

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3286203

DAL TITOLO:

“METODI DI PREPARAZIONE DI POLINUCLEOTIDI USANDO  
COMPOSIZIONI DI SALI CATIONICI MULTIVALENTI”

\*\*\* \*\*

Descrizione

### **INTRODUZIONE**

**[0001]** La chimica dei polimeri di acidi nucleici ha svolto un ruolo in molte tecnologie in corso di sviluppo nei campi farmaceutico, diagnostico e analitico e più in particolare nei sottocampi delle terapie antisenso e antigeniche, della chimica combinatoriale, dell'amplificazione del segnale del DNA ramificato e della diagnostica e dell'analisi del DNA basate su array. Parte di questa chimica dei polimeri è stata diretta a migliorare la forza di legame, la specificità e la resistenza alle nucleasi di polimeri di acidi nucleici naturali, come il DNA. Legami internucleosidici di acidi peptido-nucleici (PNA), fosforotioato, metilfosfonato e fosforammidato sono esempi di alcune chimiche dei polimeri che sono state applicate ai polinucleotidi per rendere disponibili una o più proprietà desiderabili come resistenza alle nucleasi, captazione cellulare e solubilità.

**[0002]** Gli N3'→P5' fosforammidati di polinucleotidi possono formare duplex stabili con filamenti di DNA e RNA complementari, nonché triplex stabili con duplex di DNA, e sono resistenti alle nucleasi. Gli N3'→P5' fosforammidati di polinucleotidi hanno trovato impiego come

potenti agenti antisenso sia in vitro sia in vivo. I polinucleotidi che contengono composti che inibiscono l'attività della telomerasi possono essere usati per trattare disturbi mediati dalla telomerasi, come il cancro, in quanto le cellule cancerose esprimono attività di telomerasi e le cellule somatiche umane normali non possiedono attività di telomerasi a livelli biologicamente rilevanti. Quindi, sono di interesse metodi per preparare e isolare tali polinucleotidi.

**[0003]** WO 2005/023994 descrive oligonucleotidi modificati per l'inibizione della telomerasi. Sawadogo et al, Nucl. Acids Res., vol. 19, n. 3, pagina 674 (1991) descrivono un metodo per la purificazione di oligodeossinucleotidi deprotetti. WO 2008/127305 descrive un metodo per isolare biomacromolecole usando cationi a pH basso e bivalenti. WO 2015/168310 descrive composizioni oligonucleotidiche e metodi per la produzione delle stesse. WO 2012/021985 descrive complessi chelati oligonucleotidici di ioni metallici bivalenti e oligonucleotidi.

## **SOMMARIO**

**[0004]** Aspetti della divulgazione includono metodi per la preparazione di un polinucleotide. In alcune forme di realizzazione, il metodo include mettere a contatto una prima composizione polinucleotidica che include: un polinucleotide avente una sequenza di 7 o più subunità nucleosidiche dove almeno due delle subunità nucleosidiche sono unite da un legame intersubunità N3'→P5' tiosforammidato; e prodotti e reagenti di sintesi non target; con un sale cationico multivalente per far precipitare un primo sale del polinucleotide

che include almeno un controione cationico multivalente; e separare il sale del polinucleotide dalla prima composizione polinucleotidica messa a contatto per produrre una seconda composizione polinucleotidica che include il primo sale del polinucleotide. In certe forme di realizzazione, il metodo include inoltre mettere a contatto il primo sale del polinucleotide con un supporto per cromatografia a fase inversa; ed eluire dal supporto cromatografico una terza composizione polinucleotidica che include un secondo sale del polinucleotide. Sono rese disponibili anche composizioni che includono un sale del polinucleotide che include almeno un controione cationico multivalente. In alcune forme di realizzazione, l'almeno un controione cationico multivalente è selezionato dal gruppo costituito da magnesio, zinco, alluminio e calcio.

### **BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE**

**[0005]** La persona esperta nell'arte comprenderà che i disegni, descritti nel seguito, sono solo a scopo illustrativo. I disegni non sono intesi limitare in alcun modo la portata dei presenti insegnamenti.

La Figura 1 mostra cromatogrammi HPLC di Imetelstat-Mg in soluzioni di NaCl 1 M a una varietà di pH.

La Figura 2 illustra i risultati di un'analisi elementare di Imetelstat Sodio trattato con una varietà di sali.

La Figura 3 illustra i risultati di un'analisi elementare di Imetelstat Sodio trattato con equivalenti crescenti di sale di cloruro di magnesio.

La Figura 4 illustra i risultati di un'analisi elementare di Imetelstat TEA trattato con equivalenti crescenti di sale di cloruro di magnesio.

## **DEFINIZIONI**

**[0006]** Prima di descrivere forme di realizzazione esemplificative in maggior dettaglio, vengono riportate le seguenti definizioni per illustrare e definire il significato e la portata dei termini usati nella descrizione.

**[0007]** I seguenti termini hanno i seguenti significati a meno che altrimenti indicato. Qualsiasi termine non definito ha il proprio significato riconosciuto nell'arte.

**[0008]** Così come usati nel presente documento, i termini polinucleotide e oligonucleotide sono usati in modo intercambiabile per fare riferimento a un composto che contiene una pluralità di subunità di porzioni funzionali nucleosidiche o residui nucleosidici che sono legati da legami internucleosidici o collegamenti internucleosidici. Quando un polinucleotide è rappresentato da una sequenza di lettere, come "ATGUCCTG", resta inteso che i nucleotidi sono nell'ordine 5'→3' da sinistra a destra e che "A" indica deossiadenosina, "C" indica deossicitidina, "G" indica deossiguanosina, "T" indica timidina e "U" indica deossiuridina, a meno che altrimenti indicato.

**[0009]** Così come usato nel presente documento, "nucleoside" include i nucleosidi naturali, incluse le forme 2'-deossi e 2'-idrossile, per esempio come descritto in Kornberg e Baker, DNA Replication, 2a ed. (Freeman, San Francisco, 1992). "Analoghi" in riferimento a nucleosidi include nucleosidi di sintesi aventi porzioni funzionali di basi modificate e/o porzioni funzionali zuccherine modificate, per esempio descritti

generalmente da Scheit, *Nucleotide Analogs* (John Wiley, New York, 1980). Tali analoghi includono nucleosidi di sintesi progettati per potenziare le proprietà di legame, per esempio stabilità, specificità o similari, come divulgato da Uhlmann e Peyman (*Chemical Reviews*, 90:543-584, 1990). In alcune forme di realizzazione, un nucleoside o analogo nucleosidico include un gruppo 3'-idrossile o un gruppo 3'-ammino.

**[0010]** I termini "base" e "nucleobase" sono usati in modo intercambiabile e la loro definizione nel presente documento include (i) basi di DNA e RNA convenzionali (uracile, timina, adenina, guanina e citosina) e (ii) basi modificate o analoghi di basi (per esempio 5-metilcitosina, 5-bromouracile o inosina). Un analogo di una base è una sostanza chimica la cui struttura molecolare mima quella di una base di DNA o RNA convenzionale.

**[0011]** Così come usato nel presente documento, "pirimidina" indica le pirimidine presenti in nucleosidi naturali, inclusi citosina, timina e uracile e analoghi comuni degli stessi, come quelli contenenti sostituenti ossi, metile, propinile, metossi, idrossile, ammino, tio, alo e similari. Il termine così come usato nel presente documento include inoltre pirimidine con attaccati gruppi di protezione comuni, come N4-benzoilcitosina. Ulteriori gruppi di protezione di pirimidina di interesse includono, ma non sono limitati a, i gruppi di protezione che sono divulgati da Beaucage e Iyer *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992).

**[0012]** Così come usato nel presente documento, "purina" indica le purine presenti in nucleosidi naturali, incluse adenina, guanina e ipoxantina, e analoghi comuni delle stesse, come quelli contenenti sostituenti ossi, metile, propinile, metossi, idrossile, ammino, tio, alo e similari. Il termine così come usato nel presente documento include inoltre purine con attaccati gruppi di protezione comuni, come N2-benzoilguanina, N2-isobutirilguanina, N6-benzoiladenina e similari. Ulteriori gruppi di protezione di purina comuni sono divulgati da Beaucage e Iyer *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992). Così come usato nel presente documento, il termine "-protetto" come componente di un nome chimico si riferisce a gruppi di protezione riconosciuti nell'arte per una particolare porzione funzionale di un composto, per esempio "idrossile 5'-protetto" in riferimento a un nucleoside include trifenilmetile (vale a dire tritile), *p*-anisildifenilmetile (vale a dire monometossitritile o MMT)), di- *p*-anisilfenilmetile (vale a dire dimetossitritile o DMT) e similari; e a una nucleobase protetta in riferimento a una nucleobase che include un eteroatomo protetto con un gruppo come dimetilamminoformammidina (DMF), benzoile (Bz), isobutirile e similari. I gruppi di protezione riconosciuti nell'arte includono quelli descritti nei seguenti riferimenti: Gait, a cura di, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1984); Amarnath e 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, a cura di, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical*

Approach (IRL Press, Oxford, 1991), Greene e Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, seconda edizione, (John Wiley & Sons, New York, 1991), Narang, a cura di, Synthesis and Applications of DNA and RNA (Academic Press, New York, 1987), Beaucage e Iyer Tetrahedron 48: 2223-2311 (1992) e riferimenti analoghi.

**[0013]** Così come usato nel presente documento, "N3'→P5' tiofosforammidato di un polinucleotide" indica un oligomero, solitamente lineare, di subunità nucleosidiche legate da almeno un legame N3'→P5' tiofosforammidato. In termini generali, le subunità nucleosidiche comprendono nucleosidi o analoghi nucleosidici, ma possono anche comprendere porzioni funzionali più generali aventi chimica compatibile, come zuccheri abasici e altre porzioni funzionali idrocarburiche, come descritto nei seguenti riferimenti: 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); WO 93/06122; WO 91/07092; Durand et al., Nucleic Acids Research, 18: 6353-6359 (1990); Salunkhe et al., J. Am. Chem. Soc., 114: 8768-8772 (1992); e similari. In alcune istanze, il termine indica un polinucleotide in cui tutti i legami internucleosidici sono sostituiti da legami N3'→P5' tiofosforammidato. Quindi, il termine comprende oligomeri parzialmente nonché completamente "ammidati". In alcune istanze, il termine indica un polinucleotide in cui tutti i legami internucleosidici sono sostituiti da legami N3'→P5' tiofosforammidato e in cui le subunità nucleosidiche sono i nucleosidi naturali o loro analoghi. Un N3'→P5' tiofosforammidato

del polinucleotide in oggetto in cui ciascun legame è un legame N3'→P5' tiofosforammidato ("completamente ammidato") può essere incorporato in o attaccato ad altri oligonucleotidi o polinucleotidi per formare un oligomero più grande che è "parzialmente ammidato". Un N3'→P5' tiofosforammidato del polinucleotide in oggetto può includere qualsiasi gruppo 3'- e/o 5'-terminale conveniente. In alcune forme di realizzazione, il N3'→P5' tiofosforammidato del polinucleotide include un gruppo terminale 3'-idrossile o un gruppo terminale 3'-ammino.

**[0014]** Così come usati nel presente documento, i termini "fosfato" e "gruppo fosfato" intendono comprendere un gruppo tiofosfato e un gruppo ossofosfato.

**[0015]** Così come usato nel presente documento, il termine "gruppo ammino fosforammidato" si riferisce al gruppo ammino, —NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>, attaccato all'atomo di fosforo di un gruppo fosforammidato e il termine "azoto fosforammidato" si riferisce all'atomo di azoto del gruppo ammino fosforammidato.

**[0016]** "Alchile" si riferisce a gruppi idrocarbide alifatici saturi monovalenti aventi da 1 a 10 atomi di carbonio e per esempio da 1 a 6 atomi di carbonio (per esempio "un alchile con da 1 a 6 atomi di carbonio") o da 1 a 5 (per esempio "un alchile con da 1 a 5 atomi di carbonio") o da 1 a 4 (per esempio "un" alchile con da 1 a 4 atomi di carbonio) o da 1 a 3 atomi di carbonio (per esempio "un alchile con da 1 a 3 atomi di carbonio"). Questo termine include, a titolo esemplificativo, gruppi idrocarbide lineari e ramificati come metile (CH<sub>3</sub>-), etile (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-), n-

propile ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), isopropile ( $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$ ), n-butile ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), isobutile ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2-$ ), sec-butile ( $(\text{CH}_3)(\text{CH}_3\text{CH}_2)\text{CH}-$ ), t-butile ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}-$ ), n-pentile ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ) e neopentile ( $(\text{CH}_3)_3\text{CCH}_2-$ ).

**[0017]** Il termine "alchile sostituito" si riferisce a un gruppo alchile come definito nel presente documento in cui uno o più atomi di carbonio nella catena alchilica sono stati opzionalmente sostituiti con un eteroatomo come -O-, -N-, -S-, -S(O)<sub>n</sub>- (dove n è da 0 a 2), -NR- (dove R è idrogeno o alchile) e avente da 1 a 5 sostituenti selezionati dal gruppo costituito da alcossi, alcossi sostituito, cicloalchile, cicloalchile sostituito, cicloalchenile, cicloalchenile sostituito, acile, acilammino, acilossi, ammino, amminoacile, amminoacilossi, ossiamminoacile, azido, ciano, alogeno, idrossile, osso, tiocheto, carbossile, carbossilalchile, tioarilossi, tioeteroarilossi, tioeterocicloossi, tiolo, tioalcossi, tioalcossi sostituito, arile, arilossi, eteroarile, eteroarilossi, eterociclile, eterocicloossi, idrossiammino, alcossiammino, nitro, -SO-alchile, -SO-arile, -SO-eteroarile, -SO<sub>2</sub>-alchile, -SO<sub>2</sub>-arile, -SO<sub>2</sub>-eteroarile e -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, in cui R<sup>a</sup> e R<sup>b</sup> possono essere uguali o diversi e sono scelti tra idrogeno, alchile opzionalmente sostituito, cicloalchile, alchenile, cicloalchenile, alchinile, arile, eteroarile ed eterociclico. In alcune istanze, un "alchile sostituito" si riferisce a un gruppo alchile come definito nel presente documento avente da 1 a 5 sostituenti selezionati dal gruppo costituito da alcossi, cicloalchile, cicloalchenile, acile, acilammino, acilossi, ammino, amminoacile, amminoacilossi, ossiamminoacile, azido, ciano, alogeno,

idrossile, carbossile, carbossilalchile, tiolo, tioalcoosi, arile, arilossi, eteroarile, eteroarilossi, eterociclile, eterocicloossi, solfonammido e -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, in cui R<sup>a</sup> e R<sup>b</sup> possono essere uguali o diversi e sono scelti tra idrogeno, alchile, cicloalchile, alchenile, cicloalchenile, alchinile, arile, eteroarile ed eterociclico.

**[0018]** "Alcoosi" si riferisce al gruppo -O-alchile, in cui alchile è come definito nel presente documento. Alcoosi include, a titolo esemplificativo, metossi, etossi, n-propossi, isopropossi, n-butossi, t-butossi, sec-butossi, n-pentossi e similari. Il termine "alcoosi" si riferisce anche ai gruppi alchenile-O-, cicloalchile-O-, cicloalchenile-O- e alchinile-O-, dove alchenile, cicloalchile, cicloalchenile e alchinile sono come definiti nel presente documento.

**[0019]** Il termine "alcoosi sostituito" si riferisce ai gruppi alchile sostituito-O-, alchenile sostituito-O-, cicloalchile sostituito-O-, cicloalchenile sostituito-O- e alchinile sostituito-O- dove alchile sostituito, alchenile sostituito, cicloalchile sostituito, cicloalchenile sostituito e alchinile sostituito sono come definiti nel presente documento.

**[0020]** "Acile" si riferisce ai gruppi H-C(O)-, alchile-C(O)-, alchile sostituito-C(O)-, alchenile-C(O)-, alchenile sostituito-C(O)-, alchinile-C(O)-, alchinile sostituito-C(O)-, cicloalchile-C(O)-, cicloalchile sostituito-C(O)-, cicloalchenile-C(O)-, cicloalchenile sostituito-C(O)-, arile-C(O)-, arile sostituito-C(O)-, eteroarile-C(O)-, eteroarile sostituito-C(O)-, eterociclile-C(O)- ed eterociclile sostituito-C(O)-, in cui alchile, alchile sostituito, alchenile, alchenile sostituito, alchinile, alchinile sostituito,

cicloalchile, cicloalchile sostituito, cicloalchenile, cicloalchenile sostituito, arile, arile sostituito, eteroarile, eteroarile sostituito, eterociclico ed eterociclico sostituito sono come definiti nel presente documento. Per esempio, acile include il gruppo "acetile"  $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-$ .

**[0021]** Il termine "ammino sostituito" si riferisce al gruppo -NRR dove ciascun R è selezionato indipendentemente dal gruppo costituito da idrogeno, alchile, alchile sostituito, cicloalchile, cicloalchile sostituito, alchenile, alchenile sostituito, cicloalchenile, cicloalchenile sostituito, alchinile, alchinile sostituito, arile, eteroarile ed eterociclice a condizione che almeno un R non sia idrogeno.

**[0022]** "Alo" o "alogeno" si riferisce a fluoro, cloro, bromo e iodio.

**[0023]** "Idrossi" o "idrossile" si riferisce al gruppo -OH.

**[0024]** "Eteroarile" si riferisce a un gruppo aromatico con da 1 a 15 atomi di carbonio, come da 1 a 10 atomi di carbonio, e da 1 a 10 eteroatomi selezionati dal gruppo costituito da ossigeno, azoto e zolfo all'interno dell'anello. Tali gruppi eteroarile possono avere un singolo anello (come piridinile, imidazolile o furile) o anelli condensati multipli in un sistema ad anelli (per esempio come in gruppi come indolizinile, chinolinile, benzofurano, benzimidazolile o benzotienile), in cui almeno un anello all'interno del sistema ad anelli è aromatico, a condizione che il punto di attacco sia attraverso un atomo di un anello aromatico. In certe forme di realizzazione, l'atomo/gli atomi di azoto e/o zolfo nell'anello del gruppo eteroarile sono opzionalmente ossidati per rendere disponibili le porzioni funzionali di N-ossido ( $\text{N}\rightarrow\text{O}$ ), solfinile o solfonile. Questo

termine include, a titolo esemplificativo, piridinile, pirrolile, indolile, tiofenile e furanile. A meno che altrimenti vincolati dalla definizione del sostituente eteroarile, tali gruppi eteroarile possono essere opzionalmente sostituiti con da 1 a 5 sostituenti o da 1 a 3 sostituenti, selezionati tra acilossi, idrossi, tiolo, acile, alchile, alcossi, alchenile, alchinile, cicloalchile, cicloalchenile, alchile sostituito, alcossi sostituito, alchenile sostituito, alchinile sostituito, cicloalchile sostituito, cicloalchenile sostituito, ammino, ammino sostituito, amminoacile, acilammino, alcarile, arile, arilossi, azido, carbossile, carbossilalchile, ciano, alogeno, nitro, eteroarile, eteroarilossi, eterociclice, eterocicloossi, amminoacilossi, ossiacilammino, tioalcossi, tioalcossi sostituito, tioarilossi, tioeteroarilossi, -SO-alchile, -SO-alchile sostituito, -SO-arile, -SO-eteroarile, -SO<sub>2</sub>-alchile, -SO<sub>2</sub>-alchile sostituito, -SO<sub>2</sub>-arile e -SO<sub>2</sub>-eteroarile e trialometile. In tali casi, un gruppo eteroarile che è sostituito con da 1 a 5 sostituenti (per esempio come descritto nel presente documento) è denominato "eteroarile sostituito".

**[0025]** "Eterociclo", "eterociclico", "eterocicloalchile" ed "eterociclice" si riferiscono a un gruppo saturo o insaturo avente un singolo anello o anelli condensati multipli, inclusi sistemi ad anelli fusi a ponte e spiro, e avente da 3 a 20 atomi nell'anello, inclusi da 1 a 10 eteroatomi. Questi atomi nell'anello sono selezionati dal gruppo costituito da azoto, zolfo o ossigeno, in cui, nei sistemi ad anelli fusi, uno o più degli anelli possono essere cicloalchile, arile o eteroarile, a condizione che il punto di attacco sia attraverso l'anello non aromatico. In certe forme di

realizzazione, l'atomo/gli atomi di azoto e/o zolfo del gruppo eterociclico sono opzionalmente ossidati per rendere disponibili le porzioni funzionali di N-ossido, -S(O)- o -SO<sub>2</sub>-.

**[0026]** Esempi di eterocicli ed eteroarili includono, ma non sono limitati a, azetidina, pirrolo, imidazolo, pirazolo, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindolo, indolo, diidroindolo, indazolo, purina, chinolizina, isochinolina, chinolina, ftalazina, naftilpiridina, chinossalina, chinazolina, cinnolina, pteridina, carbazolo, carbolina, fenantridina, acridina, fenantrolina, isotiazolo, fenazina, isossazolo, fenossazina, fenotiazina, imidazolidina, imidazolina, piperidina, piperazina, indolina, ftalimmide, 1,2,3,4-tetraidroisochinolina, 4,5,6,7-tetraidrobenczo[b]tiofene, tiazolo, tiazolidina, tiofene, benzo[b]tiofene, morfolinile, tiomorfolinile (denominato anche tiamorfolinile), 1,1-diossotiomorfolinile, piperidinile, pirrolidina, tetraidrofurane e similari.

**[0027]** A meno che altrimenti vincolati dalla definizione del sostituente eterociclico, tali gruppi eterociclici possono essere opzionalmente sostituiti con da 1 a 5 o da 1 a 3 sostituenti, selezionati tra alcossi, alcossi sostituito, cicloalchile, cicloalchile sostituito, cicloalchenile, cicloalchenile sostituito, acile, acilammino, acilossi, ammino, ammino sostituito, amminoacile, amminoacilossi, ossiamminoacile, azido, ciano, alogeno, idrossile, osso, tiocheto, carbossile, carbossilalchile, tioarilossi, tioeteroarilossi, tioeterocicloossi, tiolo, tioalcossi, tioalcossi sostituito, arile, arilossi, eteroarile, eteroarilossi, eterociclice, eterocicloossi, idrossiammino, alcossiammino, nitro, -SO-

alchile, -SO-alchile sostituito, -SO-arile, -SO-eteroarile, -SO<sub>2</sub>-alchile, -SO<sub>2</sub>-alchile sostituito, -SO<sub>2</sub>-arile, -SO<sub>2</sub>-eteroarile ed eterociclo fuso.

**[0028]** "Nitro" si riferisce al gruppo -NO<sub>2</sub>.

**[0029]** "Osso" si riferisce all'atomo (=O).

**[0030]** "Tiolo" si riferisce al gruppo -SH.

**[0031]** "Tiosso" o il termine "tiocheto" si riferisce all'atomo (=S).

**[0032]** In aggiunta alla divulgazione nel presente documento, il termine "sostituito", quando usato per modificare un gruppo o radicale specificato, può anche indicare che uno o più atomi di idrogeno del gruppo o radicale specificato sono, ciascuno indipendentemente l'uno dall'altro, sostituiti con lo stesso gruppo sostituyente o con gruppi sostituenti diversi, come definiti nel seguito.

**[0033]** In aggiunta ai gruppi divulgati in relazione ai singoli termini nel presente documento, i gruppi sostituenti per sostituire uno o più idrogeni (qualsiasi due idrogeni su un singolo carbonio possono essere sostituiti con =O, =NR<sup>70</sup>, =N-OR<sup>70</sup>, =N<sub>2</sub> o =S) nel gruppo o radicale specificato sono, a meno che altrimenti specificato, -R<sup>60</sup>, alo, =O, -OR<sup>70</sup>, -SR<sup>70</sup>, -NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, trialometile, -CN, -OCN, -SCN, -NO, -NO<sub>2</sub>, =N<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>, -SO<sub>2</sub>O-M<sup>+</sup>, -SO<sub>2</sub>OR<sup>70</sup>, -OSO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>, -OSO<sub>2</sub>O-M<sup>+</sup>, -OSO<sub>2</sub>OR<sup>70</sup>, -P(O)(O<sup>-</sup>)<sub>2</sub>(M<sup>+</sup>)<sub>2</sub>, -P(O)(OR<sup>70</sup>)O-M<sup>+</sup>, -P(O)(OR<sup>70</sup>)<sub>2</sub>, -C(O)R<sup>70</sup>, -C(S)R<sup>70</sup>, -C(NR<sup>70</sup>)R<sup>70</sup>, -C(O)O-M<sup>+</sup>, -C(O)OR<sup>70</sup>, -C(S)OR<sup>70</sup>, -C(O)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, -C(NR<sup>70</sup>)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, -OC(O)R<sup>70</sup>, -OC(S)R<sup>70</sup>, -OC(O)O-M<sup>+</sup>, -OC(O)OR<sup>70</sup>, -OC(S)OR<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(O)R<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(S)R<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>CO<sub>2</sub>-M<sup>+</sup>, -NR<sup>70</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(S)OR<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(O)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, -NR<sup>70</sup>C(NR<sup>70</sup>)R<sup>70</sup> e -

$\text{NR}^{70}\text{C}(\text{NR}^{70})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$ , dove  $\text{R}^{60}$  è selezionato dal gruppo costituito da alchile opzionalmente sostituito, cicloalchile, eteroalchile, eterocicloalchilalchile, cicloalchilalchile, arile, arilalchile, eteroarile ed eteroarilalchile, ciascun  $\text{R}^{70}$  è indipendentemente idrogeno o  $\text{R}^{60}$ ; ciascun  $\text{R}^{80}$  è indipendentemente  $\text{R}^{70}$  o, in alternativa, due  $\text{R}^{80}$ , presi insieme all'atomo di azoto a cui sono legati, formano un eterocicloalchile a 5, 6 o 7 termini che può opzionalmente includere da 1 a 4 degli stessi eteroatomi o di eteroatomi aggiuntivi diversi selezionati dal gruppo costituito da O, N e S, di cui N può avere una sostituzione -H o C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>alchile; e ciascun  $\text{M}^+$  è un controione con una carica positiva singola netta. Ciascun  $\text{M}^+$  può essere indipendentemente, per esempio, uno ione alcalino, come  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ; uno ione ammonio, come  $^+\text{N}(\text{R}^{60})_4$ ; o uno ione alcalino-terroso, come  $[\text{Ca}^{2+}]_{0.5}$ ,  $[\text{Mg}^{2+}]_{0.5}$  o  $[\text{Ba}^{2+}]_{0.5}$  (0.5 in pedice indica che uno dei controioni per tali ioni alcalino-terrosi bivalenti può essere una forma ionizzata di un composto dell'invenzione e l'altro un controione come cloruro o due composti ionizzati divulgati nel presente documento possono servire come controioni per tali ioni alcalino-terrosi bivalenti o un composto doppiamente ionizzato dell'invenzione può servire come controione per tali ioni alcalino-terrosi bivalenti). Come esempi specifici,  $-\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$  è inteso includere  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NH}$ -alchile, *N*-pirrolidinile, *N*-piperazinile, 4*N*-metil-piperazin-1-ile e *N*-morfolinile.

**[0034]** In aggiunta alla divulgazione nel presente documento, in una certa forma di realizzazione, un gruppo che è sostituito ha 1, 2, 3 o 4 sostituenti, 1, 2 o 3 sostituenti, 1 o 2 sostituenti o 1 sostituyente.

**[0035]** Resta inteso che in tutti i gruppi sostituiti sopra definiti, i polimeri ottenuti attraverso la definizione di sostituenti con ulteriori sostituenti degli stessi (per esempio arile sostituito avente un gruppo arile sostituito come sostituyente che a sua volta è sostituito con un gruppo arile sostituito, che è ulteriormente sostituito con un gruppo arile sostituito e così via) non sono intesi essere inclusi nel presente documento. In tali casi, il numero massimo di tali sostituzioni è tre. Per esempio, le sostituzioni seriali di gruppi arile sostituiti specificatamente contemplati nel presente documento sono limitate ad arile sostituito-(arile sostituito)-arile sostituito.

**[0036]** A meno che altrimenti indicato, la nomenclatura dei sostituenti che non sono esplicitamente definiti nel presente documento viene ottenuta nominando la porzione terminale della funzionalità seguita dalla funzionalità adiacente in direzione del punto di attacco.

**[0037]** Per quanto riguarda qualsiasi dei gruppi divulgati nel presente documento che contiene uno o più sostituenti, resta inteso, ovviamente, che tali gruppi non contengono sostituzioni o pattern di sostituzione che siano stericamente inattuabili e/o sinteticamente non fattibili. In aggiunta, i composti in oggetto includono tutti gli isomeri stereochimici derivanti dalla sostituzione di questi composti.

**[0038]** Il termine "sale farmaceuticamente accettabile" indica un sale che è accettabile per la somministrazione a un paziente, come un mammifero (sali con controioni aventi sicurezza per i mammiferi accettabile per un dato regime posologico). Tali sali possono essere

derivati da basi inorganiche o organiche farmaceuticamente accettabili e da acidi inorganici o organici farmaceuticamente accettabili. "Sale farmaceuticamente accettabile" si riferisce a sali farmaceuticamente accettabili di un composto, i quali sali sono derivati da una varietà di controioni organici e inorganici ben noti nell'arte e includono, solo a titolo esemplificativo, sodio e similari; e quando la molecola contiene una funzionalità basica, sali di acidi organici o inorganici, come cloridrato e similari. Sali farmaceuticamente accettabili di interesse includono, ma non sono limitati a, sali di alluminio, ammonio, arginina, bario, benzatina, calcio, colinato, etilendiammina, lisina, litio, magnesio, meglumina, procaina, potassio, sodio, trometamina, N-metilglucamina, N,N'-dibenziletildiammina, cloroprocaina, dietanolammina, etanolammina, piperazina, zinco, diisopropilammina, trietilammina, diisopropiletildiammina e trietanolammina.

**[0039]** L'espressione "sale dello stesso" indica un composto formato quando un protone di un acido è sostituito da un catione, come un catione metallico o un catione organico e similari. Laddove applicabile, il sale è un sale farmaceuticamente accettabile, sebbene ciò non sia necessario per i sali di composti intermedi che non sono intesi per la somministrazione a un paziente. A titolo esemplificativo, i sali dei presenti composti includono quelli in cui il composto è protonato da un acido inorganico o organico per formare un catione, con la base coniugata dell'acido inorganico o organico come componente anionico del sale. Sali di interesse includono, ma non sono limitati a, sali di alluminio, ammonio,

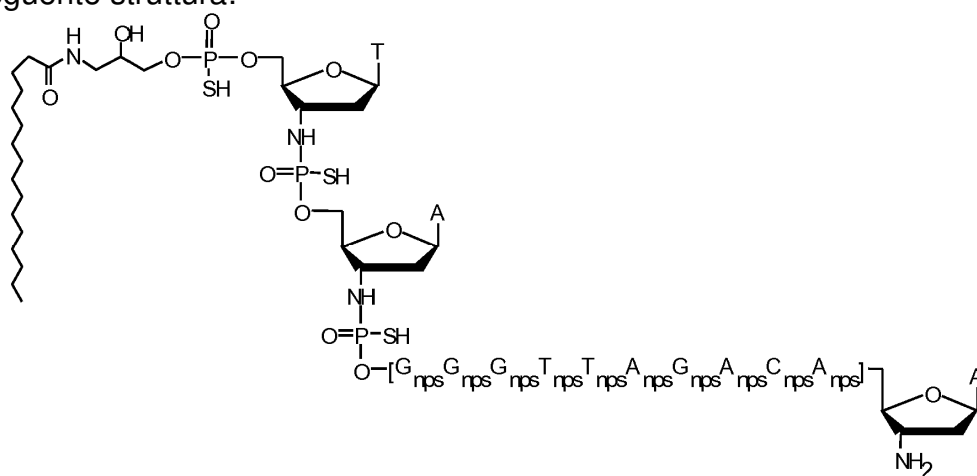
arginina, bario, benzatina, calcio, cesio, colinato, etilendiammina, litio, magnesio, meglumina, procaina, N-metilglucamina, piperazina, potassio, sodio trometamina, zinco, N,N'-dibenziletile-diammina, cloroprocaina, dietanolammina, etanolammina, piperazina, diisopropilammina, trietilammina, diisopropiletilammina e trietanolammina. Resta inteso che per qualsiasi delle strutture polinucleotidiche illustrate nel presente documento che includono una catena dorsale di legami internucleosidici, tali polinucleotidi possono anche includere qualsiasi forma di sale conveniente. In alcune forme di realizzazione, per semplicità sono illustrate le forme acide dei legami internucleosidici. In alcune istanze, il sale del composto in oggetto è un sale cationico monovalente. In certe istanze, il sale del composto in oggetto è un sale cationico bivalente. In alcune istanze, il sale del composto in oggetto è un sale cationico trivalente.

**[0040]** "Solvato" si riferisce a un complesso formato dalla combinazione di molecole di solvente con molecole o ioni del soluto. Il solvente può essere un composto organico, un composto inorganico o una miscela di entrambi. Alcuni esempi di solventi includono, ma non sono limitati a, metanolo, *N,N*-dimetilformammide, tetraidrofurano, dimetilsolfossido e acqua. Quando il solvente è acqua, il solvato formato è un idrato.

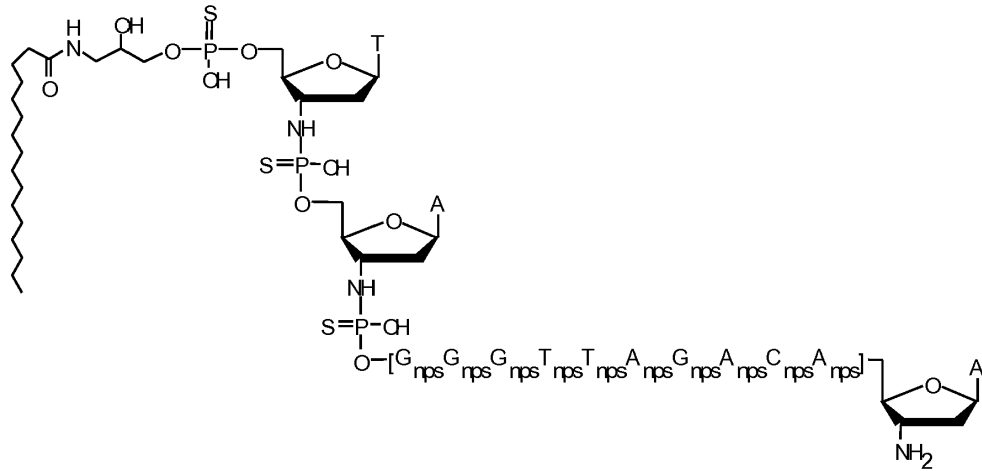
**[0041]** "Stereoisomero" e "stereoisomeri" si riferiscono a composti che possiedono la stessa connettività atomica, ma disposizione

atomica diversa nello spazio. Gli stereoisomeri includono isomeri cis-trans, isomeri E Z, enantiomeri e diastereomeri.

**[0042]** "Tautomero" si riferisce a forme alternative di una molecola che differiscono solo per il legame elettronico degli atomi e/o la posizione di un protone, come tautomeri enolo-cheto e immina-enammina,  $\text{-NH-P(=S)(OH)-O-}$  e  $\text{-NH-P(=O)(SH)-O-}$  o forme tautomeriche di gruppi eteroarile contenenti una disposizione di atomi nell'anello  $\text{-N=C(H)-NH-}$  come pirazoli, imidazoli, benzimidazoli, triazoli e tetrazoli. Una persona esperta nell'arte riconoscerà che sono possibili altre disposizioni tautomeriche dei gruppi descritti nel presente documento. Per esempio, resta inteso che un polinucleotide descritto dalla seguente struttura:



comprende anche la seguente struttura che mostra una possibile disposizione tautomerica alternativa dei gruppi di legame:



dove "nps" rappresenta un legame tiofosforammidato (-NH-P(=O)(SH)-O- o -NH-P(=S)(OH)-O-) che collega il 3'-carbonio di un nucleoside al 5'-carbonio del nucleoside adiacente. Resta inteso che tutte le forme tautomeriche di un composto in oggetto sono comprese in una struttura dove è descritta una possibile disposizione tautomerica dei gruppi del composto, anche se non specificatamente indicata. Nella descrizione dei composti può essere utilizzata qualsiasi disposizione tautomerica conveniente dei gruppi dei composti in oggetto.

**[0043]** Si comprenderà che l'espressione "o un sale o solvato o stereoisomero dello stesso" è intesa includere tutte le permutazioni di sali, solvati e stereoisomeri, come un solvato di un sale farmaceuticamente accettabile di uno stereoisomero del composto in oggetto. Resta inteso che l'espressione "o un sale dello stesso" è intesa includere tutte le permutazioni di sali. Resta inteso che l'espressione "o un sale farmaceuticamente accettabile dello stesso" è intesa includere tutte le permutazioni di sali. Resta inteso che l'espressione "o un solvato dello stesso" è intesa includere tutte le permutazioni di solvati. Resta inteso

che l'espressione "o uno stereoisomero dello stesso" è intesa includere tutte le permutazioni di stereoisomeri. Resta inteso che l'espressione "o un tautomero dello stesso" è intesa includere tutte le permutazioni di tautomeri. Quindi, per esempio, ne consegue che si intende includere un solvato di un sale farmaceuticamente accettabile di un tautomero di uno stereoisomero del composto in oggetto.

**[0044]** Così come usato nel presente documento, con il termine "isolato" si intende descrivere un composto di interesse che è in un ambiente diverso da quello in cui il composto è presente in natura. Con "isolato" si intende includere i composti che rientrano in campioni che sono sostanzialmente arricchiti del composto di interesse e/o in cui il composto di interesse è parzialmente o sostanzialmente purificato.

**[0045]** Così come usata nel presente documento, l'espressione "sostanzialmente purificato" si riferisce a un composto che è rimosso dal suo ambiente naturale ed è libero almeno al 60%, libero almeno al 75%, libero almeno all'80%, libero almeno all'81%, libero almeno all'82%, libero almeno all'83%, libero almeno all'84%, libero almeno all'85%, libero almeno all'86%, libero almeno all'87%, libero almeno all'88%, libero almeno all'89%, libero almeno al 90%, libero almeno al 91%, libero almeno al 92%, libero almeno al 93%, libero almeno al 94%, libero almeno al 95%, libero almeno al 96%, libero almeno al 97%, libero almeno al 98%, libero almeno al 99% o libero a più del 99%, da altri componenti a cui è associato in natura.

**[0046]** Con il termine "condizioni fisiologiche" si intende comprendere le condizioni compatibili con cellule viventi, per esempio condizioni prevalentemente acquose di temperatura, pH, salinità e così via che sono compatibili con cellule viventi.

**[0047]** Laddove viene reso disponibile un intervallo di valori, resta inteso che rientra nell'invenzione ciascun valore intermedio, fino al decimo dell'unità del limite inferiore a meno che il contesto indichi chiaramente altrimenti, tra il limite superiore e il limite inferiore di tale intervallo e qualsiasi altro valore dichiarato o intermedio in tale intervallo dichiarato. I limiti superiore e inferiore di questi intervalli più piccoli possono essere indipendentemente inclusi negli intervalli più piccoli e sono anche compresi nell'invenzione, fermo restando qualsiasi limite specificatamente escluso nell'intervallo dichiarato. Laddove l'intervallo dichiarato includa uno o entrambi i limiti, sono inclusi nell'invenzione anche gli intervalli che escludono uno di o entrambi tali limiti inclusi.

**[0048]** Si deve notare che così come usate nel presente documento e nelle rivendicazioni allegate, le forme singolari "un", "uno", "una" e "il", "lo", "la" includono i referenti plurali a meno che il contesto indichi chiaramente altrimenti. Si fa rilevare inoltre che le rivendicazioni possono essere redatte in modo da escludere qualsiasi elemento opzionale. Quindi, questa dichiarazione è intesa servire come base antecedente per l'uso di una terminologia esclusiva come "unicamente", "solamente" e similari in relazione all'enumerazione di elementi di rivendicazione o all'uso di una limitazione "negativa".

**[0049]** Altre definizioni di termini possono presentarsi nell'intera descrizione.

### **DESCRIZIONE DI FORME DI REALIZZAZIONE ESEMPLIFICATIVE**

**[0050]** Come sopra riepilogato, aspetti della divulgazione includono metodi per la preparazione di un polinucleotide. In alcune forme di realizzazione, il metodo include mettere a contatto una prima composizione polinucleotidica che include: un polinucleotide avente una sequenza di 7 o più subunità nucleosidiche in cui almeno due delle subunità nucleosidiche sono unite da un legame intersubunità N3'→P5' tiofosforamidato; e prodotti e reagenti di sintesi non target; con un sale cationico multivalente per far precipitare un primo sale del polinucleotide che include almeno un controione cationico multivalente; e separare il primo sale del polinucleotide dalla prima composizione polinucleotidica messa a contatto per produrre una seconda composizione polinucleotidica che include il primo sale del polinucleotide. In certe forme di realizzazione, il metodo include inoltre mettere a contatto il sale del polinucleotide con un supporto per cromatografia a fase inversa; ed eluire dal supporto cromatografico una terza composizione polinucleotidica che include il polinucleotide. In alcune istanze, la terza composizione polinucleotidica include un secondo sale del polinucleotide. Sono rese disponibili anche composizioni che includono un sale del polinucleotide che include almeno un controione cationico multivalente. In alcune forme di realizzazione, l'almeno un controione cationico multivalente è selezionato dal gruppo costituito da magnesio, zinco, alluminio e calcio.

**[0051]** Prima di descrivere le varie forme di realizzazione, si deve comprendere che gli insegnamenti di questa divulgazione non sono limitati alle particolari forme di realizzazione descritte e quindi possono, ovviamente, variare. Si deve anche comprendere che la terminologia usata nel presente documento ha solamente lo scopo di descrivere particolari forme di realizzazione e non intende essere limitativa, in quanto la portata della presente invenzione sarà limitata solamente dalle rivendicazioni allegate.

**[0052]** I titoli delle sezioni usati nel presente documento sono solamente a scopo organizzativo e non devono essere interpretati in alcun modo come limitativi dell'oggetto descritto. Sebbene i presenti insegnamenti siano descritti unitamente a varie forme di realizzazione, non si intende che i presenti insegnamenti siano limitati a tali forme di realizzazione. Al contrario, i presenti insegnamenti comprendono varie alternative, modifiche ed equivalenti, come sarà compreso dalle persone esperte nell'arte.

**[0053]** A meno che altrimenti definiti, tutti i termini tecnici e scientifici usati nel presente documento hanno lo stesso significato che è comunemente inteso da una persona esperta nell'arte alla quale appartiene questa invenzione. Sebbene nella pratica o nella verifica della presente invenzione possa essere usato anche qualsiasi dei metodi e materiali analoghi o equivalenti a quelli descritti nel presente documento, vengono ora descritti i metodi e materiali di interesse.

**[0054]** La citazione di qualsiasi pubblicazione serve per la sua divulgazione prima della data di deposito e non deve essere interpretata come un'ammissione che le presenti rivendicazioni non siano autorizzate a retrodatare tale pubblicazione in virtù di invenzione antecedente. Inoltre, le date di pubblicazione rese disponibili possono essere diverse dalle date di pubblicazione effettive che possono dover essere confermate indipendentemente.

**[0055]** Si comprenderà che certe caratteristiche dell'invenzione, che sono, per chiarezza, descritte nel contesto di forme di realizzazione separate, possono essere anche rese disponibili in combinazione in una singola forma di realizzazione. Al contrario, varie caratteristiche dell'invenzione, che sono, per brevità, descritte nel contesto di una singola forma di realizzazione, possono essere anche rese disponibili separatamente o in qualsiasi sottocombinazione idonea. Tutte le combinazioni delle forme di realizzazione relative all'invenzione sono specificatamente comprese nella presente invenzione e sono divulgate nel presente documento come se ciascuna combinazione fosse singolarmente ed esplicitamente divulgata, nella misura in cui tali combinazioni comprendano l'oggetto che è costituito, per esempio, da composti che sono composti stabili (vale a dire composti che possono essere prodotti, isolati, caratterizzati e testati per l'attività biologica). In aggiunta, tutte le sottocombinazioni delle varie forme di realizzazione e dei relativi elementi (per esempio elementi dei gruppi chimici elencati nelle forme di realizzazione che descrivono tali variabili) sono anch'esse

specificatamente comprese nella presente invenzione e sono divulgate nel presente documento come se ciascuna tale sottocombinazione fosse singolarmente ed esplicitamente divulgata nel presente documento.

**[0056]** Nel descrivere ulteriormente l'invenzione in oggetto, vengono innanzitutto descritti in maggiore dettaglio i metodi per preparare un polinucleotide. Successivamente, vengono esaminate le composizioni polinucleotidiche di interesse per la realizzazione dei metodi in oggetto.

### **Metodi di preparazione**

**[0057]** Aspetti della presente divulgazione includono metodi per la preparazione di un polinucleotide. In alcune forme di realizzazione, il metodo include mettere a contatto una prima composizione polinucleotidica che include un polinucleotide (per esempio come descritto nel presente documento) e prodotti e agenti di sintesi non target, con un sale cationico multivalente per far precipitare un sale del polinucleotide che include almeno un controione cationico multivalente. La precipitazione del sale del polinucleotide usando i metodi in oggetto rende disponibile la rimozione di tutti i prodotti e agenti di sintesi non target solubili. In alcune forme di realizzazione, il metodo include separare il sale del polinucleotide dalla prima composizione polinucleotidica messa a contatto per produrre una seconda composizione polinucleotidica che include il sale del polinucleotide. In certe forme di realizzazione, la prima composizione polinucleotidica, il sale del polinucleotide e la seconda composizione polinucleotidica

includono ciascuno un polinucleotide target avente una sequenza di 7 o più subunità nucleosidiche dove almeno due delle subunità nucleosidiche sono unite da un legame intersubunità N3'→P5' tiofosforamidato (per esempio come descritto nel presente documento).

**[0058]** La seconda composizione polinucleotidica può avere una quantità ridotta di prodotti e agenti di sintesi non target rispetto alla prima composizione polinucleotidica. Con quantità ridotta di prodotti e agenti di sintesi non target si intende che vi è un 10% o più di riduzione in peso dei prodotti e agenti di sintesi non target nella seconda composizione polinucleotidica rispetto alla prima composizione polinucleotidica, come un 15% o più di riduzione in peso, 20% o più di riduzione in peso, 25% o più di riduzione in peso, 30% o più di riduzione in peso, 35% o più di riduzione in peso, 40% o più di riduzione in peso, 45% o più di riduzione in peso, 50% o più di riduzione in peso, 55% o più di riduzione in peso, 60% o più di riduzione in peso, 65% o più di riduzione in peso, 70% o più di riduzione in peso, 75% o più di riduzione in peso, 80% o più di riduzione in peso, 85% o di riduzione in peso, 90% o più di riduzione in peso o 95% o più di riduzione in peso. Quindi, i metodi in oggetto possono rendere disponibile la precipitazione selettiva di un polinucleotide target rispetto a prodotti e agenti di sintesi non target. In certe forme di realizzazione, i metodi in oggetto rendono disponibile una selettività migliorata della precipitazione rispetto a un metodo di controllo della precipitazione del polinucleotide che usa un solvente organico, come etanolo puro o una soluzione di etanolo (si veda per esempio Crouse J, Amorese D (1987)).

"Ethanol Precipitation: Ammonium Acetate as an Alternative to Sodium Acetate". Focus 9 (2): 3-5). Con selettività migliorata della precipitazione si intende che dalla seconda composizione polinucleotidica viene rimosso il 5% o più in peso di prodotti e agenti di sintesi non target rispetto a una composizione di controllo, come viene rimosso il 10% o più in peso, il 15% o più in peso, il 20% o più in peso, il 25% o più in peso, il 30% o più in peso, il 35% o più in peso, il 40% o più in peso, il 45% o più in peso, il 50% o più in peso, il 55% o più in peso, il 60% o più in peso, il 65% o più in peso, il 70% o più in peso, il 75% o più in peso, l'80% o più in peso o più in peso, l'85% o più in peso, il 90% o più in peso o il 95% o più in peso di prodotti e agenti di sintesi non target. La quantità ridotta di prodotti e agenti di sintesi non target rispetto alla prima composizione polinucleotidica può essere determinata usando qualsiasi metodo conveniente, per esempio usando metodi HPLC.

**[0059]** Così come usati nel presente documento, i termini "polinucleotide di sintesi target" e "polinucleotide target" sono usati in modo intercambiabile e si riferiscono a un polinucleotide avente una particolare sequenza di nucleotidi desiderata che viene sintetizzata su un supporto tramite qualsiasi metodo di sintesi in fase solida di polinucleotidi a più stadi conveniente (per esempio come descritto nel presente documento) e dove il polinucleotide è privo di qualsiasi gruppo di protezione che è utilizzato unicamente ai fini dell'esecuzione della strategia di sintesi del polinucleotide target. Tali gruppi di protezione possono essere rimossi da un polinucleotide nelle fasi finali della sintesi

in fase solida, per esempio durante la deprotezione e il clivaggio finali del polinucleotide da un supporto per produrre il polinucleotide target. Così come usato nel presente documento, il termine "non target" si riferisce a qualsiasi componente conveniente, per esempio un composto, un polinucleotide o un derivato dello stesso, un agente e così via o a miscele degli stessi che non sono il prodotto target desiderato di una sintesi.

**[0060]** Il polinucleotide target può includere qualsiasi numero conveniente di subunità nucleosidiche, come tra 7 e 500 subunità nucleosidiche, tra 7 e 100 subunità nucleosidiche, tra 7 e 75 subunità nucleosidiche, tra 7 e 50 subunità nucleosidiche, tra 7 e 40 subunità nucleosidiche, tra 7 e 30 subunità nucleosidiche, tra 7 e 20 subunità nucleosidiche, tra 7 e 15 subunità nucleosidiche, tra 10 e 15 subunità nucleosidiche o tra 13 e 15 subunità nucleosidiche. In alcune istanze, il polinucleotide target ha tra 7 e 100 subunità nucleosidiche, come tra 7 e 50 subunità nucleosidiche, tra 10 e 50 subunità nucleosidiche, tra 10 e 40 subunità nucleosidiche, tra 10 e 30 subunità nucleosidiche, tra 10 e 25 subunità nucleosidiche, tra 10 e 20 subunità nucleosidiche tra 12 e 18 subunità nucleosidiche o tra 12 e 16 subunità nucleosidiche. In certi casi, il polinucleotide target ha 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 subunità nucleosidiche.

**[0061]** Così come usato nel presente documento, il termine "prodotti e agenti di sintesi non target" si riferisce collettivamente a una varietà di componenti non target che possono essere presenti in un prodotto di sintesi grezzo della sintesi in fase solida di polinucleotidi,

inclusi, ma non limitati a: prodotti polinucleotidici non target della sintesi, come polinucleotidi tronchi, frammenti polinucleotidici protetti alle estremità (vale a dire sequenze che erano incappucciate dopo il fallimento di un accoppiamento di subunità), polinucleotidi che includono una o più delezioni (vale a dire mancanti di uno o più monomeri o dimeri nucleosidici target, per esempio come descritti nel presente documento) e polinucleotidi derivatizzati (per esempio sequenze polinucleotidiche che subiscono una reazione collaterale indesiderabile durante la sintesi o il clivaggio); e agenti come linker clivati, prodotti di deprotezione, per esempio prodotti con gruppi di protezione rimossi come prodotti con gruppi di protezione del fosforo e prodotti con gruppi di protezione di basi (per esempio prodotti di gruppi di protezione di ammina esociclica), reagenti di clivaggio e/o scavenger di clivaggio e reagenti di sintesi residui, come monomeri, dimeri, reagenti di accoppiamento, incappucciamento o deprotezione.

**[0062]** In certe forme di realizzazione, i metodi rendono disponibile la precipitazione selettiva di un polinucleotide target rispetto ai prodotti e agenti di sintesi non target che includono polinucleotidi aventi 6 subunità nucleosidiche o meno, come 5 o meno, 4 o meno, 3 o meno o 2 subunità nucleosidiche. In certi casi, tutti i prodotti e agenti di sintesi non target che non sono polinucleotidi rimangono solubili durante la fase di precipitazione selettiva dei metodi in oggetto e possono quindi essere facilmente rimossi dal precipitato del sale del polinucleotide risultante.

**[0063]** I metodi in oggetto possono includere la precipitazione e separazione del polinucleotide target da una preparazione di sintesi grezza per produrre una composizione polinucleotidica che ha diverse proprietà desiderabili, come una quantità ridotta di prodotti e agenti di sintesi non target (per esempio reagenti di sintesi, reagenti di clivaggio, scavenger, gruppi di protezione rimossi, prodotti collaterali di clivaggio (linker, gruppi di incappucciamento e così via) e piccoli frammenti polinucleotidici).

**[0064]** In alcune forme di realizzazione, i metodi in oggetto includono far precipitare il polinucleotide da una preparazione di sintesi grezza come un sale cationico multivalente prima della purificazione cromatografica. In certi casi, i metodi in oggetto sono metodi di purificazione di un polinucleotide target. La precipitazione della composizione polinucleotidica grezza usando un sale cationico multivalente produce un precipitato del sale del polinucleotide che include almeno un controione cationico multivalente. In alcuni casi, il precipitato del sale del polinucleotide include una miscela di controioni cationici monovalenti e multivalenti che formano coppie ioniche con la catena dorsale polianionica del polinucleotide. Così come usati nel presente documento, i termini "sale cationico multivalente" e "sale multivalente" quando usati in riferimento a un polinucleotide sono usati in modo intercambiabile per fare riferimento a un sale del polinucleotide che include almeno un controione cationico multivalente che forma una coppia ionica con un gruppo di legame intersubunità anionico della

catena dorsale del polinucleotide. In alcune istanze, il sale cationico multivalente del polinucleotide include una miscela di cationi monovalenti e multivalenti. In alcune forme di realizzazione, il catione multivalente può rendere disponibile un'aggregazione del polinucleotide target formando una coppia ionica con gruppi di legame intersubunità anionici di due o più catene dorsali del polinucleotide. In certe istanze, uno ione cationico bivalente forma una coppia ionica con due polinucleotidi distinti per formare un dimero. In alcuni casi, l'ulteriore aggregazione dei polinucleotidi può essere ottenuta mediante interazioni multivalenti aggiuntive mediate da cationi multivalenti aggiuntivi. Quindi, in alcuni casi, i metodi in oggetto possono rendere disponibile un'aggregazione e precipitazione selettiva di polinucleotidi target rispetto a prodotti e agenti di sintesi non target.

**[0065]** In alcune forme di realizzazione del metodo, l'almeno un controione cationico multivalente è bivalente. In certe forme di realizzazione, l'almeno un controione cationico multivalente è selezionato dal gruppo costituito da magnesio, zinco e calcio. In alcune forme di realizzazione, l'almeno un controione cationico multivalente è trivalente. In certe forme di realizzazione, l'almeno un controione cationico multivalente è alluminio. In alcune forme di realizzazione, il sale del polinucleotide include inoltre un controione cationico monovalente. In tali casi, il sale del polinucleotide è un sale misto, per esempio un sale che include due o più controioni cationici diversi.

**[0066]** Qualsiasi metodo conveniente di precipitazione di un polinucleotide può trovare impiego nei metodi in oggetto. La fase di mettere a contatto la prima composizione polinucleotidica con un sale cationico multivalente per far precipitare un sale del polinucleotide che include almeno un controione cationico multivalente può essere ottenuta usando qualsiasi metodo conveniente. Nella fase di messa a contatto per produrre il precipitato può essere utilizzato qualsiasi catione multivalente conveniente e sale dello stesso (per esempio come descritto nel presente documento). In certe istanze, un sale di un polinucleotide che include almeno un controione cationico multivalente viene prodotto in una fase in soluzione, per esempio tramite l'aggiunta di un sale cationico multivalente a una soluzione che include il polinucleotide. Dopo aver aggiunto il sale cationico multivalente alla soluzione, può formarsi il precipitato. In alcuni casi, un sale di un polinucleotide che include almeno un controione cationico multivalente può essere formato su un supporto a scambio ionico. Nella fase di messa a contatto può essere utilizzato qualsiasi supporto a scambio ionico conveniente. In alcuni casi, il supporto a scambio ionico è una resina a scambio cationico forte. In alcune forme di realizzazione del metodo, la fase di messa a contatto include eluire la prima composizione polinucleotidica da un supporto a scambio cationico che include controioni cationici multivalenti. Così come usato nel presente documento, il termine "supporto a scambio cationico" si riferisce a un supporto che è esso stesso anionico ed è in grado di formare una coppia ionica con un analita cationico, come un catione

multivalente di interesse. Per la fase di eluizione dal supporto a scambio cationico può essere utilizzato qualsiasi eluente conveniente. In alcune istanze, il precipitato si forma nell'eluato dopo che il sale del polinucleotide è stato eluito dal supporto a scambio cationico.

**[0067]** I metodi in oggetto possono essere eseguiti su qualsiasi preparazione di sintesi grezza conveniente di un polinucleotide di sintesi target. In alcune istanze, la prima composizione polinucleotidica è una preparazione di sintesi grezza di un polinucleotide di sintesi target. In certe forme di realizzazione, la prima composizione polinucleotidica è una composizione che è il prodotto di clivaggio di un polinucleotide target da un supporto, post-sintesi. Quindi, la prima composizione polinucleotidica può includere una varietà di prodotti e agenti di sintesi non target. I metodi in oggetto rendono disponibile la precipitazione selettiva del sale del polinucleotide rispetto a prodotti e agenti di sintesi non target, che rimangono in soluzione e quindi possono essere facilmente rimossi dal precipitato risultante.

**[0068]** Per sintetizzare il polinucleotide target può essere utilizzato qualsiasi metodo di sintesi conveniente (per esempio come descritto nel presente documento). Dopo la sintesi, il polinucleotide target viene clivato dal supporto su cui viene eseguita la sintesi a più stadi. Dopo il clivaggio, il polinucleotide target a lunghezza intera può essere purificato per rimuovere i reagenti di sintesi e clivaggio indesiderabili e per rimuovere i frammenti polinucleotidici non target e i derivati degli stessi. I metodi in oggetto che includono la precipitazione del sale del

polinucleotide che include almeno un controione cationico multivalente possono essere eseguiti in qualsiasi stadio conveniente della preparazione di un polinucleotide target, come post-sintesi e prima della purificazione mediante cromatografia a fase inversa.

**[0069]** Così come usati nel presente documento, i termini "preparazione di sintesi grezza", "composizione grezza" e "polinucleotide grezzo" si riferiscono a una composizione che include i prodotti di sintesi della sintesi polinucleotidica in fase solida che vengono raccolti post-sintesi tramite clivaggio da un supporto di sintesi in fase solida, dove la composizione non è purificata, vale a dire non è stata eseguita alcuna purificazione cromatografica sulla composizione. La purificazione cromatografica si riferisce a qualsiasi metodo di purificazione conveniente che include l'assorbimento di un polinucleotide target su un supporto cromatografico e la successiva eluizione e risoluzione del polinucleotide target da polinucleotidi non target. In alcuni casi, la purificazione cromatografica si riferisce alla purificazione mediante cromatografia a fase inversa.

**[0070]** In alcune forme di realizzazione, il metodo include inoltre rendere disponibile una prima composizione polinucleotidica, dove la composizione viene prodotta tramite clivaggio post-sintesi da un supporto di sintesi in fase solida. Prima dell'utilizzo della composizione risultante nei metodi in oggetto può anche essere eseguita qualsiasi fase aggiuntiva conveniente, come fasi di evaporazione, diluizione o concentrazione, sulla preparazione di sintesi grezza. In alcune istanze, il

metodo include inoltre sintetizzare il polinucleotide target (per esempio come descritto nel presente documento su un supporto di sintesi in fase solida). In certe forme di realizzazione, il metodo include inoltre clivare il polinucleotide da un supporto per produrre la prima composizione polinucleotidica.

**[0071]** Un precipitato solido che include il sale del polinucleotide può essere separato dalla prima composizione polinucleotidica che è stata messa a contatto con il sale multivalente (vale a dire la prima composizione polinucleotidica messa a contatto) usando qualsiasi metodo conveniente. Metodi di separazione di interesse includono, ma non sono limitati a, centrifugazione, filtrazione, decantazione e similari.

**[0072]** In alcune istanze, la separazione del precipitato che include il sale del polinucleotide viene ottenuta mediante centrifugazione dove l'applicazione di una forza centrifuga alla prima composizione polinucleotidica messa a contatto, per esempio in una centrifuga, fa sì che il precipitato formi un pellet, per esempio, sul fondo del contenitore. La formazione di un pellet tramite centrifugazione può essere indicata come sedimentazione per centrifugazione del precipitato. In certe forme di realizzazione del metodo, la fase di separazione include centrifugare la prima composizione polinucleotidica messa a contatto per sedimentare mediante centrifugazione il precipitato del sale del polinucleotide. Il liquido surnatante può poi essere fatto decantare dalla provetta senza disturbare il precipitato o estratto dal contenitore, per

esempio con una pipetta Pasteur. Il processo di centrifugazione può essere ripetuto con una soluzione di lavaggio.

**[0073]** In alcune istanze, la separazione del precipitato che include il sale del polinucleotide viene ottenuta mediante filtrazione. In alcune forme di realizzazione del metodo, la fase di separazione include filtrare il sale del polinucleotide dal primo polinucleotide messo a contatto. Nei metodi in oggetto può essere utilizzato qualsiasi filtro e mezzo filtrante conveniente. In certi casi, la separazione viene ottenuta mediante filtrazione di profondità usando un mezzo filtrante che viene selezionato in base al polinucleotide target.

**[0074]** In alcune forme di realizzazione, il metodo include: mettere a contatto una prima composizione polinucleotidica che include: un polinucleotide avente una sequenza di 7 o più subunità nucleosidiche e almeno due delle subunità nucleosidiche sono unite da un legame intersubunità N3'→P5' tiofosforammidato; e prodotti e agenti di sintesi non target;

con un sale cationico multivalente per far precipitare un primo sale del polinucleotide che include almeno un controione cationico multivalente; e

separare il primo sale del polinucleotide dalla prima composizione polinucleotidica messa a contatto per produrre una seconda composizione polinucleotidica che include il sale del polinucleotide.

**[0075]** La separazione del precipitato dalla prima composizione polinucleotidica messa a contatto produce una seconda composizione polinucleotidica che include il primo sale del polinucleotide. In alcuni casi, la precipitazione selettiva del primo sale del polinucleotide usando il sale cationico multivalente attraverso i metodi in oggetto produce una seconda composizione polinucleotidica che include una quantità ridotta di prodotti e agenti di sintesi non target.

**[0076]** Dopo la precipitazione selettiva, i sali del polinucleotide in oggetto possono essere convertiti in un sale del polinucleotide solubile mediante scambio cationico dell'almeno un controione cationico multivalente rimuovendolo dal polinucleotide e sostituzione con un altro controione cationico di interesse (per esempio come descritto nel presente documento). Quindi, i metodi in oggetto rendono disponibile la formazione reversibile di un primo sale del polinucleotide che include almeno un controione cationico multivalente. Così come usati nel presente documento, i termini "formazione reversibile" e "scambio reversibile" sono usati in modo intercambiabile e si riferiscono alla preparazione di un sale del polinucleotide mediante, per esempio, precipitazione selettiva (per esempio come descritto nel presente documento), dove il sale formatosi può anche essere successivamente dissociato per scambiare l'almeno un sale cationico multivalente rimuovendolo dal sale. In alcuni casi, i sali del polinucleotide che sono insolubili in tutti i solventi possono essere indicati come sali formati irreversibilmente. In alcune forme di realizzazione, il metodo include

scambiare l'almeno un controione cationico multivalente rimuovendolo dal primo sale del polinucleotide per produrre un secondo sale del polinucleotide solubile, dove lo scambio include dissociare il controione cationico multivalente e formare una coppia ionica con un catione del sale solubile di interesse. In certe istanze, il secondo sale del polinucleotide solubile è un sale monovalente. In certe istanze, il secondo sale del polinucleotide solubile è un sale di sodio. In certe istanze, il secondo sale del polinucleotide solubile è un sale di trietilammonio. In alcune istanze, il primo e il secondo polinucleotide sono distinti l'uno dall'altro, vale a dire includono controioni cationici diversi. La dissociazione dei sali del polinucleotide in oggetto e lo scambio dell'almeno un controione cationico multivalente possono essere ottenuti usando qualsiasi metodo conveniente. In certe istanze, la dissociazione viene ottenuta usando la cromatografia a fase inversa, per esempio come descritto nel presente documento. In alcuni casi, per ottenere la dissociazione può essere utilizzata la cromatografia a scambio ionico. In certe forme di realizzazione, la dissociazione del primo sale del polinucleotide viene ottenuta mediante dissoluzione del sale in un solvente che include un controione cationico di interesse.

**[0077]** Dopo la separazione, possono essere eseguite ulteriori fasi di purificazione sulla seconda composizione polinucleotidica. In alcune forme di realizzazione, il metodo include inoltre: mettere a contatto il primo sale del polinucleotide con un supporto per cromatografia a fase inversa; ed eluire dal supporto cromatografico una

terza composizione polinucleotidica che include il polinucleotide. In certe forme di realizzazione, la terza composizione polinucleotidica include un secondo sale del polinucleotide. Per purificare il sale del polinucleotide può essere utilizzato qualsiasi metodo cromatografico a fase inversa conveniente. I metodi cromatografici a fase inversa e i supporti di interesse includono, ma non sono limitati a, purificazione cromatografica usando cromatografia a fase inversa a coppia ionica, cromatografia a fase inversa C18 e i metodi e i supporti descritti da Chen et al., *Journal of Chromatography A*, Volume 1288, 3 maggio 2013, pagine 73-81; e Zimmermann et al., *Journal of Chromatography A*, Volume 1354, 8 agosto 2014, pagine 43-55. In alcune forme di realizzazione, la seconda composizione polinucleotidica viene caricata direttamente sul supporto per cromatografia a fase inversa. Con caricata direttamente sul supporto si intende che la seconda composizione polinucleotidica prodotta usando il metodo in oggetto viene aggiunta direttamente, per esempio come precipitato solido isolato, al supporto per cromatografia a fase inversa. In alcune istanze, il supporto per cromatografia a fase inversa è una resina configurata come colonna e la composizione polinucleotidica viene aggiunta alla parte superiore del letto di resina. In certe forme di realizzazione, il metodo include inoltre dissolvere la seconda composizione polinucleotidica in un solvente. Può essere utilizzato qualsiasi solvente conveniente, inclusi ma non limitati a tamponi acquosi, solventi organici miscibili con acqua e miscele degli stessi. In tali casi, una soluzione della seconda composizione polinucleotidica può essere

messa a contatto con il supporto per cromatografia a fase inversa per assorbire il polinucleotide al supporto prima dell'eluizione.

**[0078]** In alcuni casi, la messa a contatto include assorbire il polinucleotide sul supporto per cromatografia a fase inversa e successivamente eluire il polinucleotide per rendere disponibile la risoluzione cromatografica del polinucleotide target dal polinucleotide non target e dagli agenti di sintesi residui che sono presenti nella composizione. L'eluato che contiene il polinucleotide target viene raccolto. Per eluire il polinucleotide dal supporto per cromatografia a fase inversa può essere utilizzato qualsiasi eluente conveniente. L'eluente può essere selezionato in base a una varietà di fattori, come la natura del supporto per cromatografia a fase inversa, l'oligonucleotide target, particolari sali desiderati del polinucleotide target e così via. In alcune istanze, viene eseguito lo scambio ionico dell'almeno un controione cationico multivalente del primo sale del polinucleotide sul supporto per cromatografia a fase inversa con un altro controione cationico distinto di interesse che è incluso nell'eluente. In tali casi, quando viene eluito dal supporto per cromatografia a fase inversa, il polinucleotide è in una forma di sale diversa (vale a dire un secondo sale del polinucleotide) rispetto a quando era stato caricato, in quanto l'almeno un controione cationico multivalente è stato scambiato rimuovendolo dal polinucleotide. In certe istanze, la forma di sale del polinucleotide che viene eluita dal supporto nella terza composizione polinucleotidica è più idrosolubile rispetto al

primo sale del polinucleotide che include almeno un controione cationico multivalente.

**[0079]** In certe forme di realizzazione, la terza composizione polinucleotidica include un secondo sale del polinucleotide che è un sale farmaceuticamente accettabile del polinucleotide. In certe istanze, la terza composizione include un secondo sale del polinucleotide che è un sale cationico monovalente del polinucleotide. In certi casi, la terza composizione include un secondo sale del polinucleotide che è un sale di trietilammonio del polinucleotide. In certi casi, la terza composizione include un secondo sale del polinucleotide che è un sale di sodio del polinucleotide. Resta inteso che, dopo che il polinucleotide è stato purificato mediante cromatografia a fase inversa, può essere eseguito qualsiasi numero di ulteriori fasi di scambio di controioni cationici sul sale del polinucleotide per produrre una forma di sale desiderata del polinucleotide. In alcune forme di realizzazione, il metodo include inoltre lo scambio ionico di controioni cationici dal secondo sale del polinucleotide per produrre un terzo sale del polinucleotide. In certe forme di realizzazione, il terzo sale del polinucleotide è un sale farmaceuticamente accettabile del polinucleotide. In certe istanze, il terzo sale del polinucleotide è un sale cationico monovalente del polinucleotide. In certe istanze, il terzo sale del polinucleotide è un sale di sodio del polinucleotide (per esempio come descritto nel presente documento).

**[0080]** In certe istanze, la prima composizione include un sale cationico monovalente del polinucleotide. In certi casi, il sale cationico

monovalente è selezionato dal gruppo costituito da sodio, ammonio e alchilammonio. In certe istanze, l'alchilammonio è selezionato dal gruppo costituito da dimetilammonio, metilammonio, etilammonio e trietilammonio. In certi casi, la prima composizione include un sale di ammonio del polinucleotide. In certi casi, la prima composizione include un sale di alchilammonio del polinucleotide. In certi casi, la prima composizione include un sale di trietilammonio del polinucleotide. In certi casi, la prima composizione include un sale di sodio del polinucleotide. La prima composizione polinucleotidica può essere messa a contatto con un sale cationico multivalente per far precipitare un primo sale del polinucleotide che include almeno un controione cationico multivalente. Quindi, in certe forme di realizzazione, la prima composizione polinucleotidica messa a contatto include il primo sale del polinucleotide che include almeno un controione cationico multivalente.

**[0081]** Sono considerate essere comprese nella portata di questa invenzione forme di realizzazione di qualsiasi delle forme di realizzazione del metodo sopra indicate, dove il polinucleotide è come descritto nel presente documento.

### **Metodi di sintesi**

**[0082]** Per preparare le composizioni polinucleotidiche del prodotto di sintesi grezzo può essere utilizzato qualsiasi metodo, strategia e chimica di sintesi di polinucleotidi conveniente che trovi impiego nei metodi di preparazione in oggetto. Le chimiche di sintesi di polinucleotidi e i metodi di interesse che possono essere atti per l'uso nei

metodi in oggetto includono, ma non sono limitati a, fosforammidito, H-fosfonato, fosfodiesteri, fosfotriesteri, fosfitotriesteri. I componenti polinucleotidici dei composti dell'invenzione possono essere sintetizzati adattando qualsiasi protocollo convenzionale al tipo di chimica selezionata. I metodi di interesse per la sintesi di oligonucleotidi aventi chimiche del N3'→P5' tiofosforammidato includono, ma non sono limitati a, i metodi descritti in US 5,824,793, Mccurdy et al., (1997) Tetrahedron Letters, 38:207-210; Pongracz & Gryaznov, (1999) Tetrahedron Letters, 49:7661-7664; US 6,835,826, US 7,494,982, US 7,485,717 e US 5,684,143.

**[0083]** In alcuni casi, un polinucleotide di interesse viene sintetizzato tramite accoppiamenti sequenziali partendo dal 5'-terminale e procedendo verso il 3'-terminale della sequenza polinucleotidica target. In certi casi, un polinucleotide di interesse viene sintetizzato tramite accoppiamenti sequenziali partendo dal 3'-terminale e procedendo verso il 5'-terminale della sequenza polinucleotidica target. In alcune forme di realizzazione, il polinucleotide viene sintetizzato mediante accoppiamenti sequenziali di fosforammiditi monomerici al terminale in crescita del polinucleotide. La subunità nucleosidica 5'-terminale può essere attaccata a qualsiasi supporto solido conveniente tramite un gruppo legante opzionale o il gruppo 5'-terminale. Dopo che la prima subunità è stata attaccata al supporto solido, la subunità può essere deprotetta per produrre un gruppo 3'-terminale libero immobilizzato. Poi, possono essere ottenuti accoppiamenti di subunità alla catena oligonucleotidica in

crescita. In alcune istanze, il metodo include accoppiare un gruppo 3'-terminale legato al supporto con un monomero 5'-fosforammidito nucleotidico protetto in 3'. In certe forme di realizzazione, il gruppo 3'-terminale è un gruppo 3'-idrossile. In certe forme di realizzazione, il gruppo 3'-terminale è un gruppo 3'-ammino.

**[0084]** In alcune istanze, il metodo di sintesi del polinucleotide include le fasi di: (a) deproteggere il gruppo 3'-ammino protetto di un nucleoside terminale attaccato a un supporto in fase solida, la deprotezione formando un gruppo 3'-ammino libero; (b) mettere a contatto il gruppo 3'-ammino libero con un monomero 5'-fosforammidito ammino-nucleosidico protetto in 3' in presenza di un catalizzatore nucleofilo per formare un legame internucleosidico  $N3' \rightarrow P5'$  fosforammidito; e (c) ossidare il legame per produrre un legame  $N3' \rightarrow P5'$  tiosforammidato. In alcune forme di realizzazione, il metodo include (d) ripetere le fasi da (a) a (c) fino a quando il polinucleotide è stato sintetizzato.

**[0085]** In alcuni casi, il metodo include accoppiare un gruppo 3'-terminale legato al supporto con un dimero 5'-fosforammidito dinucleotidico protetto in 3'. I metodi di sintesi dei polinucleotidi di interesse includono, ma non sono limitati a, i metodi di sintesi in fase solida che includono almeno un accoppiamento di un dimero dinucleotidico come descritto nella pubblicazione PCT n. WO 2015/168310, la quale domanda rivendica il beneficio della domanda provvisoria US seriale n. 61/987,396. La sequenza polinucleotidica target

può essere sintetizzata tramite una strategia di retrosintesi che include accoppiamenti sequenziali di subunità sia dimeriche sia monomeriche con il gruppo 3'-terminale della catena oligonucleotidica in crescita. In alcune forme di realizzazione, il polinucleotide viene sintetizzato usando un metodo che include almeno un accoppiamento di un dimero dinucleotidico con il gruppo 3'-terminale libero di una catena polinucleotidica in crescita.

**[0086]** In alcune istanze, il metodo di sintesi del polinucleotide include le fasi di: (a) deproteggere il gruppo 3'-ammino protetto di un nucleoside terminale attaccato a un supporto in fase solida, la deprotezione formando un gruppo 3'-ammino libero; (b) mettere a contatto il gruppo 3'-ammino libero con un dimero tiofosforamidato ammino-dinucleotidico o fosforamidato-e'-fosforamidato protetto in 3' in presenza di un catalizzatore nucleofilo per formare un legame internucleosidico N3'→P5' fosforamidato; e (c) ossidare il legame un legame N3'→P5' tiofosforamidato. In alcune forme di realizzazione, il metodo include (d) ripetere le fasi da (a) a (c) fino a quando il polinucleotide è stato sintetizzato, dove nella fase (b) può essere utilizzato un dimero tiofosforamidato ammino-dinucleotidico-5'-fosforamidato protetto in 3' o un monomero 5'-fosforamidato ammino-nucleotidico protetto in 3'.

**[0087]** Per proteggere i gruppi di basi, fosforamidato, fosforamidato, 5', 2' e/o 3' del polinucleotide nei metodi in oggetto può essere utilizzata qualsiasi strategia del gruppo di protezione conveniente.

I gruppi di protezione di interesse includono, ma non sono limitati a, i gruppi di protezione descritti da Ohkubo et al., Org. Lett., 2010, 12 (11), pp 2496-2499; e Beaucage e Iyer, Tetrahedron 48: 2223-2311 (1992).

**[0088]** Così come usato nel presente documento, il termine "gruppo di protezione di fosfato" si riferisce a un gruppo di protezione che può essere attaccato a un legame intersubunità contenente fosforo di un oligonucleotide. Quando presente, un gruppo di protezione di fosfato può impedire (vale a dire bloccare) la reazione del legame contenente fosforo nel punto in cui è attaccato il gruppo di protezione di fosfato. Qualsiasi legame intersubunità contenente fosforo conveniente (per esempio legami P(III) e P(V)) può essere protetto dai gruppi di protezione di fosfato in oggetto, inclusi, ma non limitati a, legami fosforamidato, ossofosforamidato, tiofosforamidato, estere fosfato, estere tiofosfato, fosfodiesteri e similari. Il gruppo di protezione di fosfato può essere attaccato a un atomo di ossigeno disponibile del legame intersubunità contenente fosforo. Come gruppo di protezione di fosfato può essere utilizzato qualsiasi gruppo di protezione conveniente. In certe forme di realizzazione, un gruppo di protezione di fosfato è metile o  $\beta$ -cianoetile.

**[0089]** In alcune istanze, il gruppo 3'-terminale della catena polinucleotidica in crescita può includere un 3'-idrossile, un gruppo 3'-ammino o una versione protetta dello stesso. Durante la sintesi del polinucleotide può essere utilizzato in corrispondenza del gruppo 3'-terminale qualsiasi gruppo di protezione idrossile e/o ammino conveniente. In alcune forme di realizzazione, il gruppo 3'-terminale è un

gruppo 3'-ammino protetto e il metodo include deproteggere o rimuovere il gruppo di protezione per produrre un gruppo 3'-ammino libero. Così come usato nel presente documento, il termine "gruppo ammino libero" indica un gruppo ammino disponibile per la reazione con il gruppo fosforamidato di un monomero o dimero entrante. In alcune forme di realizzazione, un gruppo ammino libero è un'ammina primaria. Dopo la fase di deprotezione (per esempio detritilazione), il gruppo ammino può essere nella forma di un sale (per esempio il sale di una base coniugata dell'acido usato per la detritilazione). Questo sale può essere opzionalmente neutralizzato con una soluzione basica come trietilammina o piridina al 2% in acetonitrile dopo la fase di detritilazione.

**[0090]** La protezione in 3' dei fosforamidati di subunità entranti impedisce una polimerizzazione indesiderabile della catena. In alcune forme di realizzazione, il gruppo 3'-terminale è un gruppo 3'-idrossile protetto e il metodo include deproteggere o rimuovere il gruppo di protezione per produrre un gruppo 3'-idrossile libero. In alcune forme di realizzazione, il gruppo 3'-terminale è un gruppo 3'-ammino protetto e il metodo include deproteggere o rimuovere il gruppo di protezione per produrre un gruppo 3'-ammino libero. Il gruppo 3'-ammino o 3'-idrossile protetto può essere protetto con un gruppo di protezione di tritile. In certe forme di realizzazione, il gruppo di protezione di tritile è trifenilmetile (Tr o Trt,  $\text{Ph}_3\text{C}-$ ). In certe forme di realizzazione, il gruppo di protezione di tritile è 4,4'-dimetossitritile (DMT). La deprotezione del gruppo ammino o idrossile 3'-terminale può essere ottenuta usando qualsiasi metodo

conveniente. I metodi di interesse includono, ma non sono limitati a, i metodi descritti da Beaucage e Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992). In alcuni casi, la deprotezione del gruppo 3'-ammino protetto di un nucleoside terminale include la detritilazione per produrre un gruppo 3'-terminale libero, per esempio detritilazione catalizzata da acido. In alcuni casi, i fosforamiditi di subunità dimeriche o monomeriche includono un gruppo 3'-idrossile o 3'-ammino protetto che è uguale al gruppo 3'-terminale del nucleoside terminale attaccato al supporto solido.

**[0091]** Per la sintesi di polinucleotidi secondo i metodi in oggetto può essere usato qualsiasi supporto in fase solida conveniente. I supporti solidi di interesse includono, ma non sono limitati a, microparticelle realizzate impiegando vetro a porosità controllata (CPG), polistirene altamente reticolato (per esempio NittoPhase HL 400 o GE Primer 350), copolimeri acrilici, cellulosa, nylon, destrano, lattice, poliacroleina e similari, come quelli divulgati nei seguenti riferimenti esemplificativi: *Met. Enzymol.*, Sezione A, pagine 11-147, vol. 44 (Academic Press, New York, 1976); brevetti US n. 4,678,814; 4,413,070; e 4,046,720; e Pon, capitolo 19, in Agrawal, a cura di, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 20, (Humana Press, Totowa, N.J., 1993). Ulteriori supporti di interesse includono perle di polistirene; polistirene innestato con polietilenglicole (per esempio TentaGel™, Rapp Polymere, Tubingen Germania); e similari. La selezione delle caratteristiche del supporto, come materiale, porosità, dimensione, forma e similari e il tipo di porzione funzionale legante impiegata dipendono da una varietà di fattori, come i gruppi di protezione

impiegati, la lunghezza del prodotto finale, la quantità del prodotto finale e similari. Porzioni funzionali leganti esemplificative sono divulgate in Pon et al., *Biotechniques*, 6:768-775 (1988); Webb, brevetto US n. 4,659,774; Barany et al., domanda di brevetto internazionale PCT/US 91/06103; 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 e Southern, *Nucleic Acids Research*, 20: 1679-1684 (1992); e similari.

**[0092]** In alcune forme di realizzazione, i supporti solidi che trovano impiego nei metodi in oggetto includono CPG e polistirene innestato con polietilenglicole e possiedono un gruppo ammino terminale (per esempio TentaGel-NH<sub>2</sub><sup>TM</sup>, Rapp Polymere, Tubingen Germania). Il gruppo amminopropile può essere usato come spaziatore tra CPG e il legame nucleosidico. In alcuni casi, il legame al 5'-idrossile del primo nucleoside è un gruppo succinile che fornisce un legame estere base-labile che può essere clivato dopo la sintesi con ammoniaca acquosa.

**[0093]** Dopo la deprotezione, il nucleoside legato al supporto è in grado di reagire con un fosforamidito di una subunità dimerica o monomerica per formare un legame internucleosidico. Resta inteso che il nucleoside legato al supporto può riferirsi a un singolo residuo attaccato a un supporto solido o può riferirsi al residuo terminale di una catena oligonucleotidica che è attaccata al supporto. Nei metodi in oggetto possono essere utilizzati qualsiasi chimica di accoppiamento, reagente di accoppiamento e metodo conveniente. Qualsiasi selezione

conveniente riguardante condizioni di accoppiamento, gruppi di protezione, supporti in fase solida, gruppi leganti, reagenti di deprotezione, reagenti per clivare prodotti da supporti in fase solida, purificazione del prodotto e similari può essere effettuata nel contesto dei metodi in oggetto secondo la guida di, per esempio, Gait, a cura di, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1984); Amarnath e Broom, *Chemical Reviews*, Vol. 77, pp. 183-217 (1977); Pon et al., *Biotechniques*, Vol. 6, pp. 768-775 (1988); Ohtsuka et al., *Nucleic Acids Research*, Vol. 10, pp. 6553-6570 (1982); Eckstein, a cura di, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991), Greene e Wuts "Protective Groups in Organic Synthesis", terza edizione, Wiley, New York 1999, Narang, a cura di, *Synthesis and Applications of DNA and RNA* (Academic Press, New York, 1987), Beaucage e Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992) e riferimenti analoghi.

**[0094]** In alcune istanze, dopo l'accoppiamento, i gruppi 3'-ammino non reagiti di una catena del polinucleotide in crescita legata al supporto possono essere opzionalmente incappucciati con un agente di incappucciamento conveniente prima della successiva fase di deprotezione (per esempio fase di detritilazione) per renderli inerti alle successive fasi di accoppiamento. Questa fase di incappucciamento può migliorare il profilo HPLC della preparazione per rendere la purificazione più facile e può anche migliorare la resa complessiva del prodotto. I reagenti di incappucciamento utili nei metodi in oggetto includono

reagenti elettrofili come anidride acetica e anidride isobutirrica, cloruri acidi come cloruro di adamantil-carbonile, cloruro di pivaloile e similari, isotiocianati, cloroformiati e così via. Sono utili anche fosforammiditi in combinazione con un attivatore e seguiti da ossidazione e sali di H-fosfonato come isopropil-H-fosfonato di trietilammonio, usato in combinazione con un cloruro acido come cloruro di pivaloile o cloruro di adamantil-carbonile.

**[0095]** In alcune forme di realizzazione, il metodo include ossidare un legame internucleosidico N3'→P5' fosforammidito. Così come usato nel presente documento, i termini "ossidare", "ossidazione", "ossidando" e similari, in riferimento a un legame internucleosidico contenente fosforo indica un processo o trattamento per convertire l'atomo di fosforo del legame da una forma di fosforo (III) a una forma di fosforo (V). L'ossidazione dei legami internucleotidici può essere eseguita in qualsiasi punto conveniente nella sintesi usando qualsiasi metodo conveniente. In alcune forme di realizzazione, l'ossidazione viene eseguita in più fasi, per esempio durante ogni ciclo di accoppiamento. In altre forme di realizzazione, l'ossidazione di legami internucleotidici multipli viene eseguita al termine della sintesi. In alcune istanze, ossidare un legame N3'→P5' fosforammidito (per esempio usando un agente ossidante a base di iodio/acqua) produce un legame osso-fosforammidato. In altre istanze, ossidare un legame N3'→P5' fosforammidito include la solforizzazione per produrre un legame N3'→P5' tiofosforammidato. La solforizzazione può essere eseguita

usando qualsiasi metodo conveniente. I metodi di solforizzazione di interesse includono quelli descritti da Gryazonov et al. in WO 2001018015 e US 6,114,519. Gli agenti solforizzanti di interesse includono, ma non sono limitati a, zolfo elementare, disolfuri di tiuram come disolfuro di tetraetil tiuram, disolfuri di acile come disolfuro di fenacile, disolfuro di fenilacetile, disolfuri di fosfinitioile come S-Tetra™ e 1,1-diosso-3H-1,2-benzoditiol-3-one. In alcune forme di realizzazione, la solforizzazione può essere eseguita usando disolfuro di fenilacetile in 2,6-lutidina. In certe forme di realizzazione, la solforizzazione può essere eseguita usando reagente di Beaucage, usando metodi come descritti da Iyer et al., J. Organic Chemistry 55:4693-4699, 1990.

**[0096]** Il clivaggio del polinucleotide dal supporto di sintesi in fase solida può essere ottenuto usando qualsiasi metodo e reagente conveniente, che può essere selezionato in base a una varietà di fattori, come la natura del supporto, la chimica del linker e la strategia del gruppo di protezione utilizzata durante la sintesi. Le selezioni effettuate nella sintesi e nel clivaggio di un polinucleotide target possono determinare le identità dei prodotti e dell'agente di sintesi non target presenti nella prima composizione polinucleotidica.

**[0097]** In alcune forme di realizzazione, prima del clivaggio, i gruppi di protezione del fosforo del polinucleotide vengono rimossi per evitare la formazione di eventuali addotti potenziali indesiderabili del gruppo di protezione clivato (per esempio il gruppo di protezione di  $\beta$ -cianoetile) con il polinucleotide. I metodi di interesse che possono essere

atti per l'uso nella deprotezione e nel clivaggio dei polinucleotidi includono quelli descritti in US 7,199,236. In alcune forme di realizzazione, il polinucleotide viene clivato dal supporto usando una soluzione di ammoniacca per rimuovere eventuali gruppi di protezione di basi (per esempio gruppi di protezione di ammino esociclico) ed eventuali gruppi di protezione del fosforo rimanenti. Nella reazione di clivaggio del polinucleotide può essere utilizzata qualsiasi condizione conveniente. In alcuni casi, il clivaggio viene eseguito a una temperatura nell'intervallo da 40 a 60 °C. In alcune istanze, il clivaggio viene eseguito per un periodo di tempo prolungato, come un tempo nell'intervallo da 12 a 24 ore. Dopo il clivaggio del polinucleotide, il supporto può essere rimosso mediante filtrazione e risciacquo. Le soluzioni di filtrato e risciacquo combinate, che ora contengono la preparazione di sintesi grezza del polinucleotide, possono essere utilizzate nei metodi di preparazione in oggetto, prima di essere portate alle ulteriori fasi di purificazione. In alcuni casi, la purificazione di una soluzione polinucleotidica include la cromatografia preparativa liquida ad alta prestazione a fase inversa (RP-HPLC) RP HPLC, per esempio usando Kromasil C18 a da 45 a 55 °C. In alcune istanze, le composizioni polinucleotidiche dei metodi in oggetto possono essere sottoposte a qualsiasi numero di fasi di desalificazione e concentrazione convenienti, per esempio usando un apparecchio di filtrazione a flusso tangenziale (TFF) dotato di membrane di polietersolfone con una dimensione di cut-off del diametro dei pori di 1.000 Da.

## **COMPOSIZIONI POLINUCLEOTIDICHE**

**[0098]** Aspetti della presente divulgazione includono composizioni di sali del polinucleotide che includono controioni cationici multivalenti. In alcune forme di realizzazione, la composizione include: un sale di un polinucleotide che include almeno un controione cationico multivalente, in cui il polinucleotide ha una sequenza di 7 o più subunità nucleosidiche e almeno due delle subunità nucleosidiche sono unite da un legame intersubunità N3'→P5' tiofosforamidato. In certe forme di realizzazione, il polinucleotide ha una sequenza di 7 o più subunità nucleosidiche complementari alla componente a RNA della telomerasi umana.

### **Controioni cationici multivalenti**

**[0099]** Qualsiasi catione multivalente conveniente può trovare impiego come controione nei sali del polinucleotide in oggetto. Quindi, un catione multivalente può formare una coppia ionica con un sito anionico su una catena dorsale del polinucleotide nelle composizioni polinucleotidiche in oggetto. I polinucleotidi possono includere subunità nucleosidiche legate da legami intersubunità contenenti fosforo (per esempio legami P(V)) come legami fosforamidato, tiofosforamidato, estere fosfato, fosfodiesteri e similari. Resta inteso che i legami intersubunità del polinucleotide possono essere a carica negativa (per esempio in una soluzione acquosa) e formano una coppia ionica con un controione cationico. Tali legami intersubunità possono essere indicati come gruppi anionici della catena dorsale del polinucleotide.

**[0100]** Così come usato nel presente documento, il termine catione multivalente si riferisce a un catione in grado di formare coppie ioniche multiple, per esempio un catione a carica multipla, come un catione a doppia carica o a tripla carica. Nelle composizioni di sali del polinucleotide in oggetto può trovare impiego qualsiasi catione multivalente conveniente. In alcune forme di realizzazione, un catione multivalente forma una coppia ionica con due o più gruppi anionici adiacenti della catena dorsale del polinucleotide. In alcune forme di realizzazione, un catione multivalente forma una coppia ionica con un gruppo anionico della catena dorsale del polinucleotide. In alcune forme di realizzazione, il controione cationico multivalente è bivalente. I controioni cationici bivalenti di interesse includono, ma non sono limitati a, magnesio, zinco e calcio. In alcune forme di realizzazione, il controione cationico multivalente è trivalente. I controioni cationici trivalenti di interesse includono, ma non sono limitati a, alluminio. In certe forme di realizzazione della composizione, l'almeno un controione cationico multivalente è selezionato dal gruppo costituito da magnesio, zinco, alluminio e calcio. In certe forme di realizzazione della composizione, l'almeno un controione cationico multivalente è magnesio. In certe forme di realizzazione della composizione, l'almeno un controione cationico multivalente è zinco. In certe forme di realizzazione della composizione, l'almeno un controione cationico multivalente è alluminio. In certe forme di realizzazione della composizione, l'almeno un controione cationico multivalente è calcio.

**[0101]** Resta inteso che il numero di controioni cationici che sono presenti in un sale del polinucleotide dipende da una varietà di fattori, come la lunghezza della catena dorsale polianionica, la valenza dei cationi nei sali, il pH della soluzione, l'aggregazione di polinucleotidi nella composizione e così via. Le composizioni in oggetto possono includere almeno un controione cationico multivalente sulla catena dorsale polianionica del polinucleotide nelle composizioni polinucleotidiche in oggetto, come 2 o più, 3 o più, 4 o più, 5 o più, 6 o più, 7 o più, 8 o più, 9 o più, 10 o più, 15 o più, 20 o più, 30 o più, 40 o più, 50 o più, 100 o più o anche più controioni cationici multivalenti. In certe forme di realizzazione, un polinucleotide avente  $n$  subunità nucleosidiche può includere tra 1 e  $(n - 1)/2$  (se  $n$  è un numero intero dispari) controioni cationici bivalenti o tra 1 e  $(n - 2)/2$  (se  $n$  è un numero intero pari) controioni cationici bivalenti. In alcune istanze, un sale del polinucleotide che include almeno un catione multivalente può includere inoltre una varietà di altri controioni cationici, che possono essere monovalenti, bivalenti o trivalenti. In certe istanze,  $n$  è nell'intervallo da 7 a 50, come da 7 a 40, da 10 a 40, da 10 a 30, da 10 a 25, da 10 a 20 o nell'intervallo da 12 a 15 subunità nucleosidiche.

**[0102]** In alcune forme di realizzazione della composizione, il sale del polinucleotide può includere il 3% in moli o più del controione cationico multivalente rispetto a una catena dorsale polianionica del polinucleotide (vale a dire rispetto a un'inclusione massima teorica di controioni cationici lungo la catena dorsale polianionica), come il 4% in

moli o più, 5% in moli o più, 6% in moli o più, 7% in moli o più, 8% in moli o più, 9% in moli o più, 10% in moli o più, 11% in moli o più, 12% in moli o più, 13% in moli o più, 14% in moli o più, 15% in moli o più, 16% in moli o più, 17% in moli o più, 18% in moli o più, 19% in moli o più, 20% in moli o più, 25% in moli o più, 30% in moli o più, 35% in moli o più, 40% in moli o più, 45% in moli o più, 50% in moli o più, 55% in moli o più, 60% in moli o più o anche più del controione cationico multivalente rispetto a una catena dorsale polianionica del polinucleotide. In alcune forme di realizzazione delle composizioni in oggetto, il polinucleotide può includere il 10% in moli o più del controione cationico multivalente rispetto a una catena dorsale polianionica del polinucleotide. Per esempio, un sale del polinucleotide che include una catena dorsale polianionica di 10 legami di subunità internucleosidiche e include un controione cationico bivalente che forma una coppia ionica con due dei legami è descritto come comprendente il 20% in moli del controione cationico bivalente. Se l'un controione cationico bivalente forma una coppia ionica con solo uno dei legami anziché due, il sale del polinucleotide è descritto come comprendente il 10% in moli del controione cationico bivalente. Quindi, il valore % in moli si riferisce a un livello di occupazione della catena dorsale polianionica del polinucleotide da parte dei controioni cationici multivalenti che sono presenti nel sale del polinucleotide. Per esempio, un catione  $Mg^{2+}$  in un sale del polinucleotide da 13 mer avente 12 legami di subunità internucleosidiche dà il 16,7% in moli di occupazione della catena dorsale. Resta inteso che in alcune forme di realizzazione, il sale

del polinucleotide può includere siti di accoppiamento ionico aggiuntivi in corrispondenza dei terminali del polinucleotide (per esempio un gruppo 5'-tiosfato) e, se presenti, tali siti devono essere inclusi nel valore % in moli del composto.

**[0103]** In alcune forme di realizzazione della composizione, il sale del polinucleotide include il 90% in moli o meno del controione cationico multivalente rispetto a una catena dorsale polianionica del polinucleotide, come il 70% in moli o meno, il 65% in moli o meno, il 60% in moli o meno, il 50% in moli o meno o anche meno del controione cationico multivalente.

**[0104]** In certe forme di realizzazione della composizione, il sale del polinucleotide include dal 3 al 90% in moli del controione cationico multivalente rispetto a una catena dorsale polianionica del polinucleotide, come dal 3 al 65% in moli (per esempio dal 6 al 50% in moli, dal 10 al 50% in moli o dal 10 al 40% in moli), dal 3 al 50% in moli, dal 3 al 40% in moli, dal 3 al 30% in moli, dal 3 al 20% in moli o dal 3 al 15% in moli del controione cationico multivalente rispetto a una catena dorsale polianionica del polinucleotide.

**[0105]** In certe istanze della composizione, il sale del polinucleotide include dal 3 al 60% in moli di un controione cationico bivalente rispetto a una catena dorsale polianionica del polinucleotide, come dal 3 al 50% in moli (per esempio dal 5 al 50% in moli), dal 3 al 40% in moli, dal 3 al 30% in moli, dal 3 al 20% in moli, dal 3 al 15% in moli, come dal 3 al 12% in moli di un controione cationico bivalente.

**[0106]** In certe istanze della composizione, il sale del polinucleotide include dal 3 al 60% in moli di un controione cationico di magnesio rispetto a una catena dorsale polianionica del polinucleotide, come magnesio, dal 5 al 50% in moli, dal 5 al 40% in moli, dal 10 al 40% in moli o dal 20 al 40% in moli di un controione cationico di magnesio.

**[0107]** In certe istanze della composizione, il sale del polinucleotide include dal 10 al 70% in moli di un controione cationico trivalente rispetto a una catena dorsale polianionica del polinucleotide, come dal 10 al 60% in moli, dal 20 al 60% in moli, dal 20 al 50% in moli o dal 30 al 50% in moli di un controione cationico trivalente. In alcune forme di realizzazione della composizione, il sale del polinucleotide include lo 0,5% o più in peso del controione cationico multivalente (per esempio magnesio), come lo 0,6% o più, 0,7% o più, 0,8% o più, 0,9% o più, 1,1% o più, 1,2% o più, 1,3% o più, 1,4% o più, 1,5% o più, 1,6% o più, 1,7% o più, 1,8% o più, 1,9% o più, 2,0% o più, 2,1% o più, 2,2% o più, 2,3% o più, 2,4% o più, 2,5% o più, 2,6% o più, 2,7% o più, 2,8% o più, 2,9% o più, 3,0% o più in peso del controione cationico multivalente.

**[0108]** Il sale del polinucleotide è un sale misto che include una miscela di controioni cationici multivalenti e monovalenti. In certe forme di realizzazione della composizione, il sale del polinucleotide include un rapporto tra controione cationico multivalente e controione cationico monovalente di almeno 0,05 o più in molarità, come 0,10 o più, 0,15 o più, 0,20 o più, 0,25 o più, 0,30 o più, 0,35 o più, 0,40 o più, 0,45 o più,

0,50 o più, 0,55 o più, 0,60 o più, 0,65 o più, 0,70 o più in molarità o anche più tra catione cationico multivalente e controione cationico monovalente.

**[0109]** In alcune istanze, il sale del polinucleotide include un rapporto tra controione cationico multivalente e monovalente di 1:12 in molarità. In alcune istanze, il sale del polinucleotide include un rapporto tra controione cationico multivalente e monovalente di 1:11 in molarità. In alcune istanze, il sale del polinucleotide include un rapporto tra controione cationico multivalente e monovalente di 1:10 in molarità. In alcune istanze, il sale del polinucleotide include un rapporto tra controione cationico multivalente e monovalente di 1:9 in molarità. In alcune istanze, il sale del polinucleotide include un rapporto tra controione cationico multivalente e monovalente di 1:8 in molarità. In alcune istanze, il sale del polinucleotide include un rapporto tra controione cationico multivalente e monovalente di 1:7 in molarità. In alcune istanze, il sale del polinucleotide include un rapporto tra controione cationico multivalente e monovalente di 1:6 in molarità. In alcune istanze, il sale del polinucleotide include un rapporto tra controione cationico multivalente e monovalente di 1:5 in molarità. In alcune istanze, il sale del polinucleotide include un rapporto tra controione cationico multivalente e monovalente di 1:4 in molarità. In alcune istanze, il sale del polinucleotide include un rapporto tra controione cationico multivalente e monovalente di 2:9 in molarità. In alcune istanze, il sale del polinucleotide include un rapporto tra controione cationico multivalente e monovalente di 3:7 in molarità. In

alcune istanze, il sale del polinucleotide include un rapporto tra controione cationico multivalente e monovalente di 4:5 in molarità. In alcune istanze, il sale del polinucleotide include un rapporto tra controione cationico multivalente e monovalente di 5:3 in molarità.

**[0110]** In certe istanze del sale del polinucleotide misto, il controione cationico multivalente è magnesio e il controione cationico monovalente è sodio. In certe istanze del sale del polinucleotide misto, il controione cationico multivalente è magnesio e il controione cationico monovalente è ammonio. In certe istanze del sale del polinucleotide misto, il controione cationico multivalente è magnesio e il controione cationico monovalente è trietilammonio. In certe istanze del sale del polinucleotide misto, il controione cationico multivalente è alluminio. In certe istanze del sale del polinucleotide misto, il controione cationico multivalente è zinco. In certi casi del sale del polinucleotide misto, il controione cationico multivalente è calcio. In certi casi del sale del polinucleotide misto, il controione cationico monovalente è sodio. In certi casi del sale del polinucleotide misto, il controione cationico monovalente è ammonio. In certe istanze del sale del polinucleotide misto, il controione cationico monovalente è trietilammonio. In certe forme di realizzazione, il sale del polinucleotide include un controione cationico multivalente. In certe forme di realizzazione, il sale del polinucleotide include 2 controioni cationici multivalenti. In certe forme di realizzazione, il sale del polinucleotide include 3 controioni cationici multivalenti. In certe forme di realizzazione, il sale del polinucleotide include 4 controioni cationici

multivalenti. In certe forme di realizzazione, il sale del polinucleotide include 5 controioni cationici multivalenti. In certe forme di realizzazione, il sale del polinucleotide include 6 controioni cationici multivalenti. In certe forme di realizzazione, il sale del polinucleotide include 7 controioni cationici multivalenti. In certe forme di realizzazione, il sale del polinucleotide include 8 controioni cationici multivalenti. In certe forme di realizzazione, il sale del polinucleotide include 9 controioni cationici multivalenti. In certe forme di realizzazione, il sale del polinucleotide include 10 controioni cationici multivalenti.

**[0111]** Oltre a un polinucleotide target, durante la sintesi del polinucleotide può essere prodotta una varietà di prodotti di sintesi polinucleotidici non target. Prodotti minori che possono essere presenti nelle preparazioni polinucleotidiche includono, ma non sono limitati a, prodotti di delezione (per esempio prodotti privi di uno o più residui nucleosidici), prodotti che includono uno o più gruppi di protezione, prodotti terminati (per esempio prodotti che includono una catena polinucleotidica incappucciata), prodotti che sono privi di una o più nucleobasi, prodotti che includono legami fosforamiditi parzialmente ossidati e prodotti che includono legami parzialmente solforizzati.

**[0112]** I metodi in oggetto rendono disponibili composizioni che includono una purezza migliorata del polinucleotide target nella composizione. In alcune forme di realizzazione, la composizione include il 20% o più in peso del polinucleotide target, come il 25% o più, 30% o più, 35% o più, 40% o più, 45% o più, 50 o più, 60% o più, 70% o più,

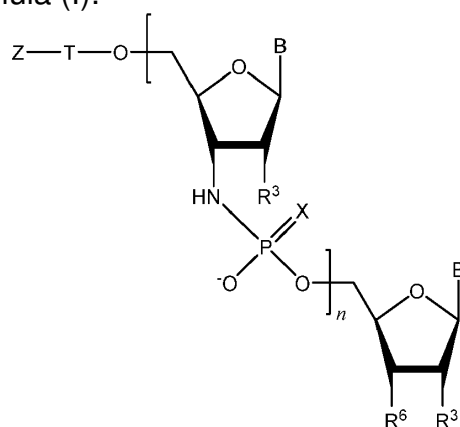
80% o più, 90% o più o anche 95% o più in peso del polinucleotide target. In certe forme di realizzazione, la composizione include il 50% o più in peso del polinucleotide target. In certe forme di realizzazione, la composizione include il 55% o più in peso del polinucleotide target. In certe forme di realizzazione, la composizione include il 60% o più in peso del polinucleotide target. In certe forme di realizzazione, la composizione include il 65% o più in peso del polinucleotide target. In certe forme di realizzazione, la composizione include il 70% o più in peso del polinucleotide target. In certe forme di realizzazione, la composizione include il 75% o più in peso del polinucleotide target. In certe forme di realizzazione, la composizione include l'80% o più in peso del polinucleotide target. In certe forme di realizzazione, la composizione include l'85% o più in peso del polinucleotide target. In certe forme di realizzazione, la composizione include il 90% o più in peso del polinucleotide target. In certe forme di realizzazione, la composizione include il 95% o più in peso del polinucleotide target.

**[0113]** I metodi in oggetto rendono disponibili composizioni che includono una quantità ridotta di prodotti e agenti di sintesi non target. Con quantità ridotta si intende che la quantità in peso dei prodotti e agenti di sintesi non target nella composizione è ridotta rispetto a un metodo di controllo. In alcune forme di realizzazione, le composizioni in oggetto includono prodotti e agenti di sintesi non target in una quantità del 50% o meno dei polinucleotidi non target totali nella composizione, come il 40%

o meno, 30% o meno, 25% o meno, 20% o meno, 15% o meno, 10% o meno o anche 5% o meno dei prodotti e agenti di sintesi non target.

**[0114]** Usando i metodi descritti nel presente documento può essere preparata qualsiasi di un'ampia varietà di composizioni polinucleotidiche. È di interesse una varietà di classi e tipi di polinucleotidi per la preparazione usando i metodi in oggetto (per esempio come descritti nel presente documento). I polinucleotidi idonei per la preparazione secondo i metodi in oggetto includono, ma non sono limitati a, polinucleotidi antisenso, polinucleotidi di RNA, polinucleotidi di siRNA, polinucleotidi di RNAi, aptameri di DNA, microRNA e similari.

**[0115]** In alcune forme di realizzazione, il polinucleotide è descritto dalla Formula (I):



Formula (I)

in cui:

ciascun B è indipendentemente una purina, una purina protetta, una pirimidina o una pirimidina protetta o un analogo delle stesse;

ciascun X è indipendentemente ossigeno o zolfo;

ciascun  $R^3$  è indipendentemente idrogeno, fluoro, idrossile, un alcossi, un alcossi sostituito o un idrossile protetto;

$R^6$  è ammino, idrossile, un ammino protetto, un idrossi protetto, -O-T-Z o -NH-T-Z;

ciascun T è indipendentemente un linker opzionale;

ciascun Z è indipendentemente H, un lipide, un trasportatore, un oligonucleotide, un polimero, un polipeptide, un marcatore rilevabile o un tag; e

n è un numero intero da 1 a 1000; Resta inteso che gli oligonucleotidi della Formula (I) possono esistere in forma di sale. Quindi, i legami internucleosidici della Formula (I) possono essere in una forma di sale che include qualsiasi controione conveniente. Tali forme sono intese essere incluse nella portata della presente divulgazione. Resta inteso che possono essere possibili altre disposizioni tautomeriche dei legami internucleosidici del polinucleotide descritto nella Formula (I). Tali forme sono intese essere incluse nella portata della presente divulgazione.

**[0116]** In alcune forme di realizzazione della Formula (I), ciascun  $R^3$  è idrogeno. In alcune forme di realizzazione della Formula (I), ciascun  $R^3$  è fluoro. In alcune forme di realizzazione della Formula (I), ciascun  $R^3$  è idrossile. In alcune forme di realizzazione della Formula (I),  $R^6$  è ammino. In certe forme di realizzazione della Formula (I),  $R^6$  è idrossile. In alcune forme di realizzazione della Formula (I), Z è H. In alcune forme di realizzazione della Formula (I), Z è un lipide (per esempio come

descritto nel presente documento). In certi casi, il lipide è un acido grasso (per esempio come descritto nel presente documento). In alcune forme di realizzazione della Formula (I), Z è un trasportatore. In alcune forme di realizzazione della Formula (I), Z è un oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione della Formula (I), Z è un polimero. In certi casi, il polimero è un PEG. In alcune forme di realizzazione della Formula (I), Z è un polipeptide. In alcune forme di realizzazione della Formula (I), Z è un marcatore rilevabile. In alcune forme di realizzazione della Formula (I), Z è un tag. In alcune forme di realizzazione della Formula (I), T è assente. In alcune forme di realizzazione, ciascun B è selezionato indipendentemente tra A, C, G, T e U.

**[0117]** In certe forme di realizzazione della Formula (I), n è un numero intero tra 7 e 500, come tra 7 e 100, tra 7 e 75, tra 7 e 50, tra 7 e 40, tra 7 e 30, tra 7 e 20, tra 7 e 15, tra 10 e 15 o tra 13 e 15. In certe forme di realizzazione, n è un numero intero tra 7 e 100, come tra 7 e 50, tra 10 e 50, tra 10 e 40, tra 10 e 30, tra 10 e 25, tra 10 e 20, tra 12 e 18 o tra 12 e 16. In certe forme di realizzazione, n è 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25.

### **Polinucleotidi complementari alla componente a RNA della telomerasi**

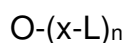
**[0118]** Aspetti della divulgazione includono composti e composizioni che includono polinucleotidi complementari alla componente a RNA della telomerasi umana e metodi per preparare gli

stessi. I composti possono inibire l'attività della telomerasi in cellule con un'elevata potenza e hanno caratteristiche di captazione cellulare.

**[0119]** In certe istanze, il polinucleotide include una sequenza di 7 o più subunità nucleosidiche complementari alla componente a RNA della telomerasi umana, come di 8 o più, 9 o più, 10 o più, 11 o più, 12 o più, 13 o più, 14 o più, 15 o più, 20 o più, 30 o più, 50 o più subunità nucleosidiche complementari alla componente a RNA della telomerasi umana.

**[0120]** In alcune forme di realizzazione, il polinucleotide include tra 3 e 50 subunità nucleosidiche contigue complementari alla componente a RNA della telomerasi umana, come tra 5 e 40, tra 7 e 40, tra 10 e 40, tra 10 e 30, tra 10 e 25, tra 10 e 20 o tra 12 e 15 subunità nucleosidiche. In certe forme di realizzazione, il polinucleotide include una sequenza di 7 o più subunità nucleosidiche contigue complementari alla componente a RNA della telomerasi umana, come di 10 o più, 11 o più, 12 o più, 13 o più, 14 o più, 15 o più, 20 o più, 30 o più, 50 o più subunità nucleosidiche contigue complementari alla componente a RNA della telomerasi umana.

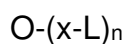
**[0121]** In alcune forme di realizzazione, il polinucleotide è un composto descritto dalla formula:



dove O rappresenta il polinucleotide che include una sequenza di subunità nucleosidiche complementari alla componente a RNA della telomerasi umana, x è un gruppo linker opzionale, L rappresenta una

porzione funzionale lipidica e n è un numero intero da 1 a 5. In alcune istanze, n è 5. In alcune istanze, n è 4. In alcune istanze, n è 3. In alcune istanze, n è 2. In alcune istanze, n è 1. La progettazione dei composti pertanto richiede la selezione di due entità, O e L, e la determinazione del legame/dei legami strutturali tra queste entità, che può coinvolgere il gruppo linker opzionale x.

**[0122]** In alcune forme di realizzazione, il composto polinucleotidico può essere descritto dalla formula:



dove O rappresenta il polinucleotide che include una sequenza di subunità nucleosidiche complementari alla componente a RNA della telomerasi umana, x è un gruppo linker opzionale, L rappresenta la porzione funzionale lipidica e n è 1, come un polinucleotide della Formula (I) o un sale dello stesso, in cui nella Formula (I) Z è la porzione funzionale lipidica, T è il linker opzionale (per esempio come descritto nel presente documento) e i gruppi B corrispondono alla sequenza di subunità nucleosidiche complementari alla componente a RNA della telomerasi umana.

**[0123]** La componente polinucleotidica O può essere considerata come la componente "effettrice" del composto in quanto è questa componente che influenza l'inibizione dell'enzima telomerasi legandosi alla componente a RNA della telomerasi. Quindi, la sequenza di O viene selezionata in modo che includa una regione che è complementare alla sequenza dell'RNA della telomerasi, che è mostrata

nella SEQ ID NO: 1. La regione che è complementare alla componente a RNA della telomerasi in teoria può essere indirizzata a qualsiasi porzione dell'RNA della telomerasi, ma regioni particolari dell'RNA della telomerasi sono target preferiti per i polinucleotidi inibitori. Una regione target preferita è la regione che si estende sui nucleotidi da 30 a 67 della SEQ ID NO: 1, che include la regione "stampo", una regione di 11 nucleotidi con la sequenza 5'-CUAACCCUAAC-3' (SEQ ID NO: 21) che si estende sui nucleotidi da 46 a 56 della SEQ ID NO: 1. La regione stampo funziona in modo da specificare la sequenza delle ripetizioni telomeriche che la telomerasi aggiunge alle estremità del cromosoma ed è essenziale per l'attività dell'enzima telomerasi (si vedano Chen et al., Cell 100:503-514, 2000; Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(14):7982-7987, 2001). Sono quindi di interesse i composti di interesse che contengono una porzione funzionale polinucleotidica che include una sequenza complementare a tutta la regione stampo o parte di essa. Un'altra regione target di interesse è la regione che si estende sui nucleotidi da 137 a 179 dell'hTR (si veda Pruzan et al., Nucl. Acids Research, 30:559-588, 2002). All'interno di questa regione, la sequenza che si estende da 141 a 153 è un target preferito. La pubblicazione PCT WO 98/28442 descrive l'uso di polinucleotidi con lunghezza di almeno 7 nucleotidi per inibire la telomerasi, dove i polinucleotidi sono progettati per essere complementari a porzioni accessibili della sequenza dell'hTR al di fuori della regione stampo, inclusi i nucleotidi da 137 a 196, da 290 a 319 e da 350 a 380 dell'hTR.

**[0124]** La regione di O che è indirizzata alla sequenza dell'hTR in alcuni casi è esattamente complementare alla sequenza dell'hTR corrispondente. Sebbene in certe istanze possano essere tollerati appaiamenti errati, si prevede che essi diminuiscano la specificità e l'attività del coniugato polinucleotidico risultante. In alcune forme di realizzazione, la sequenza di basi del polinucleotide O viene quindi selezionata in modo da includere una sequenza di almeno 5 nucleotidi esattamente complementari all'RNA della telomerasi e può essere ottenuta un'inibizione della telomerasi potenziata se vengono impiegate lunghezze crescenti della sequenza complementare, come di almeno 6, almeno 7, almeno 8, almeno 10, almeno 12, almeno 13 o almeno 15 nucleotidi esattamente complementari all'RNA della telomerasi. In altre forme di realizzazione, la sequenza del polinucleotide include una sequenza di da almeno 7 a 20, da almeno 8 a 20, da almeno 10 a 20 o da almeno 10 a 15 nucleotidi esattamente complementari alla sequenza dell'RNA della telomerasi. Può essere ottenuta un'attività inibitoria della telomerasi ottimale quando l'intera lunghezza del polinucleotide O viene selezionata in modo da essere complementare all'RNA della telomerasi. Tuttavia, non è necessario che l'intera lunghezza della componente polinucleotidica sia esattamente complementare alla sequenza target e la sequenza polinucleotidica può includere regioni che non sono complementari alla sequenza target. Tali regioni possono essere aggiunte, per esempio, per conferire altre proprietà al composto, come sequenze che facilitano la purificazione. Se la componente

polinucleotidica O deve includere regioni che non sono complementari alla sequenza target, tali regioni possono essere posizionate in corrispondenza di una o entrambe le estremità terminali 5' o 3'. Nelle istanze dove la regione con complementarità esatta è indirizzata alla regione stampo, si può ottenere un'inibizione efficace della telomerasi con una regione breve (da 5 a 8 nucleotidi) con complementarità esatta a cui è unita una sequenza simile alla telomerasi (ricca di G) in corrispondenza dell'estremità 5'.

**[0125]** Sequenze esemplificative che sono complementari all'RNA della telomerasi umana e che possono essere incluse come parte della componente polinucleotidica O o che possono essere usate come intera componente polinucleotidica O includono le seguenti:

Sequenze complementari all'hTR (regioni della sequenza polinucleotidica SEQ ID NO: 1 della Pubblicazione US 2012329858);  
 GGGUUGC GGA GGGUGGGCCU GGGAGGGGUG GUGGCCAUUU  
 UUUGUCUAAC 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 CAGGCCUUUC AGGCCGCAGG AAGAGGAACG  
 GAGCGAGUCC CCGCGCGCGG CGCGAUUCCC UGAGCUGUGG  
 GACGUGCACC CAGGACUCGG CUCACACAUG C (SEQ ID NO: 1)

*"SEQ ID NO" = SEQ ID NO*

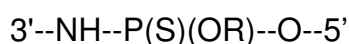
GCTCTAGAATGAACGGTGAAGGCGGCAGG 137-166 (SEQ ID NO: 2)

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)  
ACGGTGAAGGCG 142-154 (SEQ ID NO: 11)  
AACGGTGAAGGCGGC 143-155 (SEQ ID NO: 12)  
ATGAACGGTGAAGGCGG 144-158 (SEQ ID NO: 13)  
ACATTTTTTGTGGCTCTAG 160-179 (SEQ ID NO: 14)  
TAGGGTTAGACAA 42-54 (SEQ ID NO: 3)  
GTTAGGGTTAG 46-56 (SEQ ID NO: 4)  
GTTAGGGTTAGAC 44-56 (SEQ ID NO: 15)  
GTTAGGGTTAGACAA 42-56 (SEQ ID NO: 16)  
GGGTTAGAC 44-52 (SEQ ID NO: 19)  
CAGTTAGGG 50-58 (SEQ ID NO: 20)  
CCCTTCTCAGTT 54-65 (SEQ ID NO: 17)  
CGCCCTTCTCAG 56-67 (SEQ ID NO: 18)

**[0126]** In alcune forme di realizzazione, il polinucleotide include una sequenza selezionata dal gruppo costituito da: GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 4); TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3); e CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 5).

**[0127]** La scelta del tipo di legami internucleosidici usati nella sintesi della componente O può essere effettuata da qualsiasi delle chimiche dei polinucleotidi disponibili, inclusi, ma non limitati a, legami

fosfodiestere, fosfotriestere, metilfosfonato, P3'→N5' fosforammidato, N3'→P5' fosforammidato, N3'→P5' tiofosforammidato e fosforotioato. In alcune forme di realizzazione, la componente polinucleotidica O ha almeno un legame N3'→P5' tiofosforammidato. In certe forme di realizzazione, le subunità nucleosidiche complementari alla componente a RNA della telomerasi umana sono tutte unite da legami intersubunità N3'→P5' tiofosforammidato. In certi casi, il legame intersubunità N3'→P5' tiofosforammidato ha la seguente struttura:



dove R è idrogeno o un sale dello stesso. Resta inteso che per qualsiasi delle componenti polinucleotidiche O descritte nel presente documento che includono tale legame intersubunità, tali componenti polinucleotidiche O possono anche includere qualsiasi forma di sale conveniente del legame. Quindi, il legame intersubunità può essere in una forma di sale che include qualsiasi controione conveniente.

**[0128]** In alcune forme di realizzazione, almeno due delle subunità nucleosidiche sono unite da un legame intersubunità N3'→P5' tiofosforammidato e gli altri legami intersubunità sono selezionati ciascuno indipendentemente tra legami intersubunità N3'→P5' osso-fosforammidato e N3'→P5' tiofosforammidato. In alcune forme di realizzazione, le subunità nucleosidiche sono unite da legami intersubunità ciascuno selezionato indipendentemente tra legami intersubunità N3'→P5' osso-fosforammidato e N3'→P5' tiofosforammidato. In alcune forme di realizzazione, le subunità

nucleosidiche sono unite da legami intersubunità ciascuno selezionato indipendentemente tra legami intersubunità N3'→P5' osso-fosforammidato e N3'→P5' tiofosforammidato; a condizione che almeno due delle subunità nucleosidiche siano unite da un legame intersubunità N3'→P5' tiofosforammidato. In alcune forme di realizzazione, le subunità nucleosidiche sono tutte unite da legami intersubunità N3'→P5' tiofosforammidato.

**[0129]** In alcune forme di realizzazione, la componente polinucleotidica O ha la sequenza TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) e le subunità nucleosidiche sono unite da legami intersubunità comprendenti almeno un legame N3'→P5' tiofosforammidato. In alcune forme di realizzazione, la componente polinucleotidica O ha la sequenza TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) e le subunità nucleosidiche sono unite da legami intersubunità comprendenti almeno due legami N3'→P5' tiofosforammidato. In alcune forme di realizzazione, la componente polinucleotidica O ha la sequenza TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) e le subunità nucleosidiche sono unite da legami intersubunità comprendenti almeno tre legami N3'→P5' tiofosforammidato. In alcune forme di realizzazione, la componente polinucleotidica O ha la sequenza TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) e le subunità nucleosidiche sono unite da legami intersubunità comprendenti almeno quattro legami N3'→P5' tiofosforammidato. In alcune forme di realizzazione, la componente polinucleotidica O ha la sequenza TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) e le subunità nucleosidiche sono unite da legami

intersubunità comprendenti almeno cinque legami N3'→P5' tiofosforamidato. In alcune forme di realizzazione, la componente polinucleotidica O ha la sequenza TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) e le subunità nucleosidiche sono unite da legami intersubunità comprendenti almeno sei legami N3'→P5' tiofosforamidato. In alcune forme di realizzazione, la componente polinucleotidica O ha la sequenza TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) e le subunità nucleosidiche sono unite da legami intersubunità comprendenti almeno sette legami N3'→P5' tiofosforamidato. In alcune forme di realizzazione, la componente polinucleotidica O ha la sequenza TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) e le subunità nucleosidiche sono unite da legami intersubunità comprendenti almeno otto legami N3'→P5' tiofosforamidato. In alcune forme di realizzazione, la componente polinucleotidica O ha la sequenza TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) e le subunità nucleosidiche sono unite da legami intersubunità comprendenti almeno nove legami N3'→P5' tiofosforamidato. In alcune forme di realizzazione, la componente polinucleotidica O ha la sequenza TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) e le subunità nucleosidiche sono unite da legami intersubunità comprendenti almeno dieci legami N3'→P5' tiofosforamidato. In alcune forme di realizzazione, la componente polinucleotidica O ha la sequenza TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) e le subunità nucleosidiche sono unite da legami intersubunità comprendenti almeno undici legami N3'→P5' tiofosforamidato. In alcune forme di realizzazione, la componente polinucleotidica O ha la

sequenza TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) e le subunità nucleosidiche sono unite da legami intersubunità selezionati ciascuno indipendentemente tra legami intersubunità N3'→P5' osso-fosforammidato e N3'→P5' tiofosforammidato. In alcune forme di realizzazione, la componente polinucleotidica O ha la sequenza TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) e le subunità nucleosidiche sono unite da legami intersubunità selezionati ciascuno indipendentemente tra legami intersubunità N3'→P5' osso-fosforammidato e N3'→P5' tiofosforammidato; a condizione che almeno due delle subunità nucleosidiche siano unite da un legame intersubunità N3'→P5' tiofosforammidato. In alcune forme di realizzazione, la componente polinucleotidica O ha la sequenza TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) e le subunità nucleosidiche sono tutte unite da legami intersubunità N3'→P5' tiofosforammidato.

**[0130]** In tutte le forme di realizzazione precedenti e nel seguito, i legami intersubunità N3'→P5' tiofosforammidato in particolare sono -NH-P(=O)(SH)-O- o un tautomero dello stesso o un sale dello stesso; e i legami intersubunità N3'→P5' osso-fosforammidato in particolare sono -NH-P(=O)(OH)-O- o un tautomero dello stesso o un sale dello stesso. Più in particolare, in tutte le forme di realizzazione precedenti e nel seguito, i legami intersubunità N3'→P5' tiofosforammidato in particolare sono -NH-P(=O)(SH)-O- o un tautomero dello stesso o un sale di sodio dello stesso; e i legami intersubunità N3'→P5' osso-fosforammidato in

particolare sono  $\text{-NH-P(=O)(OH)-O-}$  o un tautomero dello stesso o un sale di sodio dello stesso.

**[0131]** In una delle forme di realizzazione, l'invenzione si riferisce a una qualsiasi delle strutture specifiche descritte nel presente documento in cui opzionalmente uno o più, in particolare uno, dei legami intersubunità  $\text{N3'→P5'}$  tiofosforamidato sono sostituiti da legami intersubunità  $\text{N3'→P5'}$  osso-fosforamidato. In una delle forme di realizzazione, l'invenzione si riferisce a una qualsiasi delle strutture specifiche descritte nel presente documento in cui uno o più, in particolare uno, dei legami intersubunità  $\text{N3'→P5'}$  tiofosforamidato sono sostituiti da legami intersubunità  $\text{N3'→P5'}$  osso-fosforamidato.

**[0132]** In alcuni casi, i composti in oggetto sono più efficaci nel produrre inibizione della telomerasi in cellule rispetto ai polinucleotidi corrispondenti che non sono coniugati a componenti lipidiche. Si ritiene che la componente lipidica L funzioni in modo da potenziare la captazione cellulare del composto, in particolare facilitando il passaggio attraverso la membrana cellulare. Sebbene il meccanismo con cui ciò avviene non sia stato completamente elucidato, una possibilità è che la componente lipidica possa facilitare il legame del composto alla membrana cellulare come singola molecola o come forma aggregata (micellare), con successiva internalizzazione. Tuttavia, la comprensione del meccanismo preciso non è necessaria per i composti in oggetto da utilizzare.

**[0133]** La componente lipidica può essere qualsiasi lipide o derivato lipidico che rende disponibile una captazione cellulare potenziata rispetto al polinucleotide non modificato. I lipidi di interesse includono, ma non sono limitati a, idrocarburi, grassi (per esempio gliceridi, acidi grassi e derivati di acidi grassi, come ammidi grasse) e steroli. Laddove la componente lipidica è un idrocarburo, la componente L può essere un idrocarburo ciclico sostituito o non sostituito o un idrocarburo alifatico a catena lineare o ramificato, che può essere saturo o insaturo. Esempi includono idrocarburi non ramificati a catena lineare che sono completamente saturi o polinsaturi. La lunghezza della catena idrocarburica può variare da C2 a C30, ma si può ottenere un'inibizione ottimale della telomerasi con catene di carbonio che sono da C8 a C22. Nel seguito sono elencati esempi di idrocarburi saturi (alcani) di interesse:

**Nome sistematico/catena di carbonio**

**[0134]**

Tetradecano C<sub>14</sub>H<sub>30</sub>

Pentadecano C<sub>15</sub>H<sub>32</sub>

Esadecano C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>

Eptadecano C<sub>17</sub>H<sub>36</sub>

Ottadecano C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>

Nonadecano C<sub>19</sub>H<sub>40</sub>

Eicosano C<sub>20</sub>H<sub>42</sub>

**[0135]** Possono essere selezionate anche forme mono- e polinsature (alcheni e polieni, come alcadieni e alcatrieni) di idrocarburi,

i composti aventi da uno a tre doppi legami essendo di interesse, sebbene possa essere impiegato un composto avente più doppi legami. Possono essere utilizzati anche alchini (contenenti uno o più tripli legami) e alchenini (tripli legami e doppi legami).

**[0136]** Nei composti in oggetto possono essere impiegate forme sostituite di idrocarburi, i gruppi sostituenti che sono inerti in vivo e in vitro essendo di interesse. In alcuni casi, il sostituente è fluoro. Strutture generiche esemplificative di idrocarburi polifluorurati includono:  $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n(\text{CH}_2)_m$ - dove m è almeno 1, in alcuni casi almeno 2, e n è da 1 a 30, come fluorotridecano:  $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_9(\text{CH}_2)_3$ ; e  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a(\text{CF}_2)_b(\text{CH}_2)_c$ - dove a, b e c sono indipendentemente da 1 a 30.

**[0137]** Altre componenti lipidiche idonee di interesse includono, ma non sono limitate a, acidi grassi semplici e derivati di acidi grassi, gliceridi e lipidi più complessi come steroli, per esempio colesterolo. Gli acidi grassi e i loro derivati di interesse possono essere completamente saturi o mono- o polinsaturi. La lunghezza della catena di carbonio può variare da C2 a C30, ma si può ottenere un'inibizione ottimale della telomerasi con catene di carbonio che sono da C8 a C22. Esempi di acidi grassi saturi di interesse sono elencati nel seguito:

**Nome sistematico/nome comune/catena di carbonio**

**[0138]**

Tetradecanoico miristico 14:0

Esadecanoico palmitico 16:0

Ottadecanoico stearico 18:0

Eicosanoico arachidico 20:0

**[0139]** Possono essere impiegate anche forme mono- e polinsature di acidi grassi, i composti aventi da uno a tre doppi legami essendo di interesse, sebbene possano essere impiegati anche composti aventi più doppi legami. Esempi di acidi grassi mono- e polinsaturi comuni di interesse che possono essere impiegati includono:

**Nome sistematico/nome comune/catena di carbonio**

**[0140]**

Cis-9-esadecanoico palmitoleico 16:1 (n-7)

Cis-6-ottadecanoico petroselinico 18:1 (n-12)

Cis -9-ottadecanoico oleico 18:1 (n-9)

9,12-ottadecadienoico linoleico 18:2 (n-6)

6,9,12-ottadecatrienoico gamma-linoleico 18:3 (n-6)

9,12,15-ottadecatrienoico alfa-linoleico 18:3 (n-3)

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

**[0141]** Nei composti in oggetto possono essere impiegati anche acidi grassi con uno o più tripli legami nella catena di carbonio, nonché acidi grassi ramificati. Nei composti in oggetto possono essere impiegate forme sostituite di acidi grassi. Come nel caso dei gruppi idrocarburici, sono di interesse i gruppi sostituenti che sono inerti in vivo e in vitro, come il fluoro. Strutture generiche esemplificative di derivati polifluorurati di acidi grassi idonei per l'uso nell'invenzione sono:  $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n\text{-(CH}_2)_m\text{CO-}$  dove m è almeno 1, preferibilmente almeno 2, e n è da 1 a

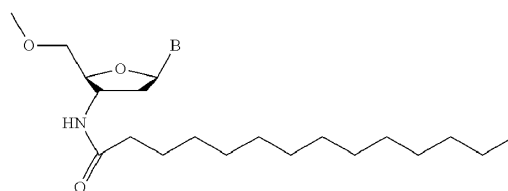
30, e  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a(\text{CF}_2)_b(\text{CH}_2)_c\text{CO-}$  dove a, b e c sono indipendentemente da 1 a 30.

**[0142]** In alcuni casi, alla componente O sono legate covalentemente tra uno e cinque componenti L (n è 1, 2, 3, 4 o 5), tramite un linker opzionale. In alcuni casi, vengono utilizzate una o due componenti L (n=1 o 2). Laddove più di una componente L è collegata alla componente O, ciascuna componente L è selezionata indipendentemente.

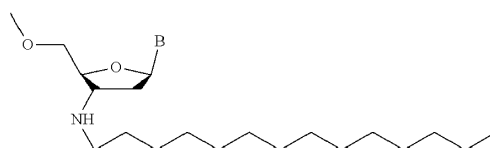
**[0143]** Si comprenderà che i composti dell'invenzione descritti come aventi un idrocarburo specificato come porzione funzionale L e i composti descritti come aventi un acido grasso specificato (con lo stesso numero di atomi di carbonio dell'idrocarburo specificato) sono strettamente correlati e la loro struttura differisce solo per la natura del legame che unisce la porzione funzionale L al polinucleotide, che a sua volta è un risultato della procedura di sintesi usata per produrre il composto. Per esempio, e come descritto in maggiore dettaglio nel seguito, quando vengono sintetizzati composti aventi la porzione funzionale L coniugata all'estremità terminale 3'-ammino di un polinucleotide (avente legami internucleosidici fosforamidato o tiofosforamidato), l'uso della forma aldeidica di un acido grasso (un'aldeide grassa) come materiale di partenza determina la formazione di un legame amminico tra la catena lipidica e il polinucleotide, cosicché il gruppo lipidico è presente come idrocarburo. Al contrario, l'uso delle forme di acido carbossilico, anidride acida o cloruro acido dello stesso

acido grasso determina la formazione di un legame ammidico, cosicché il gruppo lipidico è presente come derivato di un acido grasso, specificatamente in questa istanza un'ammide grassa (come indicato nella sezione delle definizioni di cui sopra, per motivi di semplicità il termine "acido grasso" quando si descrive il gruppo L coniugato è usato in senso ampio nel presente documento per includere derivati di acidi grassi, incluse ammidi grasse). Ciò è illustrato nei seguenti schemi che illustrano l'estremità terminale 3'-ammino di un polinucleotide fosforamidato unito a una componente lipidica C14. Nello schema A, L è acido tetradecanoico (acido miristico), in cui il collegamento tra i gruppi L e O è un'ammide. Nello schema B, L è tetradecano e il collegamento tra i gruppi L e O è un'ammina.

Schematic A



Schematic B



"Schematic\*\*\*" = Schema\*\*\*

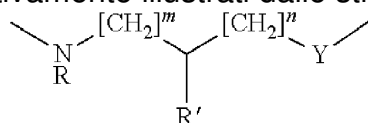
**[0144]** Il legame tra le componenti O e L può essere un legame diretto o può avvenire attraverso una porzione funzionale linker opzionale, per esempio x o il linker opzionale T della Formula (I). Il gruppo linker può servire per facilitare la sintesi chimica dei composti. Sia che venga usato un gruppo linker o meno per mediare la coniugazione delle

componenti O e L, vi sono siti multipli sulla componente polinucleotidica O a cui l'una o più componenti L possono essere convenientemente coniugate. I punti di legame idonei includono le estremità terminali 5' e 3', uno o più anelli zuccherini, la catena dorsale internucleosidica e le nucleobasi del polinucleotide. In alcuni casi, la porzione funzionale L è attaccata all'estremità terminale 3' o 5' del polinucleotide.

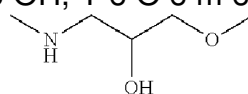
**[0145]** Se la componente L deve essere attaccata all'estremità terminale 3', l'attacco può essere direttamente al sostituente in 3', che nel caso dei polinucleotidi fosforammidato e tiofosforammidato preferiti è il gruppo 3'-ammino, e in altre istanze, come nel caso dei polinucleotidi fosfodiesteri convenzionali, è un gruppo 3-idrossi. In alternativa, la porzione funzionale L può essere legata tramite un gruppo fosfato legato in corrispondenza di 3', in cui un idrocarburo esadecano è legato al fosfato in 3' di un polinucleotide tiofosforammidato attraverso un linker O-alchilico. Se la porzione funzionale L deve essere collegata all'estremità terminale 5', essa può essere attaccata tramite un gruppo fosfato collegato in 5'. L'attacco a una base sulla porzione funzionale O può avvenire attraverso qualsiasi atomo idoneo, per esempio il gruppo N2 ammino della guanosina. Quando  $n > 1$ , cosicché alla componente O deve essere attaccata una pluralità di porzioni funzionali lipidiche, le componenti L selezionate singolarmente possono essere attaccate in corrispondenza di qualsiasi sito conveniente. Per esempio, a ciascuna estremità terminale può essere attaccato un gruppo L, alle basi possono

essere attaccati vari gruppi L o in corrispondenza di un'estremità terminale possono essere attaccati due o più gruppi L.

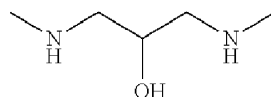
**[0146]** La componente linker opzionale x può essere usata per unire le componenti O e L dei composti. Resta inteso che il linker opzionale (per esempio x o T della Formula (I)) può essere attaccato al polinucleotide (per esempio O) attraverso un gruppo terminale fosfato, per esempio un gruppo fosfato legato in 3' o legato in 5'. Se deve essere impiegato un linker, esso viene incorporato nelle procedure di sintesi come descritto nel presente documento. Esempi di gruppi linker idonei includono linker del tipo ammino-glicerolo e O-alchilglicerolo che possono essere rispettivamente illustrati dalle strutture generiche:



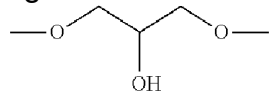
in cui R' è H, OH, NH<sub>2</sub> o SH; Y è O, S o NR; R è H, un alchile o un alchile sostituito e n e m sono ciascuno indipendentemente numeri interi tra 1 e 18. Esempi di linker di interesse idonei sono il linker di amminoglicerolo in cui R' è OH, Y è O e m e n sono ciascuno 1:



il linker di bis-amminoglicerolo, in cui R' è OH, Y è NH e m e n sono ciascuno 1:

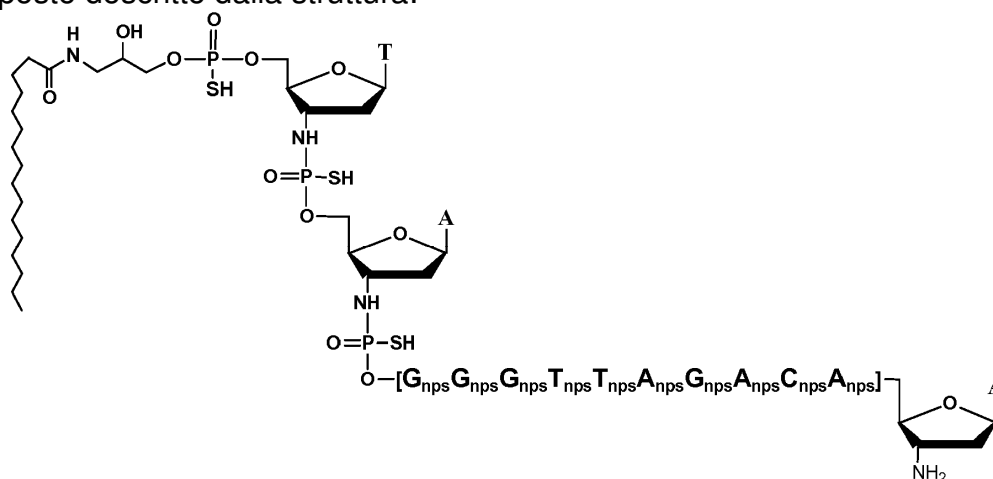


e il linker di O-alchilglicerolo in cui R è H:



**[0147]** I polinucleotidi modificati con lipidi esemplificativi che possono essere preparati secondo i metodi in oggetto includono i composti descritti nella Figura 1 (per esempio le Figure da 1A a 1DD) della domanda US US20120329858 attribuita a Gryaznov et al. "Modified oligonucleotides for telomerase inhibition", la cui divulgazione è incorporata nel presente documento a titolo di riferimento nella sua interezza.

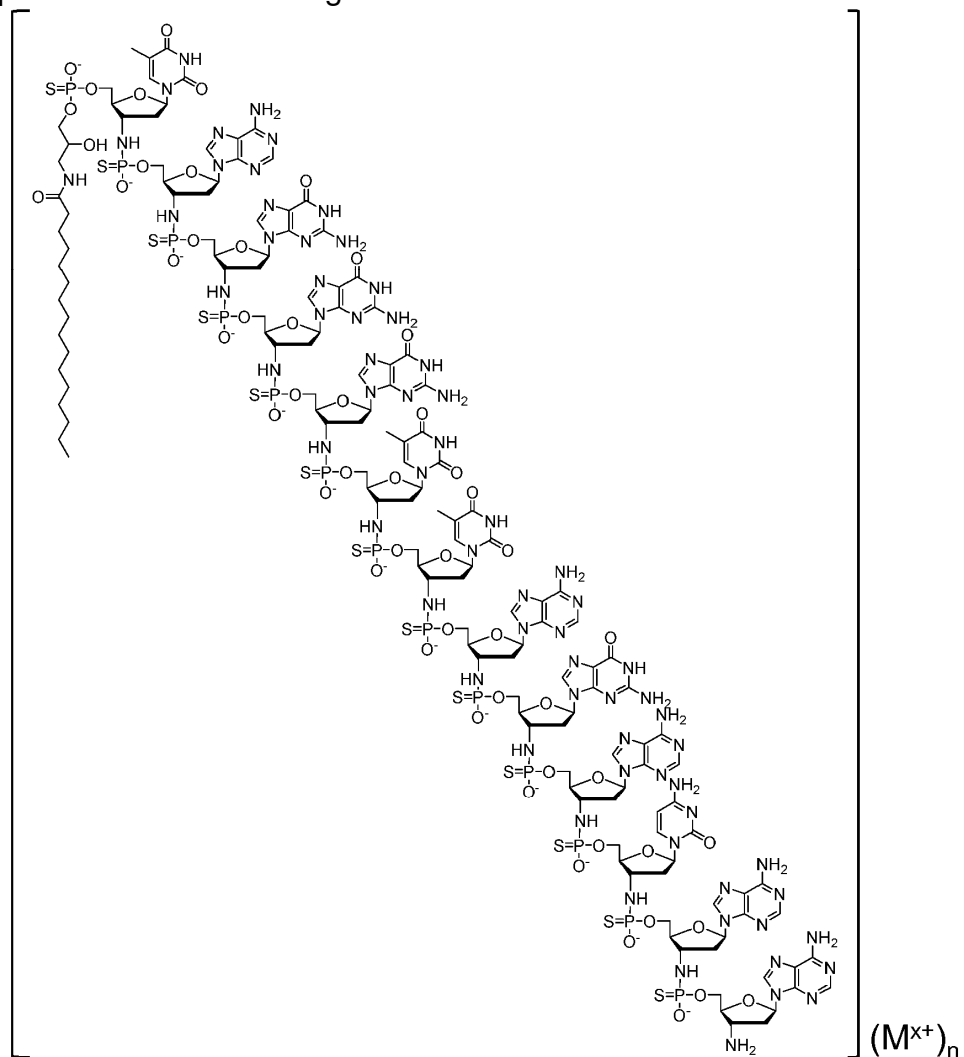
**[0148]** In certe forme di realizzazione, la composizione include un composto descritto dalla struttura:



o un sale dello stesso, dove "nps" rappresenta un legame tiofosforamidato (per esempio -NH-P(=O)(SH)-O- o un tautomero dello stesso o un sale dello stesso), che collega il 3'-carbonio di un nucleoside al 5'-carbonio del nucleoside adiacente. Resta inteso che il composto descritto nella formula di cui sopra può esistere in una forma di sale. Tali forme, nella misura in cui esse possono esistere, sono intese rientrare nella portata della presente divulgazione. In certe forme di realizzazione, la composizione include un sale farmaceuticamente accettabile del

composto. In certe istanze, la composizione include un sale di sodio del composto. In certe forme di realizzazione, la composizione include un sale cationico bivalente del composto, come un sale di magnesio del composto. In certe forme di realizzazione, la composizione include un sale cationico trivalente del composto, come un sale di alluminio del composto.

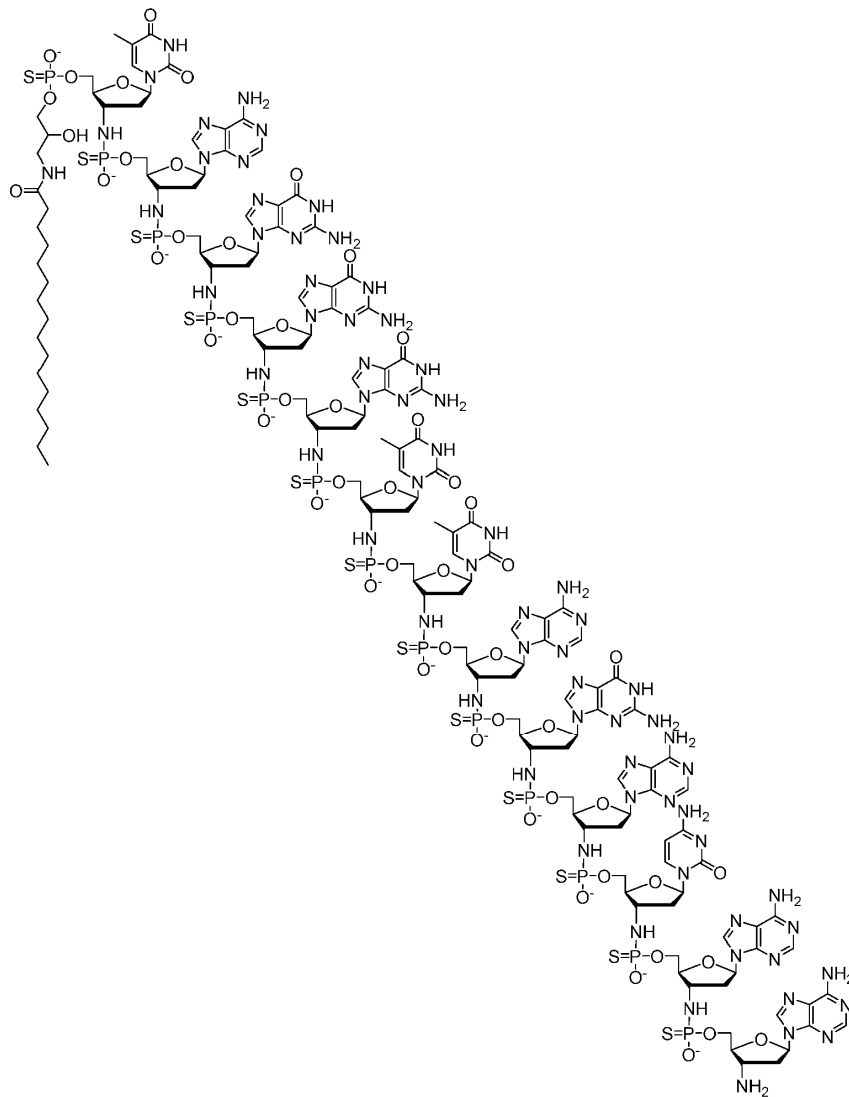
**[0149]** In certe forme di realizzazione, la composizione include un composto descritto dalla seguente struttura:



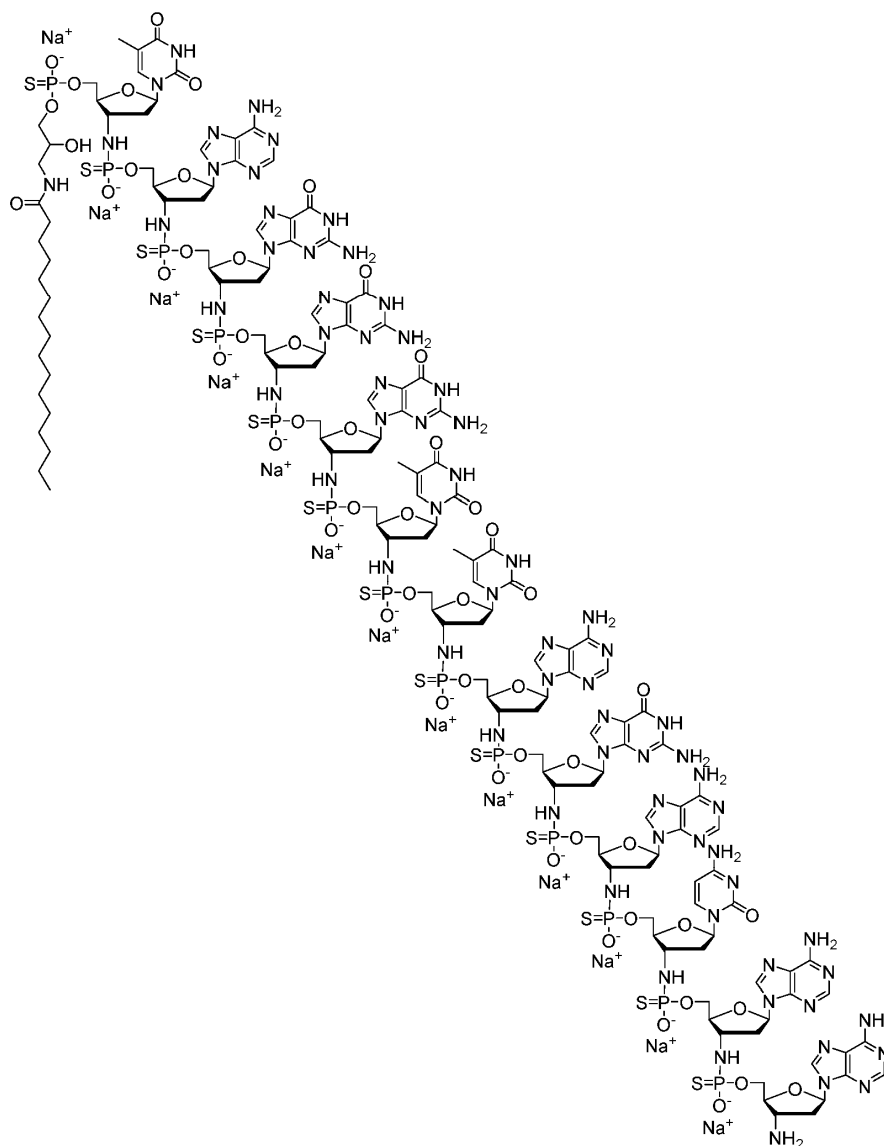
dove ciascun  $M^{x+}$  è indipendentemente idrogeno o qualsiasi controione conveniente di un sale, ciascun  $x$  è indipendentemente 1, 2 o 3 e  $n$  è un numero intero da 5 a 13. In alcune istanze,  $n$  è 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13. In certe istanze, ciascun  $x$  è indipendentemente 1, 2 o 3 e  $n$  è un numero intero da 5 a 12. In certe istanze,  $n$  è 13. In certe istanze, ciascun  $x$  è 1. In certe istanze, ciascun  $x$  è indipendentemente 1 o 2. In certe istanze, ciascun  $x$  è indipendentemente 1 o 3. In certe istanze, ciascun  $M^{x+}$  è indipendentemente un controione cationico. In certe istanze, ciascun  $M^{x+}$  è indipendentemente un controione cationico, ciascun  $x$  è indipendentemente 1, 2 o 3 e  $n$  è un numero intero da 5 a 12. In certe istanze, ciascun  $M^{x+}$  è indipendentemente idrogeno o qualsiasi controione cationico conveniente, ciascun  $x$  è indipendentemente 1, 2 o 3 e  $n$  è un numero intero da 5 a 12. In certe istanze,  $M^{x+}$  è idrogeno. In alcune forme di realizzazione,  $(M^{x+})_n$  è  $(Mg^{2+})(M^+)_{11}$ , In alcune forme di realizzazione,  $(M^{x+})_n$  è  $(Mg^{2+})_2(M^+)_9$ . In alcune forme di realizzazione,  $(M^{x+})_n$  è  $(Mg^{2+})_2(M^+)_9$ . In alcune forme di realizzazione,  $(M^{x+})_3$  è  $(Mg^{2+})_3(M^+)_7$ . In alcune forme di realizzazione,  $(M^{x+})_n$  è  $(Mg^{2+})_4(M^+)_5$ . In alcune forme di realizzazione,  $(M^{x+})_n$  è  $(Mg^{2+})_5(M^+)_3$ . In alcune forme di realizzazione,  $(M^{x+})_n$  è  $(Mg^{2+})_6(M^+)$ . In alcune forme di realizzazione,  $(M^{x+})_n$  è  $(Mg^{2+})(M^+)_{12}$ , dove il controione  $Mg^{2+}$  può formare una coppia ionica aggiuntive alla catena dorsale anionica di un altro oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione,  $(M^{x+})_n$  è  $(Mg^{2+})_2(M^+)_{11}$ , dove i controioni  $Mg^{2+}$  possono formare due coppie ioniche aggiuntive alla catena/alle catene dorsali anioniche di uno o due altri oligonucleotidi. In certe istanze,

il controione  $M^+$  del sale di magnesio misto è sodio. In certe istanze, il controione  $M^+$  del sale di magnesio misto è ammonio. In certe istanze, il controione  $M^+$  del sale di magnesio misto è trietilammonio.

**[0150]** In certe forme di realizzazione, la composizione include un composto descritto dalla seguente struttura e può includere qualsiasi controione cationico conveniente di un sale:



**[0151]** In certe forme di realizzazione, la composizione include un composto descritto dalla struttura:



### **Polinucleotidi modificati con lipidi**

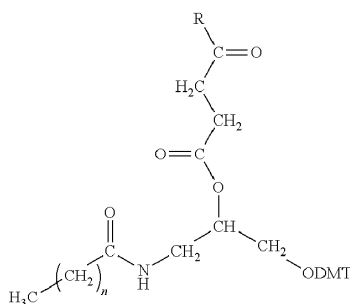
**[0152]** Per coniugare una porzione funzionale lipidica L al polinucleotide può essere usata una varietà di approcci di sintesi, in base alla natura del legame selezionato, inclusi gli approcci descritti in Mishra et al., (1995) *Biochemica et Biophysica Acta*, 1264:229-237, Shea et al., (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:3777-3783 e Rump et al., (1998) *Bioconj. Chem.* 9:341-349. La sintesi di composti in cui la porzione funzionale

lipidica è coniugata in corrispondenza dell'estremità terminale 5' o 3' del polinucleotide può essere ottenuta attraverso l'uso di gruppi funzionali idonei in corrispondenza dell'estremità terminale appropriata, in alcuni casi un gruppo amminico o un gruppo idrossile, che possono essere fatti reagire con acidi carbossilici, cloruri acidi, anidridi ed esteri attivi. Come gruppi funzionali possono essere usati anche gruppi tiolo (si veda Kupihar et al., (2001) *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 9:1241-1247). Per la sintesi di polinucleotidi sono disponibili in commercio modificatori sia amminici sia tiolici con lunghezze della catena diverse. I polinucleotidi aventi legami N3'→P5' tiolosforammidato contengono gruppi 3'-amminico (anziché i 3'-idrossi che si ritrovano nelle chimiche dei polinucleotidi più convenzionali) e quindi questi polinucleotidi rendono disponibile un'opportunità unica per coniugare gruppi lipidici all'estremità 3' del polinucleotide.

**[0153]** Si possono usare vari approcci per attaccare gruppi lipidici alle estremità terminali di polinucleotidi con chimica di N3'→P5' tiolosforammidato (per esempio un linker di palmitoilammido-1-O-(4,4'-dimetossitritil)-2-O-succinilpropandiolo). Per l'attacco all'estremità terminale 3', i composti coniugati possono essere sintetizzati facendo reagire il gruppo 3'-amminico libero del polinucleotide legato a un supporto solido completamente protetto con l'anidride acida corrispondente, a cui seguono deprotezione con ammoniaca e purificazione. In alternativa, per coniugare i gruppi lipidici può essere usato l'accoppiamento di acidi carbossilici di lipidi al gruppo 3'-amminico libero del polinucleotide legato a

un supporto usando agenti di accoppiamento come carbodiimmidi, HBTU (esafluorofosfato di *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)uronio) o ioduro di 2-cloro-1-metilpiridinio. Questi due metodi formano un legame ammidico tra il lipide e il polinucleotide. I lipidi possono essere attaccati alla catena polinucleotidica anche usando un derivato fosforamidato del lipide accoppiato ai polinucleotidi durante l'allungamento della catena. Questo approccio consente di ottenere un legame fosforamidato (per esempio tiofosforamidato) che collega il lipide e il polinucleotide (esemplificato da composti di propil-palmitoile e 2-idrossi-propil-palmitoile). Ancora un altro approccio implica la reazione del gruppo 3'-ammino libero del polinucleotide legato a un supporto completamente protetto con un'aldeide lipidica idonea, a cui segue riduzione con cianoboroidruro di sodio, che produce un legame amminico.

**[0154]** Per l'attacco all'estremità terminale 5', il polinucleotide può essere sintetizzato usando un supporto solido contenente lipidi, a cui segue sintesi del polinucleotide nella direzione da 5' a 3' come descritto in Pongracz & Gryaznov (1999). Nel seguito è reso disponibile un esempio del supporto modificato. Nell'istanza dove  $n=14$ , l'acido grasso è acido palmitico: la reazione di 3-ammino-1,2-propandiolo con cloruro di palmitoile, seguita da dimetossitritilazione e succinilazione, ha reso disponibile l'intermedio usato per l'accoppiamento al supporto solido. In alcune istanze, R può essere vetro a porosità controllata a base di alchilammina a catena lunga. In certi casi, R è un supporto solido polimerico.



## UTILITÀ

**[0155]** I metodi e le composizioni dell'invenzione, per esempio come sopra descritti, trovano impiego in una varietà di applicazioni. Le applicazioni di interesse includono, ma non sono limitate a: applicazioni terapeutiche, applicazioni diagnostiche, applicazioni di ricerca e applicazioni di screening, come esaminato in maggiore dettaglio nel seguito.

**[0156]** I composti in oggetto trovano impiego in una varietà di applicazioni terapeutiche. In alcune forme di realizzazione, i metodi per produrre un polinucleotide vengono applicati per preparare polinucleotidi che rendono disponibile un beneficio terapeutico. I tipi di malattie che possono essere trattate usando le composizioni della presente invenzione sono illimitati. Per esempio, le composizioni possono essere usate per il trattamento di numerose malattie genetiche. In alcune forme di realizzazione, i metodi e le composizioni in oggetto hanno applicazioni antisenso. In alcune forme di realizzazione, i metodi e le composizioni in oggetto hanno applicazioni antigeniche. In certe forme di realizzazione, i metodi e le composizioni in oggetto hanno applicazioni nell'inibizione della telomerasi, come quelle descritte nel Brevetto US 6,835,826 e nella Pubblicazione US 20120329858.

**[0157]** La presente divulgazione rende disponibili composti che possono inibire in modo specifico e potente l'attività della telomerasi e che possono pertanto essere usati per inibire la proliferazione di cellule telomerasi-positivo, come cellule tumorali. È stato dimostrato che un'ampia varietà di cellule cancerose è telomerasi-positiva, incluse cellule da cancro di cute, tessuto connettivo, tessuto adiposo, mammella, polmone, stomaco, pancreas, ovaio, cervice, utero, rene, vescica, colon, prostata, sistema nervoso centrale (SNC), retina e tumori ematologici (come mieloma, leucemia e linfoma). I cancri di interesse includono, ma non sono limitati a, mielofibrosi, trombocitemia, sindrome mielodisplastica e leucemia mielogeno.

**[0158]** I composti in oggetto possono essere usati per trattare neoplasie ematologiche maligne e disturbi mieloproliferativi inclusi, ma non limitati a, trombocitemia essenziale (ET), policitemia vera (PV), leucemia mielogeno cronica (CML), mielofibrosi (MF), leucemia neutrofilica cronica, leucemia eosinofila cronica e leucemia mielogeno acuta (AML). I composti in oggetto possono essere usati per trattare sindromi mielodisplastiche, che includono malattie come anemia refrattaria, anemia refrattaria con blasti in eccesso, citopenia refrattaria con displasia multilineare, citopenia refrattaria con displasia unilineare e leucemia mielomonocitica cronica (CMML). I composti in oggetto possono essere usati per trattare malattie ematologiche, come quelle descritte in WO 2014/088785.

**[0159]** Di conseguenza, i composti resi disponibili nel presente documento sono ampiamente utili nel trattamento di un'ampia gamma di neoplasie maligne. In alcune istanze, i composti in oggetto possono essere efficaci nel rendere disponibili trattamenti che distinguono tra cellule maligne e normali a un grado elevato???, evitando molti degli effetti collaterali deleteri presenti con la maggior parte dei regimi chemioterapici attuali che si basano su agenti che uccidono le cellule in divisione in modo indiscriminato. Inoltre, in alcuni casi, i composti modificati con lipidi in oggetto sono più potenti degli oligonucleotidi non coniugati equivalenti, il che significa che possono essere somministrati a dosi inferiori, rendendo disponibile una sicurezza potenziata e riduzioni significative del costo del trattamento. Gli inibitori della telomerasi possono essere impiegati unitamente ad altri approcci terapeutici per il cancro, inclusa la rimozione chirurgica di tumori primari, trattamento con agenti chemioterapici e radiazioni. Quindi, l'invenzione si riferisce a composti e composizioni resi disponibili nel presente documento per l'uso come medicamento. L'invenzione si riferisce anche a composti e composizioni resi disponibili nel presente documento per l'uso nel trattamento o nella prevenzione di una qualsiasi delle neoplasie maligne menzionate in precedenza.

**[0160]** I composti e i metodi in oggetto trovano impiego in una varietà di applicazioni diagnostiche incluso, ma non limitato a, lo sviluppo di sostanze diagnostiche cliniche, per esempio diagnostica in vitro o agenti di imaging tumorale in vivo. Tali applicazioni sono utili per

diagnosticare o confermare la diagnosi di una condizione patologica o la suscettibilità alla stessa. I metodi sono utili anche per monitorare la progressione della malattia e/o la risposta al trattamento in pazienti a cui è stata precedentemente diagnosticata la malattia.

## **ESEMPI**

### **Esempio 1. Sommario**

**[0161]** Questi esempi descrivono esperimenti per preparare varie forme bivalenti o trivalenti di Imetelstat, come Ca, Ba, Mg, Al, Fe, Cu e Zn dalla forma di sale sodico di Imetelstat. In questi esperimenti sono stati valutati miglioramenti della purezza usando metodi di preparazione che implicano la formazione e l'isolamento di sali dei cationi bi-dentati o tri-dentati che possono legarsi con uno, due o tre gruppi fosfato di Imetelstat. Sono state studiate anche la solubilità e l'osmolarità delle forme di sale risultanti.

**[0162]** È stata investigata la preparazione di sali di Imetelstat Calcio, Imetelstat Bario, Imetelstat Magnesio, Imetelstat Alluminio, Imetelstat Fe (II o III) e Imetelstat Rame usando  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{FeCl}_2$  e  $\text{FeCl}_3$ .

**[0163]** Sono stati studiati tre metodi per lo scambio di sale: uso di una resina a scambio cationico forte (FINEX MFG 210), precipitazione e semplice dissoluzione. Quando la soluzione di Imetelstat Sodio veniva fatta passare attraverso una resina scambiata con  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$  o  $\text{MgCl}_2$ , le soluzioni dell'eluato contenevano polveri fini, indicando che i controioni di sodio erano stati scambiati con successo dalla catena dorsale di

Imetelstat e sostituiti con controioni di calcio, bario o magnesio. Per gli altri cinque reagenti ( $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ ) che sono stati equilibrati con la resina a scambio cationico, la parte superiore della resina nella colonna diventava aggregata quando veniva fatta passare la soluzione di Imetelstat, anche in questo indicando che i controioni di sodio erano stati scambiati con successo dalla catena dorsale di Imetelstat.

**[0164]** Sono stati testati anche metodi di precipitazione e dissoluzione usando un eccesso di reagenti salini. Quando un grande eccesso di reagente salino (per esempio 900 equivalenti) veniva trattato con Imetelstat Sodio, si formava un precipitato. I precipitati sono stati isolati mediante filtrazione. Test successivi indicano che erano necessari da sette a cinquanta equivalenti di reagenti di sali inorganici per convertire tutto l'Imetelstat a un precipitato.

**[0165]** Cinque equivalenti di ciascuno dei tre sali inorganici (Mg, Ba o Ca) sono stati trattati con la forma di sale di TEA (trietilammonio) di Imetelstat o la forma di sale di Na di Imetelstat. È stato confermato che la precipitazione non era avvenuta e le soluzioni sono state desalificate e liofilizzate. L'analisi della polvere liofilizzata mediante Flame AA (assorbimento atomico) mostrava che alcuni dei controioni di sodio di Imetelstat erano stati scambiati.

**[0166]** È stato eseguito un esperimento aggiuntivo con  $\text{MgCl}_2$  usando da uno a nove equivalenti di catione di magnesio rispetto alla forma di Imetelstat. I controioni di sodio venivano parzialmente

scambiati in controioni di Mg, lo scambio più alto verificandosi a nove equivalenti di  $MgCl_2$ , le composizioni risultanti mostrando l'1,2% in peso di Na e l'1,1% in peso di Mg.

### **Esempio 2. Materiali e apparecchiature**

**[0167]** I reagenti inorganici, i solventi organici e altri materiali usati per lo studio sono elencati nella Tabella 1. Per lo studio è stato usato Imetelstat Sodio (CAS # 1007380-31-5) del lotto # di G 163/L-G-13002 fornito da Geron. Imetelstat ammonio è una composizione grezza derivata dal clivaggio di Imetelstat da un supporto di sintesi in fase solida usando ammoniaca ed etanolo (per esempio come descritto da Gryaznov et al. in US 20120329858) ed è stato ottenuto dallo stock del produttore. Imetelstat TEA (forma di trietilammonio) è una composizione derivata da un eluato della colonna di purificazione HPLC dove viene usato un acetato di trietilammonio (TEAA) contenente una fase mobile (per esempio come descritto da Gryaznov et al. in US 20120329858) ed è stato ottenuto dallo stock del produttore ottenuto da vari studi di sviluppo di processo. L'ultrafiltrazione è stata eseguita usando una cella per ultrafiltrazione con agitatore (Amicon 8400, Millipore) con membrane in PES da 1 KD. La liofilizzazione è stata condotta usando una centrifuga a vuoto (ScanSpeed 40, LaboGene).

### **Esempio 3. Procedura**

#### **Scambio mediante colonna di resina a scambio ionico**

**[0168]** È stata preparata una colonna di resina a scambio cationico forte, FINEX MFG 210, avente un volume della colonna di 200

ml (4,6 cm x 12 cm) e la resina è stata lavata con NaOH 1 M e acqua. La colonna è stata poi equilibrata con una soluzione 1 M di ciascun sale di interesse. In totale sono state preparate e usate in questi esperimenti otto soluzioni saline 1 M ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{FeCl}_2$  e  $\text{FeCl}_3$ ). Alla colonna è stata aggiunta una soluzione di 50 ml di Imetelstat sodio a 100 mg/ml.

**[0169]** Nel caso delle colonne equilibrate con  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{FeCl}_2$  e  $\text{FeCl}_3$ , è stata osservata aggregazione di Imetelstat sulla resina nella parte superiore della colonna quando sulla colonna veniva caricato Imetelstat sodio.

**[0170]** Nel caso delle tre colonne equilibrate con  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{BaCl}_2$ , le soluzioni saline non determinavano aggregazione di Imetelstat sulla colonna e Imetelstat veniva recuperato dagli eluati delle colonne, che avevano l'aspetto di soluzioni torbide. Sono state recuperate polveri fini da questi eluati mediante centrifugazione (4000 giri/minuto, 20 minuti). Dopo la centrifugazione, è stato confermato che il surnatante non conteneva Imetelstat mediante analisi HPLC. Ciò indica che la precipitazione e la separazione dei sali di calcio, magnesio e bario di Imetelstat erano state ottenute con successo.

### **Mediante precipitazione**

**[0171]** È stata investigata la cristallizzazione o precipitazione di forme bivalenti o trivalenti di Imetelstat usando un grande eccesso di sali inorganici di interesse (900 equivalenti, riferiti al peso). Sono state preparate soluzioni saline 1 M di  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{AlCl}_3$ ,

FeCl<sub>2</sub> e FeCl<sub>3</sub>. Sono stati miscelati tre tipi di soluzione di Imetelstat: soluzione di Imetelstat grezza (sale di ammonio), Imetelstat purificato (forma di sale di trietilammonio (TEA)) e Imetelstat sodio (forma di sale di Na), con ciascuna soluzione salina.

**[0172]** Tutte le soluzioni miscelate mostravano precipitati di Imetelstat, che venivano isolati facilmente mediante filtrazione con una carta filtrante Advantec 2. Questo risultato indica che la precipitazione e la separazione di sali multivalenti di Imetelstat erano state ottenute con successo.

**[0173]** Sono state inizialmente investigate le solubilità dei precipitati isolati nelle condizioni di grande eccesso di reagente salino usando i seguenti solventi: acqua, acetonitrile, MeOH, EtOH, IPA (alcol isopropilico), NaOH 0,1 M, HCl 0,1 M, NaCl 1 M e NMPP.

**[0174]** Per i sali precipitati in un grande eccesso di reagente salino, i sali di calcio, bario e magnesio di Imetelstat erano solubili in una soluzione di NaOH 1 M e NaCl 1 M (si veda la tabella 2) Sono stati condotti studi di solubilità del precipitato di Imetelstat ottenuto da un grande eccesso di reagente di sale di magnesio in soluzioni di NaCl 1 M a concentrazioni diverse (da 2 mg/ml a 6 mg/ml) e in condizioni di pH diverse (pH 8, 9, 10, 11, 12) e analizzato mediante HPLC (si vedano i cromatogrammi della Figura 1). È stato osservato che il precipitato di Imetelstat era solubile a 6 mg/l e da pH 11 a pH 12. Il composto presentava anche stabilità fino a pH 12 senza precipitati (Figura 1).

### **Mediante dissoluzione**

**da 30 a 50 equivalenti di reagente salino**

**[0175]** È stato investigato il numero di equivalenti di reagenti salini di interesse che potevano ottenere una precipitazione completa di Imetelstat aggiungendo il reagente salino di interesse gradualmente. È stata osservata la formazione completa di precipitato nell'intervallo da 7 a 50 equivalenti di reagente salino aggiunto per gli otto sali elencati nella Tabella 3. Man mano che si aggiungevano più equivalenti dei reagenti salini, veniva osservata una tendenza alla formazione di gel con precipitazione per tutti i sali.

**[0176]** Sono stati usati tre tipi di soluzione di Imetelstat: Imetelstat ammonio grezzo (forma grezza), Imetelstat trietilammonio (forma di sale di TEA purificato) e Imetelstat sodio (forma di sale di Na), che sono stati miscelati con ciascuna soluzione salina. Il sale di Imetelstat ammonio è stato usato sotto forma di soluzione in  $\text{NH}_4\text{OH}$  o una soluzione in acqua. Le soluzioni di Imetelstat ammonio e Imetelstat TEA richiedevano rispettivamente approssimativamente 50 equivalenti o 30 equivalenti di reagente di sale di Mg per ottenere la completa precipitazione.

**[0177]** È stata investigata la solubilità dei precipitati formati dalla soluzione di Imetelstat TEA e dalla soluzione di Imetelstat ammonio in varie condizioni di pH da pH 8 a pH 12. Dopo aver lasciato le soluzioni miscelate per 6 ore a t.a., la solubilità dei precipitati di Imetelstat-Mg è stata analizzata mediante assorbanza UV a 260 nm. Entrambi i precipitati ottenuti dall'Imetelstat ammonio e dall'Imetelstat TEA presentavano una

tendenza analoga in quanto nella soluzione di NaCl 1 M a pH elevato si dissolveva più sale di Imetelstat (si veda la Tabella 3).

**[0178]** Questo risultato suggerisce che, quando viene controllato il numero di equivalenti del reagente salino di interesse rispetto a Imetelstat, può essere ottenuta la completa precipitazione del sale di Imetelstat mediante qualsiasi metodo conveniente per produrre un precipitato che può essere ridissolto con successo.

#### **5 equivalenti di reagente salino**

**[0179]** La soluzione di Imetelstat sodio (100 mg in 1 ml di acqua) è stata miscelata con 5 equivalenti di otto reagenti salini e ciascuna soluzione è stata desalificata mediante ultrafiltrazione usando una cella per ultrafiltrazione con agitatore e una membrana da 1 KD. La soluzione ultrafiltrata è stata poi liofilizzata. La polvere risultante è stata analizzata per il contenuto di Na e ciascun controione di metallo di interesse mediante Flame AA (spettroscopia di assorbimento atomico). Come mostrato nelle Figure 2 e 3, il contenuto di controioni di metallo più elevato era dell'1,1% in peso per Zn, Al e Mg, con contenuti di Na rispettivamente del 2,6%, 1,7% e 2,6%.

#### **da 6 a 9 equivalenti di reagente salino**

**[0180]** È stata effettuata l'aggiunta di da 6 a 9 equivalenti di reagente di sale di magnesio a una soluzione di Imetelstat sodio e la successiva ultrafiltrazione e liofilizzazione rendevano disponibile il prodotto solido che era completamente solubile in acqua. È stata eseguita l'analisi del contenuto di sodio e magnesio (si vedano i risultati

nella Figura 3). L'aggiunta di nove equivalenti di  $MgCl_2$  alla soluzione di Imetelstat sodio produceva una composizione in cui il contenuto di controioni di Na e Mg è rispettivamente dell'1,1% e dell'1,2% in peso.

#### **da 1 a 10 equivalenti di reagente salino**

**[0181]** Per investigare lo scambio di controioni di Mg con controioni di TEA nel sale di Imetelstat TEA rispetto al sale di Imetelstat sodio è stata progettata ed eseguita un'altra serie di esperimenti. Sono stati miscelati da uno a dieci equivalenti di  $MgCl_2$  in soluzioni acquose con una soluzione di sale di Imetelstat TEA (purezza > 90% mediante HPLC). È stata eseguita un'analisi del contenuto di controioni di Mg dopo ultrafiltrazione e liofilizzazione. I risultati sono mostrati nella Figura 4. L'aggiunta di fino a 10 equivalenti di reagente di  $MgCl_2$  produceva una composizione avente l'1,6% di Mg in peso.

#### **Esempio 4. Conclusione**

**[0182]** È stata ottenuta la preparazione di forme saline bivalenti e trivalenti di Imetelstat inclusi sali di calcio, magnesio, zinco, alluminio, bario, ferro (II), ferro (III) e rame. Quando veniva usato un eccesso controllato di reagenti di sali inorganici selezionati (si vedano le Tabelle 2 e 3) per far precipitare il polinucleotide, si formavano precipitati che potevano essere successivamente ridissolti e che presentavano una purezza migliorata rispetto alle impurezze a eluizione rapida usando l'analisi HPLC.

**[0183]** L'uso di un reagente di sale di magnesio produceva un precipitato solido solubile di Imetelstat dopo la fase di scambio. Sono stati

prodotti precipitati che otteneva un 1,2% in peso di controione di magnesio rispetto all'1,1% in peso di controione di sodio.

**[0184]** La precipitazione di Imetelstat usando sali bivalenti o trivalenti rende disponibile la rimozione di prodotti e reagenti di sintesi non target che rimangono in soluzione. La rimozione di tali impurezze presenti nelle soluzioni di Imetelstat grezzo rende disponibili diversi vantaggi per le successive fasi di purificazione cromatografica di Imetelstat, come carico ridotto della colonna, risoluzione migliorata, numero ridotto di fasi di purificazione cromatografica e durata migliorata delle colonne cromatografiche, costi di purificazione diminuiti e purificazioni più rapide.

**Tabella 1. Sali inorganici, solventi organici e altri materiali**

<b>Materiale</b>	<b>Formula molecolare Peso molecolare:</b>	<b>Grado o purezza</b>
Cloruro di calcio diidrato	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PM 147,01)	≥ 99%
Cloruro di magnesio monoidrato	$\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (PM 203,30)	≥ 99%
Cloruro di bario diidrato	$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PM 244,26)	≥ 99%
Cloruro di rame (II) diidrato	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PM 170,48)	≥ 99%

Cloruro di zinco	ZnCl <sub>2</sub> (PM 136,30)	≥ 98%
Cloruro di alluminio esaidrato	AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O (PM 241,43)	≥ 95%
Cloruro di ferro (II) tetraidrato	FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O (PM 198,81)	≥ 98%
Cloruro di ferro (III) esaidrato	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O (PM 270,30)	≥ 98%
Cloruro di sodio	NaCl (PM 58,4)	Grado USP

Tabella 2

○ Sì, X: No, "-" significa non eseguito)										
Metodo	Imetelstat testato	Test eseguito:	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	BaCl <sub>2</sub>	CuCl <sub>2</sub>	ZnCl <sub>2</sub>	AlCl <sub>3</sub>	FeCl <sub>2</sub>	FeCl <sub>3</sub>
Resina scambio ionico	Sodio (forma Na, 100 mg/ml)	Passaggio attraverso colonna	○	○	○	X	X	X	X	X
		Precipitazione in soluzione dopo colonna	○	○	○	-	-	-	-	-
		Filtrazione dei precipitati	X	X	X	-	-	-	-	-
		Solubilità* del precipitato	X	X	X	-	-	-	-	-

Precipitazione (900 equivalenti)	Sodio (forma Na, 100 mg/ml)	Precipitati (filtrabili)	○	○	○	○	○	○	○	○
		Solubilità** del precipitato	X	X	X	X	X	X	X	X
		Solubilità del precipitato in NaOH 1 M	○	○	○	X	X	X	X	X
	TEA (35 mg/ml)	Precipitati (filtrabili)	○	○	○	○	○	○	○	○
		Solubilità** del precipitato	X	X	X	X	X	X	X	X
		Solubilità del precipitato in NaOH 1 M	○	○	X	X	X	X	X	X

	Grezzo (in NH <sub>4</sub> OH)	Precipitati (filtrabili)	○	○	○	○	○	○	○	○
		Solubilità** del precipitato	X	X	X	-	-	-	-	-
* Testato in acetonitrile, MeOH, EtOH, IPA, acqua, NMP, HCl 1 M, NaCl 1 M, NaOH 1 M										
** Testato in acetonitrile, MeOH, EtPH, IPA, acqua, NMP, HCl 1 M, NaCl 1 M										

**Tabella 3**

Dissoluzione	Sodio	Equivalenti di sale	9	15	12	7	50	50	10	11
	TEA		15	30	30	10	50	10	50	10
	Grezzo (in NH <sub>4</sub> OH)	inorganico per ottenere la completa	-	>50	-	-	-	-	-	-
	Grezzo (in acqua)	precipitazione	-	30	-	-	-	-	-	-
Solubilità in NaCl 1 M (1 ml)	TEA	Imetelstat-Mg ppt	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11	pH 12			
	Grezzo (in acqua)	Imetelstat-Mg ppt	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11	pH 12			
		6 mg (dopo 64 ore)	28 OD	31 OD	70 OD	290 OD	434 OD			
		6 mg (dopo 6 ore)	10 OD	7 OD	17 OD	111 OD	377 OD			

**ELENCO DELLE SEQUENZE****[0185]**

< 110 > Geron Corporation Ramiya, Premchandran H.

< 120 > Metodi di preparazione di polinucleotidi

usando composizioni di sali cationici multivalenti

<130> 186/002

<150> US 62/151.891

<151> 23/04/2015

<160> 23

<170> FastSEQ per Windows versione 4.0

<210> 1

<211> 451

<212> RNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 1

```

ggguugcgga gggugggccu gggaggggug guggccauuu uuugucuaac ccuaacugag 60
aaggcgcuag gcgccgugcu uuugcucucc gcgcgcuguu uuucucgcug acuuucagcg 120
ggcggaaaag ccucggccug ccgccuucca ccguucauuc uagagcaaac aaaaaauguc 180
agcugcuggc ccguucgccc cucccgggga ccugcgggcg gucgccugcc cagccccga 240
accccgccug gaggccgcgg ucggcccggg gcuucuccgg aggcaccac ugccaccgcg 300
aagaguuggg cucugucagc cgcgggucuc ucgggggcga gggcgagguu cagccuuuc 360
aggccgcagg aagaggaacg gagcgagucc ccgcgcgcgg cgcgauucc ugagcugugg 420
gacgugcacc caggacucgg cucacacaug c 451

```

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 2

gctctagaat gaacggtgga aggccgagcagg 30

<210> 3

<211> 13

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 3

tagggttaga caa            13

<210> 4

<211> 11

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 4

gttaggtta g            11

<210> 5

<211> 13

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 5

tag cagtagggt            13

<210> 6

<211> 15

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 6

gtggaaggcg gcagg 15

<210> 7

<211> 13

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 7

ggaaggcggc agg 13

<210> 8

<211> 13

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 8

gtggaaggcg gca 13

<210> 9

<211> 11

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 9

gtggaaggcg g 11

<210> 10

<211> 13

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 10

cggtggaagg cgg 13

<210> 11

<211> 13

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 11

acggtggaag gcg 13

<210> 12

<211> 16

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 12

aacggtggaa ggcggc 16

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 13

atgaacggtg gaaggcgg 18

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 14

acatttttg ttgctctag 20

<210> 15

<211> 13

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 15

tagggtaga caa            13

<210> 16

<211> 11

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 16

gttaggtta g            11

<210> 17

<211> 13

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 17

gttaggtta gac            13

<210> 18

<211> 15

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 18

gtagggtta gaaa 15

<210> 19

<211> 12

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 19

cccttctcag tt 12

<210> 20

<211> 12

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 20

cgcccttctc ag □ 12

<210> 21

<211> 9

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 21

gggtagac 9

<210> 22

<211> 9

<212> DNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 22

cagtagg 9

<210> 23

<211> 11

<212> RNA

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Oligonucleotide di sintesi

<400> 23

cuaaccuaa c 11

## RIVENDICAZIONI

1. Metodo per preparare un polinucleotide, il metodo comprendendo:

a) mettere a contatto una prima composizione polinucleotidica con un sale cationico multivalente per far precipitare un primo sale del polinucleotide;

b) separare il primo sale del polinucleotide dalla prima composizione polinucleotidica messa a contatto per produrre una seconda composizione polinucleotidica comprendente il primo sale del polinucleotide;

in cui la prima composizione polinucleotidica comprende:

(i) un polinucleotide avente una sequenza di 7 o più subunità nucleosidiche e almeno due delle subunità nucleosidiche sono unite da un legame intersubunità N3'→P5' tiofosforammidato;

e

(ii) prodotti e reagenti di sintesi non target solubili

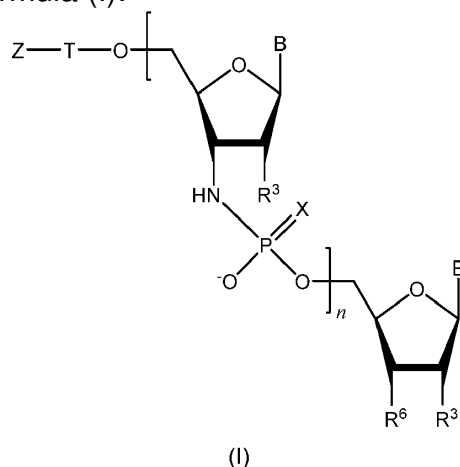
c) mettere a contatto la seconda composizione polinucleotidica dalla fase (b) con un supporto per cromatografia a fase inversa; e

d) eluire dal supporto per cromatografia a fase inversa una terza composizione polinucleotidica comprendente un secondo sale del polinucleotide solubile.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui le subunità nucleosidiche sono tutte unite da legami intersubunità ciascuno

indipendentemente selezionato tra un legame intersubunità N3'→P5' tiofosforamidato e un legame intersubunità N3'→P5' fosforamidato.

**3.** Metodo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il polinucleotide è descritto dalla Formula (I):



in cui:

ciascun B è indipendentemente una purina, una purina protetta, una pirimidina o una pirimidina protetta o un analogo delle stesse;

ciascun X è indipendentemente ossigeno o zolfo;

ciascun R<sup>3</sup> è indipendentemente idrogeno, fluoro, idrossile, un alcossi, un alcossi sostituito o un idrossile protetto;

R<sup>6</sup> è ammino, idrossile, un ammino protetto, un idrossi protetto, -O-T-Z o -NH-T-Z;

ciascun T è indipendentemente un linker opzionale;

ciascun Z è indipendentemente H, un lipide, un trasportatore, un oligonucleotide, un polimero, un polipeptide, un marcatore rilevabile o un tag; e

n è un numero intero da 7 a 100.

**4.** Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui:

il polinucleotide comprende una sequenza comprendente 13 o più subunità nucleosidiche complementari alla componente a RNA della telomerasi umana o

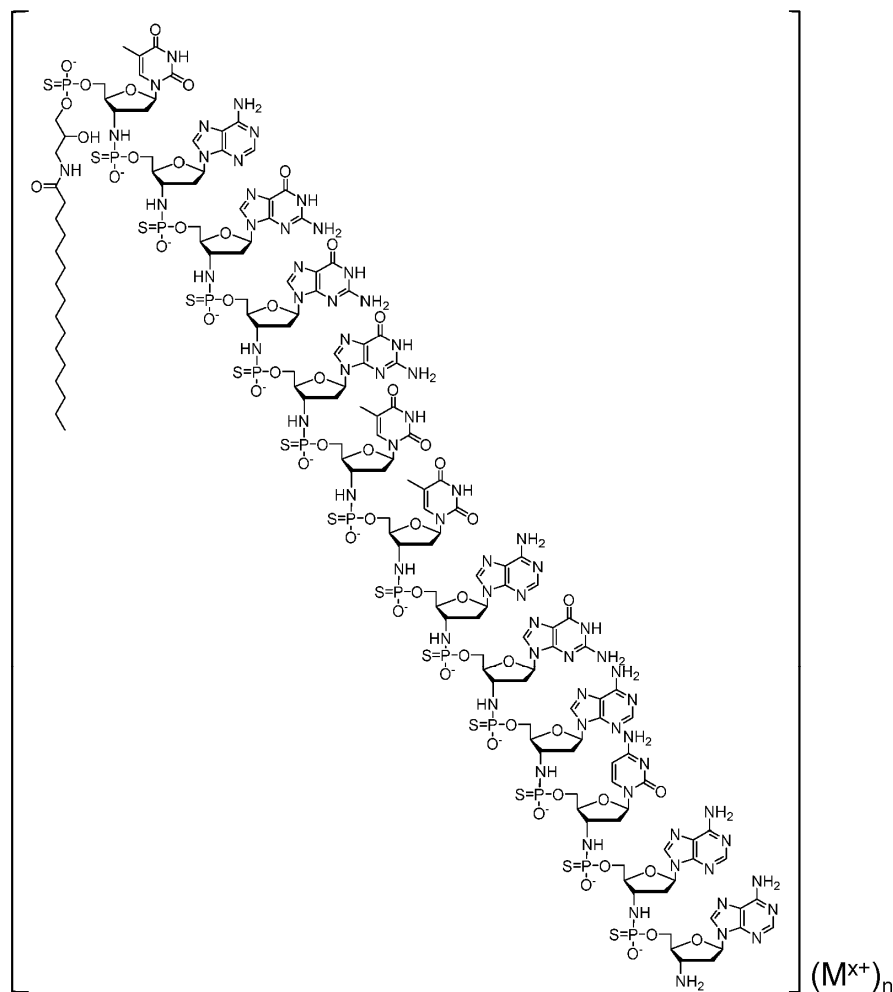
il polinucleotide comprende tra 10 e 50 subunità nucleosidiche contigue complementari alla componente a RNA della telomerasi umana.

**5.** Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui le subunità nucleosidiche sono tutte unite da legami intersubunità N3'→P5' tiofosforammidato.

**6.** Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui il polinucleotide comprende una sequenza selezionata dal gruppo costituito da: GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 4), TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) e CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 5).

**7.** Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui il polinucleotide è coniugato a una porzione funzionale lipidica tramite un linker opzionale.

**8.** Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui il secondo sale del polinucleotide ha la struttura:



in cui ciascun  $M^{x+}$  è indipendentemente idrogeno o un controione cationico, ciascun  $x$  è indipendentemente 1, 2 o 3 e  $n$  è un numero intero da 5 a 13.

**9.** Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8, in cui dopo la fase di eluizione d) il secondo sale del polinucleotide è un sale farmaceuticamente accettabile del polinucleotide.

**10.** Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui dopo la fase di eluizione d), il secondo sale del polinucleotide è un

sale cationico monovalente del polinucleotide, preferibilmente un sale di sodio del polinucleotide.

**11.** Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10, comprendente inoltre, prima della fase di messa a contatto a), clivare il polinucleotide da un supporto di sintesi in fase solida per produrre la prima composizione polinucleotidica come preparazione di sintesi grezza del polinucleotide.

**12.** Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 11, in cui prima della fase di messa a contatto a) la prima composizione polinucleotidica comprende un sale cationico monovalente del polinucleotide.

**13.** Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12, in cui la fase di messa a contatto a) comprende caricare ed eluire la prima composizione polinucleotidica da un supporto a scambio cationico.

**14.** Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 13, in cui la fase di separazione b) comprende centrifugare la prima composizione polinucleotidica messa a contatto per sedimentare mediante centrifugazione il precipitato del primo sale del polinucleotide o filtrare il primo sale del polinucleotide dalla prima composizione polinucleotidica messa a contatto.

**15.** Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 13, in cui la seconda composizione polinucleotidica della fase b) viene caricata direttamente sul supporto per cromatografia a fase inversa.

**16.** Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 15, comprendente inoltre, prima della fase di messa a contatto c), dissolvere la seconda composizione polinucleotidica in un solvente.

**17.** Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 16, in cui;

l'almeno un controione cationico multivalente è bivalente, preferibilmente selezionato dal gruppo costituito da magnesio, zinco e calcio; o

l'almeno un controione cationico multivalente è trivalente, preferibilmente alluminio.

**18.** Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 17, in cui il primo sale del polinucleotide comprende inoltre un controione cationico monovalente.

**19.** Composizione comprendente:

un precipitato salino di un polinucleotide comprendente almeno un controione cationico multivalente;

in cui il polinucleotide ha una sequenza di 7 o più subunità nucleosidiche complementari alla componente a RNA della telomerasi umana e almeno due delle subunità nucleosidiche sono unite da un legame intersubunità N3'→P5' tiofosforamidato.

**20.** Composizione secondo la rivendicazione 19, in cui:

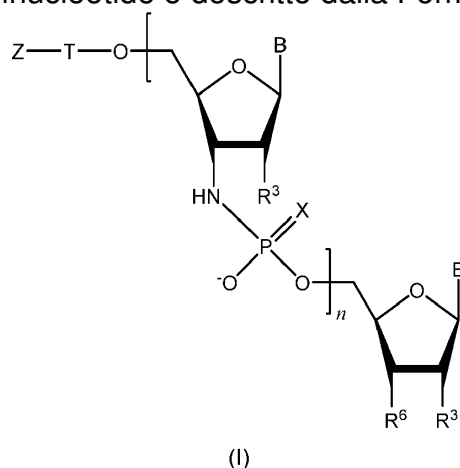
l'almeno un controione cationico multivalente è bivalente, preferibilmente selezionato dal gruppo costituito da magnesio, zinco e calcio, più preferibilmente magnesio; o

l'almeno un controione cationico multivalente è trivalente, preferibilmente alluminio.

**21.** Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 19 e 20, in cui il sale del polinucleotide comprende il 3% in moli o più del controione cationico multivalente o comprende l'1,0% in peso o più del controione cationico multivalente.

**22.** Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 19 a 21, in cui la composizione è un precipitato.

**23.** Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 19 a 22, in cui il polinucleotide è descritto dalla Formula (I):



in cui:

ciascun B è indipendentemente una purina, una purina protetta, una pirimidina o una pirimidina protetta o un analogo delle stesse;

ciascun X è indipendentemente ossigeno o zolfo;

ciascun R<sup>3</sup> è indipendentemente idrogeno, fluoro, idrossile, un alcossi, un alcossi sostituito o un idrossile protetto;

R<sup>6</sup> è ammino, idrossile, un ammino protetto, un idrossi protetto, -O-T-Z o -NH-T-Z;

ciascun T è indipendentemente un linker opzionale;

ciascun Z è indipendentemente H, un lipide, un trasportatore, un oligonucleotide, un polimero, un polipeptide, un marcatore rilevabile o un tag; e

n è un numero intero da 7 a 100;

**24.** Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 19 a 23, in cui:

il polinucleotide comprende una sequenza comprendente 13 o più subunità nucleosidiche complementari alla componente a RNA della telomerasi umana; o

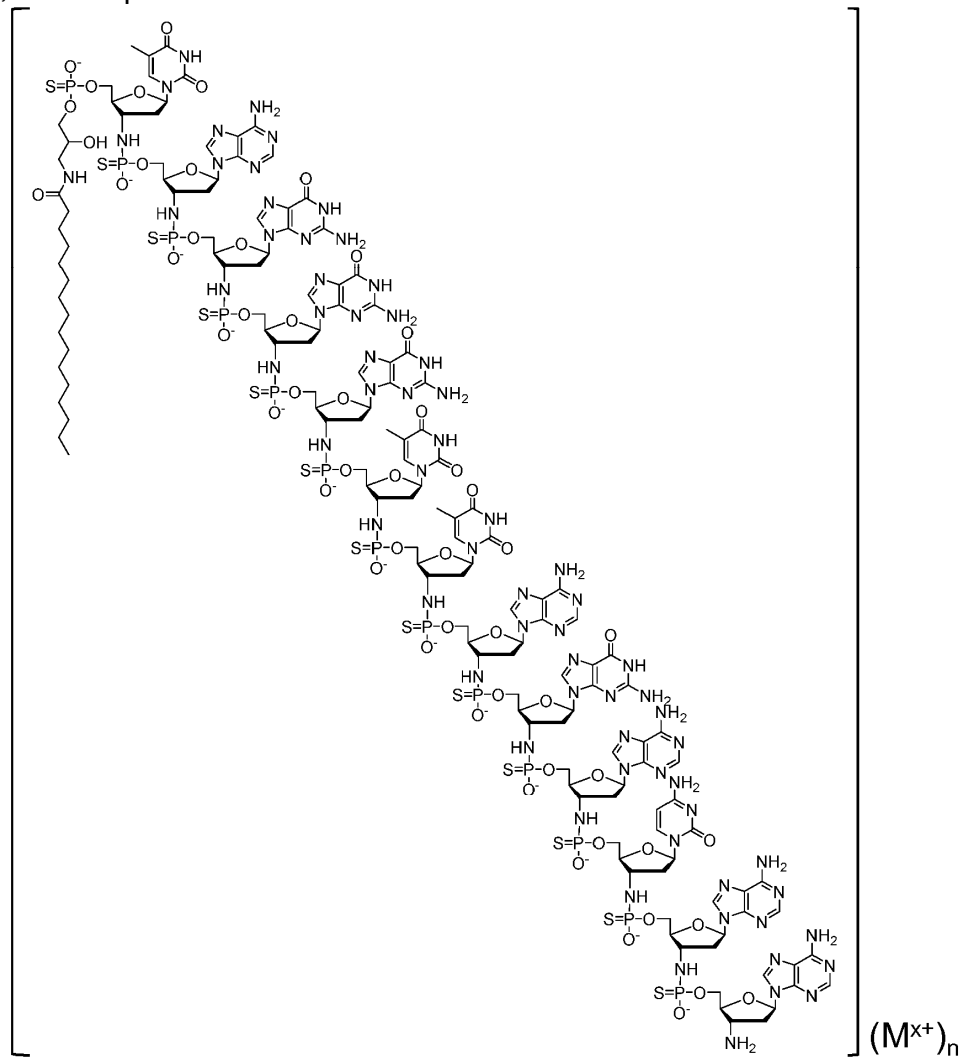
il polinucleotide comprende tra 10 e 50 subunità nucleosidiche contigue complementari alla componente a RNA della telomerasi umana.

**25.** Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 19 a 24, in cui le subunità nucleosidiche sono tutte unite da legami intersubunità N3'→P5' tiofosforamidato.

**26.** Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 19 a 25, in cui il polinucleotide comprende una sequenza selezionata dal gruppo costituito da: GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 4), TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3) e CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 5).

**27.** Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 19 a 26, in cui un'estremità terminale 5' o 3' del polinucleotide è coniugata a una porzione funzionale lipidica tramite un linker opzionale.

**28.** Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 19 a 27, in cui il polinucleotide ha la struttura:



in cui ciascun  $M^{x+}$  è indipendentemente un controione cationico, ciascun  $x$  è 1, 2 o 3 e  $n$  è da 5 a 12.

\*\*\* \*\*

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

**LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI**

**TAVOLA 1/4**

Figura 1

«Unlipidata Species» = Specie non lipidata

“blank” = bianco

**TAVOLA 2/4**

Figura 2

“Salt” = Sale

**TAVOLE 3-4/4**

Figure 3-4

“\*\*\* equ.” = \*\*\* equiv.

\*\*\* \*\*\* \*\*\*

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

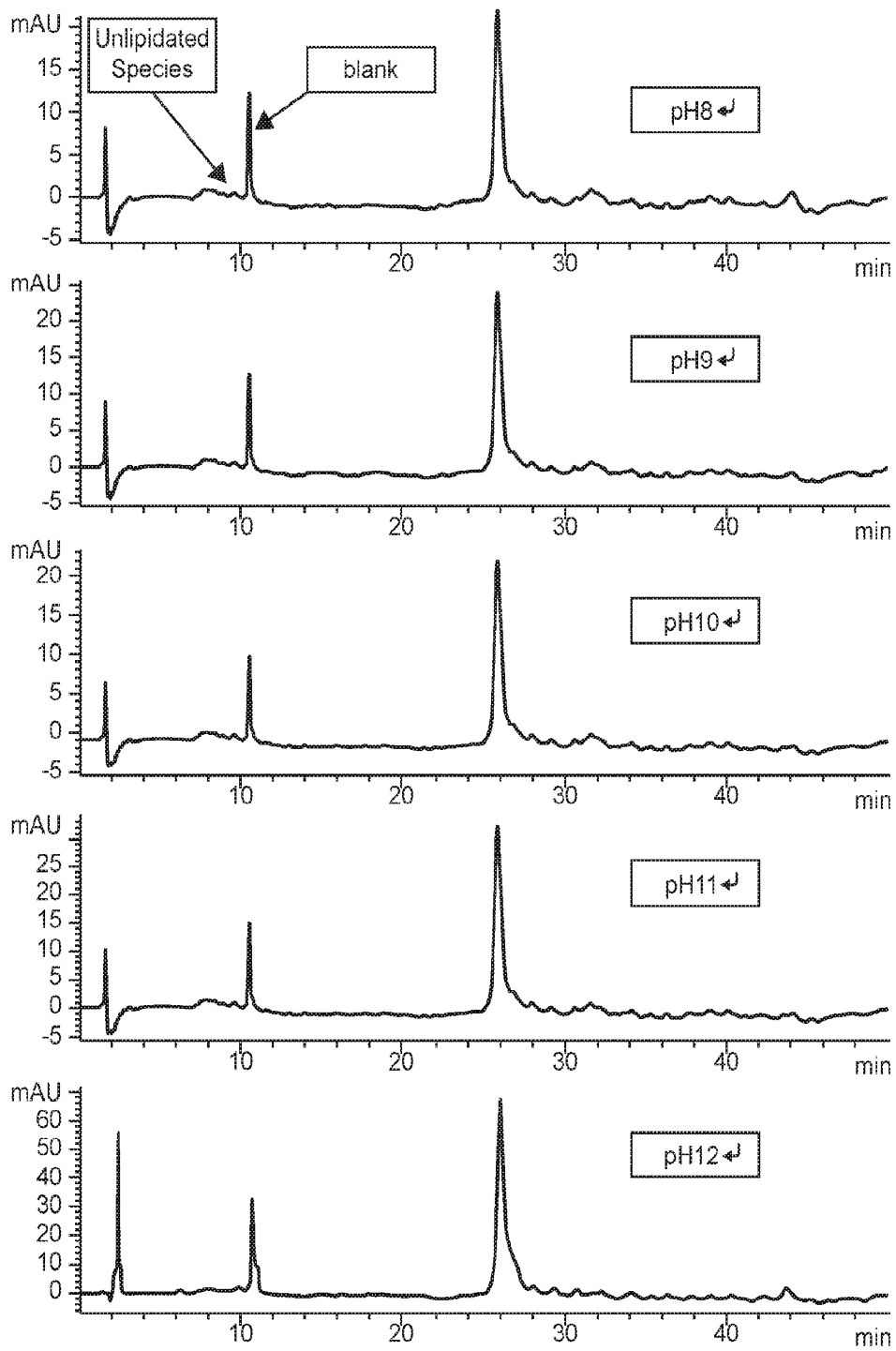


FIG. 1

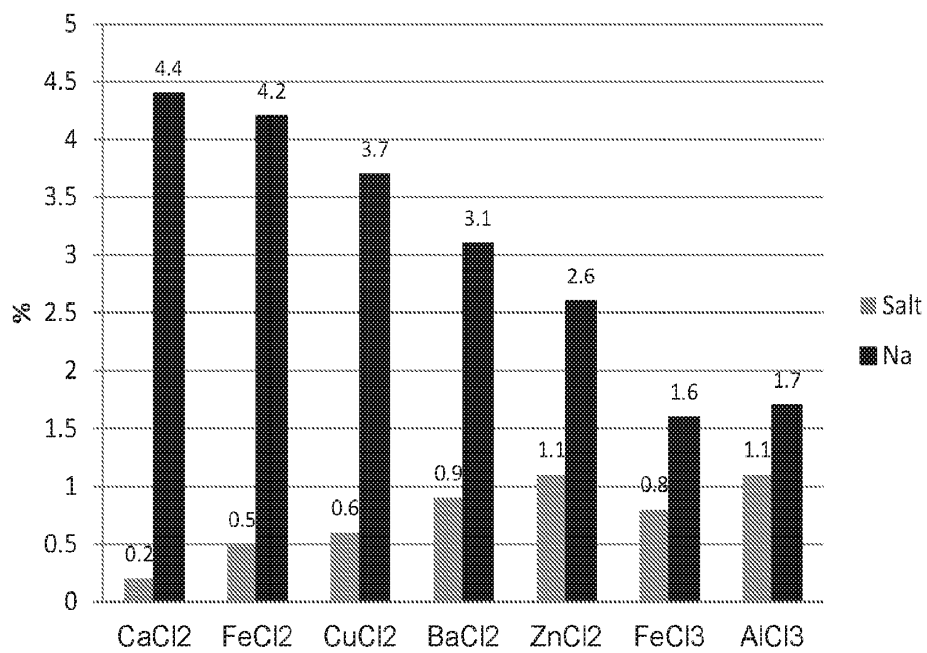


FIG. 2

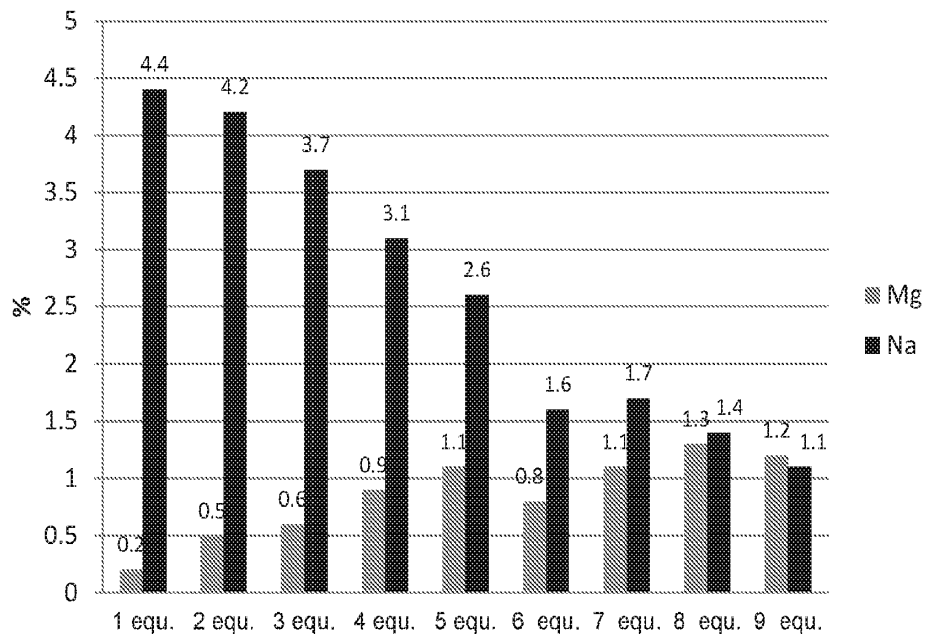


FIG. 3

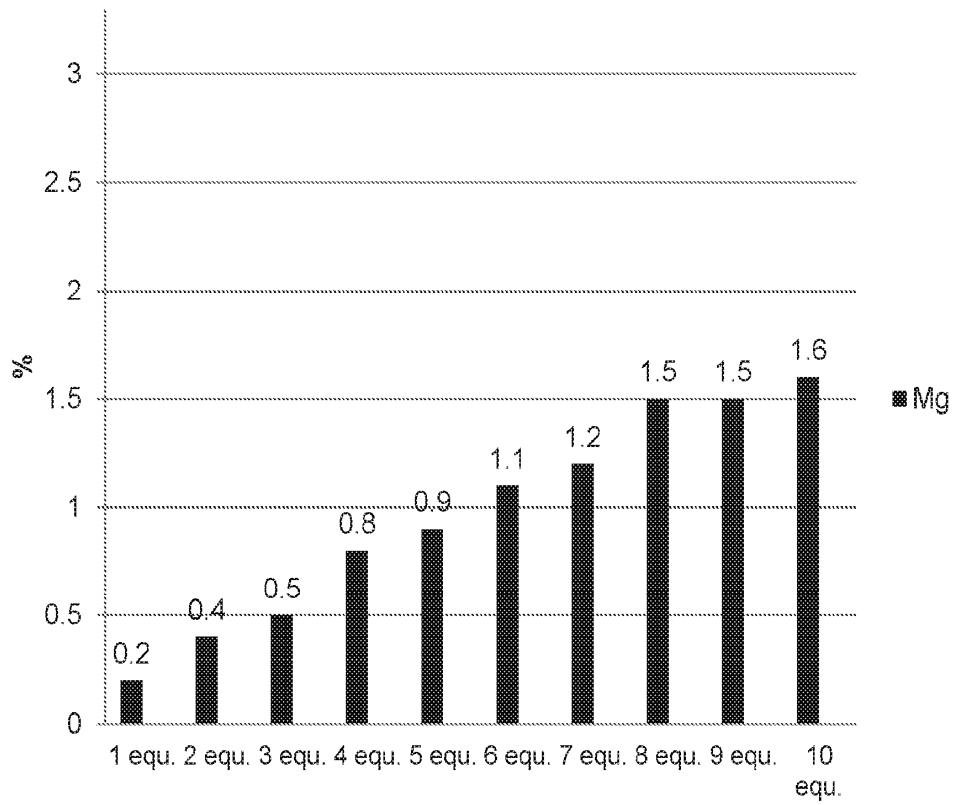


FIG. 4