противоиона.

В некоторых вариантах реализации композиции полинуклеотидная соль включает от 3 до 90 мол.% поливалентного катионного противоиона относительно полианионного скелета полинуклеотида, такого как от 3 до 65 мол.% (например, от 6 до 50 мол.%, от 10 до 50 мол.% или от 10 до 40 мол.%), от 3 до 50 мол.%, от 3 до 40 мол.%, от 3 до 30 мол.%, от 3 до 20 мол.% или от 3 до 15 мол.% поливалентного катионного противоиона по отношению к полианионному основному полинуклеотиду.

В некоторых случаях композиции полинуклеотидная соль включает от 3 до 60 мол.% двухвалентного катионного противоиона относительно полианионного скелета полинуклеотида, такого как от 3 до 50 мол.% (например, от 5 до 50 мол.%), от 3 до 40 мол.%, от 3 до 30 мол.%, от 3 до 20 мол.%, от 3 до 15 мол.%, например от 3 до 12 мол.% двухвалентного катионного противоиона.

В некоторых случаях композиции полинуклеотидная соль включает от 3 до 60 мол.% катионного противоиона магния относительно полианионного скелета полинуклеотида, такого как 5-50 мол.%, 5-40 мол.%, 10-40 мол.% или 20-40 мол.% катионного противоиона магния.

В некоторых случаях композиции полинуклеотидная соль включает в себя 10 до 70 мол.% тривалентного катионного противоиона относительно полианионного скелета полинуклеотида, такого как от 10 до 60 мол.%, от 20 до 60 мол.%, от 20 до 50 мол.% или от 30 до 50 мол.% тривалентного катионного противоиона. В некоторых вариантах осуществления композиции полинуклеотидная соль включает 0,5% или более по массе поливалентного катионного противоиона (например, магния), такого как 0,6% или более, 0,7% или более, 0,8% или более, 0,9% или более, 1,1% или более, 1,2% или более, 1,3% или более, 1,4% или более, 1,5% или более, 1,6% или более, 1,7% или более, 1,8% или более, 1,9% или более, 2,0% или более, 2,1% или более, 2,2% или более, 2,3% или более, 2,4% или более, 2,5% или более, 2,6% или более, 2,7% или более, 2,8% или более, 2,9% или более, 3,0% или более по массе поливалентного катионного противоиона.

Полинуклеотидная соль представляет собой смешанную соль, которая включает смесь поливалентных и одновалентных катионных противоионов. В некоторых вариантах реализации композиции полинуклеотидная соль имеет соотношение поливалентного катионного противоиона к моновалентному катионному противоиону по меньшей мере 0,05 или более по молярности, например 0,10 или более, 0,15

или более, 0,20 или более, 0,25 или более, 0,30 или более, 0,35 или более, 0,40 или более, 0,45 или более, 0,50 или более, 0,50 или более, 0,55 или более, 0,60 или более, 0,65 или более, 0,70 или более по молярности или даже больше поливалентного катионного противоиона к моновалентному катионному противоиону.

В некоторых случаях полинуклеотидная соль имеет соотношение поливалентного к моновалентному катионному противоиону 1:12 по молярности. В некоторых случаях полинуклеотидная соль имеет соотношение поливалентного к моновалентному катионному противоиону 1:11 по молярности. В некоторых случаях полинуклеотидная соль имеет соотношение поливалентного к моновалентному катионному противоиону 1:10 по молярности. В некоторых случаях полинуклеотидная соль имеет соотношение поливалентного к моновалентному катионному противоиону 1:9 по молярности. В некоторых случаях полинуклеотидная соль имеет соотношение поливалентного к моновалентному катионному противоиону 1:8 по молярности. В некоторых случаях полинуклеотидная соль имеет соотношение поливалентного к моновалентному катионному противоиону 1:7 по молярности. В некоторых случаях полинуклеотидная соль имеет соотношение поливалентного к моновалентному катионному противоиону 1:6 по молярности. В некоторых случаях полинуклеотидная соль имеет соотношение поливалентного к моновалентному катионному противоиону 1:5 по молярности. В некоторых случаях полинуклеотидная соль имеет соотношение поливалентного к моновалентному катионному противоиону 1:4 по молярности. В некоторых случаях полинуклеотидная соль имеет соотношение поливалентного к моновалентному катионному противоиону 2:9 по молярности. В некоторых случаях полинуклеотидная соль имеет соотношение поливалентного к моновалентному катионному противоиону 3:7 по молярности. В некоторых случаях полинуклеотидная соль имеет соотношение поливалентного к моновалентному катионному противоиону 4:5 по молярности. В некоторых случаях полинуклеотидная соль имеет соотношение поливалентного к моновалентному катионному противоиону 5:3 по молярности.

В некоторых случаях в составе смешанной соли полинуклеотида поливалентный катионный противоион представляет собой магний, а одновалентный катионный противоион - натрий. В некоторых случаях в составе смешанной соли полинуклеотида поливалентный катионный противоион представляет собой магний и одновалентный катионный противоион - аммоний. В некоторых случаях в составе смешанной соли полинуклеотида поливалентный катионный противоион представляет собой магний, а одновалентный катионный противоион представляет собой триэтиламмоний. В некоторых случаях в составе смешанной соли полинуклеотида поливалентный катионный противоион представляет собой алюминий. В некоторых случаях в составе смешанной соли полинуклеотида поливалентный катионный противоион представляет собой цинк. В некоторых случаях в составе смешанной соли полинуклеотида поливалентный катионный противоион представляет собой кальций. В некоторых случаях в составе смешанной соли полинуклеотида одновалентным катионным противоионом является натрий. В некоторых случаях в составе смешанной соли полинуклеотида одновалентным катионным противоионом является аммоний. В некоторых случаях в составе смешанной соли полинуклеотида одновалентным катионным противоионом является триэтиламмоний. В некоторых вариантах реализации полинуклеотидная соль включает один поливалентный катионный противоион. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотидная соль дополнительно включает в себя 2 поливалентных катионных противоиона. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотидная соль дополнительно включает в себя 3 поливалентных катионных противоиона. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотидная соль дополнительно включает в себя 4 поливалентных катионных противоиона. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотидная соль дополнительно включает в себя 5 поливалентных катионных противоионов. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотидная соль дополнительно включает в себя 6 поливалентных катионных противоионов. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотидная соль дополнительно включает в себя 7 поливалентных катионных противоионов. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотидная соль дополнительно включает в себя 8 поливалентных катионных противоионов. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотидная соль дополнительно включает в себя 9 поливалентных катионных противоионов. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотидная соль дополнительно включает в себя 10 поливалентных катионных противоионов.

В дополнение к целевому полинуклеотиду в процессе синтеза полинуклеотидов может быть получено множество продуктов синтеза нецелевого полинуклеотида. Побочные продукты, которые могут присутствовать в препаратах полинуклеотида, включают, но не ограничиваются ими, продукты делеции (например, продукты, не имеющие одного или более нуклеозидных остатков), продукты, которые содержат одну или более защитную группу, терминированные продукты (например, продукты, которые содержат экзипированную полинуклеотидную цепь), продукты, которые не имеют одного или более азотистых оснований, продукты, которые содержат частично окисленные фосфорамидитные связи, и продукты, которые содержат частично сульфированные связи.

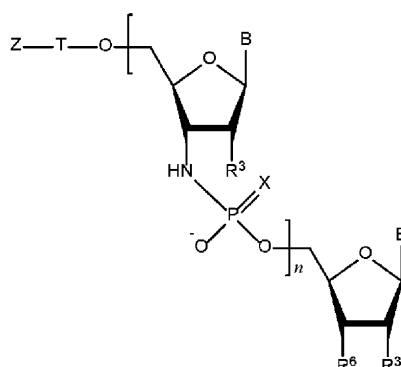
Рассматриваемые способы обеспечивают получение композиций с улучшенной чистотой целевого полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 20% или более по массе целевого полинуклеотида, например, около 25% или более, около 30% или более, около 35% или более,

около 40% или более, около 45% или более, около 50% или более, около 60% или более, около 70% или более, около 80% или более, около 90% или более или даже около 95% или более по массе целевого полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 50% или более по массе целевого полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 55% или более по массе целевого полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 60% или более по массе целевого полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 65% или более по массе целевого полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 70% или более по массе целевого полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 75% или более по массе целевого полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 80% или более по массе целевого полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 85% или более по массе целевого полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 90% или более по массе целевого полинуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 95% или более по массе целевого полинуклеотида.

Рассматриваемые способы обеспечивают получение композиций, содержащих пониженное количество побочных продуктов и агентов. Под уменьшенным количеством подразумевается, что количество по массе нецелевых продуктов синтеза и агентов в композиции уменьшается по сравнению с методом контроля. В некоторых вариантах осуществления предлагаемые композиции включают продукты и агенты, не содержащие целевого синтеза, в количестве 50% или менее от общего количества нецелевых полинуклеотидов в композиции, таких как 40% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее или даже 5% или менее нецелевых продуктов синтеза и агентов.

Многие классы и типы полинуклеотидов представляют интерес для получения с применением рассматриваемых способов (например, описанных в данном документе). Полинуклеотиды, подходящие для получения согласно рассматриваемым способам, включают, но не ограничиваются ими, антисмысловые полинуклеотиды, РНК полинуклеотиды, миРНК полинуклеотиды, полинуклеотиды РНК-интерференции, ДНК аптамеры, микроРНК и т.п.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид может быть описан формулой (I)



формулой (I),

в которой каждый В независимо представляет собой пурин, защищенный пурин, пиримидин или защищенный пиримидин или их аналог;

каждый Х независимо представляет собой кислород или серу;

каждый R^3 представляет собой водород, фтор, гидроксил, алкокси, замещенный алкокси или защищенный гидроксил;

R^6 представляет собой amino, гидроксил, защищенный amino, защищенный гидроксил, -O-T-Z или -NH-T-Z;

каждый Т независимо представляет собой необязательный линкер;

каждый Z независимо представляет собой H, липид, подложку, носитель, олигонуклеотид, полимер, полипептид, обнаруживаемую метку или маркер;

n представляет собой целое число от 1 до 1000.

Следует понимать, что некоторые олигонуклеотиды, содержащие субъединицу, описанную формулой (I), также могут существовать в солевой форме. Следовательно, межнуклеозидная связь формулы (I) может быть в солевой форме, которая содержит любой подходящий противоион. Такие формы включены в объем данного описания. Понятно, что возможны другие таутомерные устройства устройств межнуклеозидных связей полинуклеотида, описанные в формуле (I). Такие формы включены в объем данного описания.

В некоторых вариантах реализации формулы (I) каждый R^3 представляет собой водород. В некоторых вариантах реализации формулы (I) каждый R^3 представляет собой фтор. В некоторых вариантах реализации формулы (I) каждый R^3 представляет собой гидроксил. В некоторых вариантах реализации формулы (I) R^6 представляет собой amino. В некоторых вариантах реализации формулы (I) R^6 представляет собой гидроксил. В некоторых вариантах реализации формулы (I) Z представляет собой H. В некоторых

вариантах реализации формулы (I) Z представляет собой липид (например, как описано в данном документе). В некоторых случаях липид представляет собой жирную кислоту (например, как описано в данном документе). В некоторых вариантах реализации формулы (I) Z представляет собой носитель. В некоторых вариантах реализации формулы (I) Z представляет собой олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации формулы (I) Z представляет собой полимер. В некоторых случаях полимер представляет собой ПЭГ. В некоторых вариантах реализации формулы (I) Z представляет собой полипептид. В некоторых вариантах реализации формулы (I) Z представляет собой обнаруживаемую метку. В некоторых вариантах реализации формулы (I) Z представляет собой маркер. В некоторых вариантах реализации формулы (I) T отсутствует. В некоторых вариантах реализации каждый В независимо выбран из А, С, G, Т и U.

В некоторых вариантах реализации формулы (I) n представляет собой целое число от 7 до 500, например от 7 до 100, от 7 до 75, от 7 до 50, от 7 до 40, от 7 до 30, от 7 до 20, от 7 до 15, от 10 до 15 или от 13 до 15. В некоторых вариантах реализации n представляет собой целое число от 7 до 50, например от 10 до 50, от 10 до 40, от 10 до 30, от 10 до 25, от 10 до 20, от 12 до 18 или от 12 до 16. В некоторых вариантах реализации n равен 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25.

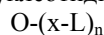
Полинуклеотиды, комплементарные РНК компоненту теломеразы.

Аспекты данного описания включают соединения и композиции, содержащие полинуклеотиды, комплементарные РНК компоненту человеческой теломеразы, а также способы их получения. Указанные соединения могут ингибировать активность теломеразы в клетках с высокой эффективностью, и имеют характеристики клеточного поглощения.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид содержит последовательность из 7 или более нуклеозидных субъединиц, комплементарную РНК компоненту человеческой теломеразы, например, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 11 или более, 12 или более, 13 или более, 14 или более, 15 или более, 20 или более, 30 или более, 50 или более нуклеозидных субъединиц, комплементарных РНК компоненту человеческой теломеразы.

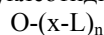
В некоторых вариантах реализации полинуклеотид содержит от 3 до 50 последовательных нуклеозидных субъединиц, комплементарных РНК компоненту человеческой теломеразы, например, от 5 до 40, от 7 до 40, 10 до 40, от 10 до 30, от 10 до 25, от 10 до 20 или от 12 до 15 нуклеозидных субъединиц. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид содержит последовательность из 7 или более нуклеозидных субъединиц, комплементарную РНК компоненту человеческой теломеразы, например 10 или более, 11 или более, 12 или более, 13 или более, 14 или более, 15 или более, 20 или более, 30 или более, 50 или более нуклеозидных субъединиц, комплементарных РНК компоненту человеческой теломеразы.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотидное соединение может быть описано формулой



где O представляет собой полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеозидных субъединиц, комплементарную РНК компоненту человеческой теломеразы, x представляет собой необязательную линкерную группу, L представляет собой липидный фрагмент, и n представляет собой целое число от 1 до 5. В некоторых случаях n равно 5. В некоторых случаях n равно 4. В некоторых вариантах реализации n равно 3. В некоторых случаях n равно 2. В некоторых случаях n равно 1. Следовательно, для конструирования соединений необходимо выбрать два элемента, O и L, а также определить структурную связь(-и) между указанными элементами, которые могут включать необязательную линкерную группу x.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотидное соединение может быть описано формулой



где O представляет собой полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеозидных субъединиц, комплементарную РНК компоненту человеческой теломеразы, x представляет собой необязательную линкерную группу, L представляет собой липидный фрагмент, и n равен 1, например, полинуклеотид Формулы (I), или его соль, при этом в формуле (I) Z представляет собой липидный фрагмент, T представляет собой необязательный линкер (например, как описано в данном документе), и группы В соответствуют последовательности нуклеозидных субъединиц, комплементарной РНК компоненту человеческой теломеразы.

Полинуклеотидный компонент O может рассматриваться как "эффекторный" компонент соединения в том отношении, что он представляет собой компонент, который влияет на ингибирование фермента теломеразы посредством связывания с РНК компонентом теломеразы. Таким образом, последовательность O выбрана так, что она содержит область, комплементарную последовательности РНК теломеразы, представленной в SEQ ID NO: 1. На область, которая комплементарна РНК компоненту теломеразы, теоретически может быть нацелена любая часть РНК теломеразы, но определенные области РНК теломеразы предпочтительно нацелены на ингибирующие полинуклеотиды. Другая предпочтительная область-мишень представляет собой область, охватывающую нуклеотиды 30-67 SEQ ID NO: 1, которая содержит "матричную область", область из 11 нуклеотидов последовательности 5'-CUAACCCUAAC-3' (SEQ ID NO: 21), которая охватывает нуклеотиды 46-56 SEQ ID NO: 1. Матричная область действует для определения последовательности теломерных повторов, которые теломераза присоединяет к концам хромосомы, и является необходимой для активности фермента теломеразы (см. Chen et al., Cell 100:503-514, 2000;

Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 98(14):7982-7987, 2001). Таким образом, представляют интерес соединения, которые содержат полинуклеотидную часть, включая последовательность, комплементарную всей или части матричной области. Другая область-мишень представляет собой область, охватывающую нуклеотиды 137-179 в hTR (см. Pruzan et al., Nucl. Acids Research, 30:559-588, 2002). В пределах этой области, последовательность охватывающую 141-153 является предпочитаемой целью. В публикации РСТ WO 98/28442 описано применение полинуклеотидов, имеющих по меньшей мере 7 нуклеотидов в длину, для ингибирования теломеразы, где указанные полинуклеотиды сконструированы так, чтобы быть комплементарными доступным областям последовательности hTR за пределами матричной области, включая нуклеотиды 137-196, 290-319 и 350-380 в hTR.

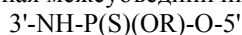
Область О, на которую нацелена последовательность hTR, точно комплементарна соответствующей последовательности hTR. Несмотря на то что в некоторых случаях допустимы некоторые несоответствия, они предположительно снижают специфичность и активность полученного полинуклеотидного конъюгата. В некоторых вариантах реализации последовательность оснований полинуклеотида О выбрана так, чтобы она содержала последовательность из по меньшей мере 5 нуклеотидов, точно комплементарную РНК теломеразы, и усиленное ингибирование теломеразы может быть достигнуто при использовании большей длины комплементарной последовательности, например, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7 по меньшей мере 8, по меньшей мере 10, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13 или по меньшей мере 15 нуклеотидов точно комплементарны РНК теломеразы. В других вариантах реализации последовательность полинуклеотида содержит последовательность, состоящую из по меньшей мере от 7 до 20, по меньшей мере от 8 до 20, по меньшей мере от 10 до 20 или по меньшей мере 10 до 15 нуклеотидов, точно комплементарных последовательности РНК теломеразы. Оптимальная активность ингибирования теломеразы может быть достигнута в том случае, если полная длина полинуклеотида О выбрана так, что она комплементарна РНК теломеразы. Однако необязательно, чтобы полная длина полинуклеотидного компонента была точно комплементарна целевой последовательности, и полинуклеотидная последовательность может содержать области, которые некомплементарны целевой последовательности. Такие области могут быть добавлены, например, для обеспечения других свойств соединения, например, последовательности, облегчающие очистку. Если полинуклеотидный компонент О содержит области, которые некомплементарны целевой последовательности, такие области могут быть расположены на одном или обоих концах 5' или 3'. В случаях, если указанная область точной комплементарности нацелена на матричную область, эффективное ингибирование теломеразы может быть достигнуто посредством короткой области (5-8 нуклеотидов) точной комплементарности, с которой теломеразоподобная (с высоким содержанием G) последовательность связана на 5'-конце.

Иллюстративные последовательности, которые комплементарны РНК человеческой теломеразы и которые могут быть включены как часть полинуклеотидного компонента О, или которые могут быть использованы в качестве целого полинуклеотидного компонента О, включают следующие последовательности, комплементарные hTR (области полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 публикации США 2012329858):

GGGUUGCGGA GGGUGGGCCU GGGAGGGGU G GUGGCCAUUU UUUGUCUAAAC
 CCUAACUGAG AAGGGCGUAG GCGCCGUGCU
 UUUGUCUCCCC GCGCGCUGUU UUUCUCGCUG ACUUUCAGCG
 GGCGGAAAAG CCUCGGCCUG CCGCCUCCA CCGUUAUUC
 UAGAGCAAAC AAAAAAUGUC AGCUGCUGGC CCGUUCGCCC
 CUCCCGGGGA CCUGCGGCGG GUCGCCUGCC CAGCCCCCGA ACCCCGCCUG
 GAGGCCGCGG UCGGCCCGGG GCUUCUCCGG AGGCACCCAC UGCCACCGCG
 AAGAGUUGGG CUCUGUCAGC CGCGGGUCUC UCGGGGGCGA
 GGGC GAGGUU CAGGCCUUUC AGGCCGCAGG AAGAGGAACG GAGCGAGUCC
 CCGCGCGCGG CGCGAUUCCC UGAGCUGUGG
 GACGUGCACC CAGGACUCGG CUCACACAUG C (SEQ ID NO: 1)
 GCTCTAGAATGAACGGTGGAAGGCGGCAGG 137-166 (SEQ ID NO: 2)
 GTGGAAGGCGGCAGG 137-151 (SEQ ID NO: 6)
 GGAAGGCGGCAGG 137-149 (SEQ ID NO: 7)
 GTGGAAGGCGGCA 139-151 (SEQ ID NO: 8)
 TGGAAGGCGG 141-151 (SEQ ID NO: 9)
 CGGTGGAAGGCGG 141-153 (SEQ ID NO: 10)
 ACGGTGGAAGGCG 142-154 (SEQ ID NO: 11)
 AACGGTGGAAGGCGGC 143-155 (SEQ ID NO: 12)
 ATGAACGGTGGAAGGCGG 144-158 (SEQ ID NO: 13)
 ATTTTTTGTGCTCTAG 160-179 (SEQ ID NO: 14)
 TAGGGTTAGACAA 42-54 (SEQ ID NO: 3)
 GTTAGGGTTAG 46-56 (SEQ ID NO: 4)
 GTTAGGGTTAGAC 44-56 (SEQ ID NO: 15)
 GTTAGGGTTAGACAA 42-56 (SEQ ID NO: 16)
 GGGTTAGAC 44-52 (SEQ ID NO: 19)
 CAGTTAGGG 50-58 (SEQ ID NO: 20)
 CCCTTCTCAGTT 54-65 (SEQ ID NO: 17)
 CGCCCTTCTCAG 56-67 (SEQ ID NO: 18)

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 4); TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) и CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 5).

Выбор типа межнуклеозидных связей, используемых для синтеза компонента О, может быть сделан на основании любых доступных химических структур полинуклеотидов, включая, но не ограничиваясь ими, фосфодифирные, фосфотриэфирные, метилфосфонатные, P3'→N5' фосфорамидатные, N3'→P5' фосфорамидатные, N3'→P5' тиофосфорамидатные и тиофосфатные связи. В некоторых вариантах реализации полинуклеотидный компонент О имеет по меньшей мере одну N3'→P5' фосфорамидатную связь. В некоторых вариантах реализации все нуклеозидные субъединицы, комплементарные РНК компоненту человеческой теломеразы, связаны N3'→P5' фосфорамидатными межсубъединичными связями. В некоторых случаях N3'→P5' тиофосфорамидатная межсубъединичная связь имеет следующую структуру:



где R представляет собой водород или соль. Следует понимать, что для любых полинуклеотидных компонентов О, описанных в данном документе, которые содержат указанную межсубъединичную связь, такие полинуклеотидные компоненты О также могут включать любые подходящие солевые формы указанной связи. Таким образом, указанная межсубъединичная связь может быть в солевой форме, которая содержит любой подходящий противоион.

В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере, две нуклеозидные субъединицы соединены межсубъединичной N3'→P5' тиофосфорамидатной связью, а другие межсубъединичные связи, каждая из которых независима, выбраны из N3'→P5' оксофосфорамидатных и N3'→P5' тиофосфорамидатных межсубъединительных связей. В некоторых вариантах реализации нуклеозидные субъединицы соединены между субъединичными связями, каждый из которых независимо выбрана из N3'→P5' оксофосфорамидатных и N3'→P5' тиофосфорамидатных межсубъединичных связей. В некоторых вариантах реализации нуклеозидные субъединицы соединены межсубъединичными связями, каждая из которых независимо выбрана из N3'→P5' оксофосфорамидатных и N3'→P5' тиофосфорамидатных межсубъединичных связей; при условии, что по меньшей мере две из нуклеозидных субъединиц соединены межсубъединичной

N3'→P5' тиофосфорамидатной связью. В некоторых вариантах реализации нуклеозидные субъединицы соединены межсубъединичной N3'→P5' тиофосфорамидатной связью.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный компонент О имеет последовательность TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), а нуклеозидные субъединицы соединены межсубъединичными связями, содержащими по меньшей мере две связи N3'→P5' тиофосфорамидата. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный компонент О имеет последовательность TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), а нуклеозидные субъединицы соединены межсубъединичными связями, содержащими по меньшей мере три соединения N3'→P5' тиофосфорамидатов. В некоторых вариантах реализации полинуклеотидный компонент О имеет последовательность TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), и нуклеозидные субъединицы соединены межсубъединичными связями, содержащими по меньшей мере четыре соединения N3'→P5' тиофосфорамидатов. В некоторых вариантах реализации полинуклеотидный компонент О имеет последовательность TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), и нуклеозидные субъединицы соединены межсубъединичными связями, содержащими по меньшей мере пятью связями N3'→P5' тиофосфорамидатов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный компонент О имеет последовательность TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), а нуклеозидные субъединицы соединены межсубъединичными связями, содержащими по меньшей мере 6 связей N3'→P5' тиофосфорамидата. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный компонент О имеет последовательность TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), а нуклеозидные субъединицы соединены межсубъединичными связями, содержащими по меньшей мере семь связей N3'→P5' тиофосфорамидата. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный компонент О имеет последовательность TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), а нуклеозидные субъединицы соединены межсубъединичными связями, содержащими по меньшей мере восемь связей N3'→P5' тиофосфорамидата. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный компонент О имеет последовательность TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), а нуклеозидные субъединицы соединены межсубъединичными связями, содержащими по меньшей мере 9 связей N3'→P5' тиофосфорамидата. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный компонент О имеет последовательность TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), а нуклеозидные субъединицы соединены межсубъединичными связями, содержащими по меньшей мере десять связей N3'→P5' тиофосфорамидата. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный компонент О имеет последовательность TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), а нуклеозидные субъединицы соединены межсубъединичными связями, содержащими по меньшей мере 11 связей N3'→P5' тиофосфорамидата. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидный компонент О имеет последовательность TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), а нуклеозидные субъединицы соединены межсубъединичными связями, каждая из которых независимо выбрана из связей N3'→P5' оксофосфорамидата и N3'→P5' тиофосфорамидата между субъединицами. В некоторых вариантах реализации полинуклеотидный компонент О имеет последовательность TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), и нуклеозидные субъединицы соединены межсубъединичными связями, каждая из которых независимо выбран из N3'→P5' оксофосфорамидата и N3'→P5' тиофосфорамидатных межсубъединичных связей; при условии, что по меньшей мере две из нуклеозидных субъединиц соединены соединением N3'→P5' тиофосфорамидата между субъединицами. В некоторых вариантах реализации полинуклеотидный компонент О имеет последовательность TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), и нуклеозидные субъединицы соединены межсубъединицей связью N3'→P5' тиофосфорамидата.

Во всех вариантах реализации, указанных выше и ниже, соединения между субъединицами N3'→P5' тиофосфорамидатов, в частности, представляют собой -NH-P(=O)(SH)-O- или его таутомер или его соль; и N3'→P5' оксофосфорамидатной межсубъединичной связи, в частности, представляют собой -NH-P(=O)(OH)-O- или его таутомер или его соль. Более конкретно, во всех вариантах реализации, указанных выше и ниже, соединения между субъединицами N3'→P5' тиофосфорамидатов, в частности, представляют собой -NH-P(=O)(SH)-O- или его таутомер или его соль; и N3'→P5' оксофосфорамидатной межсубъединичной связи, в частности, представляют собой -NH-P(=O)(OH)-O- или его таутомер или его натриевую соль.

В одном из вариантов реализации изобретения относится к любой из описанных здесь специфических структур, в которых одна или несколько, в частности межсубъединичная связь N3'→P5' тиофосфорамидата заменена на N3'→P5' оксофосфорамидатный межсубъединичную связь. В одном из вариантов реализации изобретения относится к любой из описанных здесь специфических структур, в которых одна или несколько, в частности межсубъединичная связь N3'→P5' тиофосфорамидата заменена на N3'→P5' оксофосфорамидатный межсубъединичную связь.

В некоторых случаях целевые соединения являются более эффективными при ингибировании теломеразы в клетках, чем соответствующие полинуклеотиды, которые не конъюгированы с липидными компонентами. Функция липидного компонента L предположительно заключается в усилении клеточного поглощения соединения, в частности, в облегчении прохождения через клеточную мембрану. Несмотря на то что механизм, по которому это происходит, до сих пор не до конца изучен, одна из возможно-

стей заключается в том, что липидный компонент может облегчать связывание соединения с клеточной мембраной в виде одной молекулы или в агрегированной (мицеллярной) форме, с последующей интернализацией. Однако понимание точного механизма не является необходимым для применения данного соединения.

Липидный компонент может представлять собой любой липид или липидное производное, которое обеспечивает усиленное клеточное поглощение по сравнению с немодифицированным полинуклеотидом. Предпочтительные липиды представляют собой, но не ограничены ими, углеводороды, жиры (например, глицериды, жирные кислоты и производные жирных кислот, такие как амиды жирных кислот) и стеринны. Если липидный компонент представляет собой углеводород, то компонент L может быть замещенным или незамещенным циклическим углеводородом, или алифатическим неразветвленным или разветвленным углеводородом, который может быть насыщенным или ненасыщенным. Примеры представляют собой линейные неразветвленные углеводороды, которые являются полностью насыщенными или полиненасыщенными. Длина углеводородной цепи может варьироваться от C2 до C30, но оптимальное ингибирование теломеразы может быть достигнуто с применением углеродных цепей C8-C22. Примеры насыщенных углеводородов (алканов) перечислены ниже.

Систематическое название/углеродная цепь

Тетрадекан $C_{14}H_{30}$

Пентадекан $C_{15}H_{32}$

Гексадекан $C_{16}H_{34}$

Гептадекан $C_{17}H_{36}$

Октадекан $C_{18}H_{38}$

Нонадекан $C_{19}H_{40}$

Эйкозан $C_{20}H_{42}$

Также могут быть выбраны моно- и полиненасыщенные формы (алкены и полиены, такие как алкадиены и алкатриены) углеводородов, при этом предпочтительны соединения, имеющие от одной до трех двойных связей, хотя могут быть использованы соединения, имеющие больше двойных связей. Также могут быть использованы алкины (содержащие одну или более тройных связей) и алкенины (тройная связь(и) и двойная связь(и)).

В соединениях согласно данному изобретению могут быть использованы замещенные формы углеводородов, при этом предпочтительны группы заместителей, которые являются инертными *in vivo* и *in vitro*. В некоторых случаях заместителем является фтор. Иллюстративные обобщенные структуры полифторированных углеводородов включают $CF_3(CF_2)_n-(CH_2)_m$ -, где m равен по меньшей мере 1, в некоторых случаях по меньшей мере 2, и n равно 1-30, например, фтортридекан: $CF_3(CF_2)_9(CH_2)_3$; и $CH_3(CH_2)_a(CF_2)_b(CH_2)_c$ -, в которых a, b и c равняются независимо друг от друга 1-30.

Другие подходящие липидные компоненты включают, но не ограничены ими, простые жирные кислоты и производные жирных кислот, триглицериды и более сложные липиды, такие как стеринны, например, холестерин. Жирные кислоты и их производные могут быть полностью насыщенными или моно-, или полиненасыщенными. Длина углеродной цепи может варьироваться от C2 до C30, но оптимальное ингибирование теломеразы может быть достигнуто с применением углеродных цепей C8-C22. Примеры насыщенных жирных кислот перечислены ниже:

Систематическое название/Тривиальное название/Углеродная цепь

Тетрадекановая миристиновая 14:0

Гексадекановая пальмитиновая 16:0

Октадекановая стеариновая 18:0

Эйкозановая арахидиновая 20:0

Также могут быть использованы моно- и полиненасыщенные формы жирных кислот, при этом предпочтительны соединения, имеющие от одной до трех двойных связей, хотя могут быть использованы соединения, имеющие больше двойных связей. Примеры распространенных моно- и полиненасыщенных жирных кислот, которые могут быть использованы, включают:

Систематическое название/Тривиальное название/Углеродная цепь

Цис-9-гексадекановая пальмитолеиновая 16:1 (n-7)

Цис-6-октадекановая петроселиновая 18:1 (n-12)

Цис-9-октадекановая олеиновая 18:1 (n-9)

9,12-октадекадиеновая линолевая 18:2 (n-6)

6,9,12-октадекатриеновая гамма-линолевая 18:3 (n-6)

9,12,15-октадекатриеновая альфа-линолевая 18:3 (n-3)

5,8,11,14-эйкозатетраеновая арахидиновая 20:4 (n-6)

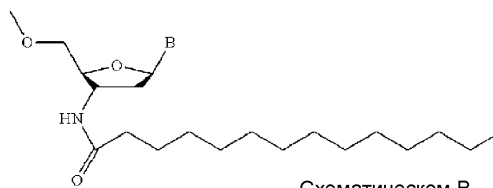
В соединениях также могут быть использованы жирные кислоты с одной или более тройными связями в углеродной цепи, а также разветвленные жирные кислоты. В соединениях могут быть использованы замещенные формы жирных кислот. Как и в случае углеводородных групп, группы заместителей являются инертными *in vivo* и *in vitro*, таких как фтор. Иллюстративные обобщенные структуры полифторированных производных жирных кислот, подходящих для применения согласно данному изобрете-

нию, представляют собой $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, где m равняется 1, предпочтительно 2, и n равно от 1 до 30, и $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a(\text{CF}_2)_b(\text{CH}_2)_c\text{CO}-$, в которых a , b и c равняются независимо друг от друга 1-30.

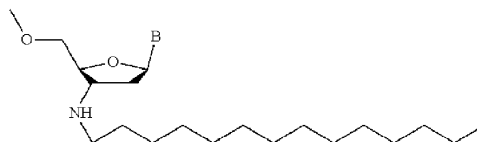
В некоторых случаях от одного до пяти компонентов L (n равно 1, 2, 3, 4 или 5) ковалентно связаны с компонентом O , необязательно через линкер. В некоторых случаях используется одна или две L -составляющие ($n = 1$ или 2). Если с компонентом O связано более одного компонента L , то каждый компонент L выбран независимо.

Следует понимать, что соединения согласно данному изобретению, соединения, описанные как имеющие определенную жирную кислоту (с таким же количеством атомов углерода, как в указанном углеводороде), являются близкородственными и отличаются по структуре только природой связи, соединяющей фрагмент L с полинуклеотидом, которая, в свою очередь, является результатом процедуры синтеза, использованной для получения соединения. Например, и как описано более подробно ниже, когда соединения синтезируются с L -группой, конъюгированной с 3'-аминоконцом полинуклеотида (имеющего межнуклеозидные связи фосфорамидата или тиофосфорамидата), использование альдегидной формы жирной кислоты (липоальдегид), поскольку исходный материал приводит к образованию аминной связи между липидной цепью и полинуклеотидом, так что липидная группа проявляется в виде углеводорода. Напротив, применение карбоновой кислоты, ангидрида кислоты или хлорангидридной формы той же жирной кислоты приводит к образованию амидной связи, так что липидная группа выступает как производное жирной кислоты, в частности, в данном случае как жирный амид (как отмечено в представленном выше разделе "Определения", для простоты термин "жирная кислота" при описании сопряженной группы L использован в данном контексте в широком смысле и включает производные жирных кислот, в том числе жирные амиды). Это показано на следующих схематических иллюстрациях, которые демонстрируют 3'-аминоконец фосфорамидатного полинуклеотида, соединенный с C14 липидным компонентом. На схематическом изображении А, L представляет собой тетрадекановую кислоту (миристиновую кислоту), в которой связь между группами L и O представляет собой амид. На схематическом изображении В L представляет собой тетрадекан, и связь между группами L и O представляет собой амин.

Схематическом А



Схематическом В

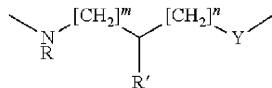


Связь между компонентами O и L может быть прямой связью или может быть реализована через необязательный линкерный фрагмент, например, x или необязательный линкер T Формулы (I). Линкерная группа может служить для облегчения химического синтеза соединений. Независимо от того, использована ли линкерная группа для опосредования сопряжения компонентов O и L или нет, в олигонуклеотидном компоненте O существует несколько сайтов, с которыми компонент(-ы) L могут быть легко сопряжены. Подходящие точки связывания включают 5' и 3' концы, одно или более сахарных колец, межнуклеозидный скелет и азотистые основания полинуклеотида. В некоторых случаях фрагмент L присоединен к 3' или 5' концу полинуклеотида.

Если L -компонент должен быть присоединен к 3'-концу, связывание может быть непосредственно с 3'-заместителем, который в случае предпочтительного полифосфата фосфорамидата и тиофосфорамидата представляет собой 3'-аминогруппу, а в других случаях такие как обычные фосфодиэфирные полинуклеотиды, представляет собой 3-гидроксигруппу. Альтернативно фрагмент L может быть связан через 3'-связанную фосфатную группу, в которой гексадекановый углеводород связан с 3'-фосфатом тиофосфорамидатного олигонуклеотида посредством O -алкильного линкера. Если фрагмент L должен быть связан с 5' концом, он может быть присоединен через 5'-связанную фосфатную группу. Присоединение к основанию фрагмента O может быть осуществлено через любой подходящий атом, например, к $N2$ аминок группе гуанозина. Если $n > 1$, так что к компоненту O должно быть присоединено множество липидных компонентов, то отдельно выбранные компоненты L могут быть присоединены в любом подходящем месте(ах). Например, одна группа L может быть присоединена к каждому из концов, различные группы L могут быть присоединены к указанным основаниям, или две или более групп L могут быть присоединены к одному концу.

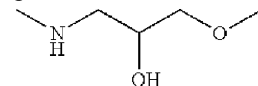
Необязательный линкерный компонент x может быть использован для связывания компонентов O и

Л соединений. Следует понимать, что необязательный линкер (например, х или L в формуле (I)) может быть присоединен к полинуклеотиду (например, O) через концевую фосфатную группу, например, 3'-связанную или 5'-связанную фосфатную группу. При необходимости использования линкера его вводят в процедуру синтеза так, как описано в данном документе. Примеры подходящих линкерных групп включают линкеры типа аминоглицерина и O-алкилглицерина, которые, соответственно, могут быть изображены общими структурами:

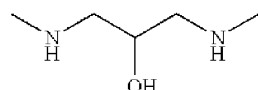


где R' является H, OH, NH₂ или SH; Y равно O, S или NR; R равняется H, алкил или замещенный алкил; и n и m независимо представляют собой целые числа от 1 до 18.

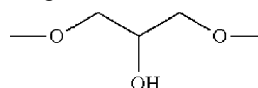
Примеры подходящих линкеров представляют собой аминоглицериновый линкер, в котором R' является OH, Y является O, и каждый m и n равен 1:



1: бис-аминоглицериновый линкер, в котором R' является OH, Y является NH, и каждый m и n равен

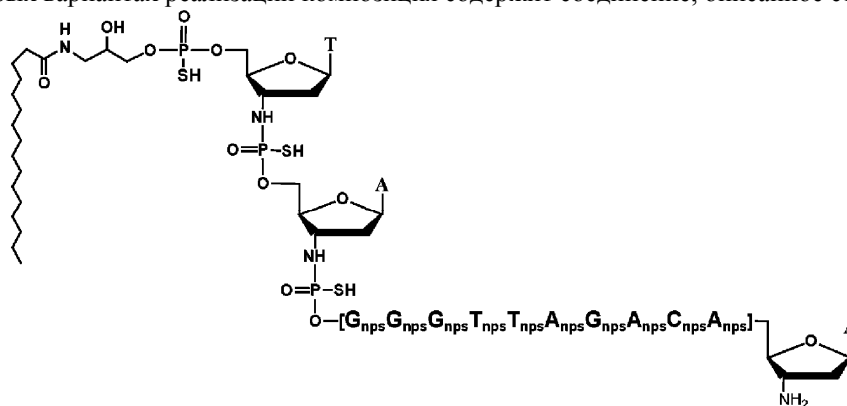


и О-алкилглицериновый линкер, в котором R является H:



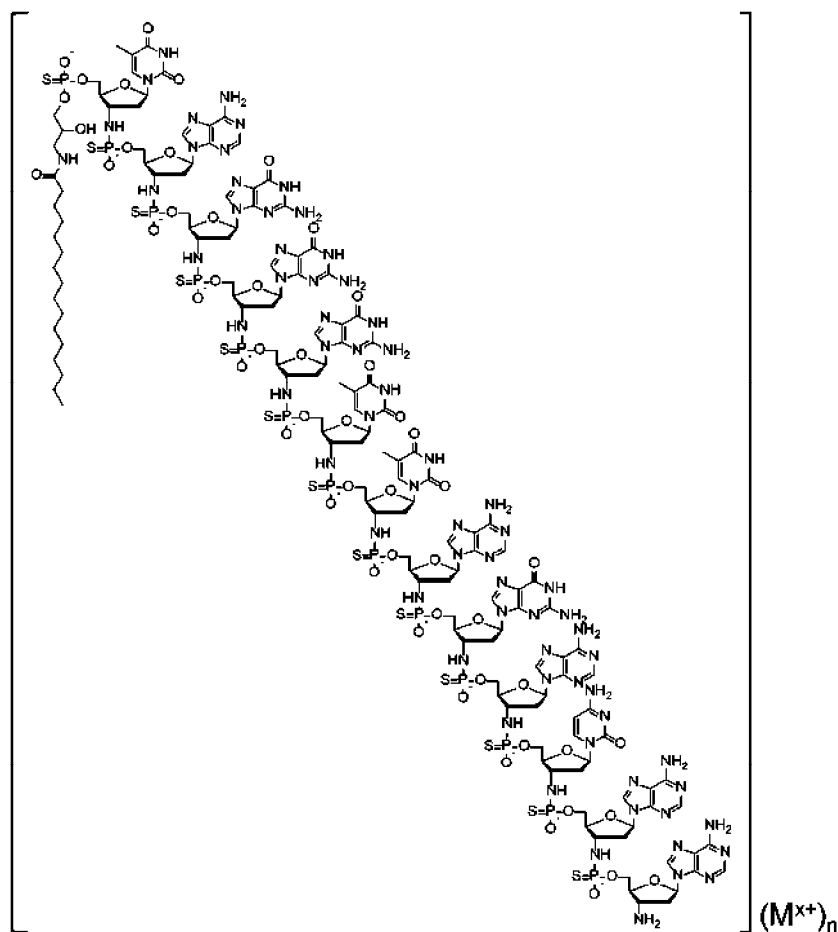
Иллюстративные модифицированные липидом олигонуклеотиды, которые могут быть получены в соответствии с рассматриваемыми способами, включают соединения, описанные на фиг. 1 (например, фиг. 1A-1DD) в Application US20120329858 to Gryaznov et al. "Modified oligonucleotides for telomerase inhibition", чье описание включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит соединение, описанное структурой



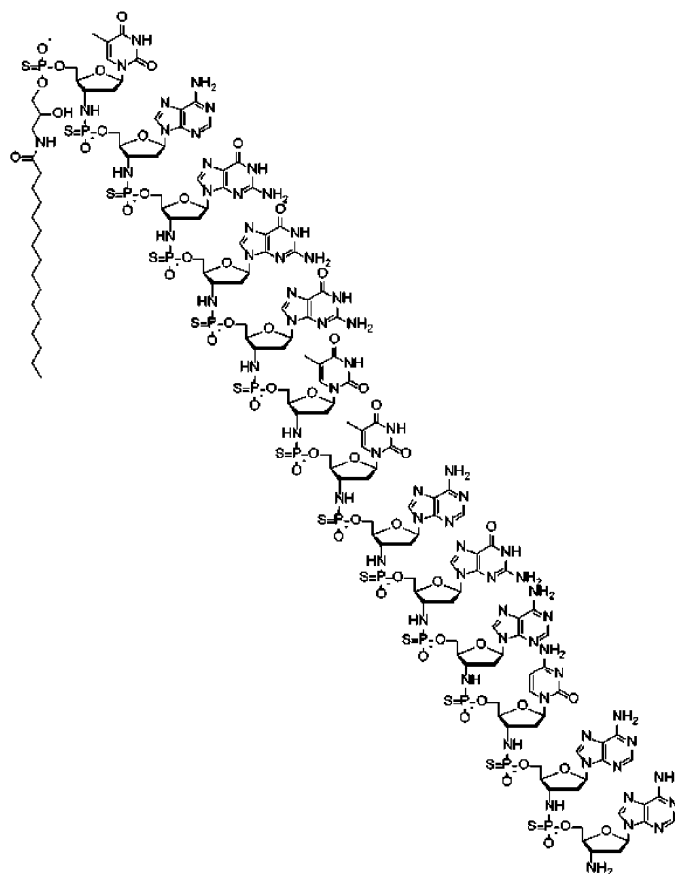
где "nps" представляет собой тиофосфорамидатную связь (например, $-\text{NH}-\text{P}(=\text{O})(\text{SH})-\text{O}-$, или ее таутомер, или ее соль), соединяющую 3'-атом углерода одного нуклеозида с 5'-атомом углерода соседнего нуклеозида. Следует понимать, что соединение, описанное в вышеуказанной формуле, может существовать в форме соли. Такие формы, при условии возможности их существования, включены в объем данного описания. В некоторых вариантах реализации композиция содержит фармацевтически приемлемую соль соединения. В некоторых случаях композиция содержит натриевую соль соединения. В некоторых вариантах реализации композиция содержит соль двухвалентного катиона и указанного соединения, такую как магниевая соль соединения. В некоторых вариантах реализации композиция содержит соль трехвалентного катиона и указанного соединения, такую как алюминиевая соль соединения.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит соединение, описанное структурой

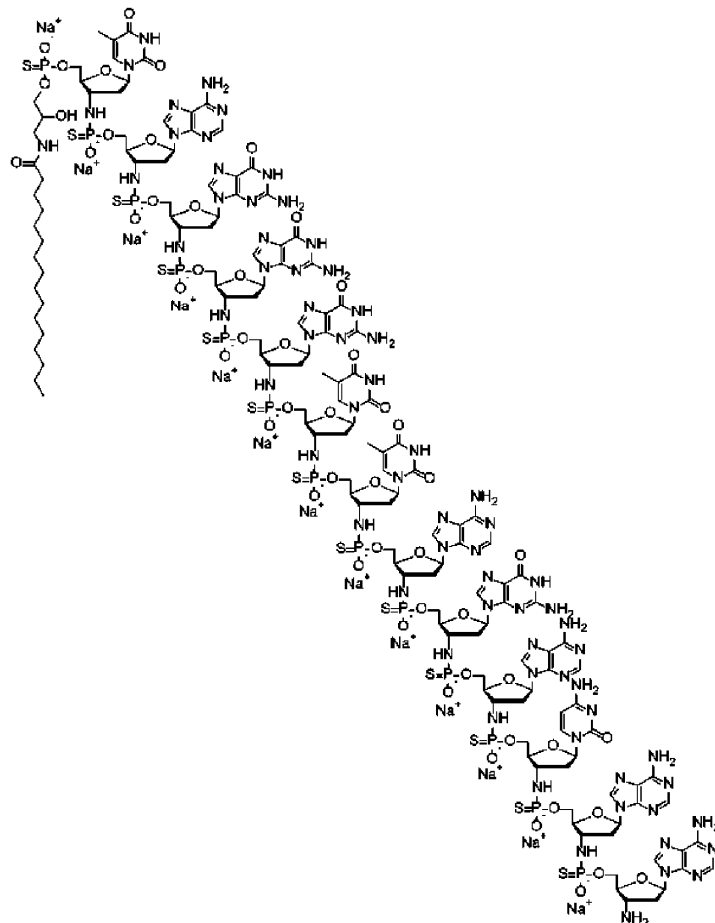


где каждый M^{x+} независимо представляет собой водород или противоион соли, каждый x независимо равен 1, 2 или 3, и n представляет собой целое число от 5 до 13. В некоторых случаях n равен 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 13. В некоторых случаях каждый x независимо равен 1, 2 или 3, а n является целым числом от 5 до 12. В некоторых случаях, n равно 13. В некоторых случаях каждый x равен 1. В некоторых случаях каждый x независимо равен 1 или 2. В некоторых случаях каждый x независимо равен 1 или 3. В некоторых случаях каждый M^{x+} является независимо катионным противоионом. В некоторых случаях каждый M^{x+} является независимо катионным противоионом, каждый x независимо равен 1, 2 или 3, n является целым числом от 5 до 12. В некоторых случаях каждый M^{x+} независимо представляет собой водород или катионный противоион, каждый x независимо представляет собой 1, 2 или 3 и n представляет собой целое число от 5 до 13. В некоторых случаях M^{x+} представляет собой водород. В некоторых вариантах реализации $(M^{x+})_n$ является $(Mg^{2+})(M^+)^{11}$. В некоторых вариантах реализации $(M^{x+})_n$ является $(Mg^{2+})_2(M^+)^9$. В некоторых вариантах реализации $(M^{x+})_3$ является $(Mg^{2+})_3(M^+)^7$. В некоторых вариантах реализации $(M^{x+})_3$ является $(Mg^{2+})_3(M^+)^7$. В некоторых вариантах реализации $(M^{x+})_n$ является $(Mg^{2+})_3(M^+)^5$. В некоторых вариантах реализации $(M^{x+})_n$ является $(Mg^{2+})_3(M^+)^3$. В некоторых вариантах реализации $(M^{x+})_n$ является $(Mg^{2+})_6(M^+)$. В некоторых вариантах реализации $(M^{x+})_n$ является $(Mg^{2+})_3(M^+)^{12}$, где противоион Mg^{2+} может образовывать дополнительную ионную пару для анионной основы другого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации $(M^{x+})_n$ является $(Mg^{2+})_2(M^+)^{11}$, где противоионы Mg^{2+} могут образовывать две дополнительные пары ионов в анионной основной цепи(ях) одного или двух других олигонуклеотидов(ов). В некоторых случаях противоионом M^+ смешанной магниевой соли является натрий. В некоторых случаях противоионом M^+ смешанной магниевой соли является аммоний. В некоторых случаях противоионом M^+ смешанной магниевой соли является триэтиламмоний.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит соединение, описанное следующей структурой, и может содержать любые подходящие катионные противоионы соли



В некоторых вариантах реализации композиция содержит соединение, описанное структурой

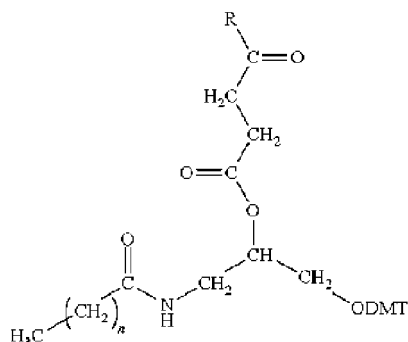


Полинуклеотиды, модифицированные липидами.

Для сопряжения липидного фрагмента L с полинуклеотидом могут быть использованы различные синтетические подходы, в зависимости от природы выбранной связи, включая подходы, описанные в публикациях Mishra et al. (1995), Biochemica et Biophysica Acta, 1264:229-237, Shea et al. (1990), Nucleic Acids Res. 18:3777-3783, и Rump et al. (1998), Bioconj. Chem. 9:341-349. Синтез соединений, в которых липидный фрагмент сопряжен на 5' или 3' конце олигонуклеотида, может быть осуществлен с помощью подходящих функциональных групп на соответствующем конце, в некоторых случаях аминогруппы или гидроксильной группы, которые могут взаимодействовать с карбоновыми кислотами, хлорангидридами кислот, ангидридами и активными сложными эфирами. В качестве функциональных групп также могут быть использованы тиольные группы (см. Kupihar et al. (2001), Bioorganic and Medicinal Chemistry 9:1241-1247). Амино- и тиол-модификаторы различной длины цепи для синтеза полинуклеотидов имеются в продаже. Полинуклеотиды, имеющие N3'→P5' тиофосфорамидатные связи, содержат 3'-аминогруппы (а не 3'-гидроксигруппы, встречающиеся в большинстве обычных химических структур олигонуклеотидов) и, следовательно, указанные олигонуклеотиды обеспечивают уникальную возможность сопряжения липидных групп с 3'-концом олигонуклеотида.

Различные подходы могут быть использованы для присоединения липидных групп к концам полинуклеотидов с химии N3'-P5' тиофосфорамидата (например, связующего пальмитоиламидо-1-O-(4,4'-диметокситриил)-2-O-сукцинилпропандиола), для присоединения к 3' концу сопряженные соединения могут быть синтезированы посредством взаимодействия свободной 3'-аминогруппы полностью защищенного полинуклеотида, связанного с твердой подложкой, с соответствующим ангидридом кислоты с последующим снятием защиты с помощью аммиака и очисткой. В альтернативном варианте для сопряжения липидных групп может быть использовано связывание карбоновых кислот липидов со свободной 3'-аминогруппой олигонуклеотида, связанного с твердой подложкой, с применением связывающих агентов, таких как карбодиимиды, HBTU (N,N,N',N'-тетраметил-O-(1H-бензотриазол-1-ил)гексафторфосфат урония) или иодид 2-хлор-1-метилпиридиния могут быть использованы для конъюгации липидных групп. Указанные два способа приводят к получению амидной связи между липидом и полинуклеотидом. Липиды также могут быть присоединены к полинуклеотидной цепи с применением фосфорамидитного производного липида, связанного с полинуклеотидами во время удлинения цепи. Такой подход дает фосфорамидат (например, тиофосфорамидатной) связи, соединяющей липид и олигонуклеотид (например, пропил-пальмитоилловые и 2-гидроксипропил-пальмитоилловые соединения). Другой подход включает взаимодействие свободной 3'-аминогруппы полностью защищенного полинуклеотида, связанного с твердой подложкой, с подходящим альдегидом липида, с последующим восстановлением цианоборогидридом натрия с получением аминной связи.

Для присоединения к 5'-концу полинуклеотид может быть синтезирован с применением модифицированной, липидсодержащей твердой подложки, с последующим синтезом полинуклеотида в направлении от 5' к 3', как описано в публикации Pongracz и Gryaznov (1999). Пример модифицированной подложки представлен ниже. Если n=14, жирная кислота представляет собой пальмитиновую кислоту: взаимодействие 3-амино-1,2-пропандиола с пальмитоилхлоридом, с последующим диметокситриилированием и сукцинилизацией приводит к получению промежуточного соединения, используемого для связывания с твердой подложкой. В некоторых случаях R может представлять собой длинноцепочечный алкиламин на стекле с контролируемым размером пор. В некоторых случаях R представляет собой полимерную твердую подложку.



Применение.

Способы и композиции согласно данному изобретению, например, описанные выше, находят применение в различных областях использования. Интересующие области применения включают, но не ограничиваются ими, терапевтические применения, диагностические применения, исследовательские применения и применения для скрининга, как подробнее описано ниже.

Рассматриваемые соединения находят применение во многих терапевтических областях. В некоторых вариантах реализации способы получения полинуклеотидное применяют для получения полинуклеотидов, которые обеспечивают терапевтический эффект. Типы заболеваний, которые можно лечить с

применением композиций согласно данному изобретению, безграничны. Например, указанные композиции могут быть использованы для лечения ряда генетических заболеваний. В некоторых вариантах реализации рассматриваемые способы и композиции имеют антисмысловое применение. В некоторых вариантах реализации рассматриваемые способы и композиции имеют антигенное применение. В некоторых вариантах реализации рассматриваемые способы и композиции имеют применение для ингибирования теломеразы, как описано в патенте США 6835826 и в публикации США 20120329858, полное описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В данном описании представлены соединения, которые могут специфически и эффективно ингибировать активность теломеразы, и которые, следовательно, могут быть использованы для ингибирования пролиферации теломераза-положительных клеток, таких как опухолевые клетки. Показано, теломераза-положительными являются многие раковые клетки, включая клетки рака кожи, соединительной ткани, жировой ткани, молочной железы, легких, пищевода, поджелудочной железы, яичников, шейки матки, матки, почек, мочевого пузыря, толстой кишки, предстательной железы, центральной нервной системы (ЦНС), сетчатки и гематологических опухолей (таких как миелома, лейкоз и лимфома). Интересующие типы рака включают, но не ограничиваются ими, миелофиброз, тромбоцитемию, миелодиспластический синдром и миелогенный лейкоз.

Рассматриваемые соединения могут быть использованы для лечения гематологических злокачественных образований и миелопролиферативных расстройств, включая, но не ограничиваясь ими, эссенциальную тромбоцитемию (ET), полицитемию вера (PV), хронический миелогенный лейкоз (CMML), миелофиброз (MF), хронический нейтрофильный лейкоз, хронический эозинофильный лейкоз и острый миелогенный лейкоз (AML). Рассматриваемые соединения могут быть использованы для лечения миелодиспластических синдромов, которые включают такие заболевания как рефрактерная анемия, рефрактерная анемия с избытком бластов, рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией, рефрактерная цитопения с однолинейной дисплазией и хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML). Рассматриваемые соединения могут быть использованы для лечения гематологических заболеваний, таких как описаны в заявке на патент PCT № PCT/US13/070437, поданной 15 ноября 2013 г., полное описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Соответственно, соединения, представленные в данном документе, подходят для лечения широкого ряда злокачественных образований. В некоторых случаях, что соединения согласно данному изобретению могут быть эффективными для лечения, обеспечивающего высокое дифференцирование между злокачественными и нормальными клетками, позволяя избежать многих вредных побочных эффектов, возникающих при использовании большинства современных химиотерапевтических режимов, основанных на агентах, без разбора уничтожающих делящиеся клетки. Кроме того, в некоторых случаях соединения, модифицированные липидами, согласно данному изобретению более эффективным, чем эквивалентные несопряженные олигонуклеотиды, что означает, что они могут быть введены в более низких дозах, обеспечивая повышенную безопасность и существенное снижение стоимости лечения. Ингибиторы теломеразы могут быть использованы в сочетании с другими средствами лечения рака, включая хирургическое удаление первичных опухолей, химиотерапевтические агенты и радиационное лечение. Следовательно, данное изобретение относится к соединениям и композициям, представленным в данном документе, для применения в качестве лекарственного средства. Данное изобретение относится также к соединениям и композициям, представленным в данном документе, для применения при лечении или предупреждении одного из злокачественных заболеваний, упомянутых выше.

Рассматриваемые соединения и способы находят применение в различных диагностических областях, включая, но не ограничиваясь ими, разработку клинической диагностики, например, *in vitro* диагностики или агентов для визуализации опухоли *in vivo*. Такие применения подходят для диагностики или подтверждения диагноза болезненного состояния или предрасположенности к нему. Указанные способы также подходят для мониторинга прогрессирования заболевания и/или реакции на лечение у пациентов, у которых ранее диагностировано заболевание.

Примеры

Пример 1. Сущность изобретения.

Эти примеры описывают эксперименты по приготовлению различных двухвалентных или трехвалентных форм иметелстата, таких как Ca, Ba, Mg, Al, Fe, Si и Zn из формы натриевой соли иметелстата. В этих экспериментах были отмечены улучшения чистоты с использованием способов получения, включающих образование и выделение солей двухдентатных или тридентатных катионов, которые могут связываться с одной, двумя или тремя фосфатными группами иметелстата. Также изучали растворимость и молярность полученных солевых форм.

Было исследовано получение солей иметелстата кальция, иметелстата бария, иметелстата магния, иметелстата алюминия, иметелстата железа(II или III) и иметелстата меди с использованием CaCl_2 , MgCl_2 , BaCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 , AlCl_3 , FeCl_2 и FeCl_3 .

Три способа солевого обмена были изучены: использование сильной катионообменной смолы (FINEX MFG 210), осаждение и простое растворение. Когда раствор иметелстата натрия пропускали через смолу, обмениваемую с CaCl_2 , BaCl_2 и MgCl_2 , растворы элюата содержали мелкие порошки, что ука-

зывает на то, что противоионы натрия успешно обменялись на основной цепи от иметелстата и заменяли на противоионы кальция, бария или магния. Для остальных пяти реагентов (CuCl_2 , ZnCl_2 , AlCl_3 , FeCl_2 , FeCl_3), которые были уравновешены на катионообменной смоле, верхняя часть смолы в колонне была агрегирована при прохождении раствора иметелстата, что также свидетельствовало о том, что противоионы натрия были успешно заменены от основы иметелстата.

Методы осаждения и растворения также испытывали с использованием избытка солевых реагентов. Когда большой избыток солевого реагента (например, 900 экв.) обрабатывали иметелстатом натрия, образовывался осадок. Осадок отделяли фильтрованием. Последующие испытания показывают, что для превращения всего иметелстата в осадок требуется от семи до пятидесяти эквивалентов неорганических солевых реагентов.

Пять эквивалентов трех неорганических солей (Mg , Ba или Ca) обрабатывали либо солью типа иметелстат ТЭА (триэтиламмония), либо солью иметелстата натрия. Было подтверждено, что осаждение не происходило, и растворы обессоливали и лиофилизировали. Анализ лиофилизированного порошка Flame AA (Atomic Absorption) показал, что некоторые из натриевых противоионов иметелста подлежали обмену.

Был проведен дополнительный эксперимент с MgCl_2 с использованием от 1 до 9 эквивалентов катиона магния к соли иметелстата. Противоионы натрия частично заменялись на противоионы Mg с самым лучшим обменом, при использовании девяти эквивалентов MgCl_2 , при этом полученные композиции показывали 1,2 мас.% Na и 1,1 мас.% Mg .

Пример 2. Материалы и оборудование.

Неорганические реагенты, органические растворители и другие материалы, используемые для исследования, приведены в табл. 1. Для исследования использовался иметелстат натрия (CAS # 1007380-31-5) Lot # G163/L-G-13002, предоставленный Geron. Иметелстат аммония представляет собой неочищенную композицию, полученную из расщепленного иметелстата с подложки для твердофазного синтеза с использованием аммиака и этанола (например, как описано Gryaznov et al. US 20120329858) и был получен из запасов производителя. Иметелстат ТЭА (вид триэтиламмония) представляет собой композицию, полученную из элюата колонки для ВЭЖХ, где используется подвижная фаза, содержащая триэтиламмоний ацетат (ТЭАА) (например, как описано Gryaznov et al. в US 20120329858) и получена из запасов производителя. Ультрафильтрацию проводили с использованием Stirred Ultrafiltration Cell (Amicon 8400, Millipore) с 1KD мембранами PES. Лيوфилизацию проводили с использованием скоростного вакуумного концентратора (ScanSpeed 40, LaboGene).

Пример 3. Методика.

Обмен на ионообменной колонке.

Подготавливали колонку с сильной катионообменной смолой FINEX MFG 210 с объемом колонки 200 мл ($4,6 \times 12$ см) и смолу промывали 1 М NaOH и водой. Затем колонку уравнивали 1М раствором каждой соли, представляющей интерес. В общей сложности в этих экспериментах были приготовлены и использованы восемь солевых растворов 1 М (CaCl_2 , MgCl_2 , BaCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 , AlCl_3 , FeCl_2 и FeCl_3). К колонке добавляли 50 мл раствора иметелстата натрия с концентрацией 100 мг/мл.

В случае уравниваемых столбцов CuCl_2 , ZnCl_2 , AlCl_3 , FeCl_2 и FeCl_3 агрегация иметелстата на смоле наблюдалась в верхней части колонки, после того, как на колонку загружался иметелстат натрия.

Когда колонки, уравнивали CaCl_2 , MgCl_2 и BaCl_2 , солевые растворы, не приводили к какой-либо агрегации иметелстата на колонке, и иметелстат был извлечен из элюата колонки, который наблюдался в виде мутности. Из этих элюатов с помощью центрифугирования извлекали мелкие порошки (4000 об/мин, 20 мин). После центрифугирования было подтверждено, что супернатант не содержал иметелстата с помощью ВЭЖХ-анализа. Это указывает на то, что осаждение и выделение солей кальция, магния и бария иметелстата было успешно достигнуто.

Осаждение.

Кристаллизацию и осаждение двухвалентных или трехвалентных форм иметелстата исследовали с использованием большого избытка неорганических солей, представляющих интерес (900 эквивалентов, весовая основа). Были приготовлены 1 М растворы соли CaCl_2 , MgCl_2 , BaCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 , AlCl_3 , FeCl_2 и FeCl_3 . Три типа растворов иметелстата: неочищенный раствор иметелстата (соль аммония), очищенная форма соли иметелстата (соль триэтиламмония (ТЭА)) и соль иметелстат натрия (соль Na) смешивались с каждым солевым раствором.

Все смешанные растворы имели осадки иметелстата, которые легко удалялись фильтрованием с помощью фильтровальной бумаги Advantec 2. Это указывает на то, что осаждение и выделение солей кальция, магния и бария иметелстата было успешно достигнуто.

Растворимость преципитатов, выделенных в условиях излишка реагентов солей, была первоначально исследована с использованием следующих растворителей: воды, ацетонитрила, метанола, этанола, IPA (изопропиловый спирт), 0,1 М NaOH , 0,1 М HCl , 1 М NaCl и NMP .

Для солей, осажденных в большом избытке солевого реагента, соли иметелстата кальция, бария и магния растворимы в 0,1 М NaOH и 1 М растворе NaCl (см. табл. 2). Исследования растворимости осадка иметелстата, полученного из большого избытка магниевой соли, проводили в 1 М растворах NaCl в

разных концентрациях (от 2 мг до 6 мг/мл) и при различных условиях pH (pH 8, 9, 10, 11, 12) и анализировали с помощью ВЭЖХ (см. хроматограммы на фиг. 1). Было обнаружено, что осадок иметелстата растворяется при 6 мг/мл и pH от 11 до 12. Соединение также показало стабильность до pH 12 без каких-либо осадков (фиг. 1).

Растворимость.

От 30 до 50 эквивалентов солей.

Количество эквивалентов солевых реагентов, представляющих интерес, которые могли бы достичь полного осаждения иметелсата, исследовали путем добавления раствора соли. Полноценное образование осадка наблюдалось в диапазоне от 7 до 50 эквивалентов добавленного солевого реагента для восьми солей, перечисленных в табл. 3. По мере добавления большего количества эквивалентов солевых реагентов для всех солей наблюдалась тенденция к образованию геля с преципитатом.

Были использованы три типа растворов иметелстата: неочищенный иметелстат аммоний (неочищенная форма), иметелстат триэтиламмоний (очищенная форма соли ТЭА) и иметелстат натрия (соль Na) и были смешаны с каждым раствором соли. Аммониевую соль иметелстата использовали либо в растворе NH_4OH либо в водном растворе. Для получения полного осаждения растворы иметелстат аммония и иметелстат ТЕА было необходимо приблизительно 50 или 30 эквивалентов реагента Mg соли соответственно.

Растворимость преципитатов, образовавшихся из раствора иметелстат ТЭА и раствора иметелстата аммония, исследовалась при различных условиях pH от pH 8 до pH 12.

После выхода из смешанных растворов в течение 6 ч при комнатной температуре растворимость преципитатов иметелстата магния анализировали с помощью УФ-поглощения при 260 нм. Оба осадка, полученные из иметелстат аммония и иметелстат ТЭА, показали сходную тенденцию в том, что больше соли иметелстата растворялось в 1 М растворе NaCl при высоком pH (см. табл. 3).

Этот результат свидетельствует о том, что, когда контролируется количество эквивалентов солевого реагента, представляющего интерес, полное осаждение соли иметелстата может быть достигнуто любым удобным способом для получения осадка, который может быть повторно растворен.

5 эквивалентов растворов солей.

Раствор иметелстата натрия (100 мг в 1 мл воды) смешивали с 5 эквивалентами восьми солевых реагентов, и каждый раствор обессоливали ультрафильтрацией с использованием Stirred Ultrafiltration Cell и 1KD-мембраны. Затем отфильтрованный раствор лиофилизировали. Полученный порошок анализировали на содержание Na и каждого представляющего интерес противоиона с помощью Flame AA (атомно-абсорбционной спектроскопии). Как показано на фиг. 2 и 3, наибольшее содержание противоионов составляло 1,1 мас.% для Zn, Al и Mg, причем содержание Na составляло 2,6, 1,7 и 2,6% соответственно.

От 6 до 9 эквивалентов растворов солей.

Добавляли от 6 до 9 эквивалентов реагента из магниевой соли в раствор иметелстата натрия, и последующая ультрафильтрация и лиофилизация обеспечивали твердый продукт, который полностью растворялся в воде. Был проведен анализ содержания натрия и магния (см. результаты на фиг. 3). Добавление девяти эквивалентов MgCl_2 к раствору иметелстата натрия давало композицию, в которой содержание противоионов Na и Mg составляет 1,1 и 1,2 мас.% соответственно.

От 1 до 10 эквивалентов растворов солей.

Чтобы исследовать обмен Mg с ТЭА-противоионами в соли иметелстат ТЭА по сравнению с солью иметелстат натрия, был выполнен другой эксперимент. От одного до десяти эквивалентов MgCl_2 в водных растворах смешивали с раствором соли иметелстат ТЭА (чистота > 90% с помощью ВЭЖХ). Анализ содержания противоиона Mg проводили после ультрафильтрации и лиофилизации. Результаты показаны на фиг. 4. Добавление до 10 эквивалентов реагента MgCl_2 дает композицию, имеющую 1,6% Mg по массе.

Пример 4. Вывод.

Было достигнуто получение двухвалентных и трехвалентных солевых форм иметелстата, включая кальций, магний, цинк, алюминий, барий, железо(II), железо(III) и соли меди. Когда использовали контролируемый избыток выбранных неорганических солевых реагентов (см. табл. 2 и 3) для осаждения полинуклеотида, образовывались преципитаты, которые впоследствии могли быть повторно растворены и которые показали повышенную чистоту в отношении быстрых элюирующих примесей с использованием ВЭЖХ-анализа.

Использование магниевой соли приводило к образованию растворимого твердого осадка иметелстата после стадии ионного обмена. Получали осадки, которые достигали 1,2 мас.% магниевого противоиона относительно 1,1 мас.% противоиона натрия.

Осаждение иметелстата с использованием двухвалентных или трехвалентных солей обеспечивало удаление нецелевых продуктов и реагентов синтеза, которые оставались в растворе. Удаление таких примесей, присутствующих в неочищенных растворах иметелстата, дает несколько преимуществ для последующих этапов очистки, таких как снижение загрузки колонн, улучшение разрешения, уменьшение количества этапов очистки и улучшение срока службы хроматографических колонок, снижение затрат на очистку и увеличение скорости очистки.

Таблица 1

Неорганические соли, органические растворители и другие материалы

Вещество	Формула	Класс или
	(Молекулярный вес)	чистота
Дигидрат хлорида кальция	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MB 147.01)	$\geq 99 \%$
Моногидрат хлорида магния	$\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MB 203.30)	$\geq 99 \%$
Дигидрат хлорида бария	$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MB 244.26)	$\geq 99 \%$
Дигидрат хлорида меди(II)	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MB 170.48)	$\geq 99 \%$
Хлорид цинка	ZnCl_2 (MB 136.30)	$\geq 98 \%$
Гексагидрат хлорида алюминия	$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (MB 241.43)	$\geq 95 \%$
Тетрагидрат хлорида железа(II)	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (MB 198.81)	$\geq 98 \%$
Гексагидрат хлорида железа (III)	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (MB 270.30)	$\geq 98 \%$
Хлорид натрия	NaCl (MB 58.4)	Класс USP

Таблица 2

Способ	Иметелс тат	Исследо вание проведено	CaCl ₂	MgCl ₂	BaCl ₂	CuCl ₂	ZnCl ₂	AlCl ₃	FeCl ₂	FeCl ₃
Ионооб менная смола	Натрий (форма Na, 100 мг/мл)	Прохожден ие в колонке	O	O	O	X	X	X	X	X
		Преципита	O	O	O	-	-	-	-	-
		ция в растворе после элюирования								
		Фильтраци я преципитат ов	X	X	X	-	-	-	-	-
		Растворим ость* осадка	X	X	X	-	-	-	-	-
Преципи тация (900 эквивале нтов)	Натрий (форма Na, 100 мг/мл)	Преципита ты (Фильтруе мые)	O	O	O	O	O	O	O	O
		Растворим ость** осадка	X	X	X	X	X	X	X	X
		Растворим ость осадка в 1М NaOH	O	O	O	X	X	X	X	X
	ТЭА (35 мг /мл)	Преципита ты (Фильтруе мые)	O	O	O	O	O	O	O	O
		Растворим ость** осадка	X	X	X	X	X	X	X	X
		Растворим ость осадка	O	O	X	X	X	X	X	X
		в 1М NaOH								
	Неочище нный (в NH ₄ OH)	Преципита ты (Фильтруе мые)	O	O	O	O	O	O	O	O
		Растворим ость** осадка	X	X	X	-	-	-	-	-

O: да, X: нет, значит не проводили.

* Исследовали в ацетонитриле, метаноле, этаноле, IPA, воде, NMP, 1 M HCl, 1 M NaCl, 1 M NaOH.

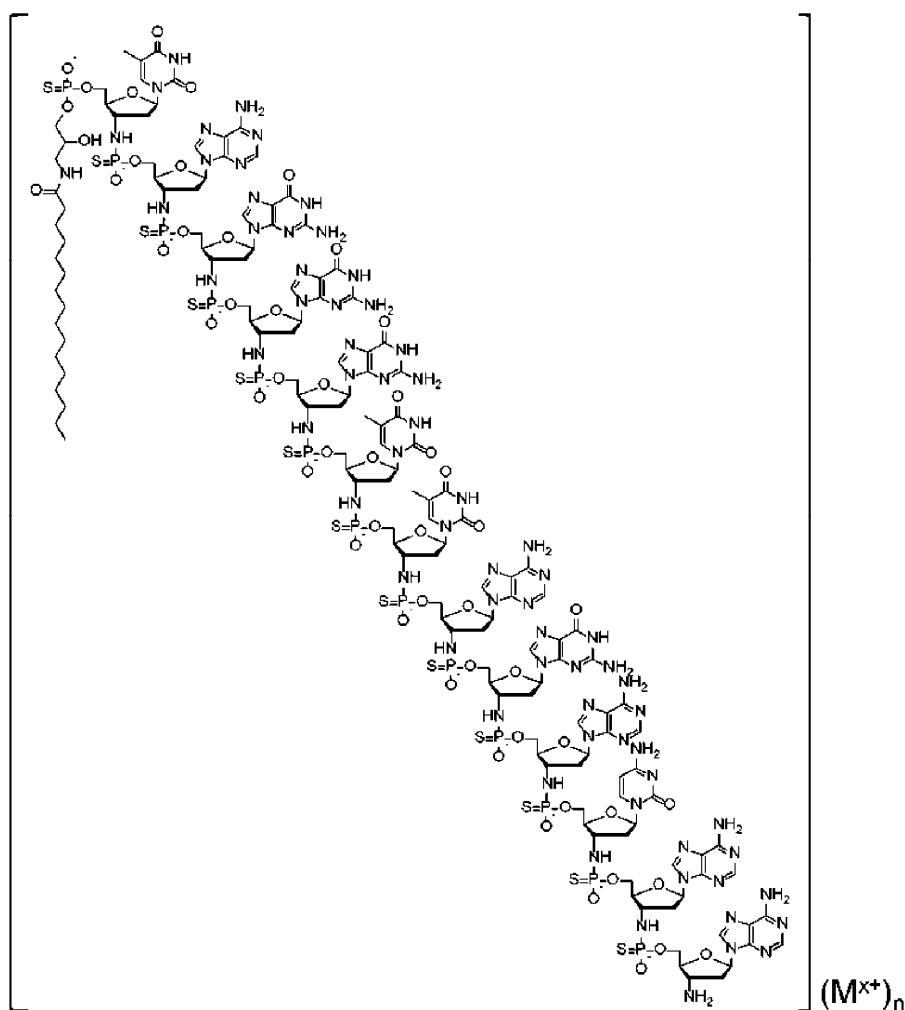
** Исследовали в ацетонитриле, метаноле, этаноле, IPA, воде, NMP, 1 M HCl, 1 M NaCl.

Таблица 3

Раствори мость	Натрий	Эквивалент ы неорганичес ких солей для завершения растворения	9	15	12	7	50	50	10	11
	ТЭА		15	30	30	10	50	10	50	10
	Неочищен ный (в NH ₄ OH)		-	>50	-	-	-	-	-	-
	Неочищен ный (в воде)		-	30	-	-	-	-	-	-
	Раствори мость в 1М NaCl (1 мл)		ТЭА	Иметелстат магния рН 8 рН 9 рН 10 рН 11 рН 12 бмг (После 64 28 ОП 31 ОП 70 ОП 290 ОП 434 ОП часов)						
	Неочищен ный (в воде)	Иметелстат магния рН 8 рН 9 рН 10 рН 11 рН 12 бмг (После 6 часов) 10 ОП 7 ОП 17 ОП 111 ОП 377 ОП								

Независимо от прилагаемой формулы изобретения, изобретение, изложенное в данном документе, также определяется следующими пунктами.

- Способ получения полинуклеотида, включающий приведение в контакт первой полинуклеотидной композиции, содержащей полинуклеотид, имеющий последовательность из 7 или более нуклеозидных субъединиц, в которой по меньшей мере две из нуклеозидных субъединиц связаны N3'→P5' тиофосфорамидатной межсубъединичной связью; и нецелевые синтетические продукты и реагенты; с поливалентной катионной солью для осаждения первой соли полинуклеотида, содержащей по меньшей мере один поливалентный катионный противоион; и отделение первой соли полинуклеотида от контактирующей первой полинуклеотидной композиции для получения второй полинуклеотидной композиции, содержащей первую соль полинуклеотида.
- Способ по п.1 дополнительно включает приведение в контакт первой соли полинуклеотида с носителем хроматографии на обращенной фазе и элюирование из хроматографического носителя третьей полинуклеотидной композиции, содержащей вторую соль полинуклеотида.
- Способ по любому из пп.1, 2, отличающийся тем, что полинуклеотид содержит последовательность, содержащую 13 или более нуклеозидных субъединиц, комплементарных РНК-компоненту теломеразы человека.
- Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что полинуклеотид содержит от 10 до 50 смежных нуклеозидных субъединиц, комплементарных РНК-компоненту теломеразы человека.
- Способ по любому из пп.3, 4, отличающийся тем, что нуклеозидные субъединицы, комплементарные РНК-компоненту теломеразы человека, соединены между собой внутренними N3'→P5' тиофосфорамидатными связями.
- Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что полинуклеотид содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из GTTAGGGT TAG (SEQ ID NO: 4), TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) и CAGTTAGGGT TAG (SEQ ID NO: 5).
- Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что полинуклеотид конъюгирован с липидным фрагментом через опциональный линкер.
- Способ по любому из пп.2-7, отличающийся тем, что вторая полинуклеотидная соль имеет структуру:



причем каждый M^{x+} независимо представляет собой водород или катионный противоион, каждый x независимо представляет собой 1, 2 или 3 и n представляет собой целое число от 5 до 13.

9. Способ по любому из пп.2-8, отличающийся тем, что вторая полинуклеотидная соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль полинуклеотида.

10. Способ по любому из пп.2-9, отличающийся тем, что вторая полинуклеотидная соль представляет собой одновалентную катионную соль полинуклеотида.

11. Способ по любому из пп.2-10, отличающийся тем, что вторая полинуклеотидная соль представляет собой натриевую соль полинуклеотида.

12. Способ по любому из пп.1-5 дополнительно включает отщепление полинуклеотида от носителя для получения первой полинуклеотидной композиции.

13. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что первая композиция содержит одновалентную катионную соль полинуклеотида.

14. Способ по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что этап контактирования включает элюирование первой полинуклеотидной композиции из катионообменного носителя.

15. Способ по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что этап разделения включает центрифугирование связанной первой полинуклеотидной композиции для осаждения соли полинуклеотида.

16. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что этап разделения включает фильтрацию соли полинуклеотида от связанного первого полинуклеотида.

17. Способ по п.2, отличающийся тем, что вторая полинуклеотидная композиция загружается непосредственно на носитель хроматографии на обращенной фазе.

18. Способ по любому из пп.1-17 дополнительно включающий растворение второй полинуклеотидной композиции в растворителе.

19. Способ по любому из пп.1-18, отличающийся тем, что по меньшей мере один поливалентный катионный противоион является двухвалентным.

20. Способ по п.19, отличающийся тем, что по меньшей мере один поливалентный катионный противоион выбран из группы, состоящей из магния, цинка и кальция.

21. Способ по любому из пп.1-18, отличающийся тем, что по меньшей мере один поливалентный катионный противоион является трехвалентным.

22. Способ по п.21, отличающийся тем, что по меньшей мере один поливалентный катионный противоион представляет собой алюминий.

23. Способ по любому из пп.1-22, отличающийся тем, что полинуклеотидная соль дополнительно содержит одновалентный катионный противоион.

24. Композиция, содержащая соль полинуклеотида, содержащую по меньшей мере один поливалентный катионный противоион; причем полинуклеотид имеет последовательность из 7 или более нуклеозидных субъединиц, комплементарных РНК-компоненту теломеразы человека, в котором по меньшей мере две из нуклеозидных субъединиц соединены между собой внутренней N3'→P5' тиофосфорамидатной связью.

25. Композиция по п.24, отличающаяся тем, что по меньшей мере один поливалентный катионный противоион является двухвалентным.

26. Композиция по п.25, отличающаяся тем, что по меньшей мере один поливалентный катионный противоион выбран из группы, состоящей из магния, цинка и кальция.

27. Композиция по любому из пп.24-26, отличающаяся тем, что по меньшей мере один поливалентный катионный противоион представляет собой магний.

28. Композиция по п.24, отличающаяся тем, что по меньшей мере один поливалентный катионный противоион является трехвалентным.

29. Композиция по п.28, отличающаяся тем, что по меньшей мере один поливалентный катионный противоион представляет собой алюминий.

30. Композиция по любому из пп.24-29, отличающаяся тем, что полинуклеотид содержит 3 мол.% или более поливалентного катионного противоиона относительно полианионного скелета полинуклеотида.

31. Композиция по любому из пп.24-29, отличающаяся тем, что полинуклеотид содержит 1,0 % по массе или больше поливалентного катионного противоиона по отношению к полинуклеотиду.

32. Композиция по любому из пп.24-31, отличающаяся тем, что композиция представляет собой осадок.

33. Композиция по любому из пп.24-32, отличающаяся тем, что полинуклеотид содержит последовательность, содержащую 13 или более нуклеозидных субъединиц, комплементарных РНК-компоненту теломеразы человека.

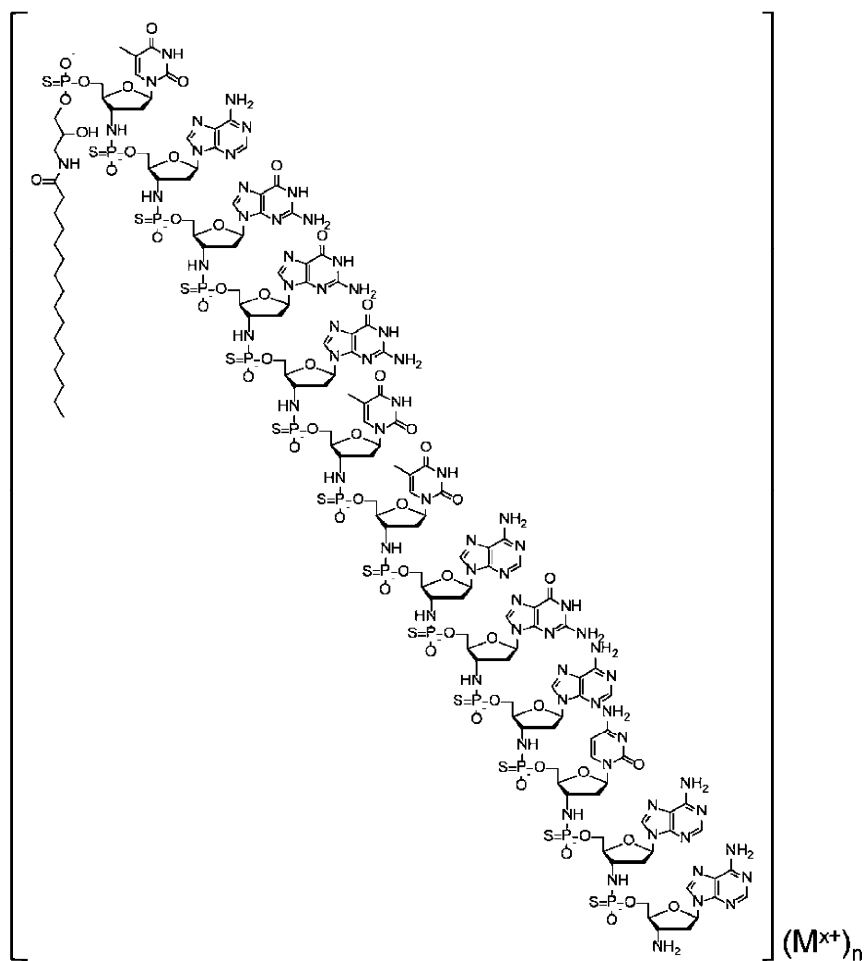
34. Композиция по любому из пп.24-33, отличающаяся тем, что полинуклеотид содержит от 10 до 50 смежных нуклеозидных субъединиц, комплементарных РНК-компоненту теломеразы человека.

35. Композиция по любому из пп.24-34, отличающаяся тем, что нуклеозидные субъединицы, комплементарные к РНК-компоненту теломеразы человека, соединены между собой внутренними N3'→P5' тиофосфорамидатными связями.

36. Композиция по любому из пп.24-35, отличающаяся тем, что полинуклеотид содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 4), TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) и CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 5).

37. Композиция по любому из пп.24-36, отличающаяся тем, что полинуклеотид конъюгирован с липидным фрагментом через опциональный линкер.

38. Композиция по любому из пп.24-37, отличающаяся тем, что полинуклеотид имеет структуру



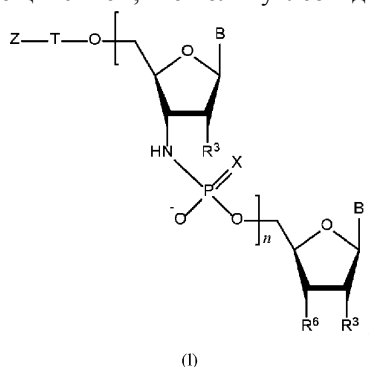
причем каждый M^{x+} независимо представляет собой катионный противоион, каждый x представляет собой 1, 2 или 3 и n представляет от 5 до 12.

Хотя вышеприведенное изобретение было описано довольно подробно посредством иллюстраций и примеров с целью ясности понимания, специалистам в данной области должно быть очевидно, что в рамках идей данного изобретения могут быть осуществлены определенные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема прилагаемой формулы изобретения.

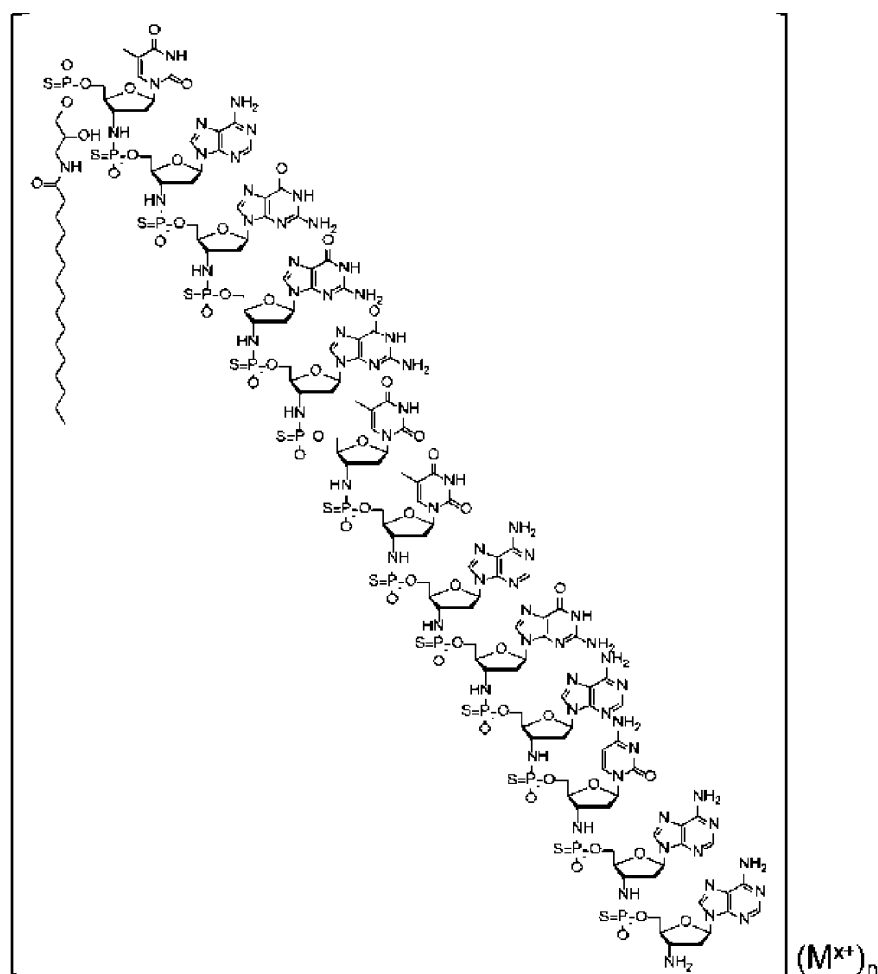
Таким образом, приведенное выше всего лишь иллюстрирует принципы изобретения. Следует отметить, что специалисты в данной области техники могут разработать различные схемы, которые, хотя отдельно не описаны и не показаны в данном документе, воплощают собой принципы изобретения и находятся в рамках его сущности и объема. Кроме того, все примеры и условные конструкции, используемые в данном документе, предназначены, главным образом, для того, чтобы помочь читателю понять принципы изобретения и направления исследований, в которые исследователи внесли вклад для развития области техники, и их не следует истолковывать, как ограничивающие до таких конкретно указанных примеров и условий. Более того, предполагается, что все заявленные в данном документе принципы, аспекты и варианты реализации изобретения, а также конкретные их примеры, охватывают их структурные и функциональные эквиваленты. Дополнительно предполагается, что такие эквиваленты включают как эквиваленты, известные в настоящий момент, так и эквиваленты, которые будут разработаны в будущем, т.е. любые разработанные элементы, которые выполняют такие же функции, вне зависимости от структуры. Поэтому предполагается, что данное изобретение не ограничено иллюстративными вариантами реализации, представленными и описанными в данном документе. Объем и сущность данного изобретения скорее определяется прилагаемой формулой изобретения. Все возможные комбинации указанных выше вариантов реализации считаются входящими в объем данного изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения полинуклеотида, включающий:
 - a) приведение в контакт первой полинуклеотидной композиции с поливалентной катионной солью для осаждения первой соли полинуклеотида и
 - b) отделение первой соли полинуклеотида от контактирующей первой полинуклеотидной композиции для получения второй полинуклеотидной композиции, содержащей первую соль полинуклеотида; причем упомянутая первая полинуклеотидная композиция содержит:
 - (i) полинуклеотид, имеющий последовательность из 7-500 нуклеозидов, в котором по меньшей мере два из нуклеозидов связаны N3'→P5' тифосфорамидатной межнауклеозидной связью; и
 - (ii) растворимые нецелевые синтетические продукты и реагенты;
 - c) приведение в контакт второй полинуклеотидной композиции с этапа b) с носителем хроматографии на обращенной фазе и
 - d) элюирование из этого носителя хроматографии на обращенной фазе третьей полинуклеотидной композиции, содержащей вторую растворимую соль полинуклеотида.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что все нуклеозиды связаны межнауклеозидными связями, каждая из которых независимо выбрана из N3'→P5' тифосфорамидатной межнауклеозидной связи и N3'→P5' фосфорамидатной межнауклеозидной связи.
3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что полинуклеотид описан формулой (I)



- в которой каждый В независимо представляет собой пурин, защищенный пурин, пиримидин или защищенный пиримидин или их аналог;
- каждый Х независимо представляет собой кислород или серу;
- каждый R³ независимо представляет собой водород, фтор, гидроксил, алкокси, замещенный алкокси или защищенный гидроксил;
- R⁶ представляет собой amino, гидроксил, защищенный amino, защищенный гидроксил, -O-T-Z или -NH-T-Z;
- каждый Т независимо представляет собой необязательный линкер;
- каждый Z независимо представляет собой H, липид, носитель, олигонуклеотид, полимер, полипептид, обнаруживаемую метку или маркер и
- n представляет собой целое число от 7 до 100.
4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что полинуклеотид содержит последовательность, содержащую 13 или более нуклеозидов, комплементарных РНК-компоненту теломеразы человека.
 5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что полинуклеотид содержит от 10 до 50 смежных нуклеозидов, комплементарных РНК-компоненту теломеразы человека.
 6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что все нуклеозиды соединены между собой N3'→P5' тифосфорамидатными межнауклеозидными связями.
 7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что полинуклеотид содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 4), TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) и CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 5).
 8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что полинуклеотид конъюгирован с липидным фрагментом через опциональный линкер.
 9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что вторая соль полинуклеотида имеет структуру:



где каждый M^{x+} независимо представляет собой водород или катионный противоион, каждый x независимо представляет собой 1, 2 или 3 и n представляет собой целое число от 5 до 13.

10. Способ по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что после этапа d) элюирования упомянутая вторая полинуклеотидная соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль полинуклеотида.

11. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что после этапа d) элюирования упомянутая вторая полинуклеотидная соль представляет собой одновалентную катионную соль полинуклеотида.

12. Способ по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что после этапа d) элюирования упомянутая вторая полинуклеотидная соль представляет собой натриевую соль полинуклеотида.

13. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что он дополнительно включает, перед этапом a) приведения в контакт, отщепление упомянутого полинуклеотида от носителя для твердофазного синтеза для получения первой полинуклеотидной композиции в виде неочищенного синтетического препарата полинуклеотида.

14. Способ по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что перед этапом a) приведения в контакт упомянутая первая полинуклеотидная композиция содержит одновалентную катионную соль полинуклеотида.

15. Способ по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что этап a) приведения в контакт включает загрузку и элюирование первой полинуклеотидной композиции из катионообменного носителя.

16. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что этап b) отделения включает центрифугирование контактирующей первой полинуклеотидной композиции для осаждения осадка соли первого полинуклеотида.

17. Способ по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что этап b) отделения включает фильтрацию соли первого полинуклеотида из контактирующей первой полинуклеотидной композиции.

18. Способ по п.1, отличающийся тем, что вторая полинуклеотидная композиция с этапа b) загружается непосредственно на носитель хроматографии на обращенной фазе.

19. Способ по любому из пп.1-18, отличающийся тем, что он дополнительно включает, перед этапом c) приведения в контакт, растворение второй полинуклеотидной композиции в растворителе.

20. Способ по любому из пп.1-19, отличающийся тем, что по меньшей мере один поливалентный катионный противоион является двухвалентным.

21. Способ по п.20, отличающийся тем, что по меньшей мере один поливалентный катионный противоион выбран из группы, состоящей из магния, цинка и кальция.

22. Способ по любому из пп.1-19, отличающийся тем, что по меньшей мере один поливалентный катионный противоион является трехвалентным.

23. Способ по п.22, отличающийся тем, что по меньшей мере один поливалентный катионный противоион представляет собой алюминий.

24. Способ по любому из пп.1-23, отличающийся тем, что соль первого полинуклеотида дополнительно содержит одновалентный катионный противоион.

25. Осадок соли полинуклеотида, содержащей по меньшей мере один поливалентный катионный противоион; причем полинуклеотид имеет последовательность из 7-500 нуклеозидов, комплементарных РНК-компоненту теломеразы человека, и по меньшей мере два из нуклеозидов соединены между собой N3'→P5' тиофосфорамидатной межнуклеозидной связью.

26. Осадок соли полинуклеотида по п.25, причем по меньшей мере один поливалентный катионный противоион является двухвалентным.

27. Осадок соли полинуклеотида по п.26, причем по меньшей мере один поливалентный катионный противоион выбран из группы, состоящей из магния, цинка и кальция.

28. Осадок соли полинуклеотида по любому из пп.25-27, причем по меньшей мере один поливалентный катионный противоион представляет собой магний.

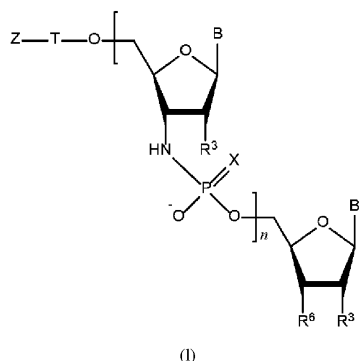
29. Осадок соли полинуклеотида по п.25, причем по меньшей мере один поливалентный катионный противоион является трехвалентным.

30. Осадок соли полинуклеотида по п.29, причем по меньшей мере один поливалентный катионный противоион представляет собой алюминий.

31. Осадок соли полинуклеотида по любому из пп.25-30, причем соль полинуклеотида содержит 3 мол.% или более поливалентного катионного противоиона.

32. Осадок соли полинуклеотида по любому из пп.25-30, причем полинуклеотид содержит 1,0 % по массе или более поливалентного катионного противоиона.

33. Осадок соли полинуклеотида по любому из пп.25-32, причем полинуклеотид описан формулой (I)



(I)

в которой каждый В независимо представляет собой пурин, защищенный пурин, пиримидин или защищенный пиримидин или их аналог;

каждый Х независимо представляет собой кислород или серу;

каждый R³ независимо представляет собой водород, фтор, гидроксил, алкокси, замещенный алкокси или защищенный гидроксил;

R⁶ представляет собой amino, гидроксил, защищенный amino, защищенный гидроксил, -O-T-Z или -NH-T-Z;

каждый Т независимо представляет собой необязательный линкер;

каждый Z независимо представляет собой H, липид, носитель, олигонуклеотид, полимер, полипептид, обнаруживаемую метку или маркер и

n представляет собой целое число от 7 до 100.

34. Осадок соли полинуклеотида по любому из пп.25-33, причем полинуклеотид содержит последовательность, содержащую 13 или более нуклеозидов, комплементарных РНК-компоненту теломеразы человека.

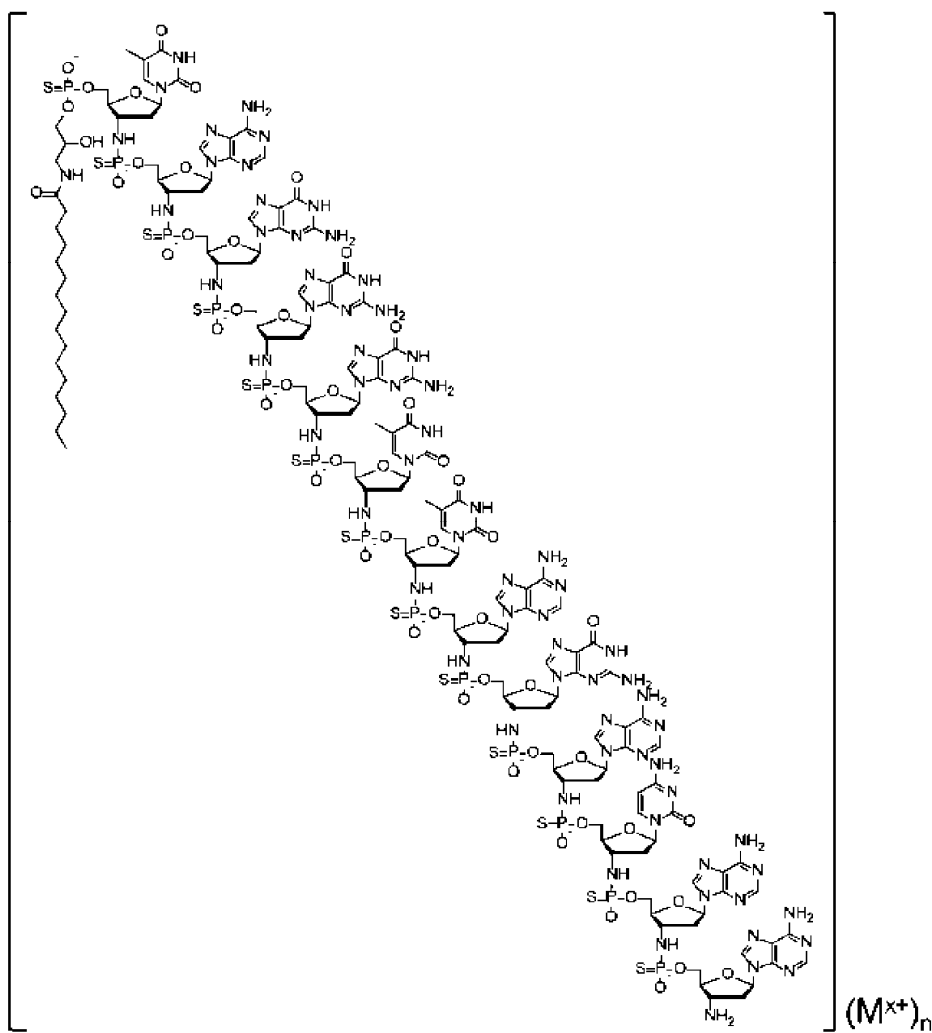
35. Осадок соли полинуклеотида по любому из пп.25-34, причем полинуклеотид содержит от 10 до 50 смежных нуклеозидов, комплементарных РНК-компоненту теломеразы человека.

36. Осадок соли полинуклеотида по любому из пп.25-35, причем все нуклеозиды соединены между собой N3'→P5' тиофосфорамидатными межнуклеозидными связями.

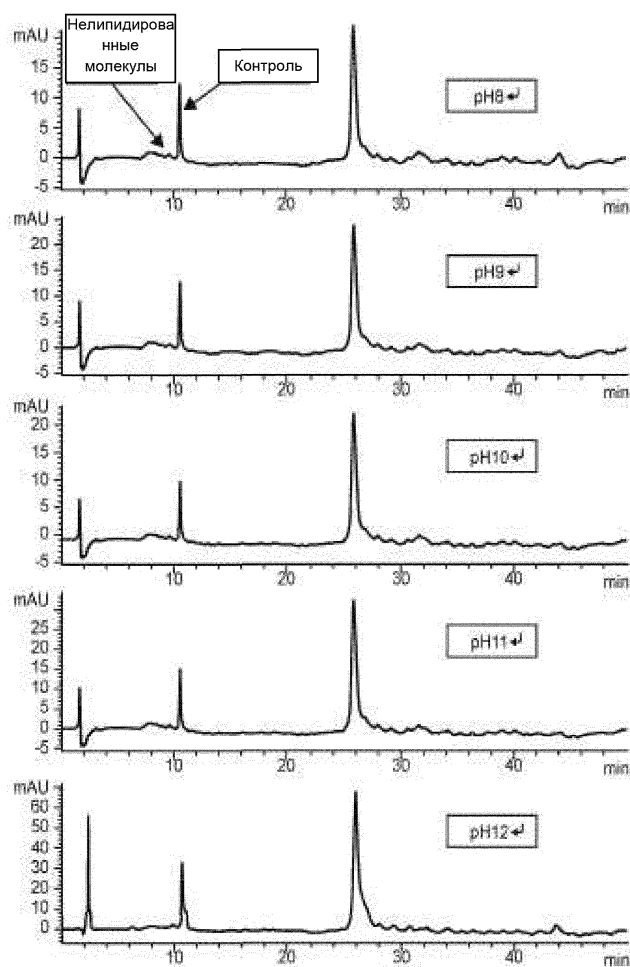
37. Осадок соли полинуклеотида по любому из пп.25-36, причем полинуклеотид содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из GTTAGGGT TAG (SEQ ID NO: 4), TAGGGTTA-GACAA (SEQ ID NO: 3) и CAGTTAGGGT TAG (SEQ ID NO: 5).

38. Осадок соли полинуклеотида по любому из пп.25-37, причем полинуклеотид конъюгирован с липидным фрагментом через опциональный линкер.

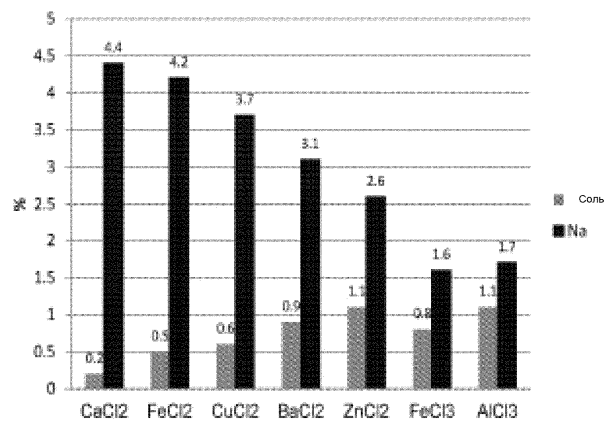
39. Осадок соли полинуклеотида по любому из пп.25-38, причем полинуклеотид имеет структуру:



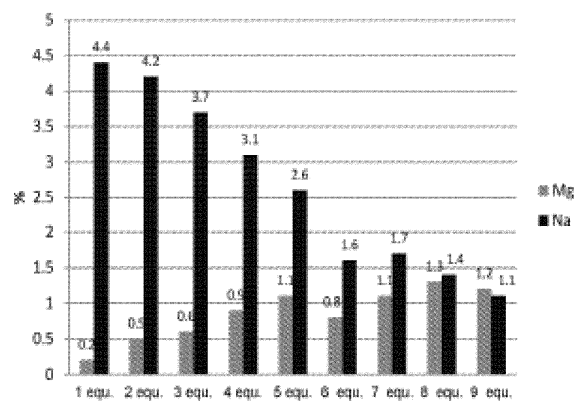
где каждый M^{x+} независимо представляет собой катионный противоион, каждый x представляет собой 1, 2 или 3 и n равно 5 до 12.



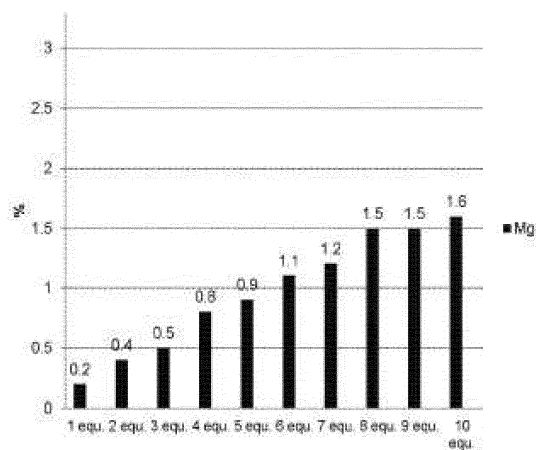
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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