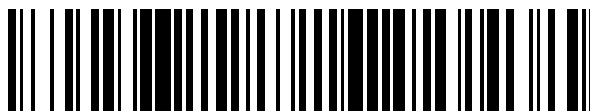


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 025**

51 Int. Cl.:

**C07H 21/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2016 PCT/EP2016/066044**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2017 WO17005818**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2016 E 16736845 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3319975**

54 Título: **Oligonucleótidos ricos en guanina**

30 Prioridad:

**08.07.2015 US 201562189832 P**  
**20.07.2015 EP 15177520**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.02.2020**

73 Titular/es:

**KUROS BIOSCIENCES AG (100.0%)**  
**Wagistrasse 25**  
**8952 Schlieren, CH**

72 Inventor/es:

**HENNECKE, FRANK;**  
**KINZLER, MATTHIAS;**  
**SAUDAN, PHILIPPE;**  
**ERICKSON, JENNIFER;**  
**LACAN, ISABELLE y**  
**LAN LE, CHI**

74 Agente/Representante:

**PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén**

ES 2 741 025 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Oligonucleótidos ricos en guanina

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a métodos para síntesis de oligonucleótidos, específicamente, la síntesis de oligonucleótidos que contienen un alto contenido de monómeros de guanina. Más concretamente, la invención se refiere a un método para acoplar un nucleósido fosforamídita durante la síntesis de un oligonucleótido a un soporte universal, a un primer nucleósido, o a un oligonucleótido de extensión.

Antecedentes de la invención

10 Los ADN y ARN sintetizados químicamente ("oligonucleótidos") y los análogos de los mismos se utilizan en la mayoría de las aplicaciones biológicas moleculares. Los métodos de síntesis de oligonucleótidos han estado disponibles durante más de treinta años (véase Agarwal *et al.*, *Nature*, 227:27-34 (1970)), y todavía el método más común de síntesis de oligonucleótidos es a través de la química de fosforamídita (véanse McBride *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 24:245-248 (1983); Beaucage *et al.*, *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* 3.3.1-3.3.20 (2000); US 5.750.666.

15 Típicamente, la síntesis de fosforamídita empieza con el nucleótido más 3' y continua a través de una serie de ciclos compuestos de cuatro etapas que se repiten hasta que se une el nucleótido más 5'. Sin embargo, se encuentra dentro de los conocimientos de una persona con experiencia ordinaria establecer la síntesis de fosforamídita en dirección 5'-3' eligiendo el primer nucleótido y el nucleósido fosforamídita en la conformación apropiada. Los métodos descritos en la presente memoria son aplicables en ambas direcciones de la síntesis, en donde se prefiere generalmente la síntesis en dirección 3'-5'.

20 Las cuatro etapas son desprotección, acoplamiento, adición de caperuza y estabilización (en términos generales, oxidación o sulfuración). En una variación, durante la etapa de desprotección, el grupo tritilo unido al carbono 5' del glúcido pentosa del nucleótido receptor se elimina por medio de ácido tricloroacético (TCA) o ácido dicloroacético (DCA) en un disolvente adecuado tal como diclorometano o tolueno, que deja un grupo hidroxilo reactivo. El siguiente monómero de fosforamídita se añade en la etapa de acoplamiento. Un activador tal como tetrazol, un ácido débil, se utiliza para reaccionar con el nucleósido fosforamídita de acoplamiento, que forma un intermediario de tetrazolil fosforamídita. Este intermediario reacciona entonces con el grupo hidroxilo del receptor y se forma el enlace 5' a 3'. El tetrazol se reconstituye y continúa el proceso. Un fallo en el acoplamiento da lugar a un oligonucleótido que tiene todavía un grupo hidroxilo en el extremo 5'. Para prevenir que estos oligonucleótidos permanezcan reactivos durante el siguiente ciclo (lo que produciría un oligonucleótido al que le falta un nucleótido), se eliminan de la síntesis posterior al añadirles una caperuza de manera irreversible por medio de un reactivo acetilante tal como una mezcla de anhídrido acético y N-metilimidazol. Este reactivo reacciona solo con los grupos hidroxilos libres para añadir una caperuza a los oligonucleótidos. En la etapa de oxidación, el enlace fosfito entre el oligonucleótido en crecimiento y el nucleótido añadido más recientemente se estabiliza, típicamente, en presencia de yodo como oxidante suave en tetrahidrofurano (THF) y agua. El agua actúa como donante de oxígeno y el yodo forma un aducto con el enlace de fósforo. El aducto se descompone por medio del agua, lo que deja un enlace fosfotriéster estable.

35 Ha habido muchas modificaciones significativas a la síntesis de fosforamídita para reducir el tiempo de la síntesis y crear un rendimiento mayor del producto. Los monómeros de fosforamídita modificados que se han desarrollado requieren también modificaciones adicionales a la síntesis.

40 Sin embargo, todavía permanecen algunos problemas en la síntesis de ciertos oligonucleótidos. Una cuestión ha sido la síntesis de oligonucleótidos ricos en guanina (G). Los oligonucleótidos con regiones ricas en G han sido muy prometedores para una variedad de aplicaciones. En términos generales, los oligonucleótidos ricos en G se pliegan en estructuras complejas que tienen aplicaciones útiles en biología molecular y medicina. Una variedad de aptámeros que se pliegan en estructuras cuádruples empaquetadas firmemente (por ejemplo, aptámero de trombina) ha sido seleccionada. Las repeticiones ricas en G en los ácidos nucleicos forman estas estructuras cuádruples en presencia de ciertos iones metálicos monovalentes o bivalentes con una variedad de papeles biológicos (véase Deng *et al.*, *PNAS* (2001), 98, 13665-13670; Jin *et al.*, *PNAS* (1992), 89, 8832-8836; y Lee, *Nucleic Acids Research* (1990), 18, 6057-6060.

50 La síntesis de gran calidad para oligonucleótidos ricos en guanina (G), en particular, con residuos de guanina consecutivos, es difícil de conseguir, probablemente, debido a la poca accesibilidad del grupo hidroxilo 5' por parte de la fosforamídita activada en la etapa de acoplamiento. En particular, el oligómero rico en G protegido unido al soporte experimenta algo de agregación o tiene problemas de solubilidad en acetonitrilo después de que alcanza una cierta longitud o una composición de bases, que es, probablemente, la causa de la poca accesibilidad del grupo hidroxilo 5'. Esto lleva a impurezas y fallos en la síntesis tales como oligonucleótidos que no tienen uno o más nucleótidos tales como uno o más residuos finales de guanina (G) o a oligonucleótidos que tienen uno o más nucleótidos tales como uno o más residuos de guanina (G) de más. Estas impurezas y fallos en la síntesis, sin embargo, llevan además a una disminución en el producto completo (FLP) deseado debido a la compleja purificación y separación de esas impurezas y fallos en la síntesis del FLP.

El disolvente estándar para la síntesis de oligonucleótidos es el acetonitrilo. Sin embargo, la publicación internacional WO 2008/073960 propone métodos para la síntesis de oligonucleótidos, en particular, para la síntesis de oligonucleótidos ricos en G que utilizan la química de la fosforamidita, y sugiere el uso de disolventes alternativos tales como disolventes apróticos polares. En particular, se ha sugerido que el uso de sulfolano durante la etapa de acoplamiento alivia los problemas de agregación o solubilidad con oligómeros ricos en monómeros de guanina. Típicamente, el sulfolano se ha utilizado en una mezcla de disolventes 1:1 con acetonitrilo para proporcionar una mejor solubilidad para oligómeros, en particular, para oligómeros con un alto contenido en residuos de guanina.

A pesar de que la publicación internacional WO 2008/073960 fue capaz de reducir la cantidad de impurezas y fallos en la síntesis y de mejorar la calidad en bruto de los oligonucleótidos ricos en G sintetizados, todavía existe una necesidad de mejorar además la síntesis de esta importante clase de oligonucleótidos, en particular, en términos de reducción de impurezas y fallos en la síntesis, al igual que en términos de pureza y rendimiento de los productos deseados de oligonucleótidos.

#### Compendio de la invención

Sorprendentemente, se ha descubierto que el uso de N,N-dimetilformamida (DMF), preferiblemente, en una mezcla de disolventes con acetonitrilo o, incluso más preferiblemente, como disolvente único, para la síntesis de oligonucleótidos ricos en G utilizando la química de fosforamidita no solo reduce las impurezas y los fallos en la síntesis, sino que, además, lleva a una mayor pureza y rendimiento del oligonucleótido sintetizado. En particular, el oligonucleótido en crudo de mejor calidad obtenido con los métodos de la presente invención facilita la purificación del crudo y, por lo tanto, lleva a una mayor pureza y rendimiento del oligonucleótido sintetizado. Por lo tanto, los métodos de la presente invención no solo permiten una producción a mayor escala, sino que los métodos de la invención son especialmente importantes cuando se pretende que los oligonucleótidos tengan un uso farmacéutico, incluido el uso terapéutico.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para acoplar un nucleósido fosforamidita durante la síntesis de un oligonucleótido a un soporte universal, a un primer nucleósido, o a un oligonucleótido de extensión, en donde dicho oligonucleótido comprende una región de 3 o más monómeros de guanina consecutivos, y en donde dicho método comprende las etapas de (I) generar una disolución de acoplamiento, en donde dicha disolución de acoplamiento comprende lo siguiente: (a) dicho nucleósido fosforamidita; (b) un reactivo de activación; y (c) uno o más disolventes, en donde uno de dicho uno o más disolventes es N,N-dimetilformamida (DMF), y en donde, preferiblemente, el volumen de dicha DMF es igual o superior a un 25 %, más preferiblemente, igual o superior a un 33 % y, de nuevo más preferiblemente, igual o superior a un 50 % del volumen total de dicho uno o más disolventes; y (II) poner en contacto dicha disolución de acoplamiento con dicho soporte universal, con dicho primer nucleósido, o con dicho oligonucleótido de extensión.

En particular, se ha encontrado que el uso de N,N-dimetilformamida (DMF), preferiblemente, en una mezcla de disolventes con acetonitrilo o, incluso más preferiblemente, como el único disolvente, para acoplar un nucleósido fosforamidita durante la síntesis de un oligonucleótido a un soporte universal, a un primer nucleósido, o a un oligonucleótido de extensión es sumamente beneficioso. Sin limitarse a esta teoría, se cree que se espera que DMF evite la formación de estructuras cuádruples formadas típicamente por oligonucleótidos ricos en G y, por lo tanto, facilite el acoplamiento de la siguiente amidita durante la elongación de la cadena. Además de aliviar la agregación, se cree que los métodos de la invención proporcionan una mejor solubilidad para los oligonucleótidos ricos en monómeros de guanina.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un oligonucleótido, dicho método comprende cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria para acoplar un nucleósido fosforamidita durante la síntesis de un oligonucleótido a un soporte universal, a un primer oligonucleótido o a un oligonucleótido de extensión según dicho primer aspecto de la presente invención.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un oligonucleótido, dicho método comprende (I) acoplar un nucleósido fosforamidita a un soporte universal o a un primer nucleósido; en donde dicho acoplamiento comprende cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria para acoplar un nucleósido fosforamidita durante la síntesis de un oligonucleótido a un primer nucleósido según dicho primer aspecto de la presente invención; (II) generar un oligonucleótido de extensión por medio de oxidación del producto de la etapa (I); (III) acoplar un nucleósido fosforamidita al producto de la etapa (II) después de desprotección; en donde dicho acoplamiento comprende el método de dicho primer aspecto de la presente invención; (IV) generar un oligonucleótido de extensión por medio de oxidación del producto de la etapa (III); y (V) repetir las etapas (III) y (IV) hasta que dicho oligonucleótido de extensión comprenda la secuencia de dicho oligonucleótido.

Los aspectos adicionales de la presente invención y las realizaciones preferidas de la misma resultarán evidentes según avance esta especificación.

## Descripción detallada de la invención

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen los mismos significados tal como se entienden comúnmente por una persona con experiencia ordinaria en la técnica a la que esta invención pertenece.

5 "Oligonucleótido". Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "oligonucleótido" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que comprende 2 o más nucleótidos, preferiblemente, entre 6 a 200 nucleótidos, más preferiblemente, entre 10 a 100 nucleótidos, y de nuevo más preferiblemente, entre 20 a aproximadamente 100 nucleótidos, de nuevo más preferiblemente, entre 20 a 50 nucleótidos y, otra vez más preferiblemente, entre 20 a 40 nucleótidos. Muy preferiblemente, los oligonucleótidos comprenden aproximadamente 30 nucleótidos, más preferiblemente, los oligonucleótidos comprenden exactamente 30 nucleótidos y, de manera más preferida, los oligonucleótidos consisten en exactamente 30 nucleótidos. Los oligonucleótidos más preferidos consisten en 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos. Los oligonucleótidos son polirribonucleótidos o polidesoxirribonucleótidos y se seleccionan, preferiblemente, de entre (a) ARN o ADN no modificado, y (b) ARN o ADN modificado. La modificación puede comprender la cadena principal o análogos de nucleótidos que son conocidos por un experto en la técnica. Las modificaciones/análogos de nucleótidos preferidos son fosforotioatos o alquilfosforotioatos. Además, los oligonucleótidos no modificados consisten exclusivamente en nucleótidos unidos por un enlace fosfodiéster, los nucleótidos fosforotioados se protegen contra la degradación en una célula o en un organismo y, por lo tanto, son modificaciones de nucleótidos preferidas. Además, abarca los oligonucleótidos que comprenden nucleótidos unidos por un enlace fosfodiéster y nucleótidos fosforotioados. El término oligonucleótido, tal como se utiliza en la presente memoria, típicamente y preferiblemente, se refiere a un desoxirribonucleótido monocatenario. Típicamente, un oligonucleótido comprende una región de 3 o más monómeros de guanina consecutivos. Preferiblemente, un oligonucleótido comprende una primera región de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 monómeros de guanina consecutivos, en donde, por la presente memoria, dicha primera región preferida se ubica en el extremo 3' de dicho oligonucleótido. En una realización más preferida, dicho oligonucleótido comprende una segunda región de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 monómeros de guanina consecutivos, en donde, preferiblemente, dicha segunda región preferida se ubica en el extremo 5' de dicho oligonucleótido. Preferiblemente, un oligonucleótido comprende al menos un 30 % de monómeros de guanina. Un oligonucleótido más preferido comprende al menos un tramo de poli G como se define a continuación. Los oligonucleótidos más preferidos comprenden 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de dichos tramos de poli G. Los oligonucleótidos muy preferidos comprenden exactamente dos tramos de poli G, en donde, preferiblemente, uno de dichos dos tramos de poli G se ubica en el extremo 5' o en el extremo 3' de dicho oligonucleótido. Los oligonucleótidos incluso más preferidos comprenden exactamente dos tramos de poli G, en donde, uno de dichos dos tramos de poli G se ubica en el extremo 5' de dicho oligonucleótido y uno de dichos dos tramos de poli G se ubica en el extremo 3' de dicho oligonucleótido. Los oligonucleótidos muy preferidos son CpG no metilados que contienen oligonucleótidos que comprenden al menos uno, preferiblemente, uno, dos, tres o cuatro motivos CpG. Los oligonucleótidos todavía más preferidos comprenden una secuencia palindrómica, en donde dicha secuencia palindrómica comprende al menos uno, preferiblemente, dos, tres o cuatro motivos CpG. Los oligonucleótidos todavía más preferidos comprenden una secuencia palindrómica, en donde, preferiblemente, dicha secuencia palindrómica comprende o preferiblemente consiste en la secuencia GACGATCGTC (SEQ ID NO:2). Los oligonucleótidos todavía más preferidos comprenden una secuencia palindrómica, en donde dicha secuencia palindrómica está flanqueada en su extremo 5' por un tramo de poli G y en donde dicha secuencia palindrómica está flanqueada en su extremo 3' por un tramo de poli G, en donde, preferiblemente, dicha secuencia palindrómica es GACGATCGTC (SEQ ID NO:2). Los oligonucleótidos muy preferidos comprenden una secuencia palindrómica, en donde dicha secuencia palindrómica está flanqueada en su extremo 5' por al menos entre 3 a 10, preferiblemente, por entre 4 a 10 entidades de guanosina y en donde dicha secuencia palindrómica está flanqueada en su extremo 3' por al menos entre 3 a 10, preferiblemente, por entre 4 a 10 entidades de guanosina, en donde, preferiblemente, dicha secuencia palindrómica es GACGATCGTC (SEQ ID NO:2).

50 "Tramo de poli G": La expresión tramo de poli G, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un segmento de un oligonucleótido, en donde dicho segmento consiste en al menos 3 residuos de guanosina consecutivos. Los tramos de poli G preferidos consisten en entre 3 a 25, preferiblemente, entre 4 a 20, más preferiblemente, entre 4 a 15 y, de manera más preferida, entre 4 a 10 entidades de guanosina consecutivas. Los tramos de poli G más preferidos consisten en 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 entidades de guanosina consecutivas.

55 "Motivo CpG": Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "motivo CpG" se refiere a un oligodesoxinucleótido que contiene al menos un dinucleótido citosina guanina no metilado y en donde, preferiblemente, dicho dinucleótido CG es un enlace fosfodiéster.

60 "Oligonucleótido que contiene CpG no metilado": Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "oligonucleótido que contiene CpG no metilado" o "CpG" se refiere a un oligonucleótido, preferiblemente, a un oligodesoxinucleótido, que contiene al menos un motivo CpG. Preferiblemente, CpG se refiere a un oligodesoxinucleótido monocatenario que contiene una citosina no metilada seguida 3' por una guanosina, en donde

dicha citosina no metilada y dicha guanosina están unidas por un enlace de fosfato, en donde, preferiblemente, dicho enlace de fosfato es un enlace fosfodiéster o un enlace fosfotioato, y en donde, más preferiblemente, dicho enlace de fosfato es un enlace fosfodiéster.

5 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para acoplar un nucleósido fosforamidita durante la síntesis de un oligonucleótido a un soporte universal, a un primer nucleósido, o a un oligonucleótido de extensión, en donde dicho oligonucleótido comprende una región de 3 o más monómeros de guanina consecutivos, y en donde dicho método comprende las etapas de (I) generar una disolución de acoplamiento, en donde dicha disolución de acoplamiento comprende lo siguiente: (a) dicho nucleósido fosforamidita; (b) un reactivo de activación; y (c) uno o más disolventes, en donde uno de dicho uno o más disolventes es N,N-dimetilformamida (DMF); y (II) poner en contacto dicha disolución de acoplamiento con dicho soporte universal, con dicho primer nucleósido, o con dicho oligonucleótido de extensión.

10 En una realización preferida, el volumen de dicha DMF es igual o superior a un 25 %, preferiblemente, igual o superior a un 33 % del volumen total de dicho uno o más disolventes. En otra realización preferida, el volumen de dicha DMF es igual o superior a un 50 % del volumen total de dicho uno o más disolventes.

15 En otra realización preferida, dicho uno o más disolventes comprende además acetonitrilo, en donde el volumen de dicho acetonitrilo es inferior o, como mucho, igual a un 75 %, preferiblemente, inferior o, como mucho, igual a un 67 % y, más preferiblemente, inferior o, como mucho, igual a un 50% del volumen total de dicho uno o más disolventes.

20 En otra realización preferida, dicho uno o más disolventes comprende, preferiblemente consiste en, DMF y acetonitrilo, y en donde la relación (v/v) de dicha DMF a acetonitrilo se encuentra entre 1:3 y 3:1. En otra realización preferida, dicho uno o más disolventes consiste en DMF y acetonitrilo, y en donde la relación (v/v) de dicha DMF a acetonitrilo es 1:1.

25 En otra realización preferida, el volumen de dicha DMF es igual o superior a un 67 %, preferiblemente, igual o superior a un 75%, más preferiblemente, igual o superior a un 90% del volumen total de dicho uno o más disolventes.

30 En una realización muy preferida, dicho uno o más disolventes consiste exactamente en un disolvente, en donde dicho exactamente un disolvente es DMF. Por lo tanto, en una realización muy preferida, dicha disolución de acoplamiento comprende exactamente un disolvente, y en donde dicho exactamente un disolvente es DMF. Preferiblemente, dicha DMF tiene una pureza de al menos un 98 %, preferiblemente, de al menos un 99 %, de nuevo más preferiblemente, de al menos un 99,5 % y, de nuevo más preferiblemente, de al menos un 99,8 %.

35 Los activadores adecuados son conocidos por un experto en la técnica y se describen, a modo de ejemplo, en los documentos US 6.031.092 y US 6.476.216, cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria como referencia. En una realización preferida, dicho reactivo de activación se selecciona de entre (a) 4,5-dicianoimidazol (DCI); (b) 5-etiltio-1H-tetrazol (ETT); (c) 5-benciltio-1H-tetrazol (BTT); o (d) 5-(3,5-bis-trifluorometil)fenil-1H-tetrazol (Activador 42). En otra realización preferida, dicho reactivo de activación se selecciona de entre (a) 5-etiltio-1H-tetrazol (ETT); (b) 5-benciltio-1H-tetrazol (BTT); o (c) 5-(3,5-bis-trifluorometil)fenil-1H-tetrazol (Activador 42), y en donde, preferiblemente, dicho reactivo de activación es 5-etiltio-1H-tetrazol (ETT). En otra realización preferida, dicho reactivo de activación es 4,5-dicianoimidazol (DCI) o 5-etiltio-1H-tetrazol (ETT). En una realización muy preferida, dicho reactivo de activación es 5-etiltio-1H-tetrazol (ETT). En, de nuevo, una realización muy preferida, dicha disolución de acoplamiento comprende, preferiblemente consiste en, (a) dicho nucleósido fosforamidita; (b) dicho reactivo de activación, en donde dicho reactivo de activación es 5-etiltio-1H-tetrazol (ETT); y (c) exactamente un disolvente, y en donde dicho exactamente un disolvente es DMF. En otra realización preferida, la concentración de dicho reactivo de activación en dicha disolución de acoplamiento se encuentra entre 0,05 a 0,90 M, y en donde, preferiblemente, la concentración de dicho reactivo de activación en dicha disolución de acoplamiento se encuentra entre 0,40 a 0,80 M.

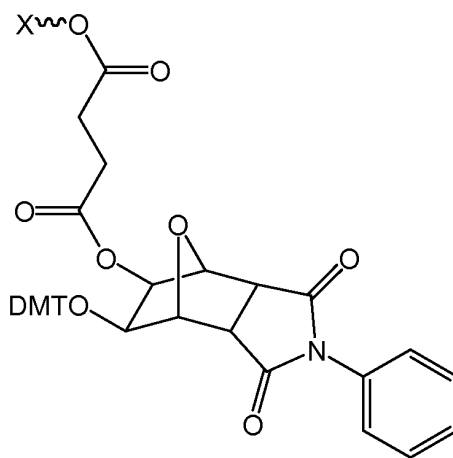
45 En una realización más preferida, la concentración de dicho nucleósido fosforamidita en dicha disolución de acoplamiento es al menos 0,03 M, y en donde, preferiblemente, la concentración de dicho nucleósido fosforamidita en dicha disolución de acoplamiento se encuentra entre 0,03 a 0,60 M, y en donde, más preferiblemente, la concentración de dicho nucleósido fosforamidita en dicha disolución de acoplamiento se encuentra entre 0,03 a 0,30 M.

50 En una realización más preferida, dicho primer nucleósido y/o dicho oligonucleótido de extensión se inmovilizan en un soporte, en donde, preferiblemente, dicho soporte se selecciona de entre (a) soporte polimérico, preferiblemente, soporte de poliestireno; y (b) soporte de sílice, preferiblemente, un vidrio de poro controlado (CPG). En una realización más preferida, dicho primer nucleósido y/o dicho oligonucleótido de extensión se inmovilizan en un soporte, en donde, preferiblemente, dicho soporte se selecciona de entre (a) soporte poliestireno; y (b) soporte de sílice, preferiblemente, un vidrio de poro controlado (CPG). Algunos soportes de perlas poliméricas se describen en las siguientes patentes: US 6.016.895; US 6.043.353; US 6.300.486; US 8.541.599 y US 8.153.725 B2.

En una realización muy preferida, dicho soporte es un soporte de poliestireno. En una realización muy preferida, dicho soporte es un soporte de poliestireno, en donde dicho soporte de poliestireno se reticula por medio de divinilbenceno, en donde, preferiblemente, dicho soporte de poliestireno se caracteriza por grupos hidroxilo funcionales; y en donde, más preferiblemente, dicho soporte de poliestireno comprende un tamaño de partícula medio de aproximadamente 80-90  $\mu\text{m}$ . Dichos soportes son conocidos por un experto en la técnica. Uno de estos soportes preferidos para la presente invención son los soportes líquidos NittoPhase<sup>®</sup>HL de Nitto Denko Corporation. Estos se han utilizado para los ejemplos proporcionados en la presente invención.

En términos generales, los soportes de este tipo se utilizan en la técnica y, típicamente y preferiblemente, comprenden además un enlazador, típicamente y preferiblemente, un enlazador de succinato o un enlazador que comprende un resto de succinato. Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, dicho soporte comprende además un enlazador, en donde, preferiblemente, dicho enlazador comprende un resto de succinato.

En una realización muy preferida, el soporte comprende además un enlazador, en donde el enlazador se representa por la siguiente fórmula I



I

en donde X representa dicho soporte, en donde, preferiblemente, X representa dicho soporte de poliestireno reticulado por medio de divinilbenceno.

En una realización muy preferida, dicho soporte comprende además un enlazador, en donde dicho soporte es un soporte de poliestireno, en donde dicho soporte de poliestireno se reticula por medio de divinilbenceno, y en donde dicho enlazador se representa por la fórmula I, en donde X representa dicho soporte de poliestireno reticulado por medio de divinilbenceno. Dicho soporte muy preferido con dicho enlazador permite una capacidad de carga preferida de 200-400  $\mu\text{mol/g}$ . Adicionalmente, muy preferidos son dicho soporte y dicho enlazador como se utilizan en la sección de ejemplos (NPHL250), en donde dicho soporte con enlazador permite una capacidad de carga de 250  $\mu\text{mol/g}$ . Estas combinaciones muy preferidas de soporte-enlazador están disponibles comercialmente de Kinovate Life Sciences, Inc., Oceanside, California, EE. UU. 92058 y con el nombre de UnyLinker<sup>™</sup> cargadas con los soportes líquidos NittoPhase<sup>®</sup>HL y NittoPhase<sup>®</sup>.

Varios enlazadores para la síntesis en fase sólida de oligómeros se han descrito y son conocidos por un experto en la técnica. Los enlazadores preferidos y las combinaciones de soporte-enlazador para la presente invención se describen en la publicación internacional WO 2005/049621. Además, la síntesis de estos enlazadores y combinaciones de soporte/enlazador se describen también en la publicación internacional WO 2005/049621.

Los cebadores de la síntesis conocidos por un experto en la técnica pueden comprender típicamente, además de las combinaciones de soporte-enlazador, un nucleósido adecuado que depende de la secuencia del oligonucleótido que se va a sintetizar realmente. Estos cebadores de síntesis se preparan típicamente por medio de enlace covalente de dicho nucleósido adecuado a dicho soporte a través de dicho enlazador. Incluso, muchos de dichos cebadores de síntesis se pueden adquirir comercialmente.

En una realización preferida, dicho oligonucleótido comprende al menos un tramo de poli G. En otra realización preferida, dicho oligonucleótido comprende al menos un 30 % de monómeros de guanina. En una realización más preferida, dicho oligonucleótido comprende al menos un 40 % de monómeros de guanina. En otra realización preferida, dicho oligonucleótido comprende al menos un 50 % de monómeros de guanina.

En una realización más preferida, el oligonucleótido contiene una primera región de 3 o más monómeros de guanina consecutivos. En una realización más preferida, el oligonucleótido contiene una primera región de 4 o más monómeros de guanina consecutivos. En una realización más preferida, el oligonucleótido contiene una primera

región de 5 o más monómeros de guanina consecutivos. En otra realización preferida, dicho oligonucleótido comprende una primera región de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 monómeros de guanina consecutivos. Preferiblemente, dicha primera región se ubica en el extremo 3' de dicho oligonucleótido.

5 En una realización más preferida, el oligonucleótido contiene una segunda región de 3 o más monómeros de guanina consecutivos. En una realización más preferida, el oligonucleótido contiene una segunda región de 4 o más monómeros de guanina consecutivos. En una realización más preferida, el oligonucleótido contiene una segunda región de 5 o más monómeros de guanina consecutivos. En otra realización preferida, dicho oligonucleótido comprende una segunda región de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 monómeros de guanina consecutivos. Preferiblemente, dicha segunda región se ubica en el extremo 5' de dicho oligonucleótido.

10 En otra realización preferida, dicho oligonucleótido comprende una primera región de 3 o más monómeros de guanina consecutivos y una segunda región de 3 o más monómeros de guanina consecutivos, y en donde dicha primera región se ubica en el extremo 3' de dicho oligonucleótido y en donde dicha segunda región se ubica en el extremo 5' de dicho oligonucleótido.

15 En otra realización preferida, dicho oligonucleótido comprende una primera región de 4 o más monómeros de guanina consecutivos y una segunda región de 4 o más monómeros de guanina consecutivos, y en donde dicha primera región se ubica en el extremo 3' de dicho oligonucleótido y en donde dicha segunda región se ubica en el extremo 5' de dicho oligonucleótido.

En una realización más preferida, dicho oligonucleótido comprende entre 10 a 50, preferiblemente, entre 20 a 40 y, más preferiblemente, 30 monómeros de nucleótidos.

20 En una realización más preferida, dicho oligonucleótido comprende una secuencia palindrómica, en donde, preferiblemente, dicha secuencia palindrómica es GACGATCGTC (SEQ ID NO:2). En otra realización preferida, dicha secuencia palindrómica está flanqueada en su extremo 5' por entre al menos 4 y como mucho 20, preferiblemente, al menos 10 entidades de guanosina. En otra realización preferida, dicha secuencia palindrómica está flanqueada en su extremo 3' por entre al menos 4 y como mucho 20, preferiblemente, al menos 10 entidades de  
25 guanosina.

En una realización más preferida, dicho oligonucleótido comprende o preferiblemente consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre el grupo que consiste en lo siguiente: (a) GGGGACGATC GTCGGGGGG (SEQ ID NO:3); (b) GGGGGACGAT CGTCGGGGGG (SEQ ID NO:4); (c) GGGGGGACGATCGTCGGGGGG (SEQ ID NO:5); (d) GGGGGGGACG ATCGTCGGGG GG (SEQ ID NO:6); (e) GGGGGGGGAC GATCGTCGGG GGGG (SEQ ID NO:7); (f) GGGGGGGGGA CGATCGTCGG GGGGGG (SEQ ID NO:8); (g) GGGGGGGGGG ACGATCGTCG GGGGGGGG (SEQ ID NO:9); (h) GGGGGGGGGG GACGATCGTC GGGGGGGGGG (SEQ ID NO:1); y (i) GGGGGGGCG ACGACGAT CGTCGTCGGGGGGG (SEQ ID NO: 10). En una realización muy preferida, dicho oligonucleótido comprende o preferiblemente consiste en el SEQ ID NO:1. En una realización más preferida, el oligonucleótido es el SEQ ID NO:10.

35 En una realización más preferida, dicho oligonucleótido es un desoxinucleótido, y en donde, preferiblemente, dicho desoxinucleótido consiste exclusivamente en monómeros unidos por un enlace fosfodiéster. Más preferiblemente, dicho oligonucleótido comprende o preferiblemente consiste en el SEQ ID NO:1 y dicho oligonucleótido es un desoxinucleótido, y en donde dicho desoxinucleótido consiste exclusivamente en monómeros unidos por un enlace fosfodiéster.

40 En otro aspecto, la invención se refiere un método para producir un oligonucleótido, dicho método comprende cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria para acoplar un nucleósido fosforamidita durante la síntesis de un oligonucleótido a un soporte universal, a un primer oligonucleótido o a un oligonucleótido de extensión.

45 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir un oligonucleótido, dicho método comprende (I) acoplar un nucleósido fosforamidita a un primer nucleósido; en donde dicho acoplamiento comprende cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria para acoplar un nucleósido fosforamidita durante la síntesis de un oligonucleótido a un primer nucleósido; (II) generar un oligonucleótido de extensión por medio de oxidación del producto de la etapa (I); (III) acoplar dicho nucleósido fosforamidita al producto de la etapa (II), típicamente y preferiblemente, después de la desprotección; en donde dicho acoplamiento comprende cualquiera de los métodos  
50 descritos en la presente memoria para acoplar un nucleósido fosforamidita durante la síntesis de un oligonucleótido a un oligonucleótido de extensión; (IV) generar un oligonucleótido de extensión por medio de oxidación del producto de la etapa (III); y (V) repetir las etapas (III) y (IV) hasta que dicho oligonucleótido de extensión comprenda la secuencia de dicho oligonucleótido.

55 En una realización preferida, dicho método comprende además la etapa de purificar dicho oligonucleótido en condiciones de desnaturalización, en donde, preferiblemente, dichas condiciones de desnaturalización se caracterizan por un pH de entre 10 a 14, preferiblemente, un pH de entre 10 a 13, más preferiblemente, un pH de aproximadamente 12, de manera más preferida, un pH de 12.

En una realización más preferida, dicho método comprende además la etapa de purificar dicho oligonucleótido a un pH de entre 10 a 14, preferiblemente, un pH de entre 10 a 13, más preferiblemente, un pH de aproximadamente 12, de manera más preferida, un pH de 12.

5 En una realización más preferida, dicha purificación se realiza por medio de cromatografía de intercambio aniónico, en donde, preferiblemente, dicha cromatografía de intercambio aniónico se realiza utilizando una matriz de intercambio aniónico funcionalizada con grupos amino terciarios, en donde, más preferiblemente, dicha matriz de intercambio aniónico se compone de un material seleccionado de entre poliestireno, poliestireno/divinilbenceno o polimetacrilato, en donde, todavía más preferiblemente, dicho material es poliestireno/divinilbenceno.

10 En una realización más preferida, dicho oligonucleótido se produce en un rendimiento molar con respecto a dicho primer oligonucleótido de al menos un 15 %, preferiblemente, de al menos un 20 %, de nuevo preferiblemente, de al menos un 25 %. Todavía más preferiblemente, de al menos un 30 %.

En una realización más preferida, la pureza de dicho oligonucleótido es al menos un 75 %, preferiblemente, al menos un 80 %, más preferiblemente, al menos un 85 %, todavía más preferiblemente, al menos un 90 % y, de manera más preferida, al menos un 95 %.

15 Los métodos de la invención descritos en la presente memoria son muy adecuados para la síntesis a gran escala de oligonucleótidos, en particular, de oligonucleótidos ricos en G, tales como, por ejemplo, oligonucleótidos que contienen CpG no metilado flanqueado por poli G. En particular, los compuestos de este tipo se utilizan en aplicaciones farmacéuticas.

20 Los siguientes ejemplos ilustran además la invención, pero, por supuesto, no se deberían interpretar de ninguna manera como limitativos de su alcance.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran además la invención, pero no se deberían interpretar de ninguna manera como limitativos de su alcance.

25 Las siguientes abreviaturas se han utilizado particularmente durante toda esta sección de Ejemplos y la especificación completa:

ACN	Acetonitrilo
GPC	Grupo protector cianoetilo
VC	Volumen (volúmenes) de la columna
DCA	Ácido dicloroacético
30 DCI	Dicianoimidazol
DEA	Dietilamina
DMF	Dimetilformamida
eq	equivalentes
ETT	3-etiltio-1H-tetrazol
35 FLP	Producto completo
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
NMI	N-metilimidazol
NPHL 250	Enlazador de alta carga Nittophase Unylinker 250
DO	Densidad óptica
40 TBA	Tert-butilamina
UV	Ultravioleta

La dimetilformamida (DMF) se adquirió a Acros Organics (parte de Thermo Fisher Scientific) y tenía una pureza de un 99,8 %. Se adquirió enlazador de alta carga Nittophase Unylinker 250 (NPHL 250) a Kinovate Life Sciences, Inc., Oceanside, California, EE. UU.



## Ejemplo 1

Este ejemplo describe la síntesis del oligonucleótido G10 (SEQ ID NO:1) en presencia de varias combinaciones de disolventes y codisolventes. Esto demuestra la superioridad de la mezcla de disolventes ACN/DMF y DMF pura por encima de ACN/sulfolano en términos de pureza del producto completo. Demuestra además la superioridad de DMF pura por encima de ACN/DMF en términos de rendimiento oligonucleótidos totales.

## Síntesis en ACN/sulfolano con DCI como activador

Este ejemplo describe una síntesis sin tritilo de 1,51 mmol del oligonucleótido G10 (SEQ ID NO:1) en Äkta 100 OligoPilot utilizando el enlazador de alta carga Nittophase Unylinker 250 (NPHL 250) como soporte sólido de síntesis. 57,7 ml del soporte de síntesis, aumentados en ACN/sulfolano (1:1 v/v) (densidad del soporte: 0,109 g/ml) se cargaron en la columna de síntesis (diámetro de la columna 3,5 cm, altura de la columna 6 cm), y después un lavado previo a la síntesis con ACN (64,1 ml/min, 2 VC), se utilizó el siguiente ciclo de síntesis: (1) destitilación con DCA en tolueno (primer ciclo: DCA al 10 % en tolueno, 32,9 ml/min; ciclos subsecuentes: DCA al 3 % en tolueno, 64,1 ml/min, 2 VC) seguido por lavado con ACN (2 VC a 32,1 ml/min y 2 VC a 64,1 ml/min); (2) acondicionamiento con ACN/sulfolano (1:1 v/v; 32,9 ml/min, 1,5 VC); (3) acoplamiento (activador: 0,7 M de DCI en ACN/sulfolano (1:1 v/v); desoxinucleósido fosforamidita (2,0 eq/soporte): 0,2 M en ACN/sulfolano (1:1 v/v); volumen de carga: 30,2 ml (15,1 ml de amidita + 15,1 ml de activador), caudal de carga: 53,1 ml/min; volumen de empuje: 8 ml, caudal de empuje: 53,1 ml/min; tiempo del ciclo repetido: 10 min, caudal del ciclo repetido: 48,1 ml/min) seguido por lavado con ACN (1 VC, 64,1 ml/min); (4) adición de caperuza previa a oxidación con 0,2 VC de Caperuza A (NMI/piridina/ACN, 2:3:5 v/v/v)/ACN (1:1 v/v) seguido por 0,75 VC de 1:1 (v/v) de Caperuza A/Caperuza B (Anhídrido isobutírico/ACN 1:1 v/v), tiempo de contacto 2,5 min, carga/caudal de empuje: 17,3 ml/min, volumen de empuje: 1,1 ml, volumen de lavado: 1 VC, caudal de lavado: 64,1 ml/min; (5) empuje previo a oxidación con 0,5 VC de Caperuza A (34,8 ml/min); (6) oxidación con 50 mM de 12 (3 eq) en piridina/agua (9:1 v/v), volumen de carga: 90,6 ml, tiempo de contacto: 2,6 min, carga/caudal de empuje: 34,8 ml/min, volumen de empuje de oxidación: 1,1 VC, seguido por lavado con ACN (1 VC, 64,1 ml/min); (7) acondicionamiento previo a adición de caperuza con 1,5 VC de ACN/sulfolano (1:1 v/v, 32,9 ml/min); (8) adición de caperuza con 0,2 VC de Caperuza A/ACN (1:1 v/v) seguida por 0,75 VC de 1:1 (v/v) de Caperuza A/Caperuza B, tiempo de contacto 2,5 min, carga/caudal de empuje: 17,3 ml/min, volumen de empuje: 1,1 VC, volumen de lavado: 1 VC, caudal de lavado: 64,1 ml/min. Después de un lavado de columna final con 2 VC de ACN (64,1 ml/min) y la destitilación final, el grupo protector GPC se eliminó del enlace fosfodiéster con DEA al 20 % en ACN (5 VC, tiempo de contacto 10 min, seguido por un lavado con 4 VC de ACN (96,2 ml/min). La escisión y desprotección se lograron por medio de tratamiento con no menos de 4 VC de amoniaco al 28-30 % a 50 °C durante no menos de 24 horas en un frasco en una mesa agitadora seguido de etapas de lavado repetidas de 1 VC de agua cada una hasta que se alcanzó una lectura de UV inferior a 40 DO/ml.

La DO se determinó por medio de medición de la absorción a 260 nm. El rendimiento de oligonucleótidos (DO/ $\mu$ mol) se encuentra en la Tabla 1.

El análisis de intercambio aniónico para determinar la pureza de los oligonucleótidos en bruto se realizó en un sistema Waters Alliance HPLC en una columna Dionex DNAPac PA200 4x250 mm a 30 °C. Las muestras se diluyeron a 6,25 DO/ml en un tampón A de HPLC (20 mM de NaOH), 20  $\mu$ l del mismo se inyectaron en la columna y se separaron a un caudal de 1 ml/min utilizando un gradiente del tampón B de HPLC al 25-40 % (20 mM de NaOH, 1,5 M de NaCl, metanol al 40 %) durante 5 min seguido por un gradiente del tampón B al 40-55 % durante 35 min. El % del producto completo se encuentra en la Tabla 1.

## Síntesis en ACN/DMF con DCI como activador

Este ejemplo describe una síntesis sin tritilo de 1,51 del SEQ ID NO:1 en Äkta 100 OligoPilot utilizando el enlazador de alta carga Nittophase Unylinker 250 (NPHL 250) como soporte sólido de síntesis. 57,7 ml del soporte de síntesis, aumentados en ACN/DMF (1:1 v/v) (densidad del soporte: 0,109 g/ml) se cargaron en la columna de síntesis (diámetro de la columna 3,5 cm, altura de la columna 6 cm), y después un lavado previo a la síntesis con ACN (64,1 ml/min, 2 VC), se utilizó el siguiente ciclo de síntesis: (1) destitilación con DCA en tolueno (primer ciclo: DCA al 10 % en tolueno, 32,9 ml/min; ciclos subsecuentes: DCA al 3 % en tolueno, 64,1 ml/min, 2 VC) seguido por lavado con ACN (2 VC a 32,1 ml/min y 2 VC a 64,1 ml/min); (2) acondicionamiento con ACN/DMF (1:1 v/v; 32,9 ml/min, 1,5 VC); (3) acoplamiento (activador: 0,7 M de DCI en ACN/DMF (1:1 v/v); desoxinucleósido fosforamidita (2,0 eq/soporte): 0,2 M en ACN/DMF (1:1 v/v); volumen de carga: 30,2 ml (15,1 ml de amidita + 15,1 ml de activador), caudal de carga: 53,1 ml/min; volumen de empuje: 8 ml, caudal de empuje: 53,1 ml/min; tiempo del ciclo repetido: 10 min, caudal del ciclo repetido: 48,1 ml/min) seguido por lavado con ACN (1 VC, 64,1 ml/min); (4) adición de caperuza previa a oxidación con 0,2 VC de Caperuza A (NMI/piridina/ACN, 2:3:5 v/v/v)/ACN (1:1 v/v) seguido por 0,75 VC de 1:1 (v/v) de Caperuza A/Caperuza B (Anhídrido isobutírico/ACN 1:1 v/v), tiempo de contacto 2,5 min, carga/caudal de empuje: 17,3 ml/min, volumen de empuje: 1,1 ml, volumen de lavado: 1 VC, caudal de lavado: 64,1 ml/min; (5) empuje previo a oxidación con 0,5 VC de Caperuza A (34,8 ml/min); (6) oxidación con 50 mM de 12 (3 eq) en piridina/agua (9:1 v/v), volumen de carga: 90,6 ml, tiempo de contacto: 2,6 min, carga/caudal de empuje: 34,8 ml/min, volumen de empuje de oxidación: 1,1 VC, seguido por lavado con ACN (1 VC, 64,1 ml/min); (7) acondicionamiento previo a la adición de caperuza con 1,5 VC de ACN/DMF (1:1 v/v, 32,9 ml/min); (8) adición de caperuza con 0,2 VC de Caperuza A/ACN (1:1 v/v) seguida por 0,75 VC de 1:1 (v/v) de Caperuza A/Caperuza B,

tiempo de contacto 2,5 min, carga/caudal de empuje: 17,3 ml/min, volumen de empuje: 1,1 VC, volumen de lavado: 1 VC, caudal de lavado: 64,1 ml/min. Después de un lavado de columna final con 2 VC de ACN (64,1 ml/min) y la destritilación final, el grupo protector GPC se eliminó del enlace fosfodiéster con DEA al 20 % en ACN (5 VC, tiempo de contacto no inferior a 45 min, seguido por un lavado con 4 VC de ACN (96,2 ml/min). La escisión y desprotección se lograron por medio de recirculación sobre columna con no menos de 4 VC de amoniaco al 28-30 % a 50 °C seguido de etapas de lavado repetidas de 1 VC de agua cada una hasta que se alcanzó una lectura de UV 40 DO/ml.

La DO se determinó por medio de medición de la absorción a 260 nm. El rendimiento de oligonucleótidos (DO/μmol) se encuentra en la Tabla 1.

- 10 El análisis de intercambio aniónico para determinar la pureza de los oligonucleótidos en bruto se realizó en un sistema Waters Alliance HPLC en una columna Dionex DNAPac PA200 4x250 mm a 30 °C. Las muestras se diluyeron a 6,25 DO/ml en un tampón A de HPLC (20 mM de NaOH), 20 μl del mismo se inyectaron en la columna y se separaron a un caudal de 1 ml/min utilizando un gradiente del tampón B de HPLC al 25-40 % (20 mM de NaOH, 1,5 M de NaCl, metanol al 40 %) durante 5 min seguido por un gradiente del tampón B al 40-55 % durante 35 min. El
- 15 % del producto completo se encuentra en la Tabla 1.

#### Síntesis en DMF con DCI como activador

- Este ejemplo describe una síntesis sin tritilo de 1,51 del SEQ ID NO:1) en Äkta 100 OligoPilot utilizando el enlazador de alta carga Nittophase Unylinker 250 (NPHL 250) como soporte sólido de síntesis. 57,7 ml del soporte de síntesis, aumentados en DMF (densidad del soporte: 0,109 g/ml) se cargaron en la columna de síntesis (diámetro de la columna 3,5 cm, altura de la columna 6 cm), y después un lavado previo a la síntesis con ACN (64,1 ml/min, 2 VC), se utilizó el siguiente ciclo de síntesis: (1) destritilación con DCA en tolueno (primer ciclo: DCA al 10 % en tolueno, 32,9 ml/min; ciclos subsecuentes: DCA al 3 % en tolueno, 64,1 ml/min, 2 VC) seguido por lavado con ACN (2 VC a 32,1 ml/min y 2 VC a 64,1 ml/min); (2) acondicionamiento con DMF (32,9 ml/min, 1,5 VC); (3) acoplamiento (activador: 0,7 M de DCI en DMF; desoxinucleósido fosforamidita (2,0 eq/soporte): 0,2 M en DMF; volumen de carga: 30,2 ml (15,1 ml de amidita + 15,1 ml de activador), caudal de carga: 53,1 ml/min; volumen de empuje: 8 ml, caudal de empuje: 53,1 ml/min; tiempo del ciclo repetido: 10 min, caudal del ciclo repetido: 48,1 ml/min) seguido por lavado con ACN (1 VC, 64,1 ml/min); (4) adición de caperuza previa a oxidación con 0,2 VC de Caperuza A (NMI/piridina/ACN, 2:3:5 v/v/v)/ACN (1:1 v/v) seguido por 0,75 VC de 1:1 (v/v) de Caperuza A/Caperuza B (Anhidrido isobutírico/ACN 1:1 v/v), tiempo de contacto 2,5 min, carga/caudal de empuje: 17,3 ml/min, volumen de empuje: 1,1 ml, volumen de lavado: 1 VC, caudal de lavado: 64,1 ml/min; (5) empuje previo a oxidación con 0,5VC de Caperuza A (34,8 ml/min); (6) oxidación con 50 mM de 12 (3 eq) en piridina/agua (9:1 v/v), volumen de carga: 90,6 ml, tiempo de contacto: 2,6 min, carga/caudal de empuje: 34,8 ml/min, volumen de empuje de oxidación: 1,1 VC, seguido por lavado con ACN (1 VC, 64,1 ml/min); (7) acondicionamiento previo a adición de caperuza con 1,5 VC de DMF (1:1 v/v, 32,9 ml/min); (8) adición de caperuza con 0,2 VC de Caperuza A/ACN (1:1 v/v) seguida por 0,75 VC de 1:1 (v/v) de Caperuza A/Caperuza B, tiempo de contacto 2,5 min, carga/caudal de empuje: 17,3 ml/min, volumen de empuje: 1,1 VC, volumen de lavado: 1 VC, caudal de lavado: 64,1 ml/min. Después de un lavado de columna final con 2 VC de ACN (64,1 ml/min) y la destritilación final, el grupo protector GPC se eliminó del enlace fosfodiéster con TBA al 20 % en ACN (5 VC, tiempo de contacto no inferior a 45 min, seguido por un lavado con 4 VC de ACN (96,2 ml/min). La escisión y desprotección se lograron por medio de recirculación sobre columna con no menos de 4 VC de amoniaco al 28-30 % a 50 °C seguido de etapas de lavado repetidas de 1 VC de agua cada una hasta que se alcanzó una lectura de UV 40 DO/ml.

La DO se determinó por medio de medición de la absorción a 260 nm. El rendimiento de oligonucleótidos (DO/μmol) se encuentra en la Tabla 1.

- 45 El análisis de intercambio aniónico para determinar la pureza de los oligonucleótidos en bruto se realizó en un sistema Waters Alliance HPLC en una columna Dionex DNAPac PA200 4x250 mm a 30 °C. Las muestras se diluyeron a 6,25 DO/ml en un tampón A de HPLC (20 mM de NaOH), 20 μl del mismo se inyectaron en la columna y se separaron a un caudal de 1 ml/min utilizando un gradiente del tampón B de HPLC al 25-40 % (20 mM de NaOH, 1,5 M de NaCl, metanol al 40 %) durante 5 min seguido por un gradiente del tampón B al 40-55 % durante 35 min. El % del producto completo se encuentra en la Tabla 1.

- 50 Los datos demuestran que la pureza de FLP en la síntesis en bruto con DMF como codisolvente (57,9 %) y con DMF pura como disolvente (56,3 %) es la mayor. Asimismo, el rendimiento total con DMF pura como disolvente es el mayor (181 DO/μmol). Asimismo, las impurezas y los fallos en la síntesis tales como G10-1n y G10+1n, es decir, compuestos que comprenden uno o más residuos de G menos o compuestos que comprenden uno o más residuos de G además del FLP objetivo, se reducen en gran medida cuando se utiliza DMF en lugar de ACN/sulfolano. En particular, esto último es cierto para G10+1n lo que, a su vez, es muy beneficioso debido a la dificultad de separar los compuestos de G10+1n del FLP.
- 55

Tabla 1

Disolvente	Activador	Rendimiento oligo [DO/ $\mu$ mol]	Pureza FLP [% de oligo]	Contenido de FLP-1n en relación a FLP [%]	Contenido de FLP+1n en relación a FLP [%]
ACN/sulfolano	DCI	166	54,0	6,46	5,37
ACN/DMF	DCI	145	57,9	6,08	3,45
DMF	DCI	181	56,3	5,75	0,62

## Ejemplo 2

Este ejemplo describe la síntesis del SEQ ID NO:1 en presencia de DMF pura utilizando ETT como activador. Demuestra la superioridad de ETT sobre DCI en términos de rendimiento de oligonucleótidos y pureza del producto completo.

5

## Síntesis en DMF con ETT como activador

Este ejemplo describe una síntesis sin tritilo de 1,26 del SEQ ID NO:1) en Äkta 100 OligoPilot utilizando el enlazador de alta carga NittoPhase Unylinker 250 (NPHL 250) como soporte sólido de síntesis. 48,1 ml del soporte de síntesis, aumentados en DMF (densidad del soporte: 0,109 g/ml) se cargaron en la columna de síntesis (diámetro de la columna 3,5 cm, altura de la columna 5 cm), y después un lavado previo a la síntesis con ACN (424 cm/h, 2 VC), se utilizó el siguiente ciclo de síntesis: (1) destitilación con DCA en tolueno (primer ciclo: DCA al 10 % en tolueno, 50 cm/h; ciclos subsecuentes: DCA al 3 % en tolueno, 424 cm/h, 2 VC) seguido por lavado con ACN (2 VC a 200 cm/h y 2 VC a 424 cm/h); (2) acondicionamiento con DMF (205 cm/h, 1,5 VC); (3) acoplamiento (activador: 0,6 M de ETT en DMF; desoxinucleósido fosforamidita (2,0 eq/soporte): 0,2 M en DMF; volumen de carga: 26,4 ml (12,6 ml de amidita + 13,8 ml de activador), caudal de carga: 19,3 ml/min; volumen de empuje: 8 ml, caudal de empuje: 120 cm/h; tiempo del ciclo repetido: 10 min, caudal del ciclo repetido: 212 cm/h) seguido por lavado con ACN (1 VC, 424 cm/h); (4) empuje previo a oxidación con 0,5 VC de Caperuza A (NMI/piridina/ACN, 2:3:5, v/v/v, 29,0 ml/min); (5) oxidación con 50 mM de 12 (3 eq) en piridina/agua (9:1 v/v), volumen de carga: 75,5 ml, tiempo de contacto: 2,6 min, carga/caudal de empuje: 29,0 ml/min, volumen de empuje de oxidación: 1,1 VC, seguido por lavado con ACN (1 VC, 424 cm/h); (6) acondicionamiento previo a adición de caperuza con 1,5 VC de DMF (205 cm/hora); (7) adición de caperuza con 0,2 VC de Caperuza A/ACN (1:1 v/v) seguido por 0,75 VC de 1:1 (v/v) de Caperuza A/Caperuza B (Anhídrido isobutírico/ACN, 1:4 v/v), tiempo de contacto 2,5 min, carga/caudal de empuje: 14,4 ml/min, volumen de empuje: 1,1 VC, volumen de lavado: 1 VC, caudal de lavado: 424 cm/h. Después de la destitilación final, el grupo protector GPC se eliminó del enlace fosfodiéster con TBA al 20 % en ACN (5 VC, tiempo de contacto no inferior a 45 min, seguido por un lavado con 4 VC de ACN (424 cm/h)). La escisión y desprotección se lograron por medio de recirculación sobre columna con 5 VC de amoniaco al 28-30 % a 50 °C durante entre 16 a 24 horas seguido de etapas de lavado repetidas de 1 VC de agua cada una hasta que se alcanzó una lectura de UV inferior a 40 DO/ml.

10

15

20

25

La DO se determinó por medio de medición de la absorción a 260 nm. El rendimiento de oligonucleótidos (DO/ $\mu$ mol) se encuentra en la Tabla 2.

30

El análisis de intercambio aniónico para determinar la pureza de los oligonucleótidos en bruto se realizó en un sistema Waters Alliance HPLC en una columna Dionex DNAPac PA200 4x250 mm a 30 °C. Las muestras se diluyeron a 6,25 DO/ml en un tampón A de HPLC (20 mM de NaOH), 20  $\mu$ l del mismo se inyectaron en la columna y se separaron a un caudal de 1 ml/min utilizando un gradiente del tampón B de HPLC al 25-40 % (20 mM de NaOH, 1,5 M de NaCl, metanol al 40 %) durante 5 min seguido por un gradiente del tampón B al 40-55 % durante 35 min. El % del producto completo se encuentra en la Tabla 2 en comparación con la síntesis del Ejemplo 1 con DCI como activador. Los datos demuestran que tanto el rendimiento del oligonucleótido en bruto como la pureza de FLP aumentan considerablemente al utilizar ETT como activador. Además, las impurezas y los fallos en la síntesis tales como G10-1n y G10+1n, es decir, compuestos que comprenden uno o más residuos de G menos o compuestos que comprenden uno o más residuos de G además del FLP objetivo, se reducen además en comparación con la síntesis con DCI como activador.

35

40

Tabla 2

Disolvente	Activador	Rendimiento oligo [DO/ $\mu$ mol]	Pureza FLP [% de oligo]	Contenido de FLP-1n en relación a FLP [%]	Contenido de FLP+1n en relación a FLP [%]
DMF	DCI	181	56,3	5,75	0,62
DMF	ETT	199	64,6	3,54	0,42

## Ejemplo 3

Este ejemplo describe la síntesis del Ejemplo 2 en una escala de 105 mmol. Demuestra que el proceso se puede escalar a escala de producción.

Este ejemplo describe una síntesis sin tritilo de 105 mmol del SEQ ID NO:1 en sintetizador de oligonucleótidos GE OligoProcess utilizando el enlazador de alta carga Nittophase Unylinker 250 (NPHL 250) como soporte sólido de síntesis. 3,85 litros del soporte de síntesis, aumentados en DMF (densidad del soporte: 9,17 ml/G) se cargaron en la columna de síntesis (diámetro de la columna 35 cm, altura de la columna 4 cm), y después un lavado previo a la síntesis con ACN (424 cm/h, 2 VC), se utilizó el siguiente ciclo de síntesis: (1) destritolación con DCA en tolueno (primer ciclo: DCA al 10 % en tolueno, 62 cm/h; ciclos subsiguientes: DCA al 3 % en tolueno, 424 cm/h, 2 VC) seguido por lavado con ACN (2 VC a 200 cm/h y 2 VC a 424 cm/h); (2) acondicionamiento con DMF (205 cm/h, 1,5 VC); (3) acoplamiento (activador: 0,6 M de ETT en DMF; desoxinucleósido fosforamidita (2,0 eq/soporte): 0,2 M en DMF; volumen de carga: 2,21 l (52,4 % de volumen del activador), caudal de carga: 1,68 l/min; caudal de empuje: 1,68 l/min; tiempo del ciclo repetido: 10 min, caudal del ciclo repetido: 3,40 l/min) seguido por lavado con ACN (1 VC, 424 cm/h); (4) empuje previo a oxidación con (0,5 VC de Caperuza A (NMI/piridina/ACN, 2:3:5, v/v/v, 2,42 l/min); (5) oxidación con 50 mM de 12 (3 eq) en piridina/agua (9:1 v/v), volumen de carga: 6,30 l, tiempo de contacto: 2,6 min, carga/caudal de empuje: 2,24 l/min, volumen del empuje de la oxidación: 1,1 VC, seguido por lavado con ACN (1 VC, 424 cm/h); (6) acondicionamiento previo a adición de caperuza con 1,5 VC de DMF (205 cm/hora); (7) adición de caperuza con 0,2 VC de Caperuza A/ACN (1:1 v/v) seguido por 0,75 VC de 1:1 (v/v) de Caperuza A/Caperuza B (anhídrido isobutírico/ACN, 1:4 v/v), tiempo de contacto 2,5 min, carga/caudal de empuje: 1,15 l/min, volumen del empuje: 1,1 VC, volumen de lavado: 1 VC, caudal de lavado: 424 cm/h. Después de la destritolación final y de un lavado de columna final (2 VC de ACN, 424 cm/h), el grupo protector GPC se eliminó del enlace fosfodiéster con TBA al 20 % en ACN (5 VC, tiempo de contacto no inferior a 45 min, seguido por un lavado con 4 VC de ACN (424 cm/h)). La escisión y desprotección se lograron por medio de recirculación sobre columna con 5 VC de amoniaco al 28-30 % a 50 °C durante entre 16 a 24 horas seguido de lavado con no menos de 4 VC de agua hasta que se alcanzó una lectura de UV inferior a 40 DO/ml.

La DO se determinó por medio de medición de la absorción a 260 nm.

El análisis de intercambio aniónico para determinar la pureza de los oligonucleótidos en bruto se realizó en un sistema Waters Alliance HPLC en una columna Dionex DNAPac PA200 4x250 mm a 30 °C. Las muestras se diluyeron a 6,25 DO/ml en un tampón A de HPLC (20 mM de NaOH), 20 µl del mismo se inyectaron en la columna y se separaron a un caudal de 1 ml/min utilizando un gradiente del tampón B de HPLC al 25-40 % (20 mM de NaOH, 1,5 M de NaCl, metanol al 40 %) durante 5 min seguido por un gradiente del tampón B al 40-55 % durante 35 min.

El rendimiento del oligonucleótido en bruto fue 178 DO/µmol (51,6 % de máximo) con un contenido de FLP de un 66,7 %, lo que demuestra que el proceso preferido es escalable a escala de producción.

## Ejemplo 4

Este ejemplo describe la purificación del oligonucleótido en bruto sintetizado como se describe en el Ejemplo 2. Demuestra que el oligonucleótido en bruto sintetizado utilizando el método preferido se puede purificar con una alta pureza.

Dos tandas de oligonucleótido en bruto sintetizado como se describe en el Ejemplo 2 se combinaron para crear un alimento para el proceso de purificación. La pureza de FLP en el conjunto de oligonucleótidos en bruto combinados se determinó con un 66,5 %. Una columna de 7,5 cm de diámetro se empaquetó con una matriz de intercambio aniónico Source15Q a una altura de lecho de 20 cm (factor de compresión 1) y se lavó con no menos de 3 VC del tampón B (25 mM de NaOH, 2 M de NaCl) a un caudal de 100 cm/h seguido por equilibración con no menos de 3 VC de tampón A (25 mM de NaOH) a un caudal de 100 cm/h. El oligonucleótido en bruto combinado se cargó a una concentración de 500 DO/ml a un caudal de 100 cm/h seguido por una etapa de lavado con no menos de 1 VC de tampón A a 100 cm/h hasta que la señal UV volvió a los valores iniciales. Para elución, un gradiente de tampón B al 10 % a tampón B al 44 % se aplicó por encima de 17 VC a un caudal de 100 cm/h, el tamaño de la fracción fue 0,5 VC. En la Tabla 3 se muestran los resultados analíticos para los conjuntos simulados de las fracciones analizadas para DO (medición de la absorción a 260 nm) y pureza de FLP (HPLC de intercambio aniónico). Los conjuntos simulados muestran una alta pureza de FLP en el intervalo de 94 % y una alta recuperación de FLP de entre un 71 a un 84 %.

Tabla 3: Datos del conjunto simulado del proceso de cromatografía.

Fracciones	Recuperación DO [%]	FLP [%]	Recuperación FLP [%]
17-30	58	94,3	82
17-31	59	94,3	84
18-31	55	94,4	78

## ES 2 741 025 T3

19-30	50	94,9	71
18-30	53	94,7	76

5 Las fracciones entre 17 a 31 se agruparon para procesamiento posterior a través de ultrafiltración/diafiltración (valor de corte del peso molecular: 3000) y liofilización que lleva a un oligonucleótido de 6,6 g (corregido para humedad) con una pureza de un 93,0 % de FLP (1 % de G10-1n y 0,53 % de G10+1n). El rendimiento del proceso global fue 2,6 g/mmol (19 %).

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Kuros Biosciences AG  
 <120> Oligonucleótidos ricos en guanina  
 5 <130> P3339PC00  
  
 <150> US 62/189.832  
 <151> 08-07-2015  
  
 10 <150> EP15177520  
 <151> 20-07-2015  
  
 <160> 11  
  
 15 <170> PatentIn versión 3,5  
  
 <210> 1  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 20 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido rico en G G10  
  
 25 <400> 1  
 gggggggggg gacgatcgtc gggggggggg 30  
  
 <210> 2  
 <211> 10  
 30 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia palindrómica  
 35  
 <400> 2  
 gacgatcgtc 10  
  
 <210> 3  
 40 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido rico en G  
  
 <400> 3  
 ggggacgatc gtcggggggg 19  
  
 50 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido rico en G  
  
 <400> 4  
 60 gggggacgat cgtcgggggg 20  
  
 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido rico en G

5 <400> 5  
 ggggggacga tcgtcggggg g 21

<210> 6  
 <211> 22  
 10 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido rico en G

15 <400> 6  
 gggggggacg atcgtcgggg gg 22

<210> 7  
 <211> 24  
 20 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido rico en G

25 <400> 7  
 ggggggggac gatcgtcggg gggg 24

<210> 8  
 <211> 26  
 30 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido rico en G

<400> 8  
 40 ggggggggga cgatcgtcgg gggggg 26

<210> 9  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido rico en G

<400> 9  
 50 gggggggggg acgatcgtcg gggggggg 28

<210> 10  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 55 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido rico en G

<400> 10  
 60 ggggggacgac gacgatcgtc gtcggggggg 30

<210> 11  
 <211> 20  
 65 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótidos ricos en guanina

5

<400> 11

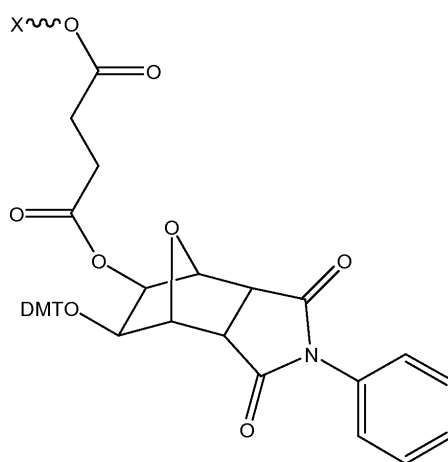
ggtgcatcga tgcagggggg

20



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para acoplar un nucleósido fosforamidita durante la síntesis de un oligonucleótido a un soporte universal, a un primer nucleósido, o a un oligonucleótido de extensión, en donde dicho oligonucleótido comprende una región de 3 o más monómeros de guanina consecutivos, y en donde dicho método comprende las siguientes etapas:
- (i) generar una disolución de acoplamiento, en donde dicha disolución de acoplamiento comprende:
- (a) dicho nucleósido fosforamidita;
- (b) un reactivo de activación; y
- 10 (c) uno o más disolventes, en donde uno de dicho uno o más disolventes es N,N-dimetilformamida (DMF); y
- (ii) poner en contacto dicha disolución de acoplamiento con dicho soporte universal, con dicho primer nucleósido o dicho oligonucleótido de extensión.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, y en donde el volumen de dicha DMF es igual o superior a un 25 %, preferiblemente, igual o superior a un 33 %, más preferiblemente, igual o superior a un 50 % del volumen total de dicho uno o más disolventes.
3. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde dicho uno o más disolventes comprende, preferiblemente consiste en, DMF y acetonitrilo, y en donde la relación (v/v) de dicha DMF a acetonitrilo es entre 1:3 y 3.1.
- 20 4. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde dicho uno o más disolventes consiste en DMF y acetonitrilo, y en donde la relación (v/v) de dicho DMF a acetonitrilo es 1:1.
5. El método de la reivindicación 1, en donde dicho uno o más disolventes consiste exactamente en un disolvente, en donde dicho exactamente un disolvente es DMF.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho reactivo de activación se selecciona de entre:
- 25 (a) 4,5-dicianoimidazol (DCI);
- (b) 5-etiltio-1H-tetrazol (ETT);
- (c) 5-benciltio-1H-tetrazol (BTT); o
- (d) 5-(3,5-bis-trifluorometil)fenil-1H-tetrazol (Activador 42).
- 30 7. El método de la reivindicación 1, en donde dicha disolución de acoplamiento comprende, preferiblemente, consiste en:
- (a) dicho nucleósido fosforamidita;
- (b) dicho reactivo de activación, en donde dicho reactivo de activación es 5-etiltio-1H-tetrazol (ETT)
- (c) exactamente un disolvente, y en donde dicho exactamente un disolvente es DMF.
- 35 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho primer nucleósido y/o dicho oligonucleótido de extensión se inmoviliza en un soporte.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho soporte es un soporte de poliestireno, en donde dicho soporte de poliestireno se reticula por medio de divinilbenceno.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho soporte comprende además un enlazador, en donde dicho enlazador se representa por la fórmula I



I

en donde X representa dicho soporte, en donde, preferiblemente, X representa dicho soporte de poliestireno reticulado por medio de divinilbenceno.

5 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho oligonucleótido comprende al menos un 30 % de monómeros de guanina.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho oligonucleótido comprende una primera región de 3 o más monómeros de guanina consecutivos y una segunda región de 3 o más monómeros de guanina consecutivos, y en donde dicha primera región se ubica en el extremo 3' de dicho oligonucleótido y en donde dicha segunda región se ubica en el extremo 5' de dicho oligonucleótido.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho oligonucleótido comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- (a) GGGGACGATCGTCGGGGGG (SEQ ID NO:3);
- (b) GGGGGACGATCGTCGGGGGG (SEQ ID NO:4);
- 15 (c) GGGGGGACGATCGTCGGGGGG (SEQ ID NO:5);
- (d) GGGGGGGACGATCGTCGGGGGG (SEQ ID NO:6);
- (e) GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGG (SEQ ID NO:7);
- (f) GGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG (SEQ ID NO:8);
- (g) GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGG (SEQ ID NO:9);
- 20 (h) GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 1); y
- (i) GGGGGGCGACGACGATCGTCGTCGGGGGGG (SEQ ID NO: 10).

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho oligonucleótido consiste en la SEQ ID NO:1.

15. Un método para producir un oligonucleótido, dicho método comprende

25 (I) acoplar un nucleósido fosforamidita a un primer nucleósido; en donde dicho acoplamiento comprende el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14;

(II) generar un oligonucleótido de extensión por medio de la oxidación del producto de la etapa (I);

(III) acoplar un nucleósido fosforamidita al producto de la etapa (II) después de la desprotección; en donde dicho acoplamiento comprende el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14;

30 (IV) generar un oligonucleótido de extensión por medio de la oxidación del producto de la etapa (III); y

(V) repetir las etapas (III) y (IV) hasta que dicho oligonucleótido de extensión comprenda la secuencia de dicho oligonucleótido.