

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 270**

51 Int. Cl.:

C07H 21/00 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.04.2016 PCT/US2016/028657**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016 WO16172346**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2016 E 16720636 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3286203**

54 Título: **Métodos de preparación de polinucleótidos usando composiciones de sales de catiónicas multivalentes**

30 Prioridad:

23.04.2015 US 201562151891 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.12.2020

73 Titular/es:

**GERON CORPORATION (100.0%)
919 E. Hillsdale Blvd.
Foster City, CA 94404, US**

72 Inventor/es:

RAMIYA, PREMCHANDRAN, H.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 798 270 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos de preparación de polinucleótidos usando composiciones de sales de catiónicas multivalentes

5 Introducción

La química de los polímeros de ácido nucleico ha desempeñado un papel en muchas tecnologías en desarrollo en los campos farmacéutico, diagnóstico y analítico, y más particularmente en los subcampos de terapias antisentido y antigénicas, química combinatoria, amplificación de señal de ADN ramificado y diagnóstico y análisis de ADN con base en una matriz. Parte de esta química de polímeros se ha dirigido a mejorar la fuerza de unión, la especificidad y la resistencia a las nucleasas de los polímeros de ácidos nucleicos naturales, tal como el ADN. Los enlaces entre nucleósidos de ácido nucleico peptídico (PNA), fosforotioato, metilfosfonato y fosforamidato son ejemplos de algunas químicas de polímeros que se han aplicado a polinucleótidos para proporcionar una o más propiedades deseables, tal como resistencia a nucleasas, absorción celular y solubilidad.

Los fosforamidatos N3'→P5' en el polinucleótido pueden formar dúplex estables con cadenas complementarias de ADN y ARN, así como triplex estables con dúplex de ADN, y son resistentes a las nucleasas. Los tiofosforamidatos N3'→P5' en el polinucleótido han encontrado uso como agentes antisentido potentes tanto *in vitro* como *in vivo*. Los compuestos que contienen polinucleótidos que inhiben la actividad de la telomerasa pueden usarse para tratar trastornos mediados por la telomerasa, tal como el cáncer, ya que las células cancerosas expresan la actividad de telomerasa y las células somáticas humanas normales no poseen actividad de telomerasa a niveles biológicamente relevantes. Como tal, los métodos de preparación y aislamiento de tales polinucleótidos son de interés.

El documento WO 2005/023994 describe oligonucleótidos modificados para la inhibición de la telomerasa. Sawadogo et al., Nucl. Acids Res., Vol. 19, No. 3, página 674 (1991) describe un método para la purificación de oligodesoxinucleótidos desprotegidos. El documento WO 2008/127305 describe un método para aislar biomacromoléculas usando pH bajo y cationes divalentes. El documento WO 2015/168310 describe composiciones de oligonucleótidos y métodos que hacen lo mismo. El documento WO 2012/021985 describe complejos de quelatos de oligonucleótidos de iones metálicos divalentes y oligonucleótidos.

30 Resumen

Los aspectos de la divulgación incluyen métodos para la preparación de un polinucleótido. En algunas realizaciones, el método incluye poner en contacto una primera composición polinucleotídica que incluye: un polinucleótido que tiene una secuencia de 7 o más subunidades de nucleósidos en la que al menos dos de las subunidades de nucleósidos están unidas por un enlace entre subunidades de tiofosforamidato N3'→P5'; y productos sintéticos no objetivo y reactivos; con una sal catiónica multivalente para precipitar una primera sal polinucleotídica que incluye al menos un contraión catiónico multivalente; y separar la sal polinucleotídica de la primera composición polinucleotídica contactada para producir una segunda composición polinucleotídica que incluye la primera sal polinucleotídica. En ciertas realizaciones, el método incluye además poner en contacto la primera sal polinucleotídica con un soporte de cromatografía de fase inversa; y eluir del soporte cromatográfico una tercera composición polinucleotídica que incluye una segunda sal polinucleotídica. También se proporcionan composiciones que incluyen una sal del polinucleótido que incluye al menos un contraión catiónico multivalente. En algunas realizaciones, al menos un contraión catiónico multivalente se selecciona del grupo que consiste en magnesio, zinc, aluminio y calcio.

45 Breve descripción de las figuras

El experto en la técnica comprenderá que los dibujos, descritos a continuación, son solo para fines ilustrativos. Los dibujos no pretenden limitar el alcance de las presentes enseñanzas de ninguna manera.

La Figura 1 muestra cromatogramas de HPLC de Imetelstat-Mg en soluciones de NaCl 1 M a una variedad de valores de pH.

La Figura 2 representa los resultados de un análisis elemental de Imetelstat sódico tratado con una variedad de sales. La Figura 3 representa los resultados de un análisis elemental de Imetelstat sódico tratado con equivalentes crecientes de sal de cloruro de magnesio.

La Figura 4 representa los resultados de un análisis elemental de Imetelstat TEA tratado con equivalentes crecientes de sal de cloruro de magnesio.

60 Definiciones

Antes de describir ejemplos de realizaciones con mayor detalle, se exponen las siguientes definiciones para ilustrar y definir el significado y el alcance de los términos usados en la descripción.

Los siguientes términos tienen los siguientes significados a menos que se indique lo contrario. Cualquier término indefinido tiene su significado reconocido en la técnica.

Como se usa en el presente documento, los términos polinucleótido y oligonucleótido se usan indistintamente para referirse a un compuesto que contiene una pluralidad de subunidades de fracciones de nucleósidos o residuos de nucleósidos que están unidos por uniones internucleosídicas o enlaces entre nucleósidos. Siempre que un polinucleótido esté representado por una secuencia de letras, tales como "ATGUCCTG", se entiende que los nucleótidos están en el orden 5'→3' de izquierda a derecha y que "A" denota desoxiadenosina, "C" denota desoxicitidina "G" denota desoxiguanosina, "T" denota timidina y "U" denota desoxiuridina, a menos que se indique lo contrario.

Como se usa en el presente documento, "nucleósido" incluye los nucleósidos naturales, incluidas las formas 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, como se describe en Kornberg y Baker, DNA Replication, 2a Ed. (Freeman, San Francisco, 1992). Los "análogos" en referencia a nucleósidos incluyen nucleósidos sintéticos que tienen fracciones de bases modificadas y/o fracciones de azúcares modificados, por ejemplo, descrito generalmente por Scheit, Nucleotide Analogs (John Wiley, Nueva York, 1980). Dichos análogos incluyen nucleósidos sintéticos diseñados para mejorar las propiedades de unión, por ejemplo, estabilidad, especificidad o similares, tal como se describe por Uhlmann y Peyman (Chemical Reviews, 90: 543-584, 1990). En algunas realizaciones, un nucleósido o análogo de nucleósido incluye un grupo hidroxilo 3' o un grupo amino 3'.

Los términos "base" y "nucleobase" se usan indistintamente y se definen en el presente documento para incluir (i) bases convencionales de ADN y ARN (uracilo, timina, adenina, guanina y citosina), y (ii) bases modificadas o análogos de bases (por ejemplo, 5-metil-citosina, 5-bromouracilo o inosina). Un análogo de base es un compuesto químico cuya estructura molecular imita la de una base convencional de ADN o ARN.

Como se usa en el presente documento, "pirimidina" significa las pirimidinas que se encuentran en nucleósidos naturales, que incluyen citosina, timina y uracilo, y análogos comunes de los mismos, tales como aquellos que contienen sustituyentes oxi, metilo, propinilo, metoxi, hidroxilo, amino, tio, halo y similares. El término como se usa en el presente documento incluye además pirimidinas con grupos protectores comunes unidos, tales como N4-benzoilcitosina. Otros grupos protectores de pirimidina de interés incluyen, pero no se limitan a, aquellos grupos protectores descritos por Beaucage y Iyer, Tetrahedron 48: 2223-2311 (1992).

Como se usa en el presente documento, "purina" significa las purinas que se encuentran en nucleósidos naturales, incluyendo adenina, guanina e hipoxantina, y análogos comunes de los mismos, tales como las que contienen sustituyentes oxi, metilo, propinilo, metoxi, hidroxilo, amino, tio, halo y similares. El término tal como se usa en el presente documento incluye además purinas con grupos de protección comunes unidos, tales como N2-benzoilguanina, N2-isobutirilguanina, N6-benzoiladenina y similares. Otros grupos protectores comunes de purinas son descritos por Beaucage y Iyer, Tetrahedron 48: 2223-2311 (1992). Como se usa en el presente documento, el término "protegido" como componente de un nombre químico se refiere a grupos de protección reconocidos en la técnica para una fracción particular de un compuesto, por ejemplo, "Hidroxilo protegido en 5'" en referencia a un nucleósido incluye trifenilmetilo (es decir, tritilo), p-anisildifenilmetilo (es decir, monometoxitritilo o MMT), di-p-anisilfenilmetilo (es decir, dimetoxitritilo o DMT), y similares; y una nucleobase protegida en referencia a una nucleobase que incluye un heteroátomo protegido con un grupo tal como dimetilaminoformamida (DMF), benzoilo (Bz), isobutirilo y similares. Los grupos protectores reconocidos en la técnica incluyen aquellos descritos en las siguientes referencias: Gait, editor, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1984); Amarnath y Broom, Chemical Reviews, 77: 183-217, 1977; Pon et al., Biotechniques, 6: 768-775, 1988; Ohtsuka et al., Nucleic Acids Research, 10: 6553-6570, 1982; Eckstein, editor, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1991), Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Second Edition, (John Wiley & Sons, Nueva York, 1991), Narang, editor, Synthesis and Applications of DNA and RNA (Academic Press, New York, 1987), Beaucage y Iyer, Tetrahedron 48: 2223-2311 (1992), y referencias similares.

Como se usa en este documento, "tiofosforamidato N3'→P5' en el polinucleótido" significa un oligómero, generalmente lineal, de subunidades de nucleósidos unidas por al menos un enlace de tiofosforamidato N3'→P5'. En términos generales, las subunidades de nucleósidos comprenden nucleósidos o análogos de nucleósidos, pero también pueden comprender fracciones más generales que tienen una química compatible, tales como azúcares abásicos y otras fracciones hidrocarbonadas, tal como se describe en las siguientes referencias: 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); el documento WO 93/06122; el documento WO 91/07092; Durand et al., Nucleic Acids Research, 18: 6353-6359 (1990); Salunkhe et al., J. Am. Chem. Soc., 114: 8768-8772 (1992); y similares. En algunos casos, el término significa un polinucleótido en el que todos los enlaces entre nucleósidos se reemplazan por enlaces tiofosforamidato N3'→P5'. Como tal, el término comprende oligómeros parcial y totalmente "amidados". En algunos casos, el término significa un polinucleótido en el que todos los enlaces entre nucleósidos se reemplazan por enlaces tiofosforamidato N3'→P5' y en el que las subunidades de nucleósidos son los nucleósidos naturales o análogos de los mismos. Un tiofosforamidato N3'→P5' en el polinucleótido objetivo en el que cada enlace es un enlace de tiofosforamidato N3'→P5' ("completamente amidado") puede estar incrustado en o unido a otros oligonucleótidos o polinucleótidos para formar un oligómero más grande que está "parcialmente amidado". "Un tiofosforamidato N3'→P5' en el polinucleótido objetivo puede incluir cualquier grupo terminal conveniente 3' y/o 5'. En algunas realizaciones, el tiofosforamidato N3'→P5' en el polinucleótido incluye un grupo terminal hidroxilo 3' o un grupo terminal amino 3'.

Como se usa en el presente documento, los términos "fosfato" y "grupo fosfato" pretenden abarcar un grupo tiofosfato y un grupo oxofosfato.

Como se usa en el presente documento, el término "grupo amino de fosforamida" se refiere al grupo amino, $-NR^4R^5$, unido al átomo de fósforo de un grupo fosforamida, y el término "nitrógeno de fosforamida" se refiere al átomo de nitrógeno del grupo amino de fosforamida.

"Alquilo" se refiere a grupos hidrocarbilo alifáticos saturados monovalentes que tienen de 1 a 10 átomos de carbono y tal como 1 a 6 átomos de carbono (por ejemplo, "un alquilo de 1 a 6 átomos de carbono"), o 1 a 5 (por ejemplo, "un alquilo de 1 a 5 átomos de carbono"), o de 1 a 4 (por ejemplo, "un alquilo de 1 a 4 átomos de carbono"), o de 1 a 3 átomos de carbono (por ejemplo, "un alquilo de 1 a 3 átomos de carbono") Este término incluye, a modo de ejemplo, grupos hidrocarbilo lineales y ramificados tales como metilo (CH_3-), etilo (CH_3CH_2-), n-propilo ($CH_3CH_2CH_2-$), isopropilo ($(CH_3)_2CH-$), n-butilo ($CH_3CH_2CH_2CH_2-$), isobutilo ($(CH_3)_2CHCH_2-$), sec-butilo ($(CH_3)(CH_3CH_2)CH-$), t-butilo ($(CH_3)_3C-$), n-pentilo ($CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2-$) y neopentilo ($(CH_3)_3CCH_2-$).

El término "alquilo sustituido" se refiere a un grupo alquilo como se define en el presente documento en el que uno o más átomos de carbono en la cadena alquilo se han reemplazado opcionalmente con un heteroátomo tal como -O-, -N-, -S-, $-S(O)_n-$ (en el que n es 0 a 2), -NR- (en el que R es hidrógeno o alquilo) y que tiene de 1 a 5 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alcoxi, alcoxi sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, aminoacilo, aminoaciloxi, oxiaminoacilo, azido, ciano, halógeno, hidroxilo, oxo, tioceto, carboxilo, carboxilalquilo, tioariloxi, tioheteroariloxi, tioheterociclooxi, tiol, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclilo, heterociclooxi, hidroxiamino, alcoxiamino, nitro, -SO-alquilo, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO₂-alquilo, -SO₂-arilo, -SO₂-heteroarilo, y $-NR^aR^b$, en el que R^a y R^b pueden ser iguales o diferentes y se eligen entre hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, ciclo alquilo, alqueno, cicloalqueno, alquinilo, arilo, heteroarilo y heterocíclico. En algunos casos, un "alquilo sustituido" se refiere a un grupo alquilo como se define en el presente documento que tiene de 1 a 5 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alcoxi, cicloalquilo, cicloalqueno, acilo, acilamino, aciloxi, amino, aminoacilo, aminoaciloxi, oxiaminoacilo, azido, ciano, halógeno, hidroxilo, carboxilo, carboxilalquilo, tiol, tioalcoxi, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclilo, heterociclooxi, sulfonamido y $-NR^aR^b$, en el que R^a y R^b pueden ser iguales o diferentes y se eligen entre hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, alquinilo, arilo, heteroarilo y heterocíclico.

"Alcoxi" se refiere al grupo -O-alquilo, en el que alquilo es como se define en el presente documento. Alcoxi incluye, a modo de ejemplo, metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, t-butoxi, sec-butoxi, n-pentoxi y similares. El término "alcoxi" también se refiere a los grupos alquenoil-O-, cicloalquenoil-O-, cicloalquenoil-O- y alquinil-O-, en los que alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno y alquinilo son como se definen en el presente documento.

El término "alcoxi sustituido" se refiere a los grupos alquil-O- sustituido, alquenoil-O- sustituido, cicloalquil-O- sustituido, cicloalquenoil-O- sustituido y alquinil-O- sustituido en los que alquilo sustituido, alqueno sustituido, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno sustituido y alquinilo sustituido son como se definen en el presente documento.

"Acilo" se refiere a los grupos HC(O)-, alquil-C(O)-, alquil-C(O)- sustituido, alquenoil-C(O)-, alquenoil-C(O)- sustituido, alquinil-C(O)-, alquinil-C(O)- sustituido, cicloalquil-C(O)-, cicloalquil-C(O)- sustituido, cicloalquenoil-C(O)-, cicloalquenoil-C(O)- sustituido, aril-C(O)-, aril-C(O)- sustituido, heteroaril-C(O)-, heteroaril-C(O)- sustituido, heterociclil-C(O)- y heterociclil-C(O) sustituido, en los que alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico y heterocíclico sustituido son como se definen en el presente documento. Por ejemplo, acilo incluye el grupo "acetilo" $CH_3C(O)-$.

El término "amino sustituido" se refiere al grupo -NRR en el que cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, heteroarilo y heterociclilo, siempre que al menos un R no sea hidrógeno.

"Halo" o "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

"Hidroxi" o "hidroxilo" se refiere al grupo -OH.

"Heteroarilo" se refiere a un grupo aromático de 1 a 15 átomos de carbono, tal como de 1 a 10 átomos de carbono y 1 a 10 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre dentro del anillo. Dichos grupos heteroarilo pueden tener un único anillo (tal como piridinilo, imidazolilo o furilo) o múltiples anillos condensados en un sistema de anillo (por ejemplo, como en grupos tales como indolizínilo, quinolinilo, benzofurano, bencimidazolilo o benzotienilo), en el que al menos uno anillo dentro del sistema de anillos es aromático, siempre que el punto de unión sea a través de un átomo de un anillo aromático. En ciertas realizaciones, el átomo o átomos de nitrógeno y/o azufre del anillo del grupo heteroarilo se oxidan opcionalmente para proporcionar las fracciones N-óxido ($N \rightarrow O$), sulfínico o sulfónico. Este término incluye, a modo de ejemplo, piridinilo, pirrolilo, indolilo, tiofenilo y furanilo. A menos que este limitado por la definición para el sustituyente heteroarilo, dichos grupos heteroarilo pueden estar

opcionalmente sustituidos con 1 a 5 sustituyentes, o de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de aciloxi, hidroxilo, tiol, acilo, alquilo, alcoxi, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo sustituido, alcoxi sustituido, alqueno sustituido, alquino sustituido, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno sustituido, amino, amino sustituido, aminoacilo, acilamino, alcarilo, arilo, ariloxi, azido, carboxilo, carboxilalquilo, ciano, halógeno, nitro, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclo, heterociclooxi, aminoaciloxi, oxiacilamino, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, tioariloxi, tioheteroariloxi, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO₂-alquilo, -SO₂-alquilo sustituido, -SO₂-arilo y -SO₂-heteroarilo, y trihalometilo. En tales casos, un grupo heteroarilo que está sustituido con 1 a 5 sustituyentes (por ejemplo, como se describe en el presente documento) se denomina como un "heteroarilo sustituido".

"Heterociclo", "heterocíclico", "heterocicloalquilo" y "heterociclilo" se refieren a un grupo saturado o insaturado que tiene un solo anillo o múltiples anillos condensados, que incluyen sistemas de anillos fusionados con puentes y espiro, y que tienen de 3 a 20 átomos por anillo, incluidos 1 a 10 heteroátomos. Estos átomos del anillo se seleccionan del grupo que consiste en nitrógeno, azufre u oxígeno, en el que, en los sistemas de anillos fusionados, uno o más de los anillos pueden ser cicloalquilo, arilo o heteroarilo, siempre que el punto de unión sea a través del anillo no aromático. En ciertas realizaciones, el átomo o átomos de nitrógeno y/o azufre del grupo heterocíclico se oxidan opcionalmente para proporcionar las fracciones N-óxido, -S(O)- o -SO₂-.

Los ejemplos de heterociclos y heteroarilos incluyen, pero sin limitación, azetidina, pirrol, imidazol, pirazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, dihidroindol, indazol, purina, quinolizina, isoquinolina, quinolina ftalazina, naftilpiridina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, fenantrolina, isotiazol, fenazina, isoxazol, fenoxazina, fenotiazina, imidazolidina, imidazolina, piperidina, piperazina, indolina, ftalimida, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofeno, tiazol, tiazolidina, tiofeno, benzo[b]tiofeno, morfolinilo, tiomorfolinilo (también conocido como tiamorfolinilo), 1,1-dioxotiomorfolinilo, piperidinilo, pirrolidina, tetrahidrofurano y similares.

A menos que este limitado por la definición para el sustituyente heterocíclico, dichos grupos heterocíclicos pueden estar opcionalmente sustituidos con 1 a 5, o de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados de alcoxi, alcoxi sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, amino sustituido, aminoacilo, aminoaciloxi, oxiacilamino, azido, ciano, halógeno, hidroxilo, oxo, tioceto, carboxilo, carboxilalquilo, tioariloxi, tioheteroariloxi, tioheterociclooxi, tiol, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclilo, heterociclooxi, hidroxiamino, alcoxiamino, nitro, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO₂-alquilo, -SO₂-alquilo sustituido, -SO₂-arilo -SO₂-heteroarilo y heterociclo fusionado.

"Nitro" se refiere al grupo -NO₂.

"Oxo" se refiere al átomo (=O).

"Tiol" se refiere al grupo -SH.

"Tioxo" o el término "tioceto" se refiere al átomo (=S).

Además de la descripción en el presente documento, el término "sustituido", cuando se usa para modificar un grupo o radical especificado, también puede significar que uno o más átomos de hidrógeno del grupo o radical especificado sean cada uno, independientemente entre sí, reemplazados con los mismos o diferentes grupos sustituyentes como se define a continuación.

Además de los grupos descritos con respecto a los términos individuales en el presente documento, los grupos sustituyentes para sustituir uno o más hidrógenos (cualquiera de los dos hidrógenos en un solo carbono puede reemplazarse con =O, =NR⁷⁰, =N-OR⁷⁰, =N₂ o =S) en el grupo o radical especificado son, a menos que se especifique lo contrario, -R⁶⁰, halo, =O, -OR⁷⁰, -SR⁷⁰, -NR⁸⁰R⁸⁰, trihalometilo, -CN, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -SO₂R⁷⁰, -SO₂O-M⁺, -SO₂OR⁷⁰, -OSO₂R⁷⁰, -OSO₂O-M⁺, -OSO₂OR⁷⁰, -P(O)(O⁻)₂(M⁺)₂, -P(O)(OR⁷⁰)O-M⁺, -P(O)(OR⁷⁰)₂, -C(O)R⁷⁰, -C(S)R⁷⁰, -C(NR⁷⁰)R⁷⁰, -C(O)O-M⁺, -C(O)OR⁷⁰, -C(S)OR⁷⁰, -C(O)NR⁸⁰R⁸⁰, -C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰, -OC(O)R⁷⁰, -OC(S)R⁷⁰, -OC(O)O-M⁺, -OC(O)OR⁷⁰, -OC(S)OR⁷⁰, -NR⁷⁰C(O)R⁷⁰, -NR⁷⁰C(S)R⁷⁰, -NR⁷⁰CO₂-M⁺, -NR⁷⁰CO₂R⁷⁰, -NR⁷⁰C(S)OR⁷⁰, -NR⁷⁰C(O)NR⁸⁰R⁸⁰, -NR⁷⁰C(NR⁷⁰)R⁷⁰ y -NR⁷⁰C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰, en le que R⁶⁰ se selecciona del grupo que consiste en alquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo, heteroalquilo, heterocicloalquilalquilo, cicloalquilalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo, cada R⁷⁰ es independientemente hidrógeno o R⁶⁰; cada R⁸⁰ es independientemente R⁷⁰ o, alternativamente, dos de R⁸⁰, tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un heterocicloalquilo de 5, 6 o 7 miembros que puede incluir opcionalmente de 1 a 4 de los mismos o diferentes heteroátomos adicionales seleccionados del grupo que consiste en O, N y S, de los cuales N puede tener -H o sustitución de alquilo C₁-C₃; y cada M⁺ es un contraión con una carga positiva neta única. Cada M⁺ puede ser independientemente, por ejemplo, un ion alcalino, tal como K⁺, Na⁺, Li⁺; un ion amonio, tal como ⁺N(R⁶⁰)₄; o un ion alcalinotérreo, tal como [Ca²⁺]_{0,5}, [Mg²⁺]_{0,5} o [Ba²⁺]_{0,5} ("el subíndice 0,5 significa que uno de los contraiones para dichos iones alcalinotérreos divalentes puede ser una forma ionizada de un compuesto de la invención y el otro un contraión tal como cloruro, o dos compuestos ionizados descritos en el presente documento pueden servir como contraiones para tales iones alcalinotérreos divalentes, o un compuesto doblemente ionizado de la invención puede servir como el

contraión para tales iones alcalinotérreos divalentes"). Como ejemplos específicos, $-NR^{80}R^{80}$ pretende incluir $-NH_2$, $-NH$ -alquilo, N-pirrolidinilo, N-piperazinilo, 4N-metil-piperazin-1-ilo y N-morfolinilo.

5 Además de la divulgación en el presente documento, en una determinada realización, un grupo que está sustituido tiene 1, 2, 3 o 4 sustituyentes, 1, 2 o 3 sustituyentes, 1 o 2 sustituyentes, o 1 sustituyente.

10 Se entiende que en todos los grupos sustituidos definidos anteriormente, no se pretenden incluir en este documento los polímeros que llegaron definiendo sustituyentes con sustituyentes adicionales para ellos mismos (por ejemplo, arilo sustituido que tiene un grupo arilo sustituido como un sustituyente que está sustituido en sí mismo con un grupo arilo sustituido, que está adicionalmente sustituido por un grupo arilo sustituido, etc.). En tales casos, el número máximo de tales sustituciones es tres. Por ejemplo, las sustituciones en serie de grupos arilo sustituidos específicamente contemplados en el presente documento se limitan a arilo sustituido-(arilo sustituido)-arilo sustituido.

15 A menos que se indique lo contrario, se llega a la nomenclatura de los sustituyentes que no se definen explícitamente en el presente documento nombrando la porción terminal de la función seguida de la función adyacente con respecto al punto de unión.

20 En cuanto a cualquiera de los grupos descritos en el presente documento que contienen uno o más sustituyentes, se entiende, por supuesto, que tales grupos no contienen ningún patrón de sustitución o sustitución que sea estéricamente poco práctico y/o sintéticamente no factible. Además, los compuestos objetivo incluyen todos los isómeros estereoquímicos que surgen de la sustitución de estos compuestos.

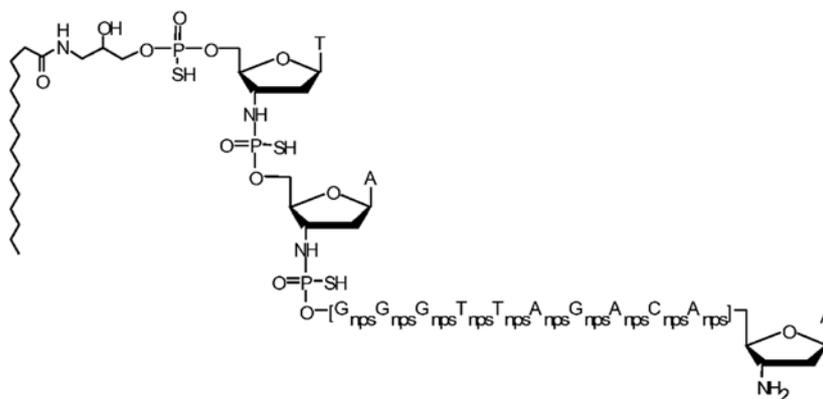
25 El término "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal que es aceptable para administración a un paciente, tal como un mamífero (sales con contraiones que tienen seguridad aceptable para un mamífero para un régimen de dosificación dado). Dichas sales pueden derivarse de bases inorgánicas u orgánicas farmacéuticamente aceptables y de ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. "Sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto, las cuales se derivan de una variedad de contraiones orgánicos e inorgánicos bien conocidos en la técnica e incluyen, a modo de ejemplo solamente, sodio y similares; y cuando la molécula contiene una función básica, sales de ácidos orgánicos o inorgánicos, tales como clorhidrato y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables de interés incluyen, entre otras, sales de aluminio, amonio, arginina, bario, benzatina, calcio, colinato, etilendiamina, lisina, litio, magnesio, meglumina, procaína, potasio, sodio, trometamina, N-metilglucamina, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, dietanolamina, etanolamina, piperazina, zinc, diisopropilamina, trietilamina, diisopropiletilamina y trietanolamina.

35 El término "sal del mismo" significa un compuesto formado cuando un protón de un ácido es reemplazado por un catión, tal como un catión metálico o un catión orgánico y similares. Cuando corresponda, la sal es una sal farmacéuticamente aceptable, aunque esto no es necesario para las sales de compuestos intermedios que no están destinados a la administración a un paciente. A modo de ejemplo, las sales de los presentes compuestos incluyen aquellas en las que el compuesto está protonado por un ácido inorgánico u orgánico para formar un catión, con la base conjugada del ácido inorgánico u orgánico como componente aniónico de la sal. Las sales de interés incluyen, entre otras, sales de aluminio, amonio, arginina, bario, benzatina, calcio, cesio, colinato, etilendiamina, litio, magnesio, meglumina, procaína, N-metilglucamina, piperazina, potasio, sodio, trometamina, zinc, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, dietanolamina, etanolamina, piperazina, diisopropilamina, trietilamina, diisopropiletilamina y trietanolamina. Se entiende que para cualquiera de las estructuras de polinucleótidos representadas en el presente documento que incluyen una cadena principal de enlaces entre nucleósidos, dichos polinucleótidos también pueden incluir cualquier forma de sal conveniente. En algunas realizaciones, las formas ácidas de los enlaces entre nucleósidos se representan por simplicidad. En algunos casos, la sal del compuesto en cuestión es una sal catiónica monovalente. En ciertos casos, la sal del compuesto en cuestión es una sal catiónica divalente. En algunos casos, la sal del compuesto en cuestión es una sal catiónica trivalente.

50 "Solvato" se refiere a un complejo formado por la combinación de moléculas de disolvente con moléculas o iones del soluto. El disolvente puede ser un compuesto orgánico, un compuesto inorgánico o una mezcla de ambos. Algunos ejemplos de solventes incluyen, pero no se limitan a, metanol, N,N-dimetilformamida, tetrahidrofurano, dimetilsulfóxido y agua. Cuando el solvente es agua, el solvato formado es un hidrato.

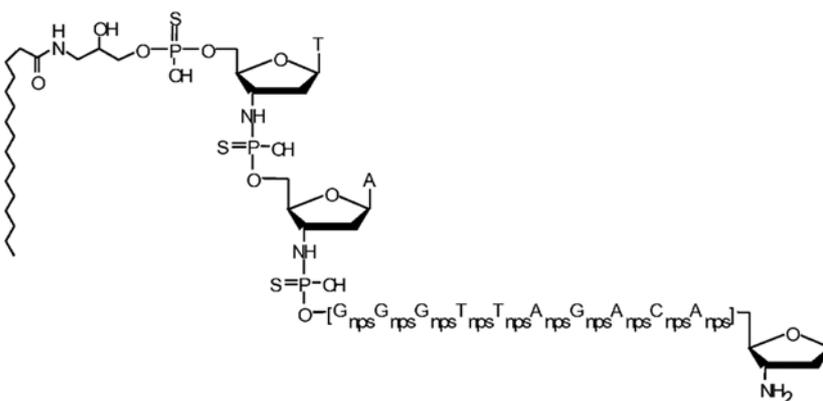
55 "Estereoisómero" y "estereoisómeros" se refieren a compuestos que tienen la misma conectividad atómica pero diferente disposición atómica en el espacio. Los estereoisómeros incluyen isómeros cis-trans, isómeros E y Z, enantiómeros y diastereómeros.

60 "Tautómero" se refiere a formas alternativas de una molécula que difieren solo en el enlace electrónico de átomos y/o en la posición de un protón, como los tautómeros enol-ceto e imina-enamina, $-NH-P(=S)(OH)-O-$ y $-NH-P(=O)(SH)-O-$, o las formas tautoméricas de grupos heteroarilo que contienen una disposición de átomos en el anillo $-N=C(H)-NH-$, tal como pirazoles, imidazoles, bencimidazoles, triazoles y tetrazoles. Una persona de habilidad ordinaria en la técnica reconocería que son posibles otras disposiciones tautoméricas de los grupos descritos en el presente documento. Por ejemplo, se entiende que un polinucleótido descrito por la siguiente estructura:



también abarca la siguiente estructura que muestra una posible disposición tautomérica alternativa de grupos de enlace:

5



en la que "nps" representa un enlace de tiosforamido (-NH-P(=O)(SH)-O- o -NH-P(=S)(OH)-O-) que conecta el carbono 3' de un nucleósido al carbono 5' del nucleósido adyacente. Se entiende que todas las formas tautoméricas de un compuesto en cuestión están abarcadas por una estructura en la que se describe una posible disposición tautomérica de los grupos del compuesto, incluso si no se indica específicamente. Cualquier disposición tautomérica conveniente de los grupos de los compuestos en cuestión puede utilizarse para describir los compuestos.

10

Se apreciará que el término "o una sal o solvato o estereoisómero del mismo" pretende incluir todas las permutaciones de sales, solvatos y estereoisómeros, tales como un solvato de una sal farmacéuticamente aceptable de un estereoisómero del compuesto en cuestión. Se entiende que el término "o una sal del mismo" pretende incluir todas las permutaciones de sales. Se entiende que el término "o un solvato del mismo" pretende incluir todas las permutaciones de solvatos. Se entiende que el término "o un estereoisómero del mismo" pretende incluir todas las permutaciones de estereoisómeros. Se entiende que el término "o un tautómero del mismo" pretende incluir todas las permutaciones de tautómeros. Así, por ejemplo, se deduce que se pretende incluir un solvato de una sal farmacéuticamente aceptable de un tautómero de un estereoisómero del compuesto en cuestión.

15

20

Como se usa en el presente documento, el término "aislado" pretende describir un compuesto de interés que se encuentra en un entorno diferente de aquel en el que el compuesto se produce naturalmente. "Aislado" pretende incluir compuestos que están dentro de muestras que están sustancialmente enriquecidas en el compuesto de interés y/o en las que el compuesto de interés está purificado parcial o sustancialmente.

25

Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente purificado" se refiere a un compuesto que se remueve de su entorno natural y es al menos 60% libre, al menos 75% libre, al menos 80% libre, al menos 81% libre, al menos 82% libre, al menos 83% libre, al menos 84% libre, al menos 85% libre, al menos 86% libre, al menos 87% libre, al menos 88% libre, al menos 89% libre, al menos 90% libre, al menos 91% libre, al menos 92% libre, al menos 93% libre, al menos 94% libre, al menos 95% libre, al menos 96% libre, al menos 97% libre, al menos 98% libre, al menos 99% libre, o más del 99% libre, de otros componentes con los que está naturalmente asociado.

30

35

El término "condiciones fisiológicas" pretende abarcar aquellas condiciones compatibles con células vivas, por ejemplo, condiciones predominantemente acuosas de una temperatura, pH, salinidad, etc. que son compatibles con células vivas.

5 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro establecido o el valor intermedio en ese intervalo establecido está incluido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también están abarcados dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la invención.

10 Debe observarse que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración tiene la intención de servir como base antecedente para el uso de una terminología exclusiva como "únicamente", "solo" y similares en relación con la mención de elementos para reivindicación o el uso de una limitación "negativa".

15 Otras definiciones de términos pueden aparecer en toda la memoria descriptiva.

Descripción de ejemplos de realizaciones

20 Como se resumió anteriormente, los aspectos de la divulgación incluyen métodos para la preparación de un polinucleótido. En algunas realizaciones, el método incluye poner en contacto una primera composición polinucleotídica que incluye: un polinucleótido que tiene una secuencia de 7 o más subunidades de nucleósidos en la que al menos dos de las subunidades de nucleósidos están unidas por un enlace entre subunidades de
25 tiofosforamidato N3'→P5'; y productos y reactivos sintéticos no objetivo; con una sal catiónica multivalente para precipitar una primera sal polinucleotídica que incluye al menos un contraión catiónico multivalente; y separar la primera sal polinucleotídica de la primera composición polinucleotídica contactada para producir una segunda composición polinucleotídica que incluye la primera sal polinucleotídica. En ciertas realizaciones, el método incluye además poner en contacto la sal polinucleotídica con un soporte de cromatografía de fase inversa; y eluir del soporte de cromatografía una tercera composición polinucleotídica que incluye el polinucleótido. En algunos casos, la tercera
30 composición polinucleotídica incluye una segunda sal polinucleotídica. También se proporcionan composiciones que incluyen una sal del polinucleótido que incluye al menos un contraión catiónico multivalente. En algunas realizaciones, al menos un contraión catiónico multivalente se selecciona del grupo que consiste en magnesio, zinc, aluminio y calcio.

35 Antes de que se describan las diversas realizaciones, debe entenderse que las enseñanzas de esta descripción no se limitan a las realizaciones particulares descritas, y como tales pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de las presentes enseñanzas estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

40 Los encabezados de sección utilizados en este documento son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes del tema descrito de ninguna manera. Si bien las presentes enseñanzas se describen junto con diversas realizaciones, no se pretende que las presentes enseñanzas se limiten a tales realizaciones. Por el contrario, las presentes enseñanzas abarcan diversas alternativas, modificaciones y equivalentes, como apreciarán los expertos en la materia.

45 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento también se puede usar en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen métodos y materiales de interés.

50 La cita de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como una admisión de que las presentes reivindicaciones no tienen derecho a anteceder dicha publicación en virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden confirmarse independientemente.

55 Se aprecia que ciertas características de la invención, que se describen, por claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una sola realización. Por el contrario, varias características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier sub-combinación adecuada. Todas las combinaciones de las realizaciones pertenecientes a la invención están específicamente abarcadas por la presente invención y se describen
60 en el presente documento como si todas y cada una de las combinaciones se divulgaran individual y explícitamente, en la medida en que tales combinaciones abarquen temas que son, por ejemplo, compuestos que son compuestos estables (es decir, compuestos que pueden prepararse, aislarse, caracterizarse y analizarse para determinar su actividad biológica). Además, todas las subcombinaciones de las diversas realizaciones y elementos de las mismas
65 (por ejemplo, elementos de los grupos químicos enumerados en las realizaciones que describen tales variables)

también se incluyen específicamente en la presente invención y se divulgan en el presente documento como si todas y cada una de estas subcombinaciones fueran individual y explícitamente divulgadas en el presente documento.

5 En la descripción adicional de la presente invención, los métodos de preparación de un polinucleótido se describen primero con mayor detalle. A continuación, se revisan las composiciones polinucleotídicas de interés para practicar los métodos en cuestión.

Métodos de preparación

10 Los aspectos de la presente descripción incluyen métodos para la preparación de un polinucleótido. En algunas realizaciones, el método incluye poner en contacto una primera composición polinucleotídica que incluye un polinucleótido (por ejemplo, como se describe en el presente documento) y productos y agentes de síntesis no objetivo, con una sal catiónica multivalente para precipitar una sal polinucleotídica que incluye al menos un contraión catiónico multivalente. La precipitación de la sal polinucleotídica usando los métodos en cuestión proporciona la eliminación de
15 todos los productos y agentes de síntesis solubles no objetivo. En algunas realizaciones, el método incluye separar la sal polinucleotídica de la primera composición polinucleotídica contactada para producir una segunda composición polinucleotídica que incluye la sal polinucleotídica. En ciertas realizaciones, la primera composición polinucleotídica, la sal polinucleotídica y la segunda composición polinucleotídica incluyen cada una un polinucleótido objetivo que tiene una secuencia de 7 o más subunidades de nucleósidos en las que al menos dos de las subunidades de nucleósidos están unidas por un enlace entre subunidades de tiofosforamidato N3'→P5' (por ejemplo, como se describe en el
20 presente documento).

La segunda composición polinucleotídica puede tener una cantidad reducida de productos y agentes de síntesis no objetivo en comparación con la primera composición polinucleotídica. Por cantidad reducida de productos y agentes de síntesis no objetivo se entiende que hay un 10% o más de reducción de peso de los productos y agentes de síntesis no objetivo en la segunda composición polinucleotídica en comparación con la primera composición polinucleotídica, tal como un 15% o más de reducción de peso, 20% o más de reducción de peso, 25% o más de reducción de peso, 30% o más de reducción de peso, 35% o más de reducción de peso, 40% o más de reducción de peso, 45% o más de reducción de peso, 50% o más de reducción de peso, 55% o más de reducción de peso, 60% o más de reducción de peso, 65% o más de reducción de peso, 70% o más de reducción de peso, 75% o más de reducción de peso, 80% o más de reducción de peso, 85% o más de reducción de peso, 90% o más de reducción de peso, o 95% o más de reducción de peso. Como tal, los métodos en cuestión pueden proporcionar la precipitación selectiva del polinucleótido objetivo sobre productos y agentes de síntesis no objetivo. En ciertas realizaciones, los métodos en cuestión proporcionan una selectividad mejorada de precipitación en comparación con un método de control de precipitación de polinucleótidos usando un disolvente orgánico, tal como etanol puro o una solución de etanol (véase, por ejemplo, Crouse J, Amorese D (1987). "Ethanol Precipitation: Ammonium Acetate as an Alternative to Sodium Acetate". Focus 9 (2): 3-5). Por selectividad mejorada de la precipitación se entiende que se eliminan 5% o más en peso de productos y agentes de síntesis no objetivo de la segunda composición polinucleotídica en comparación con una composición de control, tal como 10% o más en peso, 15% o más en peso, 20% o más en peso, 25% o más en peso, 30% o más en peso, 35% o más en peso, 40% o más en peso, 45% o más en peso, 50% o más en peso, 55% o más en peso, 60% o más en peso, 65% o más en peso, 70% o más en peso, 75% o más en peso, 80% o más en peso, 85% o más en peso, 90% o más en peso, o 95% o más en peso de productos y agentes de síntesis no objetivo. La cantidad reducida de productos y agentes de síntesis no objetivo en comparación con la primera composición polinucleotídica se puede determinar usando cualquier método conveniente, por ejemplo usando métodos de HPLC.
45

Como se usa en el presente documento, los términos "polinucleótido sintético objetivo" y "polinucleótido objetivo" se usan indistintamente y se refieren a un polinucleótido que tiene una secuencia deseada particular de nucleótidos que se sintetiza en un soporte a través de cualquier método conveniente de síntesis de polinucleótidos en fase sólida por etapas (por ejemplo, como se describe en el presente documento), y en el que el polinucleótido está desprovisto de cualquier grupo protector que se utilice únicamente con el propósito de ejecutar la estrategia de síntesis del polinucleótido objetivo. Dichos grupos protectores pueden eliminarse de un polinucleótido en las etapas finales de la síntesis en fase sólida, por ejemplo, durante la desprotección final y la escisión del polinucleótido de un soporte para producir el polinucleótido objetivo. Como se usa en el presente documento, el término "no objetivo" se refiere a cualquier componente conveniente, por ejemplo, un compuesto, un polinucleótido o derivado del mismo, un agente, etc., o mezclas de los mismos que no es el producto objetivo deseado de una síntesis.
50

El polinucleótido objetivo puede incluir cualquier número conveniente de subunidades de nucleósidos, tal como entre 7 y 500 subunidades de nucleósidos, entre 7 y 100 subunidades de nucleósidos, entre 7 y 75 subunidades de nucleósidos, entre 7 y 50 subunidades de nucleósidos, entre 7 y 40 nucleósidos subunidades, entre 7 y 30 subunidades de nucleósidos, entre 7 y 20 subunidades de nucleósidos, entre 7 y 15 subunidades de nucleósidos, entre 10 y 15 subunidades de nucleósidos, o entre 13 y 15 subunidades de nucleósidos. En algunos casos, el polinucleótido objetivo tiene entre 7 y 100 subunidades de nucleósidos, tal como entre 7 y 50 subunidades de nucleósidos, entre 10 y 50 subunidades de nucleósidos, entre 10 y 40 subunidades de nucleósidos, entre 10 y 30 subunidades de nucleósidos, entre 10 y 25 nucleósidos subunidades, entre 10 y 20 subunidades de nucleósidos, entre 12 y 18 subunidades de nucleósidos, o entre 12 y 16 subunidades de nucleósidos. En ciertos casos, el polinucleótido objetivo tiene 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 subunidades de nucleósidos.
60
65

Como se usa en el presente documento, el término "productos y agentes de síntesis no objetivo" se refiere colectivamente a una variedad de componentes no objetivo que pueden estar presentes en un producto sintético crudo de síntesis de polinucleótidos en fase sólida, que incluye pero no se limita a: productos polinucleotídicos no objetivo de la síntesis, tales como polinucleótidos truncados, fragmentos de polinucleótidos protegidos (es decir, secuencias que se protegieron después de un acoplamiento fallido de subunidades), polinucleótidos que incluyen una eliminación o eliminaciones (es decir, pérdida de uno o más monómeros o dímeros de nucleósidos objetivo, por ejemplo, como se describe en el presente documento) y polinucleótidos derivatizados (por ejemplo, secuencias polinucleotídicas que experimentan una reacción secundaria no deseada durante la síntesis o escisión); y agentes tales como enlazadores escindidos, productos de desprotección, por ejemplo, productos de grupos protectores eliminados tales como productos de grupos protectores de fósforo y productos de grupos protectores de bases (por ejemplo, productos de grupos protectores de aminas exocíclicas), reactivos de escisión y/o eliminadores de escisión y reactivos de síntesis residuales, tales como monómeros, dímeros, reactivos de acoplamiento, protección o desprotección.

En ciertas realizaciones, los métodos proporcionan la precipitación selectiva de polinucleótidos objetivo sobre productos y agentes de síntesis no objetivo que incluyen polinucleótidos que tienen 6 subunidades de nucleósidos o menos, tal como 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 subunidades de nucleósidos. En ciertos casos, todos los productos y agentes de síntesis no objetivo que no son polinucleótidos permanecen solubles durante la etapa de precipitación selectiva de los métodos en cuestión y, por lo tanto, pueden eliminarse fácilmente del precipitado de la sal polinucleotídica resultante.

Los métodos en cuestión pueden incluir precipitación y separación del polinucleótido objetivo de una preparación sintética cruda para producir una composición polinucleotídica que tiene varias propiedades deseables, tales como una cantidad reducida de productos y agentes de síntesis no objetivo (por ejemplo, reactivos de síntesis, reactivos de escisión, eliminadores, grupos protectores eliminados, productos secundarios de escisión (enlazadores, grupos de protección, etc. y pequeños fragmentos de polinucleótidos).

En algunas realizaciones, los métodos en cuestión incluyen precipitar el polinucleótido de una preparación sintética cruda como una sal catiónica multivalente antes de la purificación por cromatografía. En ciertos casos, los métodos en cuestión son métodos de purificación de un polinucleótido objetivo. La precipitación de la composición polinucleotídica en crudo usando una sal catiónica multivalente produce un precipitado de sal polinucleotídica que incluye al menos un contraión catiónico multivalente. En algunos casos, el precipitado de sal polinucleotídica incluye una mezcla de contraiones catiónicos monovalentes y multivalentes que forman pares de iones con la cadena principal del polinucleótido polianiónico. Como se usa en el presente documento, los términos "sal catiónica multivalente" y "sal multivalente" cuando se usan en referencia a un polinucleótido se usan indistintamente para referirse a una sal polinucleotídica que incluye al menos un contraión catiónico multivalente que es un ión apareado con un grupo de enlace aniónico entre subunidades de la cadena principal del polinucleótido. En algunos casos, la sal catiónica multivalente del polinucleótido incluye una mezcla de cationes monovalentes y multivalentes. En algunas realizaciones, el catión multivalente puede proporcionar la agregación del polinucleótido objetivo mediante emparejamiento iónico con grupos de enlace aniónicos entre subunidades de dos o más cadenas principales de polinucleótidos. En ciertos casos, un ión catiónico divalente se empareja con dos polinucleótidos distintos para formar un dímero. En algunos casos, se puede lograr una agregación adicional de los polinucleótidos mediante interacciones multivalentes adicionales mediadas por cationes multivalentes adicionales. Como tal, en algunos casos, los métodos en cuestión pueden proporcionar la agregación selectiva y la precipitación de polinucleótidos objetivo sobre productos y agentes sintéticos no objetivo.

En algunas realizaciones del método, al menos un contraión catiónico multivalente es divalente. En ciertas realizaciones, al menos un contraión catiónico multivalente se selecciona del grupo que consiste en magnesio, zinc y calcio. En algunas realizaciones, al menos un contraión catiónico multivalente es trivalente. En ciertas realizaciones, al menos un contraión catiónico multivalente es aluminio. En algunas realizaciones, la sal polinucleotídica incluye además un contraión catiónico monovalente. En tales casos, la sal polinucleotídica es una sal mixta, por ejemplo, una sal que incluye dos o más contraiones catiónicos diferentes.

Cualquier método conveniente para precipitar un polinucleótido puede encontrar uso en los métodos en cuestión. La etapa de poner en contacto la primera composición polinucleotídica con una sal catiónica multivalente para precipitar una sal polinucleotídica que incluye al menos un contraión catiónico multivalente puede lograrse usando cualquier método conveniente. Cualquier catión multivalente conveniente y sus sales (por ejemplo, como se describe en el presente documento) se puede utilizar en la etapa de poner en contacto para producir el precipitado. En ciertos casos, se produce una sal de un polinucleótido que incluye al menos un contraión catiónico multivalente en una fase de solución, por ejemplo, mediante la adición de una sal catiónica multivalente a una solución que incluye el polinucleótido. Una vez que se ha agregado la sal catiónica multivalente a la solución, se puede formar el precipitado. En algunos casos, se puede formar una sal de un polinucleótido que incluye al menos un contraión catiónico multivalente en un soporte de intercambio iónico. Cualquier soporte conveniente de intercambio iónico puede ser utilizado en la etapa de contacto. En algunos casos, el soporte de intercambio iónico es una resina de intercambio catiónico fuerte. En algunas realizaciones del método, la etapa de contacto incluye eluir la primera composición polinucleotídica de un soporte de intercambio catiónico que incluye contraiones catiónicos multivalentes. Como se usa en el presente documento, el

término "soporte de intercambio catiónico" se refiere a un soporte que es en sí mismo aniónico y es capaz de emparejamiento iónico con un analito catiónico, tal como un catión multivalente de interés. Se puede utilizar cualquier eluyente conveniente para la etapa de elución del soporte de intercambio catiónico. En algunos casos, el precipitado se forma en el eluato después de que la sal polinucleotídica se haya eluido del soporte de intercambio catiónico.

Los métodos en cuestión pueden realizarse en cualquier preparación sintética cruda conveniente de un polinucleótido sintético objetivo. En algunos casos, la primera composición polinucleotídica es una preparación sintética cruda de un polinucleótido sintético objetivo. En ciertas realizaciones, la primera composición polinucleotídica es una composición que es el producto de la escisión de un polinucleótido objetivo a partir de un soporte, posterior a la síntesis. Como tal, la primera composición polinucleotídica puede incluir una variedad de productos y agentes sintéticos no objetivo. Los métodos en cuestión prevén la precipitación selectiva de la sal polinucleotídicas sobre productos y agentes de síntesis no objetivo, que permanecen en solución y, por lo tanto, pueden eliminarse fácilmente del precipitado resultante.

Se puede utilizar cualquier método conveniente de síntesis (por ejemplo, como se describe en el presente documento) para sintetizar el polinucleótido objetivo. Después de la síntesis, el polinucleótido objetivo se escinde del soporte en el que se realiza la síntesis por etapas. Después de la escisión, el polinucleótido objetivo de longitud completa puede purificarse para eliminar la síntesis indeseable y los reactivos de escisión y para eliminar fragmentos de polinucleótidos no objetivo, y derivados de los mismos. Los métodos en cuestión que incluyen la precipitación de la sal polinucleotídica que incluye al menos un contraión catiónico multivalente se pueden realizar en cualquier etapa conveniente de la preparación de un polinucleótido objetivo, tal como post síntesis y antes de la purificación por cromatografía de fase inversa.

Como se usa en el presente documento, los términos "preparación sintética cruda", "composición cruda" y "polinucleótido crudo" se refieren a una composición que incluye los productos sintéticos de síntesis de polinucleótidos en fase sólida que se recogen después de la síntesis mediante escisión de un soporte de síntesis en fase sólida, en el que la composición no está purificada, es decir, no se ha realizado ninguna purificación por cromatografía sobre la composición. La purificación por cromatografía se refiere a cualquier método de purificación conveniente que incluye la absorción del polinucleótido objetivo en un soporte de cromatografía y la elución y resolución subsiguientes del polinucleótido objetivo a partir de polinucleótidos no objetivo. En algunos casos, la purificación por cromatografía se refiere a la purificación por cromatografía de fase inversa.

En algunas realizaciones, el método incluye además proporcionar una primera composición polinucleotídica, en la que la composición se produce mediante escisión posterior a la síntesis a partir de un soporte de síntesis en fase sólida. Cualquier etapa adicional conveniente tal como las etapas de evaporación, dilución o concentración también se pueden realizar en la preparación sintética cruda antes de utilizar la composición resultante en los métodos en cuestión. En algunos casos, el método incluye además sintetizar el polinucleótido objetivo (por ejemplo, como se describe en el presente documento en un soporte de síntesis en fase sólida). En ciertas realizaciones, el método incluye además escindir el polinucleótido de un soporte para producir la primera composición polinucleotídica.

Un precipitado sólido que incluye la sal polinucleotídica puede separarse de la primera composición polinucleotídica que se pone en contacto con la sal multivalente (es decir, la primera composición polinucleotídica contactada) usando cualquier método conveniente. Los métodos de separación de interés incluyen, pero no se limitan a, centrifugación, filtración, decantación y similares.

En algunos casos, la separación del precipitado que incluye la sal polinucleotídica se logra mediante centrifugación en la que la aplicación de una fuerza centrífuga a la primera composición polinucleotídica contactada, por ejemplo, en una centrifuga, hace que el precipitado forme un sedimento, por ejemplo, en el fondo del contenedor. La formación de un sedimento por centrifugación puede denominarse como decantación del precipitado. En ciertas realizaciones del método, la etapa de separación incluye centrifugar la primera composición polinucleotídica en contacto para decantar el precipitado de sal polinucleotídica. El líquido sobrenadante puede decantarse luego del tubo sin perturbar el precipitado, o retirarlo del recipiente, por ejemplo, con una pipeta Pasteur. El proceso de centrifugación se puede repetir con una solución de lavado.

En algunos casos, la separación del precipitado que incluye la sal polinucleotídica se logra por filtración. En algunas realizaciones del método, la etapa de separación incluye filtrar la sal polinucleotídica del primer polinucleótido contactado. Se puede utilizar cualquier filtro y medio filtrante conveniente en los métodos en cuestión. En ciertos casos, la separación se logra mediante filtración profunda usando un medio filtrante que se selecciona de acuerdo con el polinucleótido objetivo.

En algunas realizaciones, el método incluye: poner en contacto una primera composición polinucleotídica que incluye: un polinucleótido que tiene una secuencia de 7 o más subunidades de nucleósidos y al menos dos de las subunidades de nucleósidos están unidas por un enlace entre subunidades de tiofosforamido $N3' \rightarrow P5'$; y productos y agentes sintéticos no objetivo; con una sal catiónica multivalente para precipitar una primera sal polinucleotídica que incluye al menos un contraión catiónico multivalente; y

separar la primera sal polinucleotídica de la primera composición polinucleotídica contactada para producir una segunda composición polinucleotídica que incluye la sal polinucleotídica.

5 La separación del precipitado de la primera composición polinucleotídica contactada produce una segunda composición polinucleotídica que incluye la primera sal polinucleotídica. En algunos casos, la precipitación selectiva de la primera sal polinucleotídica usando la sal catiónica multivalente a través de los métodos en cuestión produce una segunda composición polinucleotídica que incluye una cantidad reducida de productos y agentes sintéticos no objetivo.

10 Después de la precipitación selectiva, las sales polinucleotídicas en cuestión se pueden convertir luego en una sal polinucleotídica soluble mediante intercambio catiónico de al menos un contraión catiónico multivalente fuera del polinucleótido y reemplazarlo con otro contraión catiónico de interés (por ejemplo, como se describe en el presente documento). Como tal, los métodos en cuestión proporcionan la formación reversible de una primera sal polinucleotídica que incluye al menos un contraión catiónico multivalente. Como se usa en el presente documento, los
15 términos "formación reversible" e "intercambio reversible" se usan indistintamente y se refieren a la preparación de una sal polinucleotídica por ejemplo, mediante precipitación selectiva (por ejemplo, como se describe en el presente documento), en la que la sal formada también puede disociarse posteriormente para intercambiar al menos una sal catiónica multivalente de la sal. En algunos casos, las sales polinucleotídicas que son insolubles en cualquier disolvente pueden denominarse sales formadas irreversiblemente. En algunas realizaciones, el método incluye el
20 intercambio de al menos un contraión catiónico multivalente fuera de la primera sal polinucleotídica para producir una segunda sal polinucleotídica soluble, en el que el intercambio incluye la disociación del contraión catiónico multivalente y el emparejamiento de iones con un catión salino soluble de interés. En ciertos casos, la segunda sal polinucleotídica soluble es una sal monovalente. En ciertos casos, la segunda sal polinucleotídica soluble es una sal de sodio. En ciertos casos, la segunda sal polinucleotídica soluble es una sal de trietilamonio. En algunos casos, el primer y segundo
25 polinucleótido son distintos entre sí, es decir, incluyen diferentes contraiones catiónicos. La disociación de las sales polinucleotídicas en cuestión y el intercambio de al menos un contraión catiónico multivalente se puede lograr usando cualquier método conveniente. En ciertos casos, la disociación se logra usando cromatografía de fase inversa, por ejemplo, como se describe en este documento. En algunos casos, la cromatografía de intercambio iónico se puede utilizar para lograr la disociación. En ciertas realizaciones, la disociación de la primera sal polinucleotídica se logra
30 mediante la disolución de la sal en un disolvente que incluye un contraión catiónico de interés.

Después de la separación, se pueden realizar etapas de purificación adicionales en la segunda composición polinucleotídica. En algunas realizaciones, el método incluye además: poner en contacto la primera sal polinucleotídica con un soporte de cromatografía de fase inversa; y eluir del soporte de cromatografía una tercera composición
35 polinucleotídica que incluye el polinucleótido. En ciertas realizaciones, la tercera composición polinucleotídica incluye una segunda sal polinucleotídica. Se puede utilizar cualquier método de cromatografía de fase inversa conveniente para purificar la sal polinucleotídica. Los métodos de cromatografía de fase inversa y los soportes de interés incluyen, pero no se limitan a, purificación cromatográfica mediante cromatografía de fase inversa de par iónico, cromatografía de fase inversa C18 y los métodos y soportes descritos por Chen et al., Journal of Chromatography A, Volumen 1288,
40 3 de mayo de 2013, páginas 73-81; y Zimmermann et al., Journal of Chromatography A, Volumen 1354, 8 de agosto de 2014, páginas 43-55. En algunas realizaciones, la segunda composición polinucleotídica se carga directamente sobre el soporte de cromatografía de fase inversa. Por cargar directamente sobre el soporte se entiende que la segunda composición polinucleotídica producida usando el método en cuestión se agrega directamente, por ejemplo, como un precipitado sólido aislado, al soporte de cromatografía de fase inversa. En algunos casos, el soporte de
45 cromatografía de fase inversa es una resina configurada como una columna y la composición polinucleotídica se agrega a la parte superior del lecho de resina. En ciertas realizaciones, el método incluye además disolver la segunda composición polinucleotídica en un disolvente. Se pueden utilizar disolventes convenientes, incluidos, entre otros, tampones acuosos, disolventes orgánicos miscibles con agua y mezclas de los mismos. En tales casos, una solución de la segunda composición polinucleotídica puede ponerse en contacto con el soporte de cromatografía de fase
50 inversa para absorber el polinucleótido al soporte antes de la elución.

En algunos casos, el contacto incluye la absorción del polinucleótido en el soporte de cromatografía de fase inversa y posteriormente la elución del polinucleótido para proporcionar la resolución cromatográfica del polinucleótido objetivo a partir de polinucleótido no objetivo y agentes sintéticos residuales que están presentes en la composición. Se recoge
55 el polinucleótido objetivo que contiene el eluato. Se puede utilizar cualquier eluyente conveniente para eluir el polinucleótido del soporte de cromatografía de fase inversa. El eluyente puede seleccionarse de acuerdo con una variedad de factores, tales como la naturaleza del soporte de cromatografía de fase inversa, el oligonucleótido objetivo, las sales deseadas particulares del polinucleótido objetivo, etc. En algunos casos, al menos un contraión catiónico multivalente de la primera sal polinucleotídica se intercambia con iones en el soporte de cromatografía de fase inversa
60 con otro contraión catiónico distinto de interés que se incluye en el eluyente. En tales casos, cuando el polinucleótido se eluye del soporte de cromatografía de fase inversa, está en una forma salina diferente (es decir, una segunda sal polinucleotídica) que cuando se cargó debido a que al menos un contraión catiónico multivalente se intercambia fuera del polinucleótido. En ciertos casos, la forma salina del polinucleótido que se eluye del soporte en la tercera composición polinucleotídica es más soluble en agua que la primera sal polinucleotídica que incluye al menos un
65 contraión catiónico multivalente.

En ciertas realizaciones, la tercera composición polinucleotídica incluye una segunda sal polinucleotídica que es una sal farmacéuticamente aceptable del polinucleótido. En ciertos casos, la tercera composición incluye una segunda sal polinucleotídica que es una sal catiónica monovalente del polinucleótido. En ciertos casos, la tercera composición incluye una segunda sal polinucleotídica que es una sal de trietilamonio del polinucleótido. En ciertos casos, la tercera composición incluye una segunda sal polinucleotídica que es una sal de sodio del polinucleótido. Se entiende que después de que el polinucleótido se purifica por cromatografía de fase inversa, se pueden realizar cualquier cantidad de etapas adicionales de intercambio de contraiones catiónicos en la sal polinucleotídica para producir una forma de sal deseada del polinucleótido. En algunas realizaciones, el método incluye además contraiones catiónicos de intercambio iónico de la segunda sal polinucleotídica para producir una tercera sal polinucleotídica. En ciertas realizaciones, la tercera sal polinucleotídica es una sal farmacéuticamente aceptable del polinucleótido. En ciertos casos, la tercera sal polinucleotídica es una sal catiónica monovalente del polinucleótido. En ciertos casos, la tercera sal polinucleotídica es una sal de sodio del polinucleótido (por ejemplo, como se describe en el presente documento).

En ciertos casos, la primera composición incluye una sal catiónica monovalente del polinucleótido. En ciertos casos, la sal catiónica monovalente se selecciona del grupo que consiste en sodio, amonio y alquilamonio. En ciertos casos, el alquilamonio se selecciona del grupo que consiste en dimetilamonio, metilamonio, etilamonio y trietilamonio. En ciertos casos, la primera composición incluye una sal de amonio del polinucleótido. En ciertos casos, la primera composición incluye una sal de alquilamonio del polinucleótido. En ciertos casos, la primera composición incluye una sal de trietilamonio del polinucleótido. En ciertos casos, la primera composición incluye una sal de sodio del polinucleótido. La primera composición polinucleotídica puede ponerse en contacto con una sal catiónica multivalente para precipitar una primera sal polinucleotídica que incluye al menos un contraión catiónico multivalente. Como tal, en ciertas realizaciones, la primera composición polinucleotídica contactada incluye la primera sal polinucleotídica que incluye al menos un contraión catiónico multivalente.

Se consideran abarcados dentro del alcance de esta invención las realizaciones de cualquiera de las realizaciones indicadas anteriormente del método, en el que el polinucleótido es como se describe en el presente documento.

Métodos de síntesis

Se pueden utilizar cualesquiera métodos, estrategias y químicas de síntesis de polinucleótidos convenientes para preparar las composiciones polinucleotídicas de productos sintéticos crudos que encuentran uso en los métodos de preparación en cuestión. Las químicas de síntesis de polinucleótidos y los métodos de interés que se pueden adaptar para su uso en los métodos en cuestión incluyen, pero no se limitan a, fosforamida, H-fosfonato, fosfodiéster, fosfotriéster, triéster de fosfito. Los componentes polinucleotídicos de los compuestos de la invención pueden sintetizarse adaptando cualquier protocolo convencional para el tipo de química seleccionada. Los métodos de interés para la síntesis de oligonucleótidos que tienen químicas de tiofosforamida $N3' \rightarrow P5'$ incluyen, pero no se limitan a, los métodos descritos en la patente de Estados Unidos No. 5.824.793, McCurdy et al., (1997) Tetrahedron Letters, 38: 207-210; Pongracz y Gryaznov, (1999) Tetrahedron Letters, 49: 7661-7664; Las patentes de Estados Unidos Nos. 6.835.826, 7.494.982, 7.485.717 y 5.684.143.

En algunos casos, se sintetiza un polinucleótido de interés mediante acoplamiento secuencial que comienzan desde el terminal 5' y continúan hasta el terminal 3' de la secuencia polinucleotídica objetivo. En ciertos casos, se sintetiza un polinucleótido de interés a través de acoplamiento secuencial que comienzan desde el terminal 3' y continúan hasta el terminal 5' de la secuencia polinucleotídica objetivo. En algunas realizaciones, el polinucleótido se sintetiza mediante acoplamiento secuencial de fosforamidas monoméricas al terminal en crecimiento del polinucleótido. La subunidad del nucleósido del terminal 5' se puede unir a cualquier soporte sólido conveniente mediante un grupo de enlace opcional o grupo terminal 5'. Una vez que la primera subunidad se une al soporte sólido, la subunidad se puede desproteger para producir un grupo terminal 3' libre e inmovilizado. Entonces, se pueden lograr acoplamiento de subunidades a la cadena de oligonucleótidos en crecimiento. En algunos casos, el método incluye el acoplamiento de un grupo terminal 3' unido al soporte con un monómero de nucleótido-5'-fosforamida protegido en 3'. En ciertas realizaciones, el grupo terminal 3' es un grupo hidroxilo 3'. En ciertas realizaciones, el grupo terminal 3' es un grupo amino 3'.

En algunos casos, el método de síntesis de polinucleótidos incluye las etapas de: (a) desproteger el grupo amino 3' protegido de un nucleósido terminal unido a un soporte de fase sólida, formando la desprotección un grupo amino 3' libre; (b) poner en contacto el grupo amino 3' libre con un monómero de amino nucleósido-5'-fosforamida protegido en 3' en presencia de un catalizador nucleofílico para formar un enlace de fosforamida $N3' \rightarrow P5'$ entre nucleósidos; y (c) oxidar el enlace para producir un enlace de tiofosforamida $N3' \rightarrow P5'$. En algunas realizaciones, el método incluye (d) repetir las etapas (a) a (c) hasta que se sintetice el polinucleótido.

En algunos casos, el método incluye el acoplamiento de un grupo terminal 3' unido al soporte con un dímero de dinucleótido-5'-fosforamida protegido en 3'. Los métodos de síntesis de polinucleótidos de interés incluyen, pero no se limitan a, los métodos de síntesis en fase sólida que incluyen al menos un acoplamiento de un dímero de dinucleótido como se describe en la publicación PCT No. WO2015/168310 cuya solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos No. 61/987.396. La secuencia polinucleotídica objetivo se puede sintetizar mediante una estrategia retrosintética que incluye acoplamiento secuencial de subunidades de dímero y monómero

al grupo terminal 3' de la cadena de oligonucleótido en crecimiento. En algunas realizaciones, el polinucleótido se sintetiza usando un método que incluye al menos un acoplamiento de un dímero de dinucleótido al grupo terminal 3' libre de una cadena de polinucleótido en crecimiento.

5 En algunos casos, el método de síntesis de polinucleótidos incluye las etapas de: (a) desproteger el grupo amino 3' protegido de un nucleósido terminal unido a un soporte de fase sólida, formando la desprotección un grupo amino 3' libre; (b) poner en contacto el grupo amino 3' libre con un dímero de amino dinucleótido tiofosforamidato o fosforamidita-5'-fosforamidita protegido en 3' en presencia de un catalizador nucleofílico para formar un enlace fosforamidita N3'→P5' entre nucleósidos; y (c) oxidar el enlace de un enlace de tiofosforamidato N3'→P5'. En algunas realizaciones, el método incluye (d) repetir las etapas (a) a (c) hasta que se sintetice el polinucleótido, en el que en la etapa (b) puede utilizarse un dímero de amino dinucleótido tiofosforamidato-5'-fosforamidita protegido en 3' o un monómero de amino nucleótido 5'-fosforamidita protegido en 3'.

15 Se pueden utilizar estrategias de grupos protectores convenientes en los métodos en cuestión para proteger los grupos base, fosforamidita, fosforamidato, 5', 2' y/o 3' del polinucleótido. Los grupos protectores de interés incluyen, pero no se limitan a, los grupos protectores descritos por Ohkubo et al., *Org. Lett.*, 2010, 12 (11), páginas 2496-2499; y Beaucage y Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992).

20 Como se usa en el presente documento, el término "grupo protector de fosfato" se refiere a un grupo protector que puede estar unido a un enlace entre subunidades que contiene fósforo de un oligonucleótido. Cuando está presente, un grupo protector de fosfato puede prevenir (es decir, bloquear) la reacción del enlace que contiene fósforo en el sitio en el que el grupo protector de fosfato está unido. Cualquiera de los enlaces convenientes entre subunidades que contienen fósforo (por ejemplo, enlaces P (III) y P (V)) pueden estar protegidos por los grupos protectores de fosfato en cuestión, que incluyen, pero no se limitan a, fosforamidita, oxofosforamidato, tiofosforamidato, éster fosfato, éster tiofosfato, enlaces fosfodiéster y similares. El grupo protector de fosfato puede estar unido a un átomo de oxígeno disponible del enlace entre subunidades que contiene fósforo. Se puede utilizar cualquier grupo protector conveniente como grupo protector de fosfato. En ciertas realizaciones, un grupo protector de fosfato es metilo o β-cianoetilo.

30 En algunos casos, el grupo terminal 3' de la cadena polinucleotídica en crecimiento puede incluir un hidroxilo 3', un grupo amino 3' o una versión protegida de los mismos. Cualquier grupo protector de hidroxilo y/o amino conveniente puede utilizarse en el grupo terminal 3' durante la síntesis de polinucleótidos. En algunas realizaciones, el grupo terminal 3' es un grupo amino 3' protegido y el método incluye desproteger o eliminar el grupo protector para producir un grupo amino 3' libre. Como se usa en el presente documento, el término "grupo amino libre" significa un grupo amino disponible para reaccionar con el grupo fosforamidita de un monómero o dímero entrante. En algunas realizaciones, un grupo amino libre es una amina primaria. Después de la etapa de desprotección (por ejemplo, destritolación), el grupo amino puede estar en forma de una sal (por ejemplo, la sal de una base conjugada del ácido usado para la destritolación). Esta sal puede neutralizarse opcionalmente con una solución básica tal como trietilamina al 2% o piridina en acetonitrilo después de la etapa de destritolación.

40 La protección en 3' de las fosforamiditas de la subunidad entrante evita la polimerización indeseable de la cadena. En algunas realizaciones, el grupo terminal 3' es un grupo hidroxilo 3' protegido y el método incluye desproteger o eliminar el grupo protector para producir un grupo hidroxilo 3' libre. En algunas realizaciones, el grupo terminal 3' es un grupo amino 3' protegido y el método incluye desproteger o eliminar el grupo protector para producir un grupo amino 3' libre. El grupo amino 3' o hidroxilo 3' protegido puede protegerse con un grupo protector de tritilo. En ciertas realizaciones, el grupo protector de tritilo es trifenilmetilo (Tr o Trt, Ph₃C-). En ciertas realizaciones, el grupo protector de tritilo es 4,4'-dimetoxitritilo (DMT). La desprotección del grupo amino o hidroxilo terminal 3' se puede lograr usando cualquier método conveniente. Los métodos de interés incluyen, pero no se limitan a, los métodos descritos por Beaucage y Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992). En algunos casos, la desprotección del grupo amino 3' protegido de un nucleósido terminal incluye la destritolación para producir un grupo terminal 3' libre, por ejemplo, destritolación catalizada por ácido. En algunos casos, las fosforamiditas de la subunidad dímero o monómero incluyen un grupo hidroxilo 3' o amino 3' protegido que es el mismo que el grupo terminal 3' del nucleósido terminal unido al soporte sólido.

55 Se pueden usar cualesquiera soportes de fase sólida convenientes para la síntesis de polinucleótidos de acuerdo con los métodos en cuestión. Los soportes sólidos de interés incluyen, pero no se limitan a, micropartículas de vidrio de poro controlado (CPG), poliestireno altamente entrecruzado (por ejemplo, NittoPhase HL 400 o GE Primer 350), copolímeros acrílicos, celulosa, nailon, dextrano, látex, poliacroleína, y similares, tales como los descritos en las siguientes ejemplos de referencias: *Meth. Enzymol.*, Sección A, páginas 11-147, vol. 44 (Academic Press, Nueva York, 1976); las patentes de Estados Unidos Nos. 4.678.814; 4.413.070; y 4.046.720; y Pon, Capítulo 19, en Agrawal, editor, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 20, (Humana Press, Totowa, N.J., 1993). Otros soportes de interés incluyen perlas de poliestireno; poliestireno injertado con polietilenglicol (por ejemplo, TentaGel^{MR}, Rapp Polymere, Tubingen, Alemania); y similares. La selección de las características del soporte, como el material, la porosidad, el tamaño, la forma y similares, y el tipo de fracción de enlazamiento empleada depende de una variedad de factores, tales como los grupos de protección empleados, la longitud del producto final, la cantidad de producto final, y similares. Se describen ejemplos de fracciones de enlace en Pon et al., *Biotechniques*, 6:768-775 (1988); Webb, patente de los Estados Unidos No. 4.659.774; Barany et al., solicitud internacional de patente 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 y Southern, Nucleic Acids Research, 20: 1679-1684 (1992); y similares.

En algunas realizaciones, los soportes sólidos que encuentran uso en los métodos en cuestión incluyen CPG y poliestireno injertado con polietilenglicol y que posee un grupo amino terminal (por ejemplo, TentaGel-NH₂^{MR}, Rapp Polymere, Tubingen, Alemania). El grupo aminopropilo puede usarse como un espaciador entre la CPG y el enlace nucleosídico. En algunos casos, el enlace con el hidroxilo 5' del primer nucleósido es un grupo succinilo que proporciona un enlace de éster lábil con la base que puede escindirse después de la síntesis con amoniaco acuoso.

Después de la desprotección, el nucleósido unido al soporte es capaz de reaccionar con una subunidad dimérica o monomérica de fosforamidita para formar un enlace entre nucleósidos. Se entiende que el nucleósido unido al soporte puede referirse a un solo residuo unido a un soporte sólido o puede referirse al residuo terminal de una cadena de oligonucleótidos que está unida al soporte. Cualquier química de acoplamiento conveniente, reactivos de acoplamiento y métodos pueden utilizarse en los métodos en cuestión. Cualquier selección conveniente con respecto a las condiciones de acoplamiento, grupos protectores, soportes de fase sólida, grupos de enlace, reactivos de desprotección, reactivos para escindir productos de soportes de fase sólida, purificación del producto y similares, se puede hacer en el contexto de los métodos en cuestión de acuerdo con la guía de, por ejemplo, Gait, editor, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1984); Amarnath y Broom, Chemical Reviews, vol. 77, páginas 183-217 (1977); Pon et al., Biotechniques, vol. 6, páginas 768-775 (1988); Ohtsuka et al., Nucleic Acids Research, vol. 10, páginas 6553-6570 (1982); Eckstein, editor de Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1991), Greene y Wuts "Protective Groups in Organic Synthesis", tercera edición, Wiley, Nueva York 1999, Narang, editor, Synthesis and Applications of DNA and RNA (Academic Press, Nueva York, 1987), Beaucage y Iyer, Tetrahedron 48: 2223-2311 (1992), y referencias similares.

En algunos casos, después del acoplamiento, los grupos amino 3' no reaccionados de una cadena en crecimiento unida al soporte del polinucleótido se pueden proteger opcionalmente con un agente de protección conveniente antes de la siguiente etapa de desprotección (por ejemplo, etapa de destrilación) para volverlos inertes a las siguientes etapas de acoplamiento. Esta etapa de protección puede mejorar el perfil de HPLC de la preparación para facilitar la purificación, y también puede mejorar el rendimiento general del producto. Los reactivos de protección útiles en los métodos en cuestión incluyen reactivos electrofílicos tales como anhídrido acético y anhídrido isobutírico, cloruros ácidos tales como cloruro de adamantil carbonilo, cloruro de pivaloilo y similares, isotiocianatos, cloroformatos, etc. También son útiles las fosforamiditas junto con un activador y seguido por oxidación, y sales de H-fosfonato tales como isopropil-H-fosfonato de trietilamonio usado junto con un cloruro de ácido tal como cloruro de pivaloilo o cloruro de adamantil carbonilo.

En algunas realizaciones, el método incluye oxidar un enlace de fosforamidita N3'→P5' entre nucleósidos. Como se usa en el presente documento, los términos "oxidar", "oxidación", "oxidante" y similares, en referencia a un enlace entre nucleósidos que contiene fósforo, significa un proceso o tratamiento para convertir el átomo de fósforo del enlace de una forma de fósforo (III) a una forma de fósforo (V). La oxidación de los enlaces entre nucleótidos puede realizarse en cualquier punto conveniente de la síntesis usando cualquier método conveniente. En algunas realizaciones, la oxidación se realiza de manera gradual, por ejemplo, durante cada ciclo de acoplamiento. En otras realizaciones, la oxidación de múltiples enlaces entre nucleótidos se realiza al final de la síntesis. En algunos casos, la oxidación de un enlace de fosforamidita N3'→P5' (por ejemplo, usando un agente oxidante a base de yodo/agua) produce un enlace de oxofosforamidato. En otros casos, la oxidación de un enlace de fosforamidita N3'→P5' incluye la sulfuración para producir un enlace de tiosforamidato N3'→P5'. La sulfuración puede realizarse usando cualquier método conveniente. Los métodos de sulfuración de interés incluyen los descritos por Gryazonov et al., en el documento WO2001018015 y en la patente de los Estados Unidos No. 6.114.519. Los agentes de sulfuración de interés incluyen, pero no se limitan a, azufre elemental, disulfuros de tiuram tales como disulfuro de tetraetiltiuram, disulfuros de acilo tales como disulfuro de fenacilo, disulfuro de fenilacetilo, disulfuros de fosfotioilo tales como S-Tetra^{MR} y 1,1-dioxo-3H-1,2-benzoditioil-3-ona. En algunas realizaciones, la sulfuración se puede realizar usando disulfuro de fenilacetilo en 2,6-lutidina. En ciertas realizaciones, la sulfuración puede realizarse usando el reactivo de Beaucage, usando los métodos descritos por Iyer et al., J. Organic Chemistry 55: 4693-4699, 1990.

La escisión del polinucleótido del soporte de síntesis en fase sólida puede lograrse usando cualquier método y reactivo convenientes, que pueden seleccionarse dependiendo de una variedad de factores, tales como la naturaleza del soporte, la química del enlazador y la estrategia del grupo protector utilizada durante la síntesis. Las selecciones realizadas en la síntesis y escisión de un polinucleótido objetivo pueden determinar las identidades de los productos y agentes de síntesis no objetivo presentes en la primera composición polinucleotídica.

En algunas realizaciones, antes de la escisión, los grupos protectores de fósforo del polinucleótido se eliminan para evitar la formación de aductos potenciales indeseables del grupo protector escindido (por ejemplo, el grupo protector de β-cianoetilo) con el polinucleótido. Los métodos de interés que pueden adaptarse para su uso en la desprotección y escisión de polinucleótidos incluyen los descritos en la patente de Estados Unidos No. 7.199.236. En algunas realizaciones, el polinucleótido se escinde del soporte usando una solución de amoniaco para eliminar cualquier grupo protector de base (por ejemplo, grupos protectores de aminoácidos exocíclicos) y cualquier grupo protector de fósforo restante. Se puede utilizar cualquier condición conveniente en la reacción de escisión del polinucleótido. En algunos

casos, la escisión se realiza a una temperatura en el intervalo de 40-60 °C. En algunos casos, la escisión se realiza durante un período prolongado de tiempo, tal como un tiempo en el intervalo de 12-24 horas. Después de la escisión del polinucleótido, el soporte se puede eliminar por filtración y enjuague. Las soluciones combinadas de filtrado y enjuague, que ahora contienen la preparación sintética cruda del polinucleótido, se pueden utilizar en los métodos de preparación en cuestión, antes de llevar a cabo otras etapas de purificación. En algunos casos, la purificación de una solución de polinucleótidos incluye cromatografía líquida preparativa de fase inversa de alto rendimiento (RP-HPLC), por ejemplo, usando Kromasil C18 a 45-55 °C. En algunos casos, las composiciones polinucleotídicas de los métodos en cuestión pueden someterse a cualquier número de etapas de desalación y concentración convenientes, por ejemplo, usando un aparato de filtración de flujo tangencial (TFF) equipado con membranas de polietersulfona con un tamaño de corte de diámetro de poro de 1.000 Da.

Composiciones polinucleotídicas

Los aspectos de la presente descripción incluyen composiciones salinas polinucleotídicas que incluyen contraiones catiónicos multivalentes. En algunas realizaciones, la composición incluye: una sal de un polinucleótido que incluye al menos un contraión catiónico multivalente, en el que el polinucleótido tiene una secuencia de 7 o más subunidades de nucleósidos y al menos dos de las subunidades de nucleósidos están unidas por un enlace entre subunidades de tiofosforamidato N3'→P5'. En ciertas realizaciones, el polinucleótido tiene una secuencia de 7 o más subunidades de nucleósidos complementarias al componente de ARN de la telomerasa humana.

Contraiones catiónicos multivalentes

Cualquier catión multivalente conveniente puede encontrar uso como un contraión en las sales polinucleotídicas en cuestión. Como tal, un catión multivalente puede formar un par iónico con un sitio aniónico en una cadena principal polinucleotídica en las composiciones polinucleotídicas en cuestión. Los polinucleótidos pueden incluir subunidades de nucleósidos unidas por enlaces entre subunidades que contienen fósforo (por ejemplo, enlaces P (V)) tales como fosforamidato, tiofosforamidato, éster fosfato, enlaces fosfodiéster y similares. Se entiende que los enlaces entre subunidades del polinucleótido pueden estar cargados negativamente (por ejemplo, en una solución acuosa) e iones emparejados con un contraión catiónico. Dichos enlaces entre subunidades pueden denominarse grupos aniónicos de la cadena principal del polinucleótido.

Como se usa en el presente documento, el término catión multivalente se refiere a un catión capaz de formar múltiples pares de iones, por ejemplo, un catión de carga múltiple, tal como un catión de carga doble o triple. Cualquier catión multivalente conveniente puede encontrar uso en las composiciones salinas polinucleotídicas en cuestión. En algunas realizaciones, un ión catión multivalente se empareja con dos o más grupos aniónicos adyacentes a la cadena principal polinucleotídica. En algunas realizaciones, un ión catión multivalente se empareja con un grupo aniónico de la cadena principal polinucleotídica. En algunas realizaciones, el contraión catiónico multivalente es divalente. Los contraiones catiónicos divalentes de interés incluyen, pero no se limitan a, magnesio, zinc y calcio. En algunas realizaciones, el contraión catiónico multivalente es trivalente. Los contraiones catiónicos trivalentes de interés incluyen, pero no se limitan a, aluminio. En ciertas realizaciones de la composición, al menos un contraión catiónico multivalente se selecciona del grupo que consiste en magnesio, zinc, aluminio y calcio. En ciertas realizaciones de la composición, al menos un contraión catiónico multivalente es magnesio. En ciertas realizaciones de la composición, al menos un contraión catiónico multivalente es zinc. En ciertas realizaciones de la composición, al menos un contraión catiónico multivalente es aluminio. En ciertas realizaciones de la composición, al menos un contraión catiónico multivalente es calcio.

Se entiende que el número de contraiones catiónicos que están presentes en una sal polinucleotídica depende de una variedad de factores, tales como la longitud de la cadena principal polianiónica, la valencia de los cationes en las sales, el pH de la solución, la agregación de polinucleótidos en la composición, etc. Las composiciones en cuestión pueden incluir al menos un contraión catiónico multivalente en la cadena principal polinucleotídica polianiónica en las composiciones polinucleotídicas en cuestión, tales como 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 15 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 50 o más, 100 o más, o incluso más contraiones catiónicos multivalentes. En ciertas realizaciones, un polinucleótido que tiene n subunidades de nucleósidos puede incluir entre 1 y $(n-1)/2$ (si n es un número entero impar) contraión o contraiones catiónicos divalentes o entre 1 y $(n-2)/2$ (si n es un número entero par) contraión o contraiones catiónicos divalentes. En algunos casos, una sal polinucleotídica que incluye al menos un catión multivalente, puede incluir además una variedad de otros contraiones catiónicos, que pueden ser monovalentes, divalentes o trivalentes. En ciertos casos, n está en el intervalo de 7 a 50, tal como 7 a 40, 10 a 40, 10 a 30, 10 a 25, 10 a 20, o en el intervalo de 12 a 15 subunidades de nucleósidos.

En algunas realizaciones de la composición, la sal polinucleotídica puede incluir 3% en moles o más del contraión catiónico multivalente en relación con una cadena principal polianiónica del polinucleótido (es decir, en relación con una inclusión máxima teórica de contraiones catiónicos a lo largo de la cadena principal polianiónica), tal como 4% en moles o más, 5% en moles o más, 6% en moles o más, 7% en moles o más, 8% en moles o más, 9% en moles o más, 10% en moles o más, 11% en moles o más, 12% en moles o más, 13% en moles o más, 14% en moles o más, 15% en moles o más, 16% en moles o más, 17% en moles o más, 18% en moles o más, 19% en moles o más, 20% en moles o más, 25% en moles o más, 30% en moles o más, 35% en moles o más, 40% en moles o más, 45% en moles

o más, 50% en moles o más, 55% en moles o más, 60% en moles o más, o incluso más, del contraión catiónico multivalente en relación con una cadena principal polianiónica del polinucleótido. En algunas realizaciones de las composiciones en cuestión, el polinucleótido puede incluir 10% en moles o más del contraión catiónico multivalente con respecto a una cadena principal polianiónica del polinucleótido. Por ejemplo, una sal polinucleotídica que incluye una cadena principal polianiónica de 10 enlaces de subunidades entre nucleósidos e incluye un emparejamiento de iones de contraiones catiónicos divalentes con dos de los enlaces, se describe como incluyendo 20% en moles del contraión catiónico divalente. Si el ión contraión catiónico divalente se empareja con solo uno de los enlaces en lugar de dos, se describe que la sal polinucleotídica incluye 10% en moles del contraión catiónico divalente. Como tal, el valor del porcentaje en moles se refiere a un nivel de ocupación de la cadena principal polinucleotídica polianiónica por los contraiones catiónicos multivalentes que están presentes en la sal polinucleotídica. Por ejemplo, un catión Mg^{2+} en una sal polinucleotídica de 13 mer que tiene 12 enlaces de subunidades internucleosídicas produce una de ocupación del 16,7% en moles de la cadena principal. Se entiende que en algunas realizaciones, la sal polinucleotídica puede incluir sitios de apareamiento de iones adicionales en los terminales del polinucleótido (por ejemplo, un grupo tiofosfato 5'), y si está presente, dichos sitios deberían incluirse en el valor en porcentaje en moles del compuesto.

En algunas realizaciones de la composición, la sal polinucleotídica incluye 90% en moles o menos del contraión catiónico multivalente con respecto a una cadena principal polianiónica del polinucleótido, tal como 70% en moles o menos, 65% en moles o menos, 60% en moles o menos, 50% en moles o menos, o incluso menos del contraión catiónico multivalente.

En ciertas realizaciones de la composición, la sal polinucleotídica incluye del 3 al 90% en moles del contraión catiónico multivalente en relación con una cadena principal polianiónica del polinucleótido, tal como del 3 al 65% en moles (por ejemplo, del 6 al 50% en moles, 10 a 50% en moles o 10 a 40% en moles), 3 a 50% en moles, 3 a 40% en moles, 3 a 30% en moles, 3 a 20% en moles o 3 a 15% en moles del contraión catiónico multivalente en relación con una cadena principal polianiónica del polinucleótido.

En ciertos casos de la composición, la sal polinucleotídica incluye del 3 al 60% en moles de un contraión catiónico divalente en relación con una cadena principal polianiónica del polinucleótido, tal como del 3 al 50% en moles (por ejemplo, del 5 al 50% en moles), 3 a 40% en moles, 3 a 30% en moles, 3 a 20% en moles, 3 a 15% en moles, tal como 3-12% en moles de un contraión catiónico divalente.

En ciertos casos de la composición, la sal polinucleotídica incluye del 3 al 60% en moles de un contraión catiónico de magnesio en relación con una cadena principal polianiónica del polinucleótido, tal como magnesio, 5-50% en moles, 5-40% en moles, 10-40% en moles o 20-40% en moles de un contraión catiónico de magnesio.

En ciertos casos de la composición, la sal polinucleotídica incluye del 10 al 70% en moles de un contraión catiónico trivalente en relación con una cadena principal polianiónica del polinucleótido, tal como del 10 al 60% en moles, del 20 al 60% en moles, del 20 al 50% en moles o 30 a 50% en moles de un contraión catiónico trivalente. En algunas realizaciones de la composición, la sal polinucleotídica incluye 0,5% o más en peso del contraión catiónico multivalente (por ejemplo, magnesio), tal como 0,6% o más, 0,7 % o más, 0,8% o más, 0,9% o más, 1,1% o más, 1,2% o más, 1,3% o más, 1,4% o más, 1,5% o más, 1,6% o más, 1,7% o más, 1,8% o más, 1,9% o más, 2,0% o más, 2,1% o más, 2,2% o más, 2,3% o más 2,4% o más, 2,5% o más, 2,6% o más, 2,7% o más, 2,8% o más, 2,9% o más, 3,0% o más en peso del contraión catiónico multivalente.

La sal polinucleotídica es una sal mixta que incluye una mezcla de contraiones catiónicos multivalentes y monovalentes. En ciertas realizaciones de la composición, la sal polinucleotídica incluye una relación del contraión catiónico multivalente con respecto al contraión catiónico monovalente de al menos 0,05 o más en molaridad, tal como 0,10 o más, 0,15 o más, 0,20 o más, 0,25 o más, 0,30 o más, 0,35 o más, 0,40 o más, 0,45 o más, 0,50 o más, 0,55 o más, 0,60 o más, 0,65 o más, 0,70 o más en molaridad, o incluso más del contraión catiónico multivalente con respecto al contraión catiónico monovalente.

En algunos casos, la sal polinucleotídica incluye una relación del contraión catiónico multivalente con respecto al monovalente de 1:12 en molaridad. En algunos casos, la sal polinucleotídica incluye una relación del contraión catiónico multivalente con respecto al monovalente de 1:11 en molaridad. En algunos casos, la sal polinucleotídica incluye una relación del contraión catiónico multivalente con respecto al monovalente de 1:10 en molaridad. En algunos casos, la sal polinucleotídica incluye una relación del contraión catiónico multivalente con respecto al monovalente de 1:9 en molaridad. En algunos casos, la sal polinucleotídica incluye una relación del contraión catiónico multivalente con respecto al monovalente de 1:8 en molaridad. En algunos casos, la sal polinucleotídica incluye una relación del contraión catiónico multivalente con respecto al monovalente de 1:7 en molaridad. En algunos casos, la sal polinucleotídica incluye una relación del contraión catiónico multivalente con respecto al monovalente de 1:6 en molaridad. En algunos casos, la sal polinucleotídica incluye una relación del contraión catiónico multivalente con respecto al monovalente de 1:5 en molaridad. En algunos casos, la sal polinucleotídica incluye una relación del contraión catiónico multivalente con respecto al monovalente de 1:4 en molaridad. En algunos casos, la sal polinucleotídica incluye una relación del contraión catiónico multivalente con respecto al monovalente de 2:9 en molaridad. En algunos casos, la sal polinucleotídica incluye una relación del contraión catiónico multivalente con respecto al monovalente de 3:7 en molaridad. En algunos casos, la sal polinucleotídica incluye una relación del

contraión catiónico multivalente con respecto al monovalente de 4:5 en molaridad. En algunos casos, la sal polinucleotídica incluye una relación del contraión catiónico multivalente con respecto al monovalente de 5:3 en molaridad.

5 En ciertos casos de la sal polinucleotídica mixta, el contraión catiónico multivalente es magnesio y el contraión catiónico monovalente es sodio. En ciertos casos de la sal polinucleotídica mixta, el contraión catiónico multivalente es magnesio y el contraión catiónico monovalente es amonio. En ciertos casos de la sal polinucleotídica mixta, el contraión catiónico multivalente es magnesio y el contraión catiónico monovalente es trietilamonio. En ciertos casos de la sal polinucleotídica mixta, el contraión catiónico multivalente es aluminio. En ciertos casos de la sal polinucleotídica mixta, el contraión catiónico multivalente es zinc. En ciertos casos de la sal polinucleotídica mixta, el contraión catiónico multivalente es el calcio. En ciertos casos de la sal polinucleotídica mixta, el contraión catiónico monovalente es sodio. En ciertos casos de la sal polinucleotídica mixta, el contraión catiónico monovalente es el amonio. En ciertos casos de la sal polinucleotídica mixta, el contraión catiónico monovalente es trietilamonio. En ciertas realizaciones, la sal polinucleotídica incluye un contraión catiónico multivalente. En ciertas realizaciones, la sal polinucleotídica incluye 2 contraiones catiónicos multivalentes. En ciertas realizaciones, la sal polinucleotídica incluye 3 contraiones catiónicos multivalentes. En ciertas realizaciones, la sal polinucleotídica incluye 4 contraiones catiónicos multivalentes. En ciertas realizaciones, la sal polinucleotídica incluye 5 contraiones catiónicos multivalentes. En ciertas realizaciones, la sal polinucleotídica incluye 6 contraiones catiónicos multivalentes. En ciertas realizaciones, la sal polinucleotídica incluye 7 contraiones catiónicos multivalentes. En ciertas realizaciones, la sal polinucleotídica incluye 8 contraiones catiónicos multivalentes. En ciertas realizaciones, la sal polinucleotídica incluye 9 contraiones catiónicos multivalentes. En ciertas realizaciones, la sal polinucleotídica incluye 10 contraiones catiónicos multivalentes.

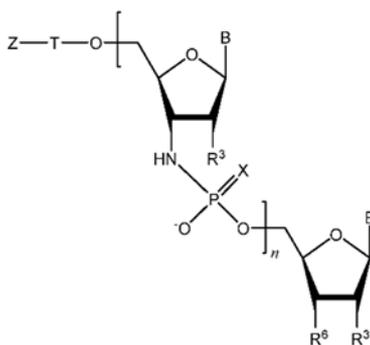
Además de un polinucleótido objetivo, se puede producir una variedad de productos de síntesis de polinucleótidos no objetivo durante la síntesis de polinucleótidos. Los productos menores que pueden estar presentes en las preparaciones de polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, productos de eliminación (por ejemplo, productos que carecen de uno o más residuos de nucleósidos), productos que incluyen uno o más grupos protectores, productos terminados (por ejemplo, productos que incluyen una cadena polinucleotídica protegida), productos que carecen de una o más nucleobases, productos que incluyen enlaces fosforamídita parcialmente oxidados y productos que incluyen enlaces parcialmente sulfurados.

Los métodos en cuestión proporcionan composiciones que incluyen una pureza mejorada de polinucleótido objetivo en la composición. En algunas realizaciones, la composición incluye 20% o más en peso del polinucleótido objetivo, tal como 25% o más, 30% o más, 35% o más, 40% o más, 45% o más, 50% o más, 60% o más, 70% o más, 80% o más, 90% o más, o incluso 95% o más en peso del polinucleótido objetivo. En ciertas realizaciones, la composición incluye 50% o más en peso del polinucleótido objetivo. En ciertas realizaciones, la composición incluye 55% o más en peso del polinucleótido objetivo. En ciertas realizaciones, la composición incluye 60% o más en peso del polinucleótido objetivo. En ciertas realizaciones, la composición incluye 65% o más en peso del polinucleótido objetivo. En ciertas realizaciones, la composición incluye 70% o más en peso del polinucleótido objetivo. En ciertas realizaciones, la composición incluye 75% o más en peso del polinucleótido objetivo. En ciertas realizaciones, la composición incluye 80% o más en peso del polinucleótido objetivo. En ciertas realizaciones, la composición incluye 85% o más en peso del polinucleótido objetivo. En ciertas realizaciones, la composición incluye 90% o más en peso del polinucleótido objetivo. En ciertas realizaciones, la composición incluye 95% o más en peso del polinucleótido objetivo.

Los métodos en cuestión proporcionan composiciones que incluyen una cantidad reducida de productos y agentes de síntesis no objetivo. Por cantidad reducida se entiende que la cantidad en peso de los productos y agentes de síntesis no objetivo en la composición se reduce en relación con un método de control. En algunas realizaciones, las composiciones en cuestión incluyen productos y agentes de síntesis no objetivo en una cantidad de 50% o menos del total de polinucleótidos no objetivo en la composición, tal como 40% o menos, 30% o menos, 25% o menos, 20% o menos, 15% o menos, 10% o menos o incluso 5% o menos de los productos y agentes de síntesis no objetivo.

Cualquiera de una amplia variedad de composiciones polinucleotídicas se puede preparar usando los métodos descritos en este documento. Una variedad de clases y tipos de polinucleótidos son de interés para la preparación usando los métodos en cuestión (por ejemplo, como se describe en el presente documento). Los polinucleótidos adecuados para la preparación de acuerdo con los métodos en cuestión incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos antisentido, polinucleótidos de ARN, polinucleótidos de ARNpi, polinucleótidos de ARNi, aptámeros de ADN, micro ARN y similares.

En algunas realizaciones, el polinucleótido se describe mediante la Fórmula (I):



Fórmula (I)

en la que:

- 5 cada B es independientemente una purina, una purina protegida, una pirimidina o una pirimidina protegida, o un análogo de la misma;
- cada X es independientemente oxígeno o azufre;
- 10 cada R³ es independientemente hidrógeno, flúor, hidroxilo, un alcoxi, un alcoxi sustituido o un hidroxilo protegido;
- R⁶ es amino, hidroxilo, un amino protegido, un hidroxilo protegido, -O-T-Z o -NH-T-Z;
- cada T es independientemente un enlazador opcional;
- cada Z es independientemente H, un lípido, un vehículo, un oligonucleótido, un polímero, un polipéptido, un marcador detectable o una etiqueta; y
- 15 n es un número entero de 1 a 1000. Se entiende que los oligonucleótidos de Fórmula (I) pueden existir en forma de sal. Como tal, los enlaces entre nucleósidos de Fórmula (I) pueden estar en forma de sal que incluye cualquier contraión conveniente. Dichas formas están destinadas a ser incluidas dentro del alcance de la presente divulgación. Se entiende que pueden ser posibles otras disposiciones tautoméricas de los enlaces entre nucleósidos del polinucleótido descrito en la Fórmula (I). Dichas formas están destinadas a ser incluidas dentro del alcance de la presente divulgación.

- 20 En algunas realizaciones de Fórmula (I), cada R³ es hidrógeno. En algunas realizaciones de Fórmula (I), cada R³ es flúor. En algunas realizaciones de Fórmula (I), cada R³ es hidroxilo. En algunas realizaciones de Fórmula (I), R⁶ es amino. En ciertas realizaciones de Fórmula (I), R⁶ es hidroxilo. En algunas realizaciones de Fórmula (I), Z es H. En algunas realizaciones de Fórmula (I), Z es un lípido (por ejemplo, como se describe en el presente documento). En algunos casos, el lípido es un ácido graso (por ejemplo, como se describe en el presente documento). En algunas realizaciones de Fórmula (I), Z es un vehículo. En algunas realizaciones de Fórmula (I), Z es un oligonucleótido. En algunas realizaciones de Fórmula (I), Z es un polímero. En algunos casos, el polímero es un PEG. En algunas realizaciones de Fórmula (I), Z es un polipéptido. En algunas realizaciones de Fórmula (I), Z es un marcador detectable. En algunas realizaciones de Fórmula (I), Z es una etiqueta. En algunas realizaciones de Fórmula (I), T está ausente.
- 30 En algunas realizaciones, cada B se selecciona independientemente de A, C, G, T y U.

- En ciertas realizaciones de Fórmula (I), n es un número entero entre 7 y 500, tal como entre 7 y 100, entre 7 y 75, entre 7 y 50, entre 7 y 40, entre 7 y 30, entre 7 y 20, entre 7 y 15, entre 10 y 15, o entre 13 y 15. En ciertas realizaciones, n es un número entero entre 7 y 100, tal como entre 7 y 50, entre 10 y 50, entre 10 y 40, entre 10 y 30, entre 10 y 25, entre 10 y 20, entre 12 y 18, o entre 12 y 16. En ciertas realizaciones, n es 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25.
- 35

Polinucleótidos complementarios al componente de ARN de la telomerasa

- 40 Los aspectos de la divulgación incluyen compuestos y composiciones que incluyen polinucleótidos complementarios al componente de ARN de la telomerasa humana, y métodos para prepararlos. Los compuestos pueden inhibir la actividad de la telomerasa en células con una alta potencia y tienen características de absorción celular.

- 45 En ciertos casos, el polinucleótido incluye una secuencia de 7 o más subunidades de nucleósidos complementarias al componente de ARN de la telomerasa humana, tal como 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 20 o más, 30 o más, 50 o más subunidades de nucleósidos complementarias al componente de ARN de la telomerasa humana.

- 50 En algunas realizaciones, el polinucleótido incluye entre 3 y 50 subunidades contiguas de nucleósidos complementarias al componente de ARN de la telomerasa humana, tal como entre 5 y 40, entre 7 y 40, 10 y 40, entre 10 y 30, entre 10 y 25, entre 10 y 20, o entre 12 y 15 subunidades de nucleósidos. En ciertas realizaciones, el polinucleótido incluye una secuencia de 7 o más subunidades contiguas de nucleósidos complementarias al componente de ARN de la telomerasa humana, tal como 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o

más, 20 o más, 30 o más, 50 o más subunidades contiguas de nucleósidos complementarias al componente de ARN de la telomerasa humana.

En algunas realizaciones, el polinucleótido es un compuesto descrito por la fórmula:



en la que O representa el polinucleótido que incluye una secuencia de subunidades de nucleósidos complementarias al componente de ARN de la telomerasa humana, x es un grupo enlazador opcional, L representa una fracción lipídica y n es un número entero de 1-5. En algunos casos, n es 5. En algunos casos, n es 4. En algunos casos, n es 3. En algunos casos, n es 2. En algunos casos, n es 1. Por lo tanto, el diseño de los compuestos requiere la selección de dos entidades, O y L, y la determinación del enlace o enlaces estructurales entre estas entidades, que pueden involucrar al grupo enlazador opcional x.

En algunas realizaciones, el compuesto polinucleotídico puede describirse mediante la fórmula:



en la que O representa el polinucleótido que incluye una secuencia de subunidades de nucleósidos complementarias al componente de ARN de la telomerasa humana, x es un grupo enlazador opcional, L representa la fracción lipídica y n es 1, tal como un polinucleótido de Fórmula (I) o una sal del mismo, en el que en la Fórmula (I), Z es la fracción lipídica, T es el enlazador opcional (por ejemplo, como se describe en el presente documento) y los grupos B corresponden a la secuencia de subunidades de nucleósidos complementarias al componente de ARN de la telomerasa humana.

El componente polinucleotídico O puede considerarse como el componente "efector" del compuesto, ya que es este componente el que efectúa la inhibición de la enzima telomerasa uniéndose al componente de ARN de la telomerasa. Por lo tanto, la secuencia de O se selecciona de modo que incluya una región que sea complementaria a la secuencia del ARN de la telomerasa, que se muestra en la SEQ ID NO: 1. La región que es complementaria al componente de ARN de la telomerasa, en teoría, puede ser dirigida a cualquier parte del ARN de la telomerasa, pero las regiones particulares del ARN de la telomerasa son objetivos preferidos para los polinucleótidos inhibitorios. Una región objetivo preferida es la región que abarca los nucleótidos 30-67 de la SEQ ID NO: 1, que incluye la "región plantilla", una región de 11 nucleótidos de secuencia 5'-CUAACCCUAAC-3' (SEQ ID NO: 21) que abarca el nucleótido 46-56 de SEQ ID NO: 1. La región plantilla funciona para especificar la secuencia de las repeticiones teloméricas que la telomerasa agrega a los extremos cromosómicos y es esencial para la actividad de la enzima telomerasa (véase Chen et al., Cell 100: 503-514, 2000; Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 98 (14): 7982-7987, 2001). Los compuestos de interés que contienen una fracción polinucleotídica que incluye una secuencia complementaria a la totalidad o parte de la región plantilla son, por lo tanto, de interés. Otra región objetivo de interés es la región que abarca los nucleótidos 137-179 de hTR (véase Pruzan et al., Nucl. Acids Research, 30: 559-588, 2002). Dentro de esta región, la secuencia que abarca 141-153 es un objetivo preferido. La publicación PCT WO 98/28442 describe el uso de polinucleótidos de al menos 7 nucleótidos de longitud para inhibir la telomerasa, en la que los polinucleótidos están diseñados para ser complementarios a porciones accesibles de la secuencia de hTR fuera de la región plantilla, incluidos los nucleótidos 137-196, 290-319 y 350-380 de hTR.

La región de O que está dirigida a la secuencia de hTR es en algunos casos exactamente complementaria a la secuencia de hTR correspondiente. Si bien se pueden tolerar desajustes en ciertos casos, se espera que disminuyan la especificidad y la actividad del conjugado polinucleotídico resultante. En algunas realizaciones, la secuencia de bases del polinucleótido O se selecciona así para incluir una secuencia de al menos 5 nucleótidos exactamente complementarios al ARN de la telomerasa, y se puede obtener una inhibición mejorada de la telomerasa si se emplean longitudes crecientes de secuencia complementaria, tal como al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 13 o al menos 15 nucleótidos exactamente complementarios al ARN de la telomerasa. En otras realizaciones, la secuencia del polinucleótido incluye una secuencia de al menos 7 a 20, de al menos 8 a 20, de al menos 10 a 20 o de al menos 10 a 15 nucleótidos exactamente complementarios a la secuencia de ARN de la telomerasa. Se puede obtener una actividad óptima inhibitoria de la telomerasa cuando se selecciona la longitud completa del polinucleótido O para que sea complementaria al ARN de la telomerasa. Sin embargo, no es necesario que la longitud total del componente polinucleotídico sea exactamente complementaria a la secuencia objetivo, y la secuencia polinucleotídica puede incluir regiones que no son complementarias a la secuencia objetivo. Dichas regiones pueden agregarse, por ejemplo, para conferir otras propiedades al compuesto, tales como secuencias que facilitan la purificación. Si el componente polinucleotídico O debe incluir regiones que no son complementarias a la secuencia objetivo, tales regiones pueden posicionarse en uno o ambos de los extremos 5' o 3'. En los casos en que la región de complementariedad exacta se dirige a la región plantilla, se puede lograr una inhibición efectiva de la telomerasa con una región corta (5-8 nucleótidos) de complementariedad exacta a la que se une una secuencia similar a la telomerasa (rica en G) en el extremo 5'.

Los ejemplos de secuencias que son complementarias al ARN de la telomerasa humana y que pueden incluirse como parte del componente polinucleotídico O, o que pueden usarse como el componente polinucleotídico completo O incluyen las siguientes:

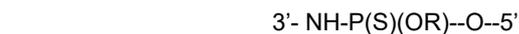
5 secuencias complementarias de hTR (regiones de la secuencia polinucleotídica SEQ ID NO: 1 de la publicación de patente de Estados Unidos No. 2012329858);

GGGUUGCGGA GGGUGGGCCU GGGAGGGGUG GUGGCCAUUU
 UUUGUCU AAC CCUAACUGAG AAGGGCGUAG GCGCCGUGCU
 UUUGCUC CCC GCGCGCUGUU UUUCUCGCUG ACUUUCAGCG
 GGCGGAAAAG CCUCGGCCUG CCGCCUCCA CCGUUCAUUC
 UAGAGCAAAC AAAAAAUGUC AGCUGCUGGC CCGUUCGCCC
 CUCCCGGGGA CCUGCGGCGG GUCGCCUGCC CAGCCCCCGA ACCCCGCCUG
 GAGGCCGCGG UCGGCCCGGG GCUUCUCCGG AGGCACCCAC UGCCACCGCG
 AAGAGUUGGG CUCUGUCAGC CGCGGGUCUC UCGGGGGCGA
 GGGCGAGGUU CAGCCUUUC AGGCCGCAGG AAGAGGAACG
 GAGCGAGUCC CCGCGCGCGG CGCGAUUCCC UGAGCUGUGG
 GACGUGCACC CAGGACUCGG CUCACACAUG C (SEQ ID NO: 1)

10 GCTCTAGAATGAACGGTGAAGGCGGCAGG 137-166 (SEQ ID NO: 2)
 GTGGAAGGCGGCAGG 137-151 (SEQ ID NO: 6)
 GGAAGGCGGCAGG 137-149 (SEQ ID NO: 7)
 GTGGAAGGCGGCA 139-151 (SEQ ID NO: 8)
 GTGGAAGGCGG 141-151 (SEQ ID NO: 9)
 CGGTGGAAGGCGG 141-153 (SEQ ID NO: 10)
 15 ACGGTGGAAGGCG 142-154 (SEQ ID NO: 11)
 AACGGTGAAGGCGGC 143-155 (SEQ ID NO: 12)
 ATGAACGGTGAAGGCGG 144-158 (SEQ ID NO: 13)
 ACATTTTTTGTGCTCTAG 160-179 (SEQ ID NO: 14)
 TAGGGTTAGACAA 42-54 (SEQ ID NO: 3)
 20 GTTAGGGTTAG 46-56 (SEQ ID NO: 4)
 GTTAGGGTTAGAC 44-56 (SEQ ID NO: 15)
 GTTAGGGTTAGACAA 42-56 (SEQ ID NO: 16)
 GGGTTAGAC 44-52 (SEQ ID NO: 19)
 CAGTTAGGG 50-58 (SEQ ID NO: 20)
 25 CCCTTCTCAGTT 54-65 (SEQ ID NO: 17)
 CGCCCTTCTCAG 56-67 (SEQ ID NO: 18)

30 En algunas realizaciones, el polinucleótido incluye una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 4); TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3); y CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 5).

La elección del tipo de enlaces entre nucleósidos utilizados en la síntesis del componente O puede hacerse a partir de cualquiera de las químicas de polinucleótidos disponibles, que incluyen, pero no se limitan a, fosfodiéster, fosfotriéster, metilfosfonato, fosforamidoato P3'→N5', fosforamidoato N3'→P5', tiosforamidoato N3'→P5', y enlaces de fosforotioato. En algunas realizaciones, el componente polinucleotídico O tiene al menos un enlace de tiosforamidoato N3'→P5'. En ciertas realizaciones, las subunidades de nucleósidos complementarias al componente de ARN de la telomerasa humana están todas unidas por enlaces entre subunidades de tiosforamidoato N3'→P5'. En ciertos casos, el enlace entre subunidades de tiosforamidoato N3'→P5' tiene la siguiente estructura:



en la que R es hidrógeno, o una sal de la misma. Se entiende que para cualquiera de los componentes polinucleotídicos O descritos en el presente documento que incluyen dicho enlace entre subunidades, dichos componentes polinucleotídicos O también pueden incluir cualquier forma de sal conveniente del enlace. Como tal, el enlace entre subunidades puede estar en forma de sal que incluya cualquier contraión conveniente.

45 En algunas realizaciones, al menos dos de las subunidades de nucleósidos están unidas por un enlace entre subunidades de tiosforamidoato N3'→P5', y los otros enlaces entre subunidades se seleccionan independientemente cada uno de los enlaces entre subunidades oxo-fosforamidoato N3'→P5' y tiosforamidoato N3'→P5'. En algunas realizaciones, las subunidades de nucleósidos están unidas mediante enlaces entre subunidades, que se seleccionan cada uno independientemente de enlaces entre subunidades de oxofosforamidoato N3'→P5' y tiosforamidoato N3'→P5'. En algunas realizaciones, las subunidades de nucleósidos están unidas mediante enlaces entre

subunidades, seleccionados cada uno independientemente enlaces entre subunidades de oxofosforamido N3'→P5' y tiofosforamido N3'→P5'; siempre que al menos dos de las subunidades de nucleósidos estén unidas por un enlace entre subunidades de tiofosforamido N3'→P5'. En algunas realizaciones, las subunidades de nucleósidos están unidas todas por enlaces entre subunidades de tiofosforamido N3'→P5'.

5 En algunas realizaciones, el componente polinucleotídico O tiene la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), y las subunidades de nucleósidos están unidas mediante enlaces entre subunidades que comprenden al menos un enlace de tiofosforamido N3'→P5'. En algunas realizaciones, el componente polinucleotídico O tiene la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), y las subunidades de nucleósidos están unidas mediante enlaces entre subunidades que comprenden al menos dos enlaces de tiofosforamido N3'→P5'. En algunas realizaciones, el componente polinucleotídico O tiene la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), y las subunidades de nucleósidos están unidas mediante enlaces entre subunidades que comprenden al menos tres enlaces de tiofosforamido N3'→P5'. En algunas realizaciones, el componente polinucleotídico O tiene la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), y las subunidades de nucleósidos están unidas mediante enlaces entre subunidades que comprenden al menos cuatro enlaces de tiofosforamido N3'→P5'. En algunas realizaciones, el componente polinucleotídico O tiene la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), y las subunidades de nucleósidos están unidas mediante enlaces entre subunidades que comprenden al menos cinco enlaces de tiofosforamido N3'→P5'. En algunas realizaciones, el componente polinucleotídico O tiene la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), y las subunidades de nucleósidos están unidas mediante enlaces entre subunidades que comprenden al menos seis enlaces de tiofosforamido N3'→P5'. En algunas realizaciones, el componente polinucleotídico O tiene la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), y las subunidades de nucleósidos están unidas mediante enlaces entre subunidades que comprenden al menos siete enlaces de tiofosforamido N3'→P5'. En algunas realizaciones, el componente polinucleotídico O tiene la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), y las subunidades de nucleósidos están unidas mediante enlaces entre subunidades que comprenden al menos ocho enlaces de tiofosforamido N3'→P5'. En algunas realizaciones, el componente polinucleotídico O tiene la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), y las subunidades de nucleósidos están unidas mediante enlaces entre subunidades que comprenden al menos nueve enlaces de tiofosforamido N3'→P5'. En algunas realizaciones, el componente polinucleotídico O tiene la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), y las subunidades de nucleósidos están unidas mediante enlaces entre subunidades que comprenden al menos diez enlaces de tiofosforamido N3'→P5'. En algunas realizaciones, el componente polinucleotídico O tiene la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), y las subunidades de nucleósidos están unidas mediante enlaces entre subunidades que comprenden al menos once enlaces de tiofosforamido N3'→P5'. En algunas realizaciones, el componente polinucleotídico O tiene la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), y las subunidades de nucleósidos están unidas mediante enlaces entre subunidades cada uno independientemente seleccionado de enlaces entre subunidades de oxo-fosforamido N3'→P5' y tiofosforamido N3'→P5'. En algunas realizaciones, el componente polinucleotídico O tiene la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), y las subunidades de nucleósidos están unidas mediante enlaces entre subunidades cada uno independientemente seleccionado de enlaces entre subunidades de oxo-fosforamido N3'→P5' y tiofosforamido N3'→P5'; siempre que al menos dos de las subunidades de nucleósidos estén unidas por un enlace entre subunidades de tiofosforamido N3'→P5'. En algunas realizaciones, el componente polinucleotídico O tiene la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3), y las subunidades de nucleósidos están unidas por enlaces entre subunidades de tiofosforamido N3'→P5'.

45 En todas las realizaciones anteriores y posteriores, los enlaces entre subunidades de tiofosforamido N3'→P5' son en particular -NH-P(=O)(SH)-O- o un tautómero del mismo, o una sal del mismo; y los enlaces entre subunidades de oxo-fosforamido N3'→P5' son en particular -NH-P(=O)(OH)-O- o un tautómero del mismo, o una sal del mismo. Más en particular, en todas las realizaciones anteriores y posteriores, los enlaces entre subunidades de tiofosforamido N3'→P5' son en particular -NH-P(=O)(SH)-O- o un tautómero de los mismos, o una sal sódica del mismo; y los enlaces entre subunidades de oxo-fosforamido de N3'→P5' son en particular -NH-P(=O)(OH)-O- o un tautómero del mismo, o una sal sódica del mismo.

55 En una de las realizaciones, la invención se refiere a una cualquiera de las estructuras específicas descritas en el presente documento en las que opcionalmente uno o más, en particular uno, de los enlaces entre subunidades de tiofosforamido N3'→P5' se reemplazan por enlaces entre subunidades de oxo-fosforamido N3'→P5'. En una de las realizaciones, la invención se refiere a una cualquiera de las estructuras específicas descritas en el presente documento en las que uno o más, en particular uno, de los enlaces entre subunidades de tiofosforamido N3'→P5' se reemplazan por enlaces entre subunidades de oxofosforamido N3'→P5'.

60 En algunos casos, los compuestos en cuestión son más efectivos en la producción de inhibición de la telomerasa en las células que los polinucleótidos correspondientes que no están conjugados con componentes lipídicos. Se cree que el componente lipídico L funciona para mejorar la captación celular del compuesto, particularmente facilitando el paso a través de la membrana celular. Si bien el mecanismo por el cual esto ocurre no se ha dilucidado completamente, una posibilidad es que el componente lipídico pueda facilitar la unión del compuesto a la membrana celular como una sola molécula o como una forma agregada (micelar), con posterior internalización. Sin embargo, no se requiere la comprensión del mecanismo preciso para utilizar los compuestos en cuestión.

El componente lipídico puede ser cualquier lípido o derivado lipídico que proporcione una captación celular mejorada en comparación con el polinucleótido no modificado. Los lípidos de interés incluyen, pero no se limitan a, hidrocarburos, grasas (por ejemplo, glicéridos, ácidos grasos y derivados de ácidos grasos, tales como amidas grasas) y esteroides. Cuando el componente lipídico es un hidrocarburo, el componente L puede ser un hidrocarburo cíclico sustituido o no sustituido o un hidrocarburo alifático de cadena lineal o ramificada, que puede estar saturado o insaturado. Los ejemplos incluyen hidrocarburos no ramificados de cadena lineal que están completamente saturados o poliinsaturados. La longitud de la cadena de hidrocarburos puede variar de C2-C30, pero la inhibición óptima de la telomerasa se puede obtener con cadenas carbonadas que son C8-C22. A continuación se enumeran ejemplos de hidrocarburos saturados (alcanos) de interés:

Nombre sistemático/cadena carbonada

Tetradecano C₁₄H₃₀

Pentadecano C₁₅H₃₂

Hexadecano C₁₆H₃₄

Heptadecano C₁₇H₃₆

Octadecano C₁₈H₃₈

Nonadecano C₁₉H₄₀

Eicosano C₂₀H₄₂

También se pueden seleccionar formas monoinsaturadas y poliinsaturadas (alquenos y polienos, tales como alcadienos y alcatrienos) de hidrocarburos, siendo interesantes los compuestos que tienen uno a tres enlaces dobles, aunque se pueden emplear compuestos que tienen más enlaces dobles. También se pueden utilizar alquinos (que contienen uno o más enlaces triples) y alquilenos (triple o triples enlaces y doble o dobles enlaces).

Las formas sustituidas de hidrocarburos pueden emplearse en los compuestos en cuestión, con grupos sustituyentes de interés que son inertes *in vivo* e *in vitro*. En algunos casos, el sustituyente es flúor. Los ejemplos de estructuras genéricas de hidrocarburos polifluorados incluyen: CF₃(CF₂)_n-(CH₂)_m- en la que m es al menos 1, en algunos casos al menos 2, y n es 1 a 30, tal como fluorotridecano: CF₃(CF₂)₉(CH₂)₃; y CH₃(CH₂)_a(CF₂)_b(CH₂)_c- en la que a, b y c son independientemente 1-30.

Otros componentes lipídicos adecuados de interés incluyen, pero no se limitan a, ácidos grasos simples y derivados de ácidos grasos, glicéridos y lípidos más complejos tales como esteroides, por ejemplo colesterol. Los ácidos grasos y sus derivados de interés pueden estar completamente saturados o mono o poliinsaturados. La longitud de la cadena carbonada puede variar de C2-C30, pero la inhibición óptima de la telomerasa se puede obtener con cadenas de carbono que son C8-C22. A continuación se enumeran ejemplos de ácidos grasos saturados de interés:

Nombre sistemático/Nombre trivial/Cadena carbonada

Mirístico tetradecanoico 14:0

Palmítico hexadecanoico 16:0

Estearico octadecanoico 18:0

Araquídico eicosanoico 20:0

Se pueden emplear también formas monoinsaturadas y poliinsaturadas de ácidos grasos, siendo interesantes los compuestos que tienen de uno a tres dobles enlaces, aunque también se pueden emplear compuestos que tienen más dobles enlaces. Los ejemplos de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados comunes de interés que pueden emplearse incluyen:

Nombre sistemático/Nombre trivial/Cadena carbonada

Palmitoleico cis-9-hexadecanoico 16:1 (n-7)

Petroselínico cis-6-octadecanoico 18:1 (n-12)

Oleico cis-9-octadecanoico 18:1 (n-9)

Linoleico 9,12-octadecadienoico 18:2 (n-6)

Gamma-linoleico 6,9,12-octadecatrienoico 18:3 (n-6)

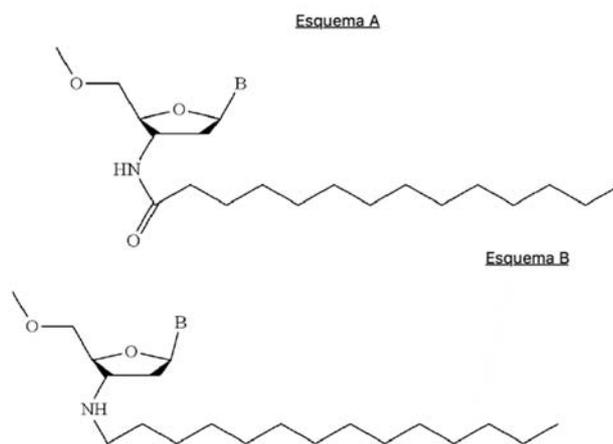
Alfa-linoleico 9,12,15-octadecatrienoico 18:3 (n-3)

Araquidónico 5,8,11,14-eicosatetraenoico 20:4 (n-6)

Los ácidos grasos con uno o más enlaces triples en la cadena carbonada, así como los ácidos grasos ramificados también pueden emplearse en los compuestos en cuestión. Se pueden emplear formas sustituidas de ácidos grasos en los compuestos en cuestión. Al igual que con los grupos hidrocarbonados, los grupos sustituyentes que son inertes *in vivo* e *in vitro* son de interés, tal como el flúor. Ejemplos de estructuras genéricas de derivados polifluorados de ácidos grasos adecuados para su uso en la invención son: CF₃(CF₂)_n-(CH₂)_mCO- en la que m es al menos 1, preferiblemente al menos 2, y n es 1 a 30, y CH₃(CH₂)_a(CF₂)_b(CH₂)_cCO- en la que a, b y c son independientemente 1-30.

En algunos casos, entre uno y cinco componentes L (n es 1, 2, 3, 4 o 5) están unidos covalentemente al componente O, a través de un enlazador opcional. En algunos casos, se utilizan uno o dos componentes L (n = 1 o 2). Cuando más de un componente L está enlazado al componente O, cada componente L se selecciona independientemente.

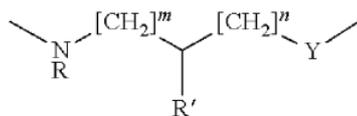
Se apreciará que los compuestos de la invención descritos por tener un hidrocarburo especificado como la fracción L y los compuestos descritos por tener un ácido graso especificado (con el mismo número de átomos de carbono que el hidrocarburo especificado) están estrechamente relacionados y difieren en estructura solo en la naturaleza del enlace que une la fracción L al polinucleótido, que a su vez es el resultado del procedimiento de síntesis utilizado para producir el compuesto. Por ejemplo, y como se describe con más detalle a continuación, cuando se sintetizan compuestos que tienen la fracción L conjugada con el extremo amino 3' de un polinucleótido (que tiene enlaces entre nucleósidos de fosforamidato o tiofosforamidato), el uso de la forma aldehído de un ácido graso (un aldehído graso) como material de partida da como resultado la formación de un enlace amina entre la cadena lipídica y el polinucleótido, de modo que el grupo lipídico aparece como un hidrocarburo. Por el contrario, el uso de las formas de ácido carboxílico, anhídrido de ácido o cloruro de ácido del mismo ácido graso da como resultado la formación de un enlace amida, de modo que el grupo lipídico aparece como un derivado de ácido graso, específicamente en este caso una amida grasa (como se menciona en la sección de definiciones anterior, en aras de la simplicidad, el término "ácido graso" cuando se describe el grupo L conjugado se usa ampliamente en el presente documento para incluir derivados de ácido graso, incluidas amidas grasas). Esto se ilustra en los siguientes esquemas que representan el extremo amino 3' de un polinucleótido de fosforamidato unido a un componente lipídico C14. En el esquema A, L es ácido tetradecanoico (ácido mirístico), en el que la conexión entre los grupos L y O es una amida. En el esquema B, L es tetradecano y la conexión entre los grupos L y O es una amina.



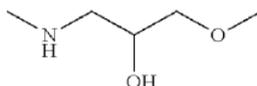
El enlace entre los componentes O y L puede ser un enlace directo, o puede ser a través de una fracción enlazadora opcional, por ejemplo, x o enlazador opcional T de Fórmula (I). El grupo enlazador puede servir para facilitar la síntesis química de los compuestos. Ya sea que se use o no un grupo enlazador para mediar la conjugación de los componentes O y L, existen múltiples sitios en el componente polinucleotídico O con los que el o los componentes L pueden conjugarse convenientemente. Los puntos de enlace adecuados incluyen los extremos 5' y 3', uno o más anillos de azúcar, la cadena principal entre nucleósidos y las nucleobases del polinucleótido. En algunos casos, la fracción L está unida al extremo 3' o 5' del polinucleótido.

Si el componente L se va a unir al terminal 3', la unión puede ser directamente al sustituyente 3', que en el caso de los polinucleótidos de fosforamidato y tiofosforamidato preferidos es el grupo amino 3', y en otros ejemplos, como los polinucleótidos de fosfodiéster convencionales, es un grupo 3-hidroxi. Alternativamente, la fracción L puede unirse a través de un grupo fosfato unido a 3', en el que un hidrocarburo de hexadecano está unido al fosfato 3' de un polinucleótido de tiofosforamidato a través de un enlazador de O-alkilo. Si la fracción L se va a unir al extremo 5', se puede unir a través de un grupo fosfato unido a 5'. La unión a una base en la fracción O puede ser a través de cualquier átomo adecuado, por ejemplo al grupo amino N2 de guanosina. Cuando n > 1 tal que una pluralidad de fracciones lipídicas se unirá al componente O, los componentes L seleccionados individualmente se pueden unir en cualquier sitio o sitios convenientes. Por ejemplo, un grupo L puede estar unido a cada terminal, varios grupos L pueden estar unidos a las bases, o dos o más grupos L pueden estar unidos en un extremo.

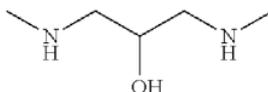
El componente enlazador opcional x puede usarse para unir los componentes O y L de los compuestos. Se entiende que el enlazador opcional (por ejemplo, x o T de Fórmula (I)) puede estar unido al polinucleótido (por ejemplo, O) a través de un grupo fosfato terminal, por ejemplo, un grupo fosfato enlazado a 3' o enlazado a 5'. Si se va a emplear un enlazador, se incorpora en los procedimientos de síntesis como se describe en este documento. Los ejemplos de grupos enlazadores adecuados incluyen enlazadores de tipo amino glicerol y O-alkil glicerol que pueden representarse respectivamente mediante las estructuras genéricas:



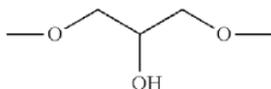
5 en las que R' es H, OH, NH₂ o SH; Y es O, S o NR; R es H, un alquilo o un alquilo sustituido; y n y m son cada uno independientemente números enteros entre 1-18. Los ejemplos de enlazadores adecuados de interés son el enlazador aminoglicerol en el que R' es OH, Y es O, y m y n son cada uno 1:



10 el enlazador de bis-aminoglicerol, en el que R' es OH, Y es NH, y m y n son cada uno 1:

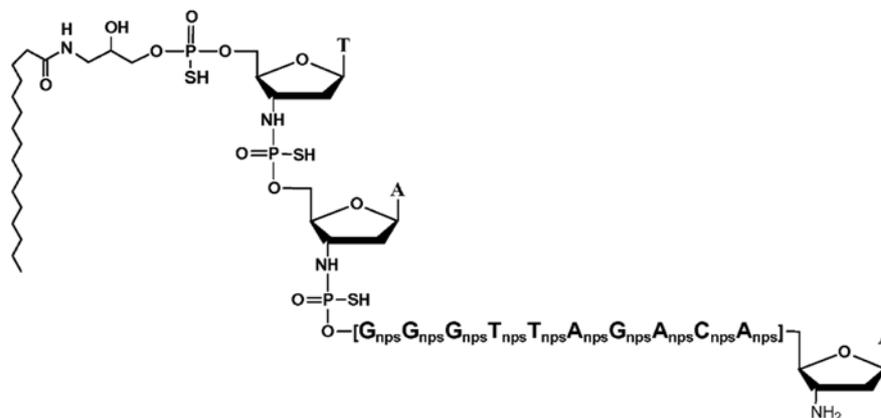


15 y el enlazador O-alkilglicerol en el que R es H:



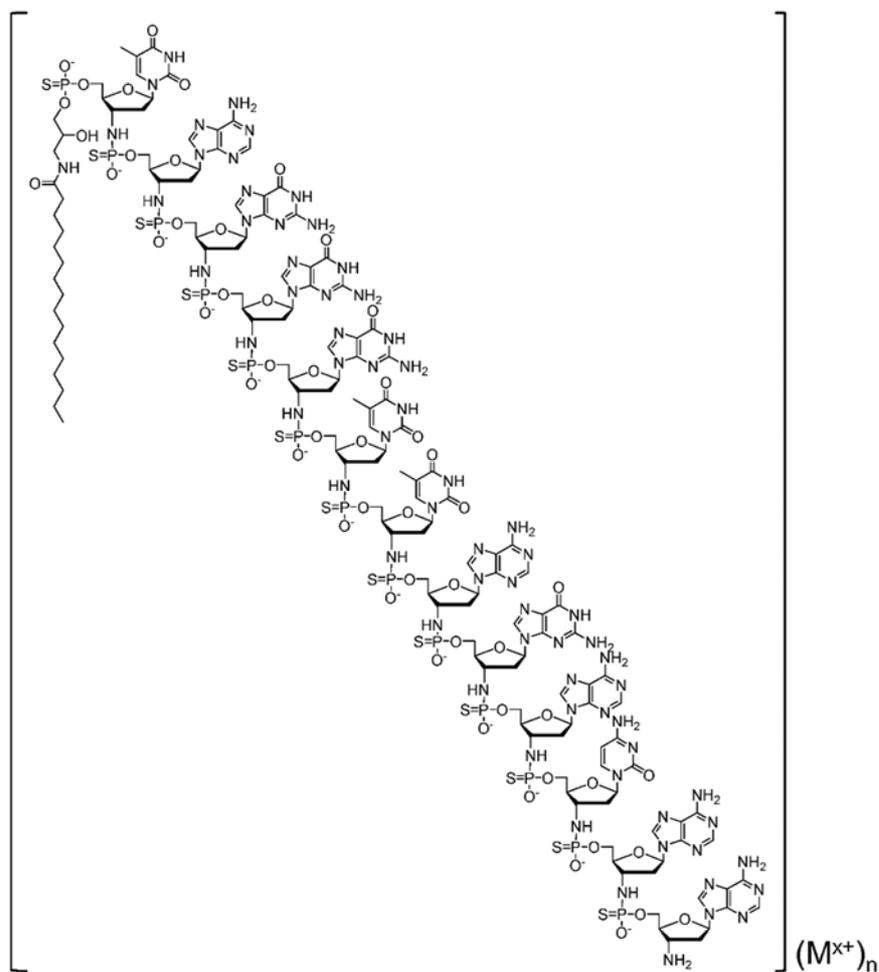
20 Los ejemplos de polinucleótidos modificados con lípidos que pueden prepararse de acuerdo con los métodos en cuestión incluyen aquellos compuestos descritos en la Figura 1 (por ejemplo, Figuras 1A-1DD) de la solicitud de patente de los Estados Unidos US20120329858 de Gryaznov et al., "Modified oligonucleotides for telomerase inhibition", cuya descripción se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

En ciertas realizaciones, la composición incluye un compuesto descrito por la estructura:



25 o una sal del mismo, en la que "nps" representa un enlace de tiosforamidato (por ejemplo, -NH-P(=O)(SH)-O- o un tautómero del mismo, o una sal del mismo), que conecta el carbono 3' de un nucleósido al carbono 5' del nucleósido adyacente. Se entiende que el compuesto descrito en la fórmula anterior puede existir en forma de sal. Dichas formas, en la medida en que puedan existir, están destinadas a ser incluidas dentro del alcance de la presente divulgación. En ciertas realizaciones, la composición incluye una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto. En ciertos casos, la composición incluye una sal de sodio del compuesto. En ciertas realizaciones, la composición incluye una sal catiónica divalente del compuesto, tal como una sal de magnesio del compuesto. En ciertas realizaciones, la composición incluye una sal catiónica trivalente del compuesto, tal como una sal de aluminio del compuesto.

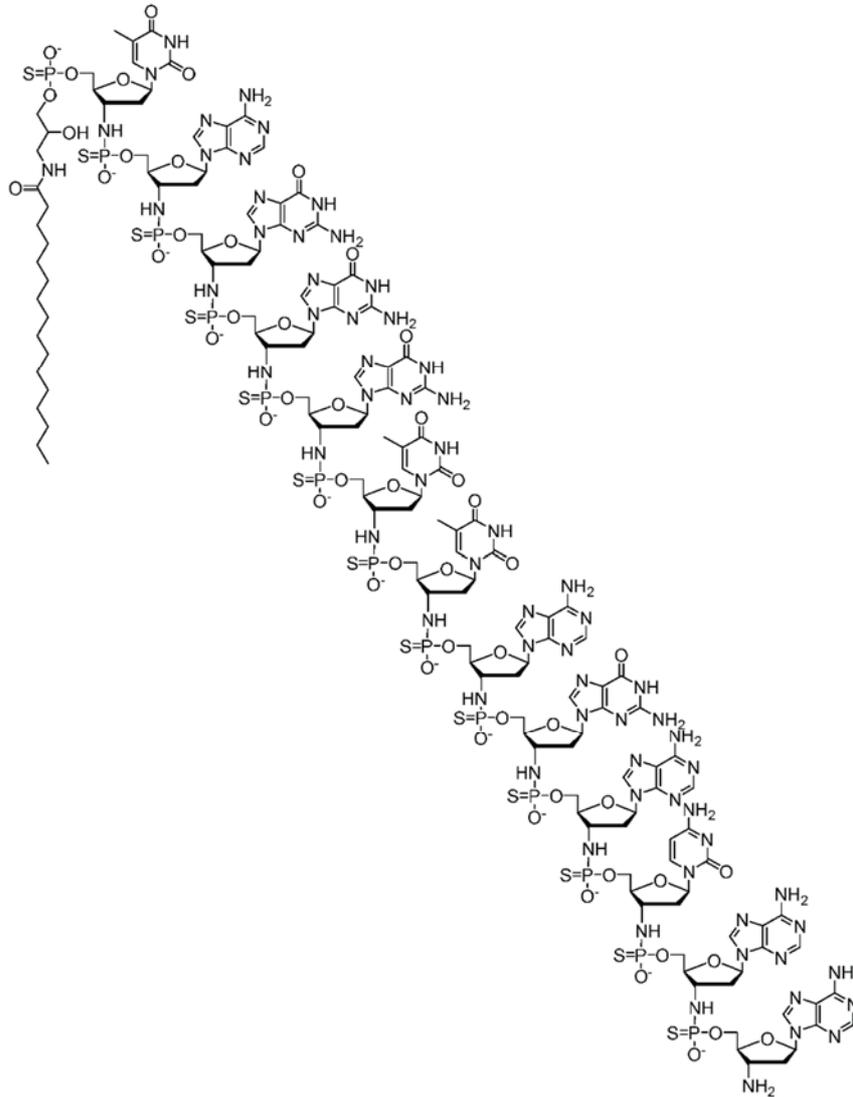
35 En ciertas realizaciones, la composición incluye un compuesto descrito por la siguiente estructura:



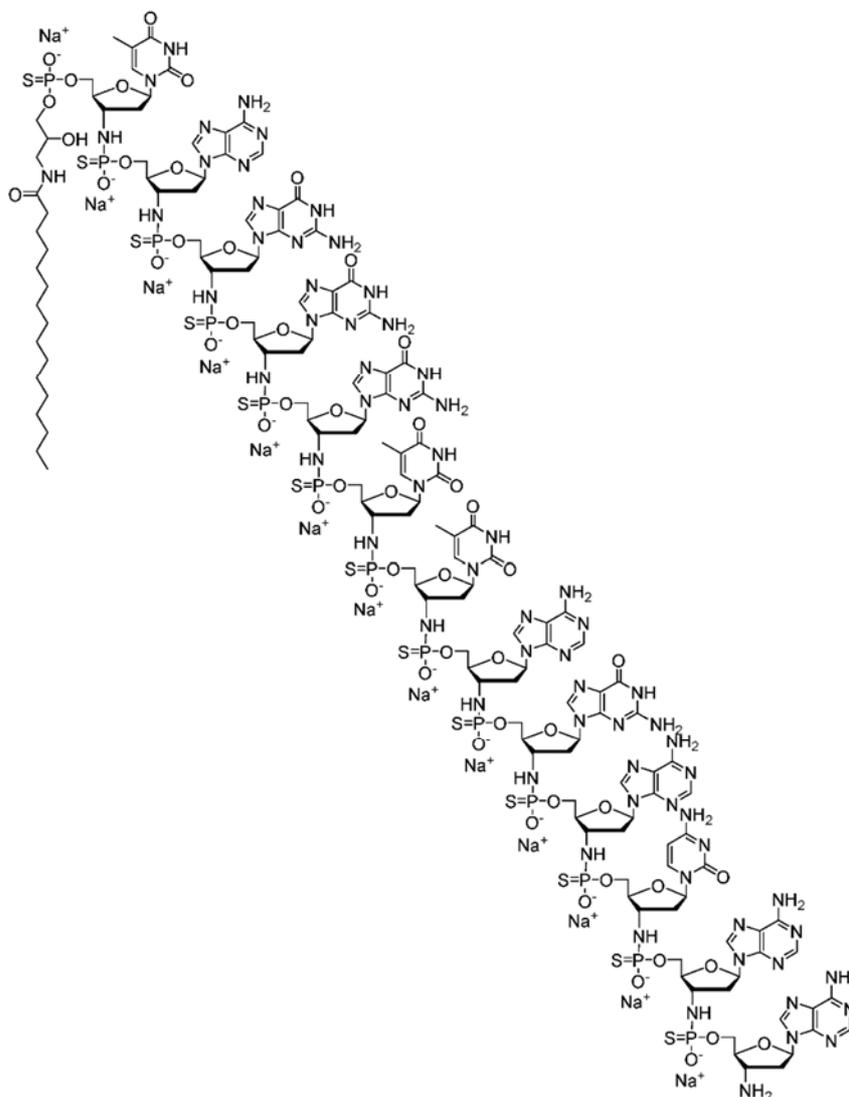
en la que cada M^{x+} es independientemente hidrógeno o cualquier contraión conveniente de una sal, cada x es independientemente 1, 2 o 3 y n es un número entero de 5 a 13. En algunos casos, n es 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13.

5 En ciertos casos, cada x es independientemente 1, 2 o 3 y n es un número entero de 5 a 12. En ciertos casos, n es 13. En ciertos casos, cada x es 1. En ciertos casos, cada x es independientemente 1 o 2. En ciertos casos, cada x es independientemente 1 o 3. En ciertos casos, cada M^{x+} es independientemente un contraión catiónico. En ciertos casos, cada M^{x+} es independientemente un contraión catiónico, cada x es independientemente 1, 2 o 3 y n es un número entero de 5 a 12. En ciertos casos, cada M^{x+} es independientemente hidrógeno o cualquier contraión catiónico conveniente, cada x es independientemente 1, 2 o 3 y n es un número entero de 5 a 12. En ciertos casos, M^{x+} es hidrógeno. En algunas realizaciones, $(M^{x+})_n$ es $(Mg^{2+})(M^+)_{11}$. En algunas realizaciones, $(M^{x+})_n$ es $(Mg^{2+})_2(M^+)_{9}$. En algunas realizaciones, $(M^{x+})_n$ es $(Mg^{2+})_2(M^+)_{9}$. En algunas realizaciones, $(M^{x+})_3$ es $(Mg^{2+})_3(M^+)_{7}$. En algunas realizaciones, $(M^{x+})_n$ es $(Mg^{2+})_4(M^+)_{5}$. En algunas realizaciones, $(M^{x+})_n$ es $(Mg^{2+})_5(M^+)_{3}$. En algunas realizaciones, $(M^{x+})_n$ es $(Mg^{2+})_6(M^+)_{1}$. En algunas realizaciones, $(M^{x+})_n$ es $(Mg^{2+})(M^+)_{12}$, en la que el contraión Mg^{2+} puede formar un par iónico adicional con la cadena principal aniónica del otro oligonucleótido. En algunas realizaciones, $(M^{x+})_n$ es $(Mg^{2+})_2(M^+)_{11}$, en la que los contraiones de Mg^{2+} pueden formar dos pares iónicos adicionales con la cadena o cadenas principales aniónicas de uno o dos del otro u otros oligonucleótidos. En ciertos casos, el contraión M^+ de la sal mixta de magnesio es sodio. En ciertos casos, el contraión M^+ de la sal mixta de magnesio es amonio. En ciertos casos, el contraión M^+ de la sal mixta de magnesio es trietilamonio.

20 En ciertas realizaciones, la composición incluye un compuesto descrito por la siguiente estructura y puede incluir cualesquiera contraiones catiónicos convenientes de una sal:



En ciertas realizaciones, la composición incluye un compuesto descrito por la estructura:



Polinucleótidos modificados con lípidos

- 5 Se puede usar una variedad de enfoques sintéticos para conjugar una fracción lipídica L con el polinucleótido, dependiendo de la naturaleza del enlace seleccionado, incluyendo los enfoques descritos en Mishra et al., (1995) *Biochemica et Biophysica Acta*, 1264: 229-237, Shea et al., (1990) *Nucleic Acids Res.* 18: 3777-3783, y Rump et al., (1998) *Bioconj. Chem* 9: 341-349. La síntesis de compuestos en los que la fracción lipídica se conjuga en el extremo 5' o 3' del polinucleótido se puede lograr mediante el uso de grupos funcionales adecuados en el extremo apropiado,
- 10 en algunos casos un grupo amino o un grupo hidroxilo, que puede reaccionar con ácidos carboxílicos, cloruros ácidos, anhídridos y ésteres activos. Los grupos tiol también pueden usarse como grupos funcionales (véase Kupihar et al., (2001) *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 9: 1241-1247). Ambos modificadores de amino y tiol de diferentes longitudes de cadena están disponibles comercialmente para la síntesis de polinucleótidos. Los polinucleótidos que tienen enlaces de tiofosforamido $N3' \rightarrow P5'$ contienen grupos amino 3' (en lugar de 3'-hidroxilo que se encuentran en la mayoría de las químicas de polinucleótidos convencionales) y, por lo tanto, estos polinucleótidos proporcionan una
- 15 oportunidad única para conjugar grupos de lípidos al extremo 3' del polinucleótido

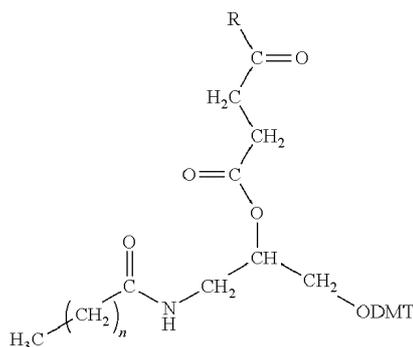
Se pueden usar diversos enfoques para unir grupos de lípidos a los extremos de polinucleótidos con la química de tiofosforamido $N3' \rightarrow P5'$ (por ejemplo, un enlazador de palmitoilamido-1-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2-O-succinil propanodiol). Para la unión al extremo 3', los compuestos conjugados pueden sintetizarse haciendo reaccionar el grupo amino 3' libre del polinucleótido unido al soporte sólido totalmente protegido con el anhídrido de ácido correspondiente seguido de desprotección con amoníaco y purificación. Alternativamente, el acoplamiento de ácidos carboxílicos de lípidos al grupo amino 3' libre del polinucleótido unido al soporte usando agentes de acoplamiento tales como carbodiimidas, HBTU (hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronio) o yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio pueden usarse para conjugar los grupos lipídicos. Estos dos métodos forman un enlace amida

20 entre el lípido y el polinucleótido. Los lípidos también pueden unirse a la cadena polinucleotídica usando un derivado de fosforamido del lípido acoplado a los polinucleótidos durante el alargamiento de la cadena. Este enfoque produce

25

un enlace fosforamidato (por ejemplo, tiofosforamidato) que conecta el lípido y el polinucleótido (ejemplificado por compuestos de propil-palmitoilo y 2-hidroxipropil-palmitoilo). Aún otro enfoque implica la reacción del grupo amino 3' libre del polinucleótido unido al soporte completamente protegido con un aldehído lipídico adecuado, seguido de reducción con cianoborohidruro de sodio, que produce un enlace amina.

Para la unión al extremo 5', el polinucleótido puede sintetizarse usando un soporte sólido modificado que contiene lípidos, seguido de síntesis del polinucleótido en la dirección 5' a 3' como se describe en Pongracz y Gryaznov (1999). A continuación se proporciona un ejemplo del soporte modificado. En el caso en que $n = 14$, el ácido graso es ácido palmítico: la reacción de 3-amino-1,2-propanodiol con cloruro de palmitoilo, seguida de dimetoxitritilación y succinilación proporcionó el compuesto intermedio utilizado para el acoplamiento al soporte sólido. En algunos casos, R puede ser alquilamina de cadena larga con vidrio de poro controlado. En ciertos casos, R es un soporte sólido polimérico.



Utilidad

Los métodos y composiciones de la invención, por ejemplo, como se describió anteriormente, encuentran uso en una variedad de aplicaciones. Las aplicaciones de interés incluyen, pero no se limitan a: aplicaciones terapéuticas, aplicaciones de diagnóstico, aplicaciones de investigación y aplicaciones de detección, como se revisa con mayor detalle a continuación.

Los compuestos en cuestión encuentran uso en una variedad de aplicaciones terapéuticas. En algunas realizaciones, los métodos para producir un polinucleótido se aplican para preparar polinucleótidos que proporcionan un beneficio terapéutico. Los tipos de enfermedades que se pueden tratar usando las composiciones de la presente invención son ilimitadas. Por ejemplo, las composiciones pueden usarse para el tratamiento de una serie de enfermedades genéticas. En algunas realizaciones, los métodos y composiciones en cuestión tienen aplicaciones antisentido. En algunas realizaciones, los métodos y composiciones en cuestión tienen aplicaciones antigénicas. En ciertas realizaciones, los métodos y composiciones en cuestión tienen aplicaciones de inhibición de la telomerasa, tales como las descritas en la patente de los Estados Unidos No. 6.835.826 y la publicación de la solicitud de los Estados Unidos No. 20120329858.

La presente descripción proporciona compuestos que pueden inhibir de forma específica y potente la actividad de la telomerasa, y que, por lo tanto, pueden usarse para inhibir la proliferación de células positivas para la telomerasa, tales como las células tumorales. Se ha demostrado que una gran variedad de células cancerosas son positivas para telomerasa, incluidas las células de cáncer de piel, tejido conectivo, adiposo, mama, pulmón, estómago, páncreas, ovario, cuello uterino, útero, riñón, vejiga, colon, próstata, sistema nervioso central (SNC), retina y tumores hematológicos (tales como mieloma, leucemia y linfoma). Los cánceres de interés incluyen, pero no se limitan a, mielofibrosis, trombocitemia, síndrome mielodisplásico y leucemia mielógena.

Los compuestos en cuestión pueden usarse para tratar tumores malignos hematológicos y trastornos mieloproliferativos, que incluyen, pero no se limitan a, trombocitemia esencial (ET), policitemia vera (PV), leucemia mielógena crónica (CML), mielofibrosis (MF), leucemia neutrofílica crónica, leucemia eosinofílica crónica y leucemia mielógena aguda (AML). Los compuestos en cuestión se pueden usar para tratar síndromes mielodisplásicos, que incluyen enfermedades tales como anemia refractaria, anemia refractaria con blastos excesivos, citopenia refractaria con displasia multilineaje, citopenia refractaria con displasia de un solo linaje y leucemia mielomonocítica crónica (CMML). Los compuestos en cuestión pueden usarse para tratar enfermedades hematológicas, tales como las descritas en el documento WO 2014/088785.

En consecuencia, los compuestos proporcionados en el presente documento son ampliamente útiles en el tratamiento de una amplia gama de tumores malignos. En algunos casos, los compuestos en cuestión pueden ser efectivos al proporcionar tratamientos que discriminan en gran medida entre las células malignas y las normales, evitando muchos de los efectos secundarios perjudiciales presentes en la mayoría de los regímenes quimioterapéuticos actuales que dependen de agentes que matan indiscriminadamente las células en división. Además, en algunos casos, los

compuestos modificados con lípidos en cuestión son más potentes que los oligonucleótidos no conjugados equivalentes, lo que significa que pueden administrarse a dosis más bajas, proporcionando una mayor seguridad y reducciones significativas en el coste del tratamiento. Los inhibidores de la telomerasa pueden emplearse junto con otros enfoques de tratamiento del cáncer, incluida la extirpación quirúrgica de tumores primarios, agentes quimioterapéuticos y tratamiento con radiación. Por lo tanto, la invención se refiere a compuestos y composiciones proporcionados en el presente documento para uso como medicamento. La invención también se refiere a compuestos y composiciones proporcionados en el presente documento para su uso en el tratamiento o prevención de cualquiera de los tumores malignos mencionados anteriormente.

Los compuestos y métodos en cuestión encuentran uso en una variedad de aplicaciones de diagnóstico, que incluyen, pero no se limitan a, el desarrollo de diagnósticos clínicos, por ejemplo, diagnósticos *in vitro* o agentes para formación de imágenes de tumores *in vivo*. Dichas aplicaciones son útiles para diagnosticar o confirmar el diagnóstico de una enfermedad o la susceptibilidad a la misma. Los métodos también son útiles para monitorear la progresión de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento en pacientes que han sido diagnosticados previamente con la enfermedad.

Ejemplos

Ejemplo 1: Resumen

Estos ejemplos describen experimentos para preparar diversas formas divalentes o trivalentes de Imetelstat, tales como Ca, Ba, Mg, Al, Fe, Cu y Zn a partir de la forma de sal de sodio de Imetelstat. En estos experimentos, se evaluaron las mejoras en la pureza utilizando métodos de preparación que implican la formación y el aislamiento de sales de los cationes bi-dentados o tri-dentados que pueden unirse con uno, dos o tres grupos fosfato de Imetelstat. También se estudió la solubilidad y la osmolalidad de las formas salinas resultantes.

La preparación de sales de Imetelstat Calcio, Imetelstat Bario, Imetelstat Magnesio, Imetelstat Aluminio, Imetelstat Fe (II o III), e Imetelstat Cúprico se investigaron usando CaCl_2 , MgCl_2 , BaCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 , AlCl_3 , FeCl_2 y FeCl_3 .

Se estudiaron tres métodos para el intercambio de sal: uso de una resina de intercambio catiónico fuerte (FINEX MFG 210), precipitación y disolución simple. Cuando la solución de Imetelstat Sodio se pasó a través de una resina intercambiada con CaCl_2 , BaCl_2 o MgCl_2 , las soluciones de eluato contenían polvos finos, lo que indica que los contraiones de sodio se intercambiaron con éxito desde la cadena principal de Imetelstat y se reemplazaron con contraiones de calcio, bario o magnesio. Para los otros cinco reactivos (CuCl_2 , ZnCl_2 , AlCl_3 , FeCl_2 , FeCl_3) que se equilibraron con la resina de intercambio catiónico, la parte superior de la resina en la columna se agregó cuando se pasó a través suyo la solución de Imetelstat, lo que también indica que los contraiones de sodio se intercambiaron con éxito de la columna principal de Imetelstat.

Los métodos de precipitación y disolución también se probaron usando un exceso de reactivos de sal. Cuando se trató un gran exceso de reactivo salino (por ejemplo, 900 equivalentes) con Imetelstat Sodio, se formó un precipitado. Los precipitados se aislaron por filtración. Pruebas posteriores indican que eran necesarios de siete a cincuenta equivalentes de reactivos de sal inorgánica para convertir todo el Imetelstat en un precipitado.

Se trataron cinco equivalentes de las tres sales inorgánicas (Mg, Ba o Ca) con forma de sal de Imetelstat TEA (trietilamonio) o de sal de Imetelstat Na. Se confirmó que no se produjo precipitación y las soluciones se desalaron y se liofilizaron. El análisis del polvo liofilizado por AA de llama (absorción atómica) mostró que se intercambiaron algunos de los contraiones de sodio de Imetelstat.

Se realizó un experimento adicional con MgCl_2 usando de uno a nueve equivalentes de catión de magnesio con la forma de Imetelstat. Los contraiones de sodio se intercambiaron parcialmente por contraiones de Mg, produciéndose el mayor intercambio con nueve equivalentes de MgCl_2 , con las composiciones resultantes mostrando un 1,2% en peso de Na y un 1,1% en peso de Mg.

Ejemplo 2: Materiales y equipos

Los reactivos inorgánicos, disolventes orgánicos y otros materiales utilizados para el estudio se enumeran en la Tabla 1. Imetelstat Sodio (CAS # 1007380-31-5) del Lote # de G163/LG-13002 proporcionado por Geron se usó para el estudio. Imetelstat amonio es una composición cruda derivada de la escisión de Imetelstat a partir de un soporte de síntesis en fase sólida usando amoníaco y etanol (por ejemplo, de acuerdo con lo descrito por Gryaznov et al., en el documento US 20120329858) y se obtuvo del patrón del fabricante. Imetelstat TEA (forma de trietilamonio) es una composición derivada de un eluato de columna de purificación por HPLC en la que se usa una fase móvil que contiene acetato de trietilamonio (TEAA) (por ejemplo, de acuerdo con lo descrito por Gryaznov et al., en el documento US 20120329858) y se obtuvo del patrón del fabricante obtenido de varios estudios de desarrollo de procesos. La ultrafiltración se realizó usando una celda de ultrafiltración agitada (Amicon 8400, Millipore) con membranas PES de 1 KD. La liofilización se realizó usando un concentrador de velocidad al vacío (ScanSpeed 40, LaboGene).

Ejemplo 3: Procedimiento

Intercambio mediante columna de resina de intercambio iónico

Se preparó una columna de resina de intercambio catiónico fuerte, FINEX MFG 210, que tenía un volumen de columna de 200 mL (4,6 cm x 12 cm) y la resina se lavó con NaOH 1 M y agua. La columna se equilibró luego con una solución 1 M de cada sal de interés. En total, se prepararon y usaron ocho soluciones salinas 1 M (CaCl₂, MgCl₂, BaCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, AlCl₃, FeCl₂ y FeCl₃) en estos experimentos. Se añadió a la columna una solución de 50 mL de Imetelstat Sodio a razón de 100 mg/mL.

En el caso de las columnas equilibradas con CuCl₂, ZnCl₂, AlCl₃, FeCl₂ y FeCl₃, se observó la agregación de Imetelstat en la resina en la parte superior de la columna cuando se cargó Imetelstat Sodio en la columna.

Las tres columnas equilibradas con CaCl₂, MgCl₂ y BaCl₂, las soluciones salinas no dieron como resultado ninguna agregación de Imetelstat en la columna e Imetelstat se recuperó del eluato de la columna, que se observó como soluciones turbias. Los polvos finos se recuperaron de estos eluatos por centrifugación (4000 rpm, 20 min). Después de la centrifugación, se confirmó que el sobrenadante no contenía Imetelstat por análisis de HPLC. Esto indica que la precipitación y separación de sales de calcio, magnesio y bario de Imetelstat se logró con éxito.

Mediante precipitación

La cristalización o precipitación de formas divalentes o trivalentes de Imetelstat se investigó usando un gran exceso de sales inorgánicas de interés (900 equivalentes, con base en el peso). Se prepararon soluciones de sal 1M de CaCl₂, MgCl₂, BaCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, AlCl₃, FeCl₂ y FeCl₃. Se mezclaron tres tipos de solución de Imetelstat: solución cruda de Imetelstat (sal de amonio), Imetelstat purificado (forma de sal de trietilamonio (TEA)) e Imetelstat Sodio (forma de sal de Na), con cada solución de sal.

Todas las soluciones mixtas mostraron precipitados de Imetelstat, que se aislaron fácilmente por filtración con un papel de filtro Advantec 2. Este resultado indica que la precipitación y separación de sales multivalentes de Imetelstat se logró con éxito.

Las solubilidades de los precipitados aislados en las condiciones de gran exceso de reactivo salino se investigaron inicialmente utilizando los siguientes disolventes: agua, acetonitrilo, MeOH, EtOH, IPA (alcohol isopropílico), NaOH 0,1 M, HCl 0,1 M, NaCl 1 M y NMP.

Para las sales precipitadas en un gran exceso de reactivo salino, las sales de calcio, bario y magnesio de Imetelstat fueron solubles en una solución de NaOH 0,1 M y NaCl 1 M (véase la Tabla 2). Los estudios de solubilidad del precipitado de Imetelstat obtenido de un gran exceso de reactivo salino de magnesio se realizaron en soluciones de NaCl 1 M a diferentes concentraciones (2 mg/mL a 6 mg/mL) y en diferentes condiciones de pH (pH 8, 9, 10, 11, 12) y se analizaron por HPLC (véanse los cromatogramas de la Figura 1). Se observó que el precipitado de Imetelstat era soluble a 6 mg/mL y pH 11 a pH 12. El compuesto también mostró estabilidad hasta pH 12 sin ningún precipitado (Figura 1).

Mediante disolución

30 a 50 equivalentes de reactivo salino

Se investigó el número de equivalentes de reactivos de sal de interés que podrían lograr una precipitación completa de Imetelstat añadiendo el reactivo salino de interés etapa a etapa. Se observó la formación completa de precipitado en el intervalo de 7 a 50 equivalentes de reactivo salino agregado para las ocho sales enumeradas en la Tabla 3. A medida que se agregaron más equivalentes de reactivos de sal, se observó una tendencia hacia la formación de gel con precipitación para todas las sales.

Se usaron tres tipos de solución de Imetelstat: Imetelstat amonio crudo (forma cruda), Imetelstat trietilamonio (forma de sal de TEA purificada) e Imetelstat Sodio (forma de sal de Na), se mezclaron con cada solución de sal. La sal de Imetelstat amonio se usó como una solución de NH₄OH o como una solución en agua. Las soluciones de Imetelstat amonio e Imetelstat TEA requirieron aproximadamente 50 equivalentes o 30 equivalentes de reactivo salino de Mg, respectivamente, para lograr la precipitación completa.

La solubilidad de los precipitados formados a partir de la solución de Imetelstat TEA y la solución de Imetelstat amonio se investigaron en diversas condiciones de pH de pH 8 a pH 12. Después de dejar las soluciones mezcladas durante 6 horas a temperatura ambiente, la solubilidad de los precipitados de Imetelstat-Mg se analizó por absorbancia UV a 260 nm. Ambos precipitados obtenidos del Imetelstat amonio y el Imetelstat TEA mostraron una tendencia similar en cuanto a que más sal de Imetelstat se disolvió en una solución de NaCl 1 M a pH alto (véase la Tabla 3).

Este resultado sugiere que cuando se controla el número de equivalentes de reactivo salino de interés en relación con Imetelstat, se puede lograr la precipitación completa de la sal de Imetelstat por cualquier método conveniente para producir un precipitado que pueda redisolverse con éxito.

5 equivalentes de reactivo salino

5 La solución de Imetelstat Sodio (100 mg en 1 mL de agua) se mezcló con 5 equivalentes de ocho reactivos de sal y cada solución se desaló por ultrafiltración usando una celda de ultrafiltración agitada y una membrana de 1 KD. La solución ultrafiltrada se liofilizó a continuación. El polvo resultante se analizó para determinar el contenido de Na y cada contraíón metálico de interés mediante AA de llama (espectroscopía de absorción atómica. Como se muestra en las Figuras 2 y 3, el contenido más alto de contraíón metálico fue del 1,1% en peso para Zn, Al y Mg, con contenidos de Na de 2,6%, 1,7% y 2,6%, respectivamente.

10

6 a 9 equivalentes de reactivo salino

15 Se realizó la adición de 6 a 9 equivalentes de reactivo salino de magnesio a la solución de Imetelstat Sodio y la posterior ultrafiltración y liofilización proporcionaron el producto sólido que era completamente soluble en agua. Se realizó el análisis del contenido de sodio y magnesio (véanse los resultados en la Figura 3). La adición de nueve equivalentes de MgCl₂ a la solución de Imetelstat Sodio, produce una composición en la que el contenido de contraíones de Na y Mg es 1,1% y 1,2% en peso, respectivamente.

20 1 a 10 equivalentes de reactivo salino

25 Para investigar el intercambio de Mg con contraíones de TEA en la sal de Imetelstat TEA en comparación con la sal de Imetelstat Sodio, se diseñó y realizó otro conjunto de experimentos. Se mezclaron de uno a diez equivalentes de MgCl₂ en soluciones acuosas con solución de sal de Imetelstat TEA (pureza > 90% por HPLC). Se realizó un análisis del contenido de contraíones de Mg después de la ultrafiltración y liofilización. Los resultados se muestran en la Figura 4. La adición de hasta 10 equivalentes de reactivo de MgCl₂ produjo una composición que tenía 1,6% en peso de Mg.

Ejemplo 4: Conclusión

30 La preparación de formas de sal divalente y trivalente de Imetelstat se logró incluyendo sales de calcio, magnesio, zinc, aluminio, bario, hierro (II), hierro (III) y cobre. Cuando se usó un exceso controlado de reactivos de sal inorgánica seleccionados (véanse las Tablas 2 y 3) para precipitar el polinucleótido, se formaron precipitados que podrían redisolverse posteriormente y que muestran una pureza mejorada con respecto a las impurezas de elución rápida usando análisis por HPLC.

35 El uso de un reactivo salino de magnesio produjo un precipitado sólido soluble de Imetelstat después de la etapa de intercambio. Se produjeron precipitados que alcanzaron un 1,2% en peso del contraíón de magnesio con respecto al 1,1% en peso del contraíón de sodio.

40 La precipitación de Imetelstat usando sales divalentes o trivalentes proporciona la eliminación de productos y reactivos sintéticos no objetivo que permanecen en solución. La eliminación de tales impurezas presentes en las soluciones crudas de Imetelstat proporciona varias ventajas para las etapas posteriores de purificación por cromatografía de Imetelstat, tales como carga reducida de la columna, resolución mejorada, número reducido de etapas de purificación de la cromatografía y vida útil mejorada de las columnas de cromatografía, menores costes de purificación y purificaciones más rápidas.

45

Tabla 1. Sales inorgánicas, disolventes orgánicos y otros materiales.

Material	Fórmula molecular (peso molecular)	Grado o pureza
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O (PM 147,01)	≥ 99 %
Clorhidrato de magnesio monohidratado	MgCl ₂ ·H ₂ O (PM 203,30)	≥ 99 %
Cloruro de bario dihidratado	BaCl ₂ ·2H ₂ O (PM 244,26)	≥ 99 %
Cobre (II) cloruro dihidratado	CuCl ₂ ·2H ₂ O (PM 170,48)	≥ 99 %
Cloruro de Zinc	ZnCl ₂ (PM 136,30)	≥ 98 %
Cloruro de aluminio hexahidratado	AlCl ₃ ·6H ₂ O (PM 241,43)	≥ 95 %
cloruro de hierro (II) tetrahidratado	FeCl ₂ ·4H ₂ O (PM 198,81)	≥ 98 %
cloruro de hierro (III) hexahidratado	FeCl ₃ ·6H ₂ O (PM 270,30)	≥ 98 %
Cloruro de sodio	NaCl (PM 58,4)	grado USP

Tabla 2

(O: Sí, X: No, "-" significa no realizado)		Prueba realizada									
Método	Imetelstat probado	CaCl ₂	MgCl ₂	BaCl ₂	CuCl ₂	ZnCl ₂	AlCl ₃	FeCl ₂	FeCl ₃		
Resina de intercambio iónico	Sodio (forma de Na, 100 mg/mL)	O	O	O	X	X	X	X	X		
	Filtración de precipitados	X	X	X	-	-	-	-	-		
	Solubilidad* del precipitado	X	X	X	-	-	-	-	-		
Precipitación (900 equivalentes)	Sodio (forma de Na, 100 mg/mL)	O	O	O	X	X	X	X	X		
	TEA (35 mg/mL)	O	O	O	X	X	X	X	X		
	Crudo (en NH ₄ OH)	X	X	X	-	-	-	-	-		

*Probado en acetoneitrilo, MeOH, EtOH, IPA, agua, NMP, HCl 1 M, NaCl 1 M, NaOH 1 M
 ** Probado en acetoneitrilo, MeOH, EtOH, IPA, agua, NMP, HCl 1 M, NaCl 1 M

Tabla 3

Disolución	Sodio	Equivalentes de sal inorgánica para lograr precipitación completa	9	15	12	7	50	50	10	11
	TEA		15	30	30	10	50	10	50	10
	Crudo (en NH ₄ OH)		-	>50	-	-	-	-	-	-
	Crudo (en agua)		-	30	-	-	-	-	-	-
Solubilidad NaCl (1 mL)		Imetelstat-Mg ppt	pH 8		pH 9	pH 10	pH 11		pH 12	
	TEA	6 mg (después de 64 horas)	28 OD		31 OD	70 OD	290 OD		434 OD	
	Crudo	Imetelstat-Mg ppt	pH 8		pH 9	pH 10	pH 11		pH 12	
	(en agua)	6 mg (después de 6 horas)	10 OD		7 OD	17 OD	111 OD		377 OD	

Listado de secuencias

- 5 <110> Geron Corporation Ramiya, Premchandran H.
 - <120> Métodos de preparación de polinucleótidos usando composiciones de sales de catiónicas multivalentes
 - <130> 186/002
 - 10 <150> US 62/151.891
 - <151> 2015-04-23
 - <160> 23
 - 15 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
 - <210> 1
 - <211> 451
 - 20 <212> ARN
 - <213> Secuencia artificial
 - <220>
 - <223> Oligonucleótido sintético
 - 25 <400> 1
- ```

ggguugcgga gggugggcu gggagggug gggccauu uuugucuaac ccuaacugag 60
aagggcguag gcgccgugc uuugcuccc gcgcguguu uuucucgug acuuucagcg 120
ggcggaaaag ccucggccug cgcuccuucca ccguucauuc uagagcaaac aaaaaauguc 180
agcugcuggc ccguucgccc cucccgggga ccugcgcgcg gucgcccugc cagccccga 240
accccgccug gaggcgcgcg ucggcccggg gcuucuccgg aggcacccac ugccaccgcg 300
aagaguuggg cucugucagc cgcgggucuc ucgggggcga gggcgagguu caggccuuuc 360
aggccgcagg aagaggaacg gagcgagucc ccgcgcgcg cgcgauuccc ugagcugugg 420
gacgugcacc caggacucgg cucacacaug c 451

```
- 30 <210> 2
  - <211> 30
  - <212> ADN
  - <213> Secuencia artificial
  - 35 <220>
  - <223> Oligonucleótido sintético
  - <400> 2
  - gctctagaat gaacggtgga aggcggcagg 30
  - 40 <210> 3
  - <211> 13

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 3  
 tagggttaga caa 13  
  
 10 <210> 4  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 4  
 gtagggta g 11  
 20  
 <210> 5  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 5  
 30 cagtagggt tag 13  
  
 <210> 6  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 6  
 40 gtggaaggcg gcagg 15  
  
 <210> 7  
 <211> 13  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 50  
 <400> 7  
 ggaaggcggc agg 13  
  
 <210> 8  
 55 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 8  
 gtggaaggcg gca 13  
  
 65 <210> 9  
 <211> 11

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 9  
 gtggaaggcg g 11  
  
 10 <210> 10  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 10  
 20 cgtggaagg cgg 13  
  
 <210> 11  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 11  
 30 acggtggaag gcg 13  
  
 <210> 12  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 12  
 40 aacggtggaaggcg 16  
  
 <210> 13  
 <211> 18  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 50  
 <400> 13  
 atgaacggtg gaaggcgg 18  
  
 <210> 14  
 55 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 14  
 acatttttg ttgctctag 20  
  
 65 <210> 15  
 <211> 13

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 15  
 tagggtaga caa 13  
  
 10 <210> 16  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 16  
 gtagggta g 11  
 20  
 <210> 17  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 17  
 30 gtagggta gac 13  
  
 <210> 18  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 18  
 40 gtagggta gaaa 15  
  
 <210> 19  
 <211> 12  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 50  
 <400> 19  
 cccttctag tt 12  
  
 <210> 20  
 55 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 20  
 cgcccttc ag 12  
  
 65 <210> 21  
 <211> 9

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 21  
gggtagac 9

10 <210> 22  
<211> 9  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 22  
cagtaggg 9

<210> 23

25 <211> 11  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

30 <400> 23  
cuaaccuaa c 11

## REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un polinucleótido, comprendiendo el método:

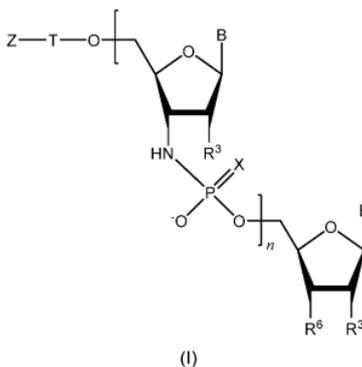
- 5 a) poner en contacto una primera composición polinucleotídica con una sal catiónica multivalente para precipitar una primera sal polinucleotídica;  
 b) separar la primera sal polinucleotídica de la primera composición polinucleotídica contactada para producir una segunda composición polinucleotídica que comprende la primera sal polinucleotídica;  
 en el que la primera composición polinucleotídica comprende:

- 10 (i) un polinucleótido que tiene una secuencia de 7 o más subunidades de nucleósidos y al menos dos de las subunidades de nucleósidos están unidas por un enlace entre subunidades de tiofosforamidato N3'→P5';  
 y  
 (ii) productos y reactivos sintéticos solubles no objetivo

- 15 c) poner en contacto la segunda composición polinucleotídica de la etapa (b) con un soporte de cromatografía de fase inversa; y  
 d) eluir a partir del soporte de cromatografía de fase inversa una tercera composición polinucleotídica que comprende una segunda sal polinucleotídica soluble.

20 2. El método de la reivindicación 1, en el que todas las subunidades de nucleósidos están unidas mediante enlaces entre subunidades, cada una seleccionada independientemente entre un enlace entre subunidades de tiofosforamidato N3'→P5' y el enlace entre subunidades de fosforamidato N3'→P5'.

25 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el polinucleótido se describe mediante la Fórmula (I):



en la que:

- 30 cada B es independientemente una purina, una purina protegida, una pirimidina o una pirimidina protegida, o un análogo de la misma;  
 cada X es independientemente oxígeno o azufre;  
 cada R<sup>3</sup> es independientemente hidrógeno, flúor, hidroxilo, un alcoxi, un alcoxi sustituido o un hidroxilo protegido;  
 35 R<sup>6</sup> es amino, hidroxilo, un amino protegido, un hidroxilo protegido, -O-T-Z o -NH-T-Z;  
 cada T es independientemente un enlazador opcional;  
 cada Z es independientemente H, un lípido, un vehículo, un oligonucleótido, un polímero, un polipéptido, un marcador detectable o una etiqueta; y  
 n es un número entero de 7 a 100.

40 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que:

- el polinucleótido comprende una secuencia que comprende 13 o más subunidades de nucleósidos complementarias al componente de ARN de la telomerasa humana, o  
 45 el polinucleótido comprende entre 10 y 50 subunidades contiguas de nucleósidos complementarias al componente de ARN de la telomerasa humana.

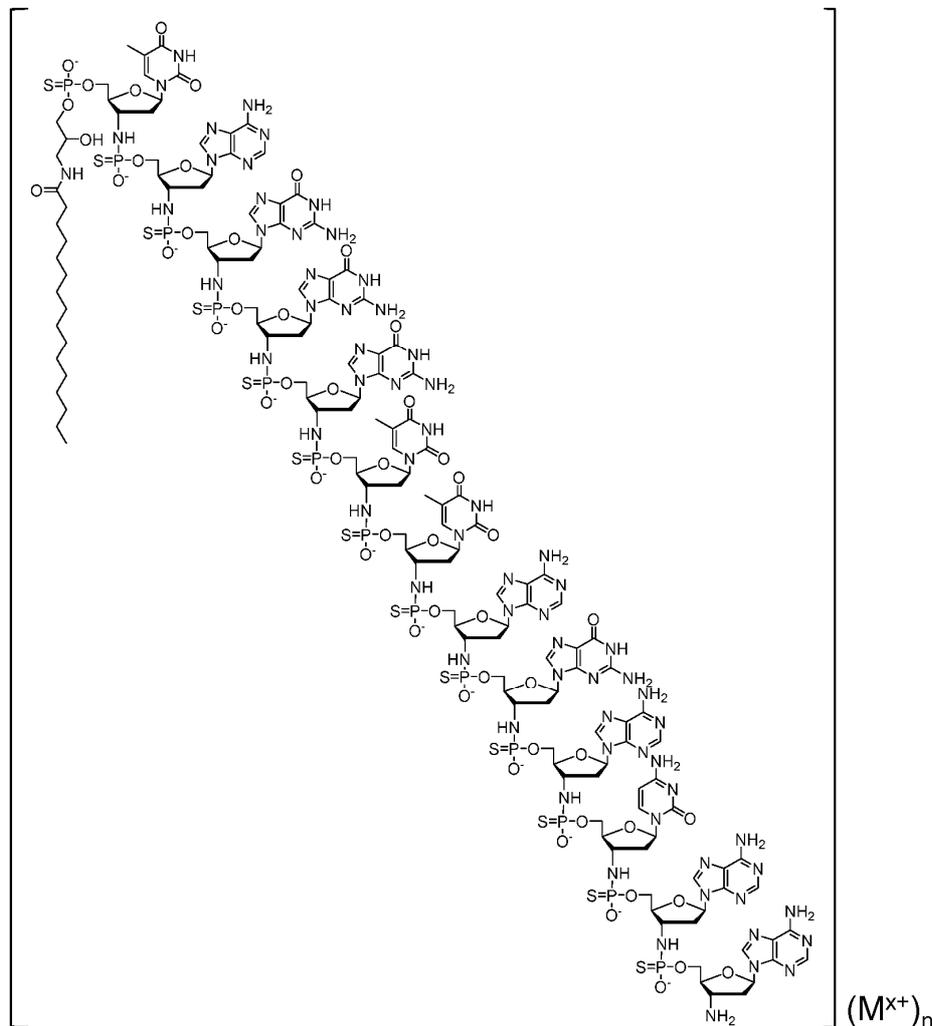
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que todas las subunidades de nucleósidos están unidas por enlaces entre subunidades de tiofosforamidato N3'→P5'.

50 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el polinucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 4), TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) y CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 5)

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el polinucleótido se conjuga con una fracción lipídica a través de un enlazador opcional.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la segunda sal polinucleotídica tiene la estructura:

5



en la que cada  $M^{x+}$  es independientemente hidrógeno o un contraión catiónico, cada  $x$  es independientemente 1, 2 o 3 y  $n$  es un número entero de 5 a 13.

10

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que después de la etapa de elución d) la segunda sal polinucleotídica es una sal farmacéuticamente aceptable del polinucleótido.

15

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que después de la etapa de elución d), la segunda sal polinucleotídica es una sal catiónica monovalente del polinucleótido, preferiblemente una sal de sodio del polinucleótido.

20

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además, antes de la etapa de contacto a), escindir el polinucleótido de un soporte de síntesis en fase sólida para producir la primera composición polinucleotídica como una preparación sintética cruda del polinucleótido.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que antes de la etapa de contacto a) la primera composición polinucleotídica comprende una sal catiónica monovalente del polinucleótido.

25

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la etapa de contacto a) comprende cargar y eluir la primera composición polinucleotídica de un soporte de intercambio catiónico.

30

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que la etapa de separación b) comprende centrifugar la primera composición polinucleotídica contactada para sedimentar el primer precipitado de sal polinucleotídica, o filtrar la primera sal polinucleotídica de la primera composición polinucleotídica contactada.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que la segunda composición polinucleotídica de la etapa b) se carga directamente en el soporte de cromatografía de fase inversa.

5 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende además, antes de la etapa de contacto c), disolver la segunda composición polinucleotídica en un disolvente.

17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que:

10 al menos un contraión catiónico multivalente es divalente, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en magnesio, zinc y calcio; o  
al menos un contraión catiónico multivalente es trivalente, preferiblemente aluminio.

15 18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que la primera sal polinucleotídica comprende además un contraión catiónico monovalente.

19. Una composición que comprende:

20 un precipitado salino de un polinucleótido que comprende al menos un contraión catiónico multivalente;  
en la que el polinucleótido tiene una secuencia de 7 o más subunidades de nucleósidos complementarias al componente de ARN de la telomerasa humana y al menos dos de las subunidades de nucleósidos están unidas por un enlace entre subunidades de tiofosforamidato N3'→P5'.

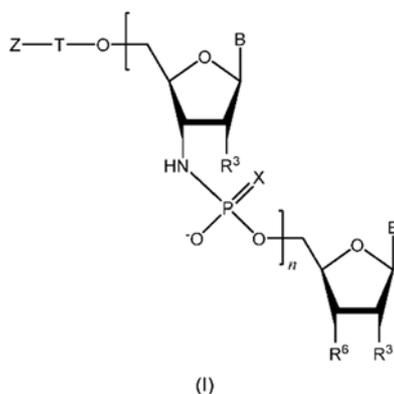
25 20. La composición de la reivindicación 19, en la que:

al menos un contraión catiónico multivalente es divalente, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en magnesio, zinc y calcio, más preferiblemente magnesio; o  
al menos un contraión catiónico multivalente es trivalente, preferiblemente aluminio.

30 21. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 19-20, en la que la sal polinucleotídica comprende 3% en moles o más del contraión catiónico multivalente o comprende 1,0% en peso o más del contraión catiónico multivalente.

35 22. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 19-21, en la que la composición es un precipitado.

23. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 19-22, en la que el polinucleótido se describe mediante la Fórmula (I):



40 en la que:

45 cada B es independientemente una purina, una purina protegida, una pirimidina o una pirimidina protegida, o un análogo de la misma;

cada X es independientemente oxígeno o azufre;

cada R<sup>3</sup> es independientemente hidrógeno, flúor, hidroxilo, un alcoxi, un alcoxi sustituido o un hidroxilo protegido;

R<sup>6</sup> es amino, hidroxilo, un amino protegido, un hidroxi protegido, -O-T-Z o -NH-T-Z;

cada T es independientemente un enlazador opcional;

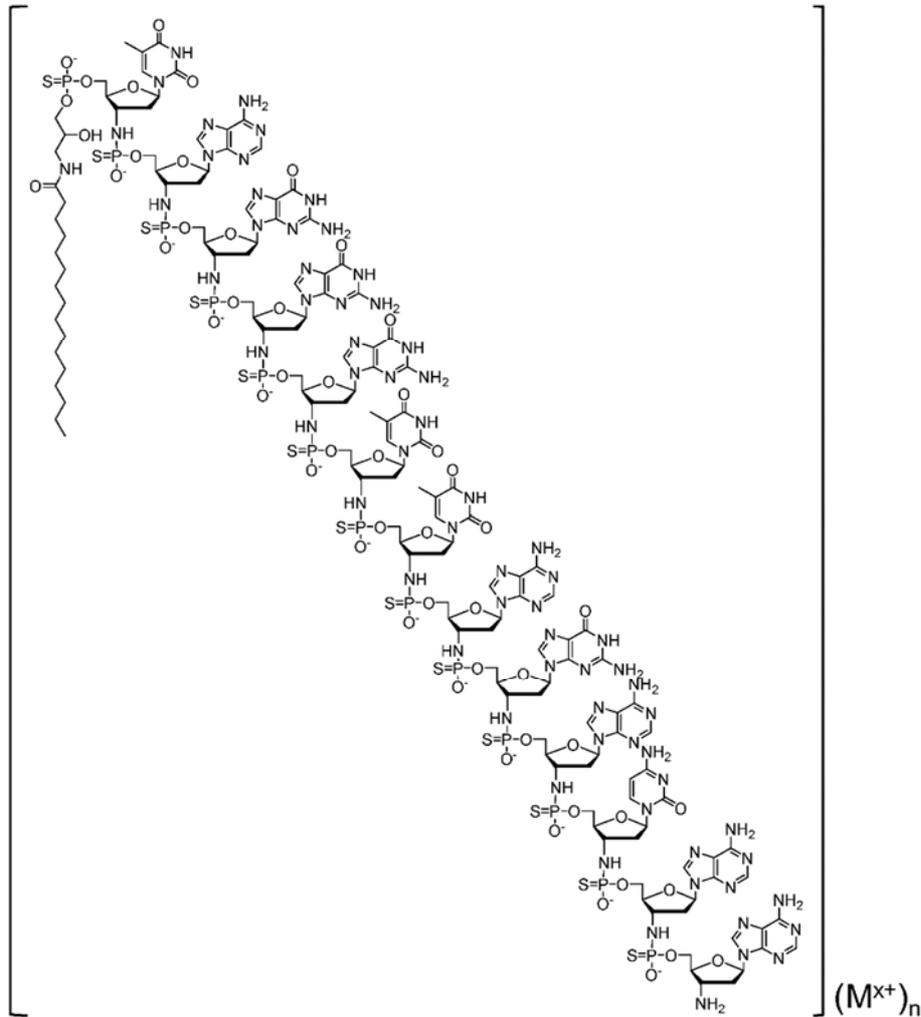
50 cada Z es independientemente H, un lípido, un vehiculo, un oligonucleótido, un polímero, un polipéptido, un marcador detectable o una etiqueta; y

n es un entero de 7 a 100.

24. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 19-23, en la que:

el polinucleótido comprende una secuencia que comprende 13 o más subunidades de nucleósidos complementarias al componente de ARN de la telomerasa humana; o  
 el polinucleótido comprende entre 10 y 50 subunidades contiguas de nucleósidos complementarias al componente de ARN de la telomerasa humana.

- 5
25. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 19-24, en la que todas las subunidades de nucleósidos están unidas por enlaces entre subunidades de tiofosforamidoato N3'→P5'.
- 10
26. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 19-25, en la que el polinucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 4), TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) y CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 5)
- 15
27. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 19-26, en la que un extremo 5' o 3' del polinucleótido se conjuga con una fracción lipídica a través de un enlazador opcional.
28. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 19-27, en la que el polinucleótido tiene la estructura:



20

en la que cada  $M^{x+}$  es independientemente un contraión catiónico, cada x es 1, 2 o 3 y n es 5 a 12.

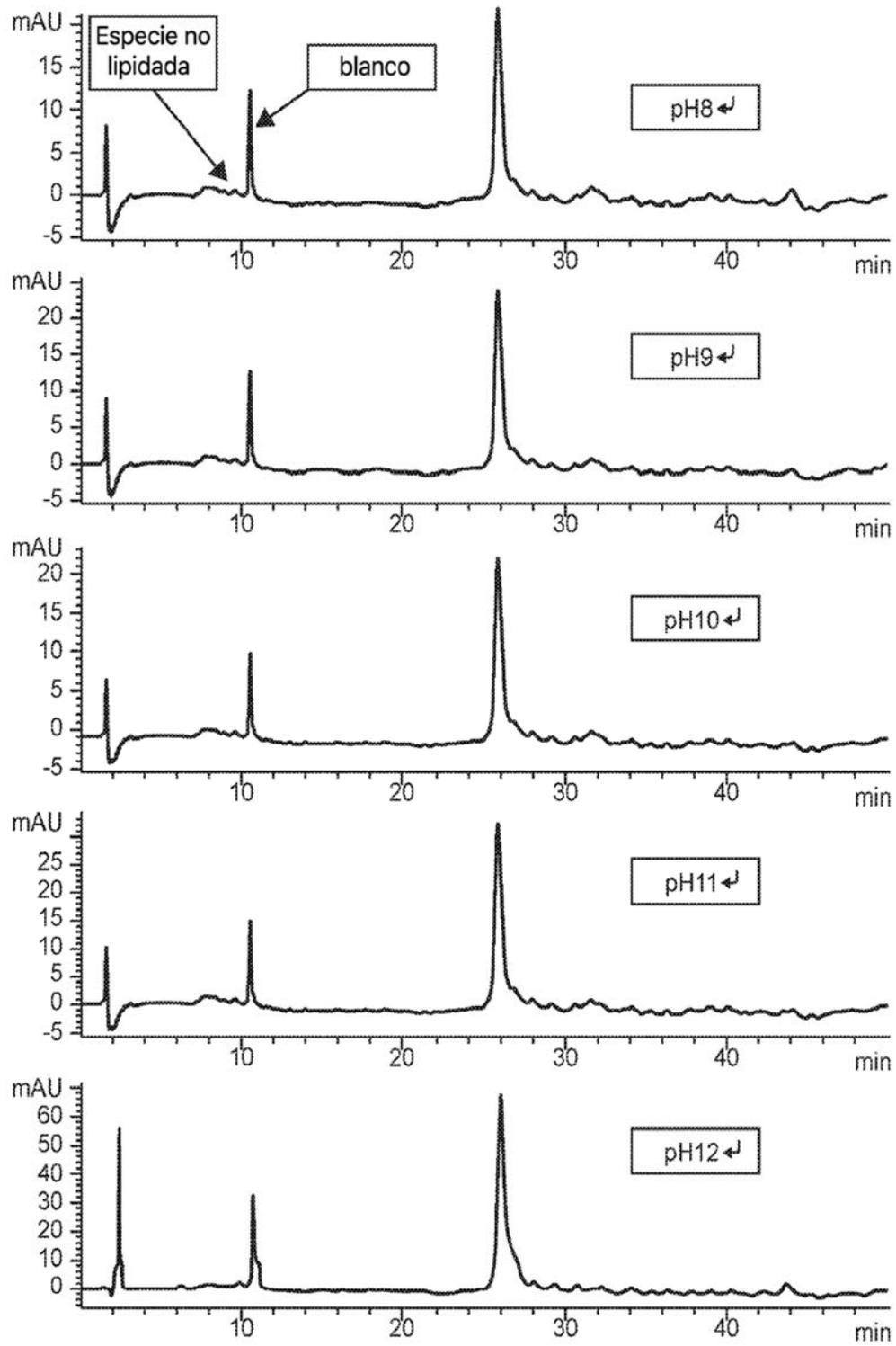


FIG. 1

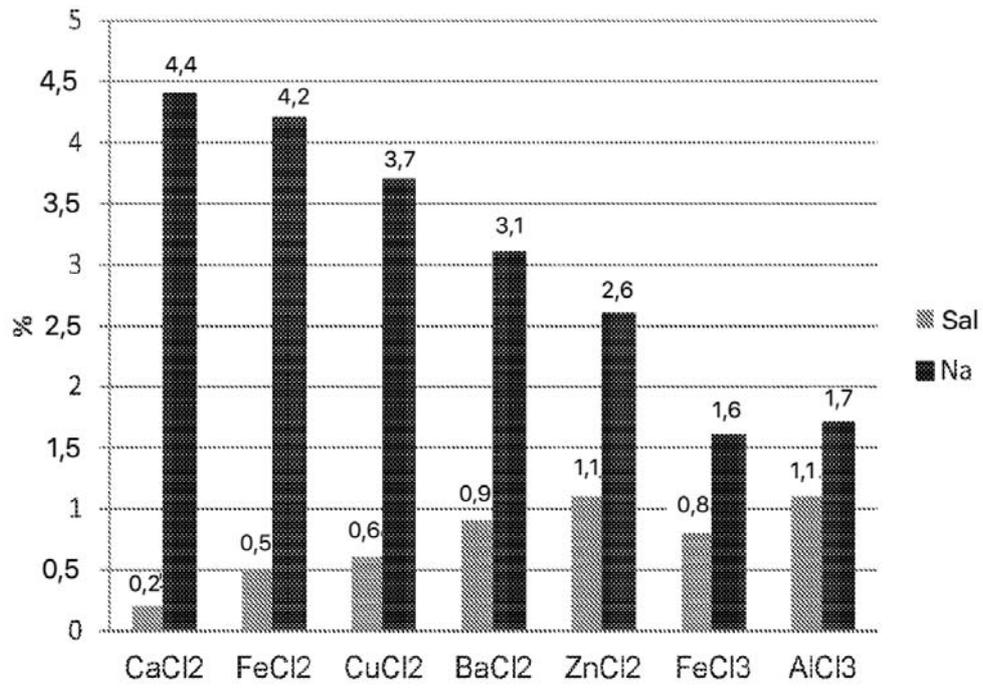


FIG. 2

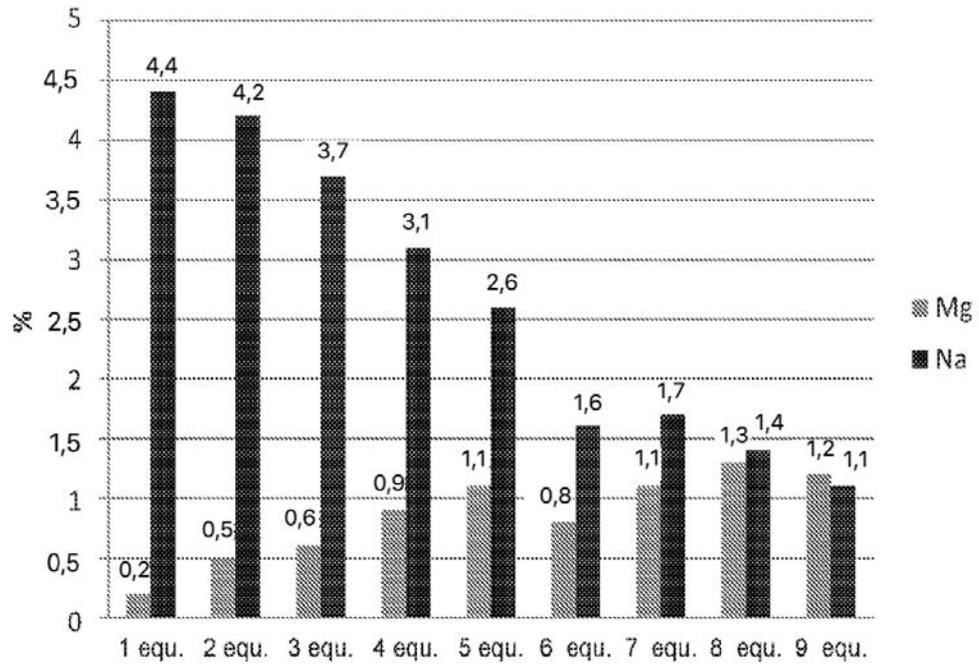
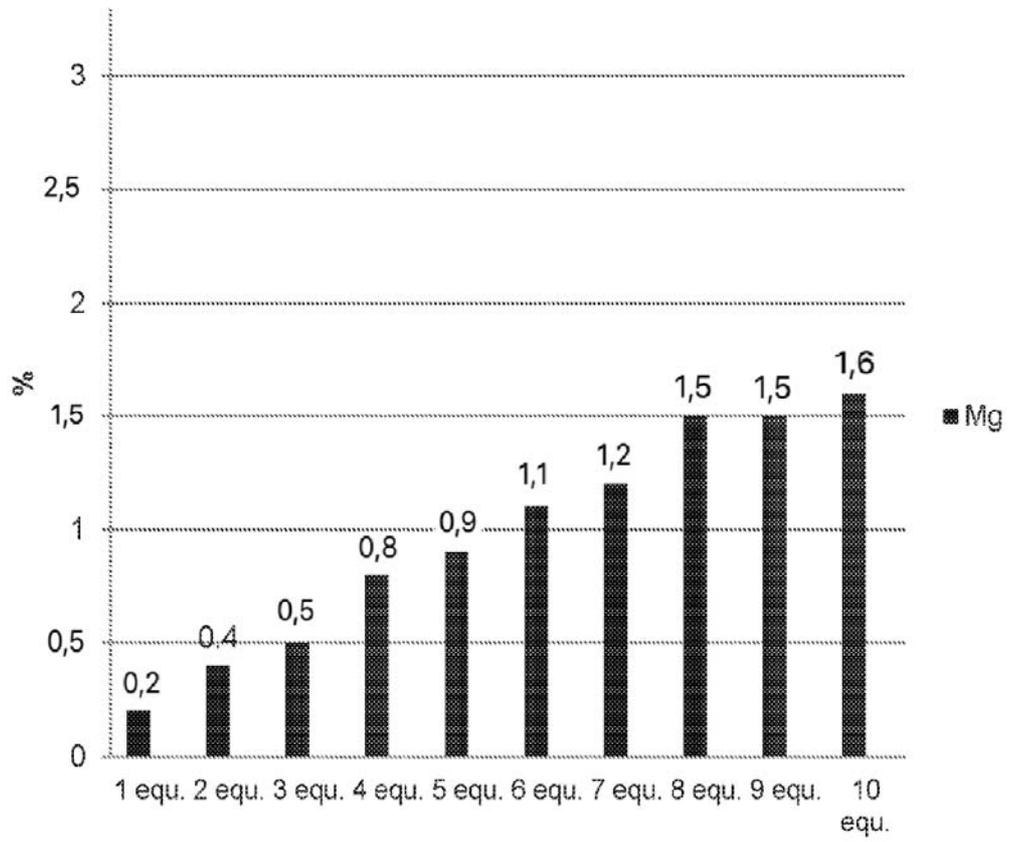


FIG. 3



**FIG. 4**