



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0035738

(51)⁷ C07H 21/00; C12P 19/34; C12N 15/113 (13) B

(21) 1-2017-03780

(22) 21/04/2016

(86) PCT/US2016/028657 21/04/2016

(87) WO2016/172346 27/10/2016

(30) 62/151,891 23/04/2015 US

(45) 25/05/2023 422

(43) 25/12/2017 357A

(73) GERON CORPORATION (US)

919 E. Hillsdale Boulevard, Suite 250, Foster City, California 94404, United States of America

(72) Premchandran H. RAMIYA (US).

(74) Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)

(54) PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ POLYNUCLEOTIT

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp điều chế polynucleotit. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc cho chế phẩm polynucleotit thứ nhất chứa: polynucleotit có trình tự gồm 7, hoặc nhiều hơn, cấu trúc siêu phân tử nucleosit và ít nhất là hai cấu trúc siêu phân tử trong số các cấu trúc siêu phân tử nucleosit này được nối bằng liên kết liên cấu trúc siêu phân tử N3'→P5'thiophosphoramidat; và các chất phản ứng và các sản phẩm tổng hợp không hướng đích; tiếp xúc với muối cation đa hóa trị để làm kết tủa muối polynucleotit chứa ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị; và tách muối polynucleotit ra khỏi chế phẩm polynucleotit thứ nhất đã được tiếp xúc để tạo ra chế phẩm polynucleotit thứ hai chứa muối polynucleotit. Theo các phương án nhất định, phương pháp này còn bao gồm việc cho muối polynucleotit tiếp xúc với nền sắc ký pha đảo; và rửa giải ra khỏi nền sắc ký này chế phẩm polynucleotit thứ ba chứa polynucleotit. Sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa muối của polynucleotit chứa ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị.

Viện dẫn chéo đến đơn có liên quan

Theo khoản 119(e) của bộ luật số 35 của Mỹ, đơn đăng ký sáng chế này yêu cầu hưởng quyền ưu tiên của đơn tạm thời Mỹ số 62/151,891, nộp ngày 23 tháng 4 năm 2015, phần bộc lộ của tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hóa học polyme axit nucleic đã có vai trò nhất định trong nhiều công nghệ phát triển trong các lĩnh vực dược học, chẩn đoán và phân tích, và cụ thể hơn là trong các lĩnh vực phụ về phép trị liệu kháng gen và đối nghĩa, hóa học tổ hợp, phương pháp khuếch đại tín hiệu ADN phân nhánh, và phép phân tích và chẩn đoán ADN dựa trên mảng. Một phần của hóa học polyme này đã được hướng đến việc cải thiện cường độ liên kết, tính đặc hiệu, và tính kháng nucleaza của các polyme axit nucleic tự nhiên, như ADN. Các liên kết liên nucleosit ở peptit axit nucleic (peptide nucleic acid – PNA), phosphorothioat, metylphosphonat và phosphoramidat là các ví dụ về một số tác nhân hóa học polyme mà đã được áp dụng cho các polynucleotit để đem lại một hoặc nhiều thuộc tính thích hợp như tính kháng nucleaza, tính hấp thụ tế bào và độ hòa tan.

Polynucleotit N3'→P5' phosphoramidat có thể tạo nên phức kép ổn định với các sợi ARN và ADN bổ trợ, cũng như tạo nên phức ba ổn định với phức kép ADN, và có tính kháng nucleaza. Đã thấy rằng polynucleotit N3'→P5' thiophosphoramidat được sử dụng làm tác nhân đối nghĩa hiệu nghiệm cả *in vitro* và *in vivo*. Các hợp chất chứa polynucleotit mà ức chế hoạt tính telomeraza có thể được sử dụng để điều trị rối loạn do telomeraza gây ra, như ung thư, vì các tế bào ung thư biểu hiện hoạt tính telomeraza và các tế bào sinh dưỡng bình thường của người không có hoạt tính telomeraza ở các mức thích hợp về mặt sinh học. Do đó, các phương pháp điều chế và phân lập polynucleotit này đang được quan tâm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các khía cạnh của sáng chế bao gồm các phương pháp điều chế polynucleotit. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc cho chế phẩm polynucleotit thứ nhất chứa: polynucleotit có trình tự gồm 7, hoặc nhiều hơn, cấu trúc siêu phân tử nucleosit, trong đó ít nhất là hai cấu trúc siêu phân tử trong số các cấu trúc siêu phân tử nucleosit này được liên kết bằng liên kết liên cấu trúc siêu phân tử N3'→P5' thiophosphoramidat; và các chất phản ứng và các sản phẩm tổng hợp không hướng đích; tiếp xúc với muối của cation đa hóa trị để làm kết tủa muối polynucleotit thứ nhất, chứa ít nhất là một ion đôi cation đa hóa trị; và tách muối polynucleotit ra khỏi chế phẩm polynucleotit thứ nhất đã được tiếp xúc để tạo ra chế phẩm polynucleotit thứ hai chứa muối polynucleotit thứ nhất. Theo các phương án nhất định, phương pháp này còn bao gồm việc cho muối polynucleotit thứ nhất tiếp xúc với nền sắc ký pha đảo; và rửa giải ra khỏi nền sắc ký này chế phẩm polynucleotit thứ ba chứa muối polynucleotit thứ hai. Sáng chế còn đề xuất các chế phẩm chứa muối của polynucleotit, kể cả ít nhất là một ion đôi cation đa hóa trị. Theo một số phương án, ít nhất là một ion đôi cation đa hóa trị được chọn từ nhóm gồm magie, kẽm, nhôm, và canxi.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các hình vẽ được mô tả dưới đây chỉ nhằm mục đích minh họa. Các hình vẽ này không được nhằm để giới hạn phạm vi của nội dung bộc lộ này theo bất kỳ cách nào.

Hình 1 thể hiện các phổ sắc ký lỏng cao áp (HPLC) của Imetelstat-Mg trong dung dịch NaCl 1M ở các độ pH khác nhau.

Hình 2 thể hiện kết quả của phân tích nguyên tố đối với natri Imetelstat đã được xử lý bằng nhiều loại muối khác nhau.

Hình 3 thể hiện kết quả của phân tích nguyên tố đối với natri Imetelstat đã được xử lý bằng muối magie clorua với đương lượng tăng dần.

Hình 4 thể hiện kết quả của phân tích nguyên tố đối với TEA Imetelstat đã được xử lý bằng muối magie clorua với đương lượng tăng dần.

Định nghĩa

Trước khi mô tả một cách chi tiết hơn các phương án làm ví dụ, các định nghĩa dưới đây được nêu ra để minh họa và xác định ý nghĩa và phạm vi của các thuật ngữ được sử dụng trong phần mô tả này.

Các thuật ngữ dưới đây có các ý nghĩa nêu dưới đây trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ bất kỳ không được định nghĩa được hiểu với nghĩa thông thường được công nhận trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các thuật ngữ polynucleotit và oligonucleotit được dùng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này để chỉ hợp chất chứa nhiều cấu trúc siêu phân tử gốc nucleosit hoặc gốc nucleosit mà được liên kết bằng các liên kết liên nucleosit hoặc các liên kết liên nucleosit. Bất cứ khi nào polynucleotit được thể hiện bằng trình tự gồm các chữ cái, như “ATGUCCTG”, thì cần phải hiểu rằng các nucleotit này là theo thứ tự 5'→3' từ trái sang phải và rằng “A” biểu thị deoxyadenosin, “C” biểu thị deoxyxytidin, “G” biểu thị deoxyguanosin, “T” biểu thị thymidin, và “U” biểu thị deoxyuridin, trừ khi được nêu rõ khác.

Thuật ngữ “nucleosit” được dùng trong bản mô tả này bao gồm các nucleosit tự nhiên, kể cả dạng 2'-deoxy và dạng 2'-hydroxyl, ví dụ như được bộc lộ trong tài liệu: Kornberg and Baker, *DNA Replication*, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992). “Các chất đồng đẳng” liên quan đến nucleosit bao gồm các nucleosit tổng hợp chứa gốc bazơ đã được cải biến và/hoặc gốc đường đã được cải biến, ví dụ, được mô tả chung bởi Scheit, *Nucleotides Analogs* (John Wiley, New York, 1980). Các chất đồng đẳng này bao gồm các nucleosit tổng hợp đã được thiết kế để nâng cao các tính chất liên kết, ví dụ, mức độ ổn định, mức độ đặc hiệu, hoặc các tính chất tương tự, như đã được bộc lộ bởi Uhlmann và Peyman (*Chemical Reviews*, 90:543-584, 1990). Theo một số phương án, nucleosit hoặc chất đồng đẳng nucleosit bao gồm nhóm 3'-hydroxyl hoặc nhóm 3'-amin.

Các thuật ngữ “bazơ” và “nucleobazơ” được dùng thay thế lẫn nhau và được định nghĩa trong bản mô tả này bao gồm (i) các bazơ ADN và ARN thông thường (uraxil, thymin, adenin, guanin, và xytosin), và (ii) các bazơ đã được cải biến hoặc các chất tương tự bazơ (ví dụ, 5-metyl-xytosin, 5-bromuraxil, hoặc inosin). Chất

tương tự bazơ là hóa chất mà cấu trúc phân tử của nó giống với cấu trúc phân tử của bazơ thông thường của ADN hoặc ARN.

Thuật ngữ “pyrimidin” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là các pyrimidin xuất hiện ở các nucleosit tự nhiên, kể cả xytosin, thymin, và uraxil, và các chất tương tự thông thường của chúng, như các loại chứa phần tử thế oxy, metyl, propynyl, metoxy, hydroxyl, amin, thio, halo, và các phần tử thế tương tự. Thuật ngữ được dùng trong bản mô tả này còn bao gồm pyrimidin có nhóm bảo vệ thông thường đã được gắn, như N4-benzoylxytosin. Các nhóm bảo vệ pyrimidin khác đang được quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm bảo vệ được bộc lộ trong tài liệu: Beaucage and Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992).

Thuật ngữ “purin” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là các purin xuất hiện trong các nucleosit tự nhiên, kể cả adenin, guanin, và hypoxantin, và các chất tương tự thông thường của chúng, như các loại chứa phần tử thế oxy, metyl, propynyl, metoxy, hydroxyl, amin, thio, halo, và các phần tử thế tương tự. Thuật ngữ được dùng trong bản mô tả này còn bao gồm các purin có nhóm bảo vệ thông thường đã được gắn, như N2-benzoylguanin, N2-isobutyrylguanin, N6-benzoyl-adenin, và các loại tương tự. Các nhóm bảo vệ purin thông thường khác nữa được bộc lộ trong tài liệu: Beaucage and Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992). Thuật ngữ “-đã được bảo vệ-” làm một phần của tên hóa học được dùng trong bản mô tả này để chỉ các nhóm bảo vệ đã được công nhận trong lĩnh vực kỹ thuật đối với một gốc cụ thể của hợp chất, ví dụ “hydroxyl-đã được bảo vệ-5” liên quan đến nucleosit bao gồm triphenylmetyl (tức là, trityl), *p*-anisylđiphenylmetyl (tức là, monometoxytrityl hay MMT), di-*p*-anisylphenylmetyl (tức là, dimetoxyltrityl hay DMT), và các loại tương tự; và một nucleobazơ được bảo vệ liên quan đến nucleobazơ bao gồm nguyên tử khác loại đã được bảo vệ bằng một nhóm như dimethylaminoformamidin (DMF), benzoyl (Bz), isobutyryl, và các loại tương tự. Các nhóm bảo vệ đã được công nhận trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm các loại được mô tả trong các tài liệu tham khảo dưới đây: *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1984) do Gait biên tập; Amarnath and Broom, *Chemical Reviews*, 77:183-217, 1977; Pon *et al.*, *Biotechniques*, 6:768-775, 1988; Ohtsuka *et*

al., *Nucleic Acids Research*, 10:6553-6570, 1982; *Oligonucleotides, and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991) do Eckstein biên tập, Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Second Edition, (John Wiley & Sons, New York, 1991), *Synthesis and Applications of DNA and RNA* (Academic Press, New York, 1987) do Narang biên tập, Beaucage and Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992), và các tài liệu tham khảo tương tự.

Thuật ngữ “polynucleotit N3'→P5' thiophosphoramidat” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là oligome, thường là mạch thẳng, của các cấu trúc siêu phân tử nucleosit được liên kết bằng ít nhất là một dạng liên kết N3'→P5' thiophosphoramidat. Nói chung, các cấu trúc siêu phân tử nucleosit bao gồm các nucleosit hoặc các chất đồng đẳng nucleosit, nhưng cũng có thể bao gồm các gốc tổng quát hơn có tính chất hóa học tương hợp, như đường không bazơ và các gốc hydrocacbon khác, như được mô tả trong các tài liệu tham khảo dưới đây: Newton *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 21: 1155- 1162 (1993); Griffin *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 114: 7976-7982 (1992); Jaschke *et al.*, *Tetrahedron Letters*, 34: 301-304 (1992); Ma *et al.*, đơn quốc tế PCT/CA92/00423; Zon *et al.*, đơn quốc tế PCT/US90/06630; Durand *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 18: 6353-6359 (1990); Salunkhe *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 114: 8768-8772 (1992); và các tài liệu tương tự. Trong một số trường hợp, thuật ngữ này có nghĩa là polynucleotit, trong đó tất cả các liên kết liên nucleosit được thay thế bằng các dạng liên kết N3'→P5' thiophosphoramidat. Do đó, thuật ngữ này bao gồm các oligome “đã được amit hóa” một phần cũng như hoàn toàn. Trong một số trường hợp, thuật ngữ này có nghĩa là polynucleotit, trong đó tất cả các liên kết liên nucleosit được thay thế bằng các dạng liên kết N3'→P5' thiophosphoramidat và trong đó các cấu trúc siêu phân tử nucleosit là các nucleosit tự nhiên hoặc các chất tương tự chúng. Một polynucleotit N3'→P5' thiophosphoramidat đối tượng mà trong đó mọi dạng liên kết là dạng liên kết N3'→P5' thiophosphoramidat (“đã được amit hóa hoàn toàn”) có thể được hợp vào hoặc được gắn kết vào các oligonucleotit hoặc các polynucleotit khác để tạo oligome lớn hơn mà “đã được amit hóa một phần”. Một polynucleotit N3'→P5' thiophosphoramidat theo sáng chế có thể bao gồm các nhóm đầu tận cùng 3' và/hoặc 5' thuận tiện. Theo một số phương án,

polynucleotit N3'→P5' thiophosphoramidat bao gồm nhóm đầu tận cùng 3'-hydroxyl hoặc nhóm đầu tận cùng 3'-amin.

Các thuật ngữ “phosphat” và “nhóm phosphat” được dùng trong bản mô tả này nhằm bao trùm nhóm thiophosphat và nhóm oxophosphat.

Thuật ngữ “nhóm amin phosphoramidit” được dùng trong bản mô tả để chỉ nhóm amin, --NR⁴R⁵, đã được gắn vào nguyên tử phospho của nhóm phosphoramidit, và thuật ngữ “nitơ phosphoramidit” được dùng để chỉ nguyên tử nitơ của nhóm amin phosphoramidit.

Thuật ngữ “alkyl” chỉ các nhóm hydrocarbyl béo bão hòa có hóa trị một gồm từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon và như 1 đến 6 nguyên tử cacbon (ví dụ, “alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon”), hoặc 1 đến 5 (ví dụ, “alkyl có 1 đến 5 nguyên tử cacbon”), hoặc 1 đến 4 (ví dụ, “alkyl có 1 đến 4 nguyên tử cacbon”), hoặc 1 đến 3 nguyên tử cacbon (ví dụ, “alkyl có 1 đến 3 nguyên tử cacbon”). Thuật ngữ này bao gồm, ví dụ, các nhóm hydrocarbyl mạch thẳng và mạch nhánh như metyl (CH₃-), etyl (CH₃CH₂-), n-propyl (CH₃CH₂CH₂-), isopropyl ((CH₃)₂CH-), n-butyl (CH₃CH₂CH₂CH₂-), isobutyl ((CH₃)₂CHCH₂-), sec-butyl ((CH₃)(CH₃CH₂)CH-), t-butyl ((CH₃)₃C-), n-pentyl (CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂-), và neopentyl ((CH₃)₃CCH₂-).

Thuật ngữ “alkyl đã được thế” được dùng để chỉ nhóm alkyl như được định nghĩa trong bản mô tả này, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon trong mạch alkyl đã được thế tùy ý bằng một nguyên tử khác loại như -O-, -N-, -S-, -S(O)_n- (trong đó n bằng 0 đến 2), -NR- (trong đó R là hydro hoặc alkyl) và có từ 1 đến 5 phần tử thế được chọn từ nhóm gồm alkoxy, alkoxy đã được thế, xycloalkyl, xycloalkyl đã được thế, xycloalkenyl, xycloalkenyl đã được thế, axyl, axylamin, axyloxy, amin, aminaxyl, aminaxyloxy, oxyaminaxyl, azido, xyano, halogen, hydroxyl, oxo, thioketo, carboxyl, carboxylalkyl, thioaryloxy, thioheteroaryloxy, thioheteroxyclooxy, thiol, thioalkoxy, thioalkoxy đã được thế, aryl, aryloxy, heteroaryl, heteroaryloxy, heteroxyclyl, heteroxyclooxy, hydroxyamin, alkoxyamin, nitro, -SO-alkyl, -SO- aryl, -SO-heteroaryl, -SO₂-alkyl, -SO₂-aryl, -SO₂- heteroaryl, và -NR^aR^b, trong đó R^a và R^b có thể giống hoặc khác nhau và được chọn từ hydro,

alkyl đã được thế tùy ý, xycloalkyl, alkenyl, xycloalkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl và dạng dị vòng. Trong một số trường hợp, “alkyl được thế” được dùng để chỉ nhóm alkyl như được định nghĩa trong bản mô tả này có từ 1 đến 5 phần tử thế được chọn từ nhóm gồm alkoxy, xycloalkyl, xycloalkenyl, axyl, axylamin, axyloxy, amin, aminaxyl, aminaxyloxy, oxyaminaxyl, azido, xyano, halogen, hydroxyl, carboxyl, carboxylalkyl, thiol, thioalkoxy, aryl, aryloxy, heteroaryl, heteroaryloxy, heteroxyclyl, heteroxyclooxy, sulfonamido, và $-NR^aR^b$, trong đó R^a và R^b có thể giống hoặc khác nhau và được chọn từ hydro, alkyl, xycloalkyl, alkenyl, xycloalkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl và dạng dị vòng.

Thuật ngữ “alkoxy” được dùng để chỉ nhóm $-O$ -alkyl, trong đó alkyl là như được định nghĩa trong bản mô tả này. Alkoxy bao gồm, ví dụ, metoxy, etoxy, n-propoxy, isopropoxy, n-butoxy, t-butoxy, sec-butoxy, n-pentoxy, và các chất tương tự. Thuật ngữ “alkoxy” còn được dùng để chỉ các nhóm alkenyl- O -, xycloalkyl- O -, xycloalkenyl- O -, và alkynyl- O -, trong đó alkenyl, xycloalkyl, xycloalkenyl, và alkynyl là như được định nghĩa trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “alkoxy được thế” được dùng để chỉ nhóm $-O$ -alkyl đã được thế, $-O$ -alkenyl đã được thế, $-O$ -xycloalkyl đã được thế, $-O$ -xycloalkenyl đã được thế, và $-O$ -alkynyl được thế, trong đó alkyl đã được thế, alkenyl đã được thế, xycloalkyl đã được thế, xycloalkenyl đã được thế và alkynyl đã được thế là như được định nghĩa trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “axyl” được dùng để chỉ các nhóm $H-C(O)$ -, alkyl- $C(O)$ -, $-C(O)$ -alkyl đã được thế, alkenyl- $C(O)$ -, $-C(O)$ -alkenyl đã được thế, alkynyl- $C(O)$ -, $-C(O)$ -alkynyl đã được thế, xycloalkyl- $C(O)$ -, $-C(O)$ -xycloalkyl đã được thế, xycloalkenyl- $C(O)$ -, $-C(O)$ -xycloalkenyl đã được thế, aryl- $C(O)$ -, $-C(O)$ -aryl đã được thế, heteroaryl- $C(O)$ -, $-C(O)$ -heteroaryl đã được thế, heteroxyclyl- $C(O)$ -, và $-C(O)$ -heteroxyclyl đã được thế, trong đó alkyl, alkyl đã được thế, alkenyl, alkenyl đã được thế, alkynyl, alkynyl đã được thế, xycloalkyl, xycloalkyl đã được thế, xycloalkenyl, xycloalkenyl đã được thế, aryl, aryl đã được thế, heteroaryl, heteroaryl đã được thế, dạng dị vòng, và dạng dị vòng được thế là như được định nghĩa trong bản mô tả này. Ví dụ, axyl bao gồm nhóm “axetyl” $CH_3C(O)$ -.

Thuật ngữ “amin được thế” được dùng để chỉ nhóm –NRR, trong đó mỗi R được chọn một cách độc lập từ nhóm gồm hydro, alkyl, alkyl đã được thế, xycloalkyl, xycloalkyl đã được thế, alkenyl, alkenyl đã được thế, xycloalkenyl, xycloalkenyl đã được thế, alkynyl, alkynyl đã được thế, aryl, heteroaryl, và heteroxycyl, với điều kiện là ít nhất là một R không phải là hydro.

Các thuật ngữ “halo” hoặc “halogen” được dùng để chỉ flo, clo, brom, và iot.

Các thuật ngữ “hydroxy” hoặc “hydroxyl” được dùng để chỉ nhóm -OH.

Các thuật ngữ “heteroaryl” được dùng để chỉ nhóm thơm có từ 1 đến 15 nguyên tử cacbon, như từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon và 1 đến 10 nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm gồm oxy, nitơ, và lưu huỳnh trong vòng. Các nhóm heteroaryl này có thể có một vòng (như pyridinyl, imidazolyl hoặc furyl) hoặc nhiều vòng ngưng tụ trong hệ vòng (ví dụ, như trong các nhóm như, indolizinyl, quinolinyl, benzofuran, benzimidazolyl hoặc benzothienyl), trong đó ít nhất là một vòng trong hệ vòng là thơm, với điều kiện là điểm gắn kết là thông qua nguyên tử của vòng thơm. Theo các phương án nhất định, (các) nguyên tử lưu huỳnh và/hoặc nitơ trên vòng của nhóm heteroaryl được tùy ý oxy hóa để tạo ra gốc N-oxit ($N \rightarrow O$), sulfinyl, hoặc sulfonyl. Thuật ngữ này bao gồm, ví dụ, pyridinyl, pyrrolyl, indolyl, thiophenyl, và furanyl. Trừ khi bị giới hạn khác bởi định nghĩa đối với phần tử thế heteroaryl, các nhóm heteroaryl này có thể được thế tùy ý bằng 1 đến 5 phần tử thế, hoặc từ 1 đến 3 phần tử thế, được chọn từ axyloxy, hydroxy, thiol, axyl, alkyl, alkoxy, alkenyl, alkynyl, xycloalkyl, xycloalkenyl, alkyl đã được thế, alkoxy đã được thế, alkenyl đã được thế, alkynyl đã được thế, xycloalkyl đã được thế, xycloalkenyl đã được thế, amin, amin được thế, aminaxyl, axylamin, alkaryl, aryl, aryloxy, azido, carboxyl, carboxylalkyl, xyano, halogen, nitro, heteroaryl, heteroaryloxy, heteroxycyl, heteroxycloxy, aminaxyloxy, oxyaxylamin, thioalkoxy, thioalkoxy đã được thế, thioaryloxy, thioheteroaryloxy, -SO-alkyl, -SO-alkyl đã được thế, -SO-aryl, -SO-heteroaryl, -SO₂-alkyl, -SO₂-alkyl đã được thế, -SO₂-aryl và -SO₂-heteroaryl, và trihalometyl. Trong các trường hợp này, nhóm heteroaryl mà được thế bằng từ 1 đến 5 phần tử thế (ví dụ, như được bộc lộ trong bản mô tả này) được gọi là “heteroaryl được thế”.

Các thuật ngữ “dị vòng”, “dạng dị vòng”, “heteroxycloalkyl”, và “heteroxyclyl” được dùng để chỉ nhóm bão hòa hoặc không bão hòa có một vòng đơn lẻ hoặc nhiều vòng ngưng tụ, kể cả các hệ vòng xoắn và được dung hợp bắc cầu, và có từ 3 đến 20 nguyên tử của vòng, kể cả 1 đến 10 nguyên tử khác loại. Các nguyên tử của vòng này được lựa chọn từ nhóm gồm nitơ, lưu huỳnh, hoặc oxy, trong đó, trong các hệ vòng được dung hợp, một hoặc nhiều vòng trong số các vòng này có thể là xycloalkyl, aryl, hoặc heteroaryl, với điều kiện là điểm gắn kết là thông qua vòng không thơm. Theo các phương án nhất định, (các) nguyên tử lưu huỳnh và/hoặc nitơ của nhóm dạng dị vòng được tùy ý oxy hóa để đem lại các gốc N-oxit, -S(O)-, hoặc -SO₂-.

Các ví dụ về các dị vòng và các heteroaryl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, azetidín, pyrol, imidazol, pyrazol, pyridín, pyrazin, pyrimidín, pyridazin, indolizin, isoindol, indol, dihydroindol, indazol, purin, quinolizin, isoquinolin, quinolin, phtalazin, naphthylpyridín, quinoxalin, quinazolin, xinnolin, pteridín, carbazol, carbolin, phenantridín, acridín, phenantrolin, isothiazol, phenazin, isoxazol, phenoxazin, phenothiazin, imidazolidin, imidazolin, piperidin, piperazin, indolin, phtalimit, 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin, 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]-thiophen, thiazol, thiazolidín, thiophen, benzo[b]thiophen, morpholinyl, thiomorpholinyl (còn được gọi là thiamorpholinyl), 1,1-dioxothiomorpholinyl, piperidiny, pyrolidín, tetrahydrofuranyl, và các chất tương tự.

Trừ khi bị giới hạn khác bởi định nghĩa đối với phần tử thế dị vòng, các nhóm dị vòng này có thể được thế tùy ý bằng 1 đến 5, hoặc từ 1 đến 3 phần tử thế, được chọn từ alkoxy, alkoxy đã được thế, xycloalkyl, xycloalkyl đã được thế, xycloalkenyl, xycloalkenyl đã được thế, axyl, axylamin, axyloxy, amin, amin được thế, aminaxyl, aminaxyloxy, oxyaminaxyl, azido, xyano, halogen, hydroxyl, oxo, thioketo, carboxyl, carboxylalkyl, thioaryloxy, thioheteroaryloxy, thioheteroxyclo-oxy, thiol, thioalkoxy, thioalkoxy đã được thế, aryl, aryloxy, heteroaryl, heteroaryl-oxy, heteroxyclyl, heteroxyclooxy, hydroxyamin, alkoxyamin, nitro, -SO-alkyl, -S-O-alkyl đã được thế, -SO-aryl, -SO-heteroaryl, -SO₂-alkyl, -SO₂-alkyl đã được thế, -SO₂-aryl, -SO₂-heteroaryl, và dị vòng đã được dung hợp.

Thuật ngữ “nitro” được dùng để chỉ nhóm $-\text{NO}_2$.

Thuật ngữ “oxo” được dùng để chỉ nguyên tử ($=\text{O}$).

Thuật ngữ “thiol” được dùng để chỉ nhóm $-\text{SH}$.

Thuật ngữ “thioxo” hoặc “thioketo” được dùng để chỉ nguyên tử ($=\text{S}$).

Ngoài nội dung bộc lộ trong bản mô tả này ra, thuật ngữ “được thể”, khi được dùng để bổ nghĩa cho nhóm hoặc gốc chỉ định, còn có thể có nghĩa là một hoặc nhiều nguyên tử hydro thuộc nhóm hoặc gốc chỉ định mà mỗi nguyên tử hydro được thể một cách độc lập với nhau bằng các nhóm phân tử thể giống hoặc khác nhau như được định nghĩa dưới đây.

Ngoài các nhóm được bộc lộ liên quan đến từng thuật ngữ trong bản mô tả này, các nhóm của phân tử thể để thể một hoặc nhiều hydro (hai hydro bất kỳ trên một cacbon có thể được thể bằng $=\text{O}$, $=\text{NR}^{70}$, $=\text{N-OR}^{70}$, $=\text{N}_2$ hoặc $=\text{S}$) ở nhóm hoặc gốc chỉ định, trừ khi được chỉ rõ theo cách khác, $-\text{R}^{60}$, halo, $=\text{O}$, $-\text{OR}^{70}$, $-\text{SR}^{70}$, $-\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, trihalometyl, $-\text{CN}$, $-\text{OCN}$, $-\text{SCN}$, $-\text{NO}$, $-\text{NO}_2$, $=\text{N}_2$, $-\text{N}_3$, $-\text{SO}_2\text{R}^{70}$, $-\text{SO}_2\text{O}^-\text{M}^+$, $-\text{SO}_2\text{OR}^{70}$, $-\text{OSO}_2\text{R}^{70}$, $-\text{OSO}_2\text{O}^-\text{M}^+$, $-\text{OSO}_2\text{OR}^{70}$, $-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)_2(\text{M}^+)_2$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{70})-\text{O}^-\text{M}^+$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{70})_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{70}$, $-\text{C}(\text{S})\text{R}^{70}$, $-\text{C}(\text{NR}^{70})\text{R}^{70}$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}^-\text{M}^+$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{70}$, $-\text{C}(\text{S})\text{OR}^{70}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, $-\text{C}(\text{NR}^{70})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^{70}$, $-\text{OC}(\text{S})\text{R}^{70}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{O}^-\text{M}^+$, $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^{70}$, $-\text{OC}(\text{S})\text{OR}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{O})\text{R}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{S})\text{R}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{CO}_2^-\text{M}^+$, $-\text{NR}^{70}\text{CO}_2\text{R}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{S})\text{OR}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{O})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{NR}^{70})\text{R}^{70}$ và $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{NR}^{70})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, trong đó R^{60} được chọn từ nhóm gồm alkyl, xycloalkyl, heteroalkyl, heteroxycloalkylalkyl, xycloalkylalkyl, aryl, arylalkyl, heteroaryl và heteroarylalkyl được tùy ý thể, mỗi R^{70} độc lập là hydro hoặc R^{60} ; mỗi R^{80} độc lập là R^{70} hoặc theo cách khác, hai R^{80} , cùng với nguyên tử nitơ mà chúng liên kết vào, tạo thành heteroxycloalkyl có 5 cạnh, 6 cạnh hoặc 7 cạnh mà có thể tùy ý bao gồm từ 1 đến 4 nguyên tử trong số các nguyên tử khác loại bổ sung giống hoặc khác nhau được chọn từ nhóm gồm O, N và S, trong số đó N có thể có phân thể $-\text{H}$ hoặc $\text{C}_1\text{-C}_3$ alkyl; và mỗi M^+ là một ion đối có điện tích dương đơn lẻ. Mỗi M^+ có thể độc lập là, ví dụ, một ion kiềm, như K^+ , Na^+ , Li^+ ; một ion amoni, như $^+\text{N}(\text{R}^{60})_4$; hoặc một ion kiềm thổ, như $[\text{Ca}^{2+}]_{0,5}$, $[\text{Mg}^{2+}]_{0,5}$, hoặc $[\text{Ba}^{2+}]_{0,5}$ (“chỉ số dưới 0,5 có nghĩa là một ion trong số

các ion đối cho các ion kiềm thổ có hóa trị hai này có thể ở dạng đã được ion hóa của hợp chất theo sáng chế và ion đối còn lại như clorua, hoặc hai hợp chất đã được ion hóa được bộc lộ trong bản mô tả này có thể làm các ion đối cho các ion kiềm thổ có hóa trị hai này, hoặc một hợp chất đã được ion hóa kép theo sáng chế có thể làm ion đối cho các ion kiềm thổ có hóa trị hai này). Ví dụ cụ thể, $-NR^{80}R^{80}$ nhằm bao gồm $-NH_2$, $-NH$ -alkyl, N -pyrrolidinyl, N -piperazinyl, $4N$ -metyl-piperazin-1-yl và N -morpholinyl.

Ngoài nội dung bộc lộ trong bản mô tả, theo một phương án nhất định, nhóm mà được thế có 1, 2, 3, hoặc 4 phần tử thế, 1, 2, hoặc 3 phần tử thế, 1 hoặc 2 phần tử thế, hoặc 1 phần tử thế.

Cần phải hiểu rằng ở tất cả các nhóm được thế được định nghĩa trên đây, các polyme đạt được bằng cách định nghĩa các phần tử thế bằng các phần tử thế khác cho chính chúng (ví dụ, aryl đã được thế có nhóm aryl đã được thế làm phần tử thế mà chính nó được thế bằng nhóm aryl đã được thế, nhóm này được thế tiếp bằng nhóm aryl đã được thế, v.v.) không nhằm được dự định đến trong bản mô tả này. Trong các trường hợp này, số lần thế như vậy tối đa là ba. Ví dụ, việc thế lần lượt các nhóm aryl đã được thế được dự liệu cụ thể trong bản mô tả này bị giới hạn ở aryl đã được thế-(aryl đã được thế)-aryl đã được thế.

Trừ khi được chỉ rõ theo cách khác, danh pháp của các phần tử thế mà không được định nghĩa rõ trong bản mô tả này có được bằng cách gọi tên phần đầu tận cùng của nhóm chức, tiếp theo là nhóm chức liền kề về phía điểm gắn.

Đối với nhóm bất kỳ trong số các nhóm được bộc lộ trong bản mô tả này mà chứa một hoặc nhiều phần tử thế, tất nhiên cần phải hiểu rằng các nhóm này không chứa phần thế hoặc kiểu hình thế bất kỳ mà không thực tế về mặt hóa học lập thể và/hoặc không khả thi về mặt tổng hợp. Ngoài ra, các hợp chất theo sáng chế bao gồm tất cả các chất đồng phân hóa lập thể phát sinh từ việc thế các hợp chất này.

Thuật ngữ “muối được dụng” có nghĩa là muối mà có thể chấp nhận được để dùng cho bệnh nhân, như động vật có vú (muối có các ion đối có độ an toàn có thể chấp nhận được đối với động vật có vú theo chế độ liều lượng nhất định). Các muối

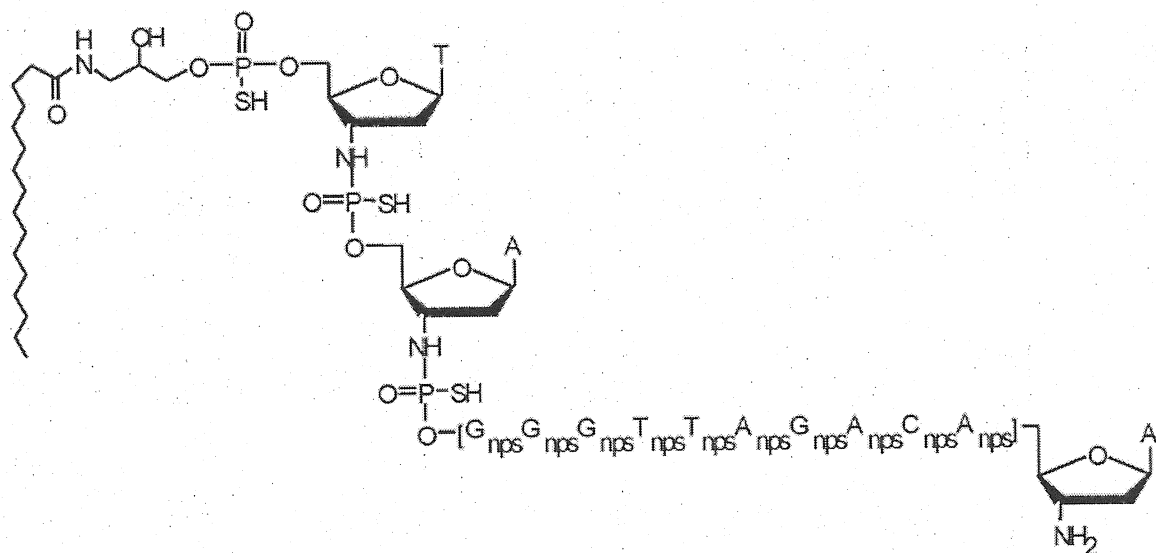
này có thể được tạo ra từ các bazơ hữu cơ hoặc vô cơ được dùng và từ các axit hữu cơ hoặc vô cơ được dùng. Thuật ngữ “muối được dùng” được dùng để chỉ các muối được dùng của hợp chất, các muối này được tạo ra từ các ion đối hữu cơ và vô cơ khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, ví dụ, natri, và các chất tương tự; và khi phân tử này chứa nhóm chức bazơ, các muối của các axit hữu cơ hoặc vô cơ, như hydroclorua, và loại tương tự. Các muối được dùng đang được quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các muối của nhôm, amoni, arginin, bari, benzathin, canxi, cholinat, etylendiamin, lysin, lithi, magie, meglumin, procain, kali, natri, trometamin, N-metylglucamin, N,N'-đibenzyletylen-diamin, cloprocain, di-etanolamin, etanolamin, piperazin, kẽm, diisopropylamin, trietylamin, diisopropyletylamin và trietanolamin.

Thuật ngữ “muối của chúng” có nghĩa là hợp chất được tạo ra khi proton của axit được thay thế bằng cation, như cation kim loại hoặc cation hữu cơ và loại tương tự. Khi khả thi, muối là muối được dùng, mặc dù điều này là không bắt buộc đối với muối của các hợp chất trung gian mà không được dự định để dùng cho bệnh nhân. Ví dụ, muối của các hợp chất theo sáng chế bao gồm các loại, trong đó hợp chất được proton hóa bằng axit hữu cơ hoặc vô cơ để tạo ra cation, với bazơ tiếp hợp của axit hữu cơ hoặc vô cơ làm thành phần anion của muối. Các muối đang được quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các muối của nhôm, amoni, arginin, bari, benzathin, canxi, xesi, cholinat, etylendiamin, lithi, magie, meglumin, procain, N-metylglucamin, piperazin, kali, natri, trometamin, kẽm, N,N'-đibenzyletylen-diamin, cloprocain, dietanolamin, etanolamin, piperazin, diisopropylamin, trietylamin, diisopropyletylamin và trietanolamin. Cần phải hiểu rằng đối với cấu trúc bất kỳ trong số các cấu trúc polynucleotit được bộc lộ trong bản mô tả này mà bao gồm mạch chính của các liên kết liên nucleosit, các polynucleotit này còn có thể bao gồm các dạng muối thuận tiện bất kỳ. Theo một số phương án, các dạng có tính axit của liên kết liên nucleosit được bộc lộ cho đơn giản. Trong một số trường hợp, muối của hợp chất theo sáng chế là muối cation có hóa trị một. Trong các trường hợp nhất định, muối của hợp chất theo sáng chế là muối cation có hóa trị hai. Trong một số trường hợp, muối của hợp chất theo sáng chế là muối cation có hóa trị ba.

Thuật ngữ “solvat” được dùng để chỉ phức được tạo ra bằng cách tổ hợp phân tử dung môi với phân tử hoặc ion của chất tan. Dung môi có thể là hợp chất hữu cơ, hợp chất vô cơ, hoặc hỗn hợp gồm cả hai. Một số ví dụ về dung môi bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metanol, *N,N*-dimetylformamit, tetrahydrofuran, dimethylsulfoxit, và nước. Khi dung môi là nước, thì solvat được tạo ra là hydrat.

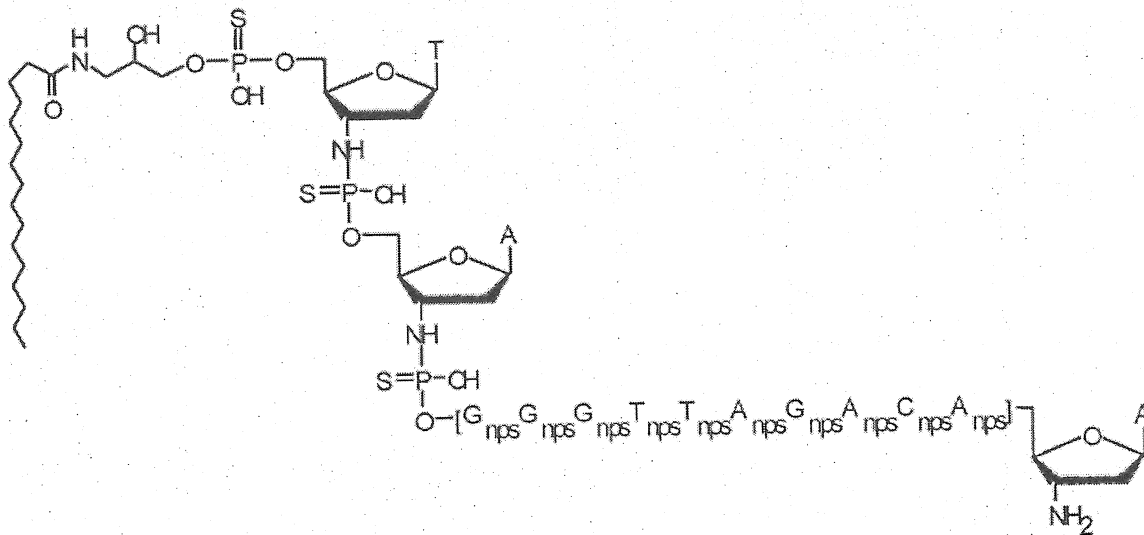
Các thuật ngữ “chất đồng phân lập thể” và “các chất đồng phân lập thể” được dùng để chỉ các hợp chất mà có cùng khả năng kết nối nguyên tử nhưng khác về bố trí nguyên tử trong không gian. Các chất đồng phân lập thể bao gồm các chất đồng phân cis-trans, các chất đồng phân *E* và *Z*, các chất đồng phân đối ảnh, và các chất đồng phân không đối quang.

Thuật ngữ “chất đồng phân hữ biến” được dùng để chỉ các dạng xen kẽ của phân tử mà chỉ khác biệt về sự liên kết điện tử của các nguyên tử và/hoặc về vị trí của proton, như enol-keto và các chất đồng phân hữ biến imin-enamin, -NH-P(=S)(OH)-O- và -NH-P(=O)(SH)-O-, hoặc các dạng đồng phân hữ biến của các nhóm heteroaryl chứa bố trí nguyên tử của vòng -N=C(H)-NH-, như pyrazol, imidazol, benzimidazol, triazol, và tetrazol. Người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận thấy rằng các dạng sắp xếp hữ biến khác của các nhóm được bộc lộ trong bản mô tả này là có thể có. Ví dụ, cần phải hiểu rằng polynucleotit được mô tả bằng cấu trúc dưới đây:



còn bao trùm cả cấu trúc dưới đây thể hiện một dạng bố trí hữ biến xen kẽ có khả

năng của các nhóm liên kết:



trong đó “nps” là liên kết thiophosphoramidat ($-\text{NH}-\text{P}(=\text{O})(\text{SH})-\text{O}-$ hoặc $-\text{NH}-\text{P}(=\text{S})(\text{OH})-\text{O}-$) kết nối cacbon ở vị trí 3' của nucleosit với cacbon ở vị trí 5' của nucleosit liền kề. Cần phải hiểu rằng tất cả các dạng đồng phân hỗn biến của hợp chất theo sáng chế được bao trùm bởi cấu trúc khi một dạng bố trí đồng phân hỗn biến có thể có của nhóm hợp chất được mô tả, ngay cả khi không được thể hiện một cách cụ thể. Dạng bố trí đồng phân hỗn biến thuận tiện bất kỳ của nhóm hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng trong việc mô tả các hợp chất.

Cần hiểu rằng thuật ngữ “hoặc muối hoặc solvat hoặc chất đồng phân lập thể của nó” được dự định bao trùm tất cả các dạng hoán vị của các muối, các solvat và các chất đồng phân lập thể, như solvat của muối được dùng của chất đồng phân lập thể của hợp chất theo sáng chế. Cần phải hiểu rằng thuật ngữ “hoặc muối của nó” được dự định bao trùm tất cả các dạng hoán vị của muối. Cần phải hiểu rằng thuật ngữ “hoặc solvat của nó” được dự định bao trùm tất cả các dạng hoán vị của solvat. Cần phải hiểu rằng thuật ngữ “hoặc chất đồng phân lập thể của nó” được dự định bao trùm tất cả các dạng hoán vị của chất đồng phân lập thể. Cần phải hiểu rằng thuật ngữ “hoặc chất đồng phân hỗn biến của nó” được dự định bao trùm tất cả các dạng hoán vị của chất đồng phân hỗn biến. Do vậy, thuật ngữ này được dự định bao trùm solvat của muối được dùng của chất đồng phân

hỗ biến của chất đồng phân lập thể của hợp chất theo sáng chế.

Thuật ngữ “được phân lập” được dùng trong bản mô tả này với nghĩa mô tả hợp chất đang được quan tâm mà ở môi trường khác với nơi mà hợp chất này xuất hiện một cách tự nhiên. Thuật ngữ “được phân lập” được dùng với nghĩa bao gồm các hợp chất mà trong các mẫu mà về cơ bản được làm giàu với hợp chất đang được quan tâm và/hoặc nơi mà hợp chất đang được quan tâm được tinh chế một phần hoặc về cơ bản được tinh chế.

Thuật ngữ “về cơ bản được tinh chế” được dùng trong bản mô tả này để chỉ hợp chất mà được lấy ra khỏi môi trường tự nhiên của nó và không chứa các hợp phần khác mà nó gắn liền trong tự nhiên ở mức ít nhất là 60%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 81%, ít nhất là 82%, ít nhất là 83%, ít nhất là 84%, ít nhất là 85%, ít nhất là 86%, ít nhất là 87%, ít nhất là 88%, ít nhất là 89%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, không có ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, không có ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, ít nhất là 99%, hoặc không nhiều hơn 99%.

Thuật ngữ “các điều kiện sinh lý” được dùng với nghĩa bao trùm các điều kiện tương thích với tế bào sống, ví dụ, các điều kiện chủ yếu là nước có nhiệt độ, độ pH, độ mặn, v.v. tương thích với tế bào sống.

Khi một khoảng trị số được đề xuất, thì cần phải hiểu rằng mỗi trị số xen giữa, tính đến một phần mười đơn vị của giới hạn dưới, trừ khi có quy định rõ ràng khác, giữa giới hạn trên và giới hạn dưới của khoảng đó và trị số khác được nêu hoặc xen giữa bất kỳ trong khoảng đã nêu, được bao trùm trong phạm vi của sáng chế. Giới hạn trên và giới hạn dưới của khoảng nhỏ hơn này có thể được đưa một cách độc lập vào khoảng nhỏ hơn, và cũng được bao trùm trong phạm vi của sáng chế, phụ thuộc vào giới hạn loại trừ cụ thể bất kỳ trong khoảng đã được nêu này. Khi khoảng được nêu bao gồm một hoặc cả hai giới hạn, thì khoảng loại trừ một trong hai hoặc cả hai giới hạn bao gồm cũng được bao gồm theo sáng chế.

Cần phải lưu ý rằng, các dạng số ít “một” và “nó” được dùng trong bản mô tả này và các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi có quy

định rõ ràng khác. Cần phải lưu ý thêm rằng các điểm yêu cầu bảo hộ có thể được soạn thảo để loại trừ yếu tố tùy ý bất kỳ. Do vậy, cách trình bày này được dự định làm cơ sở tiền đề cho việc sử dụng thuật ngữ có tính loại trừ như “chỉ riêng”, “chỉ” và các thuật ngữ tương tự liên quan đến việc liệt kê các yếu tố của điểm yêu cầu bảo hộ, hoặc việc sử dụng giới hạn “phủ định”.

Các định nghĩa khác của các thuật ngữ có thể xuất hiện trong bản mô tả.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Như được tóm tắt trên đây, các khía cạnh theo sáng chế bao gồm các phương pháp điều chế polynucleotit. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc cho chế phẩm polynucleotit thứ nhất chứa: polynucleotit có trình tự gồm 7 cấu trúc siêu phân tử nucleosit, hoặc nhiều hơn, trong đó ít nhất là hai cấu trúc siêu phân tử trong số các cấu trúc siêu phân tử nucleosit này được kết nối bằng liên kết liên cấu trúc siêu phân tử N3'→P5'thiophosphoramidat; và các chất phản ứng và các sản phẩm tổng hợp không hướng đích; tiếp xúc với muối cation đa hóa trị để làm kết tủa muối polynucleotit thứ nhất chứa ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị; và tách muối polynucleotit thứ nhất khỏi chế phẩm polynucleotit thứ nhất đã được tiếp xúc để tạo ra chế phẩm polynucleotit thứ hai chứa muối polynucleotit thứ nhất. Theo các phương án nhất định, phương pháp này còn bao gồm việc cho muối polynucleotit tiếp xúc với nền sắc ký pha đảo; và rửa giải khỏi nền sắc ký này chế phẩm polynucleotit thứ ba kể cả polynucleotit. Trong một số trường hợp, chế phẩm polynucleotit thứ ba chứa muối polynucleotit thứ hai. Sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa muối của polynucleotit gồm ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị. Theo một số phương án, ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị được chọn từ nhóm gồm magie, kẽm, nhôm, và canxi.

Trước khi mô tả các phương án khác nhau, cần phải hiểu rằng nội dung bộc lộ của bản mô tả này không bị giới hạn ở các phương án cụ thể được mô tả, và do vậy, tất nhiên có thể thay đổi. Cũng cần phải hiểu rằng các thuật ngữ được dùng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không được

dự định giới hạn, vì phạm vi của nội dung bộc lộ sẽ chỉ bị giới hạn bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Các đề mục được dùng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích bố cục và không nên hiểu là giới hạn đối tượng được mô tả theo cách bất kỳ. Trong khi nội dung bộc lộ được mô tả cùng với các phương án khác nhau, không dự định rằng nội dung bộc lộ này bị giới hạn ở các phương án đó. Trái lại, nội dung bộc lộ này bao trùm các lựa chọn thay thế, các cải biến, và các phương án tương đương khác nhau, mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu được.

Trừ khi được định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được dùng trong bản mô tả này có cùng ý nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Mặc dù các phương pháp và chất liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với loại được bộc lộ trong bản mô tả này cũng có thể được sử dụng trong việc thực hiện hoặc thử nghiệm sáng chế, các phương pháp và chất liệu đang được quan tâm nay được bộc lộ. Tất cả các công bố được đề cập trong bản mô tả này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn để bộc lộ và mô tả các phương pháp và/hoặc chất liệu mà liên quan đến các công bố đã được trích dẫn.

Việc trích dẫn công bố bất kỳ là để bộc lộ nó trước ngày nộp đơn và không nên hiểu là sự thừa nhận rằng các điểm yêu cầu bảo hộ không được hưởng quyền trước công bố đó vì sáng chế trước. Hơn nữa, ngày công bố được nêu có thể khác với ngày công bố thực tế mà có thể được xác nhận một cách độc lập.

Đã thấy rằng các dấu hiệu nhất định của sáng chế, mà dễ rõ ràng, được bộc lộ trong ngữ cảnh của các phương án riêng rẽ, cũng có thể được đề xuất kết hợp trong một phương án. Ngược lại, nhiều dấu hiệu khác nhau của sáng chế, mà, để ngắn gọn, được bộc lộ trong ngữ cảnh của một phương án, cũng có thể được đề xuất riêng rẽ hoặc ở dạng tổ hợp con thích hợp bất kỳ. Tất cả các dạng tổ hợp của các phương án theo sáng chế được bao trùm một cách cụ thể theo sáng chế và được bộc lộ trong bản mô tả này như là mỗi và từng tổ hợp được bộc lộ một cách riêng rẽ và tách biệt, đến mức các tổ hợp này bao trùm đối tượng mà, ví dụ, là các hợp chất mà là các hợp chất ổn định (tức là, các hợp chất mà có thể được tạo ra, được phân lập, được xác

định đặc tính, và được thử nghiệm về hoạt tính sinh học). Ngoài ra, tất cả tổ hợp con của các phương án khác nhau và các thành phần của chúng (ví dụ, các thành phần của các nhóm hóa chất đã được liệt kê trong các phương án mô tả các biến số này) cũng được bao trùm một cách cụ thể theo sáng chế và được bộc lộ trong bản mô tả này như thể mỗi và từng tổ hợp con này đã được bộc lộ cụ thể và riêng biệt trong bản mô tả này.

Tất cả các patent và các công bố, kể cả các trình tự được bộc lộ trong các patent và các công bố này, được viện dẫn trong bản mô tả này, rõ ràng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Để mô tả chi tiết sáng chế, trước hết các phương pháp điều chế polynucleotit được mô tả một cách chi tiết hơn. Tiếp theo, các chế phẩm polynucleotit đang được quan tâm để thực hiện các phương pháp theo sáng chế được tìm hiểu.

Các phương pháp điều chế

Các khía cạnh theo sáng chế bao gồm các phương pháp điều chế polynucleotit. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc cho chế phẩm polynucleotit thứ nhất chứa polynucleotit (ví dụ, như được bộc lộ trong bản mô tả này) và các tác nhân và các sản phẩm tổng hợp không hướng đích, tiếp xúc với muối cation đa hóa trị để làm kết tủa muối polynucleotit chứa ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị. Việc làm kết tủa muối polynucleotit bằng cách áp dụng phương pháp theo sáng chế khiến loại bỏ tất cả các tác nhân và các sản phẩm tổng hợp không hướng đích dễ hòa tan. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc tách muối polynucleotit ra khỏi chế phẩm polynucleotit thứ nhất đã được tiếp xúc để tạo ra chế phẩm polynucleotit thứ hai chứa muối polynucleotit. Theo các phương án nhất định, mỗi loại trong số chế phẩm polynucleotit thứ nhất, muối polynucleotit và chế phẩm polynucleotit thứ hai đều bao gồm polynucleotit hướng đích có trình tự gồm 7 cấu trúc siêu phân tử nucleosit, hoặc nhiều hơn, trong đó ít nhất là hai cấu trúc siêu phân tử trong số các cấu trúc siêu phân tử nucleosit này được liên kết bằng liên kết liên cấu trúc siêu phân tử $N3' \rightarrow P5'$ thiophosphoramidat (ví dụ, như được bộc lộ trong

bản mô tả này).

Chế phẩm polynucleotit thứ hai có thể chứa tác nhân và sản phẩm tổng hợp không hướng đích với lượng ít hơn so với chế phẩm polynucleotit thứ nhất. Lượng tác nhân và sản phẩm tổng hợp không hướng đích ít hơn có nghĩa là giảm trọng lượng 10% hoặc nhiều hơn tính theo trọng lượng của tác nhân và sản phẩm tổng hợp không hướng đích ở chế phẩm polynucleotit thứ hai so với chế phẩm polynucleotit thứ nhất, như giảm 15% hoặc nhiều hơn theo trọng lượng, giảm 20% hoặc nhiều hơn theo trọng lượng, giảm 25% hoặc nhiều hơn theo trọng lượng, giảm 30% hoặc nhiều hơn theo trọng lượng, giảm 35% hoặc nhiều hơn theo trọng lượng, giảm 40% hoặc nhiều hơn theo trọng lượng, giảm 45% hoặc nhiều hơn theo trọng lượng, giảm 50% hoặc nhiều hơn theo trọng lượng, giảm 55% hoặc nhiều hơn theo trọng lượng, giảm 60% hoặc nhiều hơn theo trọng lượng, giảm 65% hoặc nhiều hơn theo trọng lượng, giảm 70% hoặc nhiều hơn theo trọng lượng, giảm 75% hoặc nhiều hơn theo trọng lượng, giảm 80% hoặc nhiều hơn theo trọng lượng, giảm 85% hoặc nhiều hơn theo trọng lượng, giảm 90% hoặc nhiều hơn theo trọng lượng, hoặc giảm 95% hoặc nhiều hơn theo trọng lượng. Do vậy, các phương pháp theo sáng chế có thể gây kết tủa chọn lọc polynucleotit hướng đích so với tác nhân và sản phẩm tổng hợp không hướng đích. Theo các phương án nhất định, các phương pháp theo sáng chế khiến tăng mức độ chọn lọc của quá trình kết tủa so với phương pháp đối chứng làm kết tủa polynucleotit bằng cách sử dụng dung môi hữu cơ, như etanol nguyên chất hoặc dung dịch etanol (ví dụ, xem tài liệu: Crouse J, Amorese D (1987). "*Ethanol Precipitation: Ammonium Acetate as an Alternative to Sodium Acetate*". Focus 9 (2): 3-5). Mức độ chọn lọc cao hơn ở quá trình kết tủa nghĩa là 5% trọng lượng tác nhân và sản phẩm tổng hợp không hướng đích, hoặc nhiều hơn, được loại ra khỏi chế phẩm polynucleotit thứ hai so với chế phẩm đối chứng, như 10% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 15% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 20% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 25% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 30% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 35% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 40% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 45% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 50% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 55% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 60% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 65% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 70% trọng lượng hoặc nhiều hơn,

75% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 80% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 85% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 90% trọng lượng hoặc nhiều hơn, hoặc 95% trọng lượng hoặc nhiều hơn, các tác nhân và các sản phẩm tổng hợp không hướng đích được loại bỏ. Lượng giảm của các tác nhân và các sản phẩm tổng hợp không hướng đích so với chế phẩm polynucleotit thứ nhất có thể được xác định bằng cách áp dụng các phương pháp thuận tiện bất kỳ, ví dụ, bằng cách áp dụng phương pháp HPLC.

Các thuật ngữ “polynucleotit tổng hợp hướng đích” và “polynucleotit hướng đích” được dùng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này để chỉ polynucleotit có trình tự nucleotit mong muốn cụ thể mà được tổng hợp trên nền theo phương pháp tổng hợp polynucleotit pha rắn từng bước thuận tiện bất kỳ (ví dụ, như được bộc lộ trong bản mô tả này), và khi polynucleotit không có nhóm bảo vệ bất kỳ mà được sử dụng chỉ nhằm mục đích thực thi chiến lược tổng hợp polynucleotit hướng đích. Các nhóm bảo vệ này có thể được loại ra khỏi polynucleotit ở các bước cuối cùng của phương pháp tổng hợp pha rắn, ví dụ, trong quá trình khử bảo vệ cuối cùng và phân cắt polynucleotit ra khỏi nền để tạo ra polynucleotit hướng đích. Thuật ngữ “không hướng đích” được dùng trong bản mô tả này để chỉ thành phần thuận tiện bất kỳ, ví dụ, hợp chất, polynucleotit hoặc dẫn xuất của nó, tác nhân, v.v., hoặc các hỗn hợp của chúng mà không phải là sản phẩm hướng đích mong muốn của phương pháp tổng hợp.

Polynucleotit hướng đích có thể bao gồm số lượng cấu trúc siêu phân tử nucleosit thuận tiện bất kỳ, như từ 7 đến 500 cấu trúc siêu phân tử nucleosit, từ 7 đến 100 cấu trúc siêu phân tử nucleosit, từ 7 đến 75 cấu trúc siêu phân tử nucleosit, từ 7 đến 50 cấu trúc siêu phân tử nucleosit, từ 7 đến 40 cấu trúc siêu phân tử nucleosit, từ 7 đến 30 cấu trúc siêu phân tử nucleosit, từ 7 đến 20 cấu trúc siêu phân tử nucleosit, từ 7 đến 15 cấu trúc siêu phân tử nucleosit, từ 10 đến 15 cấu trúc siêu phân tử nucleosit, hoặc từ 13 đến 15 cấu trúc siêu phân tử nucleosit. Trong một số trường hợp, polynucleotit hướng đích có từ 7 đến 100 cấu trúc siêu phân tử nucleosit, như từ 7 đến 50 cấu trúc siêu phân tử nucleosit, từ 10 đến 50 cấu trúc siêu phân tử nucleosit, từ 10 đến 40 cấu trúc siêu phân tử nucleosit, từ 10 đến 30 cấu trúc siêu phân tử nucleosit, từ 10 đến 25 cấu trúc siêu phân tử nucleosit, từ 10 đến 20 cấu trúc

siêu phân tử nucleosit, từ 12 đến 18 cấu trúc siêu phân tử nucleosit, hoặc từ 12 đến 16 cấu trúc siêu phân tử nucleosit. Trong các trường hợp nhất định, polynucleotit hướng đích có 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 hoặc 25 cấu trúc siêu phân tử nucleosit.

Thuật ngữ “tác nhân và sản phẩm tổng hợp không hướng đích” được dùng trong bản mô tả này để chỉ chung một loạt thành phần không hướng đích mà có thể có mặt trong sản phẩm tổng hợp thô theo phương pháp tổng hợp polynucleotit pha rắn, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: các sản phẩm polynucleotit không hướng đích theo phương pháp tổng hợp, như các polynucleotit cắt, các đoạn polynucleotit bị chóp (tức là, các trình tự mà được bị chop sau khi liên hợp cấu trúc siêu phân tử không thành), các polynucleotit bao gồm xóa bỏ (tức là, thiếu một hoặc nhiều monome hoặc đime nucleosit hướng đích, ví dụ, như được bộc lộ trong bản mô tả này) và các polynucleotit được tạo dẫn xuất (ví dụ, các trình tự polynucleotit mà trải qua phản ứng phụ không mong muốn trong quá trình tổng hợp hoặc phân cắt); và các tác nhân như gốc liên kết đã được phân cắt, sản phẩm của quá trình khử bảo vệ, ví dụ, các sản phẩm đã bị loại bỏ nhóm bảo vệ như sản phẩm có nhóm bảo vệ phospho và sản phẩm có nhóm bảo vệ bazơ (ví dụ, sản phẩm có nhóm bảo vệ amin ngoài vòng), chất phản ứng của quá trình phân cắt và/hoặc chất tẩy tạp của quá trình phân cắt và chất phản ứng tổng hợp tồn dư, như monome, đime, chất phản ứng của các quá trình liên hợp, bị chóp hoặc khử bảo vệ.

Theo các phương án nhất định, các phương pháp gây kết tủa chọn lọc polynucleotit hướng đích so với các tác nhân và các sản phẩm tổng hợp không hướng đích mà bao gồm các polynucleotit có 6 cấu trúc siêu phân tử nucleosit hoặc ít hơn, như 5 cấu trúc siêu phân tử nucleosit hoặc ít hơn, 4 cấu trúc siêu phân tử nucleosit hoặc ít hơn, 3 cấu trúc siêu phân tử nucleosit hoặc ít hơn hoặc 2 cấu trúc siêu phân tử nucleosit hoặc ít hơn. Trong các trường hợp nhất định, tất cả các tác nhân và các sản phẩm tổng hợp không hướng đích mà không là polynucleotit vẫn dễ hòa tan ở bước kết tủa chọn lọc của phương pháp theo sáng chế, và vì vậy có thể được loại bỏ một cách dễ dàng khỏi chất kết tủa muối polynucleotit thu được.

Các phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm việc làm kết tủa và tách

polynucleotit hướng đích khỏi chế phẩm tổng hợp thô để tạo ra chế phẩm polynucleotit mà có một vài tính chất mong muốn, như giảm lượng tác nhân và sản phẩm tổng hợp không hướng đích (ví dụ, chất phản ứng của quá trình tổng hợp, chất phản ứng của quá trình phân cắt, chất tẩy tạp, nhóm bảo vệ được loại bỏ, sản phẩm phụ của quá trình phân cắt (gốc liên kết, nhóm bít chóp, v.v.), và đoạn polynucleotit nhỏ).

Theo một số phương án, phương pháp theo sáng chế bao gồm việc làm kết tủa polynucleotit ra khỏi chế phẩm tổng hợp thô làm muối cation đa hóa trị trước khi tinh chế sắc ký. Trong các trường hợp nhất định, các phương pháp theo sáng chế là phương pháp tinh chế polynucleotit hướng đích. Việc làm kết tủa chế phẩm polynucleotit thô bằng cách sử dụng muối cation đa hóa trị tạo ra chất kết tủa muối polynucleotit chứa ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị. Trong một số trường hợp, chất kết tủa muối polynucleotit bao gồm hỗn hợp gồm các ion đối cation có hóa trị một và đa hóa trị mà tạo cặp ion với mạch chính polynucleotit polyanion. Các thuật ngữ “muối cation đa hóa trị” và “muối đa hóa trị” được dùng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này liên quan đến polynucleotit để chỉ muối polynucleotit mà bao gồm ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị mà ghép cặp ion với nhóm liên kết liên cấu trúc siêu phân tử anion của mạch chính polynucleotit. Trong một số trường hợp, muối cation đa hóa trị của polynucleotit bao gồm hỗn hợp gồm cation hóa trị một và cation đa hóa trị. Theo một số phương án, cation đa hóa trị có thể gây kết tụ polynucleotit hướng đích bằng cách ghép cặp ion với các nhóm liên kết liên cấu trúc siêu phân tử anion của hai hoặc nhiều mạch chính polynucleotit. Trong các trường hợp nhất định, ion cation có hóa trị hai ghép cặp với hai polynucleotit khác biệt để tạo dime. Trong một số trường hợp, có thể kết tụ thêm polynucleotit nhờ các tương tác đa hóa trị bổ sung gián tiếp nhờ các cation đa hóa trị bổ sung. Như vậy, trong một số trường hợp, các phương pháp theo sáng chế có thể gây kết tụ chọn lọc và làm kết tủa polynucleotit hướng đích so với các tác nhân và các sản phẩm tổng hợp không hướng đích.

Theo một số phương án của phương pháp này, ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị có hóa trị hai. Theo các phương án nhất định, ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị được chọn từ nhóm gồm magie, kẽm và canxi. Theo một số phương án, ít

nhất là một ion đối cation đa hóa trị có hóa trị ba. Theo các phương án nhất định, ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị là nhôm. Theo một số phương án, muối polynucleotit còn bao gồm ion đối cation có hóa trị một. Trong các trường hợp này, muối polynucleotit là muối hỗn hợp, ví dụ, muối gồm hai ion đối cation khác nhau trở lên.

Phương pháp thuận tiện bất kỳ làm kết tủa polynucleotit có thể được áp dụng ở các phương pháp theo sáng chế. Bước cho chế phẩm polynucleotit thứ nhất tiếp xúc với muối cation đa hóa trị để làm kết tủa muối polynucleotit kể cả ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị có thể được thực hiện bằng cách áp dụng các phương pháp thuận tiện bất kỳ. Các cation đa hóa trị thuận tiện bất kỳ và các muối của chúng (ví dụ, như được bộc lộ trong bản mô tả này) có thể được áp dụng ở bước cho tiếp xúc để tạo ra chất kết tủa. Trong các trường hợp nhất định, muối của polynucleotit bao gồm ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị được tạo ra trong pha dung dịch, ví dụ, thông qua việc bổ sung muối cation đa hóa trị vào dung dịch chứa polynucleotit. Sau khi muối cation đa hóa trị đã được bổ sung vào dung dịch, thì lúc đó chất kết tủa có thể hình thành. Trong một số trường hợp, muối của polynucleotit chứa ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị có thể được tạo ra trên nền trao đổi ion. Các nền trao đổi ion thuận tiện bất kỳ có thể được sử dụng ở bước cho tiếp xúc. Trong một số trường hợp, nền trao đổi ion là nhựa trao đổi cation mạnh. Theo một số phương án của phương pháp này, bước cho tiếp xúc bao gồm việc rửa giải chế phẩm polynucleotit thứ nhất ra khỏi nền trao đổi cation mà bao gồm các ion đối cation đa hóa trị. Thuật ngữ “nền trao đổi cation” được dùng trong bản mô tả này để chỉ nền mà chính là anion và có khả năng ghép cặp ion với chất phân tích cation, như cation đa hóa trị đang được quan tâm. Dung môi rửa giải thuận tiện bất kỳ có thể được sử dụng cho bước rửa giải ra khỏi nền trao đổi cation. Trong một số trường hợp, chất kết tủa hình thành ở sản phẩm rửa giải sau khi muối polynucleotit đã được rửa giải ra khỏi nền trao đổi cation.

Các phương pháp theo sáng chế có thể được thực hiện trên chế phẩm tổng hợp thô thuận tiện bất kỳ chứa polynucleotit tổng hợp hướng đích. Trong một số trường hợp, chế phẩm polynucleotit thứ nhất là chế phẩm tổng hợp thô chứa polynucleotit

tổng hợp hướng đích. Theo các phương án nhất định, chế phẩm polynucleotit thứ nhất là chế phẩm mà là sản phẩm phân cắt của một polynucleotit hướng đích ra khỏi nền, sau khi tổng hợp. Như vậy, chế phẩm polynucleotit thứ nhất có thể bao gồm một loạt tác nhân và sản phẩm tổng hợp không hướng đích. Các phương pháp theo sáng chế làm kết tủa chọn lọc muối polynucleotit so với các tác nhân và các sản phẩm tổng hợp không hướng đích, phần này vẫn còn trong dung dịch, và vì vậy có thể được loại bỏ một cách dễ dàng ra khỏi chất kết tủa thu được.

Các phương pháp tổng hợp thuận tiện bất kỳ (ví dụ, như được bộc lộ trong bản mô tả này) có thể được áp dụng để tổng hợp polynucleotit hướng đích. Sau quá trình tổng hợp, polynucleotit hướng đích được phân cắt ra khỏi nền mà trên đó thực hiện quá trình tổng hợp từng bước. Sau khi phân cắt, polynucleotit hướng đích có chiều dài đầy đủ có thể được tinh chế để loại bỏ các chất phản ứng không mong muốn của quá trình phân cắt và tổng hợp và để loại bỏ các đoạn polynucleotit không hướng đích, và các chất dẫn xuất của chúng. Các phương pháp theo sáng chế bao gồm việc làm kết tủa muối polynucleotit chứa ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị có thể được thực hiện ở giai đoạn thuận tiện bất kỳ của quá trình điều chế polynucleotit hướng đích, như sau khi tổng hợp và trước khi tinh chế sắc ký pha đảo.

Các thuật ngữ “chế phẩm tổng hợp thô”, “chế phẩm thô” và “polynucleotit thô” được dùng trong bản mô tả này để chỉ chế phẩm bao gồm các sản phẩm tổng hợp của quy trình tổng hợp polynucleotit pha rắn mà được thu gom sau khi tổng hợp thông qua việc phân cắt ra khỏi nền tổng hợp pha rắn, trong đó chế phẩm này không được tinh chế, tức là quá trình tinh chế sắc ký không được thực hiện trên chế phẩm này. Thuật ngữ tinh chế sắc ký được dùng để chỉ phương pháp tinh chế thuận tiện bất kỳ mà bao gồm việc làm hấp thụ polynucleotit hướng đích vào nền sắc ký và tiếp đó rửa giải và phân giải polynucleotit hướng đích ra khỏi polynucleotit không hướng đích. Trong một số trường hợp, thuật ngữ tinh chế sắc ký được dùng để chỉ quá trình tinh chế sắc ký pha đảo.

Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc tạo ra chế phẩm polynucleotit thứ nhất, trong đó chế phẩm này được tạo ra theo quy trình phân cắt sau khi tổng hợp khỏi nền tổng hợp pha rắn. Các bước bổ sung thuận tiện bất kỳ như

các bước làm bay hơi, pha loãng hoặc cô đặc cũng có thể được thực hiện đối với chế phẩm tổng hợp thô trước khi sử dụng chế phẩm thu được theo phương pháp theo sáng chế. Trong một số trường hợp, phương pháp này còn bao gồm việc tổng hợp polynucleotit hướng đích (ví dụ, như được bộc lộ trong bản mô tả này trên nền tổng hợp pha rắn). Theo các phương án nhất định, phương pháp này còn bao gồm việc phân cắt polynucleotit ra khỏi nền để tạo ra chế phẩm polynucleotit thứ nhất.

Chất kết tủa rắn chứa muối polynucleotit có thể được tách ra khỏi chế phẩm polynucleotit thứ nhất mà được cho tiếp xúc với muối đa hóa trị (tức là, chế phẩm polynucleotit thứ nhất đã được cho tiếp xúc) bằng cách áp dụng phương pháp thuận tiện bất kỳ. Các phương pháp tách đang được quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp ly tâm, lọc, gạn lọc, và các phương pháp tương tự.

Trong một số trường hợp, việc tách chất kết tủa bao gồm muối polynucleotit được thực hiện bằng cách ly tâm khi áp dụng lực ly tâm cho chế phẩm polynucleotit thứ nhất đã được cho tiếp xúc, ví dụ, trong máy ly tâm, khiến chất kết tủa tạo thành viên kết, ví dụ, ở đáy của vật chứa. Sự hình thành viên kết nhờ ly tâm có thể được gọi là quay lắng chất kết tủa. Theo các phương án nhất định của phương pháp này, bước tách bao gồm việc ly tâm chế phẩm polynucleotit thứ nhất đã được tiếp xúc để quay lắng chất kết tủa muối polynucleotit. Sau đó, dịch nổi có thể được gạn lọc ra khỏi ống nghiệm mà không làm xáo trộn chất kết tủa, hoặc được rút khỏi vật chứa, ví dụ, bằng ống hút Pasteur. Quy trình ly tâm có thể được lặp lại với dung dịch rửa.

Trong một số trường hợp, việc tách chất kết tủa chứa cả muối polynucleotit đạt được bằng cách lọc. Theo một số phương án của phương pháp này, bước tách bao gồm việc lọc muối polynucleotit ra khỏi polynucleotit thứ nhất đã được cho tiếp xúc. Có thể sử dụng bộ lọc và môi trường lọc thuận tiện bất kỳ ở các phương pháp theo sáng chế. Trong các trường hợp nhất định, việc tách đạt được theo cách lọc sâu bằng cách sử dụng môi trường lọc mà được lựa chọn theo polynucleotit hướng đích.

Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm: việc cho chế phẩm polynucleotit thứ nhất chứa: polynucleotit có trình tự gồm 7 cấu trúc siêu phân tử nucleosit hoặc nhiều hơn và ít nhất là hai cấu trúc siêu phân tử trong số này được

nổi bằng liên kết liên cấu trúc siêu phân tử $N3' \rightarrow P5'$ thiophosphoramidat; và tác nhân và sản phẩm tổng hợp không hướng đích;

tiếp xúc với muối cation đa hóa trị để làm kết tủa muối polynucleotit thứ nhất chứa ít nhất là một ion đôi cation đa hóa trị; và

tách muối polynucleotit thứ nhất ra khỏi chế phẩm polynucleotit thứ nhất đã được tiếp xúc để tạo ra chế phẩm polynucleotit thứ hai chứa muối polynucleotit.

Việc tách chất kết tủa ra khỏi chế phẩm polynucleotit thứ nhất đã được tiếp xúc tạo ra chế phẩm polynucleotit thứ hai chứa muối polynucleotit thứ nhất. Trong một số trường hợp, việc làm kết tủa chọn lọc muối polynucleotit thứ nhất bằng cách sử dụng muối cation đa hóa trị thông qua các phương pháp theo sáng chế tạo ra chế phẩm polynucleotit thứ hai mà chứa tác nhân và sản phẩm tổng hợp không hướng đích với lượng giảm.

Sau khi làm kết tủa chọn lọc, muối polynucleotit theo sáng chế lúc đó có thể được chuyển hóa thành muối polynucleotit dễ hòa tan bằng cách trao đổi cation ít nhất là một ion đôi cation đa hóa trị cách xa polynucleotit và thay thế bằng một ion đôi cation khác đang được quan tâm (ví dụ, như được bộc lộ trong bản mô tả này). Như vậy, các phương pháp theo sáng chế gây hình thành một cách thuận nghịch muối polynucleotit thứ nhất chứa ít nhất là một ion đôi cation đa hóa trị. Các thuật ngữ “hình thành thuận nghịch” và “trao đổi thuận nghịch” được dùng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này và nhằm để chỉ quá trình điều chế muối polynucleotit, ví dụ, bằng cách kết tủa chọn lọc (ví dụ, như được bộc lộ trong bản mô tả này), trong đó muối đã được hình thành, tiếp đó cũng có thể được làm phân ly để trao đổi ít nhất là một muối cation đa hóa trị ra khỏi muối này. Trong một số trường hợp, muối polynucleotit mà không dễ hòa tan trong dung môi bất kỳ có thể được gọi là muối đã được tạo ra một cách thuận nghịch. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc trao đổi ít nhất là một ion đôi cation đa hóa trị cách xa với muối polynucleotit thứ nhất để tạo ra muối polynucleotit dễ hòa tan thứ hai, trong đó việc trao đổi bao gồm việc phân ly ion đôi cation đa hóa trị và ghép cặp ion với muối cation dễ hòa tan đang được quan tâm. Trong các trường hợp nhất định, muối

polynucleotit dễ hòa tan thứ hai là muối có hóa trị một. Trong các trường hợp nhất định, muối polynucleotit dễ hòa tan thứ hai là muối natri. Trong các trường hợp nhất định, muối polynucleotit dễ hòa tan thứ hai là muối triethylamoni. Trong một số trường hợp, polynucleotit thứ nhất và thứ hai là khác biệt với nhau, tức là, bao gồm các ion đối cation khác nhau. Việc phân ly các muối polynucleotit theo sáng chế và trao đổi ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị có thể đạt được bằng cách áp dụng các phương pháp thuận tiện bất kỳ. Trong các trường hợp nhất định, việc phân ly đạt được bằng cách áp dụng sắc ký pha đảo, ví dụ, như được bộc lộ trong bản mô tả này. Trong một số trường hợp, sắc ký trao đổi ion có thể được áp dụng để đạt được sự phân ly. Theo các phương án nhất định, việc phân ly muối polynucleotit thứ nhất đạt được bằng cách hòa tan muối trong dung môi chứa ion đối cation đang được quan tâm.

Sau khi tách, các bước tinh chế tiếp nữa có thể được thực hiện đối với chế phẩm polynucleotit thứ hai. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm: việc cho muối polynucleotit thứ nhất tiếp xúc với nền sắc ký pha đảo; và rửa giải khỏi nền sắc ký này chế phẩm polynucleotit thứ ba chứa polynucleotit. Theo các phương án nhất định, chế phẩm polynucleotit thứ ba chứa muối polynucleotit thứ hai. Các phương pháp sắc ký pha đảo thuận tiện bất kỳ có thể được áp dụng để tinh chế muối polynucleotit. Các phương pháp sắc ký pha đảo và các nền đang được quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp tinh chế sắc ký bằng cách áp dụng sắc ký pha đảo ghép cặp ion, sắc ký pha đảo C18 và các phương pháp và các nền đã được bộc lộ trong tài liệu: Chen *et al.*, *Journal of Chromatography A*, Volume 1288, 3 May 2013, trang 73-81; và Zimmermann *et al.*, *Journal of Chromatography A*, Volume 1354, 8 August 2014, trang 43-55. Theo một số phương án, chế phẩm polynucleotit thứ hai được nạp một cách trực tiếp lên nền sắc ký pha đảo. Thuật ngữ nạp một cách trực tiếp lên nền nghĩa là chế phẩm polynucleotit thứ hai tạo ra được bằng cách áp dụng phương pháp theo sáng chế được bổ sung một cách trực tiếp, ví dụ, làm chất kết tủa rắn đã được phân lập, vào nền sắc ký pha đảo. Trong một số trường hợp, nền sắc ký pha đảo là nhựa có kết cấu ở dạng cột và chế phẩm polynucleotit được bổ sung lên trên tầng nhựa. Theo các phương án nhất định,

phương pháp này còn bao gồm việc hòa tan chế phẩm polynucleotit thứ hai trong dung môi. Các dung môi thuận tiện bất kỳ có thể được sử dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch đậm nước, dung môi hữu cơ có thể trộn lẫn được với nước và các hỗn hợp của chúng. Trong các trường hợp như vậy, có thể cho dung dịch chứa chế phẩm polynucleotit thứ hai tiếp xúc với nền sắc ký pha đảo để hấp thụ polynucleotit vào nền trước khi rửa giải.

Trong một số trường hợp, việc cho tiếp xúc bao gồm việc hấp thụ polynucleotit lên trên nền sắc ký pha đảo và tiếp đó, rửa giải polynucleotit để gây phân giải sắc ký polynucleotit hướng đích ra khỏi polynucleotit không hướng đích và các tác nhân tổng hợp tồn dư mà có mặt trong chế phẩm. Dịch rửa giải chứa polynucleotit hướng đích được thu gom. Các dung môi rửa giải thuận tiện bất kỳ có thể được sử dụng để rửa giải polynucleotit ra khỏi nền sắc ký pha đảo. Dung môi rửa giải có thể được lựa chọn theo một loạt yếu tố, như bản chất của nền sắc ký pha đảo, oligonucleotit hướng đích, các muối mong muốn cụ thể của polynucleotit hướng đích, v.v. Trong một số trường hợp, ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị của muối polynucleotit thứ nhất được trao đổi ion trên nền sắc ký pha đảo với một ion đối cation khác biệt khác đang được quan tâm mà được đưa vào dung môi rửa giải. Trong các trường hợp này, khi polynucleotit được rửa giải ra khỏi nền sắc ký pha đảo, thì nó ở một dạng muối khác (tức là, muối polynucleotit thứ hai) khi nó được nạp vì ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị được trao đổi ra khỏi polynucleotit. Trong các trường hợp nhất định, dạng muối của polynucleotit mà được rửa giải khỏi nền ở chế phẩm polynucleotit thứ ba dễ hòa tan trong nước hơn so với muối polynucleotit thứ nhất bao gồm ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm polynucleotit thứ ba chứa muối polynucleotit thứ hai mà là muối được dùng của polynucleotit. Trong các trường hợp nhất định, chế phẩm thứ ba chứa muối polynucleotit thứ hai mà là muối cation có hóa trị một của polynucleotit. Trong các trường hợp nhất định, chế phẩm thứ ba chứa muối polynucleotit thứ hai mà là muối trietylamoni của polynucleotit. Trong các trường hợp nhất định, chế phẩm thứ ba chứa muối polynucleotit thứ hai mà là muối natri của polynucleotit. Cần phải hiểu rằng sau khi polynucleotit được tinh chế theo

phương pháp sắc ký pha đảo, việc trao đổi ion đối cation tiếp có thể được thực hiện đối với muối polynucleotit với số bước bất kỳ để tạo ra dạng muối mong muốn của polynucleotit. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc trao đổi ion các ion đối cation từ muối polynucleotit thứ hai để tạo ra muối polynucleotit thứ ba. Theo các phương án nhất định, muối polynucleotit thứ ba là muối được dùng của polynucleotit. Trong các trường hợp nhất định, muối polynucleotit thứ ba là muối cation có hóa trị một của polynucleotit. Trong các trường hợp nhất định, muối polynucleotit thứ ba là muối natri của polynucleotit (ví dụ, như được bộc lộ trong bản mô tả này).

Trong các trường hợp nhất định, chế phẩm thứ nhất chứa muối cation có hóa trị một của polynucleotit. Trong các trường hợp nhất định, muối cation có hóa trị một được chọn từ nhóm gồm natri, amoni và alkyl amoni. Trong các trường hợp nhất định, alkyl amoni được chọn từ nhóm gồm dimetylamoni, metylamoni, etylamoni và trietylamoni. Trong các trường hợp nhất định, chế phẩm thứ nhất chứa muối amoni của polynucleotit. Trong các trường hợp nhất định, chế phẩm thứ nhất chứa muối alkyl amoni của polynucleotit. Trong các trường hợp nhất định, chế phẩm thứ nhất chứa muối trietylamoni của polynucleotit. Trong các trường hợp nhất định, chế phẩm thứ nhất chứa muối natri của polynucleotit. Có thể cho chế phẩm polynucleotit thứ nhất tiếp xúc với muối cation đa hóa trị để làm kết tủa muối polynucleotit thứ nhất chứa ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị. Như vậy, theo các phương án nhất định, chế phẩm polynucleotit thứ nhất đã được cho tiếp xúc chứa muối polynucleotit thứ nhất bao gồm ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị.

Phạm vi của sáng chế cần được xem là bao trùm các phương án trong số các phương án bất kỳ nêu trên của phương pháp này, trong đó polynucleotit là như được bộc lộ trong bản mô tả này.

Các phương pháp tổng hợp

Các phương pháp hóa học, các chiến lược và các phương pháp tổng hợp polynucleotit thuận tiện bất kỳ có thể được áp dụng để điều chế các chế phẩm

polynucleotit sản phẩm tổng hợp thô mà có ứng dụng trong các phương pháp điều chế theo sáng chế. Các phương pháp hóa học tổng hợp polynucleotit và các phương pháp đang được quan tâm mà có thể được làm thích ứng để áp dụng ở các phương pháp theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phosphoramidit, H-phosphonat, phosphodiester, phosphotriester, phosphitriester. Các thành phần polynucleotit của các hợp chất theo sáng chế có thể được tổng hợp bằng cách làm thích ứng các quy trình thông thường bất kỳ cho loại phương pháp hóa học được chọn. Các phương pháp đang được quan tâm để tổng hợp các oligonucleotit có các tác nhân hóa học N3'→P5' thiophosphoramidat bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số U.S. 5,824,793, McCurdy *et al.*, (1997) *Tetrahedron Letters*, 38:207-210; Pongracz & Gryaznov, (1999) *Tetrahedron Letters*, 49:7661-7664; các bằng sáng chế Mỹ số US 6,835,826, US 7,494,982, US 7,485,717 và US 5,684,143.

Trong một số trường hợp, polynucleotit đang được quan tâm được tổng hợp thông qua việc liên hợp tuần tự bắt đầu từ đầu tận cùng 5' và tiến đến đầu tận cùng 3' của trình tự polynucleotit hướng đích. Trong các trường hợp nhất định, polynucleotit đang được quan tâm được tổng hợp thông qua các bước liên hợp tuần tự bắt đầu từ đầu tận cùng 3' và tiến đến đầu tận cùng 5' của trình tự polynucleotit hướng đích. Theo một số phương án, polynucleotit được tổng hợp bằng các bước liên hợp tuần tự monome phosphoramidit với đầu tận cùng đang tăng trưởng của polynucleotit. Cấu trúc siêu phân tử nucleosit đầu tận cùng 5' có thể được gắn vào nền rắn thuận tiện bất kỳ thông qua nhóm liên kết tùy ý hoặc nhóm đầu tận cùng 5'. Sau khi cấu trúc siêu phân tử thứ nhất được gắn vào nền rắn, thì cấu trúc siêu phân tử này có thể được khử bảo vệ để tạo ra nhóm đầu tận cùng 3' tự do, cố định. Sau đó, các bước liên hợp cấu trúc siêu phân tử vào chuỗi oligonucleotit đang tăng trưởng có thể được thực hiện. Trong một số trường hợp, phương pháp này bao gồm việc liên hợp nhóm đầu tận cùng 3' đã được liên kết vào nền với monome nucleotit-5'-phosphoramidit-đã được bảo vệ-3'. Theo các phương án nhất định, nhóm đầu tận cùng 3' là nhóm 3'-hydroxyl. Theo các phương án nhất định, nhóm đầu tận cùng 3' là nhóm 3'-amin.

Trong một số trường hợp, phương pháp tổng hợp polynucleotit bao gồm các bước: (a) khử bảo vệ nhóm 3'-amin đã được bảo vệ của nucleosit ở đầu tận cùng đã được gắn vào nền pha rắn, khử bảo vệ tạo ra nhóm 3'-amin tự do; (b) cho nhóm 3'-amin tự do tiếp xúc với monome amin đã được bảo vệ-3'-nucleosit-5'-phosphoramidit với sự có mặt của chất xúc tác ưa nhân để tạo liên kết liên nucleosit N3'→P5' phosphoramidit; và (c) oxy hóa liên kết để tạo ra dạng liên kết N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm (d) việc lặp lại các bước (a) đến (c) cho đến khi polynucleotit được tổng hợp.

Trong một số trường hợp, phương pháp này bao gồm việc liên hợp nhóm đầu tận cùng 3' đã được liên kết vào nền với đime dinucleotit-5'-phosphoramidit-đã được bảo vệ-3'. Các phương pháp tổng hợp polynucleotit đang được quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp tổng hợp pha rắn bao gồm ít nhất là một bước liên hợp đime dinucleotit như được bộc lộ trong công bố đơn PCT số WO2015/168310, đơn này yêu cầu hưởng quyền của đơn tạm thời Mỹ số 61/987,396. Trình tự polynucleotit hướng đích có thể được tổng hợp thông qua chiến lược tổng hợp ngược mà bao gồm các bước liên hợp tuần tự cả cấu trúc siêu phân tử đime và cấu trúc siêu phân tử monome vào nhóm đầu tận cùng 3' của chuỗi oligonucleotit đang tăng trưởng. Theo một số phương án, polynucleotit được tổng hợp bằng cách áp dụng phương pháp bao gồm ít nhất là một bước liên hợp đime dinucleotit vào nhóm đầu tận cùng 3' tự do của chuỗi polynucleotit đang tăng trưởng.

Trong một số trường hợp, phương pháp tổng hợp polynucleotit bao gồm các bước: (a) khử bảo vệ nhóm 3'-amin đã được bảo vệ của nucleosit ở đầu tận cùng đã được gắn vào nền pha rắn, khử bảo vệ tạo ra nhóm 3'-amin tự do; (b) cho nhóm 3'-amin tự do tiếp xúc với đime amin-dinucleotit thiophosphoramidat hoặc phosphoramidit-5'-phosphoramidit đã được bảo vệ ở đầu 3' với sự có mặt của chất xúc tác ưa nhân để tạo liên kết liên nucleosit N3'→P5'phosphoramidit; và (c) oxy hóa liên kết này thành liên kết N3'→P5'thiophosphoramidat. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm (d) lặp lại các bước (a) đến (c) cho đến khi polynucleotit được tổng hợp, trong đó ở bước (b) đime amin-dinucleotit thiophosphoramidat-5'-phosphoramidit đã được bảo vệ-3' hoặc monome amin-nucleotit-5'-phosphoramidit

đã được bảo vệ-3' có thể được sử dụng.

Các chiến lược nhóm bảo vệ thuận tiện bất kỳ có thể được áp dụng ở các phương pháp theo sáng chế để bảo vệ các nhóm bazơ, phosphoramidit, phosphoramidat, 5', 2' và/hoặc 3' của polynucleotit. Các nhóm bảo vệ đang được quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm bảo vệ được bộc lộ trong tài liệu: Ohkubo *et al.*, *Org. Lett.*, 2010, 12 (11), pp 2496-2499; và Beaucage and Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992).

Thuật ngữ “nhóm bảo vệ phosphat” được dùng trong bản mô tả này để chỉ nhóm bảo vệ mà có thể được gắn kết vào liên kết liên cấu trúc siêu phân tử chứa phospho của oligonucleotit. Khi có mặt, nhóm bảo vệ phosphat có thể ngăn chặn (tức là, phong bế) phản ứng của liên kết chứa phospho ở vị trí nơi mà nhóm bảo vệ phosphat được gắn. Các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử chứa phospho thuận tiện bất kỳ (ví dụ, các dạng liên kết P(III) và P(V)) có thể được bảo vệ bằng các nhóm bảo vệ phosphat theo sáng chế, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các liên kết phosphoramidit, oxophosphoramidat, thiophosphoramidat, phosphat este, thio-phosphat este, phosphodiester và các loại tương tự. Nhóm bảo vệ phosphat có thể được gắn vào nguyên tử oxy sẵn có của liên kết liên cấu trúc siêu phân tử chứa phospho. Các nhóm bảo vệ thuận tiện bất kỳ có thể được sử dụng làm nhóm bảo vệ phosphat. Theo các phương án nhất định, nhóm bảo vệ phosphat là methyl, hoặc β -xanoethyl.

Trong một số trường hợp, nhóm đầu tận cùng 3' của chuỗi polynucleotit đang tăng trưởng có thể bao gồm 3'-hydroxyl, nhóm 3'-amin hoặc phiên bản được bảo vệ của chúng. Các nhóm bảo vệ hydroxyl và/hoặc amin thuận tiện bất kỳ có thể được sử dụng ở nhóm đầu tận cùng 3' trong suốt quá trình tổng hợp polynucleotit. Theo một số phương án, nhóm đầu tận cùng 3' là nhóm 3'-amin được bảo vệ và phương pháp này bao gồm việc khử bảo vệ hoặc loại bỏ nhóm bảo vệ để tạo ra nhóm 3' amin tự do. Thuật ngữ “nhóm amin tự do” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nhóm amin sẵn sàng để phản ứng với nhóm phosphoramidit của monome hoặc dime sắp tới. Theo một số phương án, nhóm amin tự do là amin bậc nhất. Sau bước khử

bảo vệ (ví dụ, khử trityl), nhóm amin có thể ở dạng muối (ví dụ, muối của bazơ thể tiếp hợp của axit được sử dụng để khử trityl). Muối này có thể được tùy ý trung hòa bằng dung dịch bazơ như 2% triethylamin hoặc pyridin trong axetonitril sau bước khử trityl.

Việc bảo vệ ở đầu 3' của các phosphoramidit cấu trúc siêu phân tử sắp tới ngăn cản hiện tượng polyme hóa không thích hợp của chuỗi. Theo một số phương án, nhóm đầu tận cùng 3' là nhóm 3'-hydroxyl đã được bảo vệ và phương pháp này bao gồm việc khử bảo vệ hoặc loại bỏ nhóm bảo vệ để tạo ra nhóm 3'-hydroxyl tự do. Theo một số phương án, nhóm đầu tận cùng 3' là nhóm 3'-amin đã được bảo vệ và phương pháp bao gồm việc khử bảo vệ hoặc loại bỏ nhóm bảo vệ để tạo ra nhóm 3'-amin tự do. Nhóm 3'-amin đã được bảo vệ hoặc nhóm 3'-hydroxyl đã được bảo vệ có thể được bảo vệ bằng nhóm bảo vệ trityl. Theo các phương án nhất định, nhóm bảo vệ trityl là triphenylmethyl (Tr hoặc Trt, $\text{Ph}_3\text{C}-$). Theo các phương án nhất định, nhóm bảo vệ trityl là 4,4'-dimethoxytrityl (DMT). Việc khử bảo vệ nhóm hydroxyl hoặc amin ở đầu tận cùng 3' có thể được thực hiện bằng cách áp dụng các phương pháp thuận tiện bất kỳ. Các phương pháp đang được quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp được bộc lộ trong tài liệu: Beaucage and Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992). Trong một số trường hợp, việc khử bảo vệ nhóm 3' amin đã được bảo vệ của nucleosit đầu tận cùng bao gồm việc khử trityl để tạo ra nhóm đầu tận cùng 3' tự do, ví dụ, việc khử trityl được xúc tác bằng axit. Trong một số trường hợp, các phosphoramidit của cấu trúc siêu phân tử dime hoặc monome bao gồm nhóm 3'-hydroxyl hoặc nhóm 3'-amin đã được bảo vệ mà giống với nhóm đầu tận cùng 3' của nucleosit đầu tận cùng được gắn vào nền rắn.

Nền pha rắn thuận tiện bất kỳ có thể được sử dụng để tổng hợp polynucleotit theo phương pháp theo sáng chế. Các nền rắn đang được quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hạt micro được làm bằng thủy tinh có lỗ xốp được kiểm soát (controlled pore glass - CPG), polystyren được liên kết ngang ở mức cao (ví dụ, NittoPhase HL 400 hoặc GE Primer 350), copolyme acrylic, xenluloza, nylon, dextran, latex, polyacrolein, và các chất tương tự, như các loại được bộc lộ trong các tài liệu tham khảo làm ví dụ dưới đây: *Meth. Enzymol.*, Section A, pages 11-147,

vol. 44 (Academic Press, New York, 1976); các bằng sáng chế Mỹ số 4,678,814; 4,413,070; và 4,046,720; và Pon, Chapter 19, trong tài liệu: Agrawal, editor, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 20, (Humana Press, Totowa, N.J., 1993). Các nền đang được quan tâm khác nữa bao gồm các hạt polystyren; polystyren đã được ghép polyetylen glycol (ví dụ, TentaGel™, Rapp Polymere, Tubingen Đức); và các loại tương tự. Việc chọn lựa các đặc điểm của nền, như chất liệu, độ xốp, kích cỡ, hình dạng, và các đặc điểm tương tự, và loại gốc liên kết được sử dụng phụ thuộc vào một loạt yếu tố, như các nhóm bảo vệ được sử dụng, chiều dài của sản phẩm cuối cùng, lượng sản phẩm cuối cùng, và các yếu tố tương tự. Các gốc liên kết làm ví dụ được bộc lộ trong tài liệu: Pon *et al.*, *Biotechniques*, 6:768-775 (1988); bằng sáng chế Mỹ số 4,659,774 đã cấp cho Webb; đơn quốc tế số PCT/US91/06103 của Barany và các đồng tác giả; Brown *et al.*, *J. Chem. Soc. Commun.*, 1989: 891-893; Damha *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 18: 3813-3821(1990); Beattie *et al.*, *Clinical Chemistry*, 39: 719-722 (1993); Maskos and Southern, *Nucleic Acids Research*, 20: 1679-1684 (1992); và các tài liệu tương tự.

Theo một số phương án, các nền rắn mà có thể được dùng ở các phương pháp theo sáng chế bao gồm CPG và polystyren được ghép với polyetylen glycol và chứa nhóm amin ở đầu tận cùng (ví dụ, TentaGel-NH₂™, Rapp Polymere, Tubingen Đức). Nhóm aminopropyl có thể được sử dụng làm phần đệm giữa CPG và liên kết nucleosit. Trong một số trường hợp, liên kết vào 5'-hydroxyl của nucleosit thứ nhất là nhóm suxynyl mà đem lại liên kết este không bền với bazơ mà có thể bị phân cắt sau quá trình tổng hợp với dung dịch nước amoniac.

Sau khi khử bảo vệ, nucleosit đã được liên kết vào nền có khả năng phản ứng với phosphoramidit của cấu trúc siêu phân tử dime hoặc monome để tạo ra liên kết liên nucleosit. Cần phải hiểu rằng nucleosit đã được liên kết vào nền có thể được dùng để chỉ một gốc đơn lẻ đã được gắn vào nền rắn hoặc có thể được dùng để chỉ gốc ở đầu tận cùng của chuỗi oligonucleotit mà được gắn vào nền. Phương pháp hóa học liên hợp, các chất phản ứng liên hợp và các phương pháp thuận tiện bất kỳ có thể được áp dụng trong các phương pháp theo sáng chế. Các phương pháp chọn lựa thuận tiện bất kỳ liên quan đến các điều kiện liên hợp, các nhóm bảo vệ, các nền pha

rắn, các nhóm liên kết, các chất phản ứng khử bảo vệ, các chất phản ứng để phân cắt các sản phẩm ra khỏi các nền pha rắn, việc tinh chế sản phẩm, và các yếu tố tương tự, có thể được đưa ra trong ngữ cảnh của các phương pháp theo sáng chế theo hướng dẫn, ví dụ, trong các tài liệu: Gait, editor, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1984); Amarnath and Broom, *Chemical Reviews*, Vol. 77, pgs. 183-217 (1977); Pon *et al.*, *Biotechniques*, Vol. 6, pgs. 768-775 (1988); Ohtsuka *et al.*, *Nucleic Acids Research*, Vol. 10, pgs. 6553-6570 (1982); Eckstein, editor *Oligonucleotides, and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991), Greene and Wuts “*Protective Groups in Organic Synthesis*”, Third edition, Wiley, New York 1999, Narang, editor, *Synthesis and Applications of DNA and RNA* (Academic Press, New York, 1987), Beaucage and Iyer, *Tetrahedron* 48: 2223-2311 (1992), và các tài liệu tham khảo tương tự.

Trong một số trường hợp, sau khi liên hợp, các nhóm 3'-amin chưa phản ứng của chuỗi đang tăng trưởng đã được liên kết vào nền của polynucleotit có thể được tùy ý bít chóp bằng chất bít chóp thuận tiện trước bước khử bảo vệ tiếp theo (ví dụ, bước khử trityl) để làm cho chúng trợ với các bước liên hợp kế tiếp. Bước bít chóp này có thể cải thiện biên dạng HPLC của chế phẩm để dễ tinh chế hơn, và cũng có thể cải thiện tổng sản lượng của sản phẩm. Các chất phản ứng bít chóp hữu dụng ở các phương pháp theo sáng chế bao gồm các chất phản ứng ưa điện tử như axetic anhyđrua và isobutyric anhyđrua, axit clorua như adamantyl carbonyl clorua, pivaoyl clorua, và các chất tương tự, isothioxyanat, cloformat, v.v.. Các phosphoramidit còn là hữu ích cùng với chất hoạt hóa và tiếp đó là sự oxy hóa, và các muối H-phosphonat như triethylamoni isopropyl-H-phosphonat được sử dụng cùng với axit clorua như pivaoyl clorua hoặc adamantyl carbonyl clorua.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm việc oxy hóa liên kết liên nucleosit N3'→P5'phosphoramidit. Các thuật ngữ “oxy hóa”, “sự oxy hóa”, “việc oxy hóa”, và các thuật ngữ tương tự, được dùng trong bản mô tả này liên quan đến liên kết liên nucleosit chứa phospho có nghĩa là quy trình hoặc xử lý để chuyển hóa nguyên tử phospho của liên kết từ phospho (III) thành phospho (V). Việc oxy hóa liên kết liên nucleotit có thể được thực hiện tại điểm thuận tiện bất kỳ trong quá trình

tổng hợp bằng cách áp dụng các phương pháp thuận tiện bất kỳ. Theo một số phương án, việc oxy hóa được thực hiện theo phương thức từng bước, ví dụ, trong từng chu kỳ liên hợp. Theo các phương án khác, việc oxy hóa nhiều liên kết liên nucleotit được thực hiện vào cuối quy trình tổng hợp. Trong một số trường hợp, việc oxy hóa liên kết N3'→P5'phosphoramidit (ví dụ, bằng cách sử dụng chất oxy hóa trên cơ sở nước/iot) tạo ra liên kết oxo-phosphoramidat. Trong các trường hợp khác, việc oxy hóa liên kết N3'→P5'phosphoramidit bao gồm việc lưu hóa để tạo ra liên kết N3'→P5'thiophosphoramidat. Việc lưu hóa có thể được thực hiện bằng cách áp dụng các phương pháp thuận tiện bất kỳ. Các phương pháp lưu hóa đang được quan tâm bao gồm các loại được mô tả bởi Gryazonov *et al.* trong WO2001018015 và US6,114,519. Các tác nhân lưu hóa đang được quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lưu huỳnh nguyên tố, thiuram đisulfua như tetraetyl thiuram đisulfua, axyl đisulfua như phenaxyl đisulfua, phenyl axetyl đisulfua, phosphinothioyl đisulfua như S-Tetra™, và 1,1-đioxo-3H-1,2-benzodithiol-3-on. Theo một số phương án, việc lưu hóa có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phenyl axetyl đisulfua trong 2,6-lutidin. Theo các phương án nhất định, việc lưu hóa có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chất phản ứng Beaucage, bằng cách áp dụng các phương pháp đã được bộc lộ trong tài liệu: Iyer *et al.*, *J. Organic Chemistry* 55:4693-4699, 1990.

Việc phân cắt polynucleotit ra khỏi nền tổng hợp pha rắn có thể được thực hiện bằng cách áp dụng các phương pháp thuận tiện bất kỳ và các chất phản ứng, phương tiện này có thể được lựa chọn tùy thuộc vào một loạt yếu tố, như bản chất của nền, hóa học liên kết và chiến lược nhóm bảo vệ được áp dụng trong quá trình tổng hợp. Các chọn lựa được đưa ra trong quá trình tổng hợp và phân cắt một polynucleotit hướng đích có thể xác định định danh của tác nhân và sản phẩm tổng hợp không hướng đích có mặt trong chế phẩm polynucleotit thứ nhất.

Theo một số phương án, trước quá trình phân cắt, các nhóm bảo vệ phospho của polynucleotit được loại bỏ để tránh hiện tượng hình thành các sản phẩm cộng không thích hợp tiềm tàng bất kỳ của nhóm bảo vệ được phân cắt (ví dụ, nhóm bảo vệ β-xanoetyl) với polynucleotit. Các phương pháp đang được quan tâm mà có thể

được làm thích ứng để sử dụng trong quá trình khử bảo vệ và phân cắt các polynucleotit bao gồm các loại được mô tả trong tài liệu: US7,199,236. Theo một số phương án, polynucleotit được phân cắt ra khỏi nền bằng cách sử dụng dung dịch amoniac để loại bỏ các nhóm bảo vệ bazơ bất kỳ (ví dụ, các nhóm bảo vệ amin dạng vòng ngoài) và các nhóm bảo vệ phospho còn lại bất kỳ. Các điều kiện thuận tiện bất kỳ có thể được sử dụng trong phản ứng phân cắt polynucleotit. Trong một số trường hợp, sự phân cắt được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C. Trong một số trường hợp, sự phân cắt được thực hiện trong khoảng thời gian kéo dài, như thời gian nằm trong khoảng từ 12 giờ đến 24 giờ. Sau khi phân cắt polynucleotit, thì nền lúc ấy có thể được loại bỏ bằng quá trình lọc và được súc rửa. Chất lọc kết hợp và các dung dịch súc rửa, phần này bây giờ chứa chế phẩm tổng hợp thô của polynucleotit, có thể được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế của quá trình điều chế, trước khi được chuyển qua các bước tinh chế khác nữa. Trong một số trường hợp, quá trình tinh chế dung dịch polynucleotit bao gồm Sắc ký Lỏng Hiệu suất cao Pha đảo điều chế (Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography - RP-HPLC) RP HPLC, ví dụ, bằng cách sử dụng Kromasil C18 ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45°C đến 55°C. Trong một số trường hợp, các chế phẩm polynucleotit của các phương pháp theo sáng chế có thể trải qua số bước khử muối và cô đặc thuận tiện bất kỳ, ví dụ, bằng cách sử dụng thiết bị lọc dòng chảy tiếp tuyến (Tangential Flow Filtration - TFF) được trang bị màng polyetesulfon có kích cỡ ngưỡng đường kính lỗ là 1.000Da.

Chế phẩm phẩm polynucleotit

Các khía cạnh của sáng chế bao gồm các chế phẩm muối polynucleotit chứa ion đối cation đa hóa trị. Theo một số phương án, chế phẩm này chứa: muối của polynucleotit chứa ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị, trong đó polynucleotit này có trình tự gồm 7 cấu trúc siêu phân tử nucleosit hoặc nhiều hơn và ít nhất là hai cấu trúc siêu phân tử trong số các cấu trúc siêu phân tử nucleosit này được nối bằng liên kết liên cấu trúc siêu phân tử N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo các phương án nhất định, polynucleotit có trình tự gồm 7 cấu trúc siêu phân tử nucleosit hoặc nhiều

hơn hỗ trợ cho thành phần ARN của telomera của người.

Các ion đối cation đa hóa trị

Các cation đa hóa trị thuận tiện bất kỳ có thể được dùng làm ion đối trong các muối polynucleotit theo sáng chế. Như vậy, cation đa hóa trị có thể tạo cặp ion với vị trí anion trên mạch chính polynucleotit ở chế phẩm polynucleotit theo sáng chế. Các polynucleotit có thể bao gồm các cấu trúc siêu phân tử nucleosit được liên kết bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử chứa phospho (ví dụ, các liên kết P(V)) như các liên kết phosphoramidat, thiophosphoramidat, phosphat este, phosphodiester và các loại tương tự. Cần phải hiểu rằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử của polynucleotit có thể có điện tích âm (ví dụ, trong dung dịch nước) và được ghép cặp ion với ion đối cation. Các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử này có thể được gọi là các nhóm anion của mạch chính polynucleotit.

Thuật ngữ cation đa hóa trị được dùng trong bản mô tả này để chỉ cation có khả năng tạo nhiều cặp ion, ví dụ, cation mất nhiều điện tử, như cation mất hai điện tử hoặc cation mất ba điện tử. Các cation đa hóa trị thuận tiện bất kỳ có thể được dùng ở các chế phẩm muối polynucleotit theo sáng chế. Theo một số phương án, cation đa hóa trị ghép cặp ion với hai hoặc nhiều nhóm anion liền kề của mạch chính polynucleotit. Theo một số phương án, cation đa hóa trị ghép cặp ion với một nhóm anion của mạch chính polynucleotit. Theo một số phương án, ion đối cation đa hóa trị này có hóa trị hai. Các ion đối cation có hóa trị hai đang được quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, magie, kẽm và canxi. Theo một số phương án, ion đối cation đa hóa trị này có hóa trị ba. Các ion đối cation có hóa trị ba đang được quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhôm. Theo các phương án nhất định của chế phẩm này, ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị được chọn từ nhóm gồm magie, kẽm, nhôm và canxi. Theo các phương án nhất định của chế phẩm này, ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị là magie. Theo các phương án nhất định của chế phẩm này, ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị là kẽm. Theo các phương án nhất định của chế phẩm này, ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị là nhôm. Theo các phương án nhất

định của chế phẩm này, ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị là canxi.

Cần phải hiểu rằng số lượng ion đối cation mà có mặt ở muối polynucleotit phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau, như chiều dài của mạch chính polyanion, hóa trị của các cation trong các muối, độ pH của dung dịch, mức độ kết tụ của các polynucleotit trong chế phẩm, v.v.. Các chế phẩm theo sáng chế có thể chứa ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị đối với mạch chính polynucleotit polyanion ở các chế phẩm polynucleotit theo sáng chế, như 2 ion đối cation đa hóa trị hoặc nhiều hơn, 3 ion đối cation đa hóa trị hoặc nhiều hơn, 4 ion đối cation đa hóa trị hoặc nhiều hơn, 5 ion đối cation đa hóa trị hoặc nhiều hơn, 6 ion đối cation đa hóa trị hoặc nhiều hơn, 7 ion đối cation đa hóa trị hoặc nhiều hơn, 8 ion đối cation đa hóa trị hoặc nhiều hơn, 9 ion đối cation đa hóa trị hoặc nhiều hơn, 10 ion đối cation đa hóa trị hoặc nhiều hơn, 15 ion đối cation đa hóa trị hoặc nhiều hơn, 20 ion đối cation đa hóa trị hoặc nhiều hơn, 30 ion đối cation đa hóa trị hoặc nhiều hơn, 40 ion đối cation đa hóa trị hoặc nhiều hơn, 50 ion đối cation đa hóa trị hoặc nhiều hơn, 100 ion đối cation đa hóa trị hoặc nhiều hơn, hoặc thậm chí nhiều ion đối cation đa hóa trị hơn nữa. Theo các phương án nhất định, polynucleotit có n cấu trúc siêu phân tử nucleosit có thể bao gồm từ 1 đến $(n-1)/2$ (nếu n là số nguyên lẻ) ion đối cation có hóa trị hai hoặc từ 1 đến $(n-2)/2$ (nếu n là số nguyên chẵn) ion đối cation có hóa trị hai. Trong một số trường hợp, muối polynucleotit mà chứa ít nhất là một cation đa hóa trị, có thể còn chứa một loạt ion đối cation khác, ion này có thể có hóa trị một, hóa trị hai hoặc hóa trị ba. Trong các trường hợp nhất định, n là nằm trong khoảng từ 7 đến 50, như 7 đến 40, 10 đến 40, 10 đến 30, 10 đến 25, 10 đến 20, hoặc nằm trong khoảng từ 12 đến 15 cấu trúc siêu phân tử nucleosit.

Theo một số phương án của chế phẩm này, muối polynucleotit có thể chứa 3% mol ion đối cation đa hóa trị hoặc nhiều hơn so với mạch chính polyanion của polynucleotit (tức là, so với mức bao gồm tối đa theo lý thuyết của ion đối cation dọc theo mạch chính polyanion), như 4% mol hoặc nhiều hơn, 5% mol hoặc nhiều hơn, 6% mol hoặc nhiều hơn, 7% mol hoặc nhiều hơn, 8% mol hoặc nhiều hơn, 9% mol hoặc nhiều hơn, 10% mol hoặc nhiều hơn, 11 % mol hoặc nhiều hơn, 12 % mol hoặc nhiều hơn, 13% mol hoặc nhiều hơn, 14% mol hoặc nhiều hơn, 15% mol hoặc

nhiều hơn, 16% mol hoặc nhiều hơn, 17% mol hoặc nhiều hơn, 18% mol hoặc nhiều hơn, 19% mol hoặc nhiều hơn, 20% mol hoặc nhiều hơn, 25% mol hoặc nhiều hơn, 30% mol hoặc nhiều hơn, 35% mol hoặc nhiều hơn, 40% mol hoặc nhiều hơn, 45% mol hoặc nhiều hơn, 50% mol hoặc nhiều hơn, 55% mol hoặc nhiều hơn, 60% mol hoặc nhiều hơn, hoặc thậm chí nhiều ion đối cation đa hóa trị hơn nữa so với mạch chính polyanion của polynucleotit. Theo một số phương án của các chế phẩm theo sáng chế, polynucleotit có thể chứa 10% mol ion đối cation đa hóa trị hoặc nhiều hơn so với mạch chính polyanion của polynucleotit. Ví dụ, muối polynucleotit mà chứa mạch chính polyanion gồm 10 liên kết cấu trúc siêu phân tử liên nucleosit và chứa một ion đối cation có hóa trị hai ghép cặp ion với hai liên kết trong số các liên kết này, được mô tả là chứa 20% mol ion đối cation có hóa trị hai. Nếu một ion đối cation có hóa trị hai chỉ ghép cặp ion với một liên kết trong số các liên kết này thay vì hai, thì muối polynucleotit được mô tả là chứa 10% mol ion đối cation có hóa trị hai. Như vậy, trị số % mol được dùng để chỉ mức chiếm chỗ của mạch chính polynucleotit polyanion bởi ion đối cation đa hóa trị mà có ở muối polynucleotit. Ví dụ, một cation Mg^{2+} trong muối polynucleotit 13 đơn vị có 12 liên kết cấu trúc siêu phân tử liên nucleosit tạo mức chiếm chỗ 16,7% mol mạch chính. Cần phải hiểu rằng theo một số phương án, muối polynucleotit có thể bao gồm các vị trí ghép cặp ion bổ sung ở các đầu tận cùng của polynucleotit (ví dụ, nhóm 5'-thiophosphat), và nếu có mặt, các vị trí đó nên được đưa vào trị số % mol của hợp chất.

Theo một số phương án của chế phẩm này, muối polynucleotit chứa 90% mol ion đối cation đa hóa trị hoặc ít hơn so với mạch chính polyanion của polynucleotit, như 70% mol hoặc ít hơn, 65% mol hoặc ít hơn, 60% mol hoặc ít hơn, 50% mol hoặc ít hơn, hoặc thậm chí ít ion đối cation đa hóa trị hơn nữa.

Theo các phương án nhất định của chế phẩm này, muối polynucleotit chứa 3% đến 90% mol ion đối cation đa hóa trị so với mạch chính polyanion của polynucleotit, như 3% đến 65% mol (ví dụ, 6% đến 50% mol, 10% đến 50% mol hoặc 10 đến 40% mol), 3% đến 50% mol, 3% đến 40% mol, 3% đến 30% mol, 3% đến 20% mol hoặc 3% đến 15% mol ion đối cation đa hóa trị so với mạch chính polyanion của polynucleotit.

Trong các trường hợp nhất định của chế phẩm này, muối polynucleotit chứa 3% đến 60% mol ion đôi cation có hóa trị hai so với mạch chính polyanion của polynucleotit, như 3% đến 50% mol (ví dụ, 5% đến 50% mol), 3% đến 40% mol, 3% đến 30% mol, 3% đến 20% mol, 3% đến 15% mol, như 3% đến 12% mol ion đôi cation có hóa trị hai,

Trong các trường hợp nhất định của chế phẩm này, muối polynucleotit chứa 3% đến 60% mol ion đôi cation magie so với mạch chính polyanion của polynucleotit, như magie, 5% đến 50% mol, 5% đến 40% mol, 10% đến 40% mol hoặc 20 đến 40% mol ion đôi cation magie.

Trong các trường hợp nhất định của chế phẩm này, muối polynucleotit chứa 10% đến 70% mol ion đôi cation có hóa trị ba so với mạch chính polyanion của polynucleotit, như 10% đến 60% mol, 20% đến 60% mol, 20% đến 50% mol hoặc 30% đến 50% mol ion đôi cation có hóa trị ba. Theo một số phương án của chế phẩm này, muối polynucleotit chứa 0,5% hoặc nhiều hơn theo trọng lượng ion đôi cation đa hóa trị (ví dụ, magie), như 0,6% hoặc nhiều hơn, 0,7% hoặc nhiều hơn, 0,8% hoặc nhiều hơn, 0,9% hoặc nhiều hơn, 1,1% hoặc nhiều hơn, 1,2% hoặc nhiều hơn, 1,3% hoặc nhiều hơn, 1,4% hoặc nhiều hơn, 1,5% hoặc nhiều hơn, 1,6% hoặc nhiều hơn, 1,7% hoặc nhiều hơn, 1,8% hoặc nhiều hơn, 1,9% hoặc nhiều hơn, 2,0% hoặc nhiều hơn, 2,1% hoặc nhiều hơn, 2,2% hoặc nhiều hơn, 2,3% hoặc nhiều hơn, 2,4% hoặc nhiều hơn, 2,5% hoặc nhiều hơn, 2,6% hoặc nhiều hơn, 2,7% hoặc nhiều hơn, 2,8% hoặc nhiều hơn, 2,9% hoặc nhiều hơn, 3,0% ion đôi cation đa hóa trị hoặc nhiều hơn theo trọng lượng.

Muối polynucleotit là muối hỗn hợp mà bao gồm hỗn hợp gồm ion đôi cation đa hóa trị và ion đôi cation có hóa trị một. Theo các phương án nhất định của chế phẩm này, muối polynucleotit có tỷ lệ giữa ion đôi cation đa hóa trị và ion đôi cation có hóa trị một là ít nhất 0,05 hoặc cao hơn theo nồng độ mol, như 0,10 hoặc cao hơn, 0,15 hoặc cao hơn, 0,20 hoặc cao hơn, 0,25 hoặc cao hơn, 0,30 hoặc cao hơn, 0,35 hoặc cao hơn, 0,40 hoặc cao hơn, 0,45 hoặc cao hơn, 0,50 hoặc cao hơn, 0,55 hoặc cao hơn, 0,60 hoặc nhiều hơn, 0,65 hoặc cao hơn, 0,70 hoặc cao hơn theo nồng độ mol, hoặc tỷ lệ giữa ion đôi cation đa hóa trị và ion đôi cation có hóa trị một thậm

chí cao hơn nữa.

Trong một số trường hợp, muối polynucleotit có tỷ lệ giữa ion đôi cation đa hóa trị và ion đôi cation có hóa trị một là 1:12 theo nồng độ mol. Trong một số trường hợp, muối polynucleotit có tỷ lệ giữa ion đôi cation đa hóa trị và ion đôi cation có hóa trị một là 1:11 theo nồng độ mol. Trong một số trường hợp, muối polynucleotit có tỷ lệ giữa ion đôi cation đa hóa trị và ion đôi cation có hóa trị một là 1:10 theo nồng độ mol. Trong một số trường hợp, muối polynucleotit có tỷ lệ giữa ion đôi cation đa hóa trị và ion đôi cation có hóa trị một là 1:9 theo nồng độ mol. Trong một số trường hợp, muối polynucleotit có tỷ lệ giữa ion đôi cation đa hóa trị và ion đôi cation có hóa trị một là 1:8 theo nồng độ mol. Trong một số trường hợp, muối polynucleotit có tỷ lệ giữa ion đôi cation đa hóa trị và ion đôi cation có hóa trị một là 1:7 theo nồng độ mol. Trong một số trường hợp, muối polynucleotit có tỷ lệ giữa ion đôi cation đa hóa trị và ion đôi cation có hóa trị một là 1:6 theo nồng độ mol. Trong một số trường hợp, muối polynucleotit có tỷ lệ giữa ion đôi cation đa hóa trị và ion đôi cation có hóa trị một là 1:5 theo nồng độ mol. Trong một số trường hợp, muối polynucleotit có tỷ lệ giữa ion đôi cation đa hóa trị và ion đôi cation có hóa trị một là 1:4 theo nồng độ mol. Trong một số trường hợp, muối polynucleotit có tỷ lệ giữa ion đôi cation đa hóa trị và ion đôi cation có hóa trị một là 2:9 theo nồng độ mol. Trong một số trường hợp, muối polynucleotit có tỷ lệ giữa ion đôi cation đa hóa trị và ion đôi cation có hóa trị một là 3:7 theo nồng độ mol. Trong một số trường hợp, muối polynucleotit có tỷ lệ giữa ion đôi cation đa hóa trị và ion đôi cation có hóa trị một là 4:5 theo nồng độ mol. Trong một số trường hợp, muối polynucleotit có tỷ lệ giữa ion đôi cation đa hóa trị và ion đôi cation có hóa trị một là 5:3 theo nồng độ mol.

Trong các trường hợp nhất định của muối polynucleotit hỗn hợp, ion đôi cation đa hóa trị là magie và ion đôi cation có hóa trị một là natri. Trong các trường hợp nhất định của muối polynucleotit hỗn hợp, ion đôi cation đa hóa trị là magie và ion đôi cation có hóa trị một là amoni. Trong các trường hợp nhất định của muối polynucleotit hỗn hợp, ion đôi cation đa hóa trị là magie và ion đôi cation có hóa trị một là trietylamoni. Trong các trường hợp nhất định của muối polynucleotit hỗn

hợp, ion đối cation đa hóa trị là nhôm. Trong các trường hợp nhất định của muối polynucleotit hỗn hợp, ion đối cation đa hóa trị là kẽm. Trong các trường hợp nhất định của muối polynucleotit hỗn hợp, ion đối cation đa hóa trị là canxi. Trong các trường hợp nhất định của muối polynucleotit hỗn hợp, ion đối cation có hóa trị một là natri. Trong các trường hợp nhất định của muối polynucleotit hỗn hợp, ion đối cation có hóa trị một là amoni. Trong các trường hợp nhất định của muối polynucleotit hỗn hợp, ion đối cation có hóa trị một là triethylamoni. Theo các phương án nhất định, muối polynucleotit chứa một ion đối cation đa hóa trị. Theo các phương án nhất định, muối polynucleotit chứa 2 ion đối cation đa hóa trị. Theo các phương án nhất định, muối polynucleotit chứa 3 ion đối cation đa hóa trị. Theo các phương án nhất định, muối polynucleotit chứa 4 ion đối cation đa hóa trị. Theo các phương án nhất định, muối polynucleotit chứa 5 ion đối cation đa hóa trị. Theo các phương án nhất định, muối polynucleotit chứa 6 ion đối cation đa hóa trị. Theo các phương án nhất định, muối polynucleotit chứa 7 ion đối cation đa hóa trị. Theo các phương án nhất định, muối polynucleotit chứa 8 ion đối cation đa hóa trị. Theo các phương án nhất định, muối polynucleotit chứa 9 ion đối cation đa hóa trị. Theo các phương án nhất định, muối polynucleotit chứa 10 ion đối cation đa hóa trị.

Ngoài polynucleotit hướng đích ra, các sản phẩm tổng hợp polynucleotit không hướng đích khác nhau có thể được tạo ra trong quá trình tổng hợp polynucleotit. Các sản phẩm phụ mà có thể có ở các chế phẩm polynucleotit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các sản phẩm của việc xóa bỏ (ví dụ, các sản phẩm thiếu một hoặc nhiều gốc nucleosit), các sản phẩm mà bao gồm một hoặc nhiều nhóm bảo vệ, các sản phẩm bị kết thúc (ví dụ, các sản phẩm mà có chuỗi polynucleotit đã được bịt chóp), các sản phẩm mà thiếu một hoặc nhiều nucleobazơ, các sản phẩm mà bao gồm các liên kết phosphoramidit đã được oxy hóa một phần và các sản phẩm mà bao gồm các liên kết đã được lưu hóa một phần.

Các phương pháp theo sáng chế tạo ra các chế phẩm mà chứa polynucleotit hướng đích trong chế phẩm với độ tinh khiết cao hơn. Theo một số phương án, chế phẩm chứa 20% polynucleotit hướng đích hoặc nhiều hơn theo trọng lượng, như 25% hoặc nhiều hơn, 30% hoặc nhiều hơn, 35% hoặc nhiều hơn, 40% hoặc nhiều

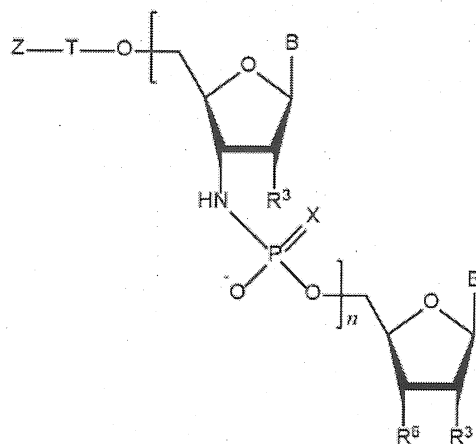
hơn, 45% hoặc nhiều hơn, 50% hoặc nhiều hơn, 60% hoặc nhiều hơn, 70% hoặc nhiều hơn, 80% hoặc nhiều hơn, 90% hoặc nhiều hơn, hoặc thậm chí 95% polynucleotit hướng đích hoặc nhiều hơn theo trọng lượng. Theo các phương án nhất định, chế phẩm này chứa 50% polynucleotit hướng đích hoặc nhiều hơn theo trọng lượng. Theo các phương án nhất định, chế phẩm này chứa 55% polynucleotit hướng đích hoặc nhiều hơn theo trọng lượng. Theo các phương án nhất định, chế phẩm này chứa 60% polynucleotit hướng đích hoặc nhiều hơn theo trọng lượng. Theo các phương án nhất định, chế phẩm này chứa 65% polynucleotit hướng đích hoặc nhiều hơn theo trọng lượng. Theo các phương án nhất định, chế phẩm này chứa 70% polynucleotit hướng đích hoặc nhiều hơn theo trọng lượng. Theo các phương án nhất định, chế phẩm này chứa 75% polynucleotit hướng đích hoặc nhiều hơn theo trọng lượng. Theo các phương án nhất định, chế phẩm này chứa 80% polynucleotit hướng đích hoặc nhiều hơn theo trọng lượng. Theo các phương án nhất định, chế phẩm này chứa 85% polynucleotit hướng đích hoặc nhiều hơn theo trọng lượng. Theo các phương án nhất định, chế phẩm này chứa 90% polynucleotit hướng đích hoặc nhiều hơn theo trọng lượng. Theo các phương án nhất định, chế phẩm này chứa 95% polynucleotit hướng đích hoặc nhiều hơn theo trọng lượng.

Các phương pháp theo sáng chế tạo ra các chế phẩm chứa các tác nhân và các sản phẩm tổng hợp không hướng đích với lượng ít hơn. Thuật ngữ lượng ít hơn có nghĩa là lượng tính theo trọng lượng của các tác nhân và các sản phẩm tổng hợp không hướng đích ở chế phẩm giảm so với phương pháp đối chứng. Theo một số phương án, các chế phẩm theo sáng chế chứa các tác nhân và các sản phẩm tổng hợp không hướng đích với lượng 50% tổng lượng polynucleotit không hướng đích ở chế phẩm hoặc ít hơn, như 40% hoặc ít hơn, 30% hoặc ít hơn, 25% hoặc ít hơn, 20% hoặc ít hơn, 15% hoặc ít hơn, 10% hoặc ít hơn hoặc thậm chí 5% tác nhân và sản phẩm tổng hợp không hướng đích hoặc ít hơn.

Chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm polynucleotit khác nhau có thể được điều chế bằng cách áp dụng các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này. Một loạt nhóm và loại polynucleotit đang được quan tâm để dùng trong việc điều chế bằng cách áp dụng các phương pháp theo sáng chế (ví dụ, như được bộc lộ trong bản

mô tả này). Các polynucleotit thích hợp để điều chế theo các phương pháp theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các polynucleotit đối nghĩa, các polynucleotit ARN, các polynucleotit ARN can thiệp nhỏ, các polynucleotit của ARN can thiệp, các aptame ADN, ARN có kích cỡ micro và các loại tương tự.

Theo một số phương án, polynucleotit được thể hiện bằng công thức (I):



Công thức (I)

trong đó:

mỗi B độc lập là purin, purin đã được bảo vệ, pyrimidin hoặc pyrimidin đã được bảo vệ, hoặc chất đồng đẳng của chúng;

mỗi X độc lập là oxy hoặc lưu huỳnh;

mỗi R^3 độc lập là hydro, flo, hydroxyl, alkoxy, alkoxy đã được thế hoặc hydroxyl đã được bảo vệ;

R^6 là amin, hydroxyl, amin đã được bảo vệ, hydroxy đã được bảo vệ, -O-T-Z hoặc -NH-T-Z;

mỗi T độc lập là gốc liên kết tùy ý;

mỗi Z độc lập là H, lipid, chất mang, oligonucleotit, polyme, polypeptit, chất đánh dấu dễ phát hiện được, hoặc thế; và

n là số nguyên từ nằm trong khoảng từ 1 đến 1000. Cần phải hiểu rằng các oligonucleotit có công thức (I), có thể tồn tại ở dạng muối. Như vậy, các liên kết liên nucleosit của công thức (I) có thể ở dạng muối mà chứa ion đối thuận tiện bất kỳ. Các dạng này được dự định nằm trong phạm vi của sáng chế. Cần phải hiểu rằng có

thể các bố trí đồng phân hỗ biến khác của các liên kết liên nucleosit của polynucleotit được mô tả ở Công thức (I) là có thể. Các dạng này được dự định nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo một số phương án của công thức (I), mỗi R^3 là hydro. Theo một số phương án của công thức (I), mỗi R^3 là flo. Theo một số phương án của công thức (I), mỗi R^3 là hydroxyl. Theo một số phương án của công thức (I), R^6 là amin. Theo các phương án nhất định của công thức (I), R^6 là hydroxyl. Theo một số phương án của công thức (I), Z là H. Theo một số phương án của công thức (I), Z là lipit (ví dụ, như được bộc lộ trong bản mô tả này). Trong các trường hợp nhất định, lipit là axit béo (ví dụ, như được bộc lộ trong bản mô tả này). Theo một số phương án của công thức (I), Z là chất mang. Theo một số phương án của công thức (I), Z là oligonucleotit. Theo một số phương án của công thức (I), Z là polyme. Trong các trường hợp nhất định, polyme là PEG. Theo một số phương án của công thức (I), Z là polypeptit. Theo một số phương án của công thức (I), Z là dấu dễ phát hiện. Theo một số phương án của công thức (I), Z là thẻ gắn. Theo một số phương án của công thức (I), T là vắng mặt. Theo một số phương án, mỗi B được lựa chọn một cách độc lập từ A, C, G, T và U.

Theo các phương án nhất định của công thức (I), n là số nguyên nằm trong khoảng từ 7 đến 500, như từ 7 đến 100, từ 7 đến 75, từ 7 đến 50, từ 7 đến 40, từ 7 đến 30, từ 7 đến 20, từ 7 đến 15, từ 10 đến 15, hoặc từ 13 đến 15. Theo các phương án nhất định, n là số nguyên nằm trong khoảng từ 7 đến 100, như từ 7 đến 50, từ 10 đến 50, từ 10 đến 40, từ 10 đến 30, từ 10 đến 25, từ 10 đến 20, từ 12 đến 18, hoặc từ 12 đến 16. Theo các phương án nhất định, n bằng 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 hoặc 25.

Các polynucleotit hỗ trợ cho thành phần ARN của telomeraza

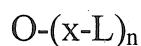
Các khía cạnh của sáng chế bao gồm các hợp chất và các chế phẩm chứa các polynucleotit hỗ trợ cho thành phần ARN của telomeraza của người, và các phương pháp điều chỉnh. Các hợp chất có thể ức chế hoạt tính telomeraza ở các tế bào với

độ hiệu nghiệm cao và có tính chất hấp thụ vào tế bào.

Trong các trường hợp nhất định, polynucleotit bao gồm trình tự gồm 7, hoặc nhiều hơn, cấu trúc siêu phân tử nucleosit hỗ trợ cho thành phần ARN của telomeraza của người, như 8 hoặc nhiều hơn, 9 hoặc nhiều hơn, 10 hoặc nhiều hơn, 11 hoặc nhiều hơn, 12 hoặc nhiều hơn, 13 hoặc nhiều hơn, 14 hoặc nhiều hơn, 15 hoặc nhiều hơn, 20 hoặc nhiều hơn, 30 hoặc nhiều hơn, 50 hoặc nhiều hơn cấu trúc siêu phân tử nucleosit hỗ trợ cho thành phần ARN của telomeraza của người.

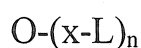
Theo một số phương án, polynucleotit bao gồm từ 3 đến 50 cấu trúc siêu phân tử nucleosit liên tiếp hỗ trợ cho thành phần ARN của telomeraza của người, như từ 5 đến 40, từ 7 đến 40, 10 và 40, từ 10 đến 30, từ 10 đến 25, từ 10 đến 20, hoặc từ 12 đến 15 cấu trúc siêu phân tử nucleosit. Theo các phương án nhất định, polynucleotit bao gồm trình tự là 7, hoặc nhiều hơn, cấu trúc siêu phân tử nucleosit liên tiếp hỗ trợ cho thành phần ARN của telomeraza của người, như 10 hoặc nhiều hơn, 11 hoặc nhiều hơn, 12 hoặc nhiều hơn, 13 hoặc nhiều hơn, 14 hoặc nhiều hơn, 15 hoặc nhiều hơn, 20 hoặc nhiều hơn, 30 hoặc nhiều hơn, 50 hoặc nhiều hơn cấu trúc siêu phân tử nucleosit liên tiếp hỗ trợ cho thành phần ARN của telomeraza của người.

Theo một số phương án, polynucleotit là hợp chất được thể hiện bằng công thức:



trong đó O thể hiện polynucleotit có trình tự gồm các cấu trúc siêu phân tử nucleosit hỗ trợ cho thành phần ARN của telomeraza của người, x là nhóm liên kết tùy ý, L là gốc lipit và n là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 5. Trong một số trường hợp, n bằng 5. Trong một số trường hợp, n bằng 4. Trong một số trường hợp, n bằng 3. Trong một số trường hợp, n bằng 2. Trong một số trường hợp, n bằng 1. Do đó, việc thiết kế các hợp chất đòi hỏi lựa chọn hai thực thể, O và L, và xác định (các) liên kết cấu trúc giữa các thực thể này, mà có thể bao gồm nhóm liên kết tùy ý x.

Theo một số phương án, hợp chất polynucleotit có thể được thể hiện bằng công thức:



trong đó O là polynucleotit có trình tự gồm các cấu trúc siêu phân tử nucleosit hỗ trợ cho thành phần ARN của telomeraza của người, x là nhóm liên kết tùy ý, L là gốc lipit và n bằng 1, như polynucleotit có công thức (I), hoặc muối của nó, trong đó ở công thức (I), Z là gốc lipit, T là gốc liên kết tùy ý (ví dụ, như được bộc lộ trong bản mô tả này) và các nhóm B tương ứng với trình tự gồm các cấu trúc siêu phân tử nucleosit hỗ trợ cho thành phần ARN của telomeraza của người.

Thành phần polynucleotit O có thể được xem là thành phần “tác động” của hợp chất ở chỗ chính thành phần này gây ức chế enzym telomeraza bằng cách liên kết với thành phần ARN của telomeraza. Vì vậy, trình tự của O được lựa chọn sao cho nó bao gồm vùng mà hỗ trợ cho trình tự của ARN telomeraza, phần này được thể hiện ở SEQ ID NO: 1. Vùng mà hỗ trợ cho thành phần ARN telomeraza về lý thuyết có thể được hướng đích đến phần bất kỳ của ARN telomeraza, nhưng các vùng cụ thể của ARN telomeraza là các đích được ưu tiên cho các polynucleotit ức chế. Một vùng đích được ưu tiên là vùng trải dài qua các nucleotit 30 đến 67 của SEQ ID NO: 1, vùng này bao gồm “vùng khuôn”, là vùng gồm 11 nucleotit của trình tự 5'-CUAACCCUAAC-3' (SEQ ID NO: 21) mà trải dài qua nucleotit 46 đến 56 của SEQ ID NO: 1. Vùng khuôn hoạt động để chỉ rõ trình tự của phần lặp lại đoạn cuối mà telomeraza bổ sung vào các đầu cuối của nhiễm sắc thể và là thiết yếu đối với hoạt tính của enzym telomeraza (xem tài liệu: Chen *et al.*, *Cell* 100:503-514, 2000; Kim *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 98(14):7982-7987, 2001). Do đó, các hợp chất đang được quan tâm mà chứa gốc polynucleotit có trình tự hỗ trợ cho toàn bộ hoặc một phần của vùng khuôn được quan tâm. Một vùng đích khác đang được quan tâm là vùng trải dài qua các nucleotit 137 đến 179 của hTR (xem tài liệu: Pruzan *et al.*, *Nucl. Acids Research*, 30:559-588, 2002). Trong vùng này, trình tự trải dài qua 141 đến 153 là đích được ưu tiên. Công bố đơn PCT số WO 98/28442 bộc lộ việc sử dụng các polynucleotit có chiều dài gồm ít nhất là 7 nucleotit để ức chế telomeraza, trong đó các polynucleotit được thiết kế để hỗ trợ cho các phần có thể tiếp cận được của trình tự hTR bên ngoài vùng khuôn, kể cả các nucleotit 137 đến 196, 290 đến 319, và 350 đến 380 của hTR.

Vùng của O mà được hướng đích đến trình tự hTR, trong một số trường hợp,

bổ trợ một cách chính xác cho trình tự hTR tương ứng. Trong khi các lỗi khớp có thể được cho phép trong các trường hợp nhất định, thì chúng được dự kiến làm giảm mức độ đặc hiệu và hoạt tính của thể tiếp hợp polynucleotit thu được. Theo một số phương án, trình tự bazơ của polynucleotit O được lựa chọn theo cách đó để bao gồm trình tự gồm ít nhất là 5 nucleotit bổ trợ một cách chính xác cho ARN telomeraza, và mức độ ức chế telomeraza có thể được tăng nếu sử dụng trình tự bổ trợ với chiều dài gia tăng, như ít nhất là 6, ít nhất là 7, ít nhất là 8, ít nhất là 10, ít nhất là 12, ít nhất là 13 hoặc ít nhất là 15 nucleotit bổ trợ một cách chính xác cho ARN telomeraza. Theo các phương án khác, trình tự của polynucleotit bao gồm trình tự gồm từ ít nhất là 7 đến 20, từ ít nhất là 8 đến 20, từ ít nhất là 10 đến 20 hoặc từ ít nhất là 10 đến 15 nucleotit bổ trợ một cách chính xác cho trình tự ARN telomeraza. Có thể đạt được hoạt tính ức chế telomeraza tối ưu khi chiều dài đầy đủ của polynucleotit O được lựa chọn để bổ trợ cho ARN telomeraza. Tuy nhiên, không cần toàn bộ chiều dài của thành phần polynucleotit bổ trợ một cách chính xác cho trình tự đích, và trình tự polynucleotit có thể bao gồm các vùng mà không bổ trợ cho trình tự đích. Các vùng này có thể được bổ sung, ví dụ, để đem lại các tính chất khác cho hợp chất này, như các trình tự mà tạo thuận lợi cho việc tinh chế. Nếu thành phần O của polynucleotit bao gồm các vùng mà không bổ trợ cho trình tự đích, thì các vùng này có thể nằm ở một hoặc cả hai đầu tận cùng 5' hoặc 3'. Trong các trường hợp khi vùng có tính bổ trợ chính xác được hướng đích đến vùng khuôn, thì có thể đạt được mức ức chế telomeraza hữu hiệu với vùng ngắn (5 đến 8 nucleotit) có tính bổ trợ chính xác mà trình tự giống telomeraza (giàu G) được nối vào đó ở đầu mút 5'.

Các trình tự làm ví dụ mà bổ trợ cho ARN telomeraza của người và các trình tự mà được đưa vào làm một phần của thành phần polynucleotit O, hoặc các trình tự này có thể được sử dụng làm toàn bộ thành phần polynucleotit O bao gồm các loại dưới đây:

các trình tự bổ trợ hTR (các vùng của trình tự polynucleotit SEQ ID NO:1 theo công bố đơn Mỹ số 2012329858);

(SEQ ID NO: 1)

GGGUUGCGGA GGGUGGGCCU GGGAGGGGUG GUGGCCAUUU

UUUGUCUAAC CCUAACUGAG AAGGGCGUAG GCGCCGUGCU
UUUGCUCUCCC GCGCGCUGUU UUUCUCGCUG ACUUUCAGCG
GGCGGAAAAG CCUCGGCCUG CCGCCUCCA CCGUUCAUUC
UAGAGCAAAC AAAAAAUGUC AGCUGCUGGC CCGUUCGCCC
CUCCCGGGGA CCUGCGGCGG GUCGCCUGCC CAGCCCCGA
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: 2)

GCTCTAGAATGAACGGTGGAAGGCGGCAGG 137-166

(SEQ ID NO: 6)

GTGGAAGGCGGCAGG 137-151

(SEQ ID NO: 7)

GGAAGGCGGCAGG 137-149

(SEQ ID NO: 8)

GTGGAAGGCGGCA 139-151

(SEQ ID NO: 9)

TGGAAGGCGG 141-151

(SEQ ID NO: 10)

CGGTGGAAGGCGG 141-153

(SEQ ID NO: 11)

ACGGTGGAAGGCG 142-154

(SEQ ID NO: 12)

AACGGTGGAAGGCGC 143-155

(SEQ ID NO: 13)

ATGAACGGTGGAAGGCGG 144-158

(SEQ ID NO: 14)

ATTTTTTGTTTGCTCTAG 160-179

(SEQ ID NO: 3)

TAGGGTTAGACAA 42-54

(SEQ ID NO: 4)

GTTAGGGTTAG 46-56

(SEQ ID NO: 15)

GTTAGGGTTAGAC 44-56

(SEQ ID NO: 16)

GTTAGGGTTAGACAA 42-56

(SEQ ID NO: 19)

GGGTTAGAC 44-52

(SEQ ID NO: 20)

CAGTTAGGG 50-58

(SEQ ID NO: 17)

CCCTTCTCAGTT 54-65

(SEQ ID NO: 18)

CGCCCTTCTCAG 56-67

Theo một số phương án, polynucleotit bao gồm trình tự được chọn từ nhóm gồm: GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO:4); TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3); và CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID NO:5).

Việc lựa chọn loại liên kết liên nucleosit được sử dụng trong quá trình tổng hợp thành phần O có thể được thực hiện từ tác nhân hóa học bất kỳ trong số các tác nhân hóa học polynucleotit sẵn có, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các liên kết phosphodiester, phosphotriester, methylphosphonat, P3'→N5' phosphoramidat, N3'→P5' phosphoramidat, N3'→P5' thiophosphoramidat, và phosphorothioat. Theo một số phương án, thành phần O của polynucleotit có ít nhất là một liên kết N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo các phương án nhất định, các cấu trúc siêu phân tử nucleosit hỗ trợ cho thành phần ARN của telomera của người đều được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử N3'→P5' thiophosphoramidat. Trong các trường hợp nhất định, liên kết liên cấu trúc siêu phân tử N3'→P5' thiophosphoramidat có cấu trúc dưới đây:



trong đó R là hydro, hoặc muối của nó. Cần phải hiểu rằng đối với thành phần bất kỳ trong số các thành phần polynucleotit O được bộc lộ trong bản mô tả này mà bao gồm liên kết liên cấu trúc siêu phân tử đó, các thành phần polynucleotit O đó còn có thể bao gồm dạng muối thuận tiện bất kỳ của liên kết này. Do vậy, liên kết liên cấu trúc siêu phân tử có thể ở dạng muối mà bao gồm ion đối thuận tiện bất kỳ.

Theo một số phương án, ít nhất là hai cấu trúc siêu phân tử trong số các cấu trúc siêu phân tử nucleosit này được nối bằng liên kết liên cấu trúc siêu phân tử

N3'→P5' thiophosphoramidat, và các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử khác mà được chọn một cách độc lập từ các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử N3'→P5' oxo-phosphoramidat và N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo một số phương án, các cấu trúc siêu phân tử nucleosit được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử mà được lựa chọn một cách độc lập từ các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử N3'→P5' oxo-phosphoramidat và N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo một số phương án, các cấu trúc siêu phân tử nucleosit được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử mà được lựa chọn một cách độc lập từ các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử N3'→P5' oxo-phosphoramidat và N3'→P5' thiophosphoramidat; với điều kiện rằng ít nhất là hai cấu trúc siêu phân tử trong số các cấu trúc siêu phân tử nucleosit này được nối bằng liên kết liên cấu trúc siêu phân tử N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo một số phương án, các cấu trúc siêu phân tử nucleosit đều được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử N3'→P5' thiophosphoramidat.

Theo một số phương án, thành phần O của polynucleotit có trình tự TAGGG-TTAGACAA (SEQ ID NO:3), và các cấu trúc siêu phân tử nucleosit được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử bao gồm ít nhất là một liên kết N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo một số phương án, thành phần O của polynucleotit có trình tự TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3), và các cấu trúc siêu phân tử nucleosit được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử bao gồm ít nhất hai liên kết N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo một số phương án, thành phần O của polynucleotit có trình tự TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3), và các cấu trúc siêu phân tử nucleosit được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử bao gồm ít nhất là ba liên kết N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo một số phương án, thành phần O của polynucleotit có trình tự TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3), và các cấu trúc siêu phân tử nucleosit được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử bao gồm ít nhất là bốn liên kết N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo một số phương án, thành phần O của polynucleotit có trình tự TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3), và các cấu trúc siêu phân tử nucleosit được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử bao gồm ít nhất là năm liên kết N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo một số phương án, thành phần O của polynucleotit có trình tự TAGGGTTAGACAA

(SEQ ID NO:3), và các cấu trúc siêu phân tử nucleosit được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử bao gồm ít nhất sáu liên kết N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo một số phương án, thành phần O của polynucleotit có trình tự TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3), và các cấu trúc siêu phân tử nucleosit được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử bao gồm ít nhất là bảy liên kết N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo một số phương án, thành phần O của polynucleotit có trình tự TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3), và các cấu trúc siêu phân tử nucleosit được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử bao gồm ít nhất là tám liên kết N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo một số phương án, thành phần O của polynucleotit có trình tự TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3), và các cấu trúc siêu phân tử nucleosit được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử bao gồm ít nhất là chín liên kết N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo một số phương án, thành phần O của polynucleotit có trình tự TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3), và các cấu trúc siêu phân tử nucleosit được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử bao gồm ít nhất là mười liên kết N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo một số phương án, thành phần O của polynucleotit có trình tự TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3), và các cấu trúc siêu phân tử nucleosit được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử bao gồm ít nhất là mười một liên kết N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo một số phương án, thành phần O của polynucleotit có trình tự TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3), và các cấu trúc siêu phân tử nucleosit được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử mà mỗi dạng được lựa chọn một cách độc lập từ các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử N3'→P5' oxo-phosphoramidat và N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo một số phương án, thành phần O của polynucleotit có trình tự TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3), và các cấu trúc siêu phân tử nucleosit được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử mà được chọn một cách độc lập từ các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử N3'→P5' oxo-phosphoramidat và N3'→P5' thiophosphoramidat; với điều kiện là ít nhất là hai cấu trúc siêu phân tử trong số các cấu trúc siêu phân tử nucleosit này được nối bằng liên kết liên cấu trúc siêu phân tử N3'→P5' thiophosphoramidat. Theo một số phương án, thành phần O của polynucleotit có trình tự TAGGGTTAGACAA (SEQ ID

NO:3), và các cấu trúc siêu phân tử nucleosit đều được nối bằng liên kết liên cấu trúc siêu phân tử $N3' \rightarrow P5'$ thiophosphoramidat.

Theo tất cả các phương án trên đây và dưới đây, cụ thể là, các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử $N3' \rightarrow P5'$ thiophosphoramidat là $-NH-P(=O)(SH)-O-$ hoặc chất đồng phân hỗn biến của chúng, hoặc muối của chúng; và cụ thể là, các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử $N3' \rightarrow P5'$ oxo-phosphoramidat là $-NH-P(=O)(OH)-O-$ hoặc chất đồng phân hỗn biến của chúng, hoặc muối của chúng. Cụ thể hơn là, theo tất cả các phương án trên đây và sau đây, cụ thể là, liên kết liên cấu trúc siêu phân tử $N3' \rightarrow P5'$ thiophosphoramidat là $-NH-P(=O)(SH)-O-$ hoặc chất đồng phân hỗn biến của chúng, hoặc muối natri của chúng; và cụ thể là, các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử $N3' \rightarrow P5'$ oxo-phosphoramidat là $-NH-P(=O)(OH)-O-$ hoặc chất đồng phân hỗn biến của chúng, hoặc muối natri của chúng.

Theo một phương án trong số các phương án này, sáng chế đề xuất cấu trúc bất kỳ trong số các cấu trúc cụ thể được bộc lộ trong bản mô tả này, trong đó tùy ý một hoặc nhiều, cụ thể là một, liên kết liên cấu trúc siêu phân tử $N3' \rightarrow P5'$ thiophosphoramidat được thế bằng liên kết liên cấu trúc siêu phân tử $N3' \rightarrow P5'$ oxo-phosphoramidat. Theo một phương án trong số các phương án này, sáng chế đề xuất cấu trúc bất kỳ trong số các cấu trúc cụ thể được bộc lộ trong bản mô tả này trong đó một hoặc nhiều, cụ thể là một, liên kết liên cấu trúc siêu phân tử $N3' \rightarrow P5'$ thiophosphoramidat được thế bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử $N3' \rightarrow P5'$ oxo-phosphoramidat.

Trong một số trường hợp, các hợp chất theo sáng chế có hiệu quả hơn trong việc gây ức chế telomeraza ở tế bào so với các polynucleotit tương ứng mà không được tiếp hợp với thành phần lipit. Đã biết rằng thành phần L của lipit hoạt động để gia tăng mức hấp thụ hợp chất vào tế bào, cụ thể là tạo thuận lợi cho sự di chuyển qua màng tế bào. Trong khi cơ chế xảy ra hiện tượng này chưa được làm sáng tỏ hoàn toàn, có khả năng là thành phần lipit có thể tạo thuận lợi sự liên kết hợp chất vào màng tế bào ở dạng phân tử đơn lẻ, hoặc dạng thể kết tụ (mixen), với hiện tượng nội bào hóa kế tiếp. Tuy nhiên, hiểu biết chính xác về cơ chế là không cần thiết đối với các hợp chất theo sáng chế sẽ được sử dụng.

Thành phần lipit có thể là lipit hoặc dẫn xuất lipit bất kỳ mà làm tang mức độ hấp thụ vào tế bào so với polynucleotit không được cải biến. Các lipit đang được quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hydrocacbon, các chất béo (ví dụ, glyxerit, axit béo và dẫn xuất axit béo, như amit béo) và sterol. Khi thành phần lipit là hydrocacbon, thành phần L có thể là hydrocacbon dạng vòng đã được thế hoặc không được thế hoặc hydrocacbon béo mạch thẳng hoặc mạch nhánh, mà có thể là no hoặc không no. Các ví dụ bao gồm các hydrocacbon mạch thẳng không nhánh mà no hoàn toàn hoặc không no ở nhiều liên kết. Chiều dài của mạch hydrocacbon có thể thay đổi từ C2 đến C30, nhưng có thể đạt được mức ức chế telomeraza tối ưu với các mạch cacbon C8 đến C22. Các ví dụ về hydrocacbon no (alkan) đang được quan tâm được liệt kê dưới đây:

Tên theo hệ thống / Mạch cacbon

Tetradecan $C_{14}H_{30}$

Pentadecan $C_{15}H_{32}$

Hexadecan $C_{16}H_{34}$

Heptadecan $C_{17}H_{36}$

Octadecan $C_{18}H_{38}$

Nonadecan $C_{19}H_{40}$

Eicosan $C_{20}H_{42}$

Dạng không no một lần và nhiều lần (alken và polyen, như alkadien và alkatrien) của các hydrocacbon cũng có thể được chọn, trong đó các hợp chất có một đến ba liên kết đôi đang được quan tâm, mặc dù hợp chất có nhiều liên kết đôi hơn có thể được sử dụng. Các alkyn (chứa một hoặc nhiều liên kết ba) và các alkenyn ((các) liên kết ba và (các) liên kết đôi) cũng có thể được sử dụng.

Các dạng đã được thế của hydrocacbon có thể được sử dụng ở các hợp chất theo sáng chế, với các nhóm phần tử thế là *in vivo* và *in vitro* được quan tâm. Trong một số trường hợp, phần tử thế là flo. Các cấu trúc chung làm ví dụ của các hydrocacbon đã được flo hóa bao gồm: $CF_3(CF_2)_n-(CH_2)_m-$, trong đó m ít nhất bằng 1, trong một số trường hợp ít nhất bằng 2, và n nằm trong khoảng từ 1 đến 30, như

flotridecan: $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_9(\text{CH}_2)_3$; và $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a(\text{CF}_2)_b(\text{CH}_2)_c$ - trong đó a, b và c độc lập bằng 1 đến 30.

Các thành phần lipid thích hợp khác đang được quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit béo đơn giản và chất dẫn xuất của axit béo, glyxerit và các lipid phức hợp hơn như sterol, ví dụ, cholesterol. Axit béo và các chất dẫn xuất đang được quan tâm của chúng có thể là hoàn toàn no hoặc chứa một hoặc nhiều liên kết không no. Chiều dài của mạch cacbon có thể thay đổi từ C2 đến C30, nhưng có thể đạt được mức ức chế telomera tối ưu với các mạch cacbon C8 đến C22. Các ví dụ về axit béo no đang được quan tâm được liệt kê dưới đây:

Tên theo hệ thống / Tên thông dụng / Mạch cacbon

Tetradecanoic myristic 14:0

Hexadecanoic palmitic 16:0

Octadecanoic stearic 18:0

Eicosanoic arachidic 20:0

Dạng chứa một và dạng chứa nhiều liên kết không no của axit béo cũng có thể được sử dụng, với các hợp chất có một đến ba liên kết đôi là đang được quan tâm, mặc dù các hợp chất có nhiều liên kết đôi hơn cũng có thể được sử dụng. Các ví dụ về axit béo chứa một liên kết không no và axit béo chứa nhiều liên kết không no thông thường đang được quan tâm mà có thể được sử dụng bao gồm:

Tên theo hệ thống / Tên thông dụng / Mạch cacbon

Cis-9-hexadecanoic palmitoleic 16:1(n-7)

Cis-6-octadecanoic petroselinic 18:1 (n-12)

Cis-9-octadecanoic oleic 18:1 (n-9)

9,12-octadecadienoic linoleic 18:2 (n-6)

6,9,12-octadecatrienoic gamma-linoleic 18:3 (n-6)

9,12,15-octadecatrienoic alpha-linoleic 18:3 (n-3)

5,8,11,14-eicosatetraenoic arachidonic 20:4 (n-6)

Các axit béo có một hoặc nhiều liên kết ba trong mạch cacbon, cũng như axit

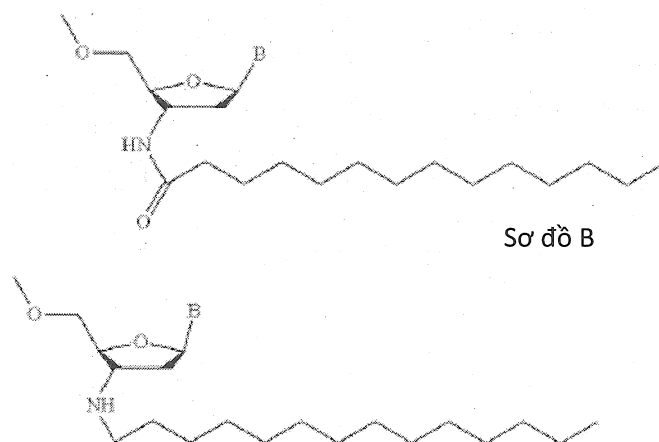
béo mạch nhánh cũng có thể được sử dụng ở các hợp chất theo sáng chế. Các dạng đã được thể của axit béo có thể được sử dụng ở các hợp chất theo sáng chế. Như với các nhóm hydrocacbon, các nhóm phân tử thể mà *trở in vivo* và *in vitro* là đang được quan tâm, như flo. Các cấu trúc chung làm ví dụ về chất dẫn xuất đã được hợp flo nhiều lần của axit béo thích hợp để dùng theo sáng chế là: $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n-(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$ trong đó m ít nhất bằng 1, tốt hơn nếu ít nhất bằng 2, và n bằng 1 đến 30, và $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a(\text{CF}_2)_b(\text{CH}_2)_c\text{CO}-$ trong đó a , b và c độc lập bằng 1 đến 30.

Trong một số trường hợp, từ một đến năm thành phần L (n bằng 1, 2, 3, 4 hoặc 5) được liên kết cộng hóa trị với thành phần O , thông qua một gốc liên kết tùy ý. Trong một số trường hợp, một hoặc hai thành phần L được dùng ($n=1$ hoặc 2). Khi nhiều hơn một thành phần L được liên kết với hợp phần O , mỗi thành phần L được chọn một cách độc lập.

Cần hiểu rằng các hợp chất theo sáng chế được mô tả là có hydrocacbon chỉ định làm gốc L và hợp chất được mô tả là có axit béo chỉ định (với cùng số nguyên tử cacbon như hydrocacbon chỉ định) là liên quan gần và chỉ khác biệt về cấu trúc ở bản chất của liên kết mà nối gốc L với polynucleotit, mà chính là kết quả của quy trình tổng hợp được áp dụng để tạo ra hợp chất này. Ví dụ, và như được mô tả chi tiết hơn dưới đây, khi các hợp chất được tổng hợp có gốc L đã được tiếp hợp vào đầu tận cùng 3'-amin của polynucleotit (có các liên kết liên nucleosit phosphoramidat hoặc thiophosphoramidat), việc sử dụng dạng aldehyt của axit béo (aldehyt béo) làm nguyên liệu ban đầu khiến tạo ra liên kết amin giữa mạch lipid và polynucleotit, sao cho nhóm lipid xuất hiện như hydrocacbon. Trái lại, việc sử dụng các dạng axit cacboxylic, anhydrua axit hoặc clorua axit của cùng một axit béo khiến tạo ra liên kết amit, sao cho nhóm lipid xuất hiện như chất dẫn xuất axit béo, đặc biệt là trong trường hợp này amit béo (như đã nêu ở phần định nghĩa trên đây, để đơn giản, thuật ngữ “axit béo” khi mô tả nhóm L đã được tiếp hợp được sử dụng theo nghĩa rộng trong bản mô tả này để bao gồm chất dẫn xuất axit béo, kể cả amit béo). Điều này được minh họa ở các sơ đồ dưới đây, mà thể hiện đầu tận cùng 3'-amin của polynucleotit phosphoramidat đã được nối vào thành phần lipid C14. Trên sơ đồ A, L là axit tetradecanoic (axit myristic), mà trong đó kết nối giữa nhóm L và nhóm

O là amit. Trên sơ đồ B, L là tetradecan, và kết nối giữa nhóm L và nhóm O là amin.

Sơ đồ A

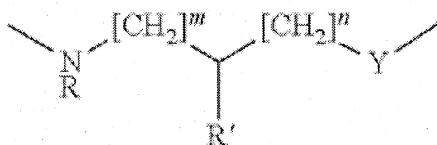


Liên kết giữa thành phần O và thành phần L có thể là liên kết trực tiếp, hoặc có thể là thông qua gốc liên kết tùy ý, ví dụ, x hoặc gốc liên kết tùy ý T của công thức (I). Nhóm gốc liên kết có thể hoạt động để tạo thuận lợi cho việc tổng hợp các hợp chất về mặt hóa học. Dù nhóm gốc liên kết được sử dụng để làm trung gian cho việc tiếp hợp thành phần O và thành phần L hay không, thì vẫn có nhiều vị trí trên thành phần O của polynucleotit mà có thể được tiếp hợp một cách thuận tiện vào (các) thành phần L. Các điểm liên kết thích hợp bao gồm đầu tận cùng 5' và đầu tận cùng 3', một hoặc nhiều nhân đường, mạch chính liên nucleosit và các nucleobazo của polynucleotit. Trong một số trường hợp, gốc L được gắn vào đầu tận cùng 3' hoặc 5' của polynucleotit.

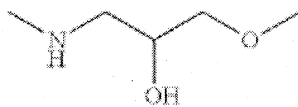
Nếu thành phần L được để gắn vào đầu tận cùng 3', thì có thể gắn một cách trực tiếp vào phần tử thế 3', mà trong trường hợp của các polynucleotit phosphoramidat và thiophosphoramidat được ưu tiên là nhóm 3'-amin, và trong các trường hợp khác, như các polynucleotit phosphodiester thông thường, là nhóm 3-hydroxy. Theo cách khác, gốc L có thể được liên kết thông qua nhóm phosphat đã được liên kết ở 3', mà trong đó hydrocarbon hexadecan được liên kết vào 3' phosphat của polynucleotit thiophosphoramidat thông qua gốc liên kết O-alkyl. Nếu gốc L được để liên kết vào đầu tận cùng 5', thì nó có thể được gắn thông qua nhóm phosphat đã được liên kết ở 5'. Việc gắn vào bazơ trên gốc O có thể thông qua nguyên tử thích hợp bất kỳ, ví dụ, vào nhóm amin N2 của guanosin. Khi $n > 1$ sao

cho nhiều gốc lipid được để gắn kết vào thành phần O, thì từng thành phần L đã được chọn một cách riêng biệt có thể được gắn ở (các) vị trí thuận tiện bất kỳ. Ví dụ, một nhóm L có thể được gắn vào từng đầu tận cùng, các nhóm L khác nhau có thể được gắn vào các bazơ, hoặc hai hoặc nhiều nhóm L có thể được gắn ở một đầu tận cùng.

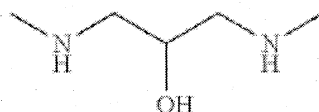
Thành phần gốc liên kết tùy ý x có thể được sử dụng để nối thành phần O và thành phần L của các hợp chất. Cần phải hiểu rằng gốc liên kết tùy ý (ví dụ, x, hoặc T của công thức (I)) có thể được gắn vào polynucleotit (ví dụ, O) thông qua nhóm phosphat ở đầu tận cùng, ví dụ, nhóm phosphat được liên kết ở 3' hoặc nhóm phosphat được liên kết ở 5'. Nếu gốc liên kết được sử dụng, thì nó được tích hợp vào quy trình tổng hợp như được bộc lộ trong bản mô tả này. Các ví dụ về nhóm gốc liên kết thích hợp bao gồm gốc liên kết amin glyxerol và gốc liên kết loại O-alkyl glyxerol mà có thể được thể hiện lần lượt bằng các cấu trúc chung:



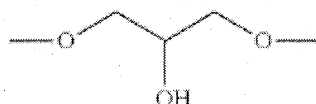
trong đó R' là H, OH, NH₂ hoặc SH; Y là O, S hoặc NR; R là H, alkyl hoặc alkyl được thế; và mỗi n và m độc lập là các số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 18. Các ví dụ về gốc liên kết thích hợp đang được quan tâm là gốc liên kết aminglyxerol, trong đó R' là OH, Y là O, và mỗi m và n đều bằng 1:



gốc liên kết bis-aminglyxerol, trong đó R' là OH, Y là NH, và mỗi m và n đều bằng 1:

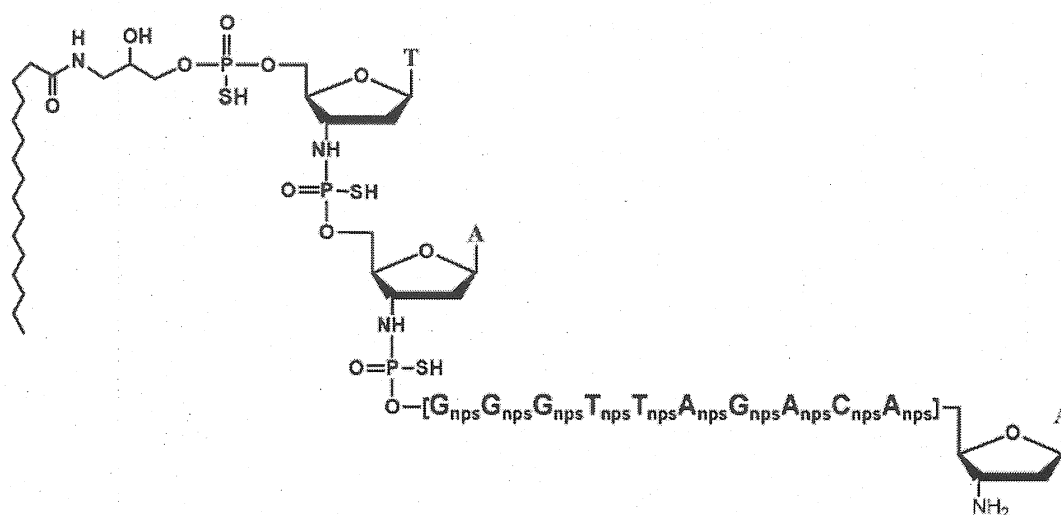


và gốc liên kết O-alkyl glyxerol, trong đó R là H:



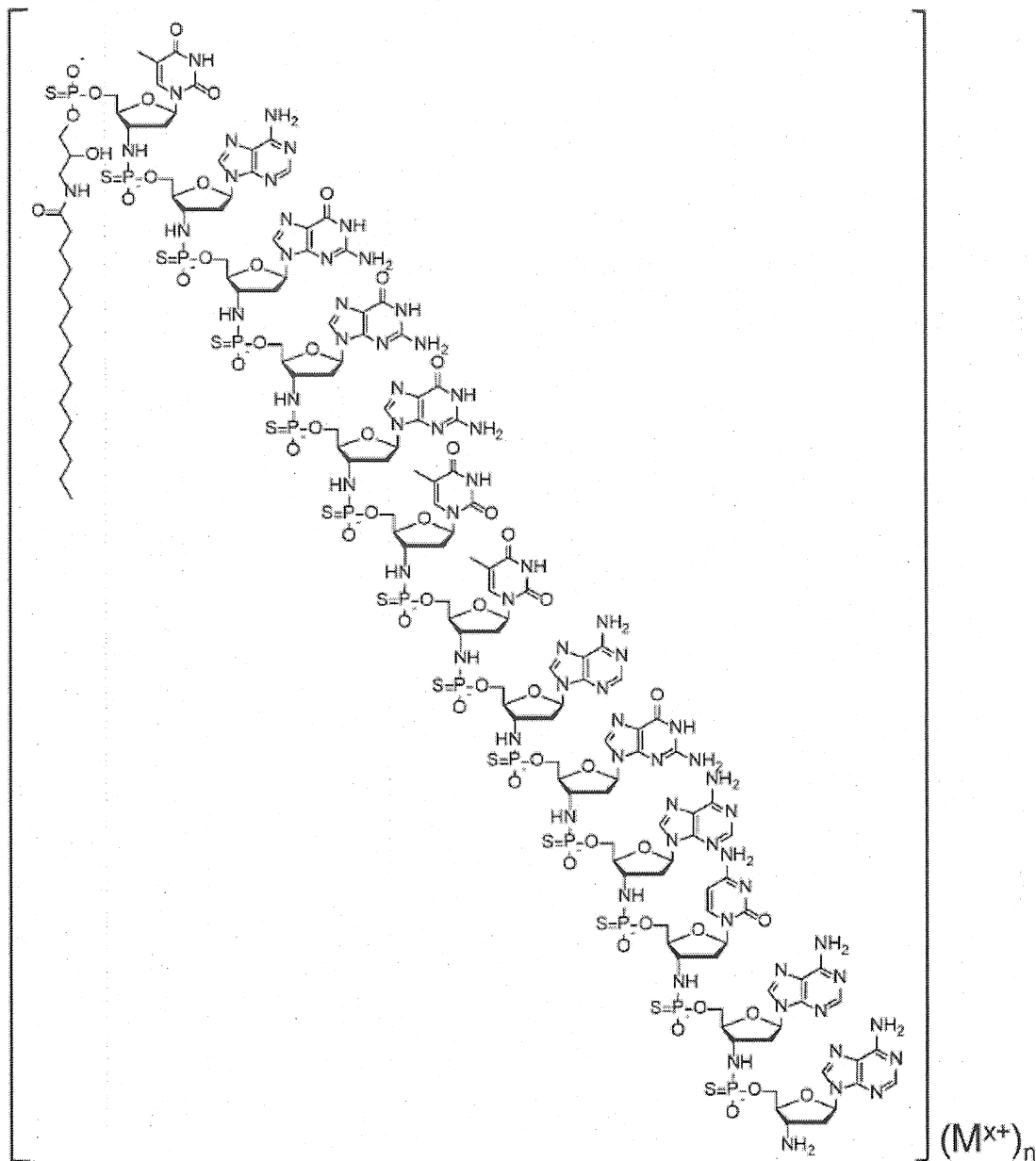
Các polynucleotit đã được cải biến lipid làm ví dụ mà có thể được điều chế theo các phương pháp theo sáng chế bao gồm các hợp chất được thể hiện ở Hình 1 (ví dụ, các Hình 1A đến 1DD) của đơn đăng ký sáng chế Mỹ số US20120329858 của Gryaznov và các đồng tác giả “*Modified oligonucleotides for telomerase inhibition*”, nội dung của tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm bao gồm hợp chất được thể hiện bằng cấu trúc:



hoặc muối của chúng, trong đó “nps” thể hiện liên kết thiophosphoramidat (ví dụ, -NH-P(=O)(SH)-O- hoặc chất đồng phân hỗn hợp của nó, hoặc muối của nó), nối 3'-cacbon của một nucleosit vào 5'-cacbon của nucleosit liền kề. Cần phải hiểu rằng hợp chất được thể hiện ở công thức trên đây có thể tồn tại ở dạng muối. Khi có thể tồn tại, dạng này được dự tính trong phạm vi của sáng chế. Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa muối được dụng của hợp chất. Trong các trường hợp nhất định, chế phẩm chứa muối natri của hợp chất. Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa muối cation có hóa trị hai của hợp chất, như muối magie của hợp chất. Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa muối cation có hóa trị ba của hợp chất, như muối nhôm của hợp chất.

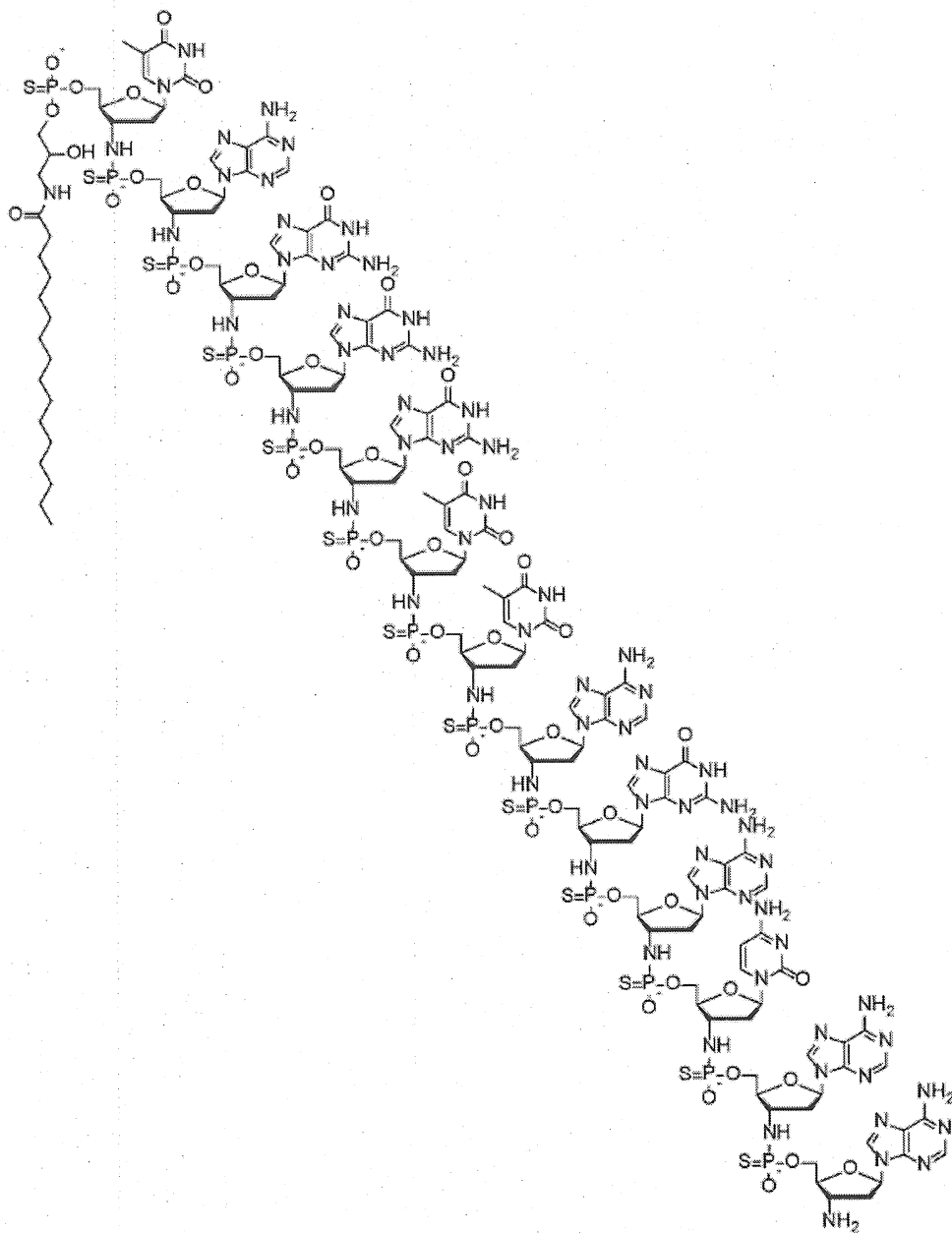
Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa hợp chất được thể hiện bằng cấu trúc dưới đây:



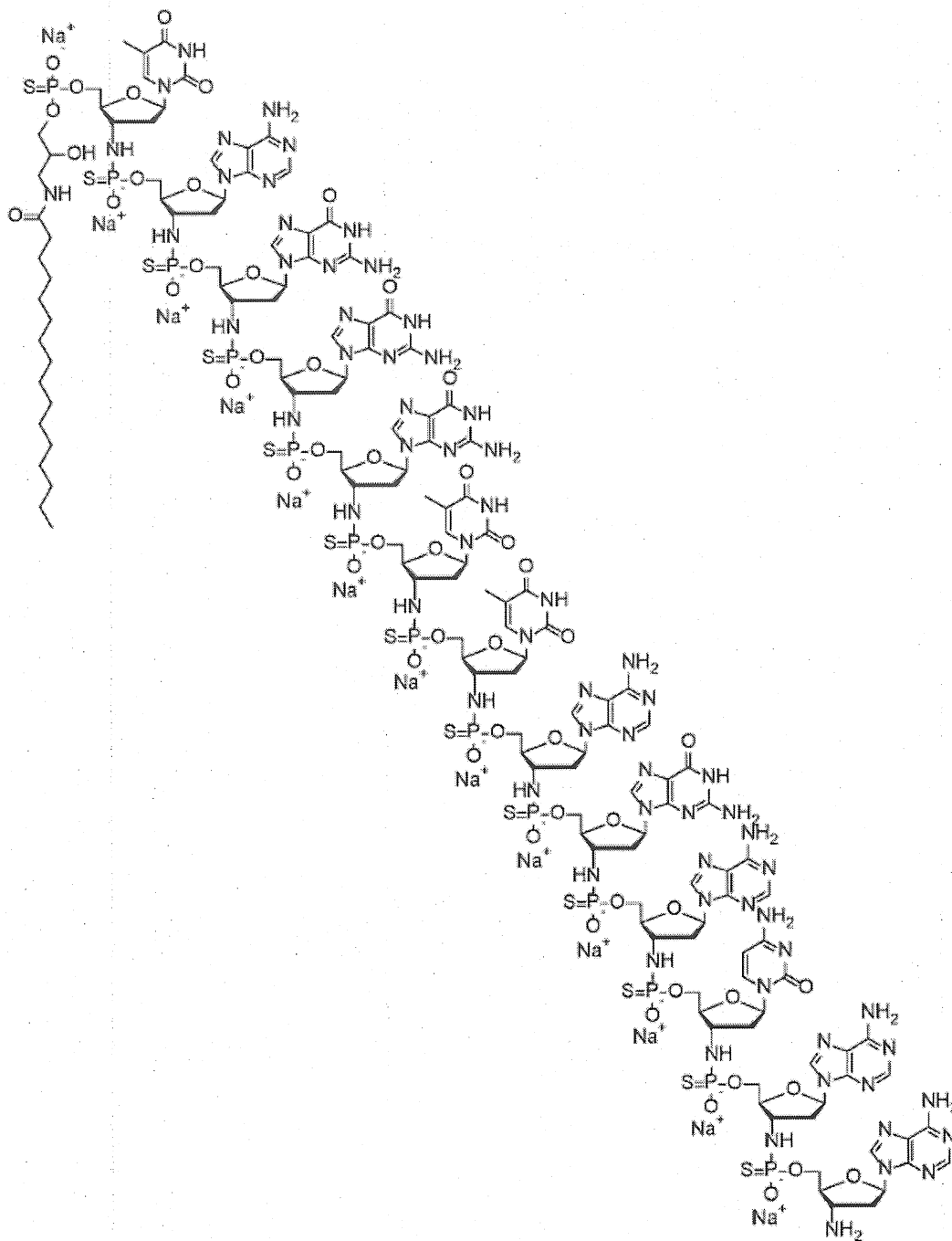
trong đó mỗi M^{x+} độc lập là hydro hoặc ion đối thuận tiện bất kỳ của muối, mỗi x độc lập bằng 1, 2 hoặc 3 và n là số nguyên nằm trong khoảng từ 5 đến 13. Trong một số trường hợp, n bằng 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 hoặc 13. Trong các trường hợp nhất định, mỗi x độc lập bằng 1, 2 hoặc 3 và n là số nguyên nằm trong khoảng từ 5 đến 12. Trong các trường hợp nhất định, n bằng 13. Trong các trường hợp nhất định, mỗi x bằng 1. Trong các trường hợp nhất định, mỗi x độc lập bằng 1 hoặc 2. Trong các trường hợp nhất định, mỗi x độc lập bằng 1 hoặc 3. Trong các trường hợp nhất định, mỗi M^{x+} độc lập là ion đối cation. Trong các trường hợp nhất định, mỗi M^{x+} độc lập là ion đối cation, mỗi x độc lập bằng 1, 2 hoặc 3 và n là số nguyên nằm trong khoảng từ 5 đến 12. Trong các trường hợp nhất định, mỗi M^{x+} độc lập là hydro hoặc ion đối

cation thuận tiện bất kỳ, mỗi x độc lập bằng 1, 2 hoặc 3 và n là số nguyên nằm trong khoảng từ 5 đến 12. Trong các trường hợp nhất định, M^{x+} là hydro. Theo một số phương án, $(M^{x+})_n$ là $(Mg^{2+})(M^+)_{11}$. Theo một số phương án, $(M^{x+})_n$ là $(Mg^{2+})_2(M^+)_{10}$. Theo một số phương án, $(M^{x+})_n$ là $(Mg^{2+})_2(M^+)_{10}$. Theo một số phương án, $(M^{x+})_3$ là $(Mg^{2+})_3(M^+)_{10}$. Theo một số phương án, $(M^{x+})_n$ là $(Mg^{2+})_4(M^+)_{10}$. Theo một số phương án, $(M^{x+})_n$ là $(Mg^{2+})_5(M^+)_{10}$. Theo một số phương án, $(M^{x+})_n$ là $(Mg^{2+})_6(M^+)_{10}$. Theo một số phương án, $(M^{x+})_n$ là $(Mg^{2+})(M^+)_{12}$, trong đó ion đối Mg^{2+} có thể tạo ra một cặp ion bổ sung với mạch chính anion của một oligonucleotit khác. Theo một số phương án, $(M^{x+})_n$ là $(Mg^{2+})_2(M^+)_{11}$, trong đó các ion đối Mg^{2+} có thể tạo hai cặp ion bổ sung với (các) mạch chính anion của một hoặc hai oligonucleotit khác. Trong các trường hợp nhất định, ion đối M^+ của muối magie hỗn hợp là natri. Trong các trường hợp nhất định, ion đối M^+ của muối magie hỗn hợp là amoni. Trong các trường hợp nhất định, ion đối M^+ của muối magie hỗn hợp là triethylamoni.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa hợp chất được thể hiện bằng cấu trúc dưới đây và có thể bao gồm các ion đối cation thuận tiện bất kỳ của muối:



Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa hợp chất được thể hiện bằng cấu trúc:



Các polynucleotit đã được cải biến của lipid

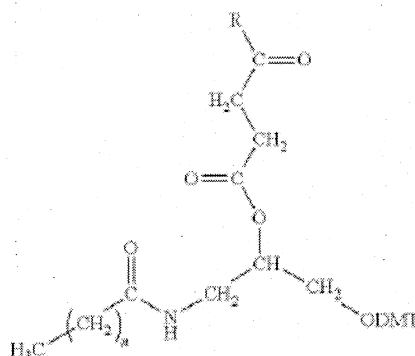
Các phương pháp tổng hợp khác nhau có thể được áp dụng để tiếp hợp gốc lipid L vào polynucleotit, tùy theo bản chất của liên kết được chọn, kể cả các phương pháp đã được bộc lộ trong tài liệu: Mishra *et al.*, (1995) *Biochemica et Biophysica Acta*, 1264:229- 237, Shea *et al.*, (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:3777-3783, và Rump *et al.*, (1998) *Bioconj. Chem.* 9:341-349. Quy trình tổng hợp các hợp chất mà trong đó gốc lipid được tiếp hợp ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của polynucleotit có thể đạt được thông qua việc sử dụng các nhóm chức thích hợp ở đầu tận cùng

thích hợp, trong một số trường hợp là nhóm amin hoặc nhóm hydroxyl, mà có thể cho phản ứng với axit cacboxylic, axit clorua, anhydrit và các este có hoạt tính. Các nhóm thiol cũng có thể được sử dụng làm nhóm chức (xem tài liệu: Kupihar *et al.*, (2001) *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 9:1241-1247). Cả hai dạng cải biến amin và thiol có chiều dài mạch khác nhau đều sẵn có trên thị trường để dùng cho việc tổng hợp polynucleotit. Polynucleotit có liên kết N3'→P5' thiophosphoramidat chứa nhóm 3'-amin (hơn là 3'-hydroxy được tìm thấy ở hầu hết các hóa chất polynucleotit thông thường), và do đó các polynucleotit này là cơ hội duy nhất để tiếp hợp các nhóm lipid vào đầu tận cùng 3' của polynucleotit.

Các phương pháp khác nhau có thể được áp dụng để gắn nhóm lipid vào các đầu tận cùng của các polynucleotit bằng tác nhân hóa học N3'→P5' thiophosphoramidat (ví dụ, gốc liên kết palmitoylamit-1-O-(4,4'-dimetoxytrityl)-2-O-suxinyl propaediol). Để gắn vào đầu tận cùng 3', các hợp chất đã được tiếp hợp có thể được tổng hợp bằng cách cho nhóm 3'-amin tự do của polynucleotit đã được liên kết vào nền rắn được bảo vệ hoàn toàn phản ứng với axit anhydrua tương ứng, tiếp theo là khử bảo vệ bằng ammoniac và tinh chế. Theo cách khác, cách liên hợp axit cacboxylic của lipid vào nhóm 3'-amin tự do của polynucleotit đã được liên kết vào nền bằng cách sử dụng chất liên hợp như carbodiimide, HBTU (*N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uron hexaflophosphat) hoặc 2-clo-1-metylpyridin iodua có thể được áp dụng để tiếp hợp nhóm lipid. Hai phương pháp này tạo liên kết amit giữa lipid và polynucleotit. Lipid cũng có thể được gắn vào chuỗi polynucleotit bằng cách sử dụng chất dẫn xuất phosphoramidit của lipid đã được liên hợp với polynucleotit trong quá trình kéo dài chuỗi. Phương pháp này tạo ra liên kết phosphoramidat (ví dụ, thiophosphoramidat) nối lipid và polynucleotit (được minh họa bằng ví dụ là hợp chất propyl-palmitoyl và 2-hydroxy-propyl-palmitoyl). Phương pháp khác nữa bao gồm phản ứng của nhóm 3'-amin tự do của polynucleotit đã được liên kết vào nền được bảo vệ hoàn toàn với aldehyt lipid thích hợp, tiếp theo là khử bằng natri xyanoborohydrua, quá trình này tạo ra liên kết amin.

Để gắn vào đầu tận cùng 5', polynucleotit có thể được tổng hợp bằng cách sử

dụng nền rắn chứa lipit đã được cải biến, sau đó là quá trình tổng hợp polynucleotit theo chiều 5' đến 3' như được mô tả trong tài liệu của Pongracz & Gryaznov (1999). Một ví dụ về nền được cải biến được đề xuất dưới đây. Trong trường hợp $n=14$, axit béo là axit palmitic: phản ứng của 3-amin-1, 2-propanediol với palmitoyl clorua, tiếp đó là việc dimethoxytrityl hóa và suxinyl hóa tạo ra sản phẩm trung gian được sử dụng để liên hợp với nền rắn. Trong một số trường hợp, R có thể là thủy tinh xốp được kiểm soát từ amin alkyl mạch dài. Trong các trường hợp nhất định, R là nền rắn polyme.



TÍNH HỮU DỤNG

Các phương pháp và các chế phẩm theo sáng chế, ví dụ, như được mô tả trên đây, có thể được áp dụng trong một loạt ứng dụng. Các ứng dụng đang được quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: các ứng dụng điều trị bệnh, các ứng dụng chẩn đoán, các ứng dụng nghiên cứu, và các ứng dụng sàng lọc, như được tìm hiểu một cách chi tiết hơn dưới đây.

Các hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng trong một loạt ứng dụng điều trị bệnh. Theo một số phương án, các phương pháp tạo ra polynucleotit được áp dụng để điều chế các polynucleotit mà đem lại lợi ích điều trị bệnh. Các loại bệnh mà có thể điều trị được bằng cách sử dụng các chế phẩm theo sáng chế không bị giới hạn. Ví dụ, các chế phẩm có thể được dùng để điều trị một số bệnh di truyền học. Theo một số phương án, các phương pháp theo sáng chế và các chế phẩm có các ứng dụng đối nghịch. Theo một số phương án, các phương pháp theo sáng chế và các chế phẩm có các ứng dụng kháng nguyên. Theo các phương án nhất định, các phương pháp theo sáng chế và các chế phẩm có tác dụng ức chế telomeraza, như các loại được mô

tả trong bằng sáng chế Mỹ số 6,835,826, và công bố đơn đăng ký sáng chế Mỹ số 20120329858, nội dung bộc lộ của tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Sáng chế đề xuất các hợp chất mà có thể ức chế một cách hiệu nghiệm và đặc hiệu hoạt tính telomerase, và do đó, có thể được dùng để ức chế sự tăng sinh của các tế bào dương tính với telomerase, như các tế bào khối u. Đã thấy nhiều loại tế bào ung thư khác nhau dương tính với telomerase, kể cả tế bào ung thư da, mô liên kết, mỡ, vú, phổi, dạ dày, tụy, buồng trứng, cổ tử cung, tử cung, thận, bàng quang, ruột kết, tuyến tiền liệt, hệ thần kinh trung ương (central nervous system - CNS), võng mạc và u huyết học (như u tủy, bệnh bạch cầu và u bạch huyết). Các loại ung thư đang được quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xơ hóa tủy xương, bệnh tăng tiểu cầu, hội chứng loạn sản tủy và bệnh bạch cầu phát sinh từ tủy xương.

Các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng để điều trị các bệnh huyết học ác tính và các rối loạn tăng sinh tủy, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh tăng tiểu cầu thiết yếu (essential thrombocythemia - ET), bệnh đa hồng cầu (polycythemia vera - PV), bệnh bạch cầu phát sinh từ tủy xương mạn tính (chronic myelogenous leukemia - CML), xơ hóa tủy xương (myelofibrosis - MF), bệnh bạch cầu do bạch cầu trung tính mạn tính, bệnh bạch cầu do bạch cầu ưa eosin mạn tính, và bệnh bạch cầu phát sinh từ tủy xương (myelogenous leukemia - AML) cấp tính. Các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng để điều trị các hội chứng loạn sản tủy, mà bao gồm bệnh như thiếu máu khó chữa, thiếu máu khó chữa dư nguyên bào, bệnh giảm tế bào máu khó chữa kèm loạn sản đa dòng, giảm tế bào máu khó chữa kèm loạn sản đơn dòng, và bệnh bạch cầu tủy bào-bạch cầu đơn nhân to mạn tính (chronic myelomonocytic leukemia - CMML). Các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng để điều trị các bệnh huyết học, như các loại đã được mô tả trong đơn PCT số PCT/US13/070437 nộp ngày 15 tháng 11 năm 2013, phần bộc lộ của tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Do vậy, các hợp chất được đề xuất trong bản mô tả này có thể được dùng một cách rộng rãi trong việc điều trị nhiều loại bệnh ác tính. Trong một số trường hợp,

các hợp chất theo sáng chế có thể là hữu hiệu trong việc điều trị bệnh mà phân biệt giữa tế bào ác tính và tế bào bình thường ở mức độ cao, tránh nhiều tác dụng phụ có hại ở hầu hết các chế độ hóa trị liệu hiện tại mà dựa vào các tác nhân mà tiêu diệt các tế bào đang phân chia một cách bừa bãi. Hơn nữa, trong một số trường hợp, các hợp chất đã được cải biến lipit theo sáng chế là hiệu nghiệm hơn các oligonucleotit không được tiếp hợp tương đương, điều này có nghĩa là chúng có thể được dùng ở liều lượng thấp hơn, có mức độ an toàn cao hơn và giảm đáng kể chi phí của việc điều trị. Chất ức chế telomera có thể được dùng cùng với cách điều trị ung thư khác, kể cả loại bỏ bằng phẫu thuật khối u nguyên phát, hóa trị và xạ trị. Do đó, sáng chế đề xuất các hợp chất và các chế phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này để dùng làm dược phẩm. Sáng chế còn đề xuất các hợp chất và các chế phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này để dùng trong việc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh bất kỳ trong số các bệnh ác tính nêu trên.

Các hợp chất và các phương pháp theo sáng chế có thể được dùng trong các ứng dụng chẩn đoán khác nhau, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phát triển chẩn đoán lâm sàng, ví dụ, chẩn đoán *in vitro* hoặc các tác nhân hiện hình khối u *in vivo*. Các ứng dụng này là hữu dụng trong việc chẩn đoán hoặc xác nhận chẩn đoán về tình trạng bệnh, hoặc tính miễn cảm với bệnh. Các phương pháp này còn hữu dụng để theo dõi tiến triển của bệnh và/hoặc đáp ứng với việc điều trị ở bệnh nhân mà đã được chẩn đoán mắc bệnh.

Các ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sơ lược

Các ví dụ này mô tả các thử nghiệm điều chế các dạng khác nhau có hóa trị hai hoặc hóa trị ba của Imetelstat, như Ca, Ba, Mg, Al, Fe, Cu, và Zn từ muối natri của Imetelstat. Trong các thử nghiệm này, mức cải thiện về độ tinh khiết bằng cách áp dụng các phương pháp điều chế bao gồm việc tạo ra và phân lập các muối của cation hai răng hoặc cation ba răng mà có thể liên kết với một, hai hoặc ba nhóm phosphat của Imetelstat được đánh giá. Độ hòa tan và độ thẩm thấu của các dạng

muối tạo ra cũng được nghiên cứu.

Việc điều chế các muối canxi Imetelstat, bari Imetelstat, magie Imetelstat, nhôm Imetelstat, Fe (II hoặc III) Imetelstat, và đồng Imetelstat được khảo sát bằng cách sử dụng CaCl_2 , MgCl_2 , BaCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 , AlCl_3 , FeCl_2 , và FeCl_3 .

Ba phương pháp áp dụng để trao đổi muối được nghiên cứu: sử dụng nhựa trao đổi cation mạnh (FINEX MFG 210), làm kết tủa, và hòa tan đơn giản. Khi dung dịch natri Imetelstat được cho đi qua nhựa đã được trao đổi với CaCl_2 , BaCl_2 hoặc MgCl_2 , thì các dung dịch rửa giải chứa bột mịn, biểu thị rằng các ion đổi natri đã được trao đổi một cách thành công ra khỏi mạch chính Imetelstat và được thế bằng các ion đổi canxi, bari hoặc magie. Đối với năm chất phản ứng khác (CuCl_2 , ZnCl_2 , AlCl_3 , FeCl_2 , FeCl_3) mà được cân bằng bằng nhựa trao đổi cation, phần trên cùng của nhựa trong cột trở bị kết tụ khi dung dịch Imetelstat được cho đi qua, cũng biểu thị rằng các ion đổi natri đã được trao đổi một cách thành công ra khỏi mạch chính Imetelstat.

Phương pháp kết tủa và phương pháp hòa tan cũng được thử bằng cách sử dụng lượng dư của các chất phản ứng muối. Khi lượng dư lớn của chất phản ứng muối (ví dụ, 900 đương lượng) được xử lý bằng natri Imetelstat, thì chất kết tủa được tạo ra. Các chất kết tủa được phân lập bằng cách lọc. Các thử nghiệm kế tiếp biểu thị rằng cần có bảy đến năm mươi đương lượng chất phản ứng muối vô cơ để chuyển hóa toàn bộ Imetelstat thành chất kết tủa.

Năm đương lượng của mỗi muối trong số ba muối vô cơ (Mg, Ba hoặc Ca) được xử lý bằng muối TEA Imetelstat (triethylamoni) hoặc muối Na Imetelstat. Đã xác nhận được rằng hiện tượng kết tủa đã không xảy ra và các dung dịch được khử muối và được làm đông khô. Phân tích bột đã được làm đông khô bằng ngọn lửa hấp thụ nguyên tử (Flame AA [atomic absorption]) đã cho thấy rằng một số ion trong số các ion đổi natri của Imetelstat đã được trao đổi.

Thử nghiệm bổ sung được thực hiện với MgCl_2 bằng cách sử dụng một đến chín đương lượng cation magie cho dạng Imetelstat. Các ion đổi natri được trao đổi một phần cho các ion đổi Mg mà mức trao đổi cao nhất xảy ra ở chín đương lượng

MgCl₂, và chế phẩm tạo ra thể hiện 1,2% trọng lượng Na và 1,1% trọng lượng Mg.

Ví dụ 2: Chất liệu và thiết bị

Các chất phản ứng vô cơ, dung môi hữu cơ, và các chất liệu khác được sử dụng cho nghiên cứu này được liệt kê trong Bảng 1. Natri Imetelstat (CAS #1007380-31-5) của lô số G163/L- G-13002 do Geron cung cấp được sử dụng cho nghiên cứu này. Amoni Imetelstat là chế phẩm thô thu được từ việc phân cắt Imetelstat khỏi nền tổng hợp pha rắn bằng cách sử dụng amoniac và etanol (ví dụ, như được Gryaznov và các đồng tác giả bộc lộ trong US 20120329858) và thu được từ nguồn dự trữ của nhà sản xuất. TEA Imetelstat (dạng triethylamoni) là chế phẩm thu được từ dịch rửa giải cột tinh chế HPLC, trong đó pha động chứa triethylamoni axetat (TEAA) được sử dụng (ví dụ, như được Gryaznov và các đồng tác giả bộc lộ trong US 20120329858) và nhận được từ nguồn dự trữ của nhà sản xuất thu được từ các nghiên cứu phát triển quy trình khác nhau. Phương pháp siêu lọc được thực hiện bằng cách sử dụng Stirred Ultrafiltration Cell (Amicon 8400, Millipore) với màng PES 1KD. Việc làm khô ở nhiệt độ thấp được thực hiện bằng cách sử dụng Speed Vacuum Concentrator (ScanSpeed 40, LaboGene).

Ví dụ 3: Quy trình

Trao đổi bằng cột nhựa trao đổi ion

Cột nhựa trao đổi cation mạnh, FINEX MFG 210, được chuẩn bị với thể tích cột là 200ml (4,6cm x 12cm) và nhựa được rửa bằng NaOH 1M và nước. Tiếp đó, cột được làm cân bằng bằng dung dịch 1M của từng muối đang được quan tâm. Tổng cộng, tám dung dịch muối 1M được điều chế và sử dụng (CaCl₂, MgCl₂, BaCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, AlCl₃, FeCl₂, và FeCl₃) trong các thử nghiệm này. 50ml dung dịch natri Imetelstat ở nồng độ 100mg/ml được bổ sung vào cột.

Trong trường hợp của các cột đã được cân bằng CuCl₂, ZnCl₂, AlCl₃, FeCl₂, và FeCl₃, hiện tượng kết tụ Imetelstat trên nhựa được quan sát ở phần trên cùng của

cột khi natri Imetelstat được nạp vào cột.

Ba cột được làm cân bằng bằng CaCl_2 , MgCl_2 và BaCl_2 , các dung dịch muối đã không gây ra hiện tượng kết tụ Imetelstat trên cột và Imetelstat được thu hồi từ sản phẩm rửa giải cột, mà được quan sát thấy ở dạng dung dịch trắng đục. Bột mịn được thu hồi từ các dịch rửa giải này bằng cách ly tâm (4000 vòng/phút, 20 phút). Sau khi ly tâm, đã xác nhận được rằng dịch nổi không chứa Imetelstat theo phân tích HPLC. Điều này biểu thị rằng việc làm kết tủa và tách các muối canxi, magie và bari của Imetelstat đã đạt được thành công.

Làm kết tủa

Việc kết tinh hoặc làm kết tủa dạng có hóa trị hai hoặc hóa trị ba của Imetelstat được khảo sát bằng cách sử dụng lượng dư lớn của các muối vô cơ đang được quan tâm (900 đương lượng, tính theo trọng lượng bazơ). Dung dịch 1M của các muối CaCl_2 , MgCl_2 , BaCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 , AlCl_3 , FeCl_2 , và FeCl_3 được điều chế. Ba loại dung dịch Imetelstat: dung dịch Imetelstat thô (muối amoni), Imetelstat đã được tinh chế (muối triethylamoni (TEA)), và natri Imetelstat (dạng muối Na), được trộn với từng dung dịch muối.

Tất cả các dung dịch đã được trộn đều thể hiện chất kết tủa của Imetelstat, mà được phân lập một cách dễ dàng bằng cách lọc bằng giấy lọc Advantec 2. Kết quả này biểu thị rằng việc làm kết tủa và tách các muối đa hóa trị của Imetelstat đã đạt được thành công.

Độ tan của các chất kết tủa phân lập được trong điều kiện lượng dư lớn của muối phản ứng ban đầu được khảo sát bằng cách sử dụng các dung môi dưới đây: nước, axetonitril, MeOH, EtOH, IPA (rượu isopropylic), NaOH 0,1M, HCl 0,1M, NaCl 1M, và NMP.

Đối với các muối kết tủa trong dư lượng lớn của muối phản ứng, các muối canxi, bari, và magie của Imetelstat là dễ hòa tan trong dung dịch NaOH 0,1M và dung dịch NaCl 1M (xem Bảng 2). Các nghiên cứu về độ hòa tan của chất kết tủa Imetelstat thu được từ lượng dư lớn của chất phản ứng là muối magie được thực hiện trong các dung dịch NaCl 1M ở các nồng độ khác nhau (2mg/ml đến 6mg/ml) và

trong các điều kiện độ pH khác nhau (độ pH = 8, 9, 10, 11, 12) và được phân tích theo HPLC (xem các phổ sắc ký trên Hình 1). Đã quan sát thấy chất kết tủa Imetelstat dễ hòa tan ở nồng độ 6mg/ml và độ pH=11 đến độ pH=12. Hợp chất này còn thể hiện tính ổn định ở điều kiện đến độ pH=12 mà không có chất kết tủa bất kỳ (Hình 1).

Hòa tan

30 đến 50 đương lượng muối phản ứng

Số đương lượng của muối phản ứng đang được quan tâm mà có thể đạt được mức kết tủa hoàn toàn Imetelstat được khảo sát bằng cách bổ sung muối phản ứng đang được quan tâm từng bước một. Hiện tượng hình thành chất kết tủa hoàn toàn được quan sát nằm ở khoảng từ 7 đến 50 đương lượng muối phản ứng được bổ sung vào đối với tám muối được liệt kê trong Bảng 3. Vì muối phản ứng được bổ sung vào với nhiều đương lượng hơn, khuynh hướng hình thành gel với kết tủa quan sát được đối với tất cả các muối.

Ba loại dung dịch Imetelstat được sử dụng: amoni Imetelstat thô (dạng thô), triethylamoni Imetelstat (dạng muối TEA đã được tinh chế), và natri Imetelstat (dạng muối Na), được trộn với từng dung dịch muối. Muối amoni Imetelstat được dùng ở dạng dung dịch NH_4OH hoặc dung dịch nước. Dung dịch amoni Imetelstat và dung dịch TEA Imetelstat lần lượt cần khoảng 50 đương lượng hoặc 30 đương lượng muối Mg phản ứng, để đạt được mức kết tủa hoàn toàn.

Độ hòa tan của chất kết tủa tạo ra được từ dung dịch TEA Imetelstat và dung dịch amoni Imetelstat được khảo sát trong các điều kiện pH khác nhau từ độ pH=8 đến độ pH=12. Sau khi để các dung dịch đã được trộn này trong 6 giờ ở nhiệt độ trong phòng, độ hòa tan của các chất kết tủa Imetelstat-Mg được phân tích theo hệ số hấp thụ UV ở bước sóng 260nm. Cả hai chất kết tủa thu được từ amoni Imetelstat và TEA Imetelstat đều thể hiện khuynh hướng tương tự ở chỗ muối Imetelstat hòa tan nhiều hơn trong dung dịch NaCl 1M ở độ pH cao (xem Bảng 3).

Kết quả này cho thấy rằng khi số đương lượng muối phản ứng đang được quan

tâm so với Imetelstat được kiểm soát, thì có thể đạt được mức kết tủa hoàn toàn của muối Imetelstat theo phương pháp thuận tiện bất kỳ để tạo ra chất kết tủa mà có thể được hòa tan lại một cách thành công.

5 đương lượng muối phản ứng

Dung dịch Natri Imetelstat (100mg trong 1ml nước) được trộn với 5 đương lượng của tám muối phản ứng và từng dung dịch được khử muối theo phương pháp siêu lọc có sử dụng tế bào siêu lọc được khuấy (Stirred Ultrafiltration Cell) và màng 1KD. Tiếp đó, dung dịch đã được siêu lọc được làm khô ở nhiệt độ thấp. Bột tạo ra được phân tích về hàm lượng Na và từng ion đối kim loại đang được quan tâm bằng Flame AA (phổ hấp thụ nguyên tử). Như thể hiện trên hình 2 và hình 3, hàm lượng ion đối kim loại cao nhất là 1,1% theo trọng lượng của Zn, Al, và Mg, với các hàm lượng Na lần lượt là 2,6%, 1,7%, và 2,6%.

6 đến 9 đương lượng muối phản ứng

Việc bổ sung 6 đến 9 đương lượng muối magie phản ứng vào dung dịch Natri Imetelstat được thực hiện và việc siêu lọc kế tiếp và làm khô ở nhiệt độ thấp tạo ra sản phẩm rắn mà hòa tan một cách hoàn toàn trong nước. Việc phân tích hàm lượng natri và magie được thực hiện (xem các kết quả trên Hình 3). Việc bổ sung chín đương lượng $MgCl_2$ vào dung dịch natri Imetelstat tạo ra chế phẩm, trong đó hàm lượng ion đối Na và Mg lần lượt là 1,1% và 1,2% trọng lượng.

1 đến 10 đương lượng muối phản ứng

Để khảo sát sự trao đổi ion đối Mg với ion đối TEA ở muối TEA Imetelstat so với muối natri Imetelstat, một bộ thử nghiệm khác được thiết kế và thực hiện. Một đến mười đương lượng $MgCl_2$ trong các dung dịch nước đã được trộn với dung dịch muối TEA Imetelstat (độ tinh khiết > 90% theo HPLC). Việc phân tích hàm lượng ion đối Mg được thực hiện sau khi siêu lọc và làm khô ở nhiệt độ thấp. Các kết quả được thể hiện trên Hình 4. Việc bổ sung đến 10 đương lượng chất phản ứng

MgCl₂ vào tạo ra chế phẩm chứa 1,6% Mg theo trọng lượng.

Ví dụ 4: Kết luận

Đã thu được chế phẩm chứa các dạng muối có hóa trị hai và hóa trị ba của Imetelstat, kể cả các muối canxi, magie, kẽm, nhôm, bari, sắt (II), sắt (III) và đồng. Khi lượng dư được kiểm soát của các chất phản ứng muối vô cơ đã chọn được sử dụng (xem bảng 2 và bảng 3) để làm kết tủa polynucleotit, thì tạo ra được các chất kết tủa mà tiếp theo có thể được hòa tan lại, và chất này thể hiện độ tinh khiết cao hơn so với các tạp chất rửa giải nhanh bằng cách áp dụng phân tích HPLC.

Việc sử dụng chất phản ứng muối magie tạo ra chất kết tủa rắn dễ hòa tan của Imetelstat sau bước trao đổi. Đã tạo ra được các chất kết tủa mà đạt được 1,2% trọng lượng ion đổi magie so với 1,1% trọng lượng ion đổi natri.

Việc làm kết tủa Imetelstat bằng cách sử dụng muối có hóa trị hai hoặc hóa trị ba khiến loại bỏ các chất phản ứng và các sản phẩm tổng hợp không hướng đích mà vẫn còn trong dung dịch. Việc loại bỏ các tạp chất có mặt trong dung dịch Imetelstat thô này đem lại một vài ưu điểm cho các bước tinh chế sắc ký tiếp theo đối với Imetelstat, như tải nạp lên cột giảm, độ phân giải tốt hơn, số bước tinh chế sắc ký giảm và thời hạn sử dụng của các cột sắc ký tốt hơn, chi phí tinh chế giảm và tinh chế nhanh hơn.

Bảng 1. Các muối vô cơ, dung môi hữu cơ, và các chất liệu khác

Chất liệu	Công thức phân tử (trọng lượng phân tử)	Cấp độ hoặc độ tinh khiết
Canxi clorua đihydrat	CaCl ₂ •2H ₂ O (trọng lượng phân tử 147,01)	≥ 99%
Magie clorua monohydrat	MgCl ₂ •H ₂ O (trọng lượng phân tử 203,30)	≥ 99%
Bari clorua đihydrat	BaCl ₂ •2H ₂ O (trọng lượng phân tử 244,26)	≥ 99%
Đồng(II) clorua đihydrat	CUCl ₂ •2H ₂ O (trọng lượng phân tử 170,48)	≥ 99%
Kẽm clorua	ZnCl ₂ (trọng lượng phân tử 136,30)	≥ 98%
Nhôm clorua hexahydrat	AlCl ₃ •6H ₂ O (trọng lượng phân tử 241,43)	≥ 95%
Sắt (II) clorua tetrahydrat	FeCl ₂ •4H ₂ O (trọng lượng phân tử 198,81)	≥ 98%
Sắt (III) clorua hexahydrat	FeCl ₃ •6H ₂ O (trọng lượng phân tử 270,30)	≥ 98%
Natri clorua	NaCl (trọng lượng phân tử 58,4)	Hạng USP

Bảng 2

(O: có, X: không, “-” có nghĩa là không được thực hiện)

Phương pháp	Imetelstat được xét nghiệm	Xét nghiệm được thực hiện	CaCl ₂	MgCl ₂	BaCl ₂	CuCl ₂	ZnCl ₂	AlCl ₃	FeCl ₂	FeCl ₃
Nhựa trao đổi ion	Natri (dạng Na, 100mg/ml)	Di chuyển qua cột	O	O	O	X	X	X	X	X
		Kết tủa ở dung dịch sau cột	O	O	O	-	-	-	-	-
		Lọc các chất kết tủa	X	X	X	-	-	-	-	-
		Độ hòa tan* của chất kết tủa	X	X	X	-	-	-	-	-
Chất kết tủa (900 đương lượng)	Natri (dạng Na, 100mg/ml)	Chất kết tủa (dễ lọc được)	O	O	O	O	O	O	O	O
		Độ hòa tan** của chất kết tủa	X	X	X	X	X	X	X	X
		Độ hòa tan của chất kết tủa trong NaOH 1M	O	O	O	X	X	X	X	X
	TEA (35mg/ml)	Chất kết tủa (dễ lọc được)	O	O	O	O	O	O	O	O
		Độ hòa tan** của chất kết tủa	X	X	X	X	X	X	X	X
		Độ hòa tan của chất kết tủa trong NaOH 1M	O	O	X	X	X	X	X	X
	Thô (trong NH ₄ OH)	Các chất kết tủa (dễ lọc được)	O	O	O	O	O	O	O	O
		Độ hòa tan** của chất kết tủa	X	X	X	-	-	-	-	-

*Được xét nghiệm trong axetonitril, MeOH, EtOH, IPA, nước, NMP, HCL 1M, NaCl 1M, NaOH 1M

** Được xét nghiệm trong axetonitril, MeOH, EtOH, IPA, nước, NMP, HCL 1M, NaCl 1M

Bảng 3

Hòa tan	Natri	Đương lượng muối	9	15	12	7	50	50	10	11
	TEA	lượng muối	15	30	30	10	50	10	50	10
	Thô (trong NH ₄ OH)	vô cơ để kết tủa hoàn	-	>50	-	-	-	-	-	-

	Thô (trong nước)	toàn	-	30	-	-	-	-	-	-
Độ hòa tan trong NaCl 1M (1ml)	TEA	Chất kết tủa Imetelstat-Mg 6mg (sau 64 giờ)	Độ pH 8 28 OD	Độ pH 9 31 OD	Độ pH 10 70 OD	Độ pH 11 290 OD	Độ pH 12 434 OD			
	Thô (trong nước)	Chất kết tủa Imetelstat-Mg 6mg (sau 6 giờ)	Độ pH 8 10 OD	Độ pH 9 7 OD	Độ pH 10 17 OD	Độ pH 11 111 OD	Độ pH 12 377 OD			

Bất kể các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, nội dung bộc lộ nêu ra trong bản mô tả này còn được xác định theo các mệnh đề dưới đây:

1. Phương pháp điều chế polynucleotit, phương pháp này bao gồm:
việc cho chế phẩm polynucleotit thứ nhất chứa:

polynucleotit có trình tự gồm 7, hoặc nhiều hơn, cấu trúc siêu phân tử nucleosit và ít nhất là hai cấu trúc siêu phân tử trong số các cấu trúc siêu phân tử nucleosit này được nối bằng liên kết liên cấu trúc siêu phân tử N3'→P5' thiophosphoramidat; và

các chất phản ứng và các sản phẩm tổng hợp không hướng đích;
tiếp xúc với muối cation đa hóa trị để làm kết tủa muối polynucleotit thứ nhất bao gồm ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị; và

tách muối polynucleotit thứ nhất ra khỏi chế phẩm polynucleotit thứ nhất đã được tiếp xúc để tạo ra chế phẩm polynucleotit thứ hai chứa muối polynucleotit thứ nhất.

2. Phương pháp theo mệnh đề 1, phương pháp còn bao gồm: việc cho muối polynucleotit thứ nhất tiếp xúc với nền sắc ký pha đảo; và việc rửa giải ra khỏi nền sắc ký này chế phẩm polynucleotit thứ ba chứa muối polynucleotit thứ hai.

3. Phương pháp theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 2, trong đó polynucleotit có trình tự bao gồm 13, hoặc nhiều hơn, cấu trúc siêu phân tử nucleosit bổ trợ cho thành phần ARN của telomera của người.

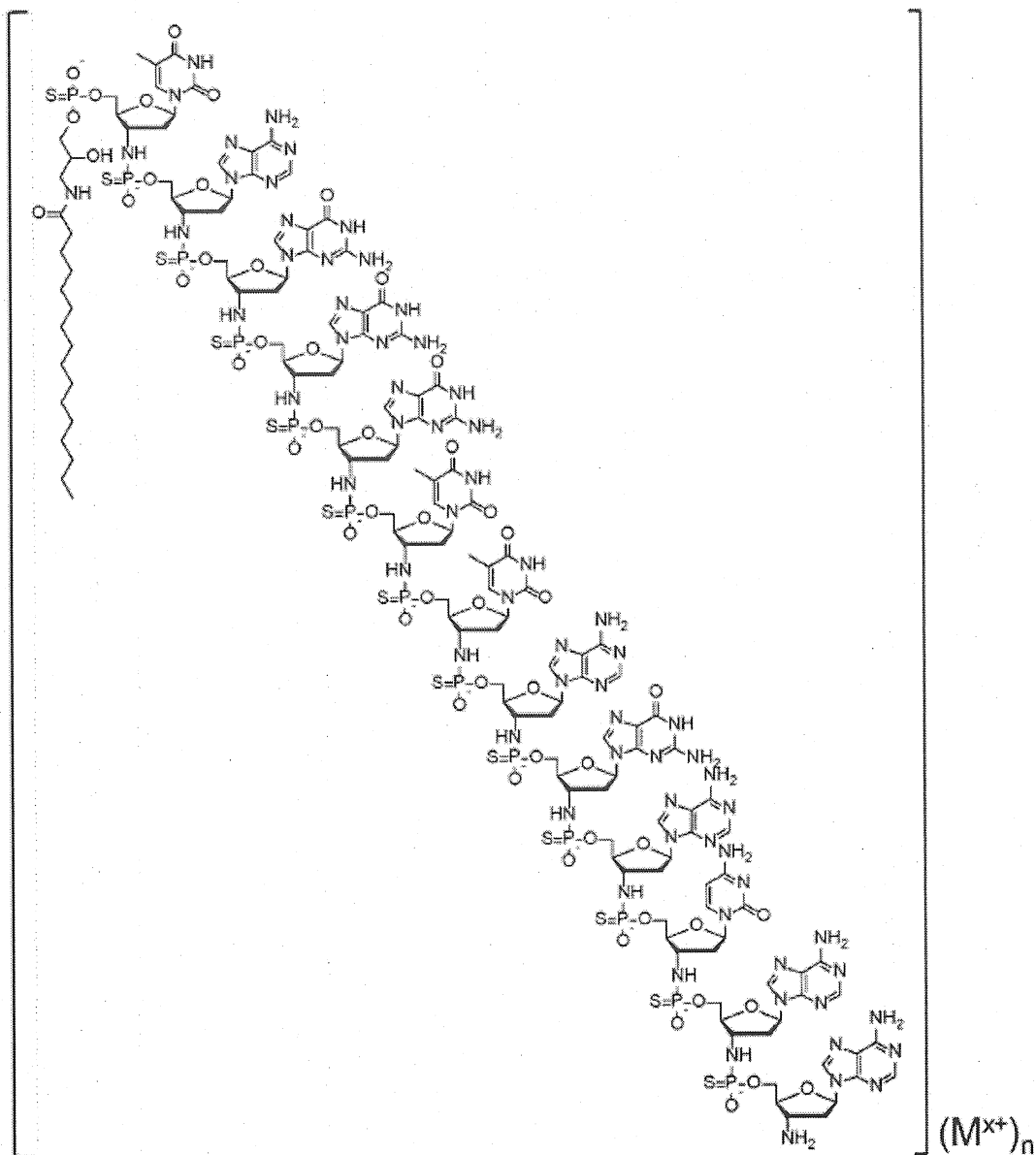
4. Phương pháp theo mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 3, trong đó polynucleotit bao gồm từ 10 đến 50 cấu trúc siêu phân tử nucleosit liên tiếp hỗ trợ cho thành phần ARN của telomeraza của người.

5. Phương pháp theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 3 đến 4, trong đó các cấu trúc siêu phân tử nucleosit hỗ trợ cho thành phần ARN của telomeraza của người đều được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử N3'→P5' thiophosphoramidat.

6. Phương pháp theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 5, trong đó polynucleotit bao gồm trình tự được chọn từ nhóm gồm: GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO:4), TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3) và CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID NO:5).

7. Phương pháp theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 6, trong đó polynucleotit này được tiếp hợp vào gốc lipid thông qua gốc liên kết tùy ý.

8. Phương pháp theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 2 đến 7, trong đó muối polynucleotit thứ hai có cấu trúc:



trong đó mỗi M^{x+} độc lập là hydro hoặc ion đôi cation, mỗi x độc lập bằng 1, 2 hoặc 3 và n là số nguyên từ 5 đến 13.

9. Phương pháp theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 2 đến 8, trong đó muối polynucleotit thứ hai này là muối được dùng của polynucleotit.

10. Phương pháp theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 2 đến 9, trong đó muối polynucleotit thứ hai này là muối cation có hóa trị một của polynucleotit.

11. Phương pháp theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 2 đến 10, trong đó muối polynucleotit thứ hai này là muối natri của polynucleotit.

12. Phương pháp theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 5,

phương pháp còn bao gồm việc phân cắt polynucleotit ra khỏi nền để tạo ra chế phẩm polynucleotit thứ nhất.

13. Phương pháp theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 12, trong đó chế phẩm thứ nhất chứa muối cation có hóa trị một của polynucleotit.

14. Phương pháp theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 13, trong đó bước cho tiếp xúc bao gồm việc rửa giải chế phẩm polynucleotit thứ nhất ra khỏi nền trao đổi cation.

15. Phương pháp theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 14, trong đó bước tách bao gồm việc ly tâm chế phẩm polynucleotit thứ nhất đã được tiếp xúc để quay lắng chất kết tủa muối polynucleotit.

16. Phương pháp theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 15, trong đó bước tách bao gồm việc lọc muối polynucleotit ra khỏi polynucleotit thứ nhất đã được cho tiếp xúc.

17. Phương pháp theo mệnh đề 2, trong đó chế phẩm polynucleotit thứ hai được nạp một cách trực tiếp lên nền sắc ký pha đảo.

18. Phương pháp theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 17, trong đó phương pháp còn bao gồm việc hòa tan chế phẩm polynucleotit thứ hai trong dung môi.

19. Phương pháp theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 18, trong đó ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị có hóa trị hai.

20. Phương pháp theo mệnh đề 19, trong đó ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị được chọn từ nhóm gồm magie, kẽm và canxi.

21. Phương pháp theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 18, trong đó ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị có hóa trị ba.

22. Phương pháp theo mệnh đề 21, trong đó ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị là nhôm.

23. Phương pháp theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 1 đến 22, trong đó muối polynucleotit còn chứa ion đối cation có hóa trị một.

24. Chế phẩm chứa: muối của polynucleotit chứa ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị; trong đó polynucleotit có trình tự gồm 7, hoặc nhiều hơn, cấu trúc siêu phân tử nucleosit hỗ trợ cho thành phần ARN của telomera của người và ít nhất là hai cấu trúc siêu phân tử trong số các cấu trúc siêu phân tử nucleosit này được nối bằng liên kết liên cấu trúc siêu phân tử N3'→P5' thiophosphoramidat.

25. Chế phẩm theo mệnh đề 24, trong đó ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị có hóa trị hai.

26. Chế phẩm theo mệnh đề 25, trong đó ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị được chọn từ nhóm gồm magie, kẽm và canxi.

27. Chế phẩm theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 24 đến 26, trong đó ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị là magie.

28. Chế phẩm theo mệnh đề 24, trong đó ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị có hóa trị ba.

29. Chế phẩm theo mệnh đề 28, trong đó ít nhất là một ion đối cation đa hóa trị là nhôm.

30. Chế phẩm theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 24 đến 29, trong đó polynucleotit chứa 3% mol, hoặc nhiều hơn, ion đối cation đa hóa trị so với mạch chính polyanion của polynucleotit.

31. Chế phẩm theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 24 đến 29, trong đó polynucleotit này chứa 1,0% trọng lượng, hoặc nhiều hơn, ion đối cation đa hóa trị theo so với polynucleotit.

32. Chế phẩm theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 24 đến 31, trong đó chế phẩm là chất kết tủa.

33. Chế phẩm theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 24 đến 32, trong đó polynucleotit chứa trình tự gồm 13 hoặc nhiều cấu trúc siêu phân tử nucleosit hỗ trợ cho thành phần ARN của telomera của người.

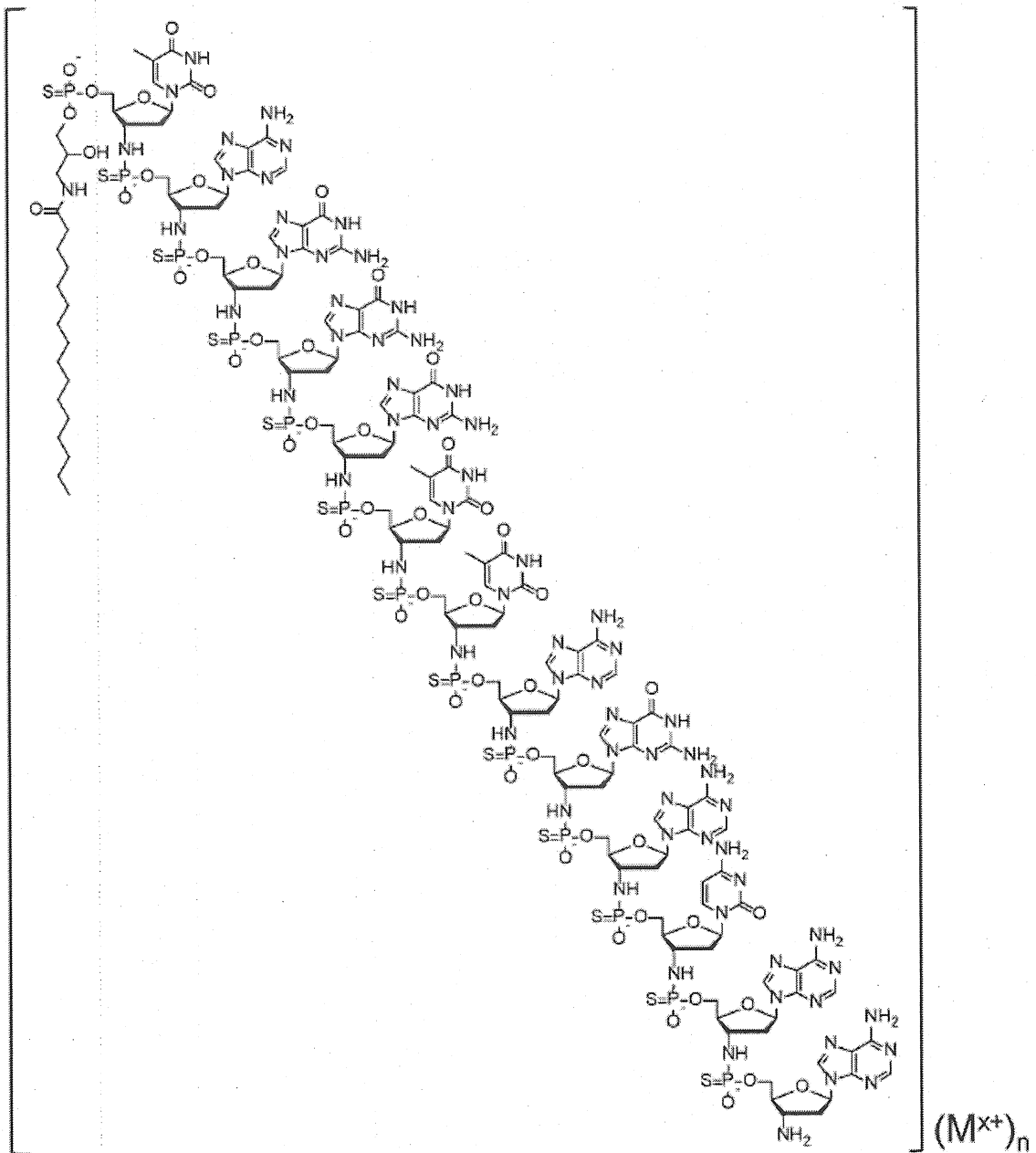
34. Chế phẩm theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 24 đến 33, trong đó polynucleotit chứa 10 đến 50 cấu trúc siêu phân tử nucleosit liên tiếp hỗ trợ cho thành phần ARN của telomera của người.

35. Chế phẩm theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 24 đến 34, trong đó các cấu trúc siêu phân tử nucleosit hỗ trợ cho thành phần ARN của telomera của người đều được nối bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử N3'→P5' thiophosphoramidat.

36. Chế phẩm theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 24 đến 35, trong đó polynucleotit chứa trình tự được chọn từ nhóm gồm: GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO:4), TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3) và CAGTTAGGGTTAG (SEQ IDNO:5).

37. Chế phẩm theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 24 đến 36, trong đó polynucleotit được tiếp hợp vào gốc lipid thông qua gốc liên kết tùy ý.

38. Chế phẩm theo một mệnh đề bất kỳ trong số các mệnh đề từ 24 đến 37, trong đó polynucleotit có cấu trúc:



trong đó mỗi M^{x+} độc lập là ion đôi cation, mỗi x bằng 1, 2 hoặc 3 và n bằng 5 đến 12.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả chi tiết trên đây bằng cách minh họa và các ví dụ để hiểu được một cách rõ ràng, người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ theo hướng dẫn của sáng chế rằng một số thay đổi và cải biến nhất định có thể được thực hiện đối với sáng chế mà không vượt quá tinh thần hoặc phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Do vậy, phần trên đây chỉ nhằm minh họa các nguyên lý của sáng chế. Người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu được rằng có thể tạo ra các cách bố trí

khác mà mặc dù không được mô tả hoặc được thể hiện một cách rõ ràng trong bản mô tả này, vẫn bao trùm các nguyên lý của sáng chế và nằm trong phạm vi và tinh thần của sáng chế. Ngoài ra, tất cả các ví dụ và ngôn ngữ điều kiện được liệt kê trong bản mô tả này về nguyên tắc được dự định để trợ giúp người đọc hiểu các nguyên lý của sáng chế và các khái niệm được đóng góp bởi các tác giả sáng chế cho sự phát triển lĩnh vực kỹ thuật này, và sẽ được hiểu là không chỉ bị giới hạn ở các ví dụ và điều kiện đã được liệt kê cụ thể này. Hơn nữa, tất cả tuyên bố trong bản mô tả này liệt kê các nguyên lý, các khía cạnh, và các phương án của sáng chế cũng như các ví dụ cụ thể của nó, được dự định bao trùm cả các phương án tương đương về cấu trúc và chức năng của chúng. Ngoài ra, dự định rằng các phương án tương đương này bao gồm cả các phương án tương đương hiện đã biết và các phương án tương đương sẽ được phát triển trong tương lai, tức là, các yếu tố bất kỳ được phát triển mà thực hiện cùng một chức năng, bất kể cấu trúc. Do đó, không dự định giới hạn phạm vi của sáng chế ở các phương án đã được thể hiện và bộc lộ trong bản mô tả này. Hơn thế, phạm vi và tinh thần của sáng chế được cụ thể hóa bằng các phương án kèm theo. Tất cả các tổ hợp có thể có của các phương án được thể hiện trên đây được xem là được bao trùm trong phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp điều chế polynucleotit, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) cho chế phẩm polynucleotit thứ nhất tiếp xúc với muối cation đa hóa trị để làm kết tủa muối polynucleotit thứ nhất chứa ít nhất là một ion đôi cation đa hóa trị; và
- b) tách muối polynucleotit thứ nhất ra khỏi chế phẩm polynucleotit thứ nhất đã được tiếp xúc để tạo ra chế phẩm polynucleotit thứ hai chứa muối polynucleotit thứ nhất.

trong đó chế phẩm polynucleotit thứ nhất chứa:

- (i) polynucleotit có trình tự gồm 7, hoặc nhiều hơn, cấu trúc siêu phân tử nucleosit và ít nhất là hai cấu trúc siêu phân tử trong số các cấu trúc siêu phân tử nucleosit này được kết hợp bằng liên kết liên cấu trúc siêu phân tử thiophosphoramidat $N3' \rightarrow P5'$; và
- (ii) các chất phản ứng và các sản phẩm tổng hợp hoà tan không là đích;
- c) cho chế phẩm polynucleotit thứ hai chứa muối polynucleotit thứ nhất từ bước b) tiếp xúc với nền sắc ký pha đảo; và
- d) rửa giải ra khỏi nền sắc ký pha đảo chế phẩm polynucleotit thứ ba chứa muối polynucleotit hòa tan thứ hai.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polynucleotit chứa trình tự gồm 13, hoặc nhiều hơn, cấu trúc siêu phân tử nucleosit hỗ trợ cho thành phần ARN của telomera của người.

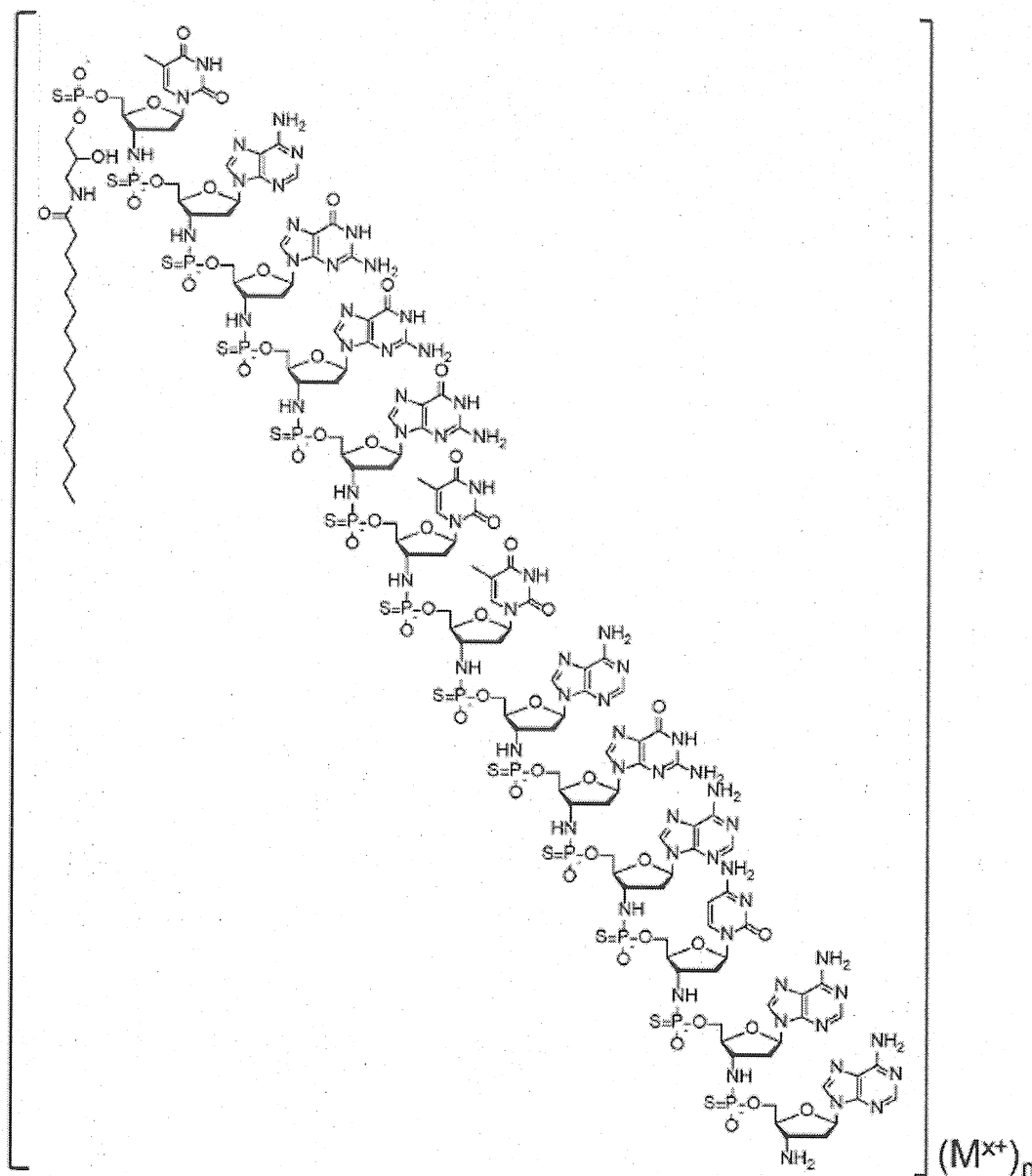
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polynucleotit chứa từ 10 đến 50 cấu trúc siêu phân tử nucleosit liên tiếp hỗ trợ cho thành phần ARN của telomera của người.

4. Phương pháp theo điểm 2, trong đó các cấu trúc siêu phân tử nucleosit hỗ trợ cho thành phần ARN của telomera của người đều được liên kết bằng các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử thiophosphoramidat $N3' \rightarrow P5'$.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polynucleotit chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm: GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO:4), TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3) và CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID NO:5).

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polynucleotit được tiếp hợp vào gốc lipid thông qua nhóm liên kết tùy ý.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó muối polynucleotit thứ hai có cấu trúc:



trong đó mỗi M^{x+} độc lập là hydro hoặc ion đối cation, mỗi x độc lập bằng 1, 2 hoặc 3 và n là số nguyên nằm trong khoảng từ 5 đến 13.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sau bước rửa giải d) muối polynucleotit thứ hai là muối được dụng của polynucleotit.

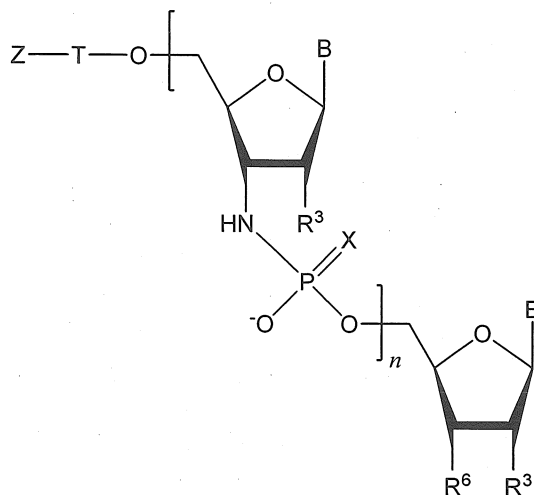
9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sau bước rửa giải d) muối polynucleotit thứ hai là muối cation hóa trị một của polynucleotit.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó muối polynucleotit thứ hai là muối natri của

polynucleotit.

11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp còn bao gồm bước phân cắt polynucleotit ra khỏi nền tổng hợp pha rắn để tạo ra chế phẩm polynucleotit thứ nhất ở dạng chế phẩm tổng hợp thô chứa polynucleotit, trước bước cho tiếp xúc a).
12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chế phẩm polynucleotit thứ nhất chứa muối cation hóa trị một của polynucleotit trước bước cho tiếp xúc a).
13. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước cho tiếp xúc a) bao gồm việc nạp và rửa giải chế phẩm polynucleotit thứ nhất ra khỏi nền trao đổi cation.
14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước tách b) bao gồm việc ly tâm chế phẩm polynucleotit thứ nhất đã được cho tiếp xúc để quay lắng chất kết tủa muối polynucleotit thứ nhất.
15. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước tách b) bao gồm việc lọc muối polynucleotit thứ nhất ra khỏi chế phẩm polynucleotit thứ nhất đã được cho tiếp xúc.
16. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chế phẩm polynucleotit thứ hai từ bước b) được nạp một cách trực tiếp lên nền sắc ký pha đảo.
17. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc hòa tan chế phẩm polynucleotit thứ hai trong dung môi, trước bước cho tiếp xúc c).
18. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ít nhất là một ion đổi cation đa hóa trị có hóa trị hai.
19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó ít nhất là một ion đổi cation đa hóa trị được chọn từ nhóm gồm magie, kẽm và canxi.
20. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ít nhất là một ion đổi cation đa hóa trị có hóa trị ba.
21. Phương pháp theo điểm 20, trong đó ít nhất là một ion đổi cation đa hóa trị là nhôm.
22. Phương pháp theo điểm 1, trong đó muối polynucleotit thứ nhất còn chứa ion đổi cation hóa trị một.
23. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polynucleotit được thể hiện bằng công thức

(I)



(I)

trong đó:

mỗi B độc lập là purin, purin đã được bảo vệ, pyrimidin hoặc pyrimidin đã được bảo vệ, hoặc nhóm tương tự nó;

mỗi X độc lập là oxy hoặc lưu huỳnh;

mỗi R³ độc lập là hydro, flo, hydroxyl, alkoxy, alkoxy đã được thế hoặc hydroxyl đã được bảo vệ;

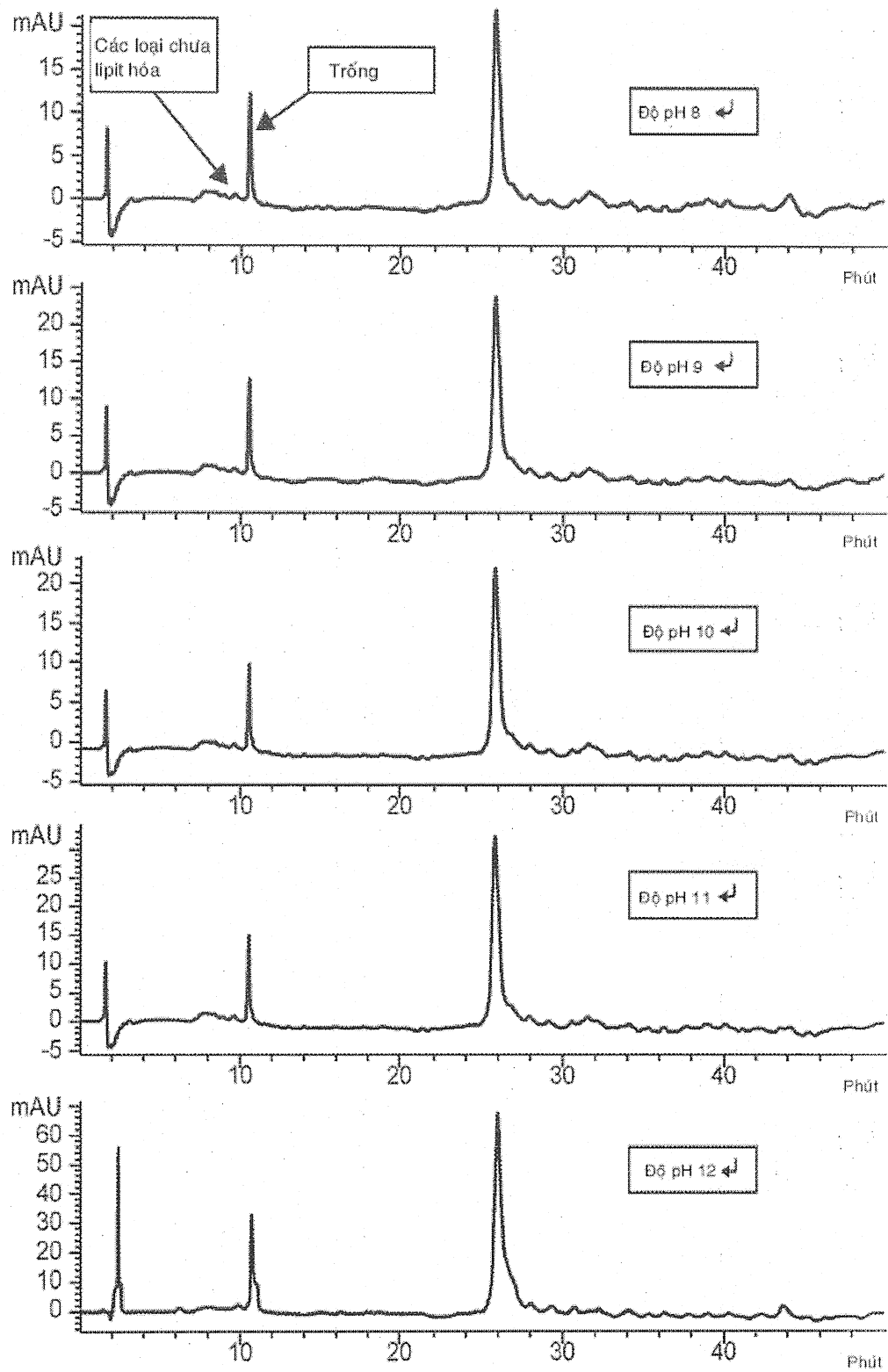
R⁶ là amino, hydroxyl, amino đã được bảo vệ, hydroxy đã được bảo vệ, -O-T-Z hoặc -NH-T-Z;

mỗi T độc lập là nhóm liên kết tùy ý;

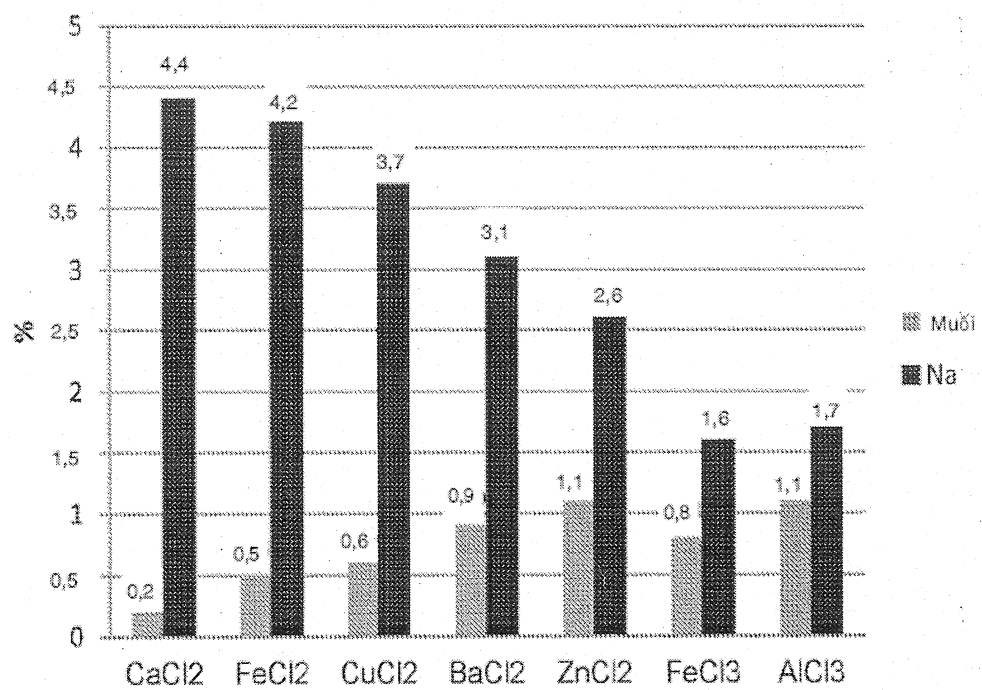
mỗi Z độc lập là H, lipid, nhóm mang, oligonucleotit, polyme, polypeptit, yếu tố đánh dấu dễ phát hiện, hoặc thẻ gắn; và

n là số nguyên nằm trong khoảng từ 7 đến 100.

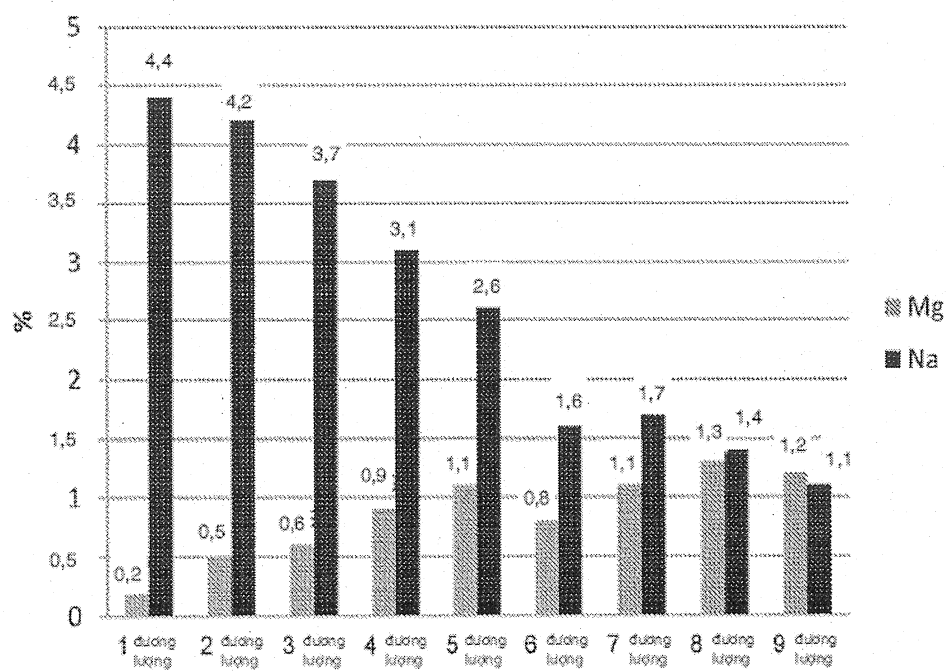
24. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tất cả các cấu trúc siêu phân tử nucleosit đều được kết hợp nhờ các liên kết liên cấu trúc siêu phân tử mà được chọn một cách độc lập từ liên kết liên cấu trúc siêu phân tử thiophosphoramidat N3'→P5' và liên kết liên cấu trúc siêu phân tử phosphoramidat N3'→P5'.



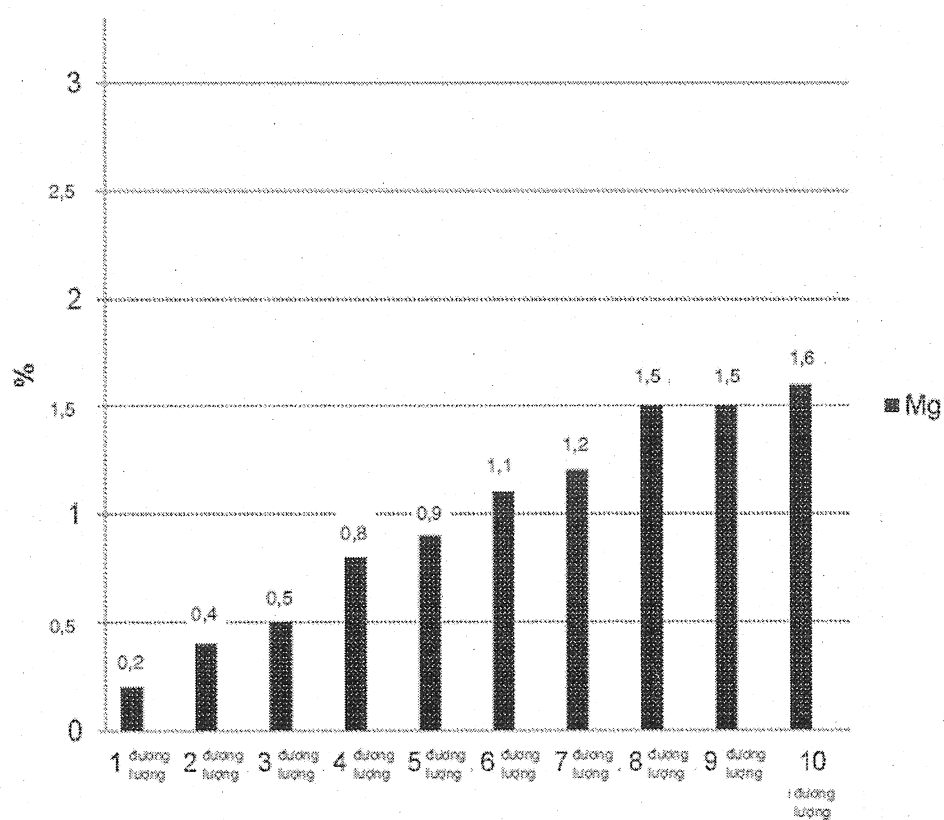
HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3



HÌNH 4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Geron Corporation
Ramiya, Premchandran H.

<120> Phương pháp điều chế polynucleotit

<130> 186/002

<150> US 62/151,891

<151> 23-04-2015

<160> 23

<170> FastSEQ dùng cho Windows Phiên bản 4.0

<210> 1

<211> 451

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 1

```

ggguugcgga gggugggccu gggaggggug guggccauuu uuugucuaac ccuaacugag 60
aagggcguag gcgccgugcu uuugcucccc gcgcgcuguu uuucucgcug acuuucagcg 120
ggcggaagaaag ccucggccug ccgccuucca ccguucauuc uagagcaaac aaaaaauguc 180
agcugcuggc ccguucgccc cucccgggga ccugcggcgg gucgccugcc cagccccga 240
accccgccug gaggccgcgg ucggcccggg gcuucuccgg aggcacccac ugccaccgcg 300
aagaguuggg cucugucagc cgcggggucuc ucggggggcga gggcgagguu caggccuuuc 360
aggccgcagg aagaggaacg gagcgagucc ccgcgcgcgg cgcgauuccc ugagcugugg 420
gacgugcacc caggacucgg cucacacaug c 451

```

<210> 2

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 2

gctctagaat gaacggtgga aggcggcagg

30

<210> 3

<211> 13

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 3 tagggtaga caa	13
<210> 4 <211> 11 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> Oligonucleotit tổng hợp	
<400> 4 gttagggta g	11
<210> 5 <211> 13 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> Oligonucleotit tổng hợp	
<400> 5 cagtagggt tag	13
<210> 6 <211> 15 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> Oligonucleotit tổng hợp	
<400> 6 gtggaaggcg gcagg	15
<210> 7 <211> 13 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> Oligonucleotit tổng hợp	
<400> 7 ggaaggcggc agg	13
<210> 8 <211> 13 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220>	

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 8
gtggaaggcg gca

13

<210> 9
<211> 11
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 9
gtggaaggcg g

11

<210> 10
<211> 13
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 10
cgggtggaagg cgg

13

<210> 11
<211> 13
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 11
acggtggaag gcg

13

<210> 12
<211> 16
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 12
aacggtggaag ggcggc

16

<210> 13
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit tổng hợp

 <400> 13
 atgaacggtg gaaggcgg 18

 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit tổng hợp

 <400> 14
 acattttttg tttgctctag 20

 <210> 15
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit tổng hợp

 <400> 15
 tagggttaga caa 13

 <210> 16
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit tổng hợp

 <400> 16
 gttagggtta g 11

 <210> 17
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit tổng hợp

 <400> 17
 gttagggtta gac 13

 <210> 18
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit tổng hợp

 <400> 18
 gtttaggggtta gacaa 15

 <210> 19
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit tổng hợp

 <400> 19
 cccttctcag tt 12

 <210> 20
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit tổng hợp

 <400> 20
 cgcccttctc ag 12

 <210> 21
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit tổng hợp

 <400> 21
 gggtagac 9

 <210> 22
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit tổng hợp

 <400> 22
 cagttaggg 9

 <210> 23
 <211> 11
 <212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 23

cuaacccuaa c

11