



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 603 05 075 T2** 2006.12.14

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 578 968 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 05 075.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/SE03/01784**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 773 016.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2004/048569**

(86) PCT-Anmeldetag: **17.11.2003**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **10.06.2004**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.09.2005**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **03.05.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.12.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/10** (2006.01)

B01D 15/08 (2006.01)

C07H 1/06 (2006.01)

C07H 1/08 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

0203521 28.11.2002 SE

(73) Patentinhaber:

GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SE

(74) Vertreter:

Hammonds Rechtsanwälte Patentanwälte, 80539 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR

(72) Erfinder:

ERIKSSON, Amersham Biosciences AB, Kjell, S-751 84 Uppsala, SE; JOHANSSON, Amersham Biosciences AB, Bo-Lennart, S-751 84 Uppsala, SE

(54) Bezeichnung: **ISOLIERUNG VON ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Isolieren von Gegensinn-Oligonucleotiden von anderen Komponenten einer biologischen Lösung.

Hintergrund

[0002] Biotechnologische Verfahren werden in einem ansteigenden Ausmaß bei der Herstellung von Proteinen, Peptiden, Nucleinsäuren und anderen biologischen Verbindungen verwendet, für Forschungszwecke wie auch um neue Arten von Arzneimitteln herzustellen. Aufgrund ihrer Vielseitigkeit und Empfindlichkeit gegenüber den Verbindungen ist eine Chromatographie oft das bevorzugte Reinigungsverfahren in diesem Kontext. Der Begriff Chromatographie umfasst eine Familie von nahe verwandten Trennverfahren, die alle auf dem Prinzip basieren, dass zwei wechselseitig unmischbare Phasen in Kontakt gebracht werden. Spezieller wird die Zielverbindung in eine mobile Phase eingeleitet, die mit einer stationären Phase in Kontakt gebracht wird. Die Zielverbindung wird dann eine Anzahl von Wechselwirkungen zwischen den stationären und mobilen Phasen durchlaufen, wenn sie durch das System durch die mobile Phase getragen wird. Die Wechselwirkungen nutzen Unterschiede in den physikalischen oder chemischen Eigenschaften der Komponenten in der Probe aus.

[0003] Wechselwirkungen zwischen einer Zielverbindung und Metallchelate bildenden Gruppen, die auf der stationären Phase vorhanden sind, werden in einem chromatographischen Reinigungsverfahren genutzt, das Adsorptionschromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC) genannt wird, auch bekannt als Metallchelate bildende Affinitätschromatographie (MCAC), welche oft für die Reinigung von Proteinen verwendet wird. Das Prinzip hinter IMAC liegt in der Tatsache, dass viele Übergangsmetallionen an Phosphatgruppen und Stickstoffatome koordiniert sein können, wie in den Aminosäuren Histidin, Cystein und Tryptophan, über Elektronendonatorgruppen auf den Aminosäure-Seitenketten. Um diese Wechselwirkung für chromatographische Zwecke zu nutzen, muss das Metallion auf einem unlöslichen Träger immobilisiert werden. Dies kann durch Binden einer Chelat-bildenden Gruppe an die chromatographische Matrix ausgeführt werden. Am wichtigsten muss, um nützlich zu sein, das Metall der Wahl eine höhere Affinität für die Matrix als für die zu reinigenden Verbindungen besitzen. Beispiele geeigneter Koordinationsionen sind Cu(II), Zn(II), Ni(II), Ca(II), Co(II), Mg(II), Fe(III), Al(III), Ga(III), Sc(III) etc.

[0004] Verschiedene Chelat-bildende Gruppen sind

für die Verwendung in IMAC bekannt, wie Iminodisigsäure (IDA), die ein dreizähliger Chelator ist, und Nitrilotriessigsäure (NTA), die ein vierzähliger Chelator ist. Eine Elution eines IMAC-Harzes wird, was Proteine betrifft, üblicherweise durch Addition von Imidazol ausgeführt. Alternativ wird eine Elution herkömmlicherweise durch Verringern des pH ausgeführt.

[0005] In den letzten Jahren wurde IMAC erfolgreich für die Reinigung von Proteinen und Peptiden verwendet, wobei His-Markierungen durch rekombinante Techniken eingeführt worden sind, um eine effiziente Reinigung davon durch IMAC zu vereinfachen. Aus diesem Grund hat IMAC eine wichtigere Rolle in der Protein- und/oder Peptidherstellung in großem Maßstab angenommen. Zusätzlich wurde IMAC auch bei der Reinigung von phosphorylierten Proteinen und Peptiden aus tryptischen Proteinverdau verwendet. Derartige phosphorylierte Proteine und Peptide können nachfolgend durch ESI/MS/MS analysiert werden, um die phosphorylierten Stellen darin zu bestimmen.

[0006] Ferner wurde während der Zeitspanne, in der IMAC relativ neu war, deren Nutzung zur Reinigung verschiedener Verbindungen vorgeschlagen. Zum Beispiel offenbarten Porath et al. (US-Patent 4,677,027) 1985, wie biologische Makromoleküle und Teilchen unter Verwenden eines Produktes getrennt werden können, das aus einer festen Phase besteht, die immobilisierte Metallionen auf ihrer Oberfläche über Metallchelatebindung mit einem Polymer substituiert hat. Die in Betracht gezogenen Biomoleküle sind Viren und Zellen, aber Polysaccharide, Proteine und auch Oligonucleotide sind erwähnt. Jedoch haben seitdem Oligonucleotide aufgrund neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse neue Anwendungen gefunden, was wiederum neue Modifikationen davon nötig macht.

[0007] Ein Beispiel eines neuerdings entwickelten Gebietes, in dem Oligonucleotide modifiziert werden, ist die Gegensinn-Technologie im Drug-Discovery. Gegensinn-Arzneimittel arbeiten auf dem genetischen Level, um den Prozess zu unterbrechen, durch den krankheitsverursachende Proteine hergestellt werden. Dies ist möglich, da gezeigt wurde, dass Proteine eine zentrale Rolle in nahezu jedem Aspekt des menschlichen Stoffwechsels spielen. Fast alle menschlichen Krankheiten sind das Ergebnis einer unangemessenen Proteinproduktion, oder einer gestörten Proteinleistungsfähigkeit. Dies gilt sowohl für Wirtskrankheiten, wie Krebs, als auch infektiöse Krankheiten, wie AIDS. Traditionelle Arzneimittel sind entworfen, um im gesamten Körper mit Proteinmolekülen wechselzuwirken, die Krankheiten unterstützen oder verursachen. Gegensinn-Arzneimittel sind entworfen, um die Produktion von krankheitsverursachenden Proteinen zu inhibieren. Sie können entwor-

fen sein, um einen weiten Bereich von Krankheiten zu behandeln, einschließlich infektiösen, entzündlichen und kardiovaskulären Krankheiten und Krebs und haben das Potential, selektiver, und als ein Ergebnis, effektiver und weniger toxisch als traditionelle Arzneimittel zu sein. Der Mechanismus hinter der Gegensinn-Technologie wurde weitverbreitet beschrieben, siehe z.B. Uhlmann et al. in *Antisense Oligonucleotides: A New Therapeutic Principle*, Chemical Reviews, Bd. 90, Nr. 4, Juni 1990. Kurz gesagt, wie gut bekannt ist, werden während der Transkription der DNA zu RNA die zwei komplementären Stränge der DNA teilweise abgewickelt, wodurch der Strang, der als der Sinn-Strang bekannt ist, sich von dem Strang trennt, der als Gegensinn-Strang bekannt ist. Der Gegensinn-Strang wird dann als eine Matrix zum Transkribieren von Enzymen verwendet, die mRNA in dem als Transkription bekannten Prozess zusammenbauen. Die mRNA wandert dann in die Zelle, wo Ribosomen die kodierte Information lesen und Aminosäuren zusammenketten, um ein spezifisches Protein in dem als Translation bekannten Prozess zu bilden. Nun sind die Gegensinn-Arzneimittel komplementäre Stränge kleiner Segmente der mRNA, und sie können entweder DNA oder RNA sein. Um Gegensinn-Arzneimittel zu erzeugen, werden Nucleotide zusammengebunden in kurzen Ketten, die als Oligonucleotide bekannt sind. Jedes Gegensinn-Arzneimittel ist entworfen, um eine spezifische Sequenz von Nucleotiden in ihrem mRNA-Ziel zu binden, um die Produktion von Protein zu inhibieren, das durch die Ziel-mRNA kodiert wird.

[0008] Das Zusammenbinden von Oligonucleotiden kann in einer beliebigen Art kommerziell erhältlicher automatisierter Festphasen-Synthetisierer für die Synthese von Oligonucleotiden unter cGMP-Bedingungen für klinische Studien und kommerzielle Arzneimittellieferungen ausgeführt werden. In einer derartigen Synthese werden die Oligonucleotide, wobei ein Sauerstoffatom der Phosphatgruppe jeder Base in der nativen Nucleinsäure durch ein Schwefelatom ausgetauscht wurde, einfach hergestellt. Jedoch ist ein inhärentes Problem bei der Synthese derartiger zum Thioat gemachter Oligonucleotide, hier bezeichnet als Gegensinn-Oligonucleotide, die Tatsache, dass es praktisch unmöglich sein wird, mit einer Ausbeute von 100 % korrekt phosphorthioierter Oligonucleotide zu arbeiten. Stattdessen wird üblicherweise eine Ausbeute im Bereich von ungefähr 70-75 % erhalten. Demgemäß wird, bevor irgendein Gegensinn-Arzneimittel daraus hergestellt werden kann, das synthetisierte Produkt eine nachfolgende Reinigung erfordern, um eine ausreichende Qualität sicherzustellen.

[0009] Reversphasen-HPLC wird allgemein für die Reinigung von Gegensinn-Oligonucleotiden verwendet. Jedoch wird die Verwendung von hohen Drücken generell nicht als vorteilhafte Bedingungen für diese

Art von Prozess betrachtet, da sie hohe Anforderungen an die verwendete Ausrüstung stellt und es auch schwierig und nachfolgend kostenintensiv macht, den Prozess maßstäblich zu vergrößern. Zusätzlich können die organischen Lösungsmittel, die in dieser Technologie allgemein verwendet werden, für einige Anwendungen unerwünscht sein.

[0010] Deshmukh et al. (Deshmukh, R.R., Miller, J.E., De Leon, P., Leitch, W.E., Cole, D.L., und Sanghvi, Y.S. in „Process Development for Purification of Therapeutic Antisense Oligonucleotides by Anion-Exchange Chromatography“, *Organic Process Research & Development* 2000, 4, 205-213) beschreibt die Entwicklung eines Anionenaustausch-Chromatographieverfahrens zur Reinigung von Phosphorthioat-Gegensinn-Oligonucleotiden. Speziell wurden 20-mere, die Gegensinn-Inhibitoren des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1 sind, synthetisiert und nachfolgend auf einem Anionenaustauscher gereinigt, der funktionelle quaternäre Ammoniumgruppen auf einer auf Polystyrol basierenden Matrix trägt (Source 15 und Source Q 30, beide von Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden). Die vorteilhafteste Auflösung wird beobachtet für den höheren pH-Wert, der für die Elution getestet wurde, der pH 11 war. Jedoch muss noch gezeigt werden, ob ein vollständig zum Thioat gemachtes 20-mer von einem 20-mer getrennt werden kann oder nicht, bei dem einer oder mehrere der Zielsauerstoffe nicht durch Schwefel substituiert worden ist. So ist die Selektivität, die mit Ionenaustausch für die Reinigung von Gegensinn-Oligonucleotiden erhältlich ist, nicht vollständig zufriedenstellend. Zusätzlich ist ein anderer Nachteil, dass eine derartige Reinigung von Gegensinn-Oligonucleotiden durch Anionenaustausch-Chromatographie auch danach einen Schritt des Entsalzens erfordern wird, was einen weiteren Prozessschritt und demzufolge höhere Prozesskosten insgesamt beinhaltet.

[0011] Auf gleiche Weise haben Deshmukh et al. (Deshmukh, R.R., Warner, T.N., Hutchison, F., Murphy, M., Leitch, W.E., De Leon, P., Srivatsa, G.S., Cole, D.L., und Sanghvi, Y.S. in „Large-scale purification of antisense oligonucleotides by highperformance membrane adsorber chromatography“, *Journal of Chromatography A*, 890 (2000) 179-192) eine Reinigung von Gegensinn-Oligonucleotiden unter Verwenden starker Anionenaustauschmembranen vorgeschlagen. Jedoch ist, wie in dem oben beschriebenen Verfahren, die erhältliche Selektivität noch nicht vollständig zufriedenstellend (ist dies wahr, können wir beliebige andere Nachteile/Unterschiede hinzufügen). Zusätzlich führt die Verwendung von Membranen zu einer geringen Kapazität und daher werden Membranen großer Größe für einen vernünftig effizienten Prozess erforderlich sein. Schließlich wird dieses Verfahren wie der oben diskutierte Anionenaustausch auch anschließend einen Schritt des Entsal-

zens erfordern.

[0012] WO 99/09045 (Somagenics, Inc.) bezieht sich auf Gegensinn- und Antigen-Therapeutika mit verbesserten Bindungseigenschaften und Verfahren für ihre Verwendung. Spezieller bezieht sich die Erfindung auf Gegensinn- und Antigen-Oligonucleotide, die zum topologischen Binden an Zielnucleinsäuren auf eine Weise fähig sind, die die Translations- und Transkriptions-Inhibitoreigenschaften verbessert. In einer Ausführungsform werden Phosphorthioat-Analoga von Nucleinsäuren offenbart, die Schwefel anstelle von nicht-brückenbildenden Sauerstoffen, die an Phosphor gebunden sind, in terminalen und Internucleotid-Phosphaten besitzen. Diese Modifikation ist angeblich fähig zu einem stärkeren Binden an Metallaffinitäts-Chromatographiemedien als die unmodifizierten Äquivalente. Jedoch gibt es keinen Vorschlag oder keine Anleitung, dass Metallaffinitäts-Chromatographie zum Trennen von Oligonucleotiden mit einem variierenden Grad der Thioatbildung nützlich sein könnten. Ferner wurden in einer anderen Ausführungsform die Oligonucleotide platiniiert. Derartige platiniierte Oligonucleotide werden leicht von Reaktionsmischungen durch präparative Elektrophorese getrennt, oder alternativ durch Ionenaustauschsäulen-Chromatographie. Es wird auch vorgeschlagen, Metallaffinitäts-Chromatographie auf merkuriierte Säulen als ein Ein-Schritt-Verfahren der Reinigung von platiniierten Oligonucleotiden zu verwenden, aber dies ist lediglich ein Vorschlag. Nichts in diesem Dokument liefert irgendeinen Beweis, dass eine derartige Reinigung effizient sein oder sogar arbeiten würde, und die Komponenten der „Reaktionsmischung“ sind nicht definiert.

[0013] So gibt es immer noch einen Bedarf an alternativen Prozeduren zur Reinigung von Gegensinn-Oligonucleotiden, speziell an Verfahren, die empfindlich genug sind, Gegensinn-Oligonucleotide unterschiedlichen Thioatbildungs-Grades voneinander zu trennen.

Zusammenfassung der vorliegenden Erfindung

[0014] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zum Isolieren von Gegensinn-Oligonucleotiden von entsprechenden nicht korrekt synthetisierten Oligonucleotiden und/oder nicht vollständig zum Thioat gemachten Oligonucleotiden in einer biologischen Lösung bereit zu stellen. Dies kann erreicht werden durch das Verfahren, wie es in den Ansprüchen definiert ist.

[0015] Eine spezifische Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zum Isolieren von Gegensinn-Oligonucleotiden aus einer biologischen Lösung bereit zu stellen, wobei das Verfahren eine verbesserte Selektivität im Vergleich zu den Verfahren des Stands der Technik zeigt.

[0016] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zum Isolieren von Gegensinn-Oligonucleotiden aus einer biologischen Lösung bereit zu stellen, wobei das Verfahren die Notwendigkeit für organische Lösungsmittel und/oder hohe Drücke im Vergleich zu Verfahren des Stands der Technik reduziert.

[0017] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zum Isolieren von Gegensinn-Oligonucleotiden aus einer biologischen Lösung bereit zu stellen, wobei das Verfahren leicht maßstäblich vergrößerbar und daher kostengünstiger als die Verfahren des Stands der Technik ist.

[0018] Andere Aufgaben und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden sich aus der folgenden detaillierten Offenbarung ergeben.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0019] [Fig. 1](#) zeigt ein Beispiel eines in voller Länge sieben-basigen, vollständig zum Thioat gemachten Phosphorthioats (a) voller Länge; sein Monophosphodiester-Analogon (b) und eine einzelne Deletionssequenz (c).

[0020] [Fig. 2](#) zeigt IMAC unter Verwenden von Fe^{3+} als Metallion, wie beschrieben in Beispiel 1 unten, und veranschaulicht einen Vergleich der Elution zweier unterschiedlicher Oligonucleotide mit derselben Sequenz von Basen.

[0021] [Fig. 3](#) zeigt IMAC unter Verwenden von Zr^{2+} als Metallion, wie beschrieben in Beispiel 2 unten, und veranschaulicht einen Vergleich der Elution zweier unterschiedlicher Oligonucleotide mit derselben Sequenz von Basen.

[0022] [Fig. 4](#) zeigt ein Beispiel einer effizienten Trennung eines vollständig zum Thioat gemachten (20S)-Oligonucleotids aus einem Oligonucleotid mit zwei Phosphodiesterbindungen („2P“), unter Verwenden von IMAC.

[0023] [Fig. 5](#) zeigt eine klare Trennung eines vollständig zum Thioat gemachten (20S)-Oligonucleotids von einem Oligonucleotid mit zwei Phosphodiesterbindungen („2P“), unter Verwenden von IMAC, diesmal durch schrittweise Elution.

Definitionen

[0024] In dieser Beschreibung wird der Begriff „Oligonucleotid“ in seiner herkömmlichen Bedeutung verwendet, d.h. um eine Sequenz von Nucleotiden zu bedeuten, und der Begriff „Polynucleotid“ bezieht sich auf einer längeren Sequenz von Nucleotiden als das Oligonucleotid.

[0025] Der Begriff „Nucleotid“ bedeutet einen Rest, der aus drei Teilen besteht, nämlich einem anorganischen Phosphat, einem einfachen Zucker oder entweder einer Purin- oder einer Pyrimidin-Base. In jedem Nucleotid sind die drei Teile aneinander in der Reihenfolge – Phosphat – Zucker – Base gebunden. In einem Oligonucleotid verbinden Esterbindungen die Zucker- und Phosphat-Komponenten von benachbarten Nucleotidmonomeren. Da der Zucker und das Phosphat innerhalb eines Nucleotid-Monomers auch über eine Esterbindung gebunden sind, ist die Zucker-Phosphat-Zucker-Bindung entlang des Rückgrats einer Poly- oder Oligonucleotidkette als eine Phosphodiesterbindung bekannt.

[0026] Der Begriff „Chromatographie“ umfasst chromatographische Trennverfahren, die in gepackten Säulen, in gestreckten oder suspendierten Betten und auf Membranen ausgeführt werden.

[0027] Der Begriff „Harz“ bezieht sich auf die feste Phase, die in der Chromatographie verwendet wird, d.h. das Adsorbens, das die Zielspezies einfängt. Ein „Harz“ kann in der Form aus porösen oder nicht-porösen kugelförmigen oder im wesentlichen kugelförmigen Teilchen, Perlen, wie Perlen für die Adsorption im gestreckten Bett, und Monolithen hergestellt werden. Ferner können durch Vorsehen des Harzes auf einem Träger Membranen bereit gestellt werden, die auch für die Isolierung einer Spezies aus einer Flüssigkeit nützlich sind. Ein Harz ist auch auf diesem Gebiet als eine Matrix bekannt.

[0028] Der Begriff „Adsorption“ bedeutet hier das Binden einer Spezies an einen Liganden oder auf einem Harz.

[0029] Der Begriff „Eluent“ wird hier in seiner herkömmlichen Bedeutung verwendet, d.h. für eine Lösung, die zum Stören der Wechselwirkung zwischen der festen Phase (Harz) und dem Produkt (Zielspezies) und Fördern der selektiven Dissoziation des Produktes von der festen Phase fähig ist.

[0030] Demzufolge bedeutet der Begriff „Desorption“, die Wechselwirkung wie oben erklärt zu stören. Der Begriff „Puffer“ oder „gepufferte Lösung“ bezieht sich auf eine Mischung einer Säure und einer Base, die, wenn sie in einer Lösung vorhanden ist, Änderungen im pH reduziert oder reguliert, die andernfalls in der Lösung auftreten würden, wenn Säure oder Base zugegeben wird.

[0031] Der Begriff „Isolation“ bedeutet hier eine Trennung von anderen Komponenten und liefert eine im wesentlichen reine Zielverbindung, wie ein im wesentlichen reines Gegensinn-Oligonucleotid.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0032] Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Isolieren von vollständig zum Thioat gemachten Einzelstrang-Gegensinn-Oligonucleotiden aus einer biologischen Lösung, umfassend die Schritte des Inkontaktbringens der biologischen Lösung mit einem Harz zur Adsorptions-Chromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC) unter Adsorbieren von Gegensinn-Oligonucleotiden an das Harz und nachfolgendes Inkontaktbringen des Harzes mit einem Eluenten unter Bedingungen, die zu einer Desorption der Gegensinn-Oligonucleotide von dem Harz führen, wobei die vollständig zum Thioat gemachten Gegensinn-Oligonucleotide von nicht korrekt zum Thioat gemachten Gegensinn-Oligonucleotiden in der Lösung getrennt werden. So ermöglicht die vorliegende Erfindung andere Komponenten vollständig zum Thioat gemachter Einzelstrang-Gegensinn-Oligonucleotide einer biologischen Lösung zu reinigen, und ermöglicht daher, die Oligonucleotide in einer wesentlich reinen Form zu erhalten.

[0033] Wie jenen Fachleuten in diesem Gebiet gut bekannt ist, ist während der Synthese von Gegensinn-Oligonucleotiden, neben Oligonucleotiden einer nicht korrekten Länge, die häufigste Kontamination Oligonucleotide, die nicht vollständig zum Thioat gemacht worden sind. Demgemäß genügt die vorliegende Erfindung einer wichtigen Notwendigkeit bei der Herstellung von Gegensinn-Oligonucleotiden für therapeutische oder andere Anwendungen.

[0034] So nutzt die vorliegende Erfindung nach unserer Erkenntnis zum ersten Mal die Wechselwirkung eines Metalls mit der Rückgrat-Phosphothioat-Gruppe einer Nucleinsäure bei der Reinigung von Gegensinn-Oligonucleotiden. Ohne zu wünschen, die vorliegende Erfindung auf irgendwelche spezifischen Wechselwirkungen zu beschränken, wird auch angenommen, dass die Stickstoffatome einer oder mehrerer der Basen Adenin, Guanin, Uracil, Cytosin und Thymin des Oligonucleotids auch in dieser Bindung involviert sein könnten.

[0035] Im vorliegenden Kontext muss verstanden werden, dass der Begriff „vollständig“ zum Thioat gemacht bedeutet, dass in 100% der Phosphat-Rückgrat-Gruppen, die in einem entsprechenden nativen Oligonucleotid vorhanden sind, eines der nicht-brückenbildenden Sauerstoffatome im Phosphatrückgrat durch ein Schwefelatom ersetzt worden ist.

[0036] Das IMAC-Harz, das in dem vorliegenden Verfahren verwendet wird, kann ein beliebiges Harz sein, wie dasjenige, das im Abschnitt „Hintergrund“ erläutert ist. Kurz gesagt umfassen die Metallchelatl-bildenden Gruppen zum Beispiel die Iminodisig-(IDA)-Gruppe, die Tris(carboxymethyl)-ethylendi-amin-(TED)-Gruppe, die N-(Hydroxyethyl)-ethylendi-

amintriessigsäure-Gruppe und Derivate, wie die N-(Methyl)- und N-(Hydroxymethyl)-IDA-Gruppen. Diese Gruppen können an den natürlichen oder synthetischen polymeren Träger durch aliphatische Standard-Ether-Bindungen und -reagenzien vernetzt werden, wie Bisoxiran, Epichlorhydrin und 1,4-Bis-(2,3-epoxypropoxy)butan. Beispiele natürlicher polymerer Trägermaterialien sind z.B. Agarose, Alginat, Carrageenan, Gelatine etc. Synthetische Polymere können veranschaulicht werden durch Styrol oder Derivate, Divinylbenzol, Acrylamid, Acrylatester, Methacrylatester, Vinylester, Vinylamide etc., gegebenenfalls vernetzt mit einem beliebigen herkömmlichen Vernetzer wie Divinylbenzol, di- oder polyfunktionelle (Meth)Acrylatester, di- oder polyfunktionelle (Meth)Acrylamide, Triallylisocyanurat, Divinylamide. Zur Klarstellung wird in diesem Kontext verstanden, dass ein IMAC-Harz, wie es im vorliegenden Verfahren verwendet wird, aus einem Träger besteht, an den chelatierende Gruppen gebunden worden sind, und mit koordinierenden Ionen beladen ist. Beispiele geeigneter koordinierender Metallionen sind z.B. Al-, Ce-, Cu-, Co-, Fe-, In-, Ga-, Ge-, Lu-, Ni-, Ru-, Sb-, Sc-, Sn-, Yc-, Zn-, Zr-, Ta- und Th-Ionen. In einer Ausführungsform der Erfindung ist das Metallion Zr^{2+} oder Fe^{3+} .

[0037] Gemäß der vorliegenden Erfindung stellt diese Ausführungsform eine stärkere Bindung an den Phosphor der Brücke bereit, als an den entsprechenden Schwefel. IMAC-Harze sind auch kommerziell erhältlich, wie HiTrap™ Chelating-HP-Säulen und Chelating Sepharose™ Fast Flow, beide von Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden.

[0038] In diesem Kontext wird verstanden, dass der Begriff „Harz“ verwendet wird, um Teilchen und Perlen, wie auch Monolithen und Membranen zu umfassen.

[0039] Die erwünschten Gegensinn-Oligonucleotide können von vielen Arten von Komponenten der biologischen Lösung getrennt werden, wie Proteine oder nicht korrekt synthetisierte Oligonucleotide, zum Großteil abhängig von der Natur der biologischen Lösung. So wird in einer Ausführungsform die biologische Lösung von einer automatisierten Synthese von Gegensinn-Oligonucleotiden bereit gestellt. Daher ist in dieser Ausführungsform die biologische Lösung eine Syntheselösung. In einer ähnlichen Ausführungsform ist die biologische Lösung eine Lösung, bei der die Gegensinn-Oligonucleotide synthetisiert worden sind unter Verwenden von nicht-automatisierten Verfahren. So kann die Synthese in Lösung gemäß gut bekannter Verfahren oder in einer beliebigen kommerziell erhältlichen Art von Ausrüstung ausgeführt werden, wie ein AKTA™ Oligopilot (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden). In einer anderen Ausführungsform ist die biologische Lösung ein Serum, wie ein menschliches Serum, und

der Zweck des Verfahrens kann dann sein, die Gegensinn-Oligonucleotide, die darin vorhanden sind, zu quantifizieren. Diese Ausführungsform kann Teil eines Behandlungsschemas sein, wobei es erwünscht ist, das Vorhandensein des Arzneimittels, d.h. des Gegensinn-Oligonucleotids im Blut des Patienten zu testen.

[0040] In einer Ausführungsform sind die isolierten Einzelstrang(ss)-Gegensinn-Oligonucleotide von einer Größe im Bereich 10-30 Basen, wie 15-25 Basen und spezieller 18-21 Basen. In einer spezifischen Ausführungsform sind die Gegensinn-Oligonucleotide von einer Größe im Bereich von ungefähr 18-20 Basen. In einer anderen Ausführungsform bestehen die Gegensinn-Oligonucleotide aus bis zu ungefähr 25 Basen, wie bis zu 20 Basen. In einer noch anderen Ausführungsform bestehen die Gegensinn-Oligonucleotide aus mindestens 5 Basen, wie mindestens ungefähr 10 Basen. Jedoch wird in diesem Kontext verstanden, da es gut bekannt ist, dass die Art des zu behandelnden Zustands unter Verwenden der Gegensinn-Technologie die Natur, wie die Basensequenz und die Größe des Gegensinn-Oligonucleotids entscheiden wird, dass die vorliegende Erfindung auch kürzere oder längere Oligonucleotide auch umfassen wird, falls sie in einem auf der Gegensinn-Technologie basierenden Arzneimittel nützlich sind. Derartige Arzneimittel sind bei der Behandlung sowohl von Wirtskrankheiten, wie Krebs, als auch infektiösen Krankheiten, wie detaillierter im Abschnitt „Hintergrund“ oben diskutiert wurde, nützlich.

[0041] Jedoch, wie auch im Hintergrund-Abschnitt oben angegeben, führt die Synthese von Gegensinn-Oligonucleotiden oft teilweise zu nicht korrekt synthetisierten Gegensinn-Oligonucleotiden. Die häufigsten Verunreinigungen in einer biologischen Lösung, die aus einer derartigen Synthese resultiert, sind Deletionssequenzen, d.h. Gegensinn-Oligonucleotide, die eine oder mehrere Basen kürzer sind als das erwünschte Produkt. Derartige deletierte Oligonucleotide können beschrieben werden als (n-1)-mere, (n-2)-mere, (n-3)-mere etc., wobei n die Anzahl von Nucleotiden des erwünschten Produktes voller Länge bezeichnet. So werden in einer Ausführungsform des vorliegenden Verfahrens die vollständig zum Thioat gemachten Gegensinn-Oligonucleotide von nicht korrekt synthetisierten Oligonucleotiden getrennt. Andere Beispiele von nicht korrekt synthetisierten Oligonucleotiden sind Additionssequenzen, d.h. Gegensinn-Oligonucleotide, die länger sind als die erwünschten Produkte, und verzweigte Produkte.

[0042] Ein anderes Beispiel von unerwünschten Komponenten in einer biologischen Lösung, die aus einer Gegensinn-Oligonucleotid-Synthese resultieren, ist eine nicht korrekt zum Thioat gemachte Sequenz, d.h. nicht vollständig zum Thioat gemachte Oligonucleotide. Wie oben erwähnt, sind diese eine

der am meisten häufig auftretenden Kontaminationen in einer Syntheselösung. Die häufigste Form sind Oligonucleotide mit einer oder zwei Bindungen ohne Thioatbildung. So werden in einer Ausführungsform des vorliegenden Verfahrens vollständig zum Thioat gemachte Gegensinn-Oligonucleotide von nicht korrekt zum Thioat gemachten Gegensinn-Oligonucleotiden getrennt, die 1 bis 5, wie 1 oder 2, Bindungen ohne Thioatbildung enthalten. Weitere Beispiele von nicht korrekt zum Thioat gemachten Oligonucleotiden sind z.B. 20-meres Oligonucleotide, wobei eine Phosphodiestergruppe nicht korrekt zum Thioat gemacht wurde, und daher werden Oligonucleotide, die zu ungefähr 95% zum Thioat gemacht worden sind, von den vollständig zum Thioat gemachten getrennt. Auf ähnliche Weise wird ein 19-meres, 18-meres oder 17-meres Oligonucleotid, bei dem eine Base nicht korrekt zum Thioat gemacht worden ist, zu ungefähr 94% zum Thioat gemacht. Demgemäß werden in einer Ausführungsform die vorliegenden vollständig zum Thioat gemachten Gegensinn-Oligonucleotide von Oligonucleotiden getrennt, die zu ungefähr 90%, wie ungefähr 94% und bevorzugt ungefähr 95% zum Thioat gemacht sind. In einer anderen Ausführungsform werden die vorliegenden vollständig zum Thioat gemachten Gegensinn-Oligonucleotide von Oligonucleotiden getrennt, die zu ungefähr 40%, bevorzugt zu ungefähr 60%, bevorzugter zu ungefähr 80% und am meisten bevorzugt zu ungefähr 90% zum Thioat gemacht sind.

[0043] Im Stand der Technik, wenn Proteine und/oder Peptide isoliert worden sind unter Verwenden von IMAC, wurden neutrale Bedingungen oder solche nahe dem neutralen pH, wie ungefähr 7,5-8,0 genutzt. Die vorliegenden Erfinder haben unerwarteter Weise gefunden, dass, wenn Gegensinn-Oligonucleotide unter Verwenden von IMAC isoliert werden, ein niedrigerer pH vorteilhafter ist. So werden in einer Ausführung der vorliegenden Erfindung die Bedingungen für eine Adsorption durch einen pH-Wert unterhalb dem Neutralen definiert. In einer spezifischen Ausführungsform wird der pH auf unter ungefähr 7 eingestellt, wie ungefähr 5. So kann der pH der biologischen Lösung beim Kontakt mit dem Harz in einem Bereich von 0-7, 0-6 oder 0-5 sein. Der pH wird leicht durch den Fachmann auf diesem Gebiet eingestellt durch Zugabe eines/einer geeigneten Puffers oder Säure, wie verdünnte Essigsäure. In einer vorteilhaften Ausführungsform wird der pH auf ungefähr 5,0 eingestellt und der verwendete Puffer ist 15 mM Natriumacetat. Wie leicht erkannt wird, sollte, da Oligonucleotide gegenüber extremen pH-Werten empfindlich sind, dafür gesorgt werden, den pH nicht auf irgendeine Weise einzustellen, die die Gegensinn-Oligonucleotide schädigen kann.

[0044] Die Elution der erwünschten Gegensinn-Oligonucleotide vom Harz kann ausgeführt werden gemäß Standardverfahren unter Verwenden eines an-

steigenden pH- und/oder Phosphatgradienten, z.B. unter Verwenden von Kaliumphosphat. Ein veranschaulichender Gradient ist wie im experimentellen Teil unten verwendet, nämlich ausgehend von dem pH, der für die Adsorption verwendet wurde, wie von 0,1 % Essigsäure bis 0,5 M Kaliumphosphat. In einer alternativen Ausführungsform beträgt der Gradient von pH 3,0 bis 0,2 M Kaliumphosphat. Andere gut bekannte Salze und Puffer sind auch für die Elution nützlich und der Fachmann kann leicht die angemessenen Bedingungen für die Elution einstellen. Wie der Fachmann auf diesem Gebiet erkennen wird, wird die Zugabe von Salz die Ionenstärke vergrößern, und daher wird der pH, der die Gegensinn-Oligonucleotide umgibt, sich etwas ändern. Jedoch wird der pH im allgemeinen während der Adsorption der Gegensinn-Oligonucleotide noch kleiner sein als die Bedingungen, die zur Verwendung des IMAC für Proteintrennung bekannt sind.

[0045] In einer spezifischen Ausführungsform umfasst das vorliegende Verfahren zusätzlich einen nachfolgenden Schritt des Glättens der isolierten Gegensinn-Oligonucleotide. Ein derartiges Glätten wird einfach ausgeführt durch den Fachmann in diesem Gebiet, wie durch Gelfiltration, Detritylierungs-Präzipitation, Entsalzen, Änderung des Puffers etc.

[0046] Sogar obwohl die unten gezeigten Beispiele einen kleinen Labormaßstab einsetzen, wird verstanden, dass der Fachmann auf diesem Gebiet leicht das vorliegende Verfahren auf eine Größe maßstäblich vergrößern kann, die in einer Herstellungsfabrik nützlich ist. So ist ein Vorteil des vorliegenden Verfahrens, dass es weniger kostenintensive Lösungsmittel und Ausrüstung erfordert, als z.B. das zuvor vorgeschlagene Reversphasen-Chromatographie(RPC)-Verfahren.

[0047] Ein dritter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Harzes zur Affinitätschromatographie an immobilisiertem Metall (IMAC) zur Isolierung von Gegensinn-Oligonucleotiden aus entsprechenden Oligonucleotiden in einer biologischen Lösung. Das IMAC-Harz kann sein wie in Bezug auf das Verfahren gemäß der Erfindung diskutiert wurde, und die oben diskutierten Betrachtungen können auch für die vorliegende Verwendung gelten.

[0048] Schließlich bezieht sich die vorliegende Erfindung auch auf ein Kit zur Reinigung von vollständig zum Thioat gemachten Einzelstrang-Gegensinn-Oligonucleotiden aus einer biologischen Lösung, wobei das Kit eine Chromatographiesäule umfasst, die mit einem Harz zur Adsorptionschromatographie an immobilisierte Metallionen (IMAC) gepackt ist, und geschriebenen Instruktionen für die Trennung der vollständig zum Thioat gemachten Oligonucleotide von nicht vollständig zum Thioat gemachten Oligonucleotiden. Das vorliegende Kit kann eine Säule im Labor-

maßstab oder eine Säule einer Größe umfassen, die für die Produktion von Gegensinn-Oligonucleotiden im großen Maßstab geeignet ist. Ferner kann das Kit (einen) Puffer umfassen, der/die zur Elution und gegebenenfalls auch zum Waschen in einer getrennten Kammer (in getrennten Kammern) geeignet ist.

Detaillierte Beschreibung der Zeichnungen

[0049] [Fig. 1](#) zeigt ein Beispiel eines mit einer vollen Länge von sieben Basen vollständig zum Thioat gemachten Phosphorthioats (a); sein Monophosphodiester-Analogon (b) und eine einzelne Deletionssequenz, die zu einem (n-1)-mer (c) führt.

[0050] [Fig. 2](#) zeigt IMAC unter Verwenden von Fe^{3+} als ein Metallion, wie unten in Beispiel 1 beschrieben, und veranschaulicht einen Vergleich der Elution zweier unterschiedlicher Oligonucleotide mit derselben Basensequenz. Die X-Achse zeigt das Retentionsvolumen in ml, während die Y-Achse die UV-Absorbanz bei 260 nm in mAU zeigt. Eines der Oligonucleotide ist vollständig zum Thioat gemacht (als 20S in [Fig. 2](#) bezeichnet), während das andere unmodifiziert ist (als 20P in [Fig. 2](#) bezeichnet). Es zeigt sich klar, dass das Gegensinn-Oligonucleotid von der Phosphodiester(nicht modifizierten)-Form von Oligonucleotiden getrennt werden kann, wobei die zum Thioat gemachte Form als ein relativ schmaler Peak bei 7,3 ml eluiert wird, vor der unmodifizierten Form. Die zwei kleinen Peaks, die früh im Chromatogramm eluierten, sind vermutlich Synthese-bezogen, und werden durch Verunreinigungen in der Probe verursacht, die keinerlei Phosphothioate oder Phosphodiester-Gruppen enthalten.

[0051] [Fig. 3](#) zeigt IMAC unter Verwenden von Zr^{2+} als ein Metallion, wie unten in Beispiel 2 beschrieben, und veranschaulicht einen Vergleich der Elution zweier unterschiedlicher Oligonucleotide mit derselben Basensequenz. Die X- und Y-Achsen sind wie oben beschrieben. Eines der Oligonucleotide ist vollständig zum Thioat gemacht (als 20S in [Fig. 3](#) bezeichnet), während das andere unmodifiziert ist (als 20P in [Fig. 3](#) bezeichnet). Es zeigt sich klar, dass das Gegensinn-Oligonucleotid von der Phosphodiester(nicht modifizierten)-Form der Oligonucleotide getrennt werden kann, wobei die zum Thioat gemachte Form wieder als ein relativ schmaler Peak bei ungefähr 9,4 ml eluiert wird vor der unmodifizierten Form. Die zwei kleinen Peaks, die vorher im Chromatogramm eluierten, werden wie oben für [Fig. 2](#) erklärt. Ein Vergleich der [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) zeigt eine stärkere Affinität der Oligonucleotide für das Zr-Ion als für das Fe-Ion, jedoch wird angemerkt, dass die verwendeten Bedingungen nicht optimiert worden sind.

[0052] [Fig. 4](#) zeigt ein Beispiel einer effizienten Trennung zweier Oligonucleotide mit derselben Sequenz, wie im Detail in Beispiel 3 beschrieben. Spe-

zifischer zeigt diese Zeichnung, dass es durchaus möglich ist, ein vollständig zum Thioat gemachtes („2P“-)-Oligonucleotid von einem Oligonucleotid mit zwei Phosphodiesterbindungen („2P“) unter Verwenden von IMAC zu trennen. Die Peaks sind klar getrennt im Chromatogramm. Für die Elution wurde ein linearer 10 CV-Gradient von 15 mM Natriumacetat bis 0,2 M Kaliumphosphat verwendet.

[0053] [Fig. 5](#) zeigt wieder eine klare Trennung zweier Oligonucleotide mit derselben Sequenz wie in Beispiel 4 beschrieben. Spezifischer zeigt diese Zeichnung eine vollständige Basislinien-Auflösung der Peaks entsprechend einem vollständig zum Thioat gemachten Oligonucleotid (20S) von jedem eines Oligonucleotids mit zwei Phosphodiesterbindungen („2P“). So zeigt die vorliegende Erfindung, dass es möglich ist, ein vollständig zum Thioat gemachtes Oligonucleotid von einem Oligonucleotid mit zwei Phosphodiesterbindungen unter Verwenden von IMAC und schrittweiser Elution zu trennen. Für die Elution wurde ein Schritt-Gradient verwendet: Schritt 1 war bei 0,1 M Kaliumphosphat und Schritt 2 bei 0,2 M Kaliumphosphat. Die in den Beispielen 3 und 4 erhaltenen Ergebnisse, wie dargestellt in den [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#), liefern den Nachweis, der eine wesentliche Wichtigkeit der Phosphonat-Gruppen in der vorliegende Bindung stützt, nicht der Basen. Daher widerspricht dies demjenigen, das in der oben diskutierten WO 99/09045 angezeigt wurde, wo behauptet wurde, dass ein höherer Grad der Thioatbildung ein stärkeres Binden an das IMAC-Harz ergeben würde.

Experimenteller Teil

[0054] Die vorliegenden Beispiele sind nur für veranschaulichende Zwecke vorgesehen und sollten nicht als den Umfang der vorliegenden Erfindung, wie er durch die beigefügten Ansprüche definiert ist, beschränkend betrachtet werden. Alle unten und irgendwo in der vorliegenden Beschreibung angegebenen Literaturstellen sind hierdurch durch Bezugnahme enthalten.

Beispiel 1: Reinigung eines Einzelstrang-Gegensinn-Oligonucleotids durch IMAC unter Verwenden von Fe^{3+} als Metallion.

[0055] Die in dieser Studie verwendeten Oligonucleotide waren 20-mere mit der Sequenz GGC CAA GCT GGC ATC CGT CA. Zwei unterschiedliche Oligonucleotide wurden verwendet, eines vollständig zum Thioat gemacht und das andere ohne irgendeine Modifikation (Phosphodiester-Form).

[0056] Für die Studie wurde eine kleine IMAC-Säule mit einer IDA-Chemie, die HiTrap™ Chelating-HP-Säule (1 ml Volumen) (erhältlich von Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden, Prod. # 17-0408-01) verwendet.

[0057] Die in diesem Beispiel verwendeten Lösungsmittel/Puffer sind für IMAC ziemlich unüblich. Als bindender „Puffer“ wurde eine Lösung von 0,1 % Essigsäure in Wasser verwendet. Die Elution wurde mit einem 10-Column-Volume-Lineargradienten von 0,1 % Essigsäure in Wasser bis 0,05 M Kaliumphosphat erreicht. Jedoch wird angemerkt, dass diese Bedingungen nicht optimiert waren, weder zum Binden (Adsorption), noch für die Elution.

[0058] Die Fließgeschwindigkeit des Eluenten betrug 1 ml/min und die Detektion wurde mit UV bei 260 nm durchgeführt.

[0059] So wurde Fe^{3+} getestet und als ein Metallion im Verfahren gemäß der Erfindung nützlich befunden. Die Ergebnisse dieses Beispiels sind wie in [Fig. 2](#) gezeigt.

Beispiel 2: Reinigung von Einzelstrang-Gegensinn-Oligonucleotiden durch IMAC unter Verwenden von Zr^{2+} als Metallion

[0060] Die in dieser Studie verwendeten Oligonucleotide waren die 20-mere, die in Beispiel 1 beschrieben wurden. Für die Studie wurde eine kleine IMAC-Säule mit IDA-Chemie, die HiTrap™ Chelating-HP-Säule (1 ml Volumen) (erhältlich von Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden, Prod. # 17-0408-01) verwendet.

[0061] In diesem Beispiel war der bindende „Puffer“, wie in Beispiel 1, eine Lösung von 0,1 % Essigsäure in Wasser. Die Elution wurde hier mit einem 10-Column-Volume-Lineargradienten von 0,1 Essigsäure in Wasser bis 0,2 M Kaliumphosphat erreicht. Jedoch wird angemerkt, dass diese Bedingungen auch nicht optimiert waren.

[0062] Die Fließgeschwindigkeit des Eluenten betrug 1 ml/min und die Detektion wurde mit UV bei 260 nm durchgeführt.

[0063] So wurde Zr^{2+} getestet und als ein Metallion im Verfahren gemäß der Erfindung nützlich befunden. Die Ergebnisse dieses Beispiels sind in [Fig. 3](#) gezeigt.

Beispiel 3: Reinigung synthetischer (Gegensinn-)Oligonucleotide von nicht vollständig zum Thioat gemachten Oligonucleotiden durch IMAC. Elution durch Lineargradienten

[0064] Dieses Beispiel zeigt, dass das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung zum Trennen vollständig zum Thioat gemachter Oligonucleotide von nur teilweise zum Thioat gemachten Oligonucleotiden fähig ist.

[0065] Die in dieser Studie verwendeten Oligonuc-

leotide waren 20-mere mit der Sequenz GCC CAA GCT GGC ATC CGT CA. Zwei unterschiedliche Oligonucleotide wurden verwendet, eines vollständig zum Thioat gemacht und eines mit zwei der Bindungen ohne Modifikation (Phosphodiester-Form). Die Phosphodiesterbindungen befanden sich an der Position 10 bzw. 15 (definiert vom 5'-Ende).

[0066] Für die Studie wurde eine kleine IMAC-Säule mit IDA-Chemie, die HiTrap™ Chelating-HP-Säule (1 ml Volumen) (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden, Prod. # 17-0408-01) verwendet. Zr^{2+} war das studierte Metallion.

[0067] Die hier verwendeten Lösungsmittel und Puffer sind für IMAC ziemlich unüblich. Als bindender Puffer wurde 15 mM Natriumacetat verwendet und der pH betrug 5,0. Die Elution wurde durch Kaliumphosphat, 0,2 M, pH 6,5 erreicht. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min und die Detektion wurde mit UV bei 260 nm durchgeführt.

[0068] Die Ergebnisse sind in [Fig. 4](#) gezeigt, die auch einen Vergleich zwischen dem vollständig zum Thioat gemachten (20S) und dem Oligonucleotid mit zwei Phosphodiesterbindungen („2P“) bereit stellt.

Beispiel 4: Reinigung synthetischer (Gegensinn-)Oligonucleotide von nicht vollständig zum Thioat gemachten Oligonucleotiden durch IMAC, Elution durch Schrittgradienten

[0069] Dies ist ein zweites Beispiel, das veranschaulicht, wie das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung zum Trennen vollständig zum Thioat gemachter Oligonucleotide von teilweise zum Thioat gemachten Oligonucleotiden fähig ist. Die Ausgangsmaterialien und Instrumente waren wie oben in Beispiel 3, der Puffer ist 15 mM Natriumacetat, pH 5,0, und in diesem Beispiel wird die Elution durch einen Schrittgradienten durchgeführt. Der erste Schritt ist 2 CV bei 0,1 M Kaliumphosphat und der zweite Schritt ist mit 2 CV bei 0,2 M Kaliumphosphat. Die Ergebnisse sind in [Fig. 5](#) bereit gestellt, die eine Trennung einer Mischung zweier Oligonucleotide zeigt, ein vollständig zum Thioat gemachtes (20S) und ein Oligonucleotid mit zwei Phosphodiesterbindungen („2P“).

Patentansprüche

1. Verfahren zum Isolieren von vollständig zum Thioat gemachten Einzelstrang-Gegensinn-Oligonucleotiden aus einer biologischen Lösung, wobei das Verfahren umfasst die Schritte des Inkontaktbringens der biologischen Lösung mit einem Harz zur Adsorptionschromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC) unter Adsorbieren von Gegensinn-Oligonucleotiden an das Harz und nachfolgendes Inkontaktbringen des Harzes mit einem Eluenten unter Bedingungen, die zu einer Desorption der Gegensinn-Oli-

gonucleotide von dem Harz führen, wobei die vollständig zum Thioat gemachten Gegensinn-Oligonucleotide von nicht korrekt zum Thioat gemachten Gegensinn-Oligonucleotiden in der Lösung getrennt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die biologische Lösung aus einer Synthese von Gegensinn-Oligonucleotiden resultiert.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem vollständig zum Thioat gemachte Gegensinn-Oligonucleotide von nicht korrekt synthetisierten Oligonucleotiden getrennt werden.

4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem vollständig zum Thioat gemachte Gegensinn-Oligonucleotide von nicht korrekt zum Thioat gemachten Gegensinn-Oligonucleotiden getrennt werden, die 1-5, wie 1 oder 2, Bindungen ohne Thioatbildung enthalten.

5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem das Metallion Zr^{2+} oder Fe^{3+} ist.

6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem die Gegensinn-Oligonucleotide eine Größe im Bereich von 5-30, und bevorzugt 15-25, Basenpaaren haben.

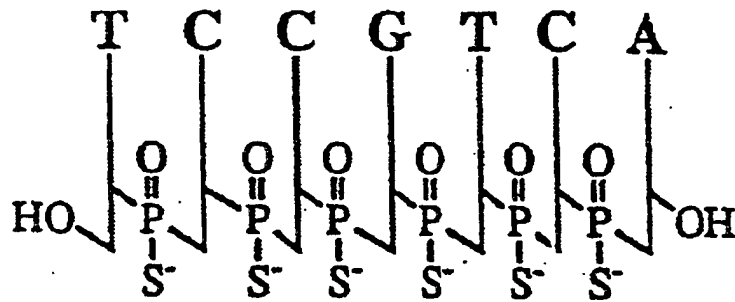
7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem der pH-Wert der biologischen Lösung während der Adsorption von Gegensinn-Oligonucleotiden unter ungefähr 7 liegt.

8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, das zusätzlich einen nachfolgenden Schritt des Glättens der isolierten Gegensinn-Oligonucleotide umfasst.

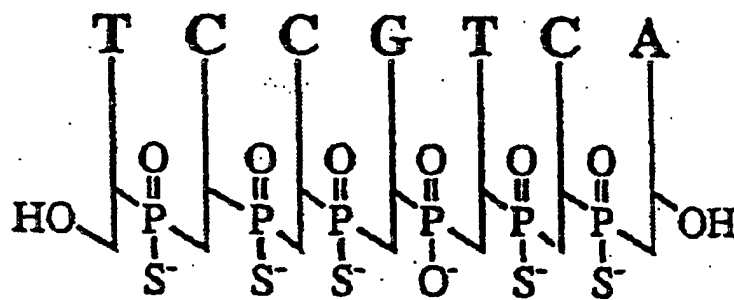
9. Verwendung eines Harzes zur Adsorptionschromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC) zum Isolieren von vollständig zum Thioat gemachten Einzelstrang-Gegensinn-Oligonucleotiden von nicht korrekt zum Thioat gemachten Gegensinn-Oligonucleotiden in einer biologischen Lösung.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

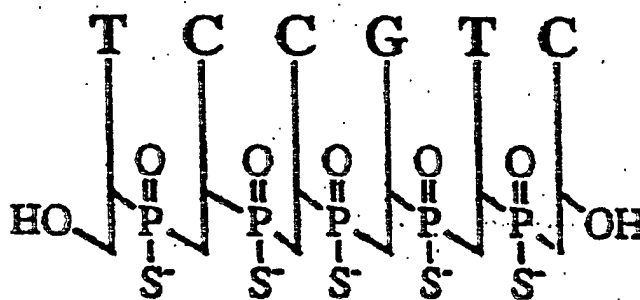
Anhängende Zeichnungen



Vollständig zum Thioat gemachtes Phosphorthioat

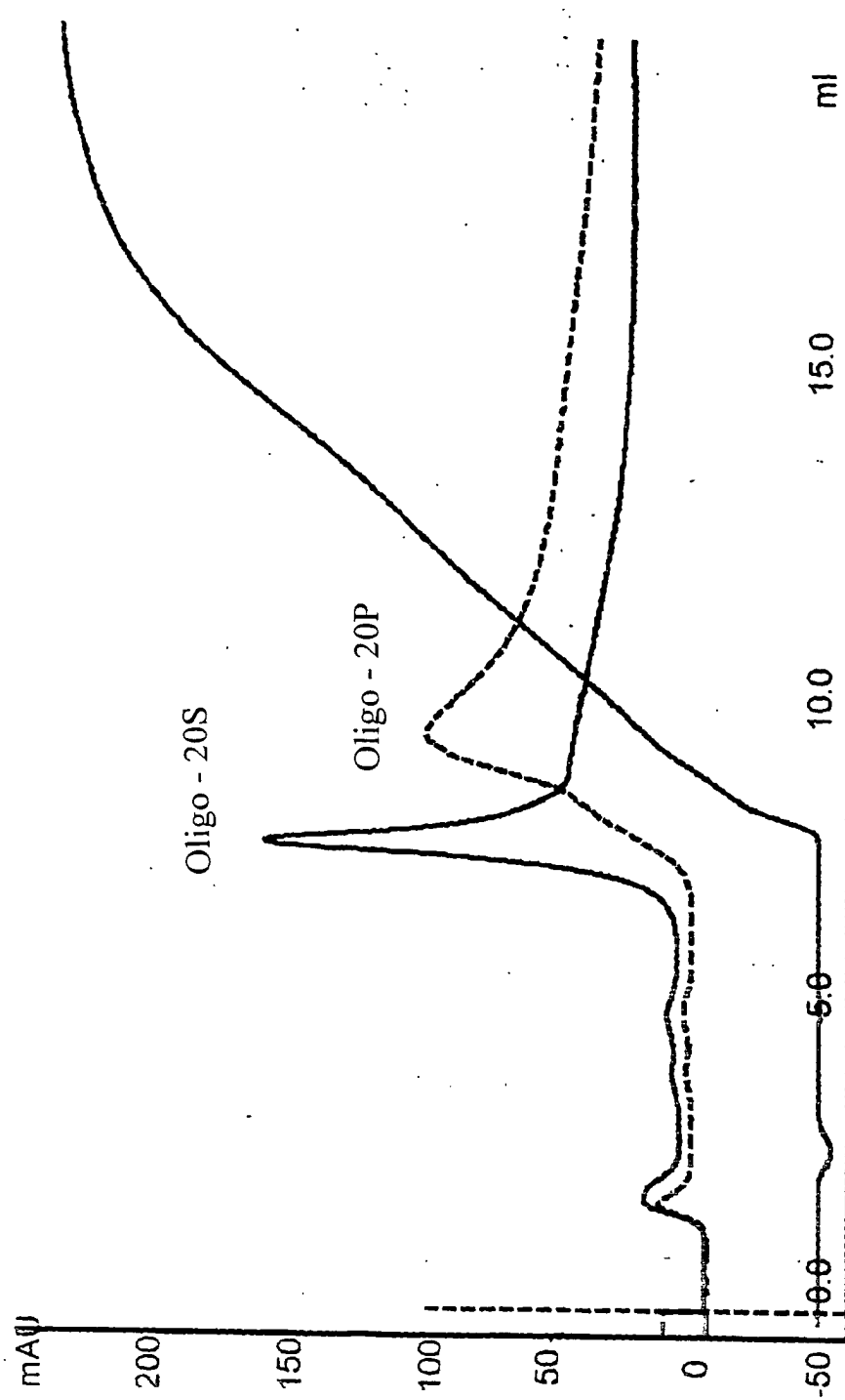


Monophosphodiester-Analogon

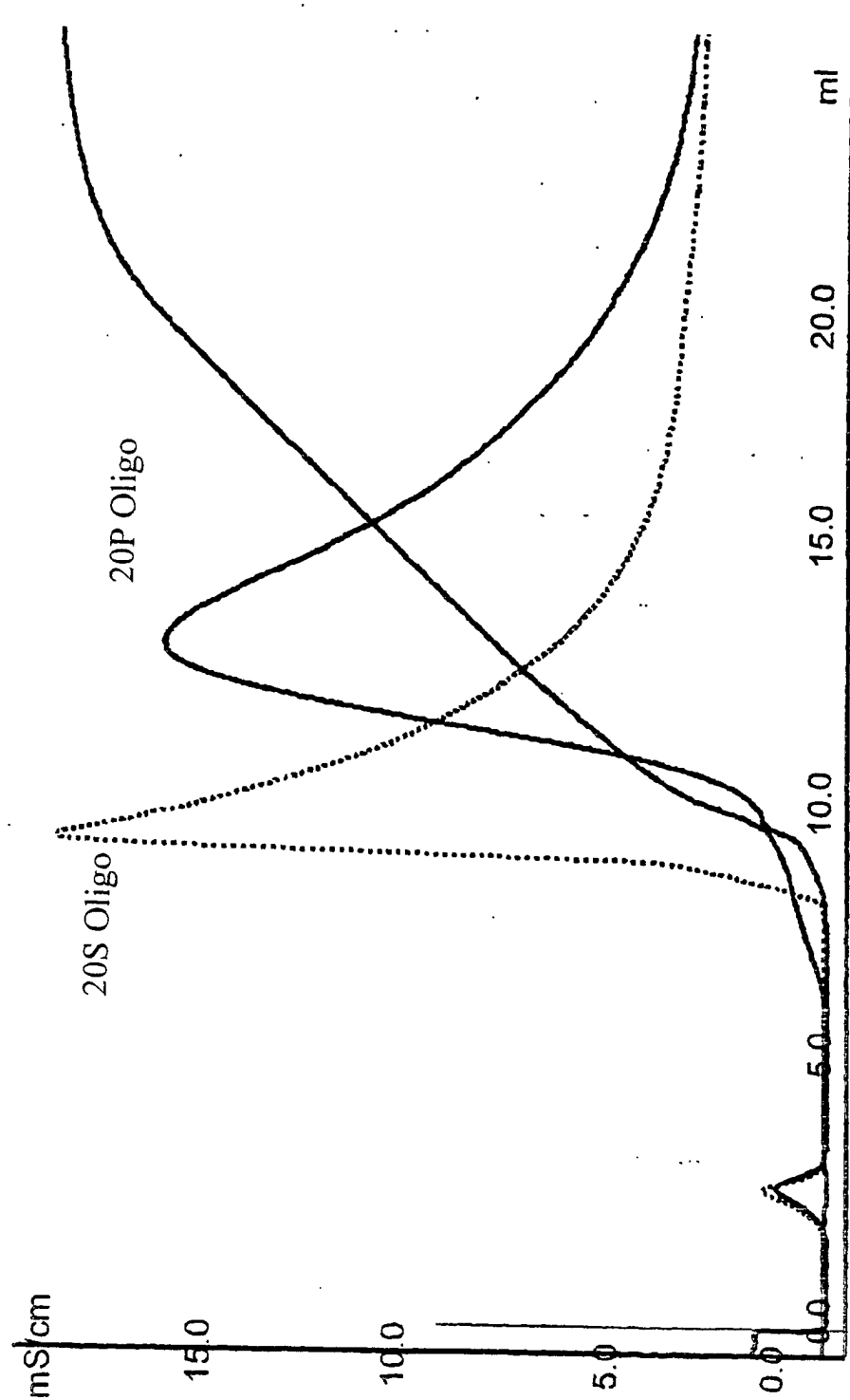


Einzelne Deletionssequenz

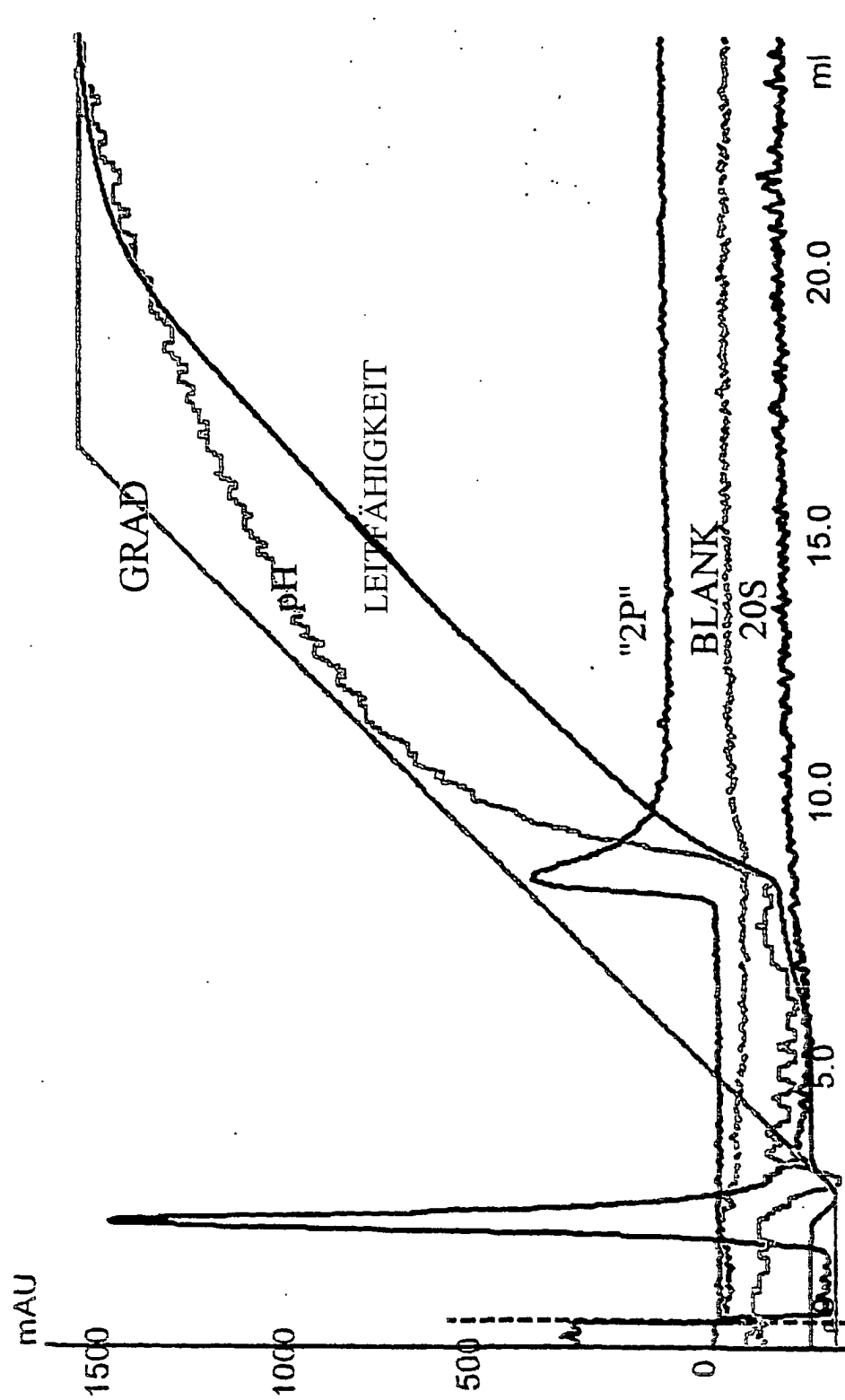
Figur 2



Figur 3



Figur 4



Figur 5

