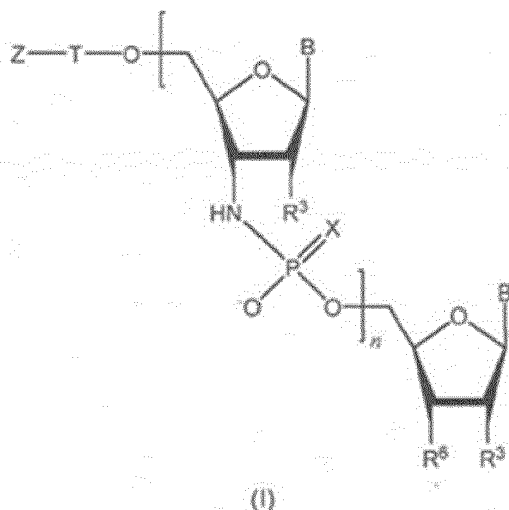


(12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 42569 B1** (51) Cl. internationale : **C12P 19/34; C07H 21/00**
- (43) Date de publication : **31.08.2020**
-
- (21) N° Dépôt : **42569**
- (22) Date de Dépôt : **21.04.2016**
- (30) Données de Priorité : **23.04.2015 US 201562151891P**
- (71) Demandeur(s) : **Geron Corporation, 149 Commonwealth Drive Menlo Park, CA 94025 / US (US)**
- (86) N° de dépôt auprès de l'organisme de validation: **EP16720636.6**
- (72) Inventeur(s) : **RAMIYA, Premchandran, H.**
- (74) Mandataire : **ATLAS INTELLECTUAL PROPERTY**
-
- (54) Titre : **PROCÉDÉS DE PRÉPARATION DE POLYNUCLÉOTIDES À L'AIDE DE COMPOSITIONS DE SEL CATIONIQUE MULTIVALENT**
- (57) Abrégé : Des aspects de la description comprennent des procédés pour la préparation d'un polynucléotide. Dans certains modes de réalisation, le procédé comprend la mise en contact d'une première composition polynucléotidique comprenant: un polynucléotide ayant une séquence de 7 sous-unités nucléosidiques ou plus et au moins deux des sous-unités nucléosidiques sont jointes par une liaison inter-sous-unité thiophosphoramidate N3 'P5'; et des produits synthétiques non ciblés et des réactifs; avec un sel de cation multivalent pour précipiter un sel de polynucléotide comprenant au moins un contre-ion de cation multivalent; et séparer le sel polynucléotidique de la première composition polynucléotidique mise en contact pour produire une seconde composition polynucléotidique comprenant le sel polynucléotidique. Dans certains modes de réalisation, le procédé comprend en outre la mise en contact du sel de polynucléotide avec un support de chromatographie en phase inverse; et en éluant à partir du support de chromatographie une troisième composition polynucléotidique comprenant le polynucléotide. L'invention concerne également des compositions comprenant un sel du polynucléotide comprenant au moins un contre-ion de cation multivalent.

1. Procédé de préparation d'un polynucléotide, le procédé comprenant les étapes consistant à :
- mettre en contact une première composition de polynucléotides avec un sel de cation multivalent pour précipiter un premier sel de polynucléotides ;
 - séparer le premier sel de polynucléotides de la première composition de polynucléotides mise en contact pour produire une deuxième composition de polynucléotides comprenant le premier sel de polynucléotides ;
- dans lequel la première composition de polynucléotides comprend :
- un polynucléotide ayant une séquence de 7 sous-unités de nucléosides ou plus et au moins deux des sous-unités de nucléosides sont réunies par une liaison inter-sous-unités de N3' → -P5' thiophosphoramidate ;
- et
- des produits de synthèse et réactifs solubles n'étant pas des cibles
- mettre en contact la deuxième composition de polynucléotides provenant de l'étape (b) avec un support de chromatographie en phase inverse ; et
 - éluer à partir du support de chromatographie en phase inverse une troisième composition de polynucléotides comprenant un deuxième sel de polynucléotides soluble.
2. Procédé de la revendication 1, dans lequel les sous-unités de nucléosides sont toutes réunies par des liaisons intersous-unités étant chacune indépendamment choisie parmi une liaison inter-sous-unités de N3' → -P5' thiophosphoramidate et une liaison inter-sous-unités de N3' → -P5' phosphoramidate.
3. Procédé des revendications 1 ou 2, dans lequel le polynucléotide est décrit par la formule (I) :



dans laquelle :

chaque B est indépendamment une purine, une purine protégée, une pyrimidine ou une pyrimidine protégée

ou bien un analogue de celles-ci ; chaque X est indépendamment un oxygène ou un soufre ;

chaque R₃ est indépendamment un hydrogène, un fluoro, un hydroxyle, un alcoxy, un alcoxy substitué ou un hydroxyle protégé ; R₆ est un amino, un hydroxyle, un amino protégé, un hydroxyle protégé, -O-T-Z ou -NH-T-Z ; chaque T est indépendamment un lieu optionnel ;

chaque Z est indépendamment H, un lipide, un véhicule, un oligonucléotide, un polymère, un polypeptide, un marqueur détectable ou une étiquette ; et n est un entier de 7 à 100.

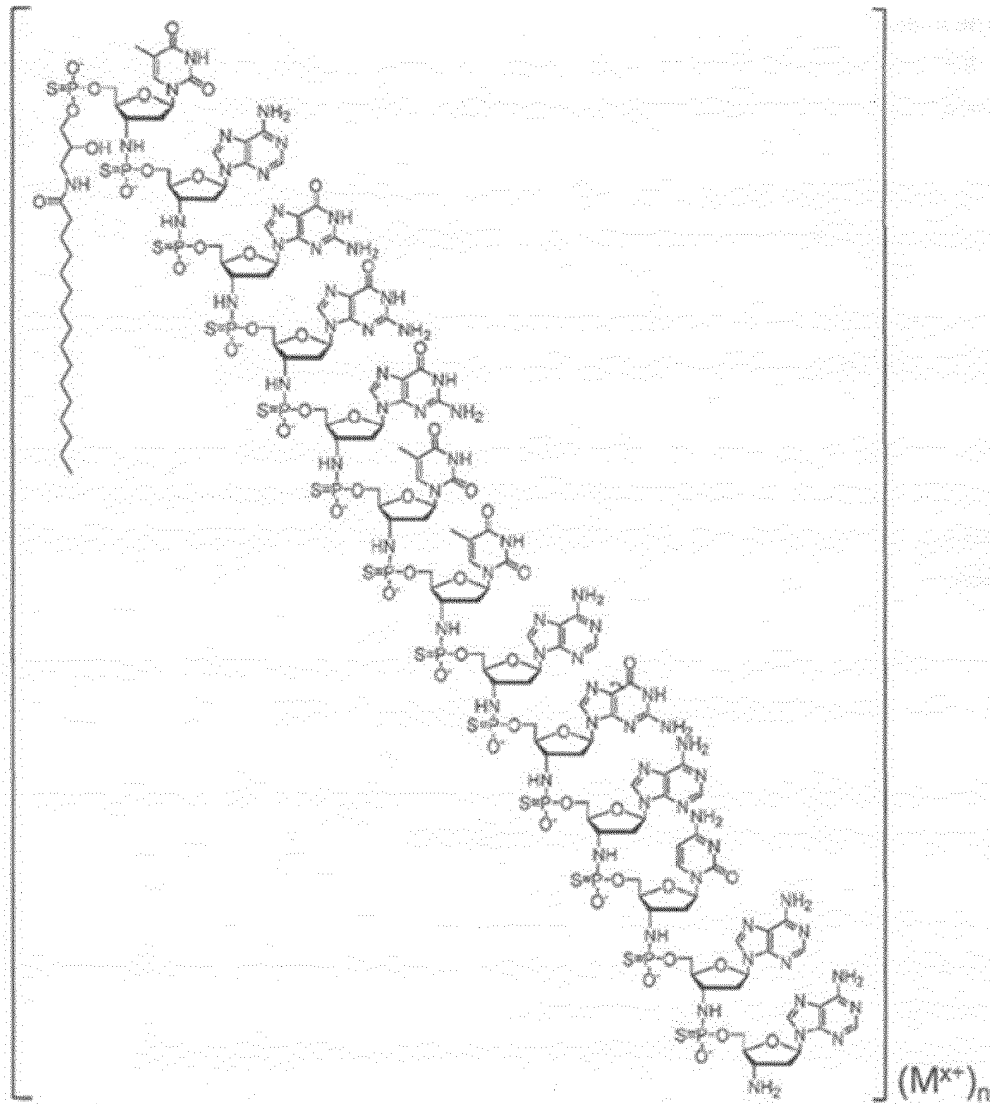
4. Procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel : le polynucléotide comprend une séquence comprenant 13 sous-unités de nucléosides ou plus complémentaires du composant d'ARN de la télomérase humaine ou le polynucléotide comprend entre 10 et 50 sous-unités de nucléosides contigus complémentaires du composant d'ARN de la télomérase humaine.

5. Procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel les sous-unités de nucléosides sont toutes réunies par des liaisons inter-sous-unités de N3'-→P5' thiophosphoramidate.

6. Procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel le polynucléotide comprend une séquence choisie dans le groupe constitué par : GTTAGGGTTAG (SEQ ID n° : 4), TAGGGTTAGACAA (SEQ ID n° : 3) et CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID n° : 5).

7. Procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel le polynucléotide est conjugué avec une fraction lipidique via un lieu optionnel.

8. Procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel le deuxième sel de polynucléotides a la structure :

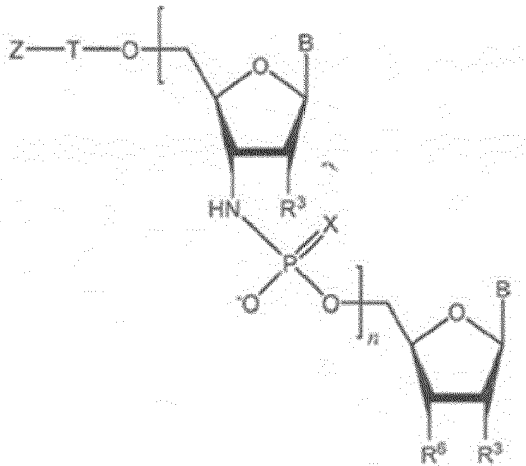


dans laquelle chaque M^{x+} est indépendamment un hydrogène ou un contre-ion cationique, chaque x est indépendamment 1, 2 ou 3 et n est un entier de 5 à 13. Procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel, après l'étape d'éluion d), le deuxième sel de polynucléotides est un sel acceptable d'un point de vue pharmaceutique du polynucléotide.

10. Procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel, après l'étape d'éluion d), le deuxième sel de polynucléotides est un sel de cation monovalent du polynucléotide, de préférence un sel de sodium du polynucléotide.

11. Procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 10, comprenant en outre, avant l'étape de mise en contact a), une coupure du polynucléotide à partir d'un support de synthèse en phase solide pour produire la première composition de polynucleotides sous forme d'une préparation de synthèse brute du polynucléotide.

- 12.** Procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans lequel, avant l'étape de mise en contact a), la première composition de polynucléotides comprend un sel de cation monovalent du polynucléotide.
- 13.** Procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 12, dans lequel l'étape de mise en contact a) comprend un chargement et une élution de la première composition de polynucléotides à partir d'un support échangeur de cations.
- 14.** Procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 13, dans lequel l'étape de séparation b) comprend une cen- trifugation de la première composition de polynucléotides mise en contact pour faire sédimenter le premier précipité de sel de polynucléotides ou une filtration du premier sel de polynucléotides à partir de la première composition de polynucléotides mise en contact.
- 15.** Procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 13, dans lequel la deuxième composition de polynucleotides de l'étape b) est chargée directement sur le support de chromatographie en phase inverse.
- 16.** Procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 15, comprenant en outre, avant l'étape de mise en contact c), une dissolution de la deuxième composition de polynucléotides dans un solvant.
- 17.** Procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 16, dans lequel : l'au moins un contre-ion de cation multivalent est divalent, de préférence choisi dans le groupe constitué par le magnésium, le zinc et le calcium ; ou l'au moins un contre-ion de cation multivalent est trivalent, de préférence l'aluminium.
- 18.** Procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 17, dans lequel le premier sel de polynucléotides comprend en outre un contre-ion de cation monovalent.
- 19.** Composition comprenant : un précipité de sel d'un polynucléotide comprenant au moins un contre-ion de cation multivalent ; dans laquelle le polynucléotide a une séquence de 7 sous-unités de nucléosides ou plus complémentaires du composant d'ARN de la télomérase humaine et au moins deux des sous-unités de nucléosides sont réunies par une liaison inter-sous-unités de N3'→P5' thiophosphoramidate.
- 20.** Composition de la revendication 19, dans laquelle : l'au moins un contre-ion de cation multivalent est divalent, de préférence choisi dans le groupe constitué par le magnésium, le zinc et le calcium, mieux préféré le magnésium ; ou l'au moins un contre-ion de cation multivalent est trivalent, de préférence l'aluminium.
- 21.** Composition de l'une quelconque des revendications 19 à 20, dans laquelle le sel de polynucléotides comprend 3 mol% ou plus de contre-ion de cation multivalent ou comprend 1,0% en poids ou plus du contre-ion de cation multivalent.
- 22.** Composition de l'une quelconque des revendications 19 à 21, la composition étant un précipité.
- 23.** Composition de l'une quelconque des revendications 19 à 22, dans laquelle le polynucléotide est décrit par la formule



(I) :

(I)

dans laquelle :

chaque B est indépendamment une purine, une purine protégée, une pyrimidine ou une pyrimidine protégée

ou bien un analogue de celles-ci ; chaque X est indépendamment un oxygène ou un soufre ; chaque R 3

est indépendamment un hydrogène, un fluoro, un hydroxyle, un alcoxy, un alcoxy substitué ou un hydroxyle protégé ; R 6

est un amino, un hydroxyle, un amino protégé, un hydroxyle protégé, -O-T-Z ou -NH-T-Z ; chaque T est indépendamment un lieu optionnel ;

chaque Z est indépendamment H, un lipide, un véhicule, un oligonucléotide, un polymère, un polypeptide, un marqueur détectable ou une étiquette ; et n est un entier de 7 à 100.

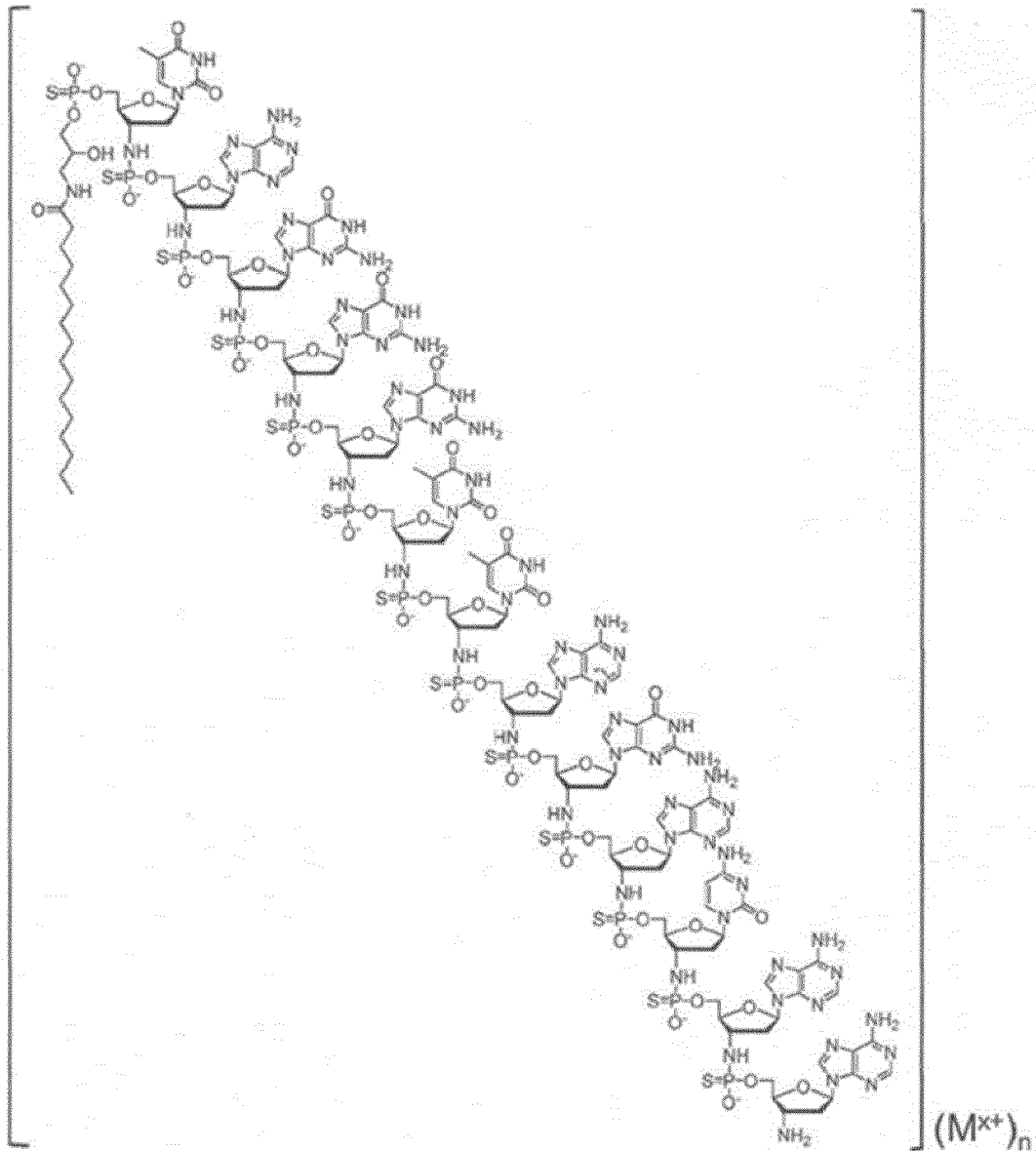
24. Composition de l'une quelconque des revendications 19 à 23, dans laquelle : le polynucléotide comprend une séquence comprenant 13 sous-unités de nucléosides ou plus complémentaires du composant d'ARN de la télomérase humaine ; ou le polynucléotide comprend entre 10 et 50 sous-unités de nucléosides contigus complémentaires du composant d'ARN de la télomérase humaine.

25. Composition de l'une quelconque des revendications 19 à 24, dans laquelle les sous-unités de nucléosides sont toutes réunies par des liaisons inter-sous-unités de N3'→-P5' thiophosphoramidate.

26. Composition de l'une quelconque des revendications 19 à 25, dans laquelle le polynucléotide comprend une séquence choisie dans le groupe constitué par : GTTAGGGTTAG (SEQ ID n° : 4), TAGGGTTAGACAA (SEQ ID n° : 3) et CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID n° : 5).

27. Composition de l'une quelconque des revendications 19 à 26, dans laquelle une extrémité 5' ou 3' du polynucleotide est conjuguée avec une fraction lipidique via un lieu optionnel.

28. Composition de l'une quelconque des revendications 19 à 27, dans laquelle le polynucléotide a la structure :



dans laquelle chaque M^{x+} est indépendamment un contre-ion cationique, chaque x est 1, 2 ou 3 et n est de 5 à 12.