



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 88676

(13) C2

(51) МПК (2009)  
C07H 21/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

## (54) СПОСІБ ОЧИЩЕННЯ ЗАХИЩЕНИХ ОЛІГОНУКЛЕОТИДІВ

1

(21) а200709660

(22) 30.01.2006

(24) 10.11.2009

(86) РСТ/ЕР2006/050503, 30.01.2006

(31) 05001768.0

(32) 28.01.2005

(33) EP

(31) 60/647,457

(32) 28.01.2005

(33) US

(46) 10.11.2009, Бюл.№ 21, 2009 р.

(72) ЛАНГЕ МАЙНОЛЬФ, DE, ГРЕССЕЛЬ ОЛАФ,  
DE, ЛІНК ФРІТЦ, DE, ШЕНБЕРГЕР АНДРЕАС, DE,  
ХОЛФЕЛЬД АНДРЕАС, DE

(73) ГІРІНДУС АГ, DE

(56) US 2003/055241 A1, 20.03.2003

US 5 571 902 A, 05.11.1996

EP 5 571 902 A, 11.11.1996

(57) 1. Спосіб очищення олігонуклеотидів, що  
включає стадії:а) отримання розчину захищеного олігонуклеотиду  
в щонайменше одному розчиннику А, що має точку  
кипіння нижче, ніж точка кипіння розчинника В,  
нагрівання розчину до температури щонайменше  
30°C, але нижче за точку кипіння щонайменше  
розчинника А,додання розчинника В до видимого осадження  
речовини в розчині, причому вказаний розчинник В  
являє собою спирт, що містить від 1 до 6 атомів С,  
або діол, що містить від 2 до 6 атомів С,  
охолодження розчину при перемішуванні до  
утворення супернатанту і осаду,  
видалення супернатанту абоб) отримання розчинника В, вказаний розчинник В  
являє собою спирт, що містить від 1 до 6 атомів С,  
або діол, що містить від 2 до 6 атомів С,  
нагрівання розчинника В до температури вище  
30°C, але нижче за точку кипіння розчинника В,  
додання розчину захищеного олігонуклеотиду в  
щонайменше одному розчиннику А до видимого  
осадження речовини в розчині,  
охолодження розчину при перемішуванні до  
утворення супернатанту і осаду,  
видалення супернатанту.2. Спосіб за п. 1, де захищений олігонуклеотид має  
довжину від 2 до 30 нуклеотидів.3. Спосіб за п. 1 або 2, де захищений олігонуклео-  
тид має

2

3' і 5' захищені групи,

5' захищену групу і 3' незахищену групу,

3' захищену групу і 5' незахищену групу.

4. Спосіб за п. 3, де 5' захищена група являє со-  
бою DMTr, MMTr, третбутилдиметилсиліл  
(TBDMS), левуленіл, бензоіл, флуорофенілметок-  
сипіперидиніл (FPMP) або 9-фенілтіоксантен-9-іл  
(S-пиксил).5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, де розчинник А  
вибирають з CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, тетрагідрофурану,  
ацетонітрилу, метанолу, етанолу, дихлоретану,  
тетрахлоретану, діоксану, ацетону.6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, де розчин захи-  
щеного олігонуклеотиду містить суміш розчинни-  
ків, вибраних з групи, що складається з CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,  
CHCl<sub>3</sub>, тетрагідрофурану, ацетонітрилу, метанолу,  
етанолу, дихлоретану, тетрахлоретану, діоксану,  
ацетону.7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, де розчин, що  
містить захищений олігонуклеотид і розчинник В,  
нагрівають до температури між 40 і 70°C.8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, де розчинник В  
додають по краплях.9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-8, де співвідношення  
між об'ємом розчину захищеного олігонуклеотиду і  
об'ємом розчинника В складає від 1:1 до 1:100,  
переважно від 1:1 до 1:10.10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-9, де осад являє  
собойо гель, масло або кристал.11. Спосіб за будь-яким з пп. 1-10, де до осаду  
додають ефір так, що ефір потім видаляють разом  
з домішками.12. Спосіб за будь-яким з пп. 1-11, де осад повто-  
рно розчиняють для утворення розчину, що міс-  
тить щонайменше один розчинник А, і стадії пункту  
1 повторюють щонайменше ще раз.

13. Спосіб за будь-яким з пп. 1-12, де

а) розчинник В додають до видимого осадження  
речовини в розчині навіть при подальшому нагрі-  
ванні, абоб) розчин захищеного олігонуклеотиду в розчини-  
ку А додають до видимого осадження речовини в  
розчині навіть при подальшому нагріванні.14. Спосіб за будь-яким з пп. 1-13, де розчинник В  
вибирають з групи, що складається з метанолу,  
етанолу, 1,2-дигідроксіетану, 1-пропанолу, 2-  
пропанолу, бутанолу і пентанолу.

(13) C2

(11) 88676

(19) UA

15. Спосіб за будь-яким з пп. 1-14, де розчинник А являє собою  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  і розчинник В являє собою 2-пропанол.

16. Спосіб очищення захищеного неіонного олігонуклеотиду, що включає в себе стадії

а) отримання розчину захищеного неіонного олігонуклеотиду в щонайменше одному розчиннику А, б) поєднання вказаного розчину з розчинником В для формування розчинника А+В, вказаний розчинник В являє собою спирт, що містить від 1 до 6 атомів С, або діол, що містить від 2 до 6 атомів С, де розчинність (вага/об'єм) при 25°C захищеного неіонного олігонуклеотиду краще в розчиннику А, ніж в розчиннику В,

і де кількості розчинника А і розчинника В вибирають так, щоб отримати насичений розчин неіонного захищеного олігонуклеотиду в розчиннику А+В, с) утворення супернатанту і осаду; д) видалення супернатанту.

17. Спосіб за п. 16, де розчинник А вибирають з  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ , тетрагідрофурану і діоксану.

18. Спосіб за п. 16 або 17, де розчинник В вибирають з ізопропанолу, 1-пропанолу або етанолу.

19. Спосіб за будь-яким з пп. 16-18, де розчин А+В охолоджують щонайменше до 10°C для поліпшення утворення супернатанту і осаду.

Даний винахід стосується способу очищення олігонуклеотидів.

Синтез олігонуклеотидів давно є об'єктом інтенсивних досліджень. Були розроблені методи автоматичного синтезу, і обладнання для автоматичного синтезу є в продажу. Більшість вказаних методів розроблена для отримання швидше невеликих кількостей олігонуклеотидів (в межах мг). Дані кількості достатні для більшості дослідницьких цілей.

Зокрема, з розробкою антисмислових лікарських препаратів крупномасштабний синтез набув великого значення.

Незважаючи на те, що були розроблені методи, пов'язані з крупномасштабними синтезами, головною складністю є очищення інтермедіатів і продуктів. Для невеликих синтезів відповідним методом, що дозволяє провести очищення в кількості мг в короткий час і з хорошим результатом, є ВЕРХ на зворотній фазі. Для крупномасштабних синтезів ВЕРХ на зворотній фазі стає складною процедурою, що вимагає великої кількості розчинників, обладнання, що дорого коштує і т.д.

У цей час існує насушна потреба у вдосконалених способах очищення продуктів синтезу олігонуклеотидів.

US 2003/0055241 розкриває спосіб отримання очищених олігонуклеотидів, що включає в себе обробку розчину олігонуклеотида агрегуючим агентом і засобом, що посилює осадження. Спосіб використовується для очищення незахищених або 5'-захищених олігонуклеотидів. Іонна форма необхідна для взаємодії молекули зі засобом, що посилює осадження.

EP 0512768A1 розкриває спосіб очищення ДНК. ДНК виділяють з природних джерел.

Обидва описаних вище способи застосовні тільки для незахищених або слабо захищених олігонуклеотидів. Під час синтезу олігонуклеотиди захищені, отже, методи US 2003/0055241 і EP 0512768 A1 непридатні.

Основною задачею даного винаходу є подолання недоліків відомого рівня техніки і надання ефективного способу очищення олігонуклеотидів і інтермедіатів, зокрема, для крупномасштабних синтезів.

В одному втіленні даний винахід надає спосіб очищення захищеного олігонуклеотиду, що включає стадію

- отримання розчину захищеного олігонуклеотиду хоча би в одному розчиннику А, що має точку кипіння нижче ніж точка кипіння розчинника В,

- нагрівання розчину до температури, щонайменше, 30°C, але нижче за точку кипіння, щонайменше, розчинника А,

- додання розчинника В до помутніння розчину, причому вказаний розчинник В являє собою спирт, що містить від 1 до 6 атомів С, або діол, що містить від 2 до 6 атомів С,

- охолодження розчину при перемішуванні до утворення супернатанту і осаду,

- видалення супернатанту.

В іншому втіленні даний винахід надає спосіб очищення захищеного олігонуклеотиду, що включає стадії

- отримання розчинника В, причому вказаний розчинник В являє собою спирт, що містить від 1 до 6 атомів С, або діол, що містить від 2 до 6 атомів С,

- нагрівання розчинника В до температури, щонайменше, 30°C, але нижче за точку кипіння розчинника В,

- додання розчину захищеного олігонуклеотиду в, щонайменше, одному розчиннику А до помутніння розчину,

- охолодження розчину при перемішуванні до утворення супернатанту і осаду,

- видалення супернатанту.

"Помутніння розчину" являє собою зауваження, що описує що розчин насичений, тобто не здатний розчинити захищений олігонуклеотид. Розчин мутніє при видимому осадженні речовини.

"Охолодження" означає зниження температури розчину. Звичайно охолодження проводять до досягнення кімнатної температури (близько 25°C). В деяких випадках переважне подальше охолодження, наприклад, щонайменше, до 20°C або, щонайменше, до 10°C або до 0°C.

"Захищений олігонуклеотид" являє собою олігонуклеотид, що містить одну або більше захищених груп в положенні 5', 3', 2' цукрової частини

і/або в гетероциклічних основах і/або в Р-сполуці (тобто в фосфаті або тіофосфатах).

Термін "захищені групи" включає в себе групи, які не видаляють перед використанням олігонуклеотидів, тобто модифікації, що використовуються для збільшення стабільності олігонуклеотиду.

Відповідний захист 2'-гідроксилгрупи включає в себе третбутилдиметилсиліл (TBDMS), триізопропілсилілоксиметил (ТОМ), флюорофенілметоксипіперидиніл (FPMР) і  $\text{CH}_2\text{-O-Et}$ , і модифікації, що не розщеплюються як 2'F або 2'MeO, але не обмежена ними.

Відповідний захист 3'-гідроксилгрупи включає в себе третбутилдиметилсиліл (TBDMS), левуленіл, бензоіл, але не обмежений ними.

Відповідні модифікації включають в себе LNA (2'-O-4'-C-метиленовий містчок).

Фахівцям в даній галузі відомі відповідні захищені нуклеїнові основи, наприклад, N-4-бензоїлцитозин, N-6-бензоїладенін, N-2-ізобутирилгуанін, N-4-ацетил- або ізобутирилцитозин, N-6-феноксіацетиладенін, N-2-третбутилфеноксіацетилгуанін. Відповідні неосновні залишки включають в себе також водень (H), що приводить до утворення 1', 2'-дидеооксирибози (dSpacer з Glen Research), яка може бути використана як містчок або для імітації основних ділянок в олігонуклеотиді (Takeshita et al. J. Biol. Chem., 1987, 262, 10171).

Відповідні 5' захищені групи включають в себе тритилові групи, але не обмежені ними, переважно диметокситритилову групу (DMTr) або монометокситритилову групу (MMTr). Дані захищені групи використовують в техніці синтезу олігонуклеотидів на твердій фазі, що звичайно застосовується в даній галузі. Інші відповідні 5' захищені групи включають в себе третбутилдиметилсиліл (TBDMS), левуленіл, бензоіл, флюорофенілметоксипіперидиніл (FPMР), 9-фенілтіоксантен-9-іл (S-піксил), але не обмежені ними.

У переважному втіленні захищений олігонуклеотид являє собою неіонну сполуку.

"Олігонуклеотид" являє собою олігомер з мономерних одиниць, що містять цукрові одиниці з'єднані з гетероциклічними основами, вказані мономерні одиниці з'єднані зв'язками. Типові зв'язки являють собою похідні фосфору, наприклад фосфати, тіофосфати або їх похідні. Даний термін також охоплює олігонуклеозиди, аналоги олігонуклеотидів, модифіковані олігонуклеотиди, нуклеотидні міметики і сполуки, за формою подібні до РНК і ДНК. Загалом, дані сполуки складаються з каркаса пов'язаних мономерних субодиниць, де кожна пов'язана мономерна субодиниця прямо або непрямо приєднана до гетероциклічної основної частини. Зв'язки, що з'єднують мономерні субодиниці, мономерні субодиниці і гетероциклічні основні частини, можуть мігрувати по структурі, приводячи до безлічі кінцевих сполук.

Згідно з переважними втіленнями винаходу захищений нуклеотид має довжину від 2 до 30 нуклеотидів, переважно від 2 до 9, переважно від 2 до 6.

Модифікації, відома в даній галузі техніки, являють собою модифікацію гетероциклічних основ,

цукру або зв'язків, що з'єднують мономерні субодиниці. Варіації міжнуклеотидних зв'язків описані, наприклад, в WO 2004/011474, починаючи з кінця стор.11 і включені в посилання.

Типові похідні являють собою тіофосфати, дитіофосфати, метил- і алкілфосфати і ацетофосфати. Інші типові модифікації знаходяться в цукровій частині. Рибоза замінюється іншим цукром або в одній або більше позиціях відбувається заміщення іншими групами, такими як F, O-алкіл, S-алкіл, N-алкіл. Переважні втілення являють собою 2'-метил і 2'-метоксіетокси. Всі вказані модифікації відомі в даній галузі техніки.

Відносно гетероциклічної основи потрібно зазначити, що існує деяка кількість синтетичних основ, які використовують в даній галузі техніки, наприклад, 5-метилцитозин, 5-гідроксиметилцитозин, ксантин, гіпоксантин, 2-аміноаденін, 6-або 2-алкілпохідні аденіну і гуаніну, 2-тіоурацил. Такі модифікації розкриті в WO 2004/011474, починаючи зі стор.21.

Захищений олігонуклеотид може мати 5' і 3' захищені групи або 5' захищену групу і 3' незахищену групу або 3' захищену групу і 5' незахищену групу. В залежності від структури нуклеотиду може бути 2' захищена група.

Переважно, щоб Р-зв'язок і гетероциклічні основи були відповідно захищені.

В одному втіленні захищений олігонуклеотид розчиняють в розчиннику або суміші розчинників, де один з розчинників позначають, як розчинник А. Прикладами розчинника А є  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ , тетрагідрофуран, ацетонітрил, метанол, етанол, дихлоретан, тетрахлоретан, діоксан, ацетон.

Незважаючи на те, що одного розчинника може бути досить для деяких захищених олігонуклеотидів в одному з втілень, переважніше використати суміш розчинників, наприклад, вибраних з  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ , тетрагідрофурану, ацетонітрилу, метанолу, етанолу, дихлоретану, тетрахлоретану, діоксану, ацетону.

Згідно з винаходом, розчин захищеного олігонуклеотиду нагрівають до температури, щонайменше, 30°C, але нижче за точку кипіння, щонайменше, одного розчинника А. Якщо суміш розчинників використовують для розчину захищеного олігонуклеотиду, переважно, щоб розчин не нагрівався вище за точку кипіння будь-якого інгредієнта суміші.

Після цього розчинник В, спирт або діол, додають до розчину.

Переважно, щоб розчинник А мав точку кипіння нижче ніж розчинник В, але можна отримати хороші результати з розчинниками А і В, що мають близькі точки кипіння, або навіть в ситуаціях, коли точка кипіння розчинника А вище ніж точка кипіння розчинника В.

Найбільш переважний розчинник А містить  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (переважно, щонайменше, 90% мас.) і найбільш переважний розчинник В містить ізопропанол (переважно, щонайменше, 90% мас). Поєднання  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  і ізопропанолу є особливо ефективним і, відповідно, переважним.

Інше втілення винаходу являє собою спосіб, що включає в себе

- отримання розчину захищеного неіонного олігонуклеотиду в, щонайменше, одному розчиннику А,

- сполуку вказаного розчину з розчинником В для формування розчинника А+В, в якому кількості розчинника А і розчинника В вибирають так, щоб отримати насичений розчин неіонного захищеного олігонуклеотиду в розчиннику А+В,

- і утворення супернатанту і осідання.

Даний розчинник В являє собою спирт, що містить від 1 до 6 атомів С, або діол, що містить від 2 до 6 атомів С.

Якщо точно не відома необхідна кількість розчинника В, то переважно додавати його по краплях. При доданні розчинника В розчин мутніє, але в більшості випадків, при подальшому помішуванні і/або нагріванні знову стає прозорим. Оскільки точка кипіння розчинника В вище ніж розчинника А, температуру розчину збільшують подальшим нагріванням. Переважна кількість розчинника В являє собою кількість, яку необхідно додати, щоб отримати помутніння розчину або трохи меншу кількість розчинника В.

В одному втіленні розчин нагрівають до температури від 5°C до 10°C нижче за точку кипіння. Після того як розчин помутнів, його витримують при температурі точки кипіння одну хвилину і потім охолоджують.

Нагрівання розчину є особливо переважним, якщо в ньому багато домішок, тобто чистота олігонуклеотиду нижче 85%. У цьому випадку нагрівання збільшує ефективність очищення. Якщо чистота вище (наприклад, щонайменше, 90%) або ефективність неповного очищення задовільна, спосіб даного винаходу може бути застосований при температурі від 25°C до 30°C, або навіть при температурі 15°C-25°C. Очищення менш ефективне при більш низьких температурах.

У деяких втіленнях доцільно повторити спосіб даного винаходу. У таких випадках перша стадія очищення була б ефективною при температурі, щонайменше, 30°C і подальші стадії очищення при більш низькій температурі, наприклад, 20°C або 25°C. Потім розчин охолоджують при помішуванні. Охолодження може бути ефективним при кімнатній температурі або навіть при більш низьких температурах, наприклад, в холодильнику.

Переважно перемішувати дані розчини під час охолодження. У переважному втіленні перемішування продовжується, щонайменше, протягом трьох годин, переважно шість годин, і найбільш переважно всю ніч.

Згідно з способом, описаним в даному винаході, утворюється супернатант і осад. Супернатант, що містить домішки, відділяють і видаляють. Осад може бути в різних формах. Він може бути в формі гелю, масла або мати кристалічну форму. У деяких втіленнях доцільно додати ефір до осаду і потім видалити ефір разом з іншими домішками. Захищені олігонуклеотиди нерозчинні в ефірі. У деяких випадках вказана обробка ефіром збільшує схильність до утворення кристалічної або порошкоподібної форми осаду.

У переважному втіленні процедура очищення повторюється, щонайменше, один раз. Додають

розчинник або суміш розчинників типу А і розчиняють повторно олігонуклеотид. Потім повторюють спосіб очищення даного винаходу.

Спосіб, представлений в даному винаході, є особливо придатним для крупномасштабних синтезів, тобто в кількостях починаючи від 100мг і до кг.

Обладнання необхідне для способу, представленого в даному винаході, дешеве в порівнянні з крупномасштабною ВЕРХ.

Спосіб даного винаходу особливо ефективний для видалення каталізаторів, таких як тетразол, DCI або BMT і сульфатуючих агентів, таких як PADS.

Далі винахід пояснюється в посиланнях на наступні приклади, що не обмежують його застосування:

1) 5'-O-DMTr-C<sup>Bz</sup>-P(S, OCNE)-C<sup>Bz</sup>-3'-O-Lev (10,8ммоль)

розчиняють в 25мл дихлорметану і нагрівають до 40°C. Додають 120мл 2-пропанолу (в співвідношенні 1:4,8) коли розчин нагрітий до 55-60°C. Після додання 2-пропанолу суміш охолоджують до кімнатної температури і перемішують протягом ночі. Очищений продукт виділяють у вигляді безбарвного осаду. Чистота збільшувалася від 77,2 до 88,0% після одного очищення. При використанні 5'-O-TBDMS-C<sup>Bz</sup>-P(S, OCNE)-C<sup>Bz</sup>-3'-O-Lev чистота збільшувалася від 78,1% до 94,8% після двох послідовних очищень.

2) 5'-O-DMTr-A<sup>Bz</sup>-P(S, OCNE)-G<sup>iBu</sup>-3'-O-Lev (15ммоль)

розчиняють в 50мл дихлорметану і нагрівають до 40°C. Додають 450мл 2-пропанолу (в співвідношенні 1:9) коли розчин нагрітий до 50-55°C. Після додання 2-пропанолу суміш охолоджують до кімнатної температури і перемішують протягом ночі. Очищений продукт виділяють у вигляді безбарвного осаду. Чистота збільшувалася від 50,8 до 79,5% після двох послідовних очищень.

3) 5'-O-DMTr-A<sup>Bz</sup>-P(S, OCNE)-G<sup>iBu</sup>-3'-OH (1,63ммоль)

розчиняють в 20мл дихлорметану і нагрівають до 40°C. Додають 400мл 2-пропанолу (в співвідношенні 1:20) коли розчин нагрітий до 50-55°C. Після додання 2-пропанолу суміш охолоджують до кімнатної температури і перемішують протягом ночі. Очищений продукт виділяють у вигляді безбарвного осаду. Чистота збільшувалася від 79,5 до 93,2% після двох послідовних очищень.

4) 5'-O-DMTr-C<sup>Bz</sup>-P(S, OCNE)-G<sup>iBu</sup>-3'-O-Lev (7,58ммоль)

розчиняють в 12 мл дихлорметану і нагрівають до 40°C. Додають 130мл 2-пропанолу (в співвідношенні 1:10,8) коли розчин нагрітий до 50-55°C. Після додання 2-пропанолу суміш охолоджують до кімнатної температури і перемішують протягом ночі. Очищений продукт виділяють у вигляді безбарвного осаду. Чистота збільшувалася від 62,5 до 88,7% після двох послідовних очищень.

5) 5'-O-DMTr-C<sup>Bz</sup>-P(S, OCNE)-G<sup>iBu</sup>-3'-OH (2,0ммоль)

розчиняють в 10мл дихлорметану і нагрівають до 40°C. Додають 70мл 2-пропанолу (в співвідношенні 1:4,8) коли розчин нагрітий до 50-55°C. Після

Додають 120мл 2-пропанолу (в співвідношенні 1:4,8) коли розчин нагрітий до 50-55°C. Після додавання 2-пропанолу суміш охолоджують до кімнатної температури і перемішують протягом ночі. Очищений продукт виділяють у вигляді безбарвно-

го осаду. Чистота збільшувалася від 66,2 до 91,8% після двох послідовних очищень.

18) 5'-O-DMTr-T-P(O, OCNE)-C<sup>Bz</sup>-3'-OH (15,1ммоль)

розчиняють в 50мл дихлорметану при 20°C. Додають 700мл 2-пропанолу (в співвідношенні 1:14) коли розчин нагрітий до 30°C. Після додання 2-пропанолу суміш перемішують і охолоджують до кімнатної температури протягом ночі. Очищений продукт виділяють у вигляді безбарвного осаду. Чистота збільшувалася від 79,2 до 91,3% після двох послідовних очищень.

19) 5'-O-DMTr-G<sup>iBu</sup>-P(O, OCNE)-T-P(O, OCNE)-T-P(O, OCNE)-G<sup>iBu</sup>-3'-O-Lev (0,76ммоль)

розчиняють в 10мл дихлорметану і 1мл метанолу при 20°C. Додають 30мл 2-пропанолу (в співвідношенні 1:3) при перемішуванні, при нагріванні розчину до 30°C. Після додання 2-пропанолу су-

міш перемішують і охолоджують до кімнатної температури протягом ночі. Очищений продукт виділяють у вигляді безбарвного осаду. Чистота збільшувалася від 79,2 до 91,3% після одного очищення.

20) 5'-O-DMTr-T-P(O, OCNE)-C<sup>Bz</sup>-P(O, OCNE)-G<sup>iBu</sup>-P(O, OCNE)-T-P(O, OCNE)-T-P(O, OCNE)-G<sup>iBu</sup>-3'-O-Lev (0,38ммоль)

розчиняють в 10мл дихлорметану і 1мл метанолу при 20°C. Додають 50мл 2-пропанолу (в співвідношенні 1:5) при перемішуванні, при нагріванні розчину до 30°C. Після додання 2-пропанолу суміш перемішують і охолоджують до кімнатної температури протягом ночі. Очищений продукт виділяють у вигляді безбарвного осаду. Чистота збільшувалася від 50,8 до 70,3% після одного очищення.