

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044343**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.08.17

(21) Номер заявки
202090282

(22) Дата подачи заявки
2015.04.29

(51) Int. Cl. **C07H 21/04** (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/115 (2010.01)

(54) НЕОЧИЩЕННАЯ КОМПОЗИЦИЯ ПОЛИНУКЛЕОТИДНОГО СОЕДИНЕНИЯ

(31) **61/987,396; 62/151,909**

(32) **2014.05.01; 2015.04.23**

(33) **US**

(43) **2020.05.20**

(62) **201691786; 2015.04.29**

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

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

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

(56) **US-A1-20070037770**

FEARON, KL et al.: Investigation Of The 'N-1' Impurity In Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides Synthesized By The Solid-Phase-Cyanoethyl Phosphoramidate Method Using Stepwise Sulfurization. *Nucleic Acids Research*. 1995, Vol. 23, No. 14; pages 2754-2761.

CAPALDI, DC et al.: Highly Efficient Solid Phase Synthesis Of Oligonucleotide Analogs Containing Phosphorodithioate Linkages. *Nucleic Acids Res.* 01 May 2000, Vol. 28, No. 9; E40; DOI: 10.1093/nar/28.9.e40.

CHEN, JJ et al.: N2'→P3' Phosphoramidate Glycerol Nucleic Acid As A Potential Alternative Genetic System. *J Am Chem Soc.* 18 February 2009, Vol. 131, No. 6; pages 2119-2121; DOI: 10.1021/ja809069b.

**WO-A2-2008094640
US-A1-20090175801**

(57) Предметом изобретения является неочищенная композиция-продукт синтеза, содержащая полинуклеотидное соединение, имеющее последовательность из N нуклеозидных субъединиц, при этом по меньшей мере две нуклеозидные субъединицы связаны N3'→P5' оксофосфорамидатной или N3'→P5' тиофосфорамидатной межсубъединичной связью, или его соль, и димер 3'-защищенный аминокдинуклеотид-фосфорамидат-5'-фосфорамидит. Композиция содержит менее чем 1 часть на 10 частей по массе (N-1) продукта относительно указанного полинуклеотидного соединения или его соли, причем N равно 10 или более.

B1**044343****044343****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Согласно 35 U.S.C. § 119(e), в настоящей заявке заявлен приоритет по датам подачи предварительной заявки на патент США с серийным номером 61/987396, поданной 1 мая 2014 г., и предварительной заявки на патент США с серийным номером 61/151909, поданной 23 апреля 2015 г. (номер дела патентного поверенного 185/002X), описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

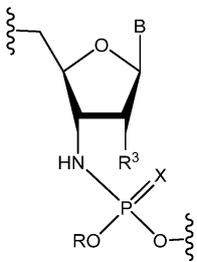
Введение

Химия полимеров нуклеиновых кислот играет важную роль во многих развивающихся технологиях в области фармацевтики, диагностики и аналитики и, более конкретно, в подобластях антисмысловых и антигенных терапевтических средств, комбинаторной химии, усиления сигналов на основе разветвленной ДНК и диагностики и анализов на основе матрицы 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 олигонуклеотидов для получения одного или более желаемых свойств, таких как устойчивость к действию нуклеаз, клеточное поглощение и растворимость. Олигонуклеотидные 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. Олигонуклеотидные N3'→P5' тиофосфорамидаты находят применение в качестве эффективных антисмысловых агентов *in vitro* и *in vivo*. Например, соединения, содержащие олигонуклеотиды, которые ингибируют активность теломеразы, могут быть использованы для лечения расстройств, опосредованных теломеразой, таких как рак, поскольку раковые клетки проявляют активность теломеразы, а нормальные соматические клетки человека не обладают активностью теломеразы на биологически значимом уровне. Таким образом, важны способы получения и выделения указанных олигонуклеотидов.

Сущность изобретения

Предметом настоящего изобретения является неочищенная композиция-продукт синтеза, содержащая полинуклеотидное соединение, имеющее последовательность из N нуклеозидных субъединиц, при этом по меньшей мере две нуклеозидные субъединицы связаны N3'→P5' оксофосфорамидатной или N3'→P5' тиофосфорамидатной межсубъединичной связью, или его соль, и димер 3'-защищенный аминоклеточный фосфорамидат-5'-фосфорамидит, при этом данная композиция содержит менее чем 1 часть на 10 частей по массе (N-1) продукта относительно указанного полинуклеотидного соединения или его соли, причем N равно 10 или более.

В некоторых вариантах реализации нуклеозидные субъединицы указанного полинуклеотидного соединения независимо имеют структуру



где

B - пурин, защищенный пурин, пиримидин или защищенный пиримидин;

X - O или S;

R выбран из группы, состоящей из водорода и замещенного цианогруппой алкила; и

R³ - водород, причем

алкил - одновалентная насыщенная алифатическая углеводородная группа, содержащая от 1 до 10 атомов углерода.

В некоторых вариантах реализации N3'→P5' оксофосфорамидатная или N3'→P5' тиофосфорамидатная межсубъединичная связь представляет собой N3'→P5' тиофосфорамидатную межсубъединичную связь, имеющую структуру



где R выбран из группы, состоящей из водорода и замещенного цианогруппой алкила, или ее соли, где

алкил - одновалентная насыщенная алифатическая углеводородная группа, содержащая от 1 до 10 атомов углерода.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид содержит последовательность, содержащую 13 или более нуклеозидных субъединиц.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид содержит от 10 до 50 последовательных нуклео-

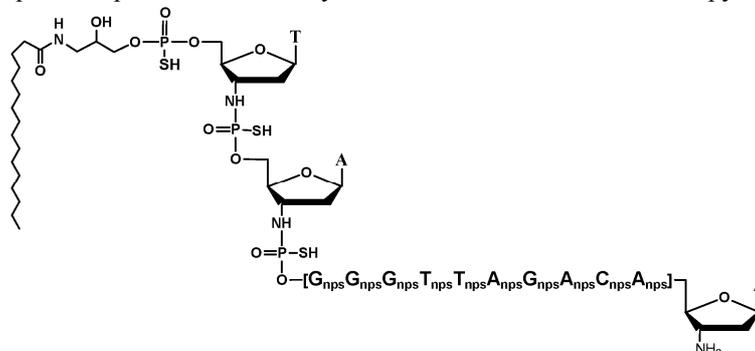
зидных субъединиц.

В некоторых вариантах реализации все нуклеозидные субъединицы связаны N3'→P5' оксофосфорамидатными или N3'→P5' тиофосфорамидатными межсубъединичными связями.

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).

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид содержит концевую 3'-амино или 3'-гидроксильную группу.

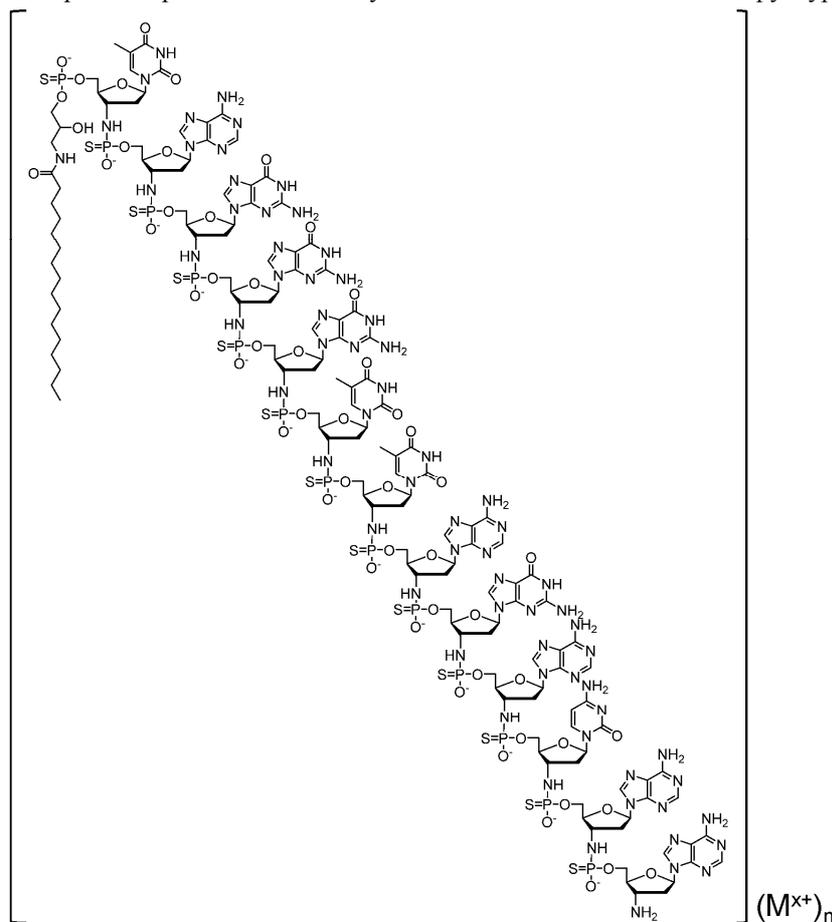
В некоторых вариантах реализации полинуклеотидное соединение имеет структуру



или его соль;

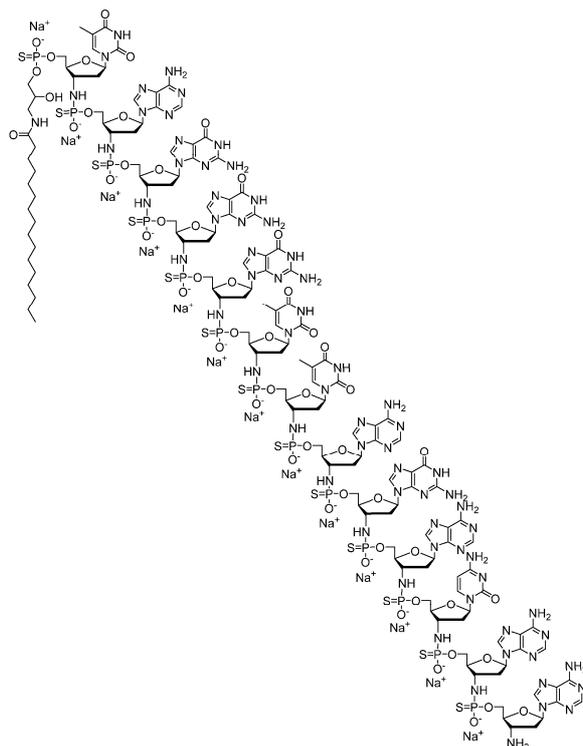
где "nps" представляет собой тиофосфорамидатную связь -NH-P(=O)(SH)-O-, связывающую 3'-атом углерода одного нуклеозида с 5'-атомом углерода соседнего нуклеозида. Соль может представлять собой фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотидное соединение имеет структуру



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

В некоторых вариантах реализации полинуклеотидное соединение имеет структуру



В некоторых вариантах реализации композиции она имеет менее чем 1 часть на 15 частей по массе (N-1) продукта относительно указанного полинуклеотидного соединения.

В некоторых вариантах реализации композиции она имеет менее чем 1 часть на 20 частей по массе (N-1) продукта относительно указанного полинуклеотидного соединения.

В некоторых вариантах реализации композиции она имеет менее чем 1 часть на 25 частей по массе (N-1) продукта относительно указанного полинуклеотидного соединения.

В некоторых вариантах реализации композиции она имеет менее чем 1 часть на 10 частей по массе любого (N-x) продукта относительно указанного полинуклеотидного соединения, где x в (N-x) представляет собой число от 1 до (N-1).

В некоторых вариантах реализации композиции она имеет менее чем 40 частей на 100 частей по совокупной массе всех (N-x) полинуклеотид-содержащих продуктов относительно указанного полинуклеотидного соединения, где x в (N-x) представляет собой число от 1 до (N-1).

В некоторых вариантах реализации композиции она имеет следующий профиль (N-x) полинуклеотид-содержащих продуктов, где x в (N-x) представляет собой число от 1 до (N-1):

менее чем 1 часть на 10 частей по массе (N-1) продукта относительно указанного полинуклеотидного соединения;

по меньшей мере 10 частей на 100 частей по массе (N-2) и (N-3) продуктов относительно указанного полинуклеотидного соединения.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1А и 1В представлена ВЭЖХ хроматограмма (А) и ^{31}P ЯМР спектры (В) для ТА димерного тиофосфорамидата (соединение 7е, схема 1).

На фиг. 2А и 2В представлена ВЭЖХ хроматограмма (А) и ^{31}P ЯМР спектры (В) для АА димерного тиофосфорамидата (соединение 7а, схема 1).

На фиг. 3А и 3В представлена ВЭЖХ хроматограмма (А) и ^{31}P ЯМР спектры (В) для GG димерного тиофосфорамидата (соединение 7с, схема 1).

На фиг. 4А и 4В представлена ВЭЖХ хроматограмма (А) и ^{31}P ЯМР спектры (В) для GT димерного тиофосфорамидата (соединение 7d, схема 1).

На фиг. 5А и 5В представлена ВЭЖХ хроматограмма (А) и ^{31}P ЯМР спектры (В) для GA димерного тиофосфорамидата (соединение 7b, схема 1).

На фиг. 6А и 6В представлены ЖХМС следы димерных амидатов ТА, АА, GA, GT и GG.

На фиг. 7 представлена ВЭЖХ хроматограмма продукта синтеза иметельстата в масштабе 140 мкмоль с применением стратегии связывания мономеров.

На фиг. 8 представлена ВЭЖХ хроматограмма продукта синтеза иметельстата в масштабе 140 мкмоль с применением стратегии связывания димерного блока.

Определения

Следующие термины имеют следующие значения, если не указано иное. Любые неопределенные термины имеют значение, принятое в данной области техники. В данном контексте термины "полинук-

леотид" и "олигонуклеотид" использованы взаимозаменяемо. Если олигонуклеотид представлен последовательностью или буквами, например "ATGUCCTG", следует понимать, что указанные нуклеотиды расположены в порядке 5'→3' слева направо, и что "А" означает дезоксиаденозин, "С" означает дезоксцитидин, "G" означает дезоксигуанозин, "Т" означает тимидин, и "U" означает 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, *DNA Replication*, 2ое изд. (Freeman, Сан-Франциско, 1992). "Аналоги" в отношении нуклеозидов включают синтетические аналоги, 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 термин в данном контексте дополнительно включает пиримидины с присоединенными обычными защитными группами, такие как N⁴-бензоилцитозин. Дополнительные обычные защитные группы пиримидина описаны авторами Beaucage и Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992). В данном контексте "пури́н" означает пурины, встречающиеся в природных нуклеозидах, включая аденин, гуанин и гипоксантин, и их распространенные аналоги, такие как аналоги, содержащие окси, метил, пропинил, метокси, гидроксид, амино, тио, галоген и т.п. заместители. Указанный термин в данном контексте дополнительно включает пурины с присоединенными обычными защитными группами, такие как N²-бензоилгуанин, N²-изобутирилгуанин, N⁶-бензоиладенин и т.п. Дополнительные обычные защитные группы пурина описаны авторами Beaucage и 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 ДМТ) и т.п.; и защищенное азотистое основание в отношении азотистого основания, содержащего гетероатом, защищенный 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, ред., *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press, Оксфорд, 1984); Amarnath и 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, ред., *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Оксфорд, 1991), Greene и Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, второе издание, (John Wiley & Sons, Нью-Йорк, 1991), Narang, ред., *Synthesis and Applications of DNA and RNA* (Academic Press, Нью-Йорк, 1987), Beaucage и Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992), и подобных ссылках.

В данном контексте "олигонуклеотидный N3'→P5' фосфорамидат" означает олигомер, обычно линейный, из нуклеозидных субъединиц, связанных по меньшей мере одной N3'→P5' фосфорамидатной связью. В общих терминах, нуклеозидные субъединицы содержат нуклеозиды или аналоги нуклеозидов, но также могут содержать более общие фрагменты, имеющие сравнимую химическую структуру, такие как лишенные азотистого основания сахара и другие углеводородные фрагменты, такие как 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., Международная заявка PCT/CA92/00423; Zon et al., Международная заявка PCT/US90/06630; 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 указанный термин означает олигонуклеотид, в котором все межнуклеозидные связи заменены N3'→P5' фосфорамидатными связями, т.е. термин включает частично и полностью "амидированные" олигомеры. В некоторых случаях он означает олигонуклеотид, в котором все межнуклеозидные связи заменены N3'→P5' фосфорамидатными связями, и в котором нуклеозидные субъединицы представляют собой природные нуклеозиды или их аналоги. Рассматриваемый олигонуклеотидный N3'→P5' фосфорамидат, в котором каждая связь представляет собой N3'→P5' фосфорамидатную связь ("полностью амидированный") может быть внедрен или присоединен к другим олигонуклеотидам или полинуклеотидам с образованием более крупного олигомера, который является "частично амидированным". Рас-

сматриваемый олигонуклеотидный $N3' \rightarrow P5'$ фосфорамидат может содержать любые подходящие $3'$ и/или $5'$ концевые группы. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотидный $N3' \rightarrow P5'$ фосфорамидат содержит $3'$ -концевую гидроксигруппу или $3'$ -концевую аминогруппу. В данном контексте термины "фосфат" и "фосфатная группа" включают тиофосфатную группу и оксофосфатную группу.

В данном контексте термин "фосфорамидитная аминогруппа" относится к аминогруппе, $-NR^4R^5$, присоединенной к атому фосфора фосфорамидитной группы, а термин "фосфорамидитный азот" относится к атому азота фосфорамидитной аминогруппы.

"Алкил" относится к одновалентным насыщенным алифатическим углеводородным группам, содержащим от 1 до 10 атомов углерода, например, от 1 до 6 атомов углерода (например, "алкил, содержащий от 1 до 6 атомов углерода") или от 1 до 5 (например, "алкил, содержащий от 1 до 5 атомов углерода"), или от 1 до 4 (например, "алкил, содержащий от 1 до 4 атомов углерода"), или от 1 до 3 атомов углерода (например, "алкил, содержащий от 1 до 3 атомов углерода"). Указанный термин включает, например, линейные и разветвленные углеводородные 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 ($(CH_3)(CH_3)CH_2CH-$), трет-бутил ($(CH_3)_3C-$), н-пентил ($CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2-$) и неопентил ($(CH_3)_3CCH_2-$). Термин "замещенный алкил" относится к алкильной группе, определенной в настоящем документе, в которой один или более атомов углерода в алкильной цепи необязательно заменены гетероатомом, таким как $-O-$, $-N-$, $-S-$, $-S(O)_n-$ (где n равен от 0 до 2), $-NR-$ (где R представляет собой водород или алкил), и имеющей от 1 до 5 заместителей, выбранных из группы, состоящей из алкокси, замещенного алкокси, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, ацила, ациламино, ацилокси, амина, аминацила, аминацилокси, оксиаминацила, азидо, циано, галогена, гидроксила, оксо, тиокето, карбоксила, карбоксиалкила, тиоарилокси, тиогетероарилокси, тиогетероциклокси, 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 $-NR^aR^b$, где R^a и R^b могут быть одинаковыми или различными и выбраны из водорода, необязательно замещенного алкила, циклоалкила, алкенила, циклоалкенила, алкинила, арила, гетероарила и гетероциклической группы. В некоторых случаях "замещенный алкил" относится к алкильной группе, определенной в настоящем документе, имеющей от 1 до 5 заместителей, выбранных из группы, состоящей из алкокси, циклоалкила, циклоалкенила, ацила, ациламино, ацилокси, амина, аминацила, аминацилокси, азидо, циано, галогена, гидроксила, карбоксила, карбоксиалкила, тиола, тиоалкокси, арила, арилокси, гетероарила, гетероарилокси, 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 гетероциклической группы.

"Алкилен" относится к двухвалентным алифатическим углеводородным группам, предпочтительно имеющим от 1 до 6 и более, предпочтительно от 1 до 3 атомов углерода, которые являются либо неразветвленными, либо разветвленными, и которые необязательно прерваны одной или более группами, выбранными из $-O-$, $-NR^{10}$, $-NR^{10}C(O)-$, $-C(O)NR^{10}$ и т.п. Указанный термин включает, например, метилен ($-CH_2-$), этилен ($-CH_2CH_2-$), н-пропилен ($-CH_2CH_2CH_2-$), изопропилен ($-CH_2CH(CH_3)-$), $(-C(CH_3)_2CH_2CH_2-$), $(-C(CH_3)_2CH_2C(O)-)$, $(-C(CH_3)_2CH_2C(O)NH-)$, $(-CH(CH_3)CH_2-)$ и т.п.

"Замещенный алкилен" относится к алкиленовой группе, имеющей от 1 до 3 атомов водорода, замещенных заместителями, описанными для атомов углерода в определении "замещенный", представленном ниже.

Термин "алкан" относится к алкильной группе и алкиленовой группе, определенным в настоящем документе.

Термин "алкиламиноалкил", "алкиламиноалкенил" и "алкиламиноалкинил" относится к группам $R'NHR''$, где R' представляет собой алкильную группу, определенную в настоящем документе, а R'' представляет собой алкиленовую, алкениленовую или алкиниленовую группу, определенную в настоящем документе.

Термин "алкарил" или "аралкил" относится к группам $-алкилен-арил$ и $-замещенный алкилен-арил$, где алкилен, замещенный алкилен и арил являются такими, как определено в настоящем документе.

"Алкокси" относится к группе $-O-алкил$, где алкил является таким, как определено в настоящем документе. Алкокси включает, например, метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, н-бутокси, трет-бутокси, втор-бутокси, н-пентокси и т.п.

Термин "алкокси" относится также к группам алкенил- $O-$, циклоалкил- $O-$, циклоалкенил- $O-$ и алкинил- $O-$, где алкенил, циклоалкил, циклоалкенил и алкинил являются такими, как определено в настоящем документе.

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

Термин "алкоксиамино" относится к группе -NH-алкокси, где алкокси является таким, как определено в настоящем документе.

Термин "галогеналкокси" относится к группам алкил-О-, где один или более атомов водорода алкильной группы замещены группой галогена, и включает, например, такие группы как трифторметокси, и т.п.

Термин "галогеноалкенил" относится к замещенной алкильной группе, описанной выше, в которой один или более атомов водорода алкильной группы замещены группой галогена. Примеры таких групп включают, без ограничения, фторалкильные группы, такие как трифторметил, дифторметил, трифторэтил и т.п.

Термин "алкилалкокси" относится к группам -алкилен-О-алкил, алкилен-О-замещенный алкил, замещенный алкилен-О-алкил и замещенный алкилен-О-замещенный алкил, где алкил, замещенный алкил, алкилен и замещенный алкилен являются такими, как определено в настоящем документе.

Термин "алкилтиоалкокси" относится к группам -алкилен-S-алкил, алкилен-S-замещенный алкил, замещенный алкилен-S-алкил и замещенный алкилен-S-замещенный алкил, где алкил, замещенный алкил, алкилен и замещенный алкилен являются такими, как определено в настоящем документе.

"Алкенил" относится к неразветвленным или разветвленным углеводородным группам, имеющим от 2 до 6 атомов углерода и предпочтительно от 2 до 4 атомов углерода, и имеющим по меньшей мере 1 и предпочтительно от 1 до 2 центров ненасыщенности, представляющих собой двойную связь. Указанный термин включает, например, бивинил, аллил и бут-3-ен-1-ил. В данный термин входят цис- и транс-изомеры или смеси указанных изомеров.

Термин "замещенный алкенил" относится к алкенильной группе, определенной в настоящем документе, имеющей от 1 до 5 заместителей или от 1 до 3 заместителей, выбранных из алкокси, замещенного алкокси, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, ацила, ациламино, ацилокси, amino, замещенного amino, aminoацила, aminoацилокси, оксиаминоацила, азидо, циано, галогена, гидроксила, оксо, тиокето, карбоксила, карбоксиалкила, тиоарилокси, тиогетероарилокси, тиогетероциклоокси, тиола, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, арилокси, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гетероциклоокси, гидроксиамино, алкоксиамино, нитро, -SO-алкила, -SO-замещенного алкила, -SO-арила, -SO-гетероарила, -SO₂-алкила, -SO₂-замещенного алкила, -SO₂-арила и -SO₂-гетероарила.

"Алкинил" относится к неразветвленным или разветвленным одновалентным углеводородным группам, имеющим от 2 до 6 атомов углерода и предпочтительно от 2 до 3 атомов углерода, и имеющим по меньшей мере 1 и предпочтительно от 1 до 2 центров ненасыщенности, представляющих собой тройную связь. Примеры таких алкинильных групп включают ацетиленил (-C≡CH) и пропаргил (-CH₂C≡CH).

Термин "замещенный алкинил" относится к алкинильной группе, определенной в настоящем документе, имеющей от 1 до 5 заместителей или от 1 до 3 заместителей, выбранных из алкокси, замещенного алкокси, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, ацила, ациламино, ацилокси, amino, замещенного amino, aminoацила, aminoацилокси, оксиаминоацила, азидо, циано, галогена, гидроксила, оксо, тиокето, карбоксила, карбоксиалкила, тиоарилокси, тиогетероарилокси, тиогетероциклоокси, тиола, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, арилокси, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гетероциклоокси, гидроксиамино, алкоксиамино, нитро, -SO-алкила, -SO-замещенного алкила, -SO-арила, -SO-гетероарила, -SO₂-алкила, -SO₂-замещенного алкила, -SO₂-арила и -SO₂-гетероарила.

"Алкинилокси" относится к группе -О-алкинил, где алкинил является таким, как определено в настоящем документе. Алкинилокси включает, например, этинилокси, пропилилокси и т.п.

"Ацил" относится к группам H-C(O)-, алкил-C(O)-, замещенный алкил-C(O)-, алкенил-C(O)-, замещенный алкенил-C(O)-, алкинил-C(O)-, замещенный алкинил-C(O)-, циклоалкил-C(O)-, замещенный циклоалкил-C(O)-, циклоалкенил-C(O)-, замещенный циклоалкенил-C(O)-, арил-C(O)-, замещенный арил-C(O)-, гетероарил-C(O)-, замещенный гетероарил-C(O)-, гетероциклил-C(O)- и замещенный гетероциклил-C(O)-, где алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклическая группа из замещенная гетероциклическая группа являются такими, как определено в настоящем документе. Например, ацил включает "ацетильную" группу CH₃C(O)-

"Ациламино" относится к группам -NR²⁰C(O)алкил, -NR²⁰C(O)замещенный алкил, -NR²⁰C(O)циклоалкил, -NR²⁰C(O)замещенный циклоалкил, NR²⁰C(O)циклоалкенил, -NR²⁰C(O)замещенный циклоалкенил, -NR²⁰C(O)алкенил, -NR²⁰C(O)замещенный алкенил, -NR²⁰C(O)алкинил, -NR²⁰C(O)замещенный алкинил, -NR²⁰C(O)арил, -NR²⁰C(O)замещенный арил, -NR²⁰C(O)гетероарил, NR²⁰C(O)замещенный гетероарил, -NR²⁰C(O)гетероциклическая группа и NR²⁰C(O)замещенная гетероциклическая группа, где R²⁰ представляет собой водород или алкил, и где алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклическая группа и замещенная гетероциклическая группа явля-

ются такими, как определено в настоящем документе.

"Аминокарбонил" или термин "аминоацил" относится к группе $-C(O)NR^{21}R^{22}$, где R^{21} и R^{22} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, гетероарила, замещенного гетероарила, гетероциклической группы и замещенной гетероциклической группы, и где R^{21} и R^{22} необязательно соединены друг с другом вместе с атомом азота, связанным с ними, с образованием гетероциклической или замещенной гетероциклической группы, и где алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклическая группа и замещенная гетероциклическая группа являются такими, как определено в настоящем документе.

"Аминокарбониламино" относится к группе $-NR^{21}C(O)NR^{22}R^{23}$, где R^{21} , R^{22} и R^{23} независимо выбраны из водорода, алкила, арила или циклоалкила, или где две группы R соединены с образованием гетероциклической группы.

Термин "алкоксикарбониламино" относится к группе $-NRC(O)OR$, где каждый R независимо представляет собой водород, алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу, где алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил и гетероциклическая группа являются такими, как определено в настоящем документе. Термин "ацилокси" относится к группам алкил- $C(O)O-$, замещенный алкил- $C(O)O-$, циклоалкил- $C(O)O-$, замещенный циклоалкил- $C(O)O-$, арил- $C(O)O-$, гетероарил- $C(O)O-$ и гетероциклическая группа и замещенная гетероциклическая группа являются такими, как определено в настоящем документе.

"Аминосulфонил" относится к группе $-SO_2NR^{21}R^{22}$, где R^{21} и R^{22} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, гетероарила, замещенного гетероарила, гетероциклической группы, замещенной гетероциклической группы, и где R^{21} и R^{22} необязательно соединены друг с другом вместе с атомом азота, связанным с ними, с образованием гетероциклической или замещенной гетероциклической группы, и алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклическая группа и замещенная гетероциклическая группа являются такими, как определено в настоящем документе.

"Сульфоиламино" относится к группе $-NR^{21}SO_2R^{22}$, где R^{21} и R^{22} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, гетероарила, замещенного гетероарила, гетероциклической группы и замещенной гетероциклической группы, и где R^{21} и R^{22} необязательно соединены друг с другом вместе с атомами, связанными с ними, с образованием гетероциклической или замещенной гетероциклической группы, и где алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклическая группа и замещенная гетероциклическая группа являются такими, как определено в настоящем документе.

"Арил" или "Ar" относится к одновалентной ароматической карбоциклической группе, состоящей из 6-18 атомов углерода, имеющей одно кольцо (такое, как в фенильной группе) или кольцевую систему, имеющую несколько конденсированных колец (примеры таких ароматических кольцевых систем включают нафтил, антрил и инданил), и указанные конденсированные кольца могут быть или не быть ароматическими, при условии, что точка присоединения находится у атома ароматического кольца. Указанный термин включает, например, фенил и нафтил. Если иное не ограничено определением арильного заместителя, такие арильные группы могут быть необязательно замещенными 1-5 заместителями или 1-3 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, азида, карбоксила, карбоксиалкила, циано, галогена, нитро, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гетероциклоокси, аминацилокси, оксиациламина, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, тиоарилокси, тиогетероарилокси, $-SO-$ алкила, $-SO-$ замещенного алкила, $-SO-$ арила, $-SO-$ гетероарила, $-SO_2-$ алкила, $-SO_2-$ замещенного алкила, $-SO_2-$ арила, $-SO_2-$ гетероарила и тригалогенметила. В таких случаях арильная группа, которая замещена 1-5 заместителями (например, как описано в настоящем документе), упомянута как "замещенный арил".

"Арилокси" относится к группе $-O-$ арил, где арил является таким, как определено в настоящем документе, включая, например, фенокси, нафтокси и т.п., включая необязательно замещенные арильные группы, также описанные в настоящем документе.

"Амино" относится к группе $-NH_2$.

Термин "замещенный амино" относится к группе $-NRR$, где каждый R независимо выбран из груп-

пы, 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 R не представляет собой водород.

Термин "азидо" относится к группе $-N_3$.

"Карбоксил", "карбоксии" или "карбоксилат" относится к $-CO_2H$ или его солям.

"Карбоксильный эфир" или "карбоксииэфир", или термины "карбоксииалкил", или "карбоксииалкил" относятся к группам $-C(O)O$ -алкил, $-C(O)O$ -замещенный алкил, $-C(O)O$ -алкенил, $-C(O)O$ -замещенный алкенил, $-C(O)O$ -алкинил, $-C(O)O$ -замещенный алкинил, $-C(O)O$ -арил, $-C(O)O$ -замещенный арил, $-C(O)O$ -циклоалкил, $-C(O)O$ -замещенный циклоалкил, $-C(O)O$ -циклоалкенил, $-C(O)O$ -замещенный циклоалкенил, $-C(O)O$ -гетероарил, $-C(O)O$ -замещенный гетероарил, $-C(O)O$ -гетероциклическая группа и $-C(O)O$ -замещенная гетероциклическая группа, где алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклическая группа и замещенная гетероциклическая группа являются такими, как определено в настоящем документе.

"(Карбоксильный эфир)окси" или "карбонат" относится к группам $-O-C(O)O$ -алкил, $-O-C(O)O$ -замещенный алкил, $-O-C(O)O$ -алкенил, $-O-C(O)O$ -замещенный алкенил, $-O-C(O)O$ -алкинил, $-O-C(O)O$ -замещенный алкинил, $-O-C(O)O$ -арил, $-O-C(O)O$ -замещенный арил, $-O-C(O)O$ -циклоалкил, $-O-C(O)O$ -замещенный циклоалкил, $-O-C(O)O$ -циклоалкенил, $-O-C(O)O$ -замещенный циклоалкенил, $-O-C(O)O$ -гетероарил, $-O-C(O)O$ -замещенный гетероарил, $-O-C(O)O$ -гетероциклическая группа и $-O-C(O)O$ -замещенная гетероциклическая группа, где алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклическая группа и замещенная гетероциклическая группа являются такими, как определено в настоящем документе. "Циано" или "нитрил" относится к группе $-CN$.

"Циклоалкил" относится к циклическим алкильным группам, состоящим из 3-10 атомов углерода, имеющим одно или несколько циклических колец, включая конденсированные, мостиковые и спирольцевые системы. Примеры подходящих циклоалкильных групп включают, например, адамантил, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклооктил и т.п. Такие циклоалкильные группы включают, например, однокольцевые структуры, такие как циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклооктил и т.п., или многокольцевые структуры, такие как адамантил и т.п. Термин "замещенный циклоалкил" относится к циклоалкильным группам, имеющим от 1 до 5 заместителей или от 1 до 3 заместителей, выбранных из алкила, замещенного алкила, алкокси, замещенного алкокси, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, ацила, ациламино, ацилокси, амино, замещенного амино, аминацила, аминацилокси, оксиаминоацила, азида, циано, галогена, гидроксидила, оксо, тиокето, карбоксила, карбоксииалкила, тиаорилокси, тиогетероарилокси, тиогетероциклоокси, тиола, тиаалкокси, замещенного тиаалкокси, арила, арилокси, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гетероциклоокси, гидроксидиламино, алкоксиамино, нитро, $-SO$ -алкила, $-SO$ -замещенного алкила, $-SO$ -арила, $-SO$ -гетероарила, $-SO_2$ -алкила, $-SO_2$ -замещенного алкила, $-SO_2$ -арила и $-SO_2$ -гетероарила.

"Циклоалкенил" относится к неароматическим циклическим алкильным группам, состоящим из 3-10 атомов углерода, имеющим одно или несколько колец и имеющим по меньшей мере одну двойную связь и предпочтительно от 1 до 2 двойных связей.

Термин "замещенный циклоалкенил" относится к циклоалкинильным группам, имеющим от 1 до 5 заместителей или от 1 до 3 заместителей, выбранных из алкокси, замещенного алкокси, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, ацила, ациламино, ацилокси, амино, замещенного амино, аминацила, аминацилокси, оксиаминоацила, азида, циано, галогена, гидроксидила, кето, тиокето, карбоксила, карбоксииалкила, тиаорилокси, тиогетероарилокси, тиогетероциклоокси, тиола, тиаалкокси, замещенного тиаалкокси, арила, арилокси, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гетероциклоокси, гидроксидиламино, алкоксиамино, нитро, $-SO$ -алкила, $-SO$ -замещенного алкила, $-SO$ -арила, $-SO$ -гетероарила, $-SO_2$ -алкила, $-SO_2$ -замещенного алкила, $-SO_2$ -арила и $-SO_2$ -гетероарила.

"Циклоалкинил" относится к неароматическим циклоалкильным группам, состоящим из 5-10 атомов углерода, имеющим одно или несколько колец и имеющим по меньшей мере одну тройную связь. "Циклоалкокси" относится к $-O$ -циклоалкилу. "Циклоалкенилокси" относится к $-O$ -циклоалкенилу. "Гало" или "галоген" относится к фтору, хлору, бром и йоду. "Гидрокси" или "гидроксил" относится к группе $-OH$.

"Гетероарил" относится к ароматической группе, состоящей из 1-15 атомов углерода, например 1-10 атомов углерода, и 1-10 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из кислорода, азота и серы, находящихся в кольце. Такие гетероарильные группы могут иметь одно кольцо (например, пиридинил, имидазол или фурил) или несколько конденсированных колец в кольцевой системе (например, в таких группах как индолизинил, хинолинил, бензофуран, бензимидазол или бензотиенил), где по меньшей мере одно кольцо в кольцевой системе является ароматическим, и по меньшей мере одно кольцо в кольцевой системе является ароматическим, при условии, что точка присоединения находится у атома арома-

тического кольца. В некоторых вариантах реализации кольцевой атом(-ы) азота и/или серы гетероарильной группы необязательно окислен с образованием N-оксида ($N \rightarrow O$), сульфинильных или сульфонильных фрагментов. Указанный термин включает, например, пиридинил, пирролил, индолил, тиофенил и фуранил. Если иное не ограничено определением гетероарильного заместителя, такие гетероарильные группы могут быть необязательно замещенными 1-5 заместителями или 1-3 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, алкарилла, арила, арилокси, азидо, карбоксила, карбоксиалкила, циано, галогена, нитро, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гетероциклоокси, аминацилокси, оксиациламина, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, тиоарилокси, тиогетероарилокси, $-SO$ -алкила, $-SO$ -замещенного алкила, $-SO$ -арила, $-SO$ -гетероарила, $-SO_2$ -алкила, $-SO_2$ -замещенного алкила, $-SO_2$ -арила и $-SO_2$ -гетероарила, и тригалогенметила. В таких случаях гетероарильная группа, которая замещена 1-5 заместителями (например, как описано в настоящем документе), упомянута как "замещенный гетероарил".

Термин "гетероаралкил" относится к группам -алкилен-гетероарил, где алкилен и гетероарил являются такими, как определено в настоящем документе. Указанный термин включает, например, пиридилметил, пиридилэтил, индолилметил и т.п.

"Гетероарилокси" относится к -О-гетероарилу.

"Гетероцикл", "гетероциклический", "гетероциклоалкил" и "гетероциклил" относятся к насыщенной или ненасыщенной группе, имеющей одно кольцо или несколько конденсированных колец, включая конденсированные, мостиковые и спирокольцевые системы, и имеющей от 3 до 20 кольцевых атомов, включая от 1 до 10 гетероатомов. Указанные кольцевые атомы выбраны из группы, состоящей из азота, серы или кислорода, при этом в конденсированных кольцевых системах одно или более колец могут представлять собой циклоалкил, арил или гетероарил, при условии, что точка присоединения находится в неароматическом кольце. В некоторых вариантах реализации атом(-ы) азота и/или серы гетероциклической группы необязательно окислен с образованием N-оксида, $-S(O)$ - или $-SO_2$ -фрагментов.

Примеры гетероциклов и гетероариллов включают, но не ограничиваются ими, азетидин, пиррол, имидазол, пиразол, пиридин, пиразин, пиримидин, пиридазин, индолизин, изоиндол, индол, дигидроиндол, индазол, пурин, хинолизин, изохинолин, хинолин, фталазин, нафтилпиридин, хиноксалин, хиназолин, циннолин, 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 тиаморфолином), 1,1-диоксотииоморфолинил, пиперидинил, пирролидин, тетрагидрофуранил и т.п.

Если иное не ограничено определением гетероциклического заместителя, такие гетероциклические группы могут быть необязательно замещены 1-5 или 1-3 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, карбоксиалкила, тиоарилокси, тиогетероарилокси, тиогетероциклоокси, тиола, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, арилокси, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гетероциклоокси, гидроксиамино, алкоксиамино, нитро, $-SO$ -алкила, $-SO$ -замещенного алкила, $-SO$ -арила, $-SO$ -гетероарила, $-SO_2$ -алкила, $-SO_2$ -замещенного алкила, $-SO_2$ -арила, $-SO_2$ -гетероарила и конденсированного гетероцикла. "Гетероциклилокси" относится к группе -О-гетероциклил. Термин "гетероциклилтио" относится к группе гетероциклил-S-. Термин "гетероциклен" относится к бирадикальной группе, образованной из гетероцикла, определенного в настоящем документе. Термин "гидроксиамино" относится к группе $-NHON$. "Нитро" относится к группе $-NO_2$. "Оксо" относится к атому ($=O$).

"Сульфонил" относится к группе SO_2 -алкил, SO_2 -замещенный алкил, SO_2 -алкенил, SO_2 -замещенный алкенил, SO_2 -циклоалкил, SO_2 -замещенный циклоалкил, SO_2 -циклоалкенил, SO_2 -замещенный циклоалкенил, SO_2 -арил, SO_2 -замещенный арил, SO_2 -гетероарил, SO_2 -замещенный гетероарил, SO_2 -гетероциклическая группа и SO_2 -замещенная гетероциклическая группа, где алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклическая группа и замещенная гетероциклическая группа являются такими, как определено в настоящем документе. Сульфонил включает, например, метил- SO_2 -, фенил- SO_2 - и 4-метилфенил- SO_2 -. "Сульфоилокси" относится к группе $-OSO_2$ -алкил, OSO_2 -замещенный алкил, OSO_2 -алкенил, OSO_2 -замещенный алкенил, OSO_2 -циклоалкил, OSO_2 -замещенный циклоалкил, OSO_2 -циклоалкенил, OSO_2 -замещенный циклоалкенил, OSO_2 -арил, OSO_2 -замещенный арил, OSO_2 -гетероарил, OSO_2 -замещенный гетероарил, OSO_2 -гетероциклическая группа и OSO_2 замещенная гетероциклическая группа, где алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклическая группа и замещенная гетероциклическая группа являются

такими, как определено в настоящем документе.

Термин "аминокарбонилокси" относится к группе $-\text{OC}(\text{O})\text{NRR}$, где каждый R независимо представляет собой водород, алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу, где алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил и гетероциклическая группа являются такими, как определено в настоящем документе.

"Тиол" относится к группе $-\text{SH}$.

"Тиоксо" или термин "тиокето" относится к атому $(=\text{S})$.

"Алкилтио" или термин "тиоалкокси" относится к группе $-\text{S}$ -алкил, где алкил является таким, как определено в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации сера может быть окислена до $-\text{S}(\text{O})-$. Сульфоксид может существовать в виде одного или более стереоизомеров.

Термин "замещенный тиоалкокси" относится к группе $-\text{S}$ -замещенный алкил.

Термин "тиоарилокси" относится к группе арил- $-\text{S}-$, где арильная группа является такой, как определено в настоящем документе, включая необязательно замещенные арильные группы, также определенные в настоящем документе.

Термин "тиогетероарилокси" относится к группе гетероарил- $-\text{S}-$, где гетероарильная группа является такой, как определено в настоящем документе, включая необязательно замещенные арильные группы, также определенные в настоящем документе.

Термин "тиогетероциклоокси" относится к группе гетероциклил- $-\text{S}-$, где гетероциклильная группа является такой, как определено в настоящем документе, включая необязательно замещенные гетероциклильные группы, также определенные в настоящем документе.

Помимо описания, представленного в настоящем документе, термин "замещенный", используемый для модификации определенной группы или радикала, также может означать, что один или более атомов водорода определенной группы или радикала, каждый независимо от других, заменены одинаковыми или различными группами заместителей, как описано ниже.

Помимо групп, описанных в отношении отдельных терминов, группы заместителей для замещения одного или более атомов водорода (любые два атома водорода у одного атома углерода могут быть заменены на $=\text{O}$, $=\text{NR}^{70}$, $=\text{N}-\text{OR}^{70}$, $=\text{N}_2$ или $=\text{S}$) у насыщенных атомов углерода в определенной группе или радикале, представляют собой, если не указано иное, $-\text{R}^{60}$, галоген, $=\text{O}$, $-\text{OR}^{70}$, $-\text{SR}^{70}$, $-\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, тригалогенметил, $-\text{CN}$, $-\text{OCN}$, $-\text{SCN}$, $-\text{NO}$, $-\text{NO}_2$, $=\text{N}_2$, $-\text{N}_3$, $-\text{SO}_2\text{R}^{70}$, $-\text{SO}_2\text{O}^+\text{M}^+$, $-\text{SO}_2\text{OR}^{70}$, $-\text{OSO}_2\text{R}^{70}$, $-\text{OSO}_2\text{O}^+\text{M}^+$, $-\text{OSO}_2\text{OR}^{70}$, $-\text{P}(\text{O})(\text{O})_2(\text{M}^+)_2$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{70})\text{O}^+\text{M}^+$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{70})_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{70}$, $-\text{C}(\text{S})\text{R}^{70}$, $-\text{C}(\text{NR}^{70})\text{R}^{70}$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}^+\text{M}^+$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{70}$, $-\text{C}(\text{S})\text{OR}^{70}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, $-\text{C}(\text{NR}^{70})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^{70}$, $-\text{OC}(\text{S})\text{R}^{70}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{O}^+\text{M}^+$, $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^{70}$, $-\text{OC}(\text{S})\text{OR}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{O})\text{R}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{S})\text{R}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{CO}_2\text{M}^+$, $-\text{NR}^{70}\text{CO}_2\text{R}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{S})\text{OR}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{O})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{NR}^{70})\text{R}^{70}$ и $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{NR}^{70})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, где R^{60} выбран из группы, состоящей из необязательно замещенного алкила, циклоалкила, гетероалкила, гетероциклоалкилалкила, циклоалкилалкила, арила, арилалкила, гетероарила и гетероарилалкила, каждый R^{70} независимо представляет собой водород или R^{60} ; каждый R^{80} независимо представляет собой R^{70} или, в альтернативном варианте, два R^{80} , вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют 5-, 6- или 7-членный гетероциклоалкил, который может необязательно содержать от 1 до 4 одинаковых или различных дополнительных гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S, из которых N может иметь -H или C_1-C_3 алкильное замещение; и каждый M^+ представляет собой противоион с нетто-единичным положительным зарядом. Каждый M^+ независимо может представлять собой, например, ион щелочного металла, такой как K^+ , Na^+ , Li^+ ; ион аммония, такой как $^+\text{N}(\text{R}^{60})_4$; или ион щелочно-земельного металла, такой как $[\text{Ca}^{2+}]_{0,5}$, $[\text{Mg}^{2+}]_{0,5}$ или $[\text{Ba}^{2+}]_{0,5}$ (нижний индекс 0,5 означает, что один из противоионов для каждого двухвалентного иона щелочноземельного металла может быть ионизированной формой соединения согласно настоящему изобретению, а другой противоион может представлять собой, например, хлорид; или два ионизированных соединения, описанных в настоящем документе, могут служить в качестве противоионов для таких двухвалентных ионов щелочноземельных металлов; или дважды ионизированное соединение согласно настоящему изобретению может служить в качестве противоиона для таких двухвалентных ионов щелочно-земельных металлов). В качестве конкретных примеров, $-\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$ включает $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}$ -алкил, N-пирролидинил, N-пиперазинил, 4N-метилпиперазин-1-ил и N-морфолинил. Помимо описания, представленного в настоящем документе, группы заместителей для атомов водорода или ненасыщенных атомов углерода в "замещенных" алкеновых, алкиновых, арильных и гетероарильных группах, если не указано иное, представляют собой $-\text{R}^{60}$, галоген, $-\text{O}^+\text{M}^+$, $-\text{OR}^{70}$, $-\text{SR}^{70}$, $-\text{S}^+\text{M}^+$, $-\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, тригалогенметил, $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$, $-\text{OCN}$, $-\text{SCN}$, $-\text{NO}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{N}_3$, $-\text{SO}_2\text{R}^{70}$, $-\text{SO}_3\text{M}^+$, $-\text{SO}_3\text{R}^{70}$, $-\text{OSO}_2\text{R}^{70}$, $-\text{OSO}_3\text{M}^+$, $-\text{OSO}_3\text{R}^{70}$, $-\text{PO}_3^{2-}(\text{M}^+)_2$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{70})\text{O}^+\text{M}^+$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{70})_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{70}$, $-\text{C}(\text{S})\text{R}^{70}$, $-\text{C}(\text{NR}^{70})\text{R}^{70}$, $-\text{CO}_2\text{M}^+$, $-\text{CO}_2\text{R}^{70}$, $-\text{C}(\text{S})\text{OR}^{70}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, $-\text{C}(\text{NR}^{70})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^{70}$, $-\text{OC}(\text{S})\text{R}^{70}$, $-\text{OCO}_2\text{M}^+$, $-\text{OCO}_2\text{R}^{70}$, $-\text{OC}(\text{S})\text{OR}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{O})\text{R}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{S})\text{R}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{CO}_2\text{M}^+$, $-\text{NR}^{70}\text{CO}_2\text{R}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{S})\text{OR}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{O})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{NR}^{70})\text{R}^{70}$ и $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{NR}^{70})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, где R^{60} , R^{70} , R^{80} и M^+ являются такими, как определено выше, при условии, что в случае замещенного алкена или алкина заместители не представляют собой $-\text{OM}^+$, $-\text{OR}^{70}$, $-\text{SR}^{70}$ и $-\text{S}^+\text{M}^+$.

Помимо групп, описанных в настоящем документе в отношении отдельных терминов, группы заместителей для атомов водорода у атома азота в "замещенных" гетероалкильных и циклогетероалкильных группах представляют собой, если не указано иное, $-\text{R}^{60}$, $-\text{O}^+\text{M}^+$, $-\text{OR}^{70}$, $-\text{SR}^{70}$, $-\text{S}^+\text{M}^+$, $-\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, трига-

логенметил, $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^{70}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{O}^-\text{M}^+$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{OR}^{70}$, $-\text{OS}(\text{O})_2\text{R}^{70}$, $-\text{OS}(\text{O})_2\text{O}^-\text{M}^+$, $-\text{OS}(\text{O})_2\text{OR}^{70}$, $-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)_2(\text{M}^+)_2$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{70})\text{O}^-\text{M}^+$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{70})(\text{OR}^{70})$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{70}$, $-\text{C}(\text{S})\text{R}^{70}$, $-\text{C}(\text{NR}^{70})\text{R}^{70}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{70}$, $-\text{C}(\text{S})\text{OR}^{70}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, $-\text{C}(\text{NR}^{70})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^{70}$, $-\text{OC}(\text{S})\text{R}^{70}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^{70}$, $-\text{OC}(\text{S})\text{OR}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{O})\text{R}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{S})\text{R}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{O})\text{OR}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{S})\text{OR}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{O})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{NR}^{70})\text{R}^{70}$ и $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{NR}^{70})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, где R^{60} , R^{70} , R^{80} и M^+ являются такими, как определено ранее.

Помимо представленного описания в некоторых вариантах реализации замещенная группа имеет 1, 2, 3 или 4 заместителя, 1, 2 или 3 заместителя, 1 или 2 заместителя, или 1 заместитель.

Следует понимать, что во всех замещенных группах, определенных выше, полимеры, возникающие при определении заместителей с дополнительными заместителями (например, замещенный арил, имеющий замещенную арильную группу в качестве заместителя, которая сама замещена замещенной арильной группой, которая дополнительно замещена замещенной арильной группой, и т.д.), не входят в настоящее описание. В таких случаях максимальное количество указанных замещения равно трем. Например, серийные замещения замещенных арильных групп, специально подразумеваемые в данном контексте, ограничены группой замещенный арил-(замещенный арил)-замещенный арил.

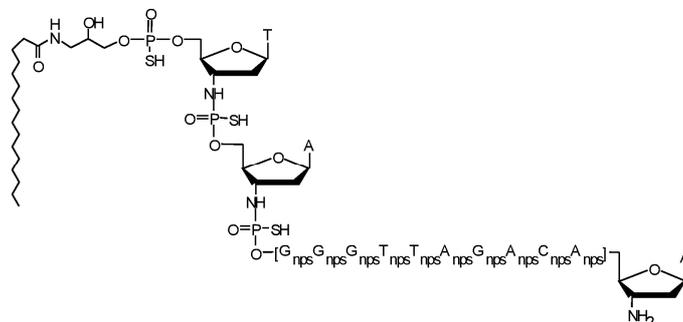
Если не указано иное, то номенклатура заместителей, не имеющих явного определения в данном описании, определена названием концевой части функциональной группы, затем соседней функциональности в направлении точки присоединения. Например, заместитель "арилалкилоксикарбонил" относится к группе (арил)-(алкил)-O-C(O)-.

В отношении любых групп, описанных в настоящем документе, которые содержат один или более заместителей, следует понимать, конечно, что такие группы не содержат какой-либо замены или замещающих структур, которые являются пространственно невозможными и/или неосуществимыми точки зрения синтеза. Кроме того, рассматриваемые соединения включают все стереохимические изомеры, возникающие при замещении указанных соединений.

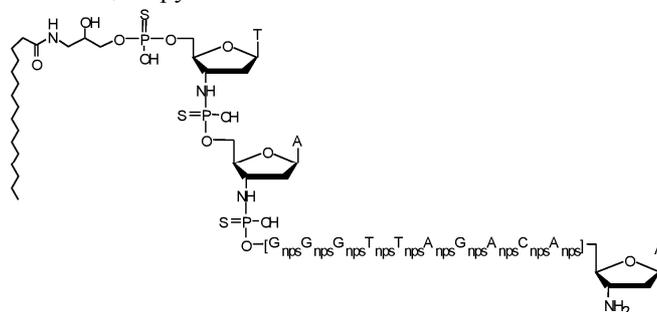
Термин "фармацевтически приемлемая соль" означает соль, которая приемлема для введения пациенту, такому как млекопитающее (соли с противоионами, имеющие приемлемую безопасность для млекопитающих в данном режиме дозирования). Такие соли могут быть получены из фармацевтически приемлемых неорганических или органических оснований и из фармацевтически приемлемых неорганических или органических кислот. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к фармацевтически приемлемым солям соединения, которые получены из различных органических и неорганических противоионов, общеизвестных в данной области техники, и включают, например, натрий и т.п.; и если молекула содержит основную функциональную группу, соли органических или неорганических кислот, такие как гидрохлорид, и т.п. Рассматриваемые фармацевтически приемлемые соли включают, но не ограничиваются ими, соли алюминия, аммония, аргинина, бария, бензатина, кальция, холината, этилендиамина, лития, лития, магния, меглумина, прокаина, калия, натрия, трометамина, N-метилглюкамина, N,N'-дибензилэтилендиамина, хлорпрокаина, диэтаноламина, этаноламина, пиперазина, цинка, диизопропиламина, диизопропилэтиламина, триэтиламина и триэтаноламина. Термин "его соль" означает соединение, образованное при замене протона кислоты катионом, таким как катион металла или органический катион, и т.п. Если это уместно, соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль, хотя это не является необходимым для солей промежуточных соединений, которые не предназначены для введения пациенту. Например, соли соединений согласно настоящему изобретению включают соли, в которых соединение является протонированным неорганической или органической кислотой с образованием катиона, с сопряженным основанием неорганической или органической кислоты в качестве анионного компонента указанной соли. Рассматриваемые соли включают, но не ограничиваются ими, соли алюминия, аммония, аргинина, бария, бензатина, кальция, цезия, холината, этилендиамина, лития, магния, меглумина, прокаина, N-метилглюкамина, пиперазина, калия, натрия, трометамина, цинка, N,N'-дибензилэтилендиамина, хлорпрокаина, диэтаноламина, этаноламина, пиперазина, диизопропиламина, диизопропилэтиламина, триэтиламина и триэтаноламина. Следует понимать, что для любых олигонуклеотидных структур, изображенных в настоящем документе, которые содержат скелет межнуклеозидных связей, такие олигонуклеотиды также могут включать любые подходящие солевые формы. В некоторых вариантах реализации для простоты изображены кислотные формы межнуклеозидных связей. В некоторых случаях соль рассматриваемого соединения представляет собой соль одновалентного катиона. В некоторых вариантах реализации соль рассматриваемого соединения представляет собой соль двухвалентного катиона. В некоторых случаях соль рассматриваемого соединения представляет собой соль трехвалентного катиона. "Сольват" относится к комплексу, образованному комбинацией молекул растворителя с молекулами или ионами растворенного вещества. Растворитель может представлять собой органическое соединение, неорганическое соединение или их смесь. Некоторые примеры растворителей включают, но не ограничиваются ими, метанол, N,N-диметилформамид, тетрагидрофуран, диметилсульфоксид и воду. Если растворитель представляет собой воду, образованный сольват представляет собой гидрат. "Стереизомер" и "стереоизомеры" относятся к соединениям, которые имеют одинаковую последовательность соединения атомов, но разное расположение атомов в пространстве. Стереизомеры включают цис-транс изомеры, E и Z изомеры, энантиомеры и диастереомеры.

"Таутомер" относится к альтернативным формам молекулы, которые отличаются только электрон-

ным связыванием атомов и/или положение протона, таким как кето-енольные и имин-енаминные таутомеры, $-\text{NH}-\text{P}(=\text{S})(\text{OH})-\text{O}-$ и $-\text{NH}-\text{P}(=\text{O})(\text{SH})-\text{O}-$, или таутомерные формы гетероарильных групп, содержащих кольцевое расположение атомов $-\text{N}=\text{C}(\text{H})-\text{NH}-$, таких как пиразолы, имидазолы, бензимидазолы, триазолы и тетразолы. Специалистам в данной области техники понятно, что возможны и другие таутомерные расположения групп, описанных в настоящем документе. Например, следует понимать, что олигонуклеотид, описанный следующей структурой:



включает также следующую структуру, демонстрирующую одно возможное альтернативное таутомерное расположение связывающих групп



где "nps" представляет собой тиофосфорамидатную связь ($-\text{NH}-\text{P}(=\text{O})(\text{SH})-\text{O}-$ или $-\text{NH}-\text{P}(=\text{S})(\text{OH})-\text{O}-$), связывающую 3'-атом углерода одного нуклеозида с 5'-атомом углерода соседнего нуклеозида. Следует понимать, что все таутомерные формы рассматриваемого соединения входят в структуру, в которой описано лишь одно возможное таутомерное расположение групп соединения, даже если они специально не указаны. При описании соединений может быть использовано любое подходящее таутомерное расположение групп рассматриваемых соединений.

Следует понимать, что термин "или его соль, или сольват, или стереоизомер" включает все перестановки солей, сольватов и стереоизомеров, такие как сольват фармацевтически приемлемой соли стереоизомера рассматриваемого соединения. Следует понимать, что термин "или его соль" включает все перестановки солей. Следует понимать, что термин "или его фармацевтически приемлемая соль" включает все перестановки солей. Следует понимать, что термин "или его сольват" включает все перестановки сольватов. Следует понимать, что термин "или его стереоизомер" включает все перестановки стереоизомеров. Следует понимать, что термин "или его таутомер" включает все перестановки таутомеров. Таким образом, например, следует, что включен сольват фармацевтически приемлемой соли таутомера стереоизомера рассматриваемого соединения.

"Фармацевтически эффективное количество" и "терапевтически эффективное количество" относятся к количеству соединения, достаточному для лечения конкретного расстройства или заболевания, или одного или более его симптомов, и/или для предотвращения возникновения заболевания или расстройства. В отношении онкогенных пролиферативных расстройств, фармацевтически или терапевтически эффективное количество включает количество, достаточное, среди прочего, для инициации сокращения опухоли или снижения скорости роста опухоли. "Пациент" относится к человеку и субъектам, не являющимся человеком, особенно к млекопитающим субъектам.

Термин "лечить" или "лечение" в данном контексте означает лечение заболевания или медицинского состояния у пациента, такого как млекопитающее (в частности, человек), которое включает: (a) предотвращение возникновения заболевания или медицинского состояния, такое как профилактическое лечение субъекта; (b) облегчение заболевания или медицинского состояния, такое как исключение или инициация регрессии заболевания или медицинского состояния у пациента; (c) подавление заболевания или медицинского состояния, например, посредством замедления или остановки развития заболевания или медицинского состояния у пациента; или (d) облегчение симптома заболевания или медицинского состояния у пациента.

В данном контексте термин "выделенное" описывает рассматриваемое соединение, которое находится в среде, отличной от среды, в которой изначально находится соединение. "Выделенное" включает

соединения, которые находятся в образцах, содержащих существенно более высокое количество рассматриваемого соединения, и/или в которых рассматриваемое соединение является частично или по существу очищенным.

В данном контексте "по существу 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 85%, чистым по меньшей мере на 90%, чистым по меньшей мере на 95%, чистым по меньшей мере на 98% или чистым более чем на 98% от других компонентов, с которыми оно было связано естественным образом. Термин "физиологические условия" включает условия, совместимые с живыми клетками, например, преимущественно водные условия с температурой, pH, соленостью и т.д., которые совместимы с живыми клетками.

Перед подробным описанием настоящего изобретения следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами реализации, поскольку они, конечно, могут изменяться. Также следует понимать, что употребляемая в данном документе терминология предназначена для описания только конкретных вариантов реализации изобретения и не должна считаться ограничивающей, так как объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

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 исключенного предела в заданном интервале. Если заданный интервал включает один или оба предела, то интервалы без одного или обоих пределов также включены в изобретение.

Понятно, что некоторые признаки настоящего изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов реализации, могут быть представлены в комбинации в пределах одного варианта реализации. С другой стороны, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта реализации, также могут быть представлены по отдельности или в любой подходящей субкомбинации. Все комбинации вариантов реализации, касающихся настоящего изобретения, специально включены в настоящее изобретение и описаны в настоящем документе, как если бы все и каждая комбинация была описана по отдельности и в явном виде, в той степени, в которой такие комбинации охватывают рассматриваемый предмет, который представляет собой, например, соединения, представляющие собой стабильные соединения (т.е. соединения, которые могут быть получены, выделены, охарактеризованы и испытаны на биологическую активность). Кроме того, все субкомбинации различных вариантов реализации и их элементов (например, элементов химических групп, перечисленных в вариантах реализации, описывающих такие переменные) также специально включены в настоящее изобретение и описаны в настоящем документе, как если бы все и каждая такая субкомбинация была по отдельности и в явном виде описана в настоящем документе.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, что обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при практическом осуществлении или испытании настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем описании, далее будут описаны иллюстративные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в настоящем документе, включены в него посредством ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми цитируются указанные публикации. Следует отметить, что при использовании в настоящем 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 исключаящих терминов, как "исключительно", "только" и тому подобных в связи с перечислением элементов формулы изобретения, или для использования "отрицательных" ограничений.

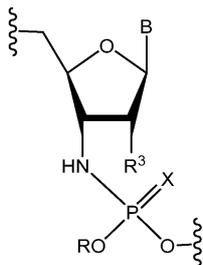
Понятно, что некоторые признаки настоящего изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов реализации, могут быть представлены в комбинации в пределах одного варианта реализации. С другой стороны, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта реализации, также могут быть представлены по отдельности или в любой подходящей субкомбинации.

Публикации, рассмотренные в данном документе, представлены лишь в отношении их описания до даты подачи настоящей заявки. Информацию в настоящем документе не следует толковать как признание того, что настоящее изобретение не имеет права датировать такую публикацию более ранним числом из-за действия более раннего изобретения. Более того, данные представленных публикаций могут отличаться от фактически опубликованных данных, что может потребовать независимого подтверждения.

Подробное описание сущности изобретения

Как вкратце описано выше, в настоящем описании представлен твердофазный способ получения олигонуклеотидов посредством последовательных циклов связывания, включающих связывание динуклеотидного димера со свободной 3'-концевой группой (например, 3'-гидроксильной или 3'-аминогруппой) растущей цепи. В целом, синтез проводят от 5'-конца к 3'-концу целевой олигонуклеотидной последовательности, и синтез включает по меньшей мере одно связывание динуклеотидного димера. Димер может быть связан со свободной 3'-концевой группой растущей цепи посредством любого подходящего химического механизма. В некоторых случаях димер представляет собой 3'-защищенный динуклеотид-5'-фосфорамидитный димер, где динуклеотид может содержать любую подходящую межнуклеозидную связь. Олигонуклеотид может содержать одну или более фосфорамидатных межсубъединичных связей (например, оксофосфорамидатную или тиофосфорамидатную связь).

В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит последовательность нуклеозидных субъединиц, содержащую по меньшей мере одну субъединицу, определенную формулой



где В представляет собой пурин, защищенный пурин, пиримидин или защищенный пиримидин, или их аналог; Х представляет собой О или S; R выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, замещенного алкила, арила, замещенного арила, фосфатной защитной группы; и R³ выбран из группы, состоящей из водорода, O-R² и галогена, где R² представляет собой H, алкил, замещенный алкил (например, -(CH₂)_nW(CH₂)_mH, где n равен от 1 до 10, m равен от 0 до 10 и W представляет собой O, S или NH) или защитной группы гидроксила. Следует понимать, что некоторые олигонуклеотиды, содержащие субъединицу, описанную представленной выше формулой, также могут существовать в солевой форме. Такие формы, при условии возможности их существования, включены в объем настоящего описания. Рассматриваемые способы обеспечивают уменьшенное количество циклов связывания по сравнению со способами, включающими связывание только нуклеозидных мономерных субъединиц, и обеспечивают уменьшенное количество нецелевых олигонуклеотидных продуктов синтеза. Ретросинтетическая стратегия, используемая для получения целевой олигонуклеотидной последовательности, может быть выбрана в зависимости от множества факторов, таких как длина и последовательность целевого олигонуклеотида, для минимизации количества конкретных нецелевых олигонуклеотидных продуктов синтеза.

В некоторых вариантах реализации рассматриваемые способы обеспечивают получение композиций, которые содержат сниженное количество одного или более (N-x) продуктов по сравнению с целевым рассматриваемым олигонуклеотидом. В некоторых вариантах реализации любые композиции, описанные в настоящем документе, содержащие сниженное количество одного или более (N-x) продуктов по сравнению с целевым рассматриваемым олигонуклеотидом, являются неочищенными.

В данном контексте термин "(N-x) продукт" (где x представляет собой целое число от 1 до N-1, и N представляет собой количество нуклеозидных остатков в целевом олигонуклеотиде) относится к нецелевому олигонуклеотиду, полученному с помощью рассматриваемых способов получения, в котором не хватает x нуклеозидных остатков, по сравнению с последовательностью целевого олигонуклеотида, имеющей N остатков в длину. Целевой олигонуклеотид представляет собой продукт, на получение которого ориентирован рассматриваемый способ получения. Таким образом, (N-1) продукт представляет собой нецелевой олигонуклеотид, в котором не хватает любого одного нуклеозидного остатка в последовательности целевого олигонуклеотида. Следовательно, в некоторых случаях термин "(N-1) продукт" относится к различным нецелевым олигонуклеотидным продуктам, в каждом из которых не хватает одного нуклеозидного остатка по сравнению с последовательностью целевого олигонуклеотида. Таким же образом, термин "(N-x) продукт" относится к множеству нецелевых олигонуклеотидных продуктов, в каждом из которых не хватает x нуклеозидных остатков по сравнению с последовательностью целевого олигонуклеотида. Например, (N-2) продукт представляет собой нецелевой олигонуклеотид, в котором не хватает любых двух нуклеозидных остатков в последовательности целевого олигонуклеотида. В некоторых случаях x остатков являются примыкающими друг к другу по сравнению с целевой олигонуклеотидной последовательностью. В других случаях x остатков расположены отдельно друг от друга относительно целевой олигонуклеотидной последовательности. X нуклеозидных остатков может не хватать в любом положении целевой последовательности, и они могут быть образованы из непрореагировавших 3'-концевых групп во время цикла связывания. (N-x) продукты рассматриваемых способов могут содержать одну или более дополнительных модификаций, возникающих в результате рассматриваемых способов синтеза, например, модификация частичного снятия защиты, потеря азотистого основания (например,

депуринизация), кэпирование концевой группы, дериватизация синтетическим реагентом (например, фенилацетилирование сульфлирующим реагентом) и т.п. Возможны многие модифицированные олигонуклеотиды, в зависимости от химического способа синтеза олигонуклеотида и используемых реагентов. Если не указано иное, все такие модификации входят в определение термина "(N-x) продукт".

В некоторых вариантах реализации рассматриваемые способы приводят к уменьшению одного или более нецелевых продуктов синтеза олигонуклеотида, выбранных из частично защищенного продукта или частично защищенного (N-x) продукта, например, олигонуклеотидного продукта, содержащего одну или более защитных групп азотистого основания. В рассматриваемых олигонуклеотидных композициях целевая олигонуклеотидная последовательность может быть легче выделена или очищена от других продуктов, содержащих олигонуклеотиды, указанного способа, например, (N-x) продуктов и продуктов, лишенных азотистого основания.

Варианты реализации рассматриваемых способов и композиций более подробно описаны в представленных ниже разделах.

Способы получения олигонуклеотидов

В настоящем описании представлен способ получения олигонуклеотида.

Рассматриваемые способы могут включать по меньшей мере одно связывание динуклеотидного димера со свободной 3'-концевой группой растущей олигонуклеотидной цепи. В рассматриваемых способах получения могут быть использованы любые подходящие способы и химические приемы синтеза олигонуклеотидов. Химические приемы и рассматриваемые способы синтеза олигонуклеотидов, которые могут быть адаптированы для применения в рассматриваемых способах, включают, но не ограничиваются ими, фосфорамидит, N-фосфонат, фосфодизфир, фосфотриэфир, фосфит-триэфир и те, которые описаны авторами Feagon et al. в патенте США 5824793, полное описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Олигонуклеотидные компоненты соединений согласно настоящему изобретению могут быть синтезированы посредством адаптации обычных протоколов к выбранному химическому типу. Рассматриваемые способы синтеза олигонуклеотидов, имеющих N3'→P5' фосфорамидатный химический состав, включают, но не ограничиваются ими, способы, описанные в публикации McCurdy et al. (1997) *Tetrahedron Letters*, 38:207-210 и Pongracz & Gryaznov, (1999) *Tetrahedron Letters*, 49:7661-7664.

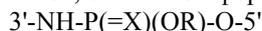
Рассматриваемый олигонуклеотид может быть получен с применением рассматриваемых способов посредством последовательного связывания, начиная с 5'-конца и продолжая до 3'-конца целевой олигонуклеотидной последовательности. 5'-Концевая нуклеозидная субъединица может быть присоединена к любой подходящей твердой подложке посредством необязательной связывающей группы или 5'-концевой группы. Затем связывание субъединицы с растущей олигонуклеотидной цепью может быть достигнуто с применением либо димерных фосфорамидитов, либо мономерных фосфорамидитов. В альтернативном варианте 5'-концевая динуклеотидная субъединица может быть присоединена к любой подходящей твердой подложке посредством необязательно связывающей группы или 5'-концевой группы. После присоединения первой субъединицы (например, мономерной или димерной субъединицы) к твердой подложке с указанной субъединицы может быть снята защита с получением свободной, иммобилизованной 5'-концевой группы. В некоторых случаях указанный способ включает связывание подложки, связанной с 3'-концевой группой, с димером 3'-защищенный динуклеотид-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 указанный способ включает стадии: (а) снятия защиты с защищенной 3'-аминогруппы концевого нуклеозида, присоединенного к твердофазной подложке, указанное снятие защиты приводит к образованию свободной 3'-аминогруппы; (b) приведения в контакт свободной 3'-аминогруппы с димером 3'-защищенный аминоклинонуклеотид-тиофосфорамидат или фосфорамидит-5'-фосфорамидит в присутствии нуклеофильного катализатора с образованием межнуклеозидной N3'→P5' фосфорамидитной связи; и (с) окисления указанной связи. Целевая олигонуклеотидная последовательность может быть синтезирована с помощью ретросинтетической стратегии, которая включает последовательное связывание обеих димерных и мономерных субъединиц с 3'-концевой группой растущей олигонуклеотидной цепи. Таким образом, в некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает стадии: (а) снятия защиты с защищенной 3'-аминогруппы концевого нуклеозида, присоединенного к твердофазной подложке, указанное снятие защиты приводит к образованию свободной 3'-аминогруппы; (b) приведения в контакт свободной 3'-аминогруппы с мономером 3'-защищенный аминоклинонуклеотид-5'-фосфорамидит в присутствии нуклеофильного катализатора с образованием межнуклеозидной N3'→P5' фосфорамидитной связи; и (с) окисления указанной связи с получением N3'→P5' фосфорамидатной связи.

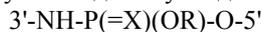
В данном контексте термин "N3'→P5' фосфорамидитная связь" относится к промежуточному соединению фосфора (III) фосфорамидатной связи N3'→P5'. В целом, фосфорамидатная связь N3'→P5' образуется посредством окисления фосфорамидитной связи N3'→P5' до продукта фосфора (V) (например, фосфорамидатная связь N3'→P5', которая может содержать оксо (P=O) или тио (P=S) группы). В некото-

рых случаях стадия окисления может быть описана как сульфирование фосфорамидитной связи $N3' \rightarrow P5'$ с получением тиофосфорамидатной связи $N3' \rightarrow P5'$.

В данном контексте " $N3' \rightarrow P5'$ фосфорамидат", " $P5' \rightarrow N3'$ фосфорамидат" и "фосфорамидат" относятся к межнуклеозидной субъединичной связи, описанной формулой:



или ее таутомеру, где 3' и 5' относятся к атомам углерода сахарных фрагментов последовательных нуклеозидов, которые связаны указанной связью, и где R представляет собой водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил или защитную группу фосфата, и X представляет собой халькоген, такой как кислород или сера. Следует понимать, что если R представляет собой водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил или защитную группу фосфата, то некоторые межнуклеозидные субъединичные связи, описанные представленной выше формулой, могут также существовать в солевой форме. Такие формы, при условии возможности их существования, включены в объем настоящего описания. В некоторых случаях, если X представляет собой серу, фосфорамидат может быть упомянут как тиофосфорамидат. В некоторых случаях, если X представляет собой кислород, "фосфорамидат" может быть упомянут как "оксофосфорамидат". В некоторых случаях, если R представляет собой защитную группу фосфата, он может представлять собой алкил, алкенил, арил, аралкил, циклоалкил или их замещенные версии. В некоторых случаях R представляет собой защитную группу фосфата, содержащую 10 или менее атомов углерода. В некоторых случаях, если R представляет собой защитную группу фосфата, он представляет собой алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода; электроноакцепторный β -замещенный этил (например, β -тригалогенметил-, β -циано-, β -сульфо- или β -нитрозамещенный этил); электроноакцепторный замещенный фенил (например, галоген-, сульфо-, циано или нитрозамещенный фенил); или электроноакцепторный замещенный фенилэтил. В некоторых вариантах реализации, если R представляет собой защитную группу фосфата, он представляет собой метил, β -цианоэтил или 4-нитрофенилэтил. В некоторых вариантах реализации R представляет собой водород, метил или β -цианоэтил. Электроноакцепторные заместители, представляющие интерес, включают, но не ограничиваются ими, галоген, циано, нитро, сульфо или моно-, ди- или тригалогенметил, и т.п. Заместители, представляющие собой атом галогена, обычно представляют собой фтор, хлор, бром или йод; и в некоторых случаях они представляют собой фтор или хлор. "Электроноакцепторный" означает склонность заместителя притягивать валентные электроны молекулы, частью которой он является, т.е. он является электроотрицательным, см., например, March, *Advanced Organic Chemistry*, сс. 16-18 (John Wiley, Нью-Йорк, 1985). Руководство по выбору защитной группы фосфата представлено в публикации Beaucage и Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992). Для удобства, нуклеотидные фосфорамидаты иногда обозначены в настоящем документе нижним индексом "np" или "pn" для $N3' \rightarrow P5'$ фосфорамидатов и $P3' \rightarrow N5'$ фосфорамидатов, соответственно. Так, " $U_{np}U$ " представляет собой динуклеотид, в котором 3'-аминоуридин и уридин связаны $N3' \rightarrow P5'$ фосфорамидатной связью. Если связь представляет собой оксофосфорамидат, то нуклеотидный оксофосфорамидат иногда обозначен в данном контексте нижним индексом "про" или "орп" для $N3' \rightarrow P5'$ фосфорамидатов и $P3' \rightarrow N5'$ фосфорамидатов, соответственно. Аналогично, нуклеотидные тиофосфорамидаты иногда обозначены в данном контексте нижним индексом "nps" или "spn" для $N3' \rightarrow P5'$ тиофосфорамидатов и $P3' \rightarrow N5'$ тиофосфорамидатов, соответственно. Аналогично, 2'-фторзаместители обозначены верхним индексом "f". Так, " $U_{fnp}U$ " представляет собой динуклеотид, в котором 5'-крайний 3'-амино-2'-фторуридин связан с уридином $N3' \rightarrow P5'$ фосфорамидатной связью. Единственный начальный нижний индекс "p" означает 5'-монофосфат, а единственный замыкающий нижний индекс "n" означает 3'-аминогруппу. В некоторых случаях межнуклеозидная субъединичная связь описана формулой:



или представляет собой ее таутомер, где 3' и 5' относятся к атомам углерода сахарных фрагментов последовательных нуклеозидов, которые связаны указанной связью, и где R представляет собой водород, и X представляет собой кислород или серу. Следует понимать, что для любых олигонуклеотидов, описанных в настоящем документе, которые содержат такую межнуклеозидную связь, указанные олигонуклеотиды также могут включать любые подходящие солевые формы указанной связи. Таким образом, указанная межнуклеозидная связь может быть в солевой форме, которая содержит любой подходящий противоион.

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

В данном контексте термин "защитная группа фосфата" относится к защитной группе, которая может быть присоединена к фосфорсодержащей межсубъединичной связи олигонуклеотида. При ее наличии защитная группа фосфата может препятствовать (т.е. блокировать) взаимодействию фосфорсодержащей связи в том положении, в котором присоединена защитная группа фосфата. Рассматриваемыми защитными группами фосфата могут быть защищены любые подходящие фосфорсодержащие межсубъ-

диничные 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. Защитная группа фосфата может быть присоединена к доступному атому кислорода фосфорсодержащей межсубъединичной связи. В качестве защитной группы фосфата могут быть использованы любые подходящие защитные группы. Защитные группы фосфата, представляющие собой интерес, включают, но не ограничиваются ими, алкил, алкенил, арил, аралкил, циклоалкил или их замещенные версии, например, алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода, такой как электроноакцепторный β -замещенный этил (например, β -тригалогенметил-, β -циано-, β -сульфо- или β -нитрозамещенный этил; электроноакцепторный замещенный фенил (например, галоген-, сульфо-, циано- или нитрозамещенный фенил); или электроноакцепторный замещенный фенилэтил, метил, β -цианоэтил или 4-нитрофенилэтил. В некоторых вариантах реализации защитная группа фосфата представляет собой метил или β -цианоэтил. Электроноакцепторные заместители, представляющие интерес, включают, но не ограничиваются ими, галоген (например, хлор или фтор), циано, нитро, сульфо или моно-, ди- или тригалогенметил, и т.п. 3'-Концевая группа растущей олигонуклеотидной цепи может включать 3'-гидроксил, 3'-аминогруппу или их защищенные версии. Во время синтеза олигонуклеотида в 3'-концевой группе могут быть использованы любые подходящие защитные группы гидроксила и/или аминогруппы. 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.

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, 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 Veaucage и Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992). В некоторых случаях снятие защиты с защищенной 3'-аминогруппы концевого нуклеозида включает детритилирование с получением свободной 3'-концевой группы, например, катализируемое кислотой детритилирование.

В целом, димерные или мономерные субъединичные фосфорамидиты содержат защищенную 3'-гидроксильную или 3'-аминогруппу, которая является такой же, как 3'-концевая группа концевого нуклеозида, присоединенного к твердой подложке. 3'-Защита поступающих субъединичных фосфорамидитов препятствует нежелательной полимеризации цепи.

В рассматриваемых способах 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, сс. 11-147, том 44 (Academic Press, Нью-Йорк, 1976); патенты США № 4678814; 4413070; и 4046720; и Pon, гл. 19, в книге Agrawal, ред., *Methods in Molecular Biology*, том 20, (Humana Press, Тотова, штат Нью-Джерси, 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, патенте США № 4659774; Barany et al., в международной патентной заявке 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 и 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-NH⁺™, 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. обстоятельное руководство по выбору 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, представлено в литературе, например, Gait, ред., *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press, Оксфорд, 1984); Amarnath и Broom, *Chemical Reviews*, том 77, сс. 183-217 (1977); Pon et al., *Biotechniques*, том 6, сс. 768-775 (1988); Ohtsuka et al., *Nucleic Acids Research*, том 10, сс. 6553-6570 (1982); Eckstein, ред., *Oligonucleotides. and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Оксфорд, 1991), Greene и Wuts "Protective Groups in Organic Synthesis", третье изд., Wiley, Нью-Йорк 1999, Narang, ред. *Synthesis and Applications of DNA and RNA* (Academic Press, Нью-Йорк, 1987), Beaucage и Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992), и подобных ссылок.

Стадия связывания рассматриваемых способов может быть осуществлена в температурном диапазоне от -20 до 200°C. В некоторых случаях реакцию проводят при температуре окружающей среды (около 15-30°C). Реакция может быть осуществлена добавлением раствора фосфорамидитного димера или мономера и раствора активатора (или раствора, содержащего фосфорамидитный димер или мономер и активатор) в реакционный сосуд, содержащий свободную аминогруппу (олиго)нуклеотида, ковалентно присоединенного к твердой подложке. В целом, рассматриваемые активаторы включают нуклеофильные катализаторы, которые замещают более стабильную фосфорамидитную аминогруппу с образованием очень реакционноспособного (и менее стабильного) промежуточного соединения, которое, в свою очередь, взаимодействует со свободной 3'-аминогруппой связанного с твердой подложкой олигонуклеотидного N3'→P5' фосфорамидата. Затем смесь перемешивают такими способами как механическое встряхивание, продувание инертного газа и т.д. В альтернативном варианте раствор(ы) димера или мономера и активатора может быть получен и направлен в виде потока через реакционный сосуд (или колонну), содержащий связанный с твердой подложкой (олиго)нуклеотид со свободной 3'-концевой группой. Мономер и активатор могут быть смешаны заранее, смешаны в клапанном блоке подходящего синтезатора, смешаны в емкости предварительной активации и при необходимости предварительно уравновешены, или они могут быть добавлены в реакционный сосуд по отдельности.

Активаторы, представляющие интерес, которые могут быть использованы в рассматриваемых способах, включают, но не ограничиваются ими, тетразол, 5-(этилтио)тетразол, 5-(4-нитрофенил)тетразол, 5-(2-тиофен)тетразол, триазол, хлорид пиридиния и т.п., например, активирующие агенты, описанные в публикации Beaucage и Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992); Berner et al., *Nucleic Acids Research*, 17: 853-864 (1989); Benson, *Chem. Rev.* 41: 1-61 (1947). В данном контексте термин "тетразольный активатор" относится к активаторам, которые представляют собой тетразол или производные тетразола. В некоторых вариантах реализации активатор представляет собой тетразол. Подходящие растворители включают, но не ограничиваются ими, ацетонитрил, тетрагидрофуран, метилхлорид и т.п. Следует соблюдать осторожность при использовании сухого (не содержащего воды) димера или мономера, активатора и растворителя на стадии связывания, а также в отношении растворителя, используемого для промывания твердой подложки непосредственно перед стадией связывания.

После связывания непрореагировавшие 3'-аминогруппы связанной с подложкой растущей цепи олигонуклеотида 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 искусный ангидрид и изомаляный ангидрид, хлорангидриды кислот, такие как адамантилкарбонилхлорид, пивалоилхлорид и т.п., изотиоцианаты, хлорформаты 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 указанный способ включает окисление межнуклеозидной

$N3' \rightarrow P5'$ 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 $N3' \rightarrow P5'$ фосфорамидитной связи (например, с применением окислительного агента на основе йода/вода) приводит к получению оксофосфорамидатной связи. В других случаях окисление $N3' \rightarrow P5'$ 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., WO 2001018015, полное описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Сульфорирующие агенты для применения согласно настоящему изобретению включают элементарную серу, тиурамдисульфиды, такие как тетраэтилтиурамдисульфид, ацилдисульфиды, такие как фенацилдисульфид, фосфинотиоилдисульфиды, такие как S-Tetra™, и 1,1-диоксо-3Н-1,2-бензодитиол-3-он. В некоторых вариантах реализации сульфирование может быть проведено с применением элементарной серы (S8). 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.

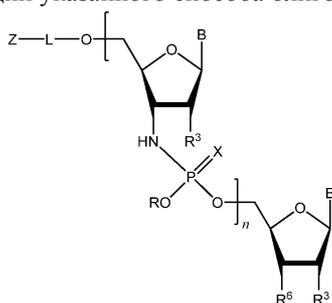
Окислительные агенты, подходящие в указанном способе, включают йод, хлор, бром, перкислоты, такие как м-хлорбензойная кислота, гидропероксиды, такие как трет-бутилгидропероксид, этилгидропероксид, метилгидропероксид и т.п., озон, смешанные ацилсульфиновые ангидриды, такие как 3Н-2,1-бензоксатиолан-3-он-1-оксид, соли персульфатов, такие как персульфат натрия, аммония и тетрабутиламмония, и т.п., монопероксисульфаты, такие как Oxone™, гипохлорит натрия и/или другие гипохлориты, пероксиды, такие как диэтилпероксид или бис(триметилсилил)пероксид, или пероксид водорода, или неводные эквиваленты пероксида водорода, такие как пероксидный комплекс мочевины/водорода, и т.д. Другие подходящие окислительные агенты, которые могут быть использованы для превращения фосфора (III) в фосфор (V), описаны в публикации Beausage и Iyer, Tetrahedron 48: 2223-2311 (1992).

В некоторых случаях окислительный или сульфорирующий агент может быть склонен к участию в нежелательной побочной реакции Арбузова, протекающей параллельно требуемому окислению (Beausage и Iyer, ссылка выше). Побочная реакция Арбузова может приводить к снятию защиты с фосфорамидата, который нестабилен в кислотных условиях на последующих стадиях детритилирования, что приводит к фрагментации олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации в качестве окислительного агента используют пероксид водорода для минимизации побочной реакции Арбузова. В некоторых вариантах реализации окисление включает приведение в контакт олигонуклеотида с раствором 1,5% пероксида водорода, 3,5% воды, 20% пиридина и 75% ТГФ. В некоторых вариантах реализации указанный способ включает стадии:

- (a) снятие защиты с защищенной 3'-аминогруппы концевого нуклеозида, присоединенного к твердофазной подложке, указанное снятие защиты приводит к образованию свободной 3'-аминогруппы;
- (b) взаимодействие свободной 3'-аминогруппы с:
 - (i) димером 3'-защищенный аминокдинуклеотид-фосфорамидат-5'-фосфорамидит или
 - (ii) мономером 3'-защищенный аминокнуклеозид-5'-фосфорамидит; в присутствии нуклеофильного катализатора с получением межнуклеозидной $N3' \rightarrow P5'$ фосфорамидитной связи;
- (c) окисление указанной связи и
- (d) повторение стадий (a)-(c) до синтеза полинуклеотида, где повторение стадий (a)-(c) включает осуществление стадии (b)(i) по меньшей мере один раз. В некоторых вариантах реализации повторение стадий (a)-(c) включает осуществление стадии (b)(i) два раза или более. В некоторых вариантах реализации повторение стадий (a)-(c) включает осуществление стадии (b)(i) 3 раза или более, например 4 раза или более, 5 раз или более, 6 раз или более, 7 раз или более, 8 раз или более, 9 раз или более, 10 раз или более, 15 раз или более, 20 раз или более, или даже 30 раз или более. В некоторых вариантах реализации повторение стадий (a)-(c) включает осуществление стадии (b)(i) на каждой стадии связывания. В некоторых вариантах реализации повторение стадий (a)-(c) включает осуществление стадии (b)(i) на каждой стадии связывания, за исключением одной. В некоторых вариантах реализации повторение стадий (a)-(c) включает осуществление стадии (b)(i) один и только один раз. В некоторых вариантах реализации повторение стадий (a)-(c) включает осуществление стадии (b)(i) два и только два раза.

Как описано в настоящем документе, следует понимать, что термин "фосфорамидатная связь" включает оксофосфорамидатные и тиофосфорамидатные связи (например, как показано в формуле I). В некоторых вариантах реализации указанного способа окисление межнуклеозидной $N3' \rightarrow P5'$ фосфорамидитной связи приводит к образованию оксофосфорамидатной связи. В некоторых вариантах реализации указанного способа окисление $N3' \rightarrow P5'$ фосфорамидитной связи включает сульфирование с получением тиофосфорамидатной связи.

В некоторых вариантах реализации указанного способа олигонуклеотид описан формулой (I)



Формула (I)

где

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 представляет собой водород, фтор, гидроксил, алкокси, замещенный алкокси или защищенный гидроксил;

R⁶ представляет собой амино, гидроксил, защищенный амино, защищенный гидроксил, -O-L-Z или -NH-L-Z;

каждый L независимо представляет собой необязательный линкер;

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

R представляет собой водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил или защитную группу фосфата и

n представляет собой целое число от 1 до 1000. Если R представляет собой водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил или защитную группу фосфата, следует понимать, что некоторые олигонуклеотиды формулы (I) также могут существовать в солевой форме. Такие формы, при условии возможности их существования, включены в объем настоящего описания.

В некоторых вариантах реализации формулы (I) каждый R³ представляет собой водород. В некоторых вариантах реализации формулы (I) каждый R³ представляет собой фтор. В некоторых вариантах реализации формулы (I) каждый R³ представляет собой гидроксил.

В некоторых вариантах реализации формулы (I) R⁶ представляет собой амино. В некоторых вариантах реализации формулы (I) R⁶ представляет собой гидроксил.

В некоторых вариантах реализации формулы (I) каждый R представляет собой водород. Следует понимать, что если R представляет собой водород, то фосфатная связь может иметь заряд в водных условиях, таких как физиологические условия. Таким образом, следует понимать, что олигонуклеотиды формулы (I) также могут включать любые подходящие солевые формы указанной связи. Следовательно, межнуклеозидная связь формулы (I) может быть в солевой форме, которая содержит любой подходящий противоион. В некоторых вариантах реализации формулы (I) каждый R представляет собой алкил или замещенный алкил. В некоторых вариантах реализации формулы (I) каждый R представляет собой арил или замещенный арил. В некоторых вариантах реализации формулы (I) каждый R представляет собой защитную группу фосфата.

В некоторых вариантах реализации формулы (I) Z представляет собой H. В некоторых вариантах реализации формулы (I) Z представляет собой липид (например, как описано в настоящем документе). В некоторых случаях липид представляет собой жирную кислоту (например, как описано в настоящем документе). В некоторых вариантах реализации формулы (I) Z представляет собой подложку. 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) L отсутствует. В некоторых вариантах реализации каждый В независимо выбран из А, С, G, Т и U или их защищенной версии.

В некоторых вариантах реализации формулы (I) n представляет собой целое число от 1 до 500, например, от 1 до 100, от 1 до 75, от 1 до 50, от 1 до 40, от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10 или от 4 до 10. В некоторых вариантах реализации n представляет собой целое число от 1 до 100, например, от 5 до 50, 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 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25.

В некоторых вариантах реализации указанного способа олигонуклеотид содержит последовательность нуклеозидных субъединиц, комплементарную РНК компоненту человеческой теломеразы, и при

этом по меньшей мере две нуклеозидные субъединицы связаны N3'→P5' фосфорамидатной межсубъединичной связью. В некоторых вариантах реализации указанного способа олигонуклеотид содержит последовательность из 3-50 нуклеозидных последовательных субъединиц, комплементарную РНК компоненту человеческой теломеразы, например, от 5 до 40, 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 нуклеозидных субъединиц. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит последовательность из 10 или более последовательных нуклеозидных субъединиц, комплементарную РНК компоненту человеческой теломеразы. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит последовательность из 7 или более последовательных нуклеозидных субъединиц, например, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 последовательных нуклеозидных субъединиц. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотид содержит последовательность из 11-18, например, 11-16 последовательных нуклеозидных субъединиц, комплементарную РНК компоненту человеческой теломеразы.

В некоторых случаях указанного способа N3'→P5' тиофосфорамидатная межсубъединичная связь описана следующей структурой:



где R выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, замещенного алкила, арила, замещенного арила и защитной группы фосфата. Следует понимать, что если R выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, замещенного алкила, арила, замещенного арила и защитной группы фосфата, то некоторые межнуклеозидные связи, описанные представленной выше формулой, также могут существовать в солевой форме. Такие формы, при условии возможности их существования, включены в объем настоящего описания.

В некоторых случаях указанного способа N3'→P5' тиофосфорамидатная межсубъединичная связь описана следующей структурой:

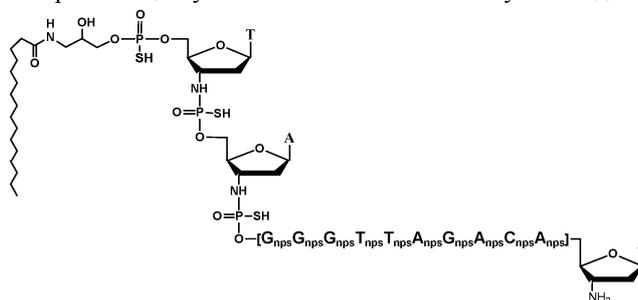


где R представляет собой водород. Следует понимать, что для любых олигонуклеотидов, описанных в настоящем документе, которые содержат такую межсубъединичную связь, указанные олигонуклеотиды также могут включать любые подходящие солевые формы указанной связи. Таким образом, указанная межсубъединичная связь может быть в солевой форме, которая содержит любой подходящий противоион.

В некоторых вариантах реализации указанного способа олигонуклеотид содержит последовательность TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3).

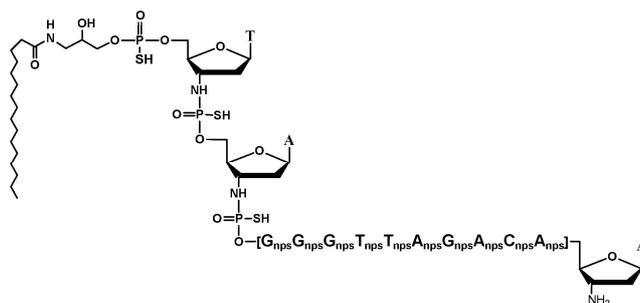
В некоторых вариантах реализации все межнуклеотидные межсубъединичные связи последовательности TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3) представляют собой N3'→P5' фосфорамидатные межсубъединичные связи. В некоторых случаях все N3'→P5' фосфорамидатные межсубъединичные связи указанной последовательности представляют собой N3'→P5' тиофосфорамидатные межсубъединичные связи (например, связи nps). В некоторых случаях все N3'→P5' фосфорамидатные межсубъединичные связи указанной последовательности представляют собой N3'→P5' оксофосфорамидатные межсубъединичные связи (например, связи пр). В некоторых вариантах реализации указанного способа полинуклеотид содержит концевую 3'-амино или 3'-гидроксигруппу. В некоторых вариантах реализации указанного способа полинуклеотид содержит концевую 3'-аминогруппу. В некоторых вариантах реализации указанного способа полинуклеотид содержит концевую 3'-гидроксильную группу.

В некоторых вариантах реализации указанного способа олигонуклеотид описан структурой



где "nps" представляет собой тиофосфорамидатную связь (например, -NH-P(=O)(SH)-O- или ее таутомер), соединяющую 3'-атом углерода одного нуклеозида с 5'-атомом углерода соседнего нуклеозида.

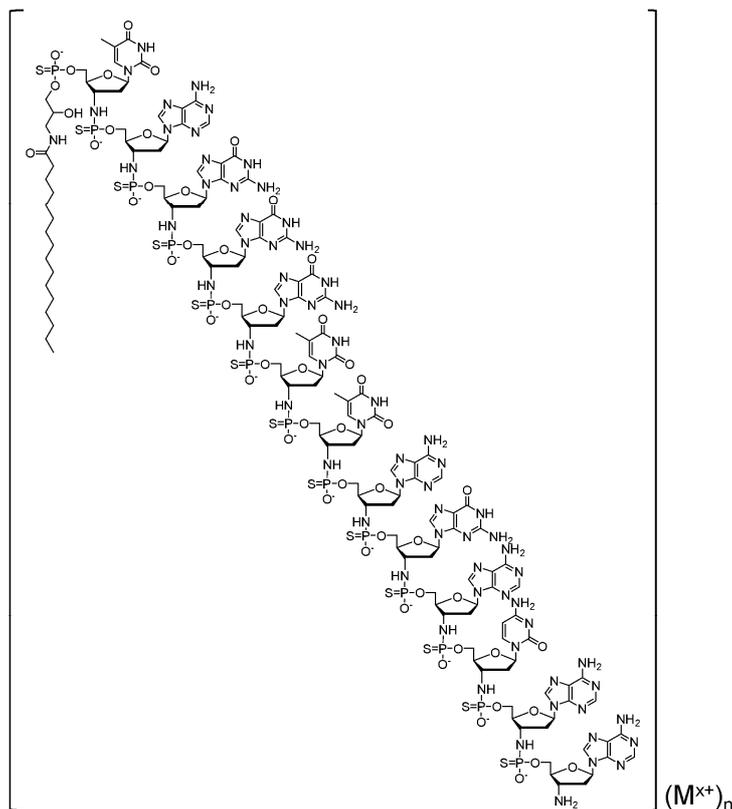
Следует понимать, что все варианты реализации, относящиеся к олигонуклеотиду, также применимы к солевым формам указанного олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации указанного способа олигонуклеотид описан структурой:



или его соль;

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. 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.

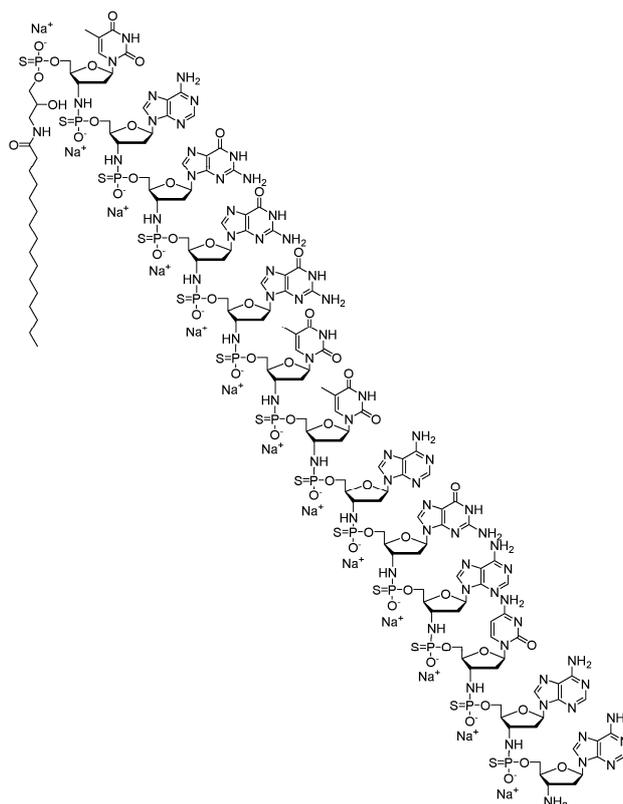
В некоторых вариантах реализации указанного способа олигонуклеотид описан следующей структурой, где каждый $\text{M}^{\text{x}+}$ независимо представляет собой водород или любой подходящей противоион соли, каждый x независимо равен 1, 2 или 3 и n представляет собой целое число от 5 до 13, например n равен 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 $\text{M}^{\text{x}+}$ представляет собой водород.

В некоторых вариантах реализации указанного способа олигонуклеотид описан следующей структурой и может содержать любые подходящие катионные противоионы соли:

В некоторых вариантах реализации указанного способа олигонуклеотид описан структурой



В некоторых вариантах реализации указанного способа С11 нуклеотидный остаток последовательности TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3) получен из мономера 3'-защищенный аминонуклеозид-5'-фосфорамидит. Под термином "получен из" понимают, что рассматриваемый остаток внедрен во время синтеза с помощью определенной субъединицы. В некоторых случаях остатки T1-A10, A12-A13 последовательности TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3) получены из димеров 3'-защищенный аминодинуклеотид-тиофосфорамидат-5'-фосфорамидит. В некоторых случаях указанный способ включает последовательное связывание следующих димеров 3'-защищенный аминодинуклеотид-тиофосфорамидат-5'-фосфорамидит и мономера 3'-защищенный аминонуклеозид-5'-фосфорамидит с концевой группой твердофазной подложки: TA, GG, GT, TA, GA, C и AA. Следует понимать, что для простоты защищенная фосфорамидитная субъединица, которая находит применение в реакциях связывания рассматриваемых способов, может быть изображена символами X^1 или X^1X^2 , где X^1 и X^2 независимо представляют собой любые подходящие нуклеозиды, связанные любой подходящей межнуклеозидной связью (например, как описано в настоящем документе). В рассматриваемых способах могут быть использованы любые подходящие стратегии синтеза. Некоторые стратегии, представляющие собой интерес, представлены ниже для демонстрации того, как способ получения целевой олигонуклеотидной последовательности может быть приспособлен к конкретным димерным и/или мономерным субъединицам. Иллюстративные ретросинтетические стратегии, представленные следующими перечнями последовательных димерных и/или мономерных субъединиц, представлены для иллюстративной целевой олигонуклеотидной последовательности TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3).

Следует понимать, что указанный перечень стратегий не является исчерпывающим, и может быть адаптирован для применения в отношении синтеза любого подходящего целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации указанный способ включает последовательное связывание одной из следующих серий димеров 3'-защищенный аминодинуклеотид-тиофосфорамидат-5'-фосфорамидит и/или мономеров 3'-защищенный аминонуклеозид-5'-фосфорамидит с концевой группой твердофазной подложки

TA, G, G, G, T, T, A, G, A, C, A, A
 T, AG, G, G, T, T, A, G, A, C, A, A
 T, A, GG, G, T, T, A, G, A, C, A, A
 T, A, G, GG, T, T, A, G, A, C, A, A
 T, A, G, G, GT, T, A, G, A, C, A, A
 T, A, G, G, G, TT, A, G, A, C, A, A
 T, A, G, G, G, T, TA, G, A, C, A, A
 T, A, G, G, G, T, T, AG, A, C, A, A

T, A, G, G, G, T, T, A, GA, C, A, A
T, A, G, G, G, T, T, A, G, AC, A, A
T, A, G, G, G, T, T, A, G, A, CA, A
T, A, G, G, G, T, T, A, G, A, C, AA
TA, GG, G, T, T, A, G, A, C, A, A
TA, G, GG, T, T, A, G, A, C, A, A
TA, G, G, GT, T, A, G, A, C, A, A
TA, G, G, G, TT, A, G, A, C, A, A
TA, G, G, G, T, TA, G, A, C, A, A
TA, G, G, G, T, T, AG, A, C, A, A
TA, G, G, G, T, T, A, GA, C, A, A
TA, G, G, G, T, T, A, G, AC, A, A
TA, G, G, G, T, T, A, G, A, CA, A
TA, G, G, G, T, T, A, G, A, C, AA
T, AG, GG, T, T, A, G, A, C, A, A
T, AG, G, GT, T, A, G, A, C, A, A
T, AG, G, G, TT, A, G, A, C, A, A
T, AG, G, G, T, TA, G, A, C, A, A
T, AG, G, G, T, T, AG, A, C, A, A
T, AG, G, G, T, T, A, GA, C, A, A
T, AG, G, G, T, T, A, G, AC, A, A
T, AG, G, G, T, T, A, G, A, CA, A
T, AG, G, G, T, T, A, G, A, C, AA
T, A, GG, GT, T, A, G, A, C, A, A
T, A, GG, G, TT, A, G, A, C, A, A
T, A, GG, G, T, TA, G, A, C, A, A
T, A, GG, G, T, T, AG, A, C, A, A
T, A, GG, G, T, T, A, GA, C, A, A
T, A, GG, G, T, T, A, G, AC, A, A
T, A, GG, G, T, T, A, G, A, CA, A
T, A, GG, G, T, T, A, G, A, C, AA
T, A, G, GG, TT, A, G, A, C, A, A
T, A, G, GG, T, TA, G, A, C, A, A
T, A, G, GG, T, T, AG, A, C, A, A

T, A, G, GG, T, T, A, GA, C, A, A
 T, A, G, GG, T, T, A, G, AC, A, A
 T, A, G, GG, T, T, A, G, A, CA, A
 T, A, G, GG, T, T, A, G, A, C, AA
 T, A, G, G, GT, TA, G, A, C, A, A
 T, A, G, G, GT, T, AG, A, C, A, A
 T, A, G, G, GT, T, A, GA, C, A, A
 T, A, G, G, GT, T, A, G, AC, A, A
 T, A, G, G, GT, T, A, G, A, CA, A
 T, A, G, G, GT, T, A, G, A, C, AA
 T, A, G, G, G, TT, AG, A, C, A, A
 T, A, G, G, G, TT, A, GA, C, A, A
 T, A, G, G, G, TT, A, G, AC, A, A
 T, A, G, G, G, TT, A, G, A, CA, A
 T, A, G, G, G, TT, A, G, A, C, AA
 T, A, G, G, G, T, TA, GA, C, A, A
 T, A, G, G, G, T, TA, G, AC, A, A
 T, A, G, G, G, T, TA, G, A, CA, A
 T, A, G, G, G, T, TA, G, A, C, AA
 T, A, G, G, G, T, T, AG, AC, A, A
 T, A, G, G, G, T, T, AG, A, CA, A
 T, A, G, G, G, T, T, AG, A, C, AA
 T, A, G, G, G, T, T, A, GA, CA, A
 T, A, G, G, G, T, T, A, GA, C, AA
 TA, GG, GT, T, A, G, A, C, A, A
 TA, GG, G, TT, A, G, A, C, A, A
 TA, GG, G, T, TA, G, A, C, A, A
 TA, GG, G, T, T, AG, A, C, A, A
 TA, GG, G, T, T, A, GA, C, A, A
 TA, GG, G, T, T, A, G, AC, A, A
 TA, GG, G, T, T, A, G, A, CA, A
 TA, GG, G, T, T, A, G, A, C, AA
 TA, G, GG, TT, A, G, A, C, A, A
 TA, G, GG, T, TA, G, A, C, A, A

TA, G, GG, T, T, AG, A, C, A, A
 TA, G, GG, T, T, A, GA, C, A, A
 TA, G, GG, T, T, A, G, AC, A, A
 TA, G, GG, T, T, A, G, A, CA, A
 TA, G, GG, T, T, A, G, A, C, AA, и т.д.
 TA, GG, GT, TA, G, A, C, A, A
 TA, GG, GT, T, AG, A, C, A, A
 TA, GG, GT, T, A, GA, C, A, A
 TA, GG, GT, T, A, G, AC, A, A
 TA, GG, GT, T, A, G, A, CA, A
 TA, GG, GT, T, A, G, A, C, AA, и т.д.
 TA, GG, GT, TA, GA, C, A, A
 TA, GG, GT, TA, G, AC, A, A
 TA, GG, GT, TA, G, A, CA, A
 TA, GG, GT, TA, G, A, C, AA, и т.д.
 TA, G, GG, TT, AG, AC, A, A
 TA, G, GG, TT, AG, A, CA, A
 TA, G, GG, TT, AG, A, C, AA
 TA, G, G, GT, TA, GA, CA, A
 TA, G, G, GT, TA, GA, C, AA
 TA, G, G, GT, TA, GA, CA, A
 TA, G, G, G, TT, AG, AC, AA
 TA, G, GG, T, TA, GA, CA, A
 TA, G, GG, T, TA, GA, C, AA
 TA, G, GG, T, TA, G, AC, AA, и т.д.
 T, A, G, GG, TT, AG, AC, AA
 T, A, GG, G, TT, AG, AC, AA
 T, AG, G, G, TT, AG, AC, AA
 TA, G, G, G, TT, AG, AC, AA
 T, AG, G, GT, T, AG, AC, AA, и т.д.
 T, AG, GG, T, T, AG, AC, AA, и т.д.
 T, AG, GG, TT, A, G, AC, AA, и т.д.
 T, AG, GG, TT, AG, A, C, AA, и т.д.
 T, AG, GG, TT, AG, AC, A, A
 T, AG, GG, TT, AG, AC, AA
 TA, G, GG, TT, AG, AC, AA
 TA, GG, G, TT, AG, AC, AA
 TA, GG, GT, T, AG, AC, AA
 TA, GG, GT, TA, G, AC, AA
 TA, GG, GT, TA, GA, C, AA или
 TA, GG, GT, TA, GA, CA, A.

В некоторых вариантах реализации указанный способ включает последовательное связывание серий димеров 3'-защищенный аминоклетид-тиофосфорамидат-5'-фосфорамидит и/или мономеров 3'-защищенный аминоклетозид-5'-фосфорамидит с концевой группой твердофазной подложки, где по меньшей мере последнее связывание синтеза представляет собой димерное связывание. В некоторых вариантах реализации второе от конца связывание и последнее связывание представляют собой димерные связывания. В некоторых случаях, если N представляет собой четное число, указанный способ включает N/2 димерных связываний. В некоторых случаях, если N представляет собой четное число, ука-

занный способ включает $N/2-1$ димерных связываний. В некоторых случаях, если N представляет собой четное число, указанный способ включает $N/2-2$ димерных связываний. В некоторых случаях, если N представляет собой четное число, указанный способ включает $N/2-3$ димерных связываний. В некоторых случаях, если N представляет собой четное число, указанный способ включает $N/2-4$ димерных связываний. В некоторых случаях, если N представляет собой четное число, указанный способ включает $N/2-5$ димерных связываний. В некоторых случаях, если N представляет собой нечетное число, указанный способ включает $N/2-1$ димерных связываний. В некоторых случаях, если N представляет собой нечетное число, указанный способ включает $N/2-2$ димерных связываний. В некоторых случаях, если N представляет собой нечетное число, указанный способ включает $N/2-3$ димерных связываний. В некоторых случаях, если N представляет собой нечетное число, указанный способ включает $N/2-4$ димерных связываний. В некоторых случаях, если N представляет собой нечетное число, указанный способ включает $N/2-5$ димерных связываний. В некоторых случаях, если N представляет собой нечетное число, указанный способ включает $N/2-6$ димерных связываний. Например, последовательное связывание следующих серий димеров 3'-защищенный аминоклеотид тиофосфорамидат-5'-фосфорамидит и/или мономеров 3'-защищенный аминоклеотид-5'-фосфорамидит с концевой группой твердофазной подложки

T, A, G, G, G, T, T, A, G, A, C, AA
 T, A, G, G, G, T, T, A, G, AC, AA
 T, A, G, G, G, T, T, A, GA, C, AA
 T, A, G, G, G, T, T, AG, A, C, AA
 T, A, G, G, G, T, TA, G, A, C, AA
 T, A, G, G, G, TT, A, G, A, C, AA
 T, A, G, G, GT, T, A, G, A, C, AA
 T, A, G, GG, T, T, A, G, A, C, AA
 T, A, GG, G, T, T, A, G, A, C, AA
 T, AG, G, G, T, T, A, G, A, C, AA
 TA, G, G, G, T, T, A, G, A, C, AA, и т.д.
 T, A, G, G, G, T, T, AG, AC, AA
 T, A, G, G, G, TT, AG, AC, AA
 T, A, G, GG, TT, AG, AC, AA
 T, AG, GG, TT, AG, AC, AA
 TA, G, GG, TT, AG, AC, AA
 TA, GG, G, TT, AG, AC, AA
 TA, GG, GT, T, AG, AC, AA
 TA, GG, GT, TA, G, AC, AA
 TA, GG, GT, TA, GA, C, AA.

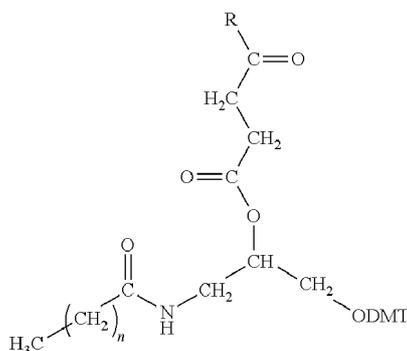
В некоторых вариантах реализации указанного способа димер 3'-защищенный аминоклеотид-тиофосфорамидат-5'-фосфорамидит описан формулой X^1X^2 , где X^1 и X^2 независимо выбраны из защищенного аденина, защищенного цитозина, защищенного гуанина, тимина и урацила.

Модифицированные липидом олигонуклеотиды Для сопряжения липидного фрагмента L с олигонуклеотидом 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 аминокруппы, 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 олигонуклеотидов имеются в продаже. Олигонуклеотиды, имеющие $N3' \rightarrow P5'$ фосфорамидатные (например, $N3' \rightarrow P5'$ тиофосфорамидатные) связи, содержат 3'-аминогруппы (а не 3'-гидрокси, встречающиеся в большинстве обычных химических структур олигонуклеотидов) и, следовательно, указанные олигонуклеотиды обеспечивают уникальную возможность сопряжения липидных групп с 3'-концом олигонуклеотида.

Могут быть использованы различные подходы для присоединения липидных групп к концам олигонуклеотидов с $N3' \rightarrow P5'$ фосфорамидатной (например, $N3' \rightarrow P5'$ тиофосфорамидатной) химической структурой (см., например, 3-пальмитоиламидо-1-О-(4,4'-диметокситритил)-2-О-сукцинил-

пропандиоловый линкер в табл. 2). Для присоединения к 3'-концу сопряженные соединения могут быть синтезированы посредством взаимодействия свободной 3'-аминогруппы полностью защищенного олигонуклеотида, связанного с твердой подложкой, с соответствующим ангидридом кислоты с последующим снятием защиты с помощью аммиака и очистки. 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 карбодимиды, HBTU или йодид 2-хлор-1-метилпиридиния. Указанные два способа приводят к получению амидной связи между липидом и олигонуклеотидом. Липиды также могут быть присоединены к олигонуклеотидной цепи с применением фосфорамидитного производного липида, связанного с олигонуклеотидами во время удлинения цепи. Указанный подход приводит к получению фосфорамидатной (например, тиофосфорамидатной) связи, соединяющей липид и олигонуклеотид (например, пропилпальмитоилловые и 2-гидроксипропилпальмитоилловые соединения). Другой подход включает взаимодействие свободной 3'-аминогруппы полностью защищенного олигонуклеотида, связанного с твердой подложкой, с подходящим альдегидом липида, с последующим восстановлением цианоборогидридом натрия с получением аминной связи.

Для присоединения к 5'-концу олигонуклеотид может быть синтезирован с применением модифицированной, липидсодержащей твердой подложки, с последующим синтезом олигонуклеотида 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 диметокситриэтированием и сукцинированием приводит к получению промежуточного соединения, используемого для связывания с твердой подложкой. R может представлять собой длинноцепочечный алкиламин на стекле с контролируемым размером пор.



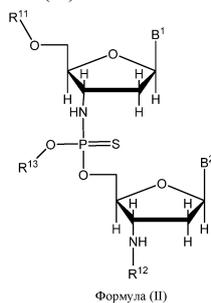
Димеры, подходящие для получения олигонуклеотидов

В некоторых вариантах реализации способа получения олигонуклеотида указанный способ включает приведение в контакт связанной с подложкой свободной 3'-концевой группы (например, 3'-гидроксильной или 3'-аминогруппы) с динуклеотидной димерной субъединицей с получением межсубъединичной связи. В целом, динуклеотидный димер является 3'-защищенным и содержит 5'-группу, способную к связыванию с 3'-концевой группой. В некоторых вариантах реализации динуклеотидный димер содержит 5'-фосфорамидит. Динуклеотидный димер может содержать 3'-защищенную аминную группу или 3'-защищенную гидроксильную группу. В некоторых вариантах реализации динуклеотид описан формулой X^1X^2 , где X^1 и X^2 независимо представляют собой любые подходящие нуклеозиды (например, A, C, G, T или U, или их защищенные версии), связанные любой подходящей межнуклеозидной связью (например, как описано в настоящем документе). Динуклеотид может содержать любую подходящую межнуклеозидную связь между двумя нуклеозидами. Рассматриваемые межнуклеозидные связи, которые находят применение в динуклеотидных димерах, включают, но не ограничиваются ими, фосфодиэфирную, фосфотриэфирную, метилфосфонатную, фосфорамидатную (например, тиофосфорамидатную) и тиофосфатную связь.

В некоторых случаях динуклеотидный димер представляет собой димер 3'-защищенный динуклеотид-5'-фосфорамидит или его синтетический предшественник, где динуклеотид описан формулой X^1X^2 , где X^1 и X^2 независимо выбраны из A, C, G, T и U или их защищенной версии и где X^1 и X^2 связаны фосфодиэфирной, фосфотриэфирной, метилфосфонатной, фосфорамидатной (например, тиофосфорамидатной) или тиофосфатной связью, или их их защищенными версиями.

В некоторых вариантах реализации способа получения олигонуклеотида указанный способ включает приведение в контакт связанной с подложкой свободной 3'-аминогруппы с димером 3'-защищенный аминодинуклеотид-фосфорамидат-5'-фосфорамидит с образованием межнуклеозидной N3'→P5' фосфорамидатной связи. В рассматриваемых способах может быть использован любой подходящий димер 3'-защищенный аминодинуклеотид-фосфорамидат-5'-фосфорамидит или его синтетические предшественники. В некоторых случаях димер может быть представлен одной из следующих последовательностей: AA, AC, AG, AT, AU, CA, CC, CG, CT или CU, GA, GC, GG, GT или GU, TA или UA, TC или UC, TG или

UG и ТТ или UU. В некоторых случаях димер содержит защищенные 2'-гидроксильные группы. В некоторых вариантах реализации динуклеотидный димер представляет собой динуклеотидное тиофосфорамидатное соединение, описываемое формулой (II)



Формула (II)

где B^1 и B^2 , каждый независимо, представляют собой пурин, защищенный пурин, пиримидин или защищенный пиримидин, или их аналог; R^{11} представляет собой водород, защитную группу или фосфорамидитную группу; R^{12} представляет собой водород или защитную группу; и R^{13} представляет собой водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил или защитную группу. В некоторых случаях B^1 и/или B^2 содержит защитную группу азотистого основания. Следует понимать, что если R^{13} представляет собой водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил или защитную группу, то некоторые динуклеотидные димеры, описанные формулой (II), могут также существовать в солевой форме. Такие формы, при условии возможности их существования, включены в объем настоящего описания.

В некоторых вариантах реализации формулы (II) R^{11} представляет собой водород. В некоторых вариантах реализации формулы (II) R^{11} представляет собой защитную группу. В рассматриваемых димерах формулы (II) могут быть использованы любые подходящие защитные группы. В некоторых вариантах реализации формулы (II) R^{11} представляет собой защитную группу на основе левулината. В некоторых вариантах реализации формулы (II) R^{11} представляет собой левулинатную защитную группу (т.е. $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COCH}_3$). В некоторых вариантах реализации формулы (II) R^{11} представляет собой 5'-фосфорамидитную группу.

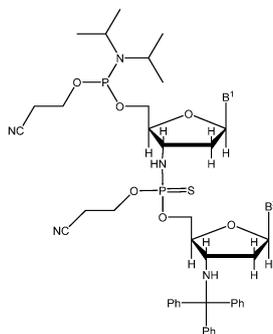
В некоторых вариантах реализации формулы (II) R^{12} представляет собой водород. В некоторых вариантах реализации формулы (II) R^{12} представляет собой защитную группу. В некоторых вариантах реализации R^{12} представляет собой тритильную группу (например, трифенилметил (Trt), монометокситритил (ММТ) или диметокситритил (DMT)). В некоторых вариантах реализации формулы (II) R^{12} представляет собой защитную группу Trt.

В некоторых вариантах реализации формулы (II) R^{12} представляет собой фоторасщепляемую защитную группу. При получении рассматриваемых динуклеотидных димеров и их синтетических предшественников могут быть использованы любые подходящие фоторасщепляемые защитные группы. В некоторых вариантах реализации формулы (II) R^{12} представляет собой замещенную пиксильную защитную группу, такую как нитро-, фтор-, метил-, трифторметил- и/или метоксизамещенная пиксильная защитная группа. В некоторых вариантах реализации формулы (II) R^{12} представляет собой пиксильную защитную группу (т.е. 9-(9-фенил)ксантенил).

В некоторых вариантах реализации формулы (II) R^{11} представляет собой левуниловую защитную группу и R^{12} представляет собой тритильную защитную группу.

В некоторых вариантах реализации формулы (II) R^{13} представляет собой водород. В некоторых вариантах реализации формулы (II) R^{13} представляет собой защитную группу. В некоторых вариантах реализации R^{13} представляет собой 2-цианоэтильную группу.

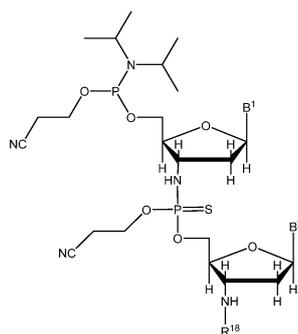
В некоторых вариантах реализации димер 3'-защищенный аминодинуклеотид-фосфорамидат-5'-фосфорамидит описан формулой (III)



Формула (III)

где B^1 и B^2 , каждый независимо, представляют собой пурин, защищенный пурин, пиримидин или защищенный пиримидин, или их аналог. В некоторых случаях B^1 и/или B^2 содержит защитную группу азотистого основания.

В некоторых вариантах реализации димер 3'-защищенный аминокдинуклеотид-фосфорамидат-5'-фосфорамидит описан формулой (III)



Формула (IV)

где B^1 и B^2 , каждый независимо, представляют собой пурин, защищенный пурин, пиримидин или защищенный пиримидин, или их аналог; и

R^{18} представляет собой тритильную защитную группу (такую как Trt, DMT или MMT) или пиксильную защитную группу.

В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 и B^2 , каждый независимо, выбраны из защищенного аденина, защищенного цитозина, защищенного гуанина, тимина и урацила. В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 и B^2 , каждый независимо, выбраны из A(Bz), A(DMF), C(Bz), G(изобутирил), T и U. В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой A(Bz). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой A(DMF). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой C(Bz). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой G(изобутирил). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой T или U. В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^2 представляет собой A(Bz) или A(DMF). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^2 представляет собой C(Bz). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^2 представляет собой G(изобутирил). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^2 представляет собой T или U.

В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой A(Bz) или A(DMF), и B^2 представляет собой A(Bz) или A(DMF). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой A(Bz) или A(DMF) и B^2 представляет собой C(Bz). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой A(Bz) или A(DMF) и B^2 представляет собой G(изобутирил). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой A(Bz) или A(DMF) и B^2 представляет собой T или U.

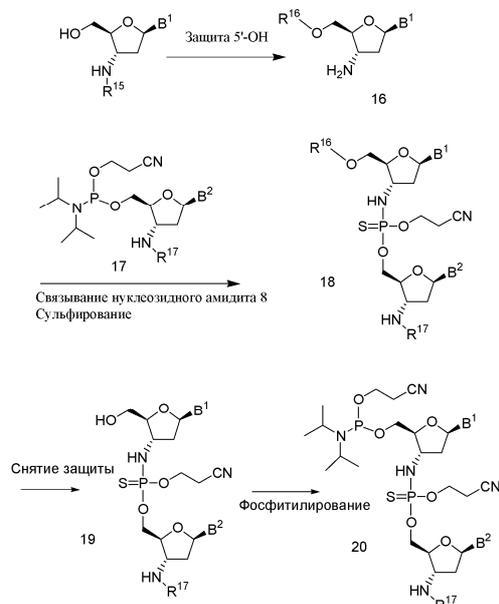
В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой C(Bz), и B^2 представляет собой A(Bz) или A(DMF). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой C(Bz), и B^2 представляет собой C(Bz). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой C(Bz) и B^2 представляет собой G(изобутирил). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой C(Bz) и B^2 представляет собой T или U. В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой G(изобутирил) и B^2 представляет собой A(Bz) или A(DMF). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой G(изобутирил) и B^2 представляет собой C(Bz). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой G(изобутирил) и B^2 представляет собой G(изобутирил). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой G(изобутирил) и B^2 представляет собой T или U.

В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой T или U, и B^2 представляет собой A(Bz) или A(DMF). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой T или U, и B^2 представляет собой C(Bz). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой T или U, и B^2 представляет собой G(изобутирил). В некоторых вариантах реализации формул (II) или (III) B^1 представляет собой T или U и B^2 представляет собой T или U. Следует понимать, что любой из вариантов реализации формул (II) или (III), описанный в настоящем документе, также может быть применен в отношении формулы (IV).

Любые димеры, описанные в настоящем документе, могут быть адаптированы для применения в рассматриваемых способах. Рассматриваемые димеры могут быть получены в соответствии с любыми подходящими способами из любых подходящих нуклеозидных мономеров. Нуклеозидные мономеры, представляющие собой интерес, которые находят применение при получении рассматриваемых нуклеозидных димеров, включают, но не ограничиваются ими, мономеры 16, 17, 12 и 13, которые изображены на схемах синтеза, описанных в настоящем документе. Рассматриваемые динуклеотидные димеры включают нефосфитированные димеры, которые находят применение при получении рассматриваемых фосфитированных динуклеотидных димеров, такие как димеры 18 и 19, которые находят применение при получении фосфитированных динуклеотидных димеров, таких как 20, или димер 14, который на-

ходит применение при получении фосфитилированных динуклеотидных димеров, таких как 15.

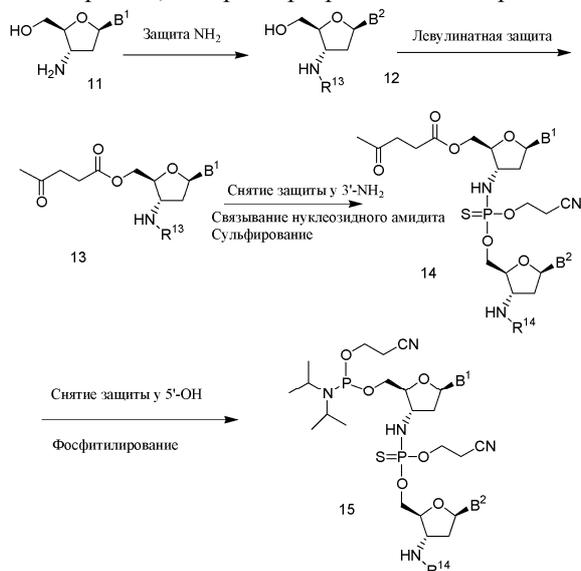
В некоторых вариантах реализации димеры формул (III) и (IV) получают способом, представленным на следующей схеме:



где B^1 и B^2 , каждый независимо, представляют собой пурин, защищенный пурин, пиримидин или защищенный пиримидин, или их аналог; R^{15} представляет собой водород или защитную группу амина; R^{17} представляет собой защитную группу амина; и R^{16} представляет собой защитную группу гидроксила. В некоторых вариантах реализации R^{15} представляет собой водород. В некоторых вариантах реализации мономера 16 R^{16} представляет собой силил. В некоторых вариантах реализации мономера 16 R^{16} представляет собой TBDMS (трет-бутилдиметилсилил). В некоторых вариантах реализации мономера 17 R^{17} представляет собой тритил (Ttt). В некоторых вариантах реализации мономера 17 R^{17} представляет собой монометокситритил (ММТ).

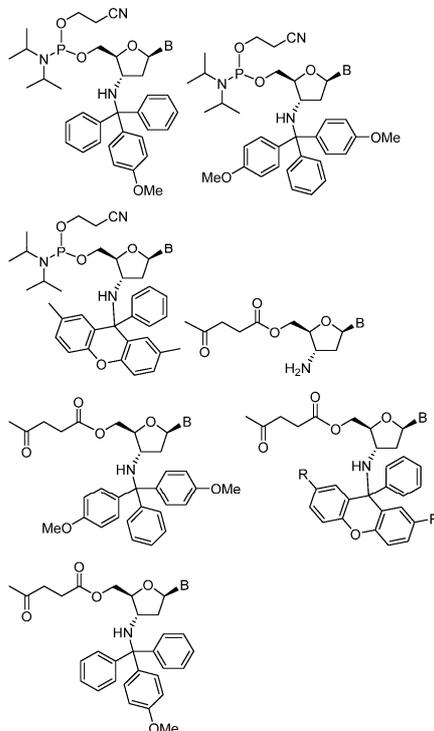
В некоторых вариантах реализации мономера 17 R^{17} представляет собой диметокситритил (DMT). В некоторых вариантах реализации мономера 17 R^{17} представляет собой пиксил. В некоторых вариантах реализации димеров 18-20 R^{17} представляет собой тритил (Ttt). В некоторых вариантах реализации димеров 18-20 R^{17} представляет собой монометокситритил (ММТ). В некоторых вариантах реализации димеров 18-20 R^{17} представляет собой диметокситритил (DMT). В некоторых вариантах реализации димеров 18-20 R^{17} представляет собой пиксил.

В некоторых вариантах реализации димеры формул (III) и (IV) получают по способу, представленному на следующей схеме, где мономер 13 получают из 11 через мономер 12 и связывают с нуклеозидным амидитом с получением димеров 14, которые превращают в димер 15:



где B^1 и B^2 , каждый независимо, представляют собой пурин, защищенный пурин, пиримидин или защищенный пиримидин, или их аналог; и R^{13} и R^{14} , каждый независимо, представляют собой защитную группу. В некоторых вариантах реализации мономеров 12 и 13 R^{13} представляет собой тритил. В некото-

рых вариантах реализации мономеров 12 и 13 R¹³ представляет собой пиксил. В некоторых вариантах реализации димеров 14 и 15 R¹⁴ представляет собой тритил. В некоторых вариантах реализации димеров 14 и 15 R¹⁴ представляет собой соой диметокситритил. В некоторых вариантах реализации димеров 14 и 15 R¹⁴ представляет собой монометокситритил. В некоторых вариантах реализации димеров 14 и 15 R¹⁴ представляет собой пиксил. Мономеры, представляющие собой интерес, которые находят применение при получении рассматриваемых динуклеотидных димеров согласно способам, описанным в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими



где В представляет собой пурин, защищенный пурин, пиримидин или защищенный пиримидин, или их аналог, и R представляет собой водород или алкил (например, метил) или галоген (например, бром). В некоторых случаях В выбран из A(Bz), G(iBu), T, A(DMF), C(Bz) или U.

Композиции олигонуклеотидов

Помимо целевого олигонуклеотида во время синтеза олигонуклеотида могут быть получены различные нецелевые продукты синтеза олигонуклеотида. Побочные продукты, которые могут присутствовать в препаратах олигонуклеотида, включают, но не ограничиваются ими, продукты делеции (например, продукты, не имеющие одного или более нуклеозидных остатков), продукты, которые содержат одну или более защитных групп, терминированные продукты (например, продукты, которые содержат кэпированную олигонуклеотидную цепь), продукты, которые не имеют одного или более азотистых оснований, продукты, которые содержат частично окисленные фосфорамидитные связи, и продукты, которые содержат частично сульфированные связи. В данном контексте целевой олигонуклеотид относится к интересующей олигонуклеотидной последовательности, которая представляет собой целевой продукт описанного способа получения. В данном контексте термины "нецелевой продукт" и "побочный продукт" использованы взаимозаменяемо и относятся к любому продукту, содержащему олигонуклеотид, который не является целевым продуктом и который может образовываться во время или после циклов синтеза целевого олигонуклеотида.

Рассматриваемые способы обеспечивают получение композиций с улучшенной чистотой целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 50% или более по массе целевого олигонуклеотида, например, около 55% или более, около 60% или более, около 65% или более, около 70% или более, около 75% или более, около 80% или более, около 85% или более, около 90% или более или даже около 95% или более по массе целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 50% или более по массе целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 55% или более по массе целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 60% или более по массе целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 65% или более по массе целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 70% или более по массе целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 75% или более по массе целевого олигонуклеотида.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит 80% или более по массе целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 85% или более по массе целевого олигонуклеотида.

олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 90% или более по массе целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит 95% или более по массе целевого олигонуклеотида.

В некоторых вариантах реализации рассматриваемые способы обеспечивают эффективность связывания 95% или более, например, 96% или более, 97% или более, 98% или более или даже 98% или более.

В некоторых вариантах реализации рассматриваемые способы обеспечивают среднюю эффективность связывания, которая на 0,5% или более, например на 0,75% или более, на 1,0% или более, на 1,25% или более, на 1,5% или более, на 1,75% или более, на 2,0% или более, на 2,5% или более или даже на 3% или более выше средней эффективности связывания в контрольном синтезе, проведенном с применением только мономерных субъединиц. В некоторых вариантах реализации рассматриваемые способы обеспечивают эффективность связывания 96% или более. В некоторых вариантах реализации рассматриваемые способы обеспечивают эффективность связывания, которая на 2% или более выше, чем эффективность связывания в контрольном синтезе, проведенном с применением только мономерных субъединиц.

После синтеза рассматриваемые композиции могут быть подвержены одной или более стадиям очистки (например, ВЭЖХ хроматография, аффинная хроматография, ионообменная хроматография, гель-фильтрация и т.д.), например, для удаления одного или более побочных продуктов из целевого олигонуклеотида. Следует понимать, что в рассматриваемых композициях сниженные количества побочных продуктов и/или увеличенное количество целевого нуклеотида, обеспечиваемые рассматриваемыми способами получения, могут относиться к таким количествам и к такой чистоте, которые получены непосредственно после синтеза и до проведения любой дополнительной стадии очистки или разделения (например, ВЭЖХ хроматографии). Таким образом, в некоторых случаях рассматриваемые композиции могут быть упомянуты как препараты синтеза, например, неочищенные препараты синтеза. Под "неочищенной" понимают, что в отношении композиции не было выполнено никаких стадий хроматографической очистки. Хроматографическая очистка относится к любому подходящему способу очистки, который включает абсорбцию целевого полинуклеотида на хроматографической подложке с последующим элюированием целевого полинуклеотида. В некоторых случаях хроматографическая очистка относится к обращенно-фазовой хроматографической очистке.

Рассматриваемые способы обеспечивают получение композиций, содержащих сниженное количество одного или более побочных продуктов. Под сниженным количеством понимают, что количество по массе побочного продукта в композиции относительно целевого олигонуклеотида снижено по сравнению с контрольным синтезом, например, синтезом, в котором олигонуклеотид получают с применением только мономерного связывания. В некоторых вариантах реализации сниженное количество побочного продукта составляет около 20% или менее относительно количества по массе целевого олигонуклеотида, например, около 15% или менее, около 10% или менее, или около 5% или менее относительно количества по массе целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации сниженное количество побочного продукта составляет 20% или менее относительно количества по массе целевого олигонуклеотида, например, 15% или менее, 10% или менее, 9% или менее, 8% или менее, 7% или менее, 6% или менее, 5% или менее, 4 или менее, 3% или менее, 2% или менее или даже 1% или менее относительно количества по массе целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации побочный продукт представляет собой (N-x) продукт.

Рассматриваемые способы получения могут обеспечивать получение композиций, имеющих сниженное количество одного или более (N-x) продуктов относительно целевого интересующего олигонуклеотида, где x представляет собой целое число от 1 до N-1, и N представляет собой количество нуклеотидных остатков в целевом олигонуклеотиде. Следовательно, (N-1) продукт может относиться к любому и всем олигонуклеотидным продуктам, в которых не хватает одного нуклеотидного остатка по сравнению с целевым олигонуклеотидом (например, N продуктом). Следовательно, (N-2) продукт относится к любому и всем олигонуклеотидным продуктам, в которых не хватает двух нуклеотидных остатков по сравнению с целевым олигонуклеотидом (например, N-продуктом). В некоторых вариантах реализации побочный продукт представляет собой (N-1) продукт. В некоторых вариантах реализации побочный продукт представляет собой (N-2) продукт. В некоторых вариантах реализации побочный продукт представляет собой (N-3) продукт. В некоторых вариантах реализации побочный продукт представляет собой (N-4) продукт. В некоторых вариантах реализации побочный продукт представляет собой (N-5) продукт. В некоторых вариантах реализации побочный продукт представляет собой (N-6) продукт. В некоторых вариантах реализации побочный продукт представляет собой (N-7) продукт.

В некоторых вариантах реализации любые композиции, описанные в настоящем документе, содержащие сниженное количество одного или более (N-x) продуктов по сравнению с целевым рассматриваемым олигонуклеотидом, являются неочищенными.

В некоторых вариантах реализации рассматриваемые композиции содержат низкое соотношение (N-1) продукта к целевому олигонуклеотидному продукту. В некоторых случаях низкое соотношение составляет менее $(2,0 \times N)$ частей на 100 частей по массе (N-1) продукта относительно целевого олигонуклеотида, где N относится к количеству нуклеотидных остатков в целевой олигонуклеотидной последова-

тельности. В некоторых вариантах реализации указанное соотношение составляет менее $(1,9 \times N)$ частей на 100 частей по массе $(N-1)$ продукта относительно целевого олигонуклеотида, например, менее $(1,8 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(1,7 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(1,6 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(1,5 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(1,4 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(1,3 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(1,2 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(1,1 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(1,0 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(0,9 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(0,8 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(0,7 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(0,6 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(0,5 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(0,4 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(0,3 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(0,2 \times N)$ частей на 100 частей или даже менее $(0,1 \times N)$ частей на 100 частей по массе $(N-1)$ продукта относительно целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации рассматриваемые композиции имеют низкое соотношение, составляющее менее $(1,5 \times N)$ частей на 100 частей по массе $(N-1)$ продукта относительно целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации рассматриваемые композиции имеют низкое соотношение, составляющее менее $(1,2 \times N)$ частей на 100 частей по массе $(N-1)$ продукта относительно целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации рассматриваемые композиции имеют низкое соотношение, составляющее менее $(1,0 \times N)$ частей на 100 частей по массе $(N-1)$ продукта относительно целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации рассматриваемые композиции имеют низкое соотношение, составляющее менее $(0,5 \times N)$ частей на 100 частей по массе $(N-1)$ продукта относительно целевого олигонуклеотида.

В некоторых вариантах реализации рассматриваемые композиции содержат низкое соотношение $(N-2)$ продукта к целевому олигонуклеотидному продукту. В некоторых случаях низкое соотношение составляет менее $(2,0 \times N)$ частей на 100 частей по массе $(N-2)$ продукта относительно целевого олигонуклеотида, где N относится к количеству нуклеотидных остатков в целевой олигонуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации указанное соотношение составляет менее $(1,9 \times N)$ частей на 100 частей по массе $(N-2)$ продукта относительно целевого олигонуклеотида, например, менее $(1,8 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(1,7 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(1,6 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(1,5 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(1,4 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(1,3 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(1,2 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(1,1 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(1,0 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(0,9 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(0,8 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(0,7 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(0,6 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(0,5 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(0,4 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(0,3 \times N)$ частей на 100 частей, менее $(0,2 \times N)$ частей на 100 частей или даже менее $(0,1 \times N)$ частей на 100 частей по массе $(N-2)$ продукта относительно целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации рассматриваемые композиции имеют низкое соотношение, составляющее менее $(1,5 \times N)$ частей на 100 частей по массе $(N-2)$ продукта относительно целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации рассматриваемые композиции имеют низкое соотношение, составляющее менее $(1,2 \times N)$ частей на 100 частей по массе $(N-2)$ продукта относительно целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации рассматриваемые композиции имеют низкое соотношение, составляющее менее $(1,0 \times N)$ частей на 100 частей по массе $(N-1)$ продукта относительно целевого олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации рассматриваемые композиции имеют низкое соотношение, составляющее менее $(0,5 \times N)$ частей на 100 частей по массе $(N-2)$ продукта относительно целевого олигонуклеотида.

В некоторых вариантах реализации композиции содержат $(N-1)$ продукт в количестве 20% или менее относительно общего содержания нецелевых олигонуклеотидов в композиции, например, 15% или менее, 10% или менее, или даже 5% или менее относительно общего содержания нецелевых олигонуклеотидов.

С помощью способов, описанных в настоящем документе, может быть получена любая из многочисленных композиций олигонуклеотидов. Многие классы и типы олигонуклеотидов представляют собой интерес для получения с применением рассматриваемых способов (например, описанных в настоящем документе). Олигонуклеотиды, подходящие для получения согласно рассматриваемым способам, включают, но не ограничиваются ими, бессмысловые олигонуклеотиды, РНК олигонуклеотиды, миРНК олигонуклеотиды, РНКи олигонуклеотиды, ДНК аптамеры, микроРНК и т.п.

Олигонуклеотиды, комплементарные РНК компоненту теломеразы. Аспекты настоящего описания включают соединения и композиции, содержащие олигонуклеотиды, 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.

Как кратко описано выше, рассматриваемые способы обеспечивают возможность снижения количества нецелевых олигонуклеотидных продуктов синтеза. В некоторых случаях рассматриваемые способы обеспечивают получение увеличенных количеств целевого олигонуклеотидного продукта синтеза. В некоторых вариантах реализации рассматриваемые способы обеспечивают получение композиций, которые содержат сниженное количество одного или более $(N-x)$ продуктов по сравнению с целевым рас-

смаатриваемым олигонуклеотидом. В таблице 1 представлены интересные количества некоторых целевых олигонуклеотидных продуктов. В некоторых вариантах реализации любые композиции, описанные в настоящем документе, содержащие сниженное количество одного или более (N-x) продуктов по сравнению с целевым рассматриваемым олигонуклеотидом, являются неочищенными.

Таблица 1. Содержание олигонуклеотидных продуктов в рассматриваемых композициях. Рассматриваемые композиции могут содержать один или более следующих компонентов в количествах, указанных в табл. 1.

Продукт	% в композиции (по массе)	Пороговые количества относительно целевого продукта (по массе)	Диапазон относительно целевого продукта (по массе) Олигонуклеотиды	Диапазон относительно целевого продукта (по массе) иметельстат
целевой продукт	50 % или более, 55 % или более, 60 % или более, 65 % или более, 70 % или более, 75 % или более, 80 % или более, 85 % или более, 90 % или более, 95 % или более	н.д.	н.д.	н.д.
(N-1) продукты (включая их производные, такие как фенилацетильные и iВи производные) (например, (N-1) продукт хвостового пика 1)	менее 11 % менее 10 % менее 9 % менее 8 % менее 7 % менее 6 % менее 5 % менее 4 % менее 3 % менее 2 % менее 1 % менее 0,5 %	менее (1,9 x N) частей на 100, менее (1,8 x N) частей на 100, менее (1,7 x N) частей на 100, менее (1,6 x N) частей на 100, менее (1,5 x N) частей на 100, менее (1,4 x N) частей на 100, менее (1,3 x N) частей на 100, менее (1,2 x N) частей на 100, менее (1,1 x N) частей на 100, менее (0,9 x N) частей на 100, менее (0,8 x N) частей на 100, менее (0,7 x N) частей на 100, менее (0,6 x N) частей на 100, менее (0,5 x N) частей на 100, менее (0,4 x N) частей на 100, менее (0,3 x N) частей на 100, менее (0,2 x N) частей на 100, менее (0,1 x N) частей на 100	от около (0,1 x N) до около (0,5 x N) частей на 100, от около (0,1 x N) до около (0,4 x N) частей на 100, от около (0,2 x N) до около (0,3 x N) частей на 100, около (0,1 x N) частей на 100, около (0,2 x N) частей на 100, около (0,3 x N) частей на 100, около (0,4 x N) частей на 100, около (0,5 x N) частей на 100,	от около 1 до около 20 частей на 100, от около 1 до около 10 частей на 100, от около 1 до около 8 частей на 100, от около 1 до около 6 частей на 100, от около 1 до около 5 частей на 100, от около 2 до около 4 частей на 100, около 1 частей на 100, около 2 частей на 100, около 3 частей на 100, около 4 частей на 100, около 5 частей на 100 менее 1 части на 4, менее 1 части на 5, менее 1 части на 6, менее 1 части на 7, менее 1 части на 8, менее 1 части на 9, менее 1 части на 10, менее 1 части на 20, менее 1 части на 25, менее 1 части на 100
(N-2) и (N-3) продукты по отдельности или в совокупности (включая их производные, такие как	4 % или более 6 % или более 8 % или более 10 % или более 12 % или более 14 % или более 16 % или более	по меньшей мере (1,0 x N) частей на 100, по меньшей мере (1,5 x N) частей на 100, по меньшей мере (2,0 x N) частей на 100,	от около (1,0 x N) до около (5,0 x N) частей на 100, от около (2,0 x N) до около (5,0 x N) частей на 100, от около (2,5 x N) до	от около 5 до около 50 частей на 100, от около 10 до около 50 частей на 100, от около 20 до около 50 частей

фенилацетильные и iВи производные) (например, хвостовые пики 2+3+4 или хвостовые пики 3+4, или хвостовые пики 2, 3 или 4)	18 % или более 20 % или более 25 % или более менее 25 % менее 20 % менее 18 % менее 16 % менее 14 % менее 12 % менее 10 %	по меньшей мере (2,5 x N) частей на 100, по меньшей мере (3,0 x N) частей на 100, по меньшей мере (3,3 x N) частей на 100 менее (3,3 x N) частей на 100, менее (3,0 x N) частей на 100, менее (2,5 x N) частей на 100, менее (2,0 x N) частей на 100, менее (1,5 x N) частей на 100, менее (1,0 x N) частей на 100	около (4,0 x N) частей на 100, от около (3,0 x N) до около (4,0 x N) частей на 100, от около (3,0 x N) до около (3,5 x N) частей на 100 около (1,0 x N) частей на 100, около (1,5 x N) частей на 100, около (2,0 x N) частей на 100, около (2,5 x N) частей на 100, около (3,0 x N) частей на 100, около (3,3 x N) частей на 100, около (3,5 x N) частей на 100	на 100, от около 30 до около 50 частей на 100, от около 5 до около 40 частей на 100, от около 5 до около 30 частей на 100, от около 5 до около 20 частей на 100, от около 10 до около 20 частей на 100, около 10 частей на 100, около 15 частей на 100, около 20 частей на 100, около 25 частей на 100, около 30 частей на 100, около 35 частей на 100, около 40 частей на 100, около 45 частей на 100, около 50 частей на 100 по меньшей мере 5 частей на 100, по меньшей мере 10 частей на 100, по меньшей мере 12 частей на 100, по меньшей мере 14 частей на 100, по меньшей мере 15 частей на 100, по меньшей мере 20 частей на 100, по меньшей мере 30 частей на 100, по меньшей мере 40 частей на 100
Общее содержание нецелевых олигонуклеотидов	45 % или менее, 40 % или менее, 35 % или менее, 30 % или менее, 25 % или менее, 20 % или менее	менее (8,5 x N) частей на 100, менее (8,0 x N) частей на 100, менее (7,5 x N) частей на 100, менее (7,0 x N) частей на 100, менее (6,5 x N) частей на 100,	от около (0,4 x N) до около (5,0 x N) частей на 100, от около (0,8 x N) до около (4,0 x N) частей на 100, от около (1,6 x N) до около (4,0 x N) частей на 100, от	от около 5 до около 50 частей на 100, от около 10 до около 50 частей на 100, от около 20 до около 50 частей на 100, от около 20 до около 40
		частей на 100, менее (6,0 x N) частей на 100, менее (5,5 x N) частей на 100, менее (5,0 x N) частей на 100, менее (4,5 x N) частей на 100, менее (4,0 x N) частей на 100, менее (3,5 x N) частей на 100, менее (3,0 x N) частей на 100, менее (2,5 x N) частей на 100, менее (2,0 x N) частей на 100, менее (1,5 x N) частей на 100, менее (1,0 x N) частей на 100	около (1,6 x N) до около (2,5 x N) частей на 100 около (1,9 x N) частей на 100 по меньшей мере (1,0 x N) частей на 100, по меньшей мере (1,5 x N) частей на 100, по меньшей мере (2,0 x N) частей на 100	частей на 100, от около 20 до около 30 частей на 100, около 25 частей на 100 по меньшей мере 10 частей на 100, по меньшей мере 15 частей на 100, по меньшей мере 20 частей на 100, по меньшей мере 25 частей на 100, менее 40 частей на 100, менее 30 частей на 100, менее 25 частей на 100, менее 20 частей на 100, менее 15 частей на 100

В некоторых вариантах реализации композиция содержит менее (2,0×N) частей на 100 частей по массе (N-1) продукта относительно соединения, где соединение содержит полинуклеотид, имеющий последовательность из N нуклеозидных субъединиц, комплементарную РНК компоненту человеческой теломеразы, при этом по меньшей мере две нуклеозидные субъединицы связаны N3'→P5' тиофосфорамидной межсубъединичной связью. В некоторых вариантах реализации указанное соотношение составляет менее (1,9×N) частей на 100 частей по массе (N-1) продукта относительно N продукта, например менее

($1,8 \times N$) частей на 100, менее ($1,7 \times N$) частей на 100, менее ($1,6 \times N$) частей на 100, менее ($1,5 \times N$) частей на 100, менее ($1,4 \times N$) частей на 100, менее ($1,3 \times N$) частей на 100, менее ($1,2 \times N$) частей на 100, менее ($1,1 \times N$) частей на 100, менее ($1,0 \times N$) частей на 100, менее ($0,9 \times N$) частей на 100, менее ($0,8 \times N$) частей на 100, менее ($0,7 \times N$) частей на 100, менее ($0,6 \times N$) частей на 100, менее ($0,5 \times N$) частей на 100, менее ($0,4 \times N$) частей на 100, менее ($0,3 \times N$) частей на 100, менее ($0,2 \times N$) частей на 100 или даже менее ($0,1 \times N$) частей на 100 частей по массе ($N-1$) продукта относительно N продукта.

В некоторых вариантах реализации содержит менее 1 части на 4 части по массе ($N-1$) продукта относительно соединения (например, менее 1 части на 5, менее 1 части на 6, менее 1 части на 7, менее 1 части на 8, менее 1 части на 9, менее 1 части на 10, менее 1 части на 15, менее 1 части на 20, менее 1 части на 25, менее 1 части на 50, менее 1 части на 100 частей по массе ($N-1$) продукта относительно соединения), где указанное соединение содержит полинуклеотид, имеющий последовательность из 10 или более нуклеозидных субъединиц, комплементарную РНК компоненту человеческой теломеразы, при этом по меньшей мере две нуклеозидные субъединицы связаны $N3' \rightarrow P5'$ тиофосфорамидатной или оксофосфорамидатной межсубъединичной связью. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид имеет последовательность из 10 или более нуклеозидных субъединиц, комплементарную РНК компоненту человеческой теломеразы, например 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более нуклеозидных субъединиц.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотид содержит последовательность из 13 или более нуклеозидных субъединиц, комплементарную РНК компоненту человеческой теломеразы, например, 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 последовательность из 7 или более нуклеозидных субъединиц, комплементарную РНК компоненту человеческой теломеразы, например 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 нуклеозидных субъединиц, комплементарных РНК компоненту человеческой теломеразы. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид содержит последовательность нуклеозидных субъединиц, комплементарную РНК компоненту человеческой теломеразы, содержащую от 11 до 18, например, от 11 до 16 последовательных 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 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 олигонуклеотид содержит последовательность из 10 или более последовательных нуклеозидных субъединиц, комплементарную РНК компоненту человеческой теломеразы. В некоторых вариантах реализации композиция содержит менее 1 части на 10 частей по массе ($N-1$) продукта относительно указанного соединения. В некоторых вариантах реализации композиция содержит менее 1 части на 20 частей по массе ($N-1$) продукта относительно указанного соединения. В некоторых вариантах реализации композиция содержит менее 1 части на 25 частей по массе ($N-1$) продукта относительно указанного соединения. В некоторых вариантах реализации композиция содержит менее 1 части на 30 частей по массе ($N-1$) продукта относительно указанного соединения. В некоторых вариантах реализации композиция содержит менее 1 части на 50 частей по массе ($N-1$) продукта относительно указанного соединения.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит менее 1 части на 4 части по массе любого ($N-x$) продукта относительно соединения, например, менее 1 части на 5, менее 1 части на 6, менее 1 части на 7, менее 1 части на 8, менее 1 части на 9, менее 1 части на 10, менее 1 части на 20, менее 1 части на 25, менее 1 части на 30 или даже менее 1 части на 50 частей по массе любого ($N-x$) продукта относительно соединения.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит менее 40 частей на 100 частей по массе совокупных ($N-x$) полинуклеотид-содержащих продуктов относительно соединения, например, менее 35 частей на 100, менее 30 частей на 100, менее 25 частей на 100, менее 20 частей на 100 или даже менее 15 частей на 100 по массе ($N-x$) полинуклеотид-содержащих продуктов относительно соединения.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит по меньшей мере 5 частей на 100 частей по массе ($N-2$) и ($N-3$) продуктов относительно соединения, например, по меньшей мере 10 частей на 100 частей по массе, по меньшей мере 12 частей на 100 частей по массе, по меньшей мере 14 частей на 100 частей по массе, по меньшей мере 15 частей на 100 частей по массе, по меньшей мере 20 частей на 100 частей по массе, по меньшей мере 30 частей на 100 частей по массе или по меньшей мере 40 частей на 100 частей по массе ($N-2$) и ($N-3$) продуктов относительно соединения.

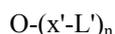
В некоторых вариантах реализации композиция имеет следующий профиль ($N-x$) полинуклеотид-содержащих продуктов:

менее 1 части на 4 части по массе ($N-1$) продукта относительно N продукта и

по меньшей мере 10 частей на 100 частей по массе ($N-2$) и ($N-3$) продуктов относительно N продукта.

В некоторых вариантах реализации олигонуклеотидный N продукт содержит 3'-концевую нуклео-

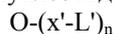
зидную субъединицу, которая отсутствует в (N-1) продукте. Олигонуклеотидное соединение может быть описано формулой:



где O представляет собой олигонуклеотид, 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.

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 олигонуклеотидное соединение может быть описано формулой



где O представляет собой олигонуклеотид, 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, олигонуклеотид формулы (I), или его соль, при этом в формуле (I) Z представляет собой липидный фрагмент, L представляет собой необязательный линкер, и группы B соответствуют последовательности нуклеозидных субъединиц, комплементарной РНК компоненту человеческой теломеразы.

Олигонуклеотидный 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 олигонуклеотиды. Одна предпочтительная область-мишень представляет собой область, охватывающую нуклеотиды 30-67 в SEQ ID NO: 1, которая содержит "матричную область", область из 11 нуклеотидов последовательности 5'-CUAACCCUAAC-3' (SEQ ID NO: 2), 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, особенно предпочтительны соединения согласно настоящему изобретению, которые содержат олигонуклеотидный фрагмент, содержащий последовательность, комплементарную всей или части матричной области. Другая предпочтительная область-мишень представляет собой область, охватывающую нуклеотиды 137-179 в hTR (см. Pruzan et al., Nucl. Acids Research, 30:559-588, 2002). В указанной области последовательность, охватывающая 141-153, является предпочтительной мишенью. В публикации PCT WO 98/28442 описано применение олигонуклеотидов, имеющих по меньшей мере 7 нуклеотидов в длину, для ингибирования теломеразы, где указанные олигонуклеотиды 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 O, на которую нацелена последовательность hTR, предпочтительно точно комплементарна соответствующей последовательности hTR. Несмотря на то, что в некоторых случаях допустимы некоторые несоответствия, они предположительно снижают специфичность и активность полученного олигонуклеотидного конъюгата. Таким образом, в конкретных вариантах реализации последовательность оснований олигонуклеотида O 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 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 олигонуклеотида содержит последовательность, состоящую из по меньшей мере от 5 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 олигонуклеотида O выбрана так, что она комплементарна РНК теломеразы. Однако необязательно, чтобы полная длина олигонуклеотидного компонента была точно комплементарна целевой последовательности, и олигонуклеотидная последовательность может содержать области, которые некомплементарны целевой последовательности. Такие области могут быть добавлены, например, для обеспечения других свойств соединения, например, последовательности, облегчающие очистку. Если олигонуклеотидный компонент O 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 со-

держанием G) последовательность связана на 5'-конце.

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

GGGUUGC GGA GGGUGGGCCU GGGAGGGGUG GUGGCCAUUU
 UUUGUCUAAC CCUAACUGAG AAGGGCGUAG GCGCCGUGCU UUUGUCUCCCC
 GCGCGCUGUU UUUCUCGUG ACUUUCAGCG GGCGGAAAAG CCUCGGCCUG
 CCGCCUCCA CCGUUCUUC UAGAGCAAAC AAAAAUGUC AGCUGCUGGC
 CCGUUCGCCC CUCCCGGGGA CCUGCGGCGG GUCGCCUGCC CAGCCCCGA
 ACCCCGCCUG GAGGCCGCGG UCGGCCCGGG GCUUCUCCGG AGGCACCCAC
 UGCCACCGCG AAGAGUUGGG CUCUGUCAGC CGCGGGUCUC UCGGGGGCGA
 GGGCGAGGUU CAGCCUUUC AGGCCGAGG AAGAGGAACG GAGCGAGUCC
 CCGCGCGCGG CGGAUUCUCC UGAGCUGUGG GACGUGCACC CAGGACUCGG
 CUCACACAUG C (SEQ ID NO: 1)
 GCTCTAGAATGAACGGTGAAGGCGGCAGG 137-166 (SEQ ID NO: 6)
 GTGGAAGGCGGCAGG 137-151 (SEQ ID NO: 7)
 GGAAGGCGGCAGG 137-149 (SEQ ID NO: 8)
 GTGGAAGGCGCA 139-151 (SEQ ID NO: 9)
 GTGGAAGGCGG 141-151 (SEQ ID NO: 10)
 CGGTGGAAGGCGG 141-153 (SEQ ID NO: 11)
 ACGGTGGAAGGCG 142-154 (SEQ ID NO: 12)
 AACGGTGAAGGCGGC 143-155 (SEQ ID NO: 13)
 ATGAACGGTGAAGGCGG 144-158 (SEQ ID NO: 14)
 ACATTTTTTTGTTGCTCTAG 160-179 (SEQ ID NO: 15)
 TAGGGTTAGACAA 42-54 (SEQ ID NO: 3)
 GTTAGGGTTAG 46-56 (SEQ ID NO: 4)
 GTTAGGGTTAGAC 44-56 (SEQ ID NO: 16)
 GTTAGGGTTAGACAA 42-56 (SEQ ID NO: 17)
 GGGTTAGAC 44-52
 CAGTTAGGG 50-58
 CCCTTCTCAGTT 54-65 (SEQ ID NO: 18)
 CGCCCTTCTCAG 56-67 (SEQ ID NO: 19)

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 O, может быть сделан на основании любых доступных химических структур олигонуклеотидов, включая, но не ограничиваясь ими, фосфодиэфирные, фосфотриэфирные, метилфосфонатные, P3'→N5' фосфорамидатные, N3'→P5' фосфорамидатные, N3'→P5' тиофосфорамидатные и тиофосфатные связи. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотидный компонент O имеет по меньшей мере одну N3'→P5' фосфорамидатную (например, N3'→P5' тиофосфорамидатную) связь. В некоторых вариантах реализации все нуклеозидные субъединицы, комплементарные РНК компоненту человеческой теломеразы, связаны N3'→P5' фосфорамидатными межсубъединичными связями. В некоторых случаях N3'→P5' фосфорамидатные межсубъединичные связи представляют собой N3'→P5' тиофосфорамидатные межсубъединичные связи. В некоторых случаях N3'→P5' фосфорамидатные межсубъединичные связи представляют собой N3'→P5' оксофосфорамидатные межсубъединичные связи.

В некоторых случаях N3'→P5' тиофосфорамидатная межсубъединичная связь имеет следующую структуру:



где R выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, замещенного алкила, арила, замещенного арила и защитной группы фосфата. Следует понимать, что некоторые олигонуклеотидные компоненты O, содержащие межсубъединичную связь, описанную представленной выше формулой, где R выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, замещенного алкила, арила, замещенного арила и защитной группы фосфата, также могут существовать в солевой форме. Такие формы, при условии возможности их существования, включены в объем настоящего описания.

В некоторых случаях N3'→P5' тиофосфорамидатная межсубъединичная связь описана следующей структурой:



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

Соединения согласно настоящему изобретению более эффективны для ингибирования теломеразы в клетках, чем соответствующие олигонуклеотиды, не сопряженные 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 возможностей 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 настоящего изобретения.

Липидный компонент может представлять собой любой липид или липидное производное, которое обеспечивает усиленное клеточное поглощение по сравнению с немодифицированным олигонуклеотидом. Предпочтительные липиды представляют собой углеводороды, жиры (например, глицериды, жирные кислоты и производные жирных кислот, такие как амиды жирных кислот) и стерины. 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. Предпочтительные 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. Предпочтительные примеры насыщенных углеводородов (алканов) перечислены ниже.

Систематическое название/углеродная цепь

Тетрадекан C₁₄H₃₀

Пентадекан C₁₅H₃₂

Гексадекан C₁₆H₃₄

Гептадекан C₁₇H₃₆

Октадекан C₁₈H₃₈

Нонадекан C₁₉H₄₀

Эйкозан C₂₀H₄₂

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 настоящему изобретению могут быть использованы замещенные формы углеводородов, при этом предпочтительны группы заместителей, которые являются инертными *in vivo* и *in vitro*. Особенно предпочтительный заместитель представляет собой фтор. Иллюстративные обобщенные структуры полифторированных углеводородов включают: CF₃(CF₂)_n-(CH₂)_m-, где m равен по меньшей мере 1, предпочтительно по меньшей мере 2, и n=1-30, например, фтортридекан: CF₃(CF₂)₉(CH₂)₃; и CH₃(CH₂)_a(CF₂)_b(CH₂)_c-, где a, b и c независимо равны 1-30.

Другие подходящие липидные компоненты включают простые жирные кислоты и производные жирных кислот, триглицериды и более сложные липиды, такие как стерины, 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. Предпочтительные 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 арахиновая 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 пальмитинолеиновая 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)

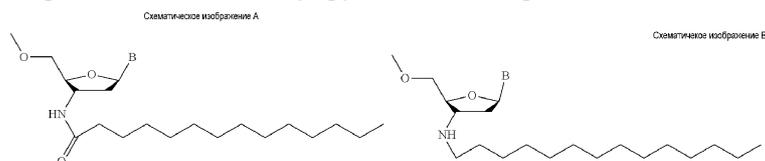
5,8,11,14-эйкозатетраеновая арахидоновая 20:4 (n-6)

В соединениях согласно настоящему изобретению также могут быть использованы жирные кислоты с одной или более тройными связями в углеродной цепи, а также разветвленные жирные кислоты. В соединениях согласно настоящему изобретению могут быть использованы замещенные формы жирных кислот. Как и в случае углеводородных групп, предпочтительны группы заместителей, которые являются инертными *in vivo* и *in vitro*, при этом особенно предпочтителен фтор.

Иллюстративные обобщенные структуры полифторированных производных жирных кислот, подходящих для применения согласно настоящему изобретению, представляют собой: $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, где m равен по меньшей мере 1, предпочтительно по меньшей мере 2 и $n=1-30$, и $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a(\text{CF}_2)_b(\text{CH}_2)_c\text{CO}-$, где a , b и c независимо равны 1-30.

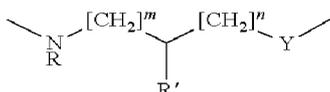
В некоторых случаях от одного до пяти компонентов L' ($n=1-5$) ковалентно связаны с компонентом O , необязательно через линкер. Более часто используют 1 или два компонента L' ($n=1$ или 2). Если с компонентом O связано более одного компонента L' , то каждый компонент L' выбран независимо.

Следует понимать, что соединения согласно настоящему изобретению, описанные как имеющие определенный углеводород в качестве фрагмента L' , и 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 олигонуклеотидом, которая, в свою очередь, является результатом процедуры синтеза, использованной для получения соединения. Например, как более подробно описано ниже, если синтезированы соединения, имеющие фрагмент L' , сопряженный с 3'-аминоконцом олигонуклеотида (имеющего фосфорамидатные или тиофосфорамидатные межнуклеозидные связи), то применение альдегидной формы жирной кислоты (жирного альдегида) в качестве исходного материала приводит к образованию аминной связи между липидной цепью и олигонуклеотидом, так что липидная группа выступает как углеводород. 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'-аминоконеч фосфорамидатного олигонуклеотида, соединенный с C_{14} липидным компонентом. На схематическом изображении A L' представляет собой тетрадекановую кислоту (миристиновую кислоту), в которой связь между группами L' и O представляет собой амид. На схематическом изображении B L' представляет собой тетрадекан, и связь между группами L' и O представляет собой амин.

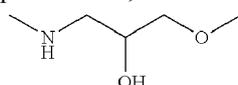


Связь между компонентами O и L' может быть прямой связью или может быть реализована через необязательный линкерный фрагмент, например, x или необязательный линкер L' формулы (I). Линкерная группа может служить для облегчения химического синтеза соединений. Независимо от того, использована ли линкерная 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 олигонуклеотида. В некоторых случаях фрагмент L' присоединен к 3' или 5' концу олигонуклеотида. Если компонент L' должен быть присоединен к 3' концу, то присоединение может быть осуществлено непосредственно к 3'-заместителю, который в случае предпочтительных фосфорамидатных и тиофосфорамидатных олигонуклеотидов представляет собой 3'-аминогруппу, и в других случаях, таких как обычные фосфодиэфирные олигонуклеотиды, представляет собой 3-гидроксигруппу. В альтернативном варианте 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 N_2 аминогруппе гуанози-

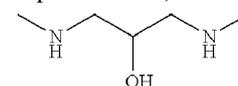
на. Если $n > 1$, так что к компоненту O должно быть присоединено множество липидных компонентов, то отдельно выбранные компоненты L' могут быть присоединены в любом подходящем месте(-ах). Например, одна группа L' может быть присоединена к каждому из концов, различные группы L' могут быть присоединены 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 L' соединений. Следует понимать, что необязательный линкер (например, x 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 настоящем документе. Примеры подходящих линкерных групп включают линкеры типа аминоклицирина и O-алкилглицирина, которые, соответственно, могут быть изображены общими структурами:



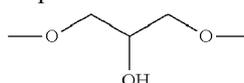
где R'=H, OH, NH₂ or SH; Y=O, S или NR; R=H, алкил или замещенный алкил; и n и m независимо представляют собой целые числа от 1 до 18. Конкретные примеры подходящих линкеров представляют собой аминоклицириновый линкер, в котором R'=OH, Y=O и каждый m и n равен 1



бис-аминоклицириновый линкер, в котором R'=OH, Y=NH, и каждый m и n равен 1

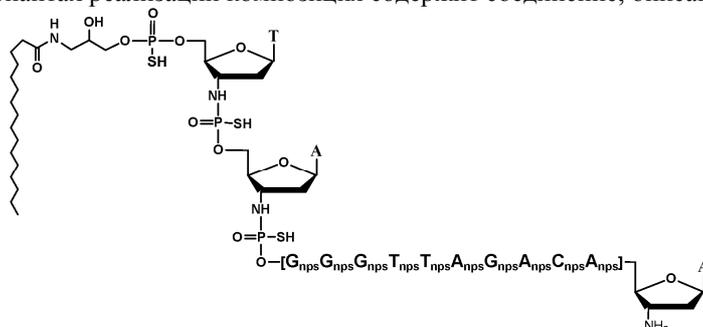


и O-алкилглицириновый линкер, в котором R=H:



Иллюстративные модифицированные липидом олигонуклеотиды, которые могут быть получены в соответствии с рассматриваемыми способами, включают соединения, описанные на фиг. 1 (например, фиг. 1A-1DD) в заявке на патент США US 20120329858, Gryaznov et al., "Modified oligonucleotides for telomerase inhibition", полное описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

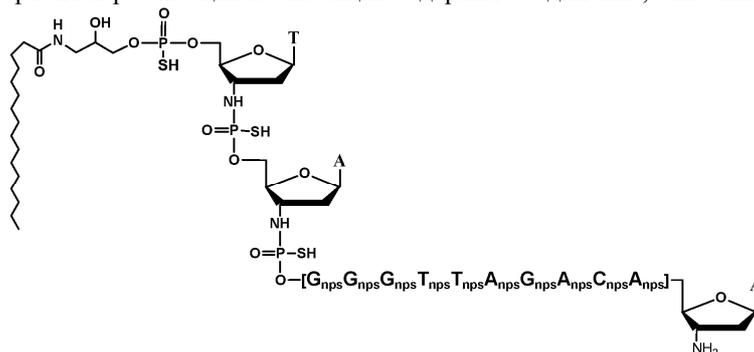
В некоторых вариантах реализации композиция содержит соединение, описанное структурой



где "nps" представляет собой тиофосфорамидатную связь (например, -NH-P(=O)(SH)-O-), связывающую 3'-атом углерода нуклеозида с 5'-атомом углерода соседнего нуклеозида.

Следует понимать, что все варианты реализации, относящиеся к соединению, также применимы к солевым формам указанного соединения.

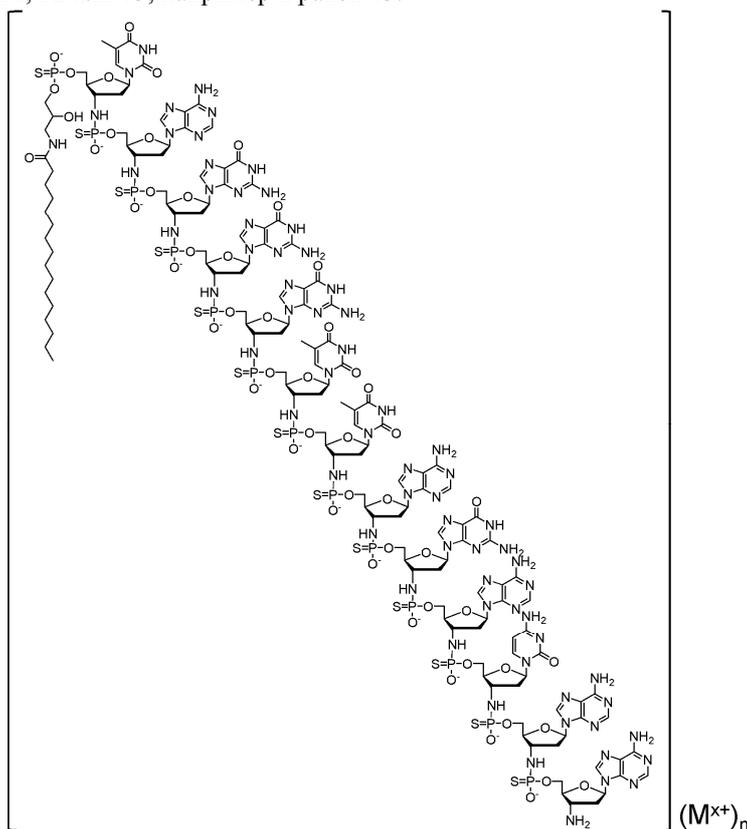
В некоторых вариантах реализации композиция содержит соединение, описанное структурой



или его соль;

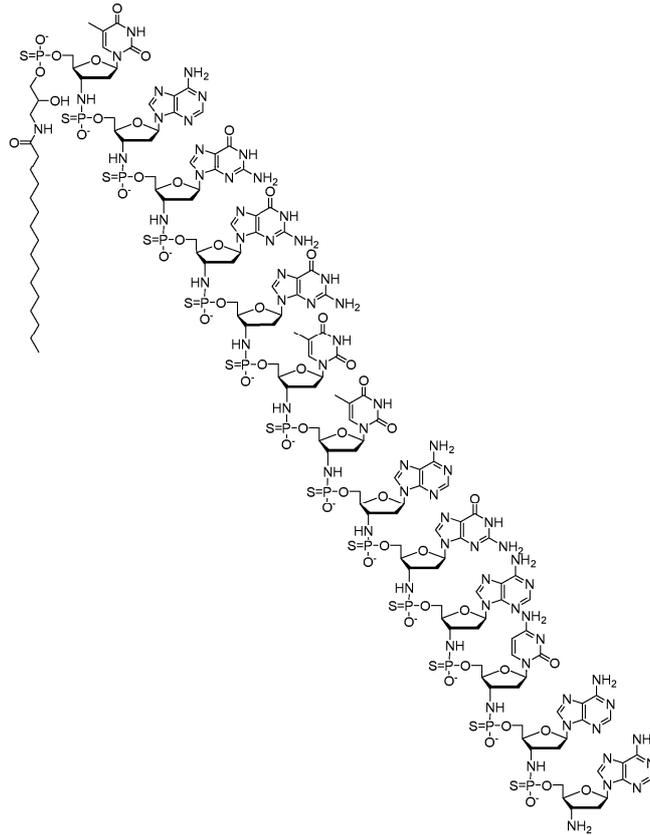
где "nps" представляет собой тиофосфорамидатную связь (например, $-\text{NH}-\text{P}(=\text{O})(\text{SH})-\text{O}-$ или ее таутомер, или ее соль), соединяющую 3'-атом углерода одного нуклеозида с 5'-атомом углерода соседнего нуклеозида. В некоторых вариантах реализации композиция содержит фармацевтически 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 олигонуклеотид, описанный следующей структурой, где каждый $\text{M}^{\text{x}+}$ независимо представляет собой водород или любой подходящий противоион соли, каждый x независимо равен 1, 2 или 3 и n представляет собой целое число от 5 до 13, например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13, например n равен 13.

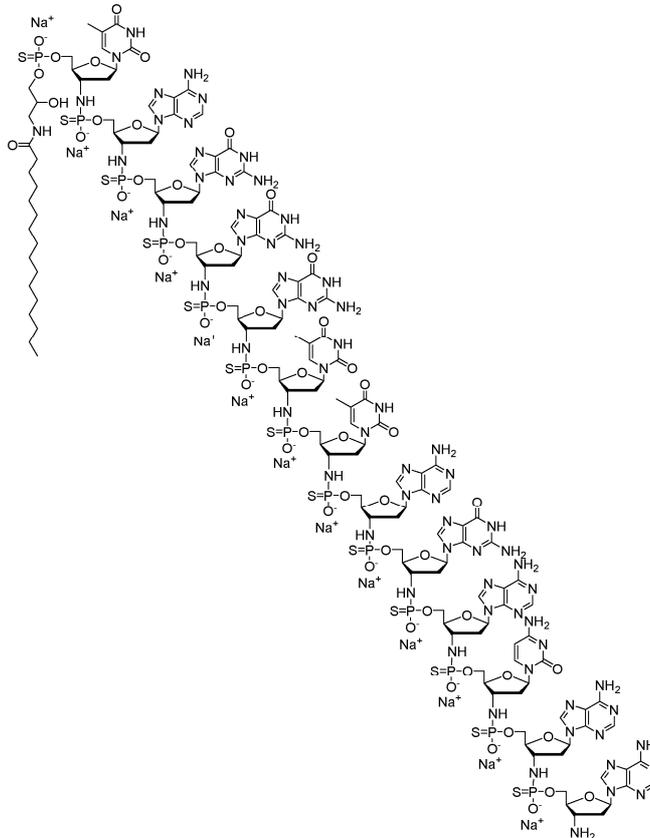


В некоторых случаях каждый x равен 1. В некоторых случаях каждый x независимо равен 1 или 2. В некоторых случаях каждый x независимо равен 1 или 3. В некоторых случаях $\text{M}^{\text{x}+}$ представляет собой водород.

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



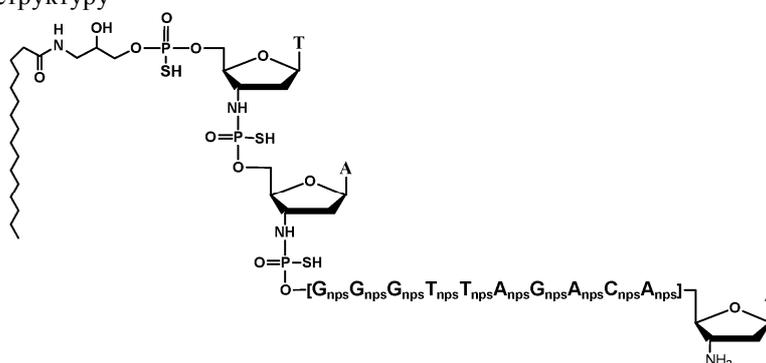
В некоторых вариантах реализации композиция содержит соединение, описанное структурой



Представлены также композиции сложного активного фармацевтического ингредиента, содержащие соединение, которое содержит олигонуклеотид. В данном контексте активный фармацевтический ингредиент относится к композиции, которая получена с применением рассматриваемых способов получения, при этом указанная композиция может быть необязательно подвержена одной или более дополнительным стадиям очистки после синтеза. В целом, активный фармацевтический ингредиент представляет собой композицию, подходящую для составления в фармацевтическую композицию. В некоторых случа-

Следует понимать, что все варианты реализации, относящиеся к сложному активному фармацевтическому ингредиенту, также применимы к солевым формам указанного сложного активного фармацевтического ингредиента.

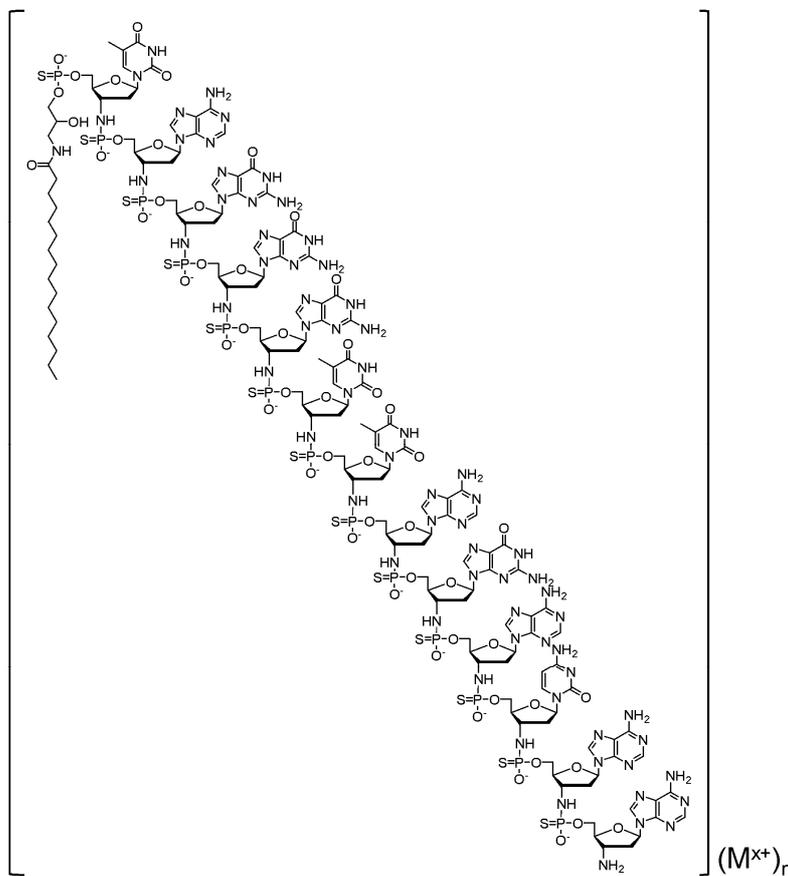
В некоторых вариантах реализации сложного активного фармацевтического ингредиента указанное соединение имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль;

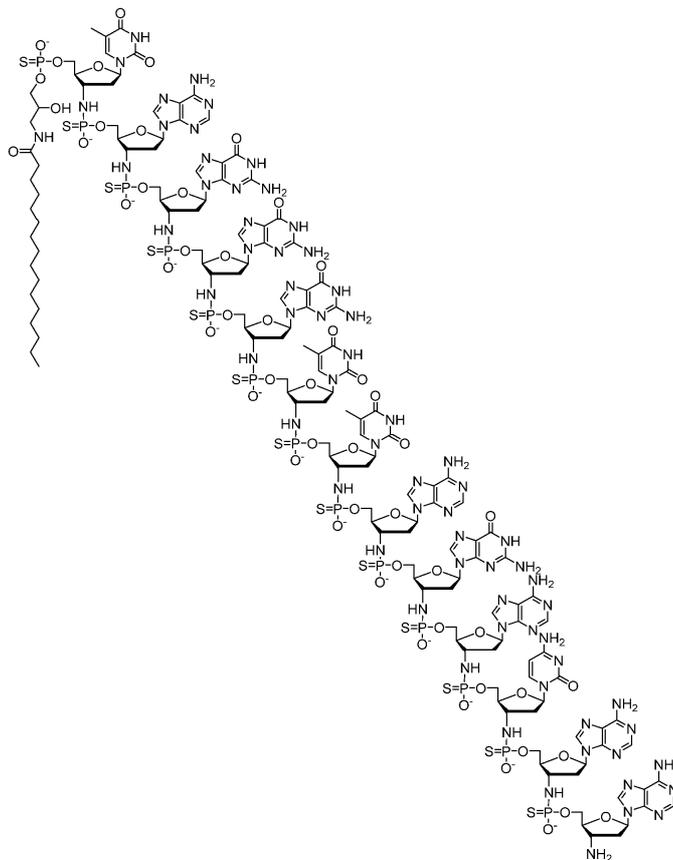
где "nps" представляет собой тиофосфорамидатную связь -NH-P(=O)(SH)-O- (или ее таутомер, или ее фармацевтически приемлемую соль, как описано в настоящем документе), связывающую 3'-атом углерода одного нуклеозида с 5'-атомом углерода соседнего нуклеозида. В некоторых вариантах реализации сложного активного фармацевтического ингредиента композиция содержит натриевую соль указанного соединения. В некоторых вариантах реализации композиция содержит соль двухвалентного катиона и указанного соединения, такую как магневая соль соединения. В некоторых вариантах реализации композиция содержит соль трехвалентного катиона и указанного соединения, такую как алюминиевая соль соединения.

В некоторых вариантах реализации сложного активного фармацевтического ингредиента соединение описано следующей структурой, где каждый M^{x+} независимо представляет собой водород или любой подходящий противоион соли, каждый x независимо равен 1, 2 или 3, и n представляет собой целое число от 5 до 13, например 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13, например n равен 13:

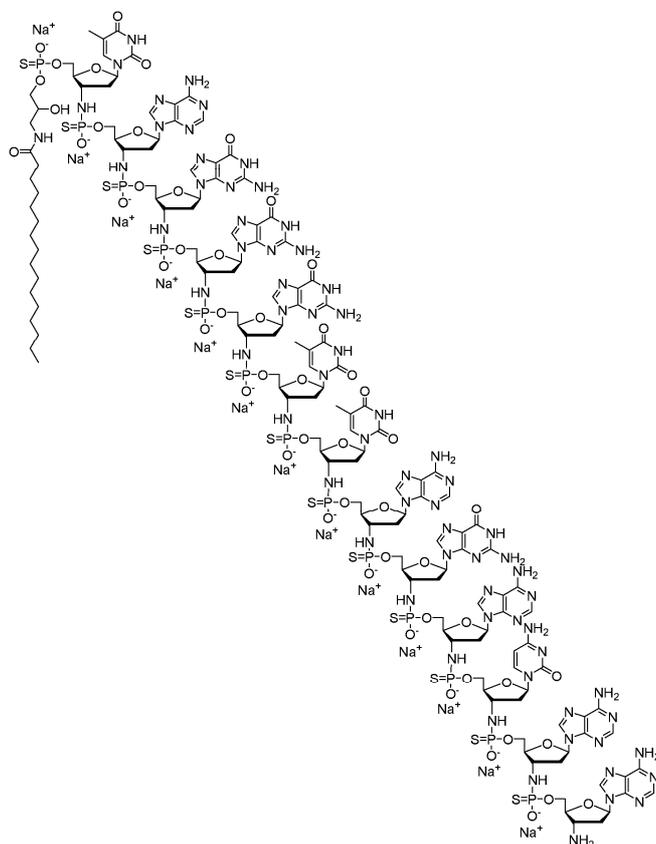


В некоторых случаях каждый x равен 1. В некоторых случаях каждый x независимо равен 1 или 2. В некоторых случаях каждый x независимо равен 1 или 3. В некоторых случаях M^{x+} представляет собой водород.

В некоторых вариантах реализации сложного активного фармацевтического ингредиента соединение описано следующей структурой и может содержать любые подходящие катионные противоионы соли



В некоторых вариантах реализации сложного активного фармацевтического ингредиента указанное соединение описано структурой



В некоторых вариантах реализации сложный активный фармацевтический ингредиент содержит менее 9% по массе (N-1) продукта, например менее 8% по массе, менее 7% по массе, менее 6% по массе, менее 5% по массе, менее 4% по массе, менее 3% по массе, менее 2% по массе или даже менее 1% по массе (N-1) продукта. В некоторых вариантах реализации сложный активный фармацевтический ингредиент содержит менее 5% по массе (N-1) продукта. В некоторых вариантах реализации сложный активный фармацевтический ингредиент содержит менее 2% по массе (N-1) продукта.

В некоторых вариантах реализации активный фармацевтический ингредиент содержит менее 9% любого (N-x) продукта, например менее 8% по массе, менее 7% по массе, менее 6% по массе, менее 5% по массе, менее 4% по массе, менее 3% по массе, менее 2% по массе или даже менее 1% по массе любого (N-x) продукта. В некоторых вариантах реализации сложный активный фармацевтический ингредиент содержит менее 9% по совокупной массе всех (N-x) полинуклеотидсодержащих продуктов, например менее 8% по массе, менее 7% по массе, менее 6% по массе, менее 5% по массе, менее 4% по массе, менее 3% по массе, менее 2% по массе или даже менее 1% по совокупной массе всех (N-x) полинуклеотидсодержащих продуктов.

В некоторых вариантах реализации сложный активный фармацевтический ингредиент имеет следующий профиль (N-x) полинуклеотидсодержащих продуктов:

менее 1 части на 4 части по массе (N-1) продукта относительно N продукта; и по меньшей мере 10 частей на 100 частей по массе (N-2) и (N-3) продуктов относительно N продукта.

Лекарственные формы

Представлены также фармацевтические композиции, которые содержат олигонуклеотидную композицию (например, описанную в настоящем документе). Олигонуклеотидные композиции (например, описанные в настоящем документе) также могут быть составлены в фармацевтическую композицию для ингибирования транскрипции или трансляции в клетке при болезненном состоянии, связанном со сверхэкспрессией гена-мишени.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит композицию олигонуклеотида (например, описанную в настоящем документе), составленную в виде смеси с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом. В некоторых вариантах реализации композиция олигонуклеотида представляет собой сложный активный фармацевтический ингредиент, имеющий менее 9% по массе (N-1) продукта, где указанное соединение содержит полинуклеотид, имеющий последовательность из 10 или более нуклеозидных субъединиц, комплементарную РНК компоненту человеческой теломеразы, при этом по меньшей мере две нуклеозидные субъединицы связаны N3'→P5' тиофосфорамидной межсубъединичной связью.

В настоящем изобретении 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 (ЕТ), полицитемию вера (PV), хронический миелогенный лейкоз (СМЛ), 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 (СММЛ). Рассматриваемые соединения могут быть использованы для лечения гематологических заболеваний, таких как описаны в заявке на патент РСТ № РСТ/US 13/070437, поданной 15 ноября 2013 г., полное описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Соответственно, соединения, представленные в настоящем документе, подходят для лечения широкого ряда злокачественных образований. Более важно, что соединения согласно настоящему 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, соединения согласно настоящему 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. Таким образом, один из аспектов настоящего изобретения представляет собой способ лечения рака у пациента, включающий ведение пациенту терапевтически эффективной дозы соединения согласно настоящему изобре-

тению. Ингибиторы теломеразы, включая соединения согласно настоящему изобретению, могут быть использованы в сочетании с другими средствами лечения рака, включая хирургическое удаление первичных опухолей, химиотерапевтические агенты и радиационное лечение. Следовательно, настоящее изобретение относится к соединениям и композициям, представленным в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства. Настоящее изобретение относится также к соединениям и композициям, представленным в настоящем документе, для применения при лечении или предупреждении одного из злокачественных заболеваний, упомянутых выше.

Для терапевтического применения соединения согласно настоящему изобретению составляют в терапевтически эффективном количестве с фармацевтически приемлемым носителем. В любую данную лекарственную форму может быть введено одно или более соединений согласно настоящему изобретению (например, имеющих разные компоненты L' или O). Фармацевтический носитель может быть твердым или жидким. Жидкие носители могут быть использованы при получении растворов, эмульсий, суспензий и композиций под давлением. Соединения растворяют или суспендируют в фармацевтически приемлемом жидком вспомогательном веществе. Подходящие примеры жидких носителей для парентерального введения препаратов олигонуклеотидов включают воду (которая может содержать добавку, например, производные целлюлозы, предпочтительно раствор карбоксиметилцеллюлозы натрия), фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), спирты (включая одноатомные спирты и многоатомные спирты, например, гликоли) и их производные, а также масла (например, фракционированное кокосовое масло и арахисовое масло). Жидкий носитель может содержать другие подходящие фармацевтические добавки, включая, но не ограничиваясь ими, следующие: солюбилизаторы, суспендирующие агенты, эмульгаторы, буферы, загустители, окрашивающие агенты, регуляторы вязкости, консерванты, стабилизаторы и регуляторы осмолярности.

Для парентерального введения соединений носитель также может представлять собой маслянистый сложный эфир, такой как этилолеат и изопропилмирикат. Для применения в стерильных жидких формах композиций для парентерального введения подходят стерильные носители.

Стерильные жидкие фармацевтические композиции, растворы или суспензии, могут быть использованы, например, посредством внутривенной инъекции, подкожной инъекции, внутривенно или локально. Олигонуклеотиды также могут быть введены внутримышечно или через сосудистый стент.

Жидкий носитель для композиций под давлением может представлять собой галогенированный углеводород или другой фармацевтически приемлемый агент-вытеснитель. Такие композиции под давлением также могут быть инкапсулированы в липиде для доставки посредством ингаляции. Для введения интраназальной или интрабронхиальной ингаляцией или инсuffляцией олигонуклеотиды могут быть составлены в композицию в виде водного или частично водного раствора, который может быть затем использован в форме аэрозоля.

Соединения могут быть введены локально в виде раствора, крема или лосьона, с помощью лекарственной формы с фармацевтически приемлемыми носителями, содержащей активное соединение.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть перорально введены в любой приемлемой лекарственной форме, включая, но не ограничиваясь ими, лекарственные формы в капсулах, таблетках, порошках или гранулах, а также в виде суспензий или растворов в водной или неводной среде. Фармацевтические композиции и/или лекарственные формы, содержащие олигонуклеотиды согласно настоящему изобретению, могут содержать носители, смазывающие вещества, разбавители, загустители, ароматизаторы, эмульгаторы, диспергирующие добавки или связующие вещества. В случае таблеток для перорального применения традиционно используемые носители включают лактозу и кукурузный крахмал. Также могут быть добавлены смазывающие агенты, такие как стеарат магния. Для перорального введения в форме капсулы пригодные разбавители включают лактозу и высушенный кукурузный крахмал. Если требуются водные суспензии для перорального применения, активный ингредиент объединяют с эмульгирующими и суспендирующими агентами. При необходимости также могут быть добавлены некоторые подсластители, ароматизаторы или окрашивающие агенты. Несмотря на то, что соединения согласно настоящему изобретению обладают превосходными характеристиками проникновения в клетки и ткани, они могут быть составлены для обеспечения еще большего преимущества, например, в липосомных носителях. Применение липосом для облегчения клеточного поглощения описано, например, в патенте США № 4897355 и в патенте США № 4394448. Составление и получение липосом описано в многочисленных публикациях. Соединения также могут быть составлены в композицию посредством смешивания с дополнительными усилителями проникновения, такими как несопряженные формы липидных фрагментов, описанных выше, включая жирные кислоты и их производные. Примеры включают олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, рецинолеат, моноолеин (также известный как 1-моноолеил-рац-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахионовую кислоту, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклопентан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, моно- и диглицериды и их фармацевтически приемлемые соли (т.е. олеат, лаурат, капрат, мирикат, пальмитат, стеарат, линолеат и т.д.). Могут быть использованы сложные лекарственные формы, содержащие один или более агентов усиления проникновения. Например, желчные соли могут

быть использованы в комбинации с жирными кислотами для получения сложных лекарственных форм. Иллюстративные комбинации включают хенодесоксихолевую кислоту (CDCA), обычно используемую в концентрациях от около 0,5 до 2%, комбинируемую с капратом натрия или лауратом натрия, обычно используемым в концентрациях от около 0,5 до 5%.

Фармацевтические композиции и/или лекарственные формы, содержащие олигонуклеотиды согласно настоящему изобретению, также могут содержать хелатообразующие агенты, поверхностно-активные вещества и поверхностно-неактивные вещества. Хелатообразующие агенты включают, но не ограничиваются ими, этилендиаминтетраацетат динатрия (ЭДТА), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомованилат), N-ацильные производные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацильные производные бета-дикетоннов (енаминов). Поверхностно-активные вещества включают, например, лаурилсульфат натрия, полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир и полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир; и эмульсии перфторированных соединений, такие как FC-43. Поверхностно-неактивные вещества включают, например, ненасыщенные циклические мочевины, 1-алкил- и 1-алкенилазациклоалканоновые производные, а также нестероидные противовоспалительные агенты, такие как диклофенак натрия, индометацин и фенилбутазон.

Таким образом, в другом аспекте настоящего изобретения представлен способ составления фармацевтической композиции, включающий обеспечение соединения, описанного в настоящем документе, и комбинирование указанного соединения с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом. Предпочтительно, представленное соединение имеет фармацевтическую чистоту, как описано ниже. Указанный способ может дополнительно включать добавление к соединению, до или после добавления вспомогательного вещества, агента для усиления проникновения.

Фармацевтическая композиция может соответствовать стандартам фармацевтической чистоты. В некоторых случаях, для применения в качестве активного ингредиента в фармацевтическом препарате, рассматриваемое соединение очищено от реакционноспособных или потенциально иммуногенных компонентов, присутствующих в смеси, в которой оно было получено.

Может быть взята аликвота фармацевтической композиции и упакована в виде одной дозы или многодозовых единиц. Требования к дозе для лечения олигонуклеотидным соединением варьируются в зависимости от конкретных используемых композиций, способа введения, тяжести присутствующих симптомов, формы соединения и конкретного субъекта, подлежащего лечению. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены субъекту в лекарственной форме и в количестве, эффективных для достижения клинически желаемого результата. Для лечения рака желаемые результаты включают уменьшение массы опухоли (определяемой пальпацией или визуализацией; например, радиографией, радионуклидным сканированием, КАТ сканированием или МРТ), уменьшение скорости роста опухоли, уменьшение скорости образования метастазов (определяемой, например, гистохимическим анализом биопсийных образцов), уменьшение биохимических маркеров (включая общие маркеры, такие как CSR, и опухолеспецифические маркеры, такие как PSA в сыворотке) и улучшение качества жизни (определяемое клинической оценкой, например, по шкале Карновского), увеличение времени до прогрессирования, выживаемости без признаков заболевания и общей выживаемости.

Количество соединения на одну дозу и количество доз, необходимых для достижения указанных эффектов, варьируется в зависимости от множества факторов, включая показания для лечения заболевания, характеристики пациента, подлежащего лечению, и способ введения. В некоторых случаях лекарственная форма и способ введения обеспечивают локальную концентрацию в очаге заболевания от 1 мкМ до 1 нМ соединения.

В целом, соединения вводят в концентрации, которая обеспечивает эффективные результаты, не вызывая вредных или губительных побочных эффектов. Указанная концентрация может быть достигнута посредством введения одной единичной дозы или посредством введения дозы, разделенной на удобные субъединицы, с подходящими интервалами в течение суток.

Полезность

Способы и композиции согласно настоящему 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 олигонуклеотидов применяют для получения олигонуклеотидов, которые обеспечивают терапевтический эффект. Типы заболеваний, которые можно лечить с применением композиций согласно настоящему 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.

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

Следующие примеры представлены для обеспечения специалистам в данной области техники полного раскрытия и описания способов осуществления и применения настоящего изобретения, и они не предназначены для ограничения объема, который авторы изобретения считают своим изобретением, а также они не предназначены для того, чтобы показать, что представленные ниже эксперименты являются всеми или единственными проведенными экспериментами. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части являются массовыми частями, молекулярная масса является средневесовой молекулярной массой, температура указана в градусах Цельсия, а давление равно или близко к атмосферному. Под "средним" подразумевается среднее арифметическое. Могут быть использованы стандартные сокращения, например, п.о., пара(ы) оснований; тыс.о., тысяча(и) оснований; пл, пиколитр(ы); с или сек., секунда(ы); мин., минута(ы); ч или ч., час(ы); а.к., аминокислота(ы); тыс.о., тысяча(и) оснований; п.о., пара(ы) оснований; нт, нуклеотид(ы), i.m., внутримышечно(ый); i.p., внутривнутрибрюшинно(ый); s.c., подкожно(ый); и т.п.

Общие способы синтеза

Доступны многие общие ссылки, обеспечивающие общеизвестные схемы и условия химического синтеза, подходящие для синтеза описанных соединений (см., например, Smith и March; March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, пятое изд., Wiley-Interscience, 2001; или Vogel, *A Textbook of Practical Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis*, четвертое изд., Нью-Йорк: Longman, 1978).

Соединения, описанные в настоящем документе, могут быть очищены любым способом очистки, известным в данной области техники, включая хроматографию, такую как ВЭЖХ, препаративная тонкослойная хроматография, колоночная флэш-хроматография и ионообменная хроматография. Может быть использована любая подходящая неподвижная фаза, включая нормальные и обращенные фазы, а также ионные смолы. В некоторых вариантах реализации описанные соединения очищают хроматографией на силикагеле и/или оксиде алюминия. См., например, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2e изд., ред. L. R. Snyder и J. J. Kirkland, John Wiley and Sons, 1979; и *Thin Layer Chromatography*, ред. E. Stahl, Springer-Verlag, Нью-Йорк, 1969.

Во время любых способов получения рассматриваемых соединений может быть необходимо и/или желательно защитить чувствительные или реакционноспособные группы любых рассматриваемых молекул. Это может быть осуществлено с помощью подходящих защитных групп, описанных в известных трудах, таких как J. F. W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, Лондон и Нью-Йорк, 1973, в T. W. Greene и P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", третье изд., Wiley, Нью-Йорк 1999, в "The Peptides"; том 3 (ред.: E. Gross и J. Meienhofer), Academic Press, Лондон и Нью-Йорк, 1981, в "Methoden der organischen Chemie", Houben-Weyl, 4^е изд., том 15/1, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, в H.-D. Jakubke и H. Jescheit, "Aminosäuren, Peptide, Proteine", Verlag Chemie, Вайнхайм, Дирфилд-Бич и Базель, 1982, и/или в Jochen Lehmann, "Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide and Derivate", Georg Thieme Verlag, Штутгарт, 1974. Защитные группы могут быть удалены на подходящей последующей стадии с помощью способов, известных в данной области техники.

Рассматриваемые соединения могут быть синтезированы различными способами синтеза с применением имеющихся в продаже исходных материалов и/или исходных материалов, полученных обычными способами синтеза. Многочисленные примеры способов синтеза, которые могут быть использованы для синтеза соединений, описанных в настоящем документе, описаны на представленных ниже схемах.

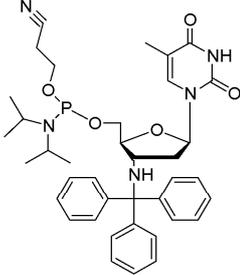
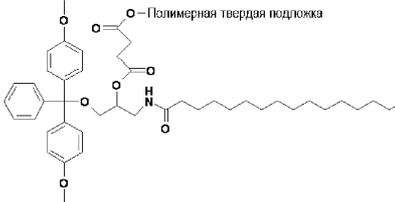
Пример 1. Синтез иметельстата натрия с применением димерных фосфорамидитов

Иметельстат натрия синтезировали с помощью твердой подложки (подложка из стекла с контролируемым размером пор или полимерная твердая подложка) и мономерных фосфорамидитов, таких как A^{Bz} или A^{dmf}, C, G^{iBu} и T амидиты, в следующей последовательности:

5'R-TAGGGTTAGACAA-NH₂-3' (SEQ ID NO: 3), где R = липидная линкерная группа

Таблица 2. Структура амидитов и твердой подложки

Сокращенное название	Описание	Структура
Амидит A ^{dmf}	3'-Тритиламино-N ₆ -диметилформамидино-2',3'-дидезоксиаденозин-5'-(2-цианоэтил)-N,N-диизопропил-фосфорамидит	
Амидит A ^{dmf} (ММТ)	3'-Монометокситритиламино-N ₆ -диметилформамидино-2',3'-дидезоксиаденозин-5'-(2-цианоэтил)-N,N-диизопропил-фосфорамидит	
Амидит A ^{dmf} (пиксил)	3'-(Диметилзамещенный пиксил)амино-N ₆ -диметилформамидино-2',3'-дидезоксиаденозин-5'-(2-цианоэтил)-N,N-диизопропил-фосфорамидит	
Амидит A ^{dmf} (DMT)	3'-Диметокситритиламино-N ₆ -диметилформамидино-2',3'-дидезоксиаденозин-5'-(2-цианоэтил)-N,N-диизопропил-фосфорамидит	
Амидит A ^{Bz}	3'-Тритиламино-N ₆ -бензоил-2',3'-дидезоксиаденозин-5'-(2-цианоэтил)-N,N-диизопропил-фосфорамидит	
Амидит C(Bz)	3'-Тритиламино-N-бензоил-2',3'-дидезоксицитидин-5'-(2-цианоэтил)-N,N-диизопропил-фосфорамидит	
Амидит G(iBu)	3'-Тритиламино-N ₂ -изобутирил-2',3'-дидезоксигуанозин-5'-(2-цианоэтил)-N,N-диизопропил-фосфорамидит	

Амидит Т	3'-Тригилламино-3'-дезокситимидин-5'-(2-цианоэтил)-N,N-диизопропил-фосфорамидит	
Пальмитоил-аминоглицерин-твердая подложка	3-Пальмитоиламидо-1-О-(4,4'-диметокситритил)-2-О-сукцинилпропандиол, стеклянная подложка с контролируемым размером пор	
или		
NittoPhaseHL пальмитоил 400 полимерная твердая подложка	3-Пальмитоиламидо-1-О-(4,4'-диметокситритил)-2-О-сукцинилпропандиол, полимерная твердая подложка	

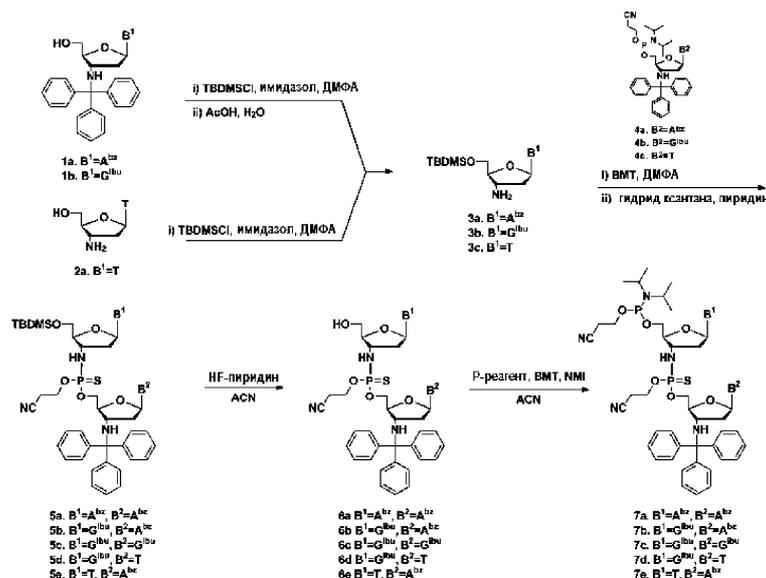
Иметельстат имеет скелет NPS, аналогичный исходным фосфорамидитом, и поэтому эффективность связывания составляет примерно 92%. Использование димерных фосфорамидитов обеспечивает возможность использования меньшего количества стадий связывания, что может приводить к более высокому выходу и чистоте на промежуточной стадии после синтеза. По способу, описанному на схеме синтеза 1, получали следующие димерные фосфорамидиты, представленные ниже:

ТА, АА, GA, GG и GT.

Для синтеза димерных фосфорамидитов потребовались три мономерных амидата (4а-4с, схема 1) и три 5'-TBDMS-3' аминонуклеозидных промежуточных соединения (3а-3с, схема 1) для нуклеозидов А, G и Т. TBDMS представляет собой трет-бутилдиметилсилил. Промежуточные соединения (3а-3с, схема 1) получали из двух типов исходных материалов, 5'-ОН-3'-NR-Tr-2'-дезоксиде-*N*-бензоиладенозин (1а), 5'-ОН-3'-NH-Tr-2'-дезоксиде-*N*-изобутирилгуанозин (1б) и 5'-ОН-3'-аминотимидин (2). Tr или Trt относится к три-тилу.

5'-Гидроксильные группы в 1а и 1б защищали группами TBDMS, используя трет-бутилдиметилсилилхлорид и имидазол в ДМФА (N,N-диметилформамид), а затем тритильные группы в 3'-аминоположениях удаляли обработкой уксусной кислотой в воде. Полученные промежуточные соединения, 3а-3с, связывали с соответствующими амидатами, 4а-4с, используя бензилмеркаптотетразол (BMT) в качестве активатора в диметилформамиде, а последующее сульфирование (P III до P V) проводили с применением гидроксида ксантана и пиридина (схема 1). В целом, реакция сульфирования была завершена легко. Результат реакций связывания варьировался в зависимости от содержания влаги, времени реакции и эквивалентности амидатов. Желательными были безводные условия с применением газообразного азота или аргона, а также быстрое проведение реакции связывания, поскольку более продолжительное время реакции приводило к большему количеству побочных продуктов, таких как продукты окисления P (V). Промежуточные соединения димера P (III) имели разную стабильность. Промежуточный продукт ТА был достаточно стабильным для контролирования завершения реакции по ТСХ и ВЭЖХ. Другие промежуточные продукты P (III) были недостаточно стабильными для контролирования реакции связывания, и завершение реакции проверяли после завершения сульфирования (схема 1). Соединения P(V) более стабильны для димеров АА, GA, GG и GT. Для димера ТА (5е) использовали 1,3 эквивалента амидата (4с) для связывания, а для других четырех димеров (5а~5д) потребовалось примерно 3 эквивалента амидатов (4а и 4б) (схема 1). Амидатные мономеры 4а-4с получали адаптацией способов, описанных в патенте США 5859233.

Схема 1. Схема синтеза димерных амидатов (P-реагент представляет собой цианоэтоксиде-бис(N,N-диизопропиламино)фосфин)



Защитную группу TBDMS у 5'-гидроксильной группы удаляли с использованием HF-пиридина в ацетонитриле, а окончательное фосфитилирование проводили с помощью фосфитилирующего агента в присутствии ВМТ и N-метилимидазола (NMI) с получением димерных тиофосфорамидатов 7a-7e (схема 1). Конечные продукты (7) и три промежуточных соединения (3, 5, 6) очищали колоночной хроматографией. Выход указанной стадии и общие выходы реакций с количествами полученных готовых амидатов представлены в табл. 3. Обобщение результатов анализов для пяти димерных амидатов представлено в табл. 4.

Таблица 3. Выходы синтеза димеров

Димер (количество)	5'-TBDMS-3'-аминонуклеозид	5'-TBDMS-3'-NH-T-димер	5'-OH-3'-NH-T-димер	Димерный амидат	Общий выход (%)
ТА (2,9 г)	58 %	91 %	71 %	51 %	19,1 %
АА (1,7 г)	58 %	82 %	70 %	47 %	15,6 %
ГА (3,4 г)	58 %	77 %	60 %	55 %	14,7 %
ГГ (1,9 г)	58 %	67 %	57 %	38 %	8,4 %
ГТ (1,8 г)	58 %	99 %	42 %	38 %	9,2 %

Таблица 4. Обобщение анализа димеров

Димер	Чистота по ВЭЖХ	³¹ P-ЯМР	ВЭЖХ (расч.)	Количество (г)
ТА	96,0 %	148,281(с), 148,193(с), 73,811(с), 73,723(с), 72,981(с), 72,592(с)	1169,4 (1169,23)	2,9
АА	95,8 %	148,262(м), 74,034(м), 72,774(д), 72,267(д)	1282,5 (1282,35)	1,7
ГГ	94,5 %	148,156(м), 74,244(с), 73,993(с), 72,912(с), 72,761(с)	1268,5 (Na) (1246,32)	1,9
ГТ	95,3 %	148,159(м), 73,993(с), 73,811(с), 73,295(с), 73,100(с)	1151,4 (1151,22)	1,8
ГА	96,2 %	148,168(м), 148,011(с), 74,175(с), 73,942(с), 73,170(с), 72,906(с)	1264,5 (1264,33)	3,4

Способ синтеза димерных тиофосфорамидатов

- Получение 5'-TBDMS-3'-аминонуклеозида (для аденозина и гуанозина).
 - Растворяли 5'-OH-3'-NH-T-2'-дезоксинуклеозид (1,0 экв.) и имидазол (5,0 экв.) в ДМФА и нагревали до 60°C.
 - Добавляли TBDMSCl (1,2 экв.) к нагреваемому раствору, затем перемешивали в течение 1 ч при

60°C.

с) Добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 к реакционной смеси, затем экстрагировали этилацетатом.

д) Органический слой промывали насыщенным водным раствором NaHCO_3 и насыщенным соевым раствором.

е) Добавляли безводный Na_2SO_4 к отделенному органическому слою для высушивания, затем фильтровали.

ф) Фильтрат концентрировали.

г) Добавляли 80% водный раствор уксусной кислоты к концентрированной реакционной смеси, затем перемешивали в течение 1 ч при температуре окружающей среды.

h) Удаляли твердый продукт фильтрованием, затем добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 фильтрату, затем четыре раза экстрагировали этилацетатом.

и) Органический слой высушивали над безводным Na_2SO_4 , затем удаляли твердое вещество фильтрованием.

j) Фильтрат концентрировали, затем очищали колоночной хроматографией (элюент: этилацетат: метанол=9:1→5:1).

к) 5'-TBDMS-3'-амино-2'-дезоксинуклеозид получали в виде белого твердого вещества.

2) Получение 5'-TBDMS-3'-аминонуклеозид (для тимидина)

а) Растворяли 5'-ОН-3'-амино-2'-дезоксинуклеозид (1,0 экв.) и имидазол (5,0 экв.) в ДМФА и нагревали до 60°C.

б) Добавляли TBDMSCl (1,2 экв.) к нагреваемому раствору, затем перемешивали в течение 1 ч при 60°C.

с) Добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 к реакционной смеси, затем четыре раза экстрагировали этилацетатом.

д) Добавляли безводный Na_2SO_4 к органическому слою для высушивания и фильтровали.

е) Фильтрат концентрировали.

ф) Концентрированную неочищенную смесь очищали колоночной хроматографией (элюент: этилацетат: метанол=15:1→5:1).

г) S'-TBDMS-3'-аминотимидин получали в виде белого твердого вещества.

3) Получение димера 5'-TBDMS-3'-NH-Tr

а) Для удаления влаги S'-TBDMS-3'-аминонуклеозид (1,0 экв.) и ВМТ (бензилмеркаптотетразол, 1,0~5,0 экв.) подвергали азеотропной перегонке с ацетонитрилом три раза, затем растворяли в ДМФА при температуре окружающей среды в атмосфере N_2 .

б) По каплям добавляли мономерный амидат (3,0 экв.) в ДМФА (используя минимальное количество для растворения мономерного амидата) к реакционному раствору, затем перемешивали в течение 1 ч при температуре окружающей среды в атмосфере азота. Мономерный амидат получали в соответствии со способами, описанными в патенте США 5859233.

с) Добавляли гидрид ксантана (2,0 экв.) и пиридин (4,0 экв.) к реакционному раствору, затем перемешивали в течение 1 ч при температуре окружающей среды в атмосфере азота.

д) Добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 к реакционной смеси, затем экстрагировали этилацетатом.

е) Водный слой экстрагировали этилацетатом.

ф) Отделенные органические слои объединяли, а затем промывали насыщенным водным раствором NaHCO_3 и насыщенным соевым раствором.

г) Добавляли безводный Na_2SO_4 к органическому слою для высушивания и фильтровали, затем концентрировали фильтрат.

h) Концентрированную неочищенную смесь очищали колоночной хроматографией (элюент: этилацетат: метанол=1.5:1→только EA).

и) Димер 5'-TBDMS-3'-NH-Tr получали в виде бледно-желтого твердого вещества.

4) Получение димера 5'-ОН-3'-NH-Tr

а) Растворяли димер 5'-TBDMS-3'-NH-Tr (1,0 экв.) в ACN (20 мл) в атмосфере азота, а затем добавляли раствор HF-пиридина при перемешивании при температуре окружающей среды в течение 1,5 ч.

б) Добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 к реакционной смеси, затем экстрагировали этилацетатом.

с) Отделенный органический слой промывали насыщенным водным раствором NaHCO_3 и насыщенным соевым раствором.

д) Добавляли безводный Na_2SO_4 к органическому слою для высушивания и фильтровали, затем фильтрат концентрировали.

е) Концентрированную неочищенную смесь очищали колоночной хроматографией (элюент: этилацетат, метанол, совместный растворитель метиленхлорид).

ф) Получали димер 5'-ОН-3'-NH-Tr в виде белого твердого вещества.

5) Получение димерного тиофосфорамидата (димерного амидата)

А) Для удаления влаги димер 5'-гидрокси-3'-NH-Tг подвергали азеотропной перегонке с ацетонитрилом три раза, затем растворяли в ACN при температуре окружающей среды в атмосфере азота.

б) Добавляли BMT (1,3 экв.), NMI (N-метилимидазол, 0,3 экв.) и фосфитилирующий реагент (2,0 экв.) к реакционному раствору, затем перемешивали в течение 1 ч при температуре окружающей среды.

с) Добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 к реакционной смеси, затем экстрагировали этилацетатом.

д) Отделенный органический слой промывали насыщенным солевым раствором.

е) Добавляли безводный Na_2SO_4 к органическому слою для высушивания и фильтровали, затем концентрировали фильтрат.

ф) Растворяли концентрированную реакционную смесь в метиленхлориде (10 мл), затем добавляли гексан для осаждения твердого вещества.

г) Декантировали верхний слой раствора для удаления избытка фосфитилирующего реагента. (Повторяли процесс декантации 5 раз).

h) Оставшееся твердое вещество очищали колоночной хроматографией (элюент: этилацетат, ацетон, совместный растворитель метиленхлорид)

и) Получали димер в виде белого твердого вещества.

Синтез иметельстата с применением димерных амидатов

Пять димерных амидатов использовали вместо мономерных амидатов в качестве строительных блоков для синтеза иметельстата, и результаты сравнивали с результатами, полученными для амидатов мономера. Для связывания нуклеозида С в иметельстат выбрали мономерный строительный блок, представленный в следующей последовательности. Синтез проводили в масштабе 140 мкмоль, используя Akta Oligopilot 100.

5'R-TA GG GT TA GA C AA-NH₂ 3' (SEQ ID NO: 3)

Димерные амидаты использовали в качестве строительных блоков для получения иметельстата. Используя реагенты и параметры синтеза, перечисленные в табл. 5А и 5В, пять димерных амидатов (AA, TA, GG, GA и GT) и один мономерный амидат (С), представленный выше, связывали с получением последовательности иметельстата на CPG с низкой загрузкой (PALM 0051, 64,6 мкмоль/г). Время связывания составляло 500 с, и использовали эквивалентность амидатов 10. После твердофазного синтеза подложку обрабатывали этанольным раствором аммиака ($\text{NH}_4\text{OH}:\text{EtOH}=3:1$ (об./об.)) при 65°C в течение 15 ч. Неочищенный продукт выделяли испарением растворителей и анализировали с помощью УФ спектроскопии и ВЭЖХ.

Таблица 5. Иллюстративные параметры синтеза (А) и состав реагентов (В) для синтеза олигонуклеотидов. ACN представляет собой ацетонитрил. DCA представляет собой дихлоруксусную кислоту. PADS представляет собой фенилацетилдисульфид. ETT представляет собой 5-этилтио-1Н-тетразол.

Стадия	Реагент	Время	об.мин.	М .
1	Промыв.	3.5	300	
2	Газ	4.0	400	
3	Дебл.	3.4	250	
4	Дебл.	2.0	250	
5	Пауза	60.0		
6	Промыв.	12.0	350	
7	Актив.	3.0	250	
8	Связ.			
9	Пауза	300.0		
10	Связ.			
11	Актив.	1.3	150	
12	Пауза	200.0		
13	Промыв.	3.0	300	
14	Окисл.	10.0	350	
15	Пауза	300.0		
16	Окисл.	10.0	350	
17	Пауза	300.0		
18	Промыв.	6.0	350	
19	КепА	3.0	200	
20	КепВ	1.5	150	
21	Пауза	1.5		
22	КепА	1.5	150	
23	КепВ	1.5	150	
24	Пауза	1.5		
25	Промыв.	4.0	350	

Название реагента	Состав
Разделение блоков	5 % DCA в толуоле
Амидит	0,2 М в ACN
Активатор	0,5 М ETT в ACN
Тиолирование	0,2 М PADS в ACN:LTD=1:1
Кэп А	20 % NMI в ACN
Кэп В	IBUA:LTD:ACN=1:1:8
DEA	20 % DEA в ACN

Используя Akta Oligopilot 100, проводили синтез в масштабе 140 мкмоль с применением мономерного блочного способа и димерного блочного способа. Условия синтеза были аналогичными условиям, указанным в табл. 5А-В.

Таблица 6. Параметры синтеза в масштабе 140 мкмоль (АКТА Oligopilot 100)

Параметры		Синтез иметельстата с применением мономеров	Синтез иметельстата с применением димеров
Разделение блоков (5 % DCA в толуоле)	СТ (мин.)	3 мин. (2-ой 6 мин.)	3 мин.
	CV	11,2 CV	
	Линейный поток (см/ч)	450 см/ч	
Связывание	Амидат	0,1 М, 2,5 экв. (последние 2: 3,0 экв.)	0,1 М, 2,5 экв. (последний АА: 3,0 экв.)
	Активатор	0,5 М ЕТТ (амидат:активатор, 4:6)	
	1ое связывание	двойное связывание	
	СТ пропускания потока (мин.)	1,8 мин.	
	СТ рецикла (мин.)	1,8 мин. (1ый: 4 мин.)	
Тиолирование (0,1 М PADS в AN:LTD=9:1)	СТ (мин.)	5,27 мин.	
	CV	3,5 CV	
	Линейный поток (см/ч)	80 см/ч	
Кэпирование (Кэп А: 20 % NMI в AN, Кэп В: IBUA:LTD:AN =1:1:8)	СТ (мин.)	1 мин. (1ый: 2 мин.)	
	CV	1 CV (1ый: 2 CV)	
	Линейный поток (см/ч)	120 см/ч	
DEA (20 % DEA в AN)	СТ (мин.)	10 мин.	
	CV	4,3 CV	
	Линейный поток (см/ч)	52 см/ч	

Анализ олигонуклеотидов с помощью ВЭЖХ-МС показал, что чистота FLP (продукта полной длины) была существенно улучшена при использовании для синтеза пяти димерных блоков, с получением чистоты 72% по ВЭЖХ, как показано в табл. 7 и 8. Неочищенный олигонуклеотид, полученный с применением мономерных блоков, продемонстрировал чистоту лишь 45% FLP. Кроме того, общая OD (оптическая плотность) увеличилась более чем в два раза, с 5,299 до 11,623, что дает неочищенный выход 3,34 г/ммоль. Содержание (N-1) продукта и РО снизилось до 2,4% с 11,2% и до 5% с 20%, соответственно.

Преимущество применения димерных блоков включает тот факт, что время получения сокращено, а количество растворителей, используемых во время твердофазного синтеза, снижено.

Таблица 7. Результаты анализа для синтеза в масштабе 140 мкмоль

Показатели		Синтез иметельстата с применением мономерного амидата	Синтез иметельстата с применением димерного амидата
ВЭЖХ	FLP	44,4 %	74,0 %
	Хвостовой пик 1 (N-1) продукт	11,0 %	2,4 %
УФ	Общая оптическая плотность (TOD)	5299	11623
	Масса (мг)	213 мг	468 мг
	г/ммоль	1,52	3,34
ЖХ/МС	FLP	70,3 %	71,9 %
	n-117	3,3 %	16,4 %
	n-133	6,5 %	6,7 %
	n-16	19,9 %	5,0 %

Синтез пяти димерных амидатов был успешно завершён с выходом 9-19% из 5'-гидрокси-3'-аминонуклеозида или 5'-гидрокси-3'-третиламинонуклеозида с получением 1,7-3,4 г. Оптимизация условий реакции для каждой стадии не была тщательно изучена. Синтез иметельстата из димерных блоков проводили в масштабе 140 мкмоль, и результаты были сравнимы с данными, полученными для синтеза с применением мономерных амидатов. Димерная блочная стратегия получения иметельстата продемонстрировала существенное улучшение, поскольку была значительно улучшена чистота и выход, например, в масштабе 140 мкмоль (чистота по ВЭЖХ: димер 74,0% (фиг. 8), мономер 44,4% (фиг. 7), неочищенный выход по TOD (общей оптической плотности): димер 468 мг, мономер 213 мг). Кроме того, было получено более низкое количество связей про, поскольку имело место меньшее количество стадий связывания при синтезе с применением димеров. Эффективность связывания димера (синтез в масштабе 140

мколь) продемонстрировала, что димерный синтез имеет эффективность связывания 96%, тогда как мономерный синтез имеет эффективность связывания 94%. Поскольку для димера было проведено только семь связываний, то содержание FLP для димера составило 71,6%, что близко к теоретически рассчитанному значению продукта полной длины 72%, а для мономера с 13 связываниями содержание FLP составило 45,6% по сравнению с теоретическим расчетом 44%.

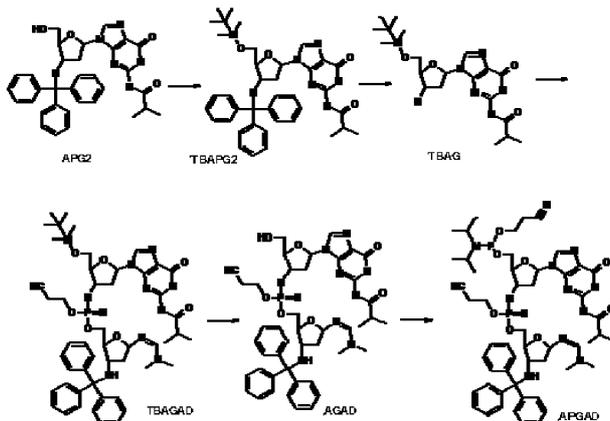
Таблица 8. Анализ результатов для синтеза в масштабе 140 мкмоль

Продукты мономерного синтеза	Время удерживания (мин.)	% площади для мономерного синтеза	Продукты димерного синтеза	Время удерживания (мин.)	% площади для димерного синтеза
целевой продукт	38,2	44,4	целевой продукт	37,9	74,0
Хвостовой пик 1 N-1 (N-G)	39,8	11,0	Хвостовой пик 1 N-1 (N-C)	39,8	2,5
Хвостовой пик 2 N-2+iBu, N-2, N-G+фенилацетил	41,2	6,3	Хвостовой пик 2 N-2+iBu, N-2, N-G+фенилацетил	41,3	3,9
Хвостовой пик 3 N-2+фенилацетил, N-3 (N-A-A-C)	42,9	6,9	Хвостовой пик 3 N-2+фенилацетил, N-3 (N-A-A-C)	42,4	5,1
Хвостовой пик 4 N-3+фенилацетил	44,7	6,0	Хвостовой пик 4 N-3+фенилацетил	44,5	1,6
Общее содержание нецелевых олигонуклеотидов	39,8 – 54,7	49,5	Общее содержание нецелевых олигонуклеотидов	39,7 – 53,1	19,8

"Фенилацетил" означает продукт, полученный в результате реакции с окислительным реагентом

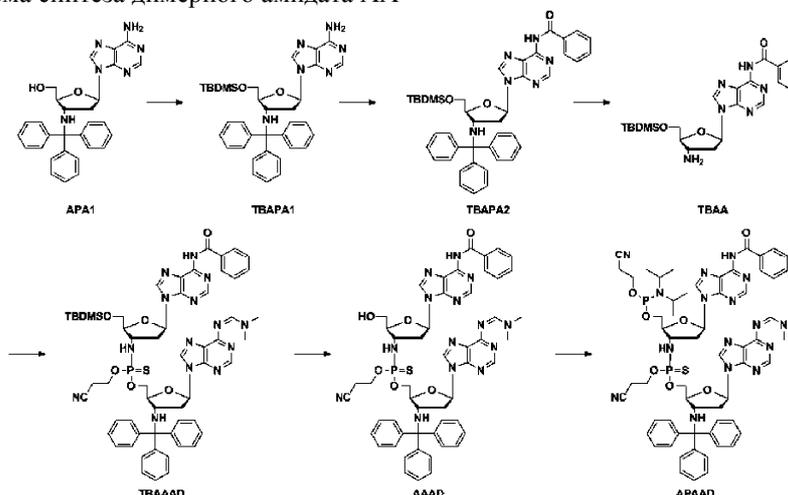
Синтез иметельстата с применением меньшего количества стадий связывания обеспечивает существенно более высокую чистоту и выход продукта полной длины. Выделение примесей обеспечивает более простую очистку иметельстата с меньшим количеством побочных продуктов, выходящих вблизи основного пика ВЭЖХ, с получением композиций, имеющих более высокую чистоту иметельстата. Такое улучшение является желательным для снижения стоимости продуктов производства иметельстата натрия, например, стоимость продуктов может быть снижена на 30-40% при реализации в производственном масштабе.

Схема 2. Схема синтеза димерного амидата GA



85 г TBAG получали из 300 г APG2 в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, по стадиям, представленным на схеме 2.

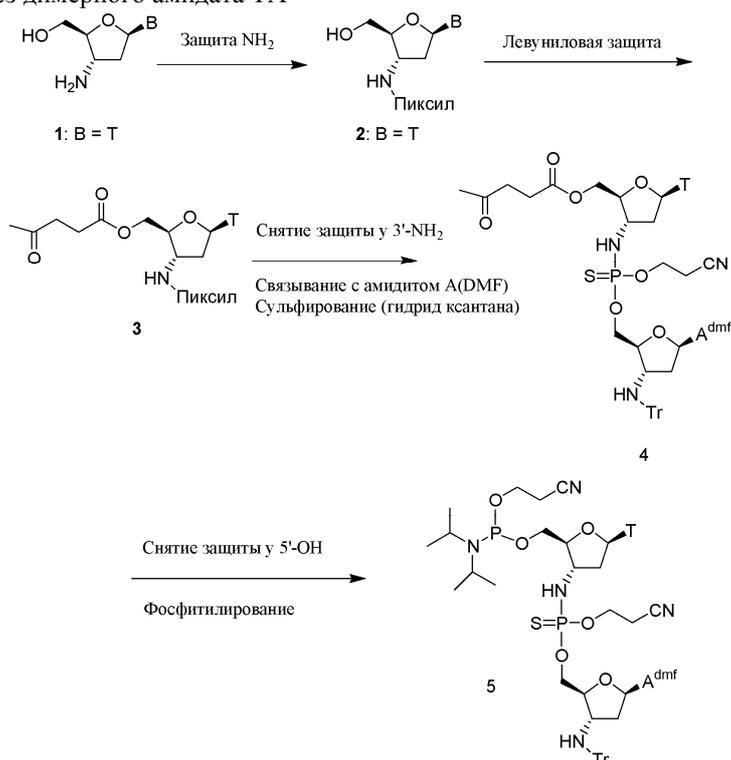
Схема 3. Схема синтеза димерного амидата AA



430 г TBAPA1 получали из 800 г неочищенного APA1 (чистота: 46%) в соответствии со способами,

описанными в настоящем документе, по стадиям, представленным на схеме 3.

Схема 4. Синтез димерного амидата ТА



Димерный амидат ТА (5) получали в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, по стадиям, представленным на схеме 4, в масштабе синтеза от 100 мг до 1 г.

Схема 5. Связывание и сульфирование во время синтеза димерного амидата

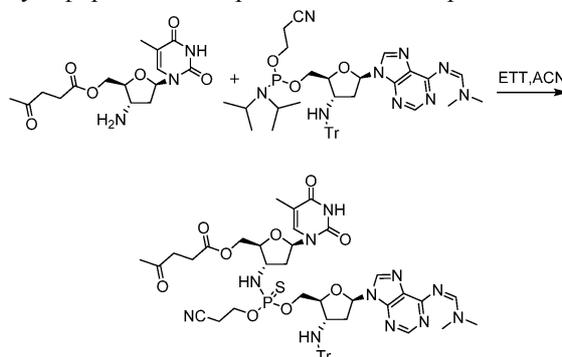


Таблица 9. Связывание и сульфирование во время синтеза димерного амидата

Ввод	Количество исходного материала	Мол. экв. реагентов	Тип и количество растворителя	Время реакции/температура	Расч. масс. выход	Анализ
1	100 мг	ЕТТ (1,0 экв.), гидрид ксантана (2,0 экв.), пиридин (1,5 мл)	ацетонитрил (5,0 мл)	комн. т-ра в течение 3+2 ч.	300 мг (неочищ.)	ЖХМС
2	100 мг	0,4 М ЕТТ (2,0 мл), гидрид ксантана (1,2 экв.), пиридин (2,0 мл)	неразбавленный	комн. т-ра в течение 3+2 ч.	350 мг (неочищ.)	ЖХМС

В соответствии со способами, описанными в настоящем документе, получали различные нуклеозидные мономеры, которые находят применение при получении димерных соединений.

Схема 6. Синтез левулинат-защищенных мономеров

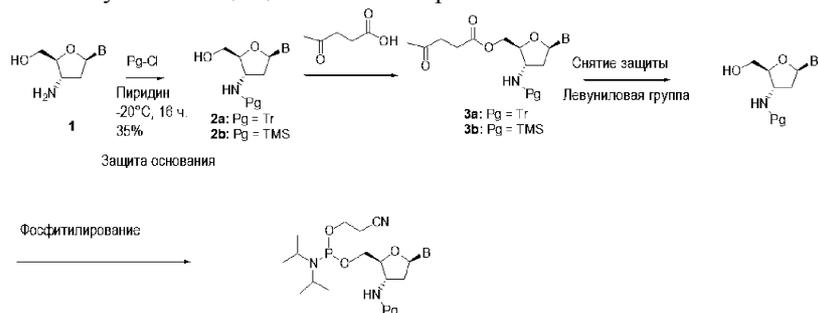


Схема 7. Синтез амидита А бис-ДМФА

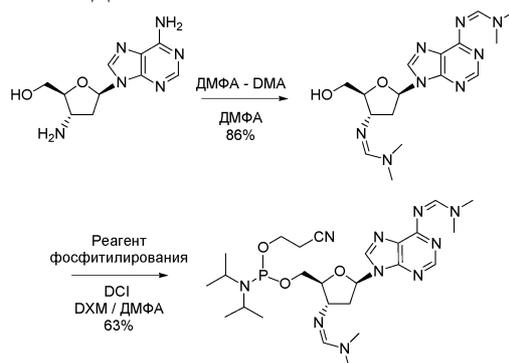
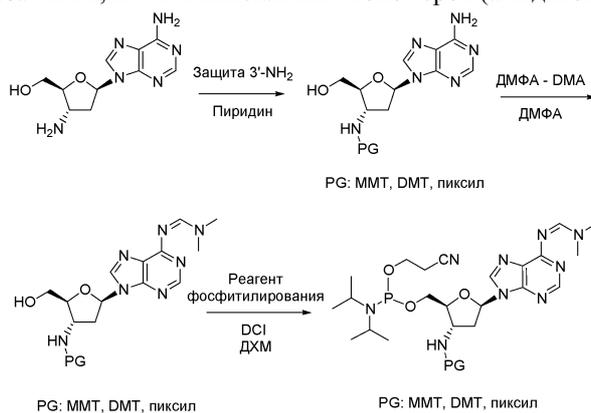


Схема 8. Схема синтеза ММТ, DMT и пиксильных мономеров (амидитов А)



	PG: ММТ, DMT, пиксил	PG: ММТ, DMT, пиксил
Амидит A ^{dmf} (ММТ)	3'- Монометокситрилами но-N ₆ - диметилформамидино- 2',3'- дидезоксиаденозин-5'- (2-цианозтил)-N,N- дизопропил- фосфорамидит	
Амидит A ^{dmf} (пиксил)	3'-(Диметил- замещенный пиксил)амино-N ₆ - диметилформамидино- 2',3'- дидезоксиаденозин-5'- (2-цианозтил)-N,N- дизопропил- фосфорамидит	
Амидит A ^{dmf} (DMT)	3'- Диметокситриламино- N ₆ - диметилформамидино- 2',3'- дидезоксиаденозин-5'- (2-цианозтил)-N,N- дизопропил- фосфорамидит	

Несмотря на то, что настоящее изобретение описано со ссылкой на конкретные варианты его реали-

зации, специалистам в данной области техники следует понимать, что в отношении них могут быть сделаны различные изменения, и они могут быть заменены эквивалентами без отклонения от принципиальной идеи и объема настоящего изобретения. Кроме того, могут быть сделаны многие модификации для адаптации конкретной ситуации, материала, состава вещества, способа, стадии или стадий способа в отношении задачи, общей идеи и объема настоящего изобретения. Все такие модификации считаются входящими в объем прилагаемой формулы изобретения.

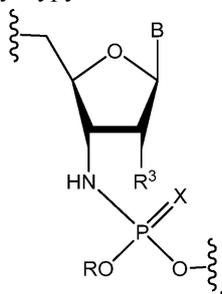
Все возможные комбинации указанных выше вариантов реализации считаются входящими в объем настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Неочищенная композиция-продукт синтеза, содержащая полинуклеотидное соединение, имеющее последовательность из N нуклеозидных субъединиц, при этом по меньшей мере две нуклеозидные субъединицы связаны N3'→P5' оксофосфорамидатной или N3'→P5' тиофосфорамидатной межсубъединичной связью, или его соль, и димер 3'-защищенный аминокдинуклеотид-фосфорамидат-5'-фосфорамидит,

при этом данная композиция содержит менее чем 1 часть на 10 частей по массе (N-1) продукта относительно указанного полинуклеотидного соединения или его соли, причем N равно 10 или более.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что нуклеозидные субъединицы указанного полинуклеотидного соединения независимо имеют структуру



где

B - пурин, защищенный пурин, пиримидин или защищенный пиримидин;

X - O или S;

R выбран из группы, состоящей из водорода и замещенного цианогруппой алкила; и

R³ - водород, причем

алкил - одновалентная насыщенная алифатическая углеводородная группа, содержащая от 1 до 10 атомов углерода.

3. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что N3'→P5' оксофосфорамидатная или N3'→P5' тиофосфорамидатная межсубъединичная связь представляет собой N3'→P5' тиофосфорамидатную межсубъединичную связь, имеющую структуру



где R выбран из группы, состоящей из водорода и замещенного цианогруппой алкила, или ее соли, где

алкил - одновалентная насыщенная алифатическая углеводородная группа, содержащая от 1 до 10 атомов углерода.

4. Композиция по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что полинуклеотид содержит последовательность, содержащую 13 или более нуклеозидных субъединиц.

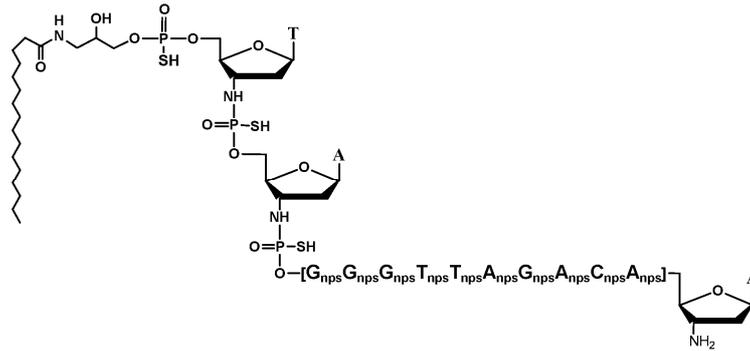
5. Композиция по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что полинуклеотид содержит от 10 до 50 последовательных нуклеозидных субъединиц.

6. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что все нуклеозидные субъединицы связаны N3'→P5' оксофосфорамидатными или N3'→P5' тиофосфорамидатными межсубъединичными связями.

7. Композиция по любому из пп.1-6, 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).

8. Композиция по любому из пп.1-7, отличающаяся тем, что полинуклеотид содержит концевую 3'-амино или 3'-гидроксильную группу.

9. Композиция по п.7, отличающаяся тем, что полинуклеотидное соединение имеет структуру

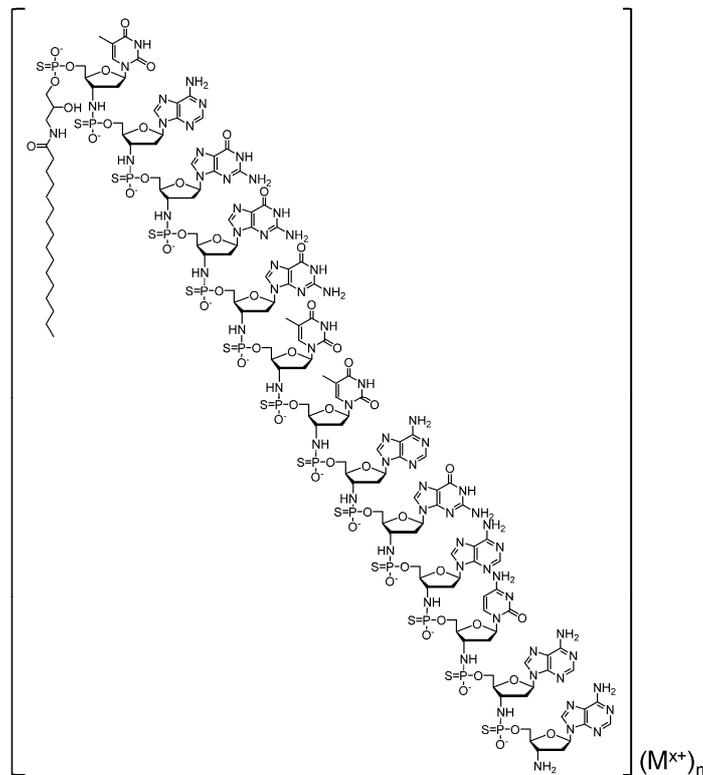


или его соль;

где "nps" представляет собой тиофосфорамидатную связь -NH-P(=O)(SH)-O- , связывающую 3'-атом углерода одного нуклеозида с 5'-атомом углерода соседнего нуклеозида.

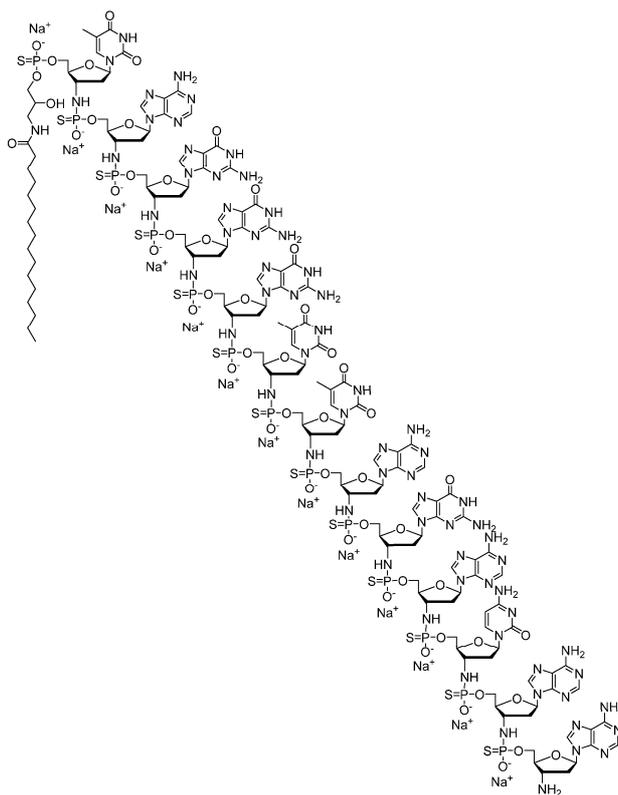
10. Композиция по п.9, отличающаяся тем, что соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль.

11. Композиция по п.7, отличающаяся тем, что полинуклеотидное соединение имеет структуру



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

12. Композиция по п.7, отличающаяся тем, что полинуклеотидное соединение имеет структуру



13. Композиция по любому из пп.1-12, имеющая менее чем 1 часть на 15 частей по массе (N-1) продукта относительно указанного полинуклеотидного соединения.

14. Композиция по п.13, имеющая менее чем 1 часть на 20 частей по массе (N-1) продукта относительно указанного полинуклеотидного соединения.

15. Композиция по п.13, имеющая менее чем 1 часть на 25 частей по массе (N-1) продукта относительно указанного полинуклеотидного соединения.

16. Композиция по любому из пп.1-15, имеющая менее чем 1 часть на 10 частей по массе любого (N-x) продукта относительно указанного полинуклеотидного соединения, где x в (N-x) представляет собой число от 1 до (N-1).

17. Композиция по п.16, имеющая менее чем 40 частей на 100 частей по совокупной массе всех (N-x) полинуклеотидсодержащих продуктов относительно указанного полинуклеотидного соединения, где x в (N-x) представляет собой число от 1 до (N-1).

18. Композиция по любому из пп.1-12, имеющая следующий профиль (N-x) полинуклеотидсодержащих продуктов, где x в (N-x) представляет собой число от 1 до (N-1):

менее чем 1 часть на 10 частей по массе (N-1) продукта относительно указанного полинуклеотидного соединения;

по меньшей мере 10 частей на 100 частей по массе (N-2) и (N-3) продуктов относительно указанного полинуклеотидного соединения.

044343

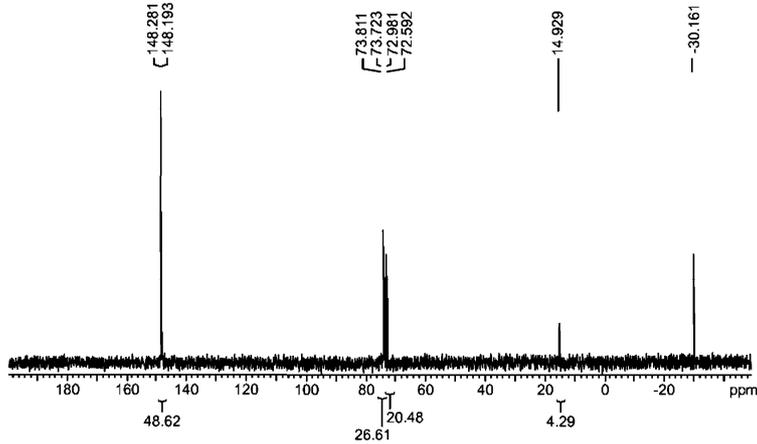


Таблица результатов (без расчета – колонка 0813 ARTA – канал 1)

	Время удерживания [мин.]	Площадь [мВ.с]	Высота [мВ]	Площадь [%]
1	3,557	926,835	32,478	2,2
2	4,853	248,330	7,706	0,6
3	5,427	430,800	12,110	1,0
4	8,593	12,505	0,485	0,0
5	10,503	30344,332	839,556	73,4
6	11,120	9320,006	331,485	22,6
7	14,610	41,645	1,230	0,1
	Всего	41324,453	1225,050	100,0

Фиг. 1А

522-961-891
Последовательность импульсов: s2ru1



Фиг. 1В

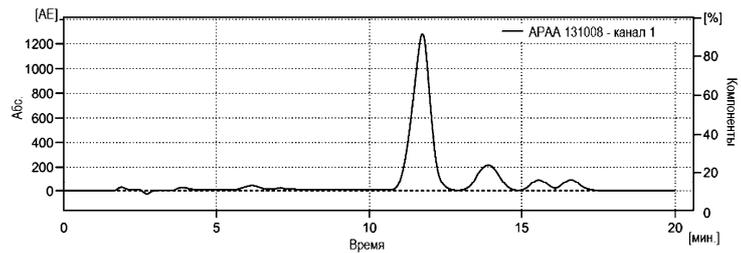


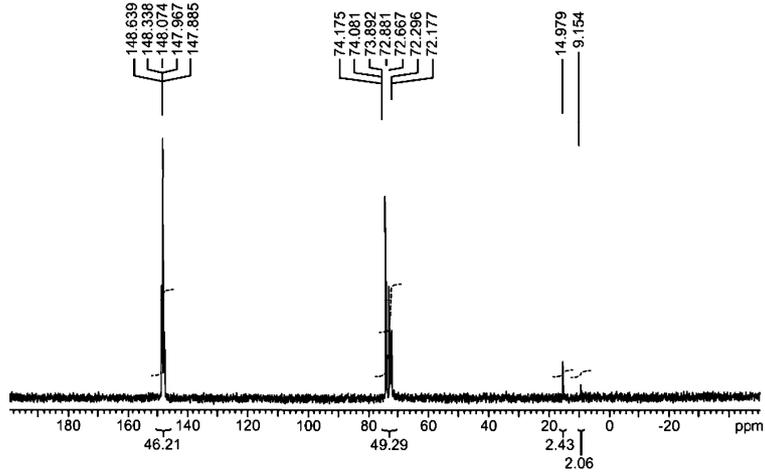
Таблица результатов (без расчета – АРАА 131008 – канал 1)

	Время удерживания [мин.]	Площадь [мВ.с]	Высота [мВ]	Площадь [%]
1	3,890	683,024	21,161	0,9
2	6,157	1547,356	37,841	2,1
3	7,043	832,950	15,650	1,1
4	9,713	33,979	0,981	0,0
5	11,740	53142,367	1282,119	71,5
6	13,903	10883,314	214,185	14,6
7	15,543	3501,138	93,342	4,7
8	16,587	3742,492	93,843	5,0
	Всего	74366,620	1759,121	100,0

Фиг. 2А

044343

530-036-602_ARAA
Последовательность импульсов: s2pu1



Фиг. 2В

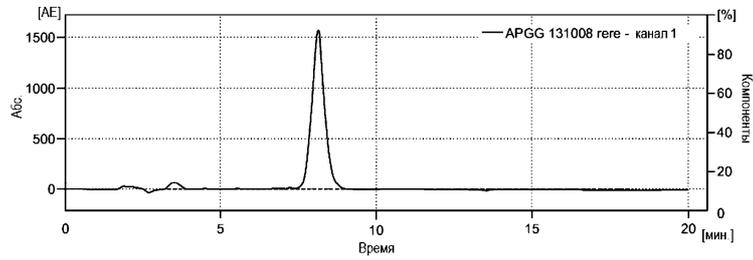
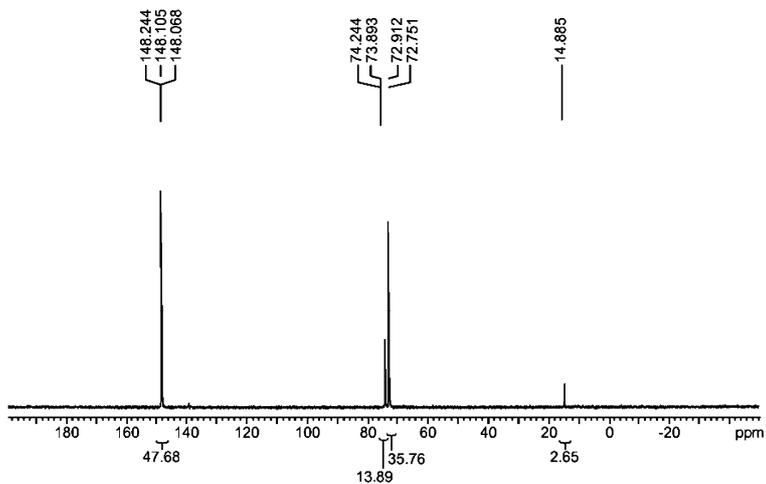


Таблица результатов (без расчета – APGG 131008 gere – канал 1)

	Время удерживания [мин.]	Площадь [мВ.с]	Высота [мВ]	Площадь [%]
1	3,530	1726,515	70,546	3,6
2	4,473	167,636	5,052	0,3
3	5,543	111,014	4,805	0,2
4	6,220	84,336	3,982	0,2
5	7,487	387,810	16,415	0,8
6	8,120	45390,847	1580,744	94,5
7	10,147	31,679	1,149	0,1
8	11,213	111,591	3,775	0,2
	Всего	48011,427	1686,468	100,0

Фиг. 3А

530-036-612 APGG
Последовательность импульсов: s2pu1



Фиг. 3В

044343

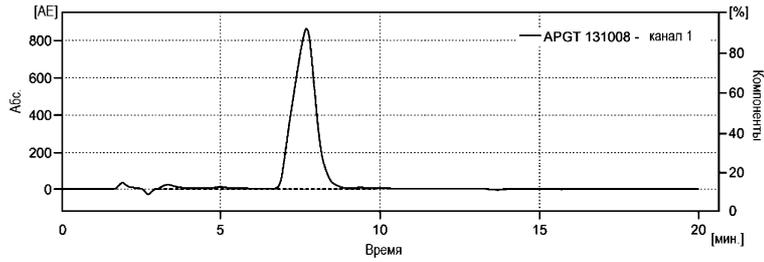
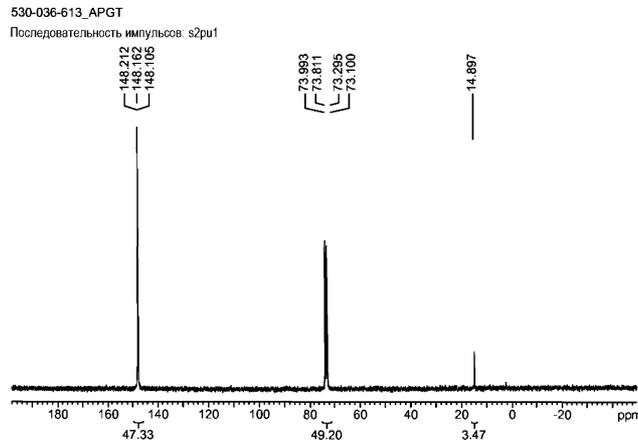


Таблица результатов (без расчета – APTG 131008 – канал 1)

	Время удерживания [мин.]	Площадь [мВ.с]	Высота [мВ]	Площадь [%]
1	3,333	944,000	23,530	2,1
2	4,980	412,032	9,308	0,9
3	5,543	321,186	6,399	0,7
4	7,650	42081,239	864,466	95,3
5	9,353	388,891	5,485	0,9
	Всего	44147,348	909,188	100,0

Фиг. 4А



Фиг. 4В

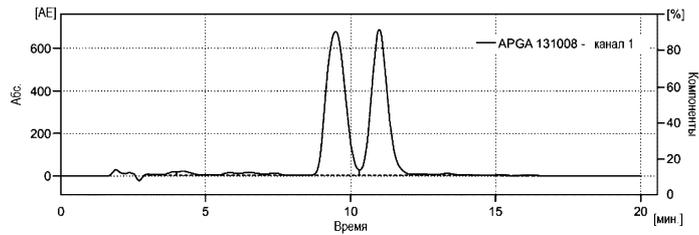


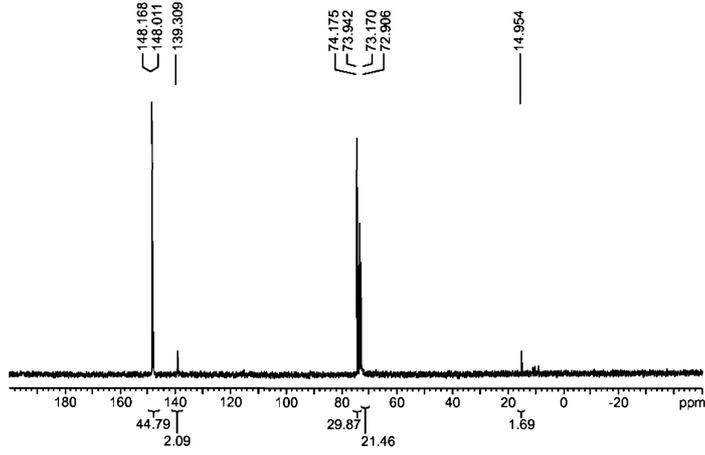
Таблица результатов (без расчета – APTG 131008 – канал 1)

	Время удерживания [мин.]	Площадь [мВ.с]	Высота [мВ]	Площадь [%]
1	3,940	244,344	14,351	0,4
2	4,233	539,181	16,577	0,9
3	5,843	297,336	10,208	0,5
4	6,467	496,091	13,150	0,8
5	7,343	245,806	7,818	0,4
6	9,463	30522,359	670,507	51,8
7	10,980	26153,247	679,925	44,4
8	13,297	157,913	5,393	0,3
9	15,070	90,029	2,819	0,2
10	16,083	106,327	2,935	0,2
	Всего	58870,634	1423,682	100,0

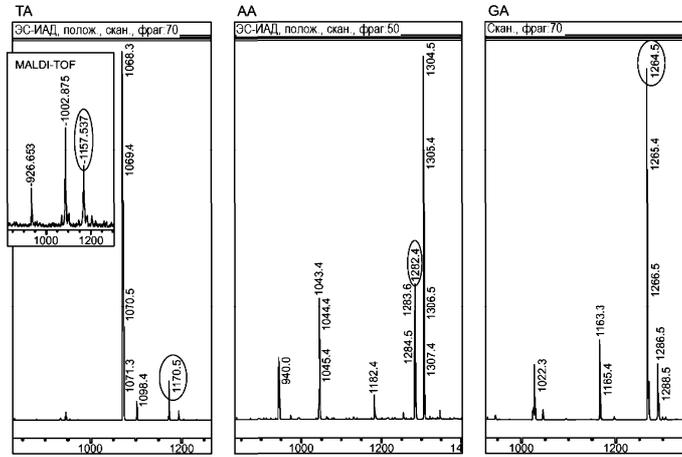
Фиг. 5А

044343

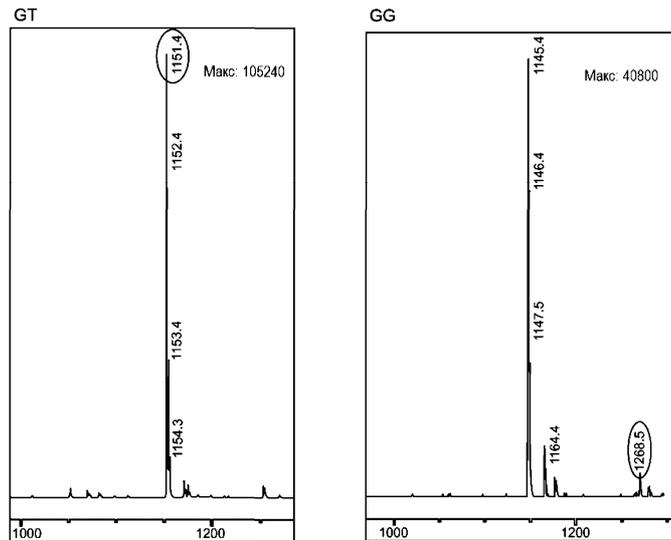
530-036-606 APGA
Последовательность импульсов: s2ри1



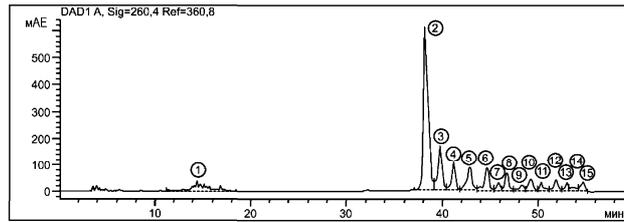
Фиг. 5В



Фиг. 6А



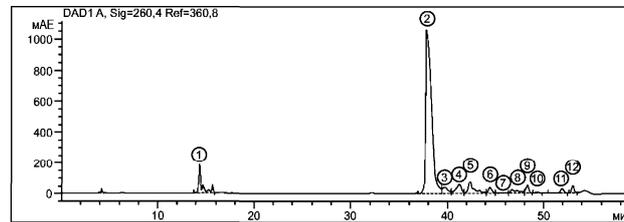
Фиг. 6В



Сигнал 1: DAD1 A, Sig=260, 4 Ref=360,8

№ пика	Вр. удерж. [мин.]	Тип	Ширина [мин.]	Площадь [мАЕ·с]	Высота [мАЕ]	Площадь %
1	14.351	MM	1.3428	3049.04346	37.84385	6.1692
2	38.185	MF	0.6051	2.19306e4	604.03412	44.3729
3	39.756	MF	0.5388	5442.11719	168.33372	11.0112
4	41.191	MF	0.4944	3088.60327	104.45593	6.2695
5	42.867	MF	0.6396	3392.55371	83.39773	6.8643
6	44.667	MF	0.5744	2941.21948	85.34209	5.9511
7	45.869	MF	0.4522	756.01624	27.86593	1.5297
8	46.732	MF	0.4561	1895.68347	69.27336	3.8356
9	48.335	MF	0.5734	743.65094	21.61706	1.5047
10	49.248	MF	0.5933	1568.34546	44.05754	3.1733
11	50.315	MF	0.4816	928.79987	32.14064	1.8793
12	51.866	MF	0.5346	1350.28284	42.09404	2.7321
13	53.023	MF	0.3815	750.43585	32.78460	1.5184
14	53.607	MF	0.7460	613.24054	13.69989	1.2408
15	54.707	FM	0.5027	962.75043	31.92237	1.9480
Всего:				4.94233e4	1403.86277	

Фиг. 7



Сигнал 1: DAD1 A, Sig=260, 4 Ref=360,8

№ пика	Вр. удерж. [мин.]	Тип	Ширина [мин.]	Площадь [мАЕ·с]	Высота [мАЕ]	Площадь %
1	14.297	MM	0.3289	3623.52319	183.63403	6.1565
2	37.881	MF	0.6886	4.35741e4	1054.70142	74.0343
3	39.764	FM	0.6084	1453.00427	39.80315	2.4687
4	41.269	FM	0.6541	2267.20410	57.76622	3.8521
5	42.377	MF	0.6595	3004.52759	75.93487	5.1048
6	44.469	FM	0.4059	953.07678	39.13720	1.6193
7	45.981	FM	0.6801	134.64066	3.29974	0.2288
8	46.754	MF	0.8563	1150.84033	22.39912	1.9553
9	48.331	FM	0.3501	1082.63159	51.54351	1.8394
10	49.313	MM	0.4398	186.19765	7.05598	0.3164
11	51.937	MM	0.4624	659.89532	23.78648	1.1212
12	53.050	MM	0.2866	766.97327	44.60481	1.3031
Всего:				5.88566e4	1603.66652	

Фиг. 8

