

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040914**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.16

(51) Int. Cl. *C07H 1/00* (2006.01)

(21) Номер заявки
201892656

(22) Дата подачи заявки
2017.06.13

**(54) ХРОМАТОГРАФИЯ ГИДРОФОБНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ОЧИСТКИ
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ**

(31) 62/349,970; 62/492,402

(32) 2016.06.14; 2017.05.01

(33) US

(43) 2019.08.30

(86) PCT/US2017/037126

(87) WO 2017/218454 2017.12.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАЙОДЖЕН МА ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Гронке Роберт С., Джоши Ратнеш С.
(US)**

(74) Представитель:
**Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О.,
Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,
Лыу Т.Н., Строкова О.В. (RU)**

(56) US-A-6087491

WO-A1-9601268

WO-A1-2004020449

WO-A1-9847910

RAMAGE R. ET AL.: "4-(17-

Tetrabenzof[a,c,g,i]fluorenylmethyl)-41',4"-

dimethoxytrityl chloride: A hydrophobic 5'-

protecting group for the separation of synthetic

oligonucleotides", TETRAHEDRON LETTERS,

ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 34, no. 44,

29 October 1993 (1993-10-29), pages 7133-7136,

XP026637308, ISSN: 0040-4039, DOI: 10.1016/

S0040-4039(00)61618-0 [retrieved on 1993-10-29],

the whole document

(57) Изобретение относится к биохимии, а именно к способу отделения целевого олигонуклеотида от смеси, содержащей целевой олигонуклеотид и сопутствующую продукту примесь (варианты). Способ по изобретению предусматривает использование хроматографии гидрофобного взаимодействия и приводит к улучшенному отделению примесей N-1 и P=O от целевого олигонуклеотида, а также к исключению применения органических растворителей во время процесса очистки. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ по изобретению также может удалять примеси ABasic, CNEt и/или N+1.

B1

040914

040914

B1

Ссылка на родственные заявки

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет по дате подачи в соответствии с 35 U.S.C. § 119(e) по предварительной заявке США № 62/349,970, поданной 14 июня 2016 г.; и предварительной заявке США № 62/492,402, поданной 1 мая 2017 г., полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Рассматриваемая в настоящий момент заявка содержит перечень последовательностей, предоставленный в электронном виде в формате ASCII и включенный в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 12 июня 2017 г., называется 123429-00120_SL.txt и имеет размер 839 байт.

Уровень техники

Олигонуклеотиды представляют собой короткие олигомеры ДНК или РНК, которые могут быть химически синтезированы для исследовательских и медицинских целей. Олигонуклеотиды обычно получают путем последовательного добавления нуклеотидных остатков для получения специфической последовательности. Во время синтеза возможны несоответствия на любом из этапов, в результате которых в олигомере либо отсутствует нуклеозид ("примесь N-1"), либо присутствует сложная фосфодиэфирная связь вместо желаемой сложной фосфотиозэфирной связи ("примесь P=O"). Кроме того, воздействие окислительных условий во время или после синтеза может преобразовывать связь P=S в связь P=O с образованием примеси P=O. После завершения синтеза олигонуклеотида желаемой последовательности целевой олигонуклеотид получают в виде смеси вместе со всеми неудавшимися последовательностями и примесями N-1 и P=O. Затем эти примеси должны быть отделены от целевого олигонуклеотида.

Одной из широко применяемых методик отделения является жидкостная хроматография высокого давления с обращенной фазой (оф-ВЭЖХ), применяемая для очистки олигонуклеотидов, однако оф-ВЭЖХ, как правило, не может эффективно удалять примеси N-1, P=O, ABasic, CNEt и/или N+1. Другим недостатком оф-ВЭЖХ является применение значительного количества органических растворителей, что создает проблему утилизации, а также необходимость проведения очистки во взрывобезопасном помещении.

Поэтому требуются способы очистки олигонуклеотидов, которые могут удалять примеси N-1, P=O, ABasic, CNEt и/или N+1 и подходят для крупномасштабного коммерческого процесса.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении описывается способ очистки целевого олигонуклеотида с применением хроматографии гидрофобного взаимодействия (ХГВ). В частности, описанный в данном документе способ включает применение, при конкретной емкости динамической загрузки, смеси целевого олигонуклеотида и сопутствующих продукту примесей на смоле для хроматографии гидрофобного взаимодействия (или гидрофобном адсорбенте). Заявленный способ приводит к улучшенному отделению примесей N-1 и P=O от целевого олигонуклеотида, а также к исключению применения органических растворителей во время процесса очистки. В некоторых вариантах осуществления изобретения заявленный способ также может удалять примеси ABasic, CNEt и/или N+1.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу отделения целевого олигонуклеотида от смеси, содержащей целевой олигонуклеотид и сопутствующую продукту примесь, включающему этапы:

- a) добавление соли к смеси, где соль представляет собой сульфат аммония;
 - b) приведение в контакт разбавленной смеси с гидрофобным адсорбентом при емкости динамической загрузки от 32 до 78% емкости гидрофобного адсорбента, причем гидрофобный адсорбент содержит фенил или гексил;
 - c) промывание гидрофобного адсорбента с помощью водного раствора соли;
 - d) элюирование целевого олигонуклеотида с помощью элюирующего раствора;
 - e) сбор элюента, содержащего целевой олигонуклеотид,
- при этом сопутствующая продукту примесь содержит по меньшей мере одну примесь N-1.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу отделения целевого олигонуклеотида от смеси, содержащей целевой тиолированный олигонуклеотид и сопутствующую продукту примесь, включающему этапы:

- a) добавление соли к смеси, где соль представляет собой сульфат аммония;
 - b) приведение в контакт разбавленной смеси с гидрофобным адсорбентом при емкости динамической загрузки от 40 до 100% емкости гидрофобного адсорбента, причем гидрофобный адсорбент содержит фенил или гексил;
 - c) промывание гидрофобного адсорбента с помощью водного раствора соли;
 - d) элюирование целевого олигонуклеотида с помощью элюирующего раствора;
 - e) сбор элюента, содержащего целевой олигонуклеотид,
- при этом сопутствующая продукту примесь содержит по меньшей мере одну примесь P=O.

Согласно одному аспекту соль добавляют к смеси в виде водного раствора соли или соль растворяют непосредственно в смеси и скорость потока на этапе промывки меньше, чем скорость потока

загрузки.

Согласно еще одному аспекту элюирующий раствор выбран из воды, водного раствора соли, этиленгликоля или пропиленгликоля или их смесей.

Согласно еще одному аспекту сбор элюата задерживают таким образом, что он не содержит первые 1-25%, 10-25% или 5-10% пика элюирования продукта или последние 1-25%, 5-10% или 10-25% пика элюирования продукта.

Согласно еще одному аспекту целевой олигонуклеотид содержит от 15 до 25 нуклеотидов.

Согласно еще одному аспекту целевой олигонуклеотид содержит нуклеос основания, независимо выбранные из группы, состоящей из аденина, гуанина, тимина (5-метилурацила), цитозина, гипоксантина, ксантина, 7-метилгуанина, 5,6-дигидроурацила, 5-метилцитозина, 7-дезазапурина и 5-гидроксиметилцитозина.

Согласно еще одному аспекту целевой олигонуклеотид содержит сахар, который является необязательно замещенным; два атома негеминального кольца соединены мостиковой связью с образованием бициклической нуклеиновой кислоты (БНК) или атом кислорода кольца сахара замещен на S, N(R) или C(R)₂, где R представляет собой H или C₁-C₁₂-алкил и их комбинации.

Согласно еще одному аспекту сахар замещен в положении 2' с помощью O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, OCH₂C(=O)N(H)CH₃ и O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, где m и n независимо равны от 1 до 10, или сахар замещен по 2' с помощью O(CH₂)₂OCH₃.

Согласно еще одному аспекту целевой олигонуклеотид содержит только РНК, только ДНК, комбинацию РНК и ДНК или гЭмпер.

Согласно еще одному аспекту целевой олигонуклеотид содержит сложные фосфодиэфиры (P=O), фосфотиоаты (P=S) или их комбинацию.

Согласно еще одному аспекту последовательность целевого олигонуклеотида представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

Согласно еще одному аспекту целевой олигонуклеотид содержит 4,4'-диметокситритил (DMT).

Согласно еще одному аспекту сопутствующая продукту примесь дополнительно содержит по меньшей мере одну примесь P=O.

Согласно еще одному аспекту сопутствующая продукту примесь дополнительно содержит по меньшей мере одну примесь N-1.

Согласно еще одному аспекту сопутствующая продукту примесь дополнительно содержит по меньшей мере одну примесь ABasic или по меньшей мере одну примесь CNEt или по меньшей мере одну примесь N+1.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой график, изображающий взаимосвязь между емкостью динамической загрузки и удалением примеси P=O.

Фиг. 2 представляет собой график, изображающий взаимосвязь между емкостью динамической загрузки и удалением примеси N-1.

Фиг. 3 изображает приводимые в качестве примера структуры примесей ABasic, CNEt и P=O.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способам отделения олигонуклеотида от сопутствующих продукту примесей, полученных во время синтеза олигонуклеотида. Был разработан новый способ, в котором неочищенную олигонуклеотидную смесь, которая содержит не только целевой олигонуклеотид, но и различные сопутствующие продукту примеси, наносят на гидрофобный адсорбент при конкретной емкости динамической загрузки. Этот новый способ приводит к улучшению удаления определенных сопутствующих продукту примесей, в том числе примеси N-1 и примеси P=O. Такое улучшение было неожиданным, поскольку гидрофобность целевого олигонуклеотида по сравнению с его примесями N-1 и P=O, как ожидается, является аналогичной, и эти примеси не удаляются в масштабируемом процессе высокоэффективной электрофоретической хроматографии с обращенной фазой (оф-ВЭЭХ), что также основывается на гидрофобных взаимодействиях. В некоторых вариантах осуществления изобретения заявленный способ также может удалять примеси ABasic, примеси CNEt и примеси N+1, которые трудно удаляются с помощью оф-ВЭЖХ.

Первый вариант осуществления изобретения представляет собой способ отделения целевого олигонуклеотида от смеси, содержащей целевой олигонуклеотид и сопутствующую продукту примесь, включающий этапы:

- а) добавление соли к смеси;
- б) приведение в контакт разбавленной смеси с гидрофобным адсорбентом при емкости динамической загрузки от около 32 до около 78% емкости гидрофобного адсорбента;
- в) промывание гидрофобного адсорбента с помощью водного раствора соли;
- г) элюирование целевого олигонуклеотида с помощью элюирующего раствора;
- е) сбор элюента, содержащего целевой олигонуклеотид,

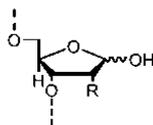
при этом сопутствующая продукту примесь содержит по меньшей мере одну примесь N-1, таким образом, обеспечивается отделение целевого олигонуклеотида от сопутствующей продукту примеси.

Второй вариант осуществления изобретения представляет собой способ отделения целевого олигонуклеотида от смеси, содержащей целевой тиолированный олигонуклеотид и сопутствующую продукту примесь, включающий этапы:

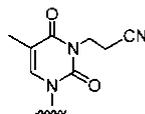
- a) добавление соли к смеси;
 - b) приведение в контакт разбавленной смеси с гидрофобным адсорбентом при емкости динамической загрузки от около 40 до около 100% емкости гидрофобного адсорбента;
 - c) промывание гидрофобного адсорбента с помощью водного раствора соли;
 - d) элюирование целевого олигонуклеотида с помощью элюирующего раствора;
 - e) сбор элюента, содержащего целевой олигонуклеотид,
- при этом сопутствующая продукту примесь содержит по меньшей мере одну примесь P=O, таким образом отделяя целевой олигонуклеотид от сопутствующей продукту примеси.

Как применяют в данном документе, "сопутствующая продукту примесь" относится к нежелательным побочным продуктам, полученным во время синтеза целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения сопутствующая продукту примесь представляет собой i) примесь N-1; ii) примесь P=O; или iii) их комбинацию; или iv) смесь любой из этих трех. Как применяют в данном документе, "примесь N-1" представляет собой олигонуклеотид, в котором отсутствует один нуклеозид в любом положении по сравнению с целевым олигонуклеотидом из-за неудавшейся реакции связывания. Как применяют в данном документе, "примесь P=O" представляет собой олигонуклеотид, который содержит сложную фосфодиэфирную связь вместо желаемой фосфотиоатной связи целевого олигонуклеотида из-за неудавшейся реакции сульфуризации или нежелательного окисления после синтеза. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ, описанный в случае первого варианта осуществления изобретения, может быть применен для удаления примеси P=O вместе с примесью N-1. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ, описанный в случае второго варианта осуществления изобретения, может быть применен для удаления примеси N-1 вместе с примесью P=O.

В некоторых вариантах осуществления изобретения сопутствующие продукту примеси также могут содержать примесь ABasic, примеси CNEt и/или N+1. Как применяют в данном документе, "примесь N+1" представляет собой олигонуклеотид, который имеет один дополнительный нуклеозид в любом положении по сравнению с целевым олигонуклеотидом. Как применяют в данном документе, "примесь ABasic" представляет собой олигонуклеотид, имеющий один или более нуклеозидов, в которых отсутствует нуклеосодержащее основание по сравнению с целевым олигонуклеотидом, причем нуклеозид имеет структуру, показанную ниже:



Приводимая в качестве примера структура примеси ABasic показана на фиг. 3. В конкретном варианте осуществления изобретения отсутствующее нуклеосодержащее основание в примеси ABasic представляет собой аденозин и/или гуанин. Как применяют в данном документе, примесь "CNEt" представляет собой олигонуклеотид, который содержит модифицированное нуклеосодержащее основание тимин вместо немодифицированного нуклеосодержащего основания тимина целевого олигонуклеотида, причем модифицированное нуклеосодержащее основание тимин имеет следующую структуру:



Приводимая в качестве примера структура примеси CNEt показана на фиг. 3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения сопутствующие продукту примеси содержат шортмерную примесь. Как применяют в данном документе, "шортмерная примесь" представляет собой олигонуклеотид, в котором отсутствуют 1, 2, 3, 4 или более нуклеозидов в любом положении по сравнению с целевым олигонуклеотидом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения сопутствующие продукту примеси содержат элюируемую ранее примесь (ЭРП). Как применяют в данном документе, "элюируемая ранее примесь" представляет собой примесь, которая элюируется перед целевым олигонуклеотидом при применении способов очистки, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления изобретения ЭРП содержит шортмерную примесь, такую как примесь N-1, примесь P=O и/или примесь ABasic.

В некоторых вариантах осуществления изобретения сопутствующая продукту примесь содержит элюируемую позже примесь (ЭПП). Как применяют в данном документе, "элюируемая позже примесь" представляет собой примесь, которая элюируется после целевого олигонуклеотида с применением способов очистки, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления изобретения ЭПП содержит примесь N+1.

"Олигонуклеотид" означает соединение, которое содержит множество связанных нуклеозидов. В отдельных вариантах осуществления изобретения один или более нуклеозидов из множества являются

модифицированными. В отдельных вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид содержит один или более рибонуклеозидов (РНК) и/или дезоксирибонуклеозидов (ДНК). В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид содержит только РНК, только ДНК или содержит и РНК, и ДНК. В конкретном варианте осуществления изобретения целевой олигонуклеотид представляет собой гзпмер. "Гзпмер" означает химерное соединение, в котором внутренняя область, имеющая множество нуклеозидов, которые способствуют расщеплению с помощью РНКазы Н, расположена между внешними областями, содержащими один или более нуклеозидов, причем содержащиеся во внутренней области нуклеозиды химически отличаются от нуклеозида или нуклеозидов, которые содержатся во внешних областях. В некоторых вариантах осуществления изобретения целевой олигонуклеотид содержит от 10 до 100, от 10 до 50, от 10 до 25, от 15 до 100, от 15 до 50 или от 15 до 25 нуклеотидов.

"Нуклеозид" означает соединение, содержащее нуклеос основание и функциональную группу сахара. Нуклеозиды включают в себя, но не ограничиваются этим, встречающиеся в природе нуклеозиды, модифицированные нуклеозиды и нуклеозиды с миметическими основаниями и/или группами сахаров. "Модифицированный нуклеозид" представляет собой нуклеозид, содержащий по меньшей мере одну модификацию по сравнению с встречающимися в природе нуклеозидами РНК или ДНК. Подобная модификация может быть в функциональной группе сахара и/или в нуклеос основании. Нуклеозиды могут быть модифицированы любым из множества заместителей либо на нуклеос основании, либо на функциональной группе сахара.

"Нуклеотид" относится к нуклеозиду, содержащему связывающую группу, которая связывает два нуклеозида вместе в качестве части олигонуклеотида. Два основных класса связывающих групп определяют по наличию или отсутствию атома фосфора. Типичные фосфорсодержащие связи содержат, но не ограничиваются этим, сложные фосфодизэфиры (P=O), сложные фосфотриэфиры, метилфосфонаты, фосфорамидат и фосфотиоаты (P=S). Типичные не содержащие фосфор связывающие группы содержат, но не ограничиваются этим, метиленметилямино (-CH₂-N/CH₃-O-CH₂-), сложный тиодизэфир (-O-C(O)-S-), тиокарбамат (-O-C(O)(NH)-S-); силосан (-O-Si(H)₂-O-) и N,N'-диметилгидразин (-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-). В конкретном варианте осуществления изобретения связывающая группа представляет собой сложный фосфодизэфир (P=O) или фосфотиоат (P=S). В некоторых вариантах осуществления изобретения целевой олигонуклеотид по способам, описанным в случае первого и второго вариантов осуществления изобретения, содержит в качестве связывающей группы только сложные фосфодизэфиры (P=O), фосфотиоаты (P=S) или их комбинацию.

"Нуклеос основание" означает гетероциклическую основную часть нуклеозида. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеос основание может содержать любой атом или группу атомов, способных образовывать водородную связь с нуклеос основанием другой нуклеиновой кислоты. Нуклеос основания могут быть встречающимися в природе или могут быть модифицированными. В дополнение к "немодифицированным" или "природным" нуклеос основаниям, таким как пуриновые нуклеос основания аденин (А) и гуанин (G) и пиримидиновые нуклеос основания тимин (Т) (или 5-метилурацил), цитозин (С) и урацил (U), многие модифицированные нуклеос основания или миметики нуклеос оснований, известные специалистам в данной области техники, способны к включению в целевые олигонуклеотиды, которые отделяются с помощью способа, описанного либо в первом, либо во втором варианте осуществления изобретения, в том числе, например, гипоксантин, ксантин, 7-метилгуанин, 5,6-дигидроурацил, 5-метилцитозин, 7-дезапурин и 5-гидрокси метилцитозин. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ является таким, как описано в случае первого или второго варианта осуществления изобретения, и нуклеос основание выбрано из аденина, гуанина, тимина (5-метилурацила) и 5-метилцитозина.

"Функциональная группа сахара" означает природный или модифицированный сахар или заместитель сахара.

"Природный сахар" означает рибофуранозную функциональную группу ДНК (2'-Н) или РНК (2'-ОН).

"Модифицированный сахар" означает рибофуранозную функциональную группу, содержащую по меньшей мере один заместитель, отличный от заместителя природного сахара. Подобные модификации содержат, без ограничения, добавление замещающих групп, мостиковое связывание негеминальных атомов кольца с образованием бициклической нуклеиновой кислоты (БНК), замену атома кислорода рибозильного кольца на S, N(R) или C(R¹)(R²) (R=H, C₁-C₁₂-алкил или защитная группа) и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления изобретения сахар модифицируют по 2'-положению для включения заместителя, отличного от Н или ОН ("2'-модифицированный" или "2'-замещенный"). В качестве альтернативы модификацию осуществляют по 5'-положению сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения сахар модифицируют по 2'-положению и 5'-положению сахара.

Примеры модификаций сахаров, применимые в данном изобретении, включают в себя, но не ограничиваются этим, соединения, содержащие замещающую группу сахара, выбранную из: ОН, F, O-алкила, S-алкила, N-алкила или O-алкил-O-алкила, где алкил, алкенил и алкинил могут быть замещенными или незамещенными C₁-C₁₀-алкилом или C₂-C₁₀-алкенилом и алкинилом. В некоторых вариантах осуществления изобретения подобные заместители выбирают из галогенида (в том числе, но не ограничиваясь этим, F), аллила, амина, азидо, тию, O-аллила, O-C₁-C₁₀-алкила, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃,

2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n) или O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), где каждый R_m и R_n представляет собой, независимо, H или замещенный или незамещенный C₁-C₁₀-алкил. В частности, модифицированные нуклеозиды, подходящие для применения в способах, описанных в первом или втором варианте осуществления изобретения, представляют собой 2'-метоксиэтокси ("MOE", или "2'-MOE", или 2'-OCH₂CH₂OCH₃), 2'-O-метил ("2'-OMe" или 2'-O-CH₃) или 2'-фтор (2'-F).

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные нуклеозиды, имеющие замещающую группу в 2'-положении, выбраны из O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, OCH₂C(=O)N(H)CH₃ и O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, где n и m независимо равны от 1 до около 10. Другие 2'-сахарозамещающие группы включают в себя C₁-C₁₀-алкил, замещенный алкил, алкенил, алкинил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклил и аминоклиламино.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные нуклеозиды, имеющие замещающую группу на атоме кислорода в 5'-положении, выбраны из ацетила (Ac); бензоила (Bz); бензила (Bn); β-метоксиэтоксиметилового эфира (MEM); диметокситритила, [бис-(4-метоксифенил)фенилметила] (DMT); метоксиметилового эфира (MOM); метокситритил[(4-метоксифенил)дифенилметила, MMT]; п-метоксибензилового эфира (PMB); метилтиометилового эфира; пивалоила (Piv); тетрагидропирирана (THP); тетрагидрофурана (THF); тритила (трифенилметила, Tr); силилового эфира (в том числе, но не ограничиваясь этим, триметилсилилового (TMS), трет-бутилдиметилсилилового (TBDMS), три-изопропилсилилоксиметилового (ТОМ) и три-изопропилсилилового (TIPS) эфиров); метиловых эфиров, этоксиэтиловых эфиров (EE) и 5'-O-(α-метил-6-нитропиперонилоксикарбонила) (MeNPOC). В конкретном варианте осуществления изобретения 5'-положение представляет собой -ODMT.

Примеры нуклеозидов, которые имеют модифицированные функциональные группы сахаров, содержат, без ограничения, нуклеозиды, содержащие замещающие группы 5'-винил, 5'-метил, 5'-ODMT, 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃ и 2'-O(CH₂)₂OCH₃.

В некоторых вариантах осуществления изобретения 2'-сахарозамещающие группы находятся либо в арабино-положении (вверх), либо рибо-положении (вниз). В некоторых подобных вариантах осуществления изобретения 2'-арабино модификация представляет собой 2'-F арабино (FANA). Подобные модификации также могут быть осуществлены в других положениях сахара, в частности в 3'-положении сахара на 3'-концевом нуклеозиде или в 2'-5'-связанных олигонуклеотидах и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида.

Как применяют в данном документе, термин "алкил" соответствует полностью насыщенную разветвленную или неразветвленную углеводородную функциональную группу. Предпочтительно алкил содержит от 1 до 20 атомов углерода, более предпочтительно от 1 до 16 атомов углерода, от 1 до 10 атомов углерода, от 1 до 6 атомов углерода или от 1 до 4 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления изобретения алкил содержит от 6 до 20 атомов углерода. Типичные примеры алкила включают в себя, но не ограничиваются этим, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, н-пентил, изопентил, неопентил, н-гексил, 3-метилгексил, 2,2-диметилпентил, 2,3-диметилпентил, н-гептил, н-октил, н-нонил или н-децил.

"Алкенил" соответствует ненасыщенной углеводородной группе, которая может быть линейной или разветвленной и имеет по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод. Предпочтительными могут быть алкенильные группы с 2-6 атомами углерода. Алкенильная группа может содержать 1, 2 или 3 двойные связи углерод-углерод или более. Примеры алкенильных групп включают в себя этенил, н-пропенил, изопропенил, н-бут-2-енил, н-гекс-3-енил и т.п.

"Алкинил" соответствует незамещенной углеводородной группе, которая может быть линейной или разветвленной и имеет по меньшей мере одну тройную связь углерод-углерод. Предпочтительными могут быть алкинильные группы с 2-6 атомами углерода. Алкинильная группа может содержать 1, 2 или 3 тройные связи углерод-углерод или более. Примеры алкинильных групп включают в себя этинил, н-пропинил, н-бут-2-инил, н-гекс-3-инил и т.п.

Термин "арил" соответствует моноциклическим, бициклическим или трициклическим ароматическим углеводородным группам, имеющим от 6 до 14 атомов углерода в кольцевой части. В одном варианте осуществления изобретения термин "арил" соответствует моноциклическим и бициклическим ароматическим углеводородным группам, имеющим от 6 до 10 атомов углерода. Типичные примеры арильных групп включают в себя фенил, нафтил, флуоренил и антраценил. Термин "арил" также соответствует бициклической или трициклической группе, в которой по меньшей мере одно кольцо является ароматическим и слитым с одним или двумя неароматическими углеводородными кольцами. Неограничивающие примеры включают в себя тетрагидронафталин, дигидронафталинил и инданил. "Арилалкил" представляет собой арильную группу, связанную посредством алкиленового линкера с остатком молекулы. "Алкарил" представляет собой алкильную группу, связанную посредством ариленового линкера с остатком молекулы.

Как применяют в данном документе, термин "гетероциклил" соответствует насыщенной или ненасыщенной, моноциклической или бициклической (например, соединенные мостиковой связью или спи-

рокольцевые системы) кольцевой системе, которая имеет от 3 до 7 членов кольца, или, в частности, от 3 до 6 членов кольца, или от 5 до 7 членов кольца, по меньшей мере один из которых представляет собой гетероатом и до 4 (например, 1, 2, 3 или 4) из которых могут быть гетероатомами, причем гетероатомы независимо выбраны из O, S и N, и при этом C может быть окислен (например, C(O)), N может быть окислен (например, N(O)) или кватернизован, а S может быть необязательно окислена до сульфоксида и сульфона. Ненасыщенные гетероциклические кольца включают в себя гетероарильные кольца. Как применяют в данном документе, термин "гетероарил" соответствует ароматической 5- или 6-членной моноциклической кольцевой системе, имеющей от 1 до 4 гетероатомов, независимо выбранных из O, S и N, и при этом N может быть окислен (например, N(O)) или кватернизован, а S может быть необязательно окислена до сульфоксида и сульфона. В одном варианте осуществления изобретения гетероцикл представляет собой 3-7-членное насыщенное моноциклическое, или 3-6-членное насыщенное моноциклическое, или 5-7-членное насыщенное моноциклическое кольцо. В другом варианте осуществления изобретения гетероцикл представляет собой 3-7-членное моноциклическое, или 3-6-членное моноциклическое, или 5-7-членное моноциклическое кольцо. В другом варианте осуществления изобретения гетероцикл представляет собой 6-7-членное бициклическое кольцо. Гетероциклическая группа может быть присоединена на гетероатоме или атоме углерода.

"Бициклический нуклеозид" или "БНК" означает нуклеозид, в котором функциональная группа сахара нуклеозида содержит мостик, соединяющий два атома углерода кольца сахара, тем самым образуя бициклическую функциональную группу сахара. Примеры БНК включают в себя, без ограничения, нуклеозиды, содержащие мостик между 4' и 2' атомами рибозильного кольца ("4'-2' бициклический нуклеозид"), например фуранозное кольцо, содержащее мостик, соединяющий два атома углерода фуранозного кольца для соединения 2' атома углерода и 4' атома углерода кольца сахара.

В некоторых вариантах осуществления изобретения целевой олигонуклеотид содержит один или более нуклеозидов БНК, в которых мостик содержит одну структуру из формул: 4'- β -D-(CH₂)-O-2' (β -D-LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'- α -L-(CH₂)-O-2' (α -L-LNA); 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-C(CH₃)₂-O-2' (см. PCT/US2008/068922); 4'-CH(CH₃)-O-2' (cEt) и 4'-C-H(CH₂OCH₃)-O-2' (см. патент США № 7399845, выданный 15 июля 2008 г.); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (см. PCT/US2008/064591); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (см. опубликованную патентную заявку США US2004-0171570, опубликованную 2 сентября 2004 г.); 4'-CH₂-N(R)-O-2' (см. патент США № 7427672, выданный 23 сентября 2008 г.); 4'-CH₂-C(CH₃)-2' и 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (см. PCT/US2008/066154); и где R представляет собой, независимо, H, C₁-C₁₂-алкил или защитную группу. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает модифицированные нуклеозиды, содержащие модифицированные функциональные группы сахаров, которые не являются функциональными группами бициклического сахаров.

"Заменитель сахара" означает структуру, отличную от рибофуранозного кольца, которая способна заменять сахар нуклеозида. Примеры заменителей сахара включают в себя, но не ограничиваются этим, 6-членные кольца, сахара, в которых кислород заменен, например, на серу или азот, с образованием, например, морфолиновых и 4'-тиосодержащих сахаров.

В некоторых вариантах осуществления изобретения целевой олигонуклеотид, отделенный способом, описанным в первом или втором варианте осуществления изобретения, представляет собой фосфотиоатный олигонуклеотид, имеющий последовательность (от 5' до 3'):

ТСАСТТТСАТААТГСТГГ (SEQ ID NO: 1),

причем каждая межнуклеозидная связь олигонуклеотида представляет собой фосфотиоатную связь, каждый нуклеозид олигонуклеотида представляет собой 2'-метоксиэтильный (МОЕ) нуклеозид и каждый цитозин представляет собой 5'-метилцитозин.

Последовательность SEQ ID NO: 1, также известна как ВПВ058 и описана в WO 2007/002390, WO 2010/148249 и US 8980853, идеи которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения целевой олигонуклеотид, отделенный способом, описанным в первом или втором варианте осуществления изобретения, представляет собой гэмпер 5-10-5 МОЕ, имеющий последовательность (от 5' до 3'):

САГГАТАСАТТТСТАСАГСТ (SEQ ID NO: 2),

в котором каждый из нуклеозидов 1-5 и 16-20 представляет собой модифицированные 2'-О-метоксиэтилрибозные нуклеозиды, а каждый из нуклеозидов 6-15 представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, причем межнуклеозидные связи между нуклеозидами 2-3, 4-5, 16-17 и 18-19 представляют собой сложные фосфодифирные связи, а межнуклеозидные связи между нуклеозидами 1-2, 3-4, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 17-18 и 19-20 представляют собой фосфотиоатные связи, и при этом каждый цитозин представляет собой 5'-метилцитозин.

Последовательность SEQ ID NO: 2 описывают следующим химическим обозначением:

mCes Aeо Ges Geo Aes Tds Ads mCds Ads Tds mCds Tds Ads mCeо Aes Geo mCes Te,

где A = аденин,

mC = 5'-метилцитозин,

G = гуанин,

T = тимин,
 e = модифицированный 2'-О-метоксиэтилрибозный сахар,
 d = 2'-дезоксирибозный сахар,
 s = фосфотиоатная межнуклеозидная связь и
 o = сложная фосфодиэфирная связь.

Последовательность SEQ ID NO: 2 также известна как ВПВ067 или ISIS 666853 и описана в WO 2015/153800, идеи которой включены в настоящий документ посредством ссылки.

Гидрофобный адсорбент (т.е. "гидрофобная смола") представляет собой любой материал, с которым целевой олигонуклеотид будет связываться таким образом, что он может быть отделен от сопутствующих продукту примесей в способе, описанном в первом или втором варианте осуществления изобретения. Например, гидрофобный адсорбент содержит гидрофильные углеводы: перекрестно сшитую агарозу и синтетические сополимерные материалы. В частности, гидрофобный адсорбент содержит любой из фенила, бутила либо гексила. Например, Неху1650С представляет собой подходящий гидрофобный адсорбент. Кроме того, гидрофобный адсорбент упаковывают при толщине слоя по меньшей мере 15 см, например по меньшей мере 20 см, по меньшей мере 25 см или по меньшей мере 30 см; или от около 15 до около 30 см; от около 15 до 20 см, от около 20 до около 25 см; или от около 25 см до около 30 см.

"Емкость динамической загрузки" определяют как количество продукта (например, олигонуклеотидного продукта), которое будет связываться с хроматографической смолой в типичных условиях потока и которое определяют в соответствии со специфическими условиями потока и конкретной концентрацией загружаемой соли, среди других факторов загрузки, известных специалисту в данной области техники. Ее рассчитывают на основе количества, которое может быть нагружено, до того как в проходящем потоке появляются измеряемые уровни продукта (называется "точкой прорыва"). В частности, подлежащий отделению материал наносят на смолу в режиме потока (в противоположность статическому нанесению, выполняемому в периодическом режиме) при определенной скорости потока, например от около 100 до около 250 см/ч и, в частности 200 см/ч. Специалисту в данной области будет известно, как выбрать и концентрацию соли в зависимости от растворимости продукта в этой соли, и скорость потока, основанную на размере гранул, толщине слоя и других переменных, так чтобы не превышать входное давление для достижения конкретного соотношения динамической загрузки.

Например, если емкость гидрофобного адсорбента в случае олигонуклеотидной смеси составляет 50 мг/мл (динамическая), применение 50 мг/мл смеси может быть осуществлено при 100% емкости динамической загрузки. Аналогичным образом, для 50 мг/мл гидрофобного адсорбента применение 25 мг/мл смеси может быть осуществлено при 50% емкости динамической загрузки. Для способа, описанного в первом варианте осуществления изобретения, емкость динамической загрузки составляет от около 32 до около 78%, например от около 32 до около 45%, от около 40 до около 50%, от около 45 до около 55%, от около 50 до около 60%, от около 55 до около 65%, от около 60 до около 70%, от около 65 до около 78% или от около 32 до около 50%, от около 40 до около 75% или от около 50 до около 78%.

Для способа, описанного во втором варианте осуществления изобретения, емкость динамической загрузки составляет от около 40 до около 100%, например от около 40 до около 50%, от около 50 до около 60%, от около 60 до около 70%, от около 70 до около 80%, от около 80 до около 90%, от около 90 до около 100%, от около 40 до около 75%, или от около 40 до около 60%, или от около 40 до около 80%.

Для способа, описанного и в первом и во втором вариантах осуществления изобретения, емкость динамической загрузки составляет от около 40 до около 78%, например от около 40 до около 45%, от около 45 до около 50%, от около 50 до около 55%, от около 55 до около 60%, от около 60 до около 65%, от около 65 до около 70%, от около 70 до около 75% или от около 40 до около 50%, от около 40 до около 75% или от около 50 до около 78%.

В третьем варианте осуществления изобретения способ является таким, как описано в случае либо первого, либо второго варианта осуществления изобретения, и в котором добавляют соль к смеси в виде водного раствора соли или соль растворяют непосредственно в смеси. В частности, соль включает в себя любой катион из NH_4^+ , K^+ или Na^+ и любой анион, состоящий из F^- , $[\text{SO}_4]^{2-}$, $[\text{HPO}_4]^{2-}$, ацетата или Cl^- или их комбинации. В частности, соль представляет собой сульфат аммония.

В четвертом варианте осуществления изобретения способ является таким, как описано в случае любого из первого, второго или третьего вариантов осуществления изобретения, в котором скорость потока на этапе промывки меньше, чем скорость потока загрузки. В частности, скорость потока этапа загрузки составляет от около 150 до около 250 см/ч, а скорость потока этапа промывки составляет от около 50 до около 150 см/ч, например скорость потока этапа загрузки составляет от около 175 до около 225 см/ч, а скорость потока этапа промывки составляет от около 75 до около 125 см/ч. В частности, скорость потока этапа загрузки составляет от около 200 см/ч, а скорость потока этапа промывки составляет от около 100 см/ч.

В пятом варианте осуществления изобретения способ является таким, как описано в случае любого из первого, второго, третьего или четвертого вариантов осуществления изобретения, в котором элюи-

рующий раствор выбран из воды, водного раствора соли, этиленгликоля или пропиленгликоля или их смесей. В частности, соль включает в себя любой катион из NH_4^+ , K^+ или Na^+ и любой анион, состоящий из F^- , $[\text{SO}_4]^{2-}$, $[\text{HPO}_4]^{2-}$, ацетата или Cl^- или их комбинации. В частности, соль представляет собой сульфат аммония.

В шестом варианте осуществления изобретения способ является таким, как описано в случае любого из первого, второго, третьего, четвертого или пятого вариантов осуществления изобретения, в котором сбор элюата задерживают таким образом, что он не содержит первые 2-25%, первые 2-10%, первые 2-8%, первые 4-6%, первые 5-10% или первые 10-25% пика элюирования продукта. В более специфическом варианте осуществления изобретения сбор задерживают таким образом, что он не содержит первые 5% пика элюирования продукта. В частности, элюент собирают во фракции и размер фракции регулируют для отделения целевого олигонуклеотида от сопутствующих продукту примесей в отдельных фракциях. Размер фракции может быть легко определен специалистом в данной области техники, частично в зависимости от разницы во времени элюирования между олигонуклеотидом и сопутствующей продукту примеси, количеством неочищенного продукта, содержащего целевой олигонуклеотид, и сопутствующих продукту примесей, которые должны быть отделены, и т.д.

Также в шестом варианте осуществления изобретения способ является таким, как описано в случае любого из первого, второго, третьего, четвертого или пятого вариантов осуществления изобретения, в котором сбор элюата не содержит первые и последние 2-25% пика элюирования продукта. Более конкретно, сбор элюата не содержит первые и последние 2-10%, первые и последние 2-8%, первые и последние 4-6%, первые и последние 5-10% или первые и последние 10-25% пика элюирования продукта. В другом специфическом варианте осуществления изобретения сбор элюата не содержит первые и последние 5% пика элюирования продукта.

В одном варианте осуществления изобретения раствор для промывания поддерживают постоянным во время этапа промывки, известного как изократический режим промывки. В качестве альтернативы промывающий раствор изменяют во время этапа промывки, известного как градиентный режим промывки. При градиентной промывке раствор для промывания может быть изменен от высокой ионной силы или полярности до низкой ионной силы или полярности. Уменьшение полярности или ионной силы может быть достигнуто путем уменьшения концентрации соли водного раствора или увеличения объемного соотношения более полярного растворителя, например воды или других полярных растворителей, например этиленгликоля или пропиленгликоля с более высоким содержанием соли. В качестве альтернативы раствор для промывания может быть изменен от низкой полярности или высокой ионной силы до высокой полярности или низкой ионной силы. В другом альтернативном варианте после этапа градиентной промывки может быть выполнен этап изократической промывки или *vice versa*.

В одном варианте осуществления изобретения элюирующий раствор поддерживают постоянным во время элюирования, что известно как изократический режим элюирования. В качестве альтернативы элюирующий раствор изменяют во время элюирования, что известно как градиентный режим элюирования. При градиентном элюировании элюирующий раствор может быть изменен от высокой ионной силы или низкой полярности до низкой ионной силы или высокой полярности. Увеличение полярности или уменьшение ионной силы может быть достигнуто путем уменьшения концентрации соли водного раствора или увеличения объемного соотношения более полярного растворителя, например воды или другого полярного растворителя, например этиленгликоля или пропиленгликоля с более высоким содержанием соли. В качестве альтернативы элюирующий раствор может быть изменен от низкой полярности или высокой ионной силы до высокой полярности или низкой ионной силы. В другом альтернативном варианте после градиентного элюирования может быть выполнено изократическое элюирование или *vice versa*.

В одном варианте осуществления изобретения способ по настоящему изобретению, описанный в данном документе, также может удалять ЭРП и/или ЭПП. В другом варианте осуществления изобретения способ по настоящему изобретению, описанный в данном документе, может удалять по меньшей мере одну сопутствующую продукту примесь, выбранную из шортмерной примеси, примеси N+1, примеси ABasic, примеси CNEt и примеси P=O. В другом варианте осуществления изобретения способ по настоящему изобретению, описанный в данном документе, может удалять примесь N-1, примесь P=O и по меньшей мере одну сопутствующую продукту примесь, выбранную из шортмерной примеси, отличной от примеси N-1, примеси N+1, примеси ABasic и примеси CNEt. В другом варианте осуществления изобретения способ по настоящему изобретению, описанный в данном документе, может удалять примесь N-1, примесь P=O, шортмерную примесь, отличную от примеси N-1, примеси N+1, примеси ABasic и примеси CNEt.

"Отделение целевого олигонуклеотида от смеси, содержащей целевой олигонуклеотид и сопутствующую продукту примесь" или "удаление сопутствующей продукту примеси" означает удаление из смеси по меньшей мере 15%, например 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60%, одной или более сопутствующих продукту примесей, описанных в данном документе, например примеси N-1, примеси P=O, примеси ABasic, примеси CNEt или примеси N+1.

Иллюстративные примеры

Пример 1. Удаление примеси N-1 или P=O.

Материалы:

Колонка: 6,84 мл Phenyl Sepharose Fast Flow High Sub.

Толщина слоя: 20 см.

Буфер для разбавления продукта: 850 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5.

Уравновешивающий буфер: 800 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5.

Загрузка неочищенного продукта: 765 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5.

Промывочный буфер: 440 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5.

Элюирующий буфер: 40 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5.

Освобождение: деионизированная вода.

Очистка на месте: 1н. гидроксид натрия.

Хранение: 0,1н. гидроксид натрия УФ-контроль: 295 нм.

Методика:

Подготовка образца: Образец (SEQ ID NO: 2) разбавляли 10-кратно с помощью буфера для разбавления (конечная концентрация сульфата аммония составляет 765 мМ).

Методика проведения циклов: Колонку уравновешивали с помощью 4 объемов колонки (ОК) 800 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5 при 200 см/ч. Образец загружали при скорости 200 см/ч при трех различных емкостях динамической загрузки:

в случае опыта 1: загружали при емкости динамической загрузки 8,8%;

в случае опыта 2: загружали при емкости динамической загрузки 47%;

в случае опыта 3: загружали при емкости динамической загрузки 100%.

Колонку промывали с помощью 7 ОК 440 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5 при 100 см/ч.

Колонку элюировали с помощью 6 ОК 40 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5 при 200 см/ч.

Колонку освобождали с помощью 2 ОК деионизированной воды при 200 см/ч.

Колонку очищали с помощью 3 ОК 1н. гидроксида натрия при 200 см/ч и хранили в 3 ОК 0, 1н. гидроксиде натрия при 200 см/ч.

Результаты: Относительные величины удаления примесей n-1 и P=O приведены в табл. 1 и 2 соответственно.

Таблица 1

Удаление примеси N-1

| Примесь | Исходный уровень в % в неочищенном продукте | Количество в элюате ХГВ при низкой загрузке (4 мг/мл) опыт 1 | Количество в элюате ХГВ при средней загрузке (21 мг/мл) опыт 2 | Количество в элюате ХГВ при высокой загрузке (45 мг/мл) опыт 3 |
|---------|---|--|--|--|
| N-1 | 3,2 | 3,2 | 2,6 | 4,4 |

Таблица 2

Удаление примеси P=O

| Примесь | Исходный уровень % в неочищенном продукте | Количество в элюате ХГВ при низкой загрузке (4 мг/мл) опыт 1 | Количество в элюате ХГВ при средней загрузке (21 мг/мл) опыт 2 |
|---------|---|--|--|
| P=O | 2,6 | 3,9 | 2,1 |

На основании результатов, описанных в табл. 1 и 2, применение соответствующей емкости динамической загрузки является необходимым условием для удаления примесей n-1 и P=O.

Пример 2. Взаимосвязь между емкостью динамической загрузки и удалением примеси P=O.

Оценка влияния емкости динамической загрузки на удаление сопутствующей продукту примеси P=O осуществляли с применением программного обеспечения Design of Experiment (DesignExpert™ v9). Тип статистического расчета представлял собой центральный композиционный план. Тип исследования представлял собой поиск поверхности отклика. Осуществляли 50 опытов с помощью колонки Phenyl Sepharose с толщиной слоя 20 см и емкостью динамического связывания 45 мг/мл. Промывочный буфер представлял собой 440 мМ сульфат аммония, а элюирующий буфер представлял собой 40 мМ сульфат аммония. Применяли семь и шесть объемов колонки промывочного и элюирующего буфера соответственно. Последовательность SEQ ID NO: 2 применяли в качестве олигонуклеотида с применением тех же условий, которые описаны выше в примере 1.

Результаты анализа показывают, что в случае примеси P=O наблюдается улучшение в удалении

примеси Р=О при условии, что емкость загрузки составляет 42-100% (т.е. 19-45 мг/мл на графике на фиг. 1).

Пример 3. Взаимосвязь между емкостью динамической загрузки и удалением примеси N-1.

Оценка влияния емкости динамической загрузки на удаление сопутствующей продукту примеси N-1 показана на фиг. 2. Результаты пяти опытов нанесены на график на фиг. 2 и соответствуют емкости загрузки 9, 24, 47, 69 и 100% 45 мг/мл гидрофобного адсорбента. Процент снижения N-1 рассчитывали исходя из исходных уровней N-1 в неочищенном продукте. При анализе сделан вывод, что коэффициент загрузки является единственным фактором, который является значимым в снижении N-1. Поэтому другие переменные для снижения N-1, согласно статистическому анализу, являются незначимыми.

Материалы:

Колонка: 6,84 мл Phenyl Sepharose Fast Flow High Sub (Ge Healthcare Life Sciences, P/C: 17-0973-05).

Толщина слоя: 20 см.

Буфер для разбавления продукта: 850 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5.

Уравновешивающий буфер: 800 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5.

Загрузка неочищенного продукта: 765 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5.

Промывочные буферы: 440 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5 400 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5.

Элюирующий буфер: 40 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5.

10 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5.

Освобождение: деионизированная вода.

Очистка на месте: 1н. гидроксид натрия.

Хранение: 0,1н. гидроксид натрия.

УФ-контроль: 295 нм.

Методика:

Подготовка образца: Образец (SEQ ID NO: 2) разбавляли 10-кратно с помощью буфера для разбавления (конечная концентрация сульфата аммония составляет 765 мМ).

Методика проведения циклов: Колонку уравновешивали с помощью 4 объемов колонки (ОК) 800 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5 при 200 см/ч. Образец нагружали при скорости 200 см/ч при пяти различных соотношениях загрузки, указанных в табл. 3.

Таблица 3

Переменные DoE для снижения N-1, основываясь на опытах по количеству загрузки

| Загруженное количество | Промывочный буфер (мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5) | Промывочный ОК | Элюирующий буфер (мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5) | Элюирование ОК |
|------------------------|---|----------------|--|----------------|
| 9 | 440 | 7 | 40 | 6 |
| 24 | 400 | 10 | 10 | 10 |
| 47 | 440 | 7 | 40 | 6 |
| 69 | 400 | 4 | 10 | 2 |
| 100 | 440 | 7 | 40 | 6 |

Колонку промывали при 100 см/ч с помощью определенных в табл. 3 промывочного буфера и ОК. Колонку элюировали при 200 см/ч с помощью определенных в табл. 3 элюирующего буфера и ОК. Колонку освобождали с помощью 2 ОК деионизированной воды при 200 см/ч. Колонку очищали с помощью 3 ОК 1н. гидроксида натрия при 200 см/ч и хранили в 3 ОК 0, 1н. гидроксида натрия при 200 см/ч.

Как показано на фиг. 2, наблюдается улучшение в удалении примеси N-1 при условии, что емкость загрузки составляет от 40 до 78%.

Пример 4. Удаление примесей ABasic, CNEt или N+1.

Материалы:

Колонка: 81 мл, упакованная с Phenyl Sepharose Fast Flow High Sub.

Толщина слоя: 15 см; Диаметр слоя: 2,6 см.

Буфер для разбавления продукта: 575 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5.

Уравновешивающий буфер: 500 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5.

Загрузка неочищенного продукта: 500 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5.

Промывочный буфер: 250 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5.

Элюирующий буфер: 10 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, pH 8,5.

Освобождение: вода.

Очистка на месте: 1н. гидроксида натрия.

Хранение: 0,1н. гидроксид натрия.

УФ-контроль: 295 нм.

Методика:

Подготовка образца: Неочищенный образец (SEQ ID NO: 1) разбавляли 7,7-кратно с помощью буфера для разбавления продукта (конечная концентрация сульфата аммония составляет 500 мМ).

Методика для хроматографической колонки: Колонку кондиционировали с помощью 5 объемов колонки (ОК) 500 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, рН 8,5 при 150 см/ч.

Разбавленный неочищенный образец нагружали при скорости потока 150 см/ч при емкости динамической загрузки 47% (26,5 мг продукта/мл смолы).

Колонку промывали с помощью 7 ОК 250 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, рН 8,5 при 75 см/ч.

Колонку элюировали с помощью 9 ОК 10 мМ сульфата аммония, 50 мМ трис, рН 8,5 при 150 см/ч и собирали пик.

Колонку освобождали с помощью 3 ОК деионизированной воды при 150 см/ч.

Колонку очищали с помощью 3 ОК 1н. гидроксида натрия при 150 см/ч и хранили в 3 ОК 0,1н. гидроксида натрия при 150 см/ч.

Результаты:

Относительные величины удаления примесей ABasic, CNEt и N+1 относительно количества в неочищенном виде приведены в табл. 4-6 соответственно.

Таблица 4

Удаление примеси ABasic

| Примесь | Исходный уровень в % в неочищенном продукте | Уровень в % в ХГВ элюате |
|---------|---|--------------------------|
| ABasic | 0,34 | 0,19 |

Таблица 5

Удаление примеси CNEt

| Примесь | Исходный уровень в % в неочищенном продукте | Уровень в % в ХГВ элюате |
|---------|---|--------------------------|
| N+1 | 0,31 | 0,20 |

Таблица 6

Удаление примеси N+1

| Примесь | Исходный уровень в % в неочищенном продукте | Уровень в % в ХГВ элюате |
|---------|---|--------------------------|
| N+1 | 1,25 | 0,20 |

На основании результатов, приведенных в табл. 4-6, загрузка ХГВ-колонки в центральной области ее емкости динамического связывания позволяет удалять примеси ABasic, CNEt и N+1.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ отделения целевого олигонуклеотида от смеси, содержащей целевой олигонуклеотид и сопутствующую продукту примесь, включающий этапы:

- добавление соли к смеси, где соль представляет собой сульфат аммония;
- приведение в контакт разбавленной смеси с гидрофобным адсорбентом при емкости динамической загрузки от 32 до 78% емкости гидрофобного адсорбента, причем гидрофобный адсорбент содержит фенил или гексил;
- промывание гидрофобного адсорбента с помощью водного раствора соли;
- элюирование целевого олигонуклеотида с помощью элюирующего раствора;
- сбор элюента, содержащего целевой олигонуклеотид, при этом сопутствующая продукту примесь содержит по меньшей мере одну примесь N-1.

2. Способ отделения целевого олигонуклеотида от смеси, содержащей целевой тиолированный олигонуклеотид и сопутствующую продукту примесь, включающий этапы:

- добавление соли к смеси, где соль представляет собой сульфат аммония;
- приведение в контакт разбавленной смеси с гидрофобным адсорбентом при емкости динамической загрузки от 40 до 100% емкости гидрофобного адсорбента, причем гидрофобный адсорбент содержит фенил или гексил;
- промывание гидрофобного адсорбента с помощью водного раствора соли;
- элюирование целевого олигонуклеотида с помощью элюирующего раствора;

е) сбор элюента, содержащего целевой олигонуклеотид, при этом сопутствующая продукту примесь содержит по меньшей мере одну примесь P=O.

3. Способ по п.1 или 2, в котором соль добавляют к смеси в виде водного раствора соли или соль растворяют непосредственно в смеси и в котором скорость потока на этапе промывки меньше, чем скорость потока загрузки.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором элюирующий раствор выбран из воды, водного раствора соли, этиленгликоля или пропиленгликоля или их смесей.

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором сбор элюата задерживают таким образом, что он не содержит первые 1-25%, 10-25% или 5-10% пика элюирования продукта или последние 1-25%, 5-10% или 10-25% пика элюирования продукта.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором целевой олигонуклеотид содержит от 15 до 25 нуклеотидов.

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором целевой олигонуклеотид содержит нуклеосложения, независимо выбранные из группы, состоящей из аденина, гуанина, тимина (5-метилурацила), цитозина, гипоксантина, ксантина, 7-метилгуанина, 5,6-дигидроурацила, 5-метилцитозина, 7-дезазапурина и 5 гидроксиметилцитозина.

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором целевой олигонуклеотид содержит сахар, который является необязательно замещенным; два атома негеминального кольца соединены мостиковой связью с образованием бициклической нуклеиновой кислоты (БНК) или атом кислорода кольца сахара замещен на S, N(R) или C(R)₂, где R представляет собой H или C₁-C₁₂-алкил и их комбинации.

9. Способ по п.8, в котором сахар замещен в положении 2' с помощью O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, OCH₂C(=O)N(H)CH₃ и O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, где n и m независимо равны от 1 до 10, или сахар замещен по положению 2' с помощью O(CH₂)₂OCH₃.

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором целевой олигонуклеотид содержит только РНК, только ДНК, комбинацию РНК и ДНК или гЭпмер.

11. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором целевой олигонуклеотид содержит сложные фосфодиэфиры (P=O), фосфотиоаты (P=S) или их комбинацию.

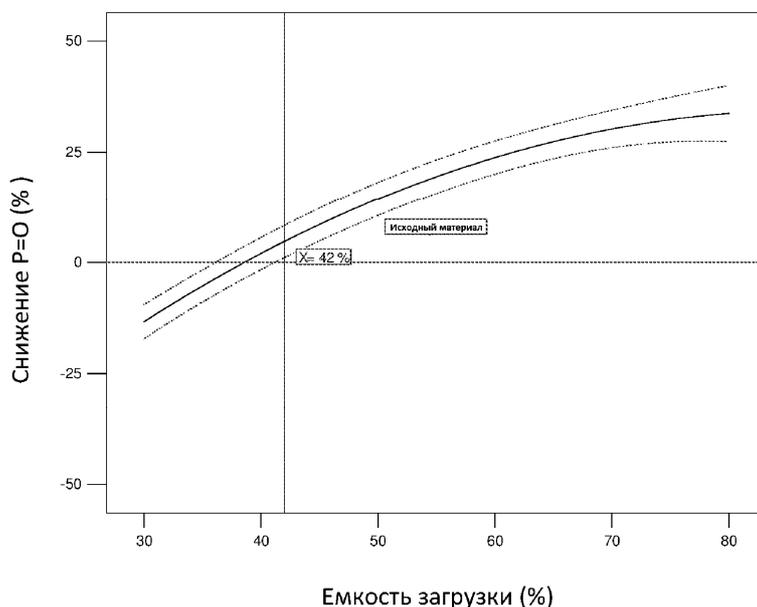
12. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором последовательность целевого олигонуклеотида представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

13. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором целевой олигонуклеотид содержит 4,4'-диметокситритил (DMT).

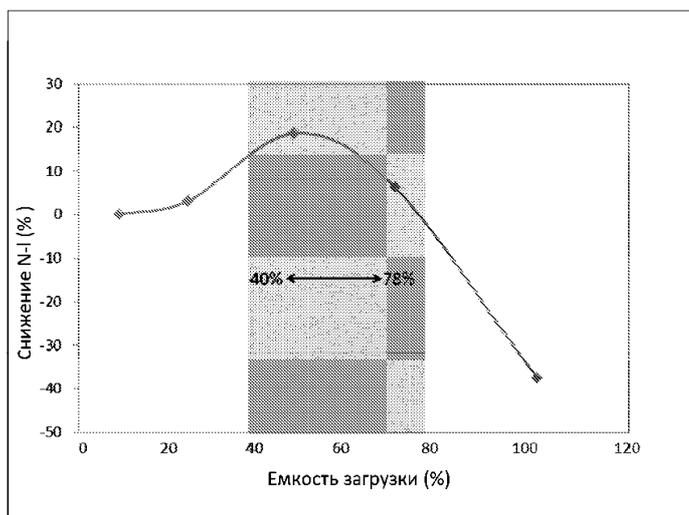
14. Способ по п.1, в котором сопутствующая продукту примесь дополнительно содержит по меньшей мере одну примесь P=O.

15. Способ по п.2, в котором сопутствующая продукту примесь дополнительно содержит по меньшей мере одну примесь N-1.

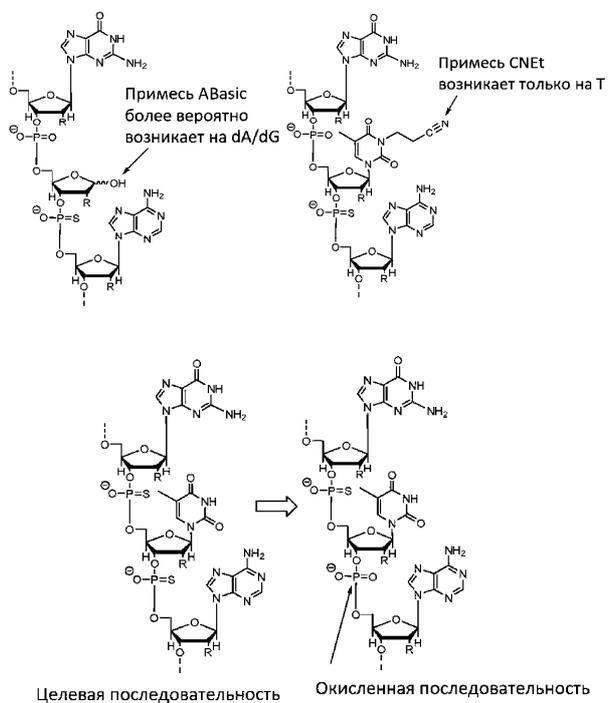
16. Способ по любому из пп.1-15, в котором сопутствующая продукту примесь дополнительно содержит по меньшей мере одну примесь ABasic, или по меньшей мере одну примесь CNEt, или по меньшей мере одну примесь N+1.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

