

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 999 138**

51 Int. Cl.:

**C07H 1/00** (2006.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2017** **PCT/US2017/038643**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.12.2017** **WO17223258**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2017** **E 17735311 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2024** **EP 3475292**

54 Título: **Síntesis de oligonucleótidos tiolados sin una etapa de recubrimiento**

30 Prioridad:

**24.06.2016 US 201662354433 P**

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

**24.02.2025**

73 Titular/es:

**BIOGEN MA INC. (100.00%)  
225 Binney Street  
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**SHI, XIANGLIN;  
YANG, JIMIN;  
KIESMAN, WILLIAM, F. y  
FILLON, YANNICK**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

### Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 999 138 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

Síntesis de oligonucleótidos tiolados sin una etapa de recubrimiento

Solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación en virtud de 35 USC §119(e), de la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. No. 62/354,433, presentada el 24 de junio de 2016.

Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato ASCII. Dicha copia ASCII, creada el 20 de junio de 2017, se llama 123429-00220\_SL.txt y tiene un tamaño de 3,101 bytes.

10 Antecedentes de la invención

Los oligonucleótidos son oligómeros cortos de ADN o ARN que se pueden sintetizar químicamente para fines médicos y de investigación. Los oligonucleótidos normalmente se preparan mediante la adición gradual de residuos de nucleótidos para producir una secuencia específica. El actual proceso de fabricación de síntesis en fase sólida de oligonucleótidos tiolados utiliza la repetición de cuatro reacciones por ciclo, a saber, desprotección (por ejemplo, destrilación), acoplamiento, sulfuración y recubrimiento. La etapa de recubrimiento se diseñó para bloquear cualesquier grupos 5'-hidroxilo sin reaccionar y que no se hayan podido acoplar con la fosforamidita en cada ciclo, de tal manera que la secuencia que falla no participe más en las reacciones de acoplamiento en los ciclos subsiguientes para generar impurezas que faltan en el nucleósido del acoplamiento fallido. La etapa de recubrimiento se realiza normalmente utilizando anhídrido acético con catalizadores básicos, tales como piridina o N-metilmorfolina.

Como es necesario completar cada una de las cuatro etapas para agregar cada nucleótido al oligómero en crecimiento, reducir el número de etapas reduciría la cantidad de tiempo requerido para cada adición de nucleótido, así como también reduciría la cantidad de reactivos necesarios para completar la síntesis de oligonucleótidos. Por lo tanto, se necesitan nuevos métodos sintéticos para preparar oligonucleótidos.

25 El documento US 2010/331533 A1 divulga un método y composiciones para sulfurar al menos un ligamiento de fosfito o tiofosfito en un oligonucleótido. El documento US 6809195 B1 describe métodos para sintetizar compuestos oligoméricos.

30 Zacharia S. Cheruvallath et al ("Synthesis of Antisense Oligonucleotides: Replacement of 3H-1,2-Benzodithiol3-one 1,1-Dioxide (Beaucage Reagent) with Phenylacetyl Disulfide (PADS) As Efficient Sulfurization Reagent: From Bench to Bulk Manufacture of Active Pharmaceutical Ingredient", Org. Proc. Res. Dev. 2000, 4, 3, 199-204) divulgan que los oligodesoxirribonucleótidos de fosforotioato se pueden sintetizar utilizando PADS como reemplazo del reactivo de Beaucage.

35 Marc M Lemaitre et al ("Volume 18 Number 1 Supplementary Material December 2006 Sulfurizing Reagent II and its use in synthesizing oligonucleotide phosphorothioates", 1 January 2006) y Tang et al ("Large-scale synthesis of oligonucleotide phosphorothioates using 3-amino-1,2,4-dithiazole-5-thione as an efficient sulfur-transfer reagent", Org. Proc. Res. Dev. 2000, 4, 3, 194-198) divulgan el uso de DDTT o ADTT como agente de sulfuración en la síntesis de oligonucleótidos fosforotioatos.

Resumen de la invención

40 La invención en el presente documento describe un proceso de fabricación de síntesis en fase sólida para oligonucleótidos total o parcialmente tiolados utilizando la repetición de tres reacciones por ciclo, a saber, destrilación, acoplamiento y sulfuración, en lugar de las cuatro reacciones convencionales por ciclo.

45 Normalmente, los nucleótidos se agregan a una cadena de oligómeros en crecimiento al acoplar el 5'-hidroxilo libre del último nucleótido del oligómero adherido al soporte sólido con la fosforamidita apropiada. Las ineficiencias en la reacción de acoplamiento dejarían algunos de los grupos 5'-hidroxilo libres para reaccionar en reacciones de acoplamiento subsiguientes, lo que daría como resultado una mezcla complicada de oligómeros a los que les falta un único nucleótido aleatorio. De acuerdo con lo anterior, para evitar que el 5'-hidroxilo sin reaccionar reaccione posteriormente, el 5'-hidroxilo se cubre a través del uso de un reactivo de recubrimiento tal como anhídrido acético antes o después de la etapa de sulfuración.

50 Sorprendentemente, los presentes inventores desarrollaron un proceso que elimina la etapa de recubrimiento antes o después de la etapa de sulfuración. En particular, en lugar de recubrir los grupos 5'-hidroxilo sin reaccionar con un reactivo que necesita ser introducido nuevamente en el proceso, por ejemplo, anhídrido acético, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que los subproductos generados durante la etapa de sulfuración se pueden utilizar para recubrir los grupos 5'-hidroxilo sin reaccionar. Estos subproductos o, en ciertos casos, el propio agente de sulfuración, por ejemplo PADS, se pueden recircular a

través del soporte sólido para recubrir los grupos 5'-hidroxi que no se pudieron acoplar con la fosforamidita. Los grupos 5'-hidroxilo sin reaccionar reaccionan con los subproductos de sulfuración, sin necesidad de una etapa de recubrimiento separado, y ya no están disponibles para acoplarse en los ciclos subsiguientes.

- 5 Para un oligonucleótido completamente tiolado (es decir, un oligonucleótido que incluye solo enlaces fosfotiolato (-P=S)), no se necesita ninguna etapa de recubrimiento y el proceso incluye solo 3 reacciones por ciclo (desprotección, acoplamiento y sulfuración).

El proceso descrito en el presente documento también se puede utilizar para preparar oligonucleótidos parcialmente tiolados, que incluyen enlaces fosfotiolato (-P=S) y fosfodiéster (-P=O). Los oligonucleótidos parcialmente tiolados se preparan convencionalmente mediante un ciclo de 4 etapas de reacción, donde la  
10 tercera etapa del ciclo es la oxidación o la sulfuración, dependiendo de si se desea un enlace -P=O o -P=S. El uso del proceso descrito en el presente documento se puede utilizar para eliminar la etapa de recubrimiento que sigue a la etapa de sulfuración. Sin embargo, debido a que los subproductos de la etapa de oxidación no cubren el 5'-hidroxilo sin reaccionar, pueden quedar cantidades residuales de grupos 5'-hidroxilo que no reaccionaron después de la etapa de oxidación. Sin embargo, para oligonucleótidos parcialmente tiolados que  
15 incluyen una pequeña cantidad de enlaces -P=O, por ejemplo, 4 o menos, el proceso descrito en el presente documento se puede utilizar incluso sin una etapa de recubrimiento después de la etapa de oxidación. Para oligonucleótidos parcialmente tiolados que incluyen un mayor número de enlaces -P=O, por ejemplo, 5 o más, se puede utilizar el proceso descrito en el presente documento, pero se puede utilizar una etapa de recubrimiento convencional, por ejemplo, con anhídrido acético, después de cada etapa de oxidación. Sin  
20 embargo, todavía no es necesario una etapa de recubrimiento después de la etapa de sulfuración, independientemente de cuántos enlaces -P=O estén presentes.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 es un diagrama del método sintético de oligonucleótidos de 3 etapas.

- 25 La FIG. 2 es un diagrama del método sintético de oligonucleótidos convencional de 4 etapas. Se observa que la etapa de sulfuración se puede realizar antes o después de la etapa de recubrimiento en el proceso convencional de 4 reacciones por ciclo.

La FIG. 3 es un cromatograma que compara la pureza por espectrometría de masas para el ciclo de 4 reacciones con PADS (arriba); el ciclo de 3 reacciones con PADS (medio); y el ciclo de 3 reacciones con hidruro de xantano (abajo).

- 30 Las FIGS. 4 y 5 son cromatogramas de HPLC RPIP que comparan el BIIB078 preparado mediante el proceso de 4 ciclos de reacciones (abajo) y el proceso de 3 ciclos de reacciones (arriba) con PADS como el agente de sulfuración.

- 35 Las FIGS. 6 y 7 son cromatogramas de espectrometría de masas que comparan BIIB078 preparado mediante el proceso de 4 ciclos de reacciones (abajo) y el proceso de 3 ciclos de reacciones (arriba) con PADS como el agente de sulfuración.

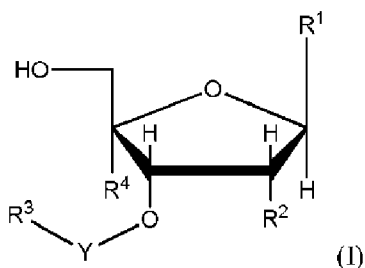
La FIG. 8 muestra los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para la mezcla de reacción de BuOH,  $\text{P}(\text{OMe})_3$  y PADS a lo largo del tiempo, en la que PADS se envejeció con 3-picolina en acetonitrilo- $\text{d}_3$ .

La FIG. 9 muestra los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para la mezcla de reacción de BuOH,  $\text{P}(\text{OMe})_3$  y PADS a lo largo del tiempo, en la que PADS se envejeció con N-metil imidazol en acetonitrilo- $\text{d}_3$ .

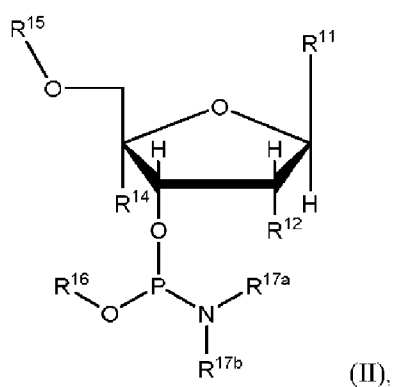
- 40 Descripción detallada

Una primera realización de la invención es un proceso para preparar un oligonucleótido que comprende

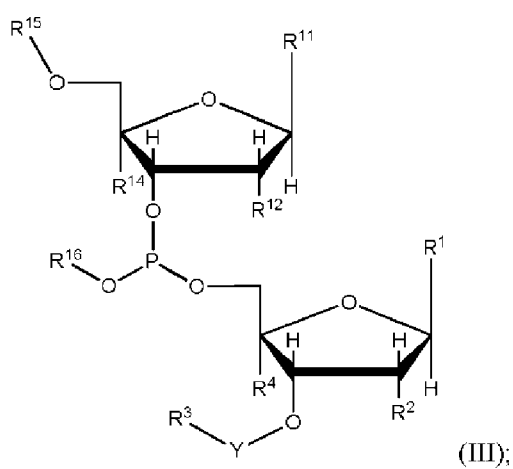
a) hacer reaccionar el compuesto de Fórmula (I):



con el compuesto de Fórmula (II):

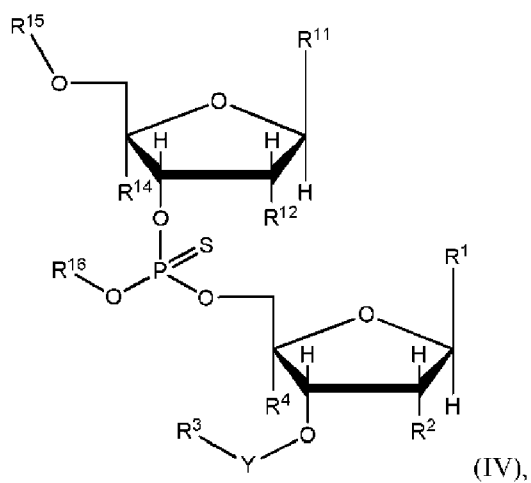


para formar un compuesto de Fórmula (III):

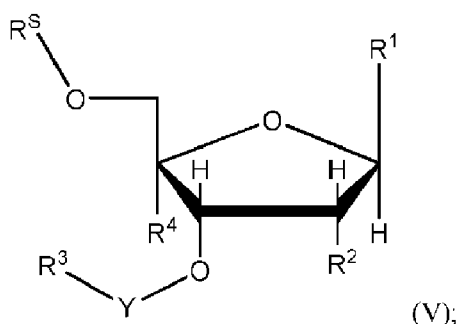


y

- 5 b) sulfurar el compuesto de Fórmula (III) con un agente de sulfuración para formar un compuesto de Fórmula (IV):



y a partir del compuesto sin reaccionar de Fórmula (I) se forma un compuesto de Fórmula (V):



en la que

Cada  $R^1$  y  $R^{11}$  son independientemente una nucleobase, en la que el  $NH_2$  de la nucleobase, si está presente, está protegido por un grupo protector de amina;

- 5 Cada  $R^2$  y  $R^{12}$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, halo y alcoxi  $C_{1-6}$  opcionalmente sustituido con alcoxi  $C_{1-6}$ ;

$R^3$  es un soporte sólido, que comprende opcionalmente un ligador;

Y es un oligonucleótido que comprende 2 o más nucleótidos;

Cada  $R^4$  es independientemente H o forma un anillo con el grupo alcoxi de  $R^2$ ;

- 10 Cada  $R^{14}$  es independientemente H o forma un anillo con el grupo alcoxi de  $R^{12}$ ;

$R^{15}$  es un grupo protector de hidroxilo;

$R^{16}$  es alquilo  $C_{1-6}$  opcionalmente sustituido con -CN;

$R^{17a}$  y  $R^{17b}$  son independientemente alquilo  $C_{1-6}$ ;

$R^S$  es un grupo protector de hidroxilo formado a partir de un subproducto del agente de sulfuración;

- 15 en el que el agente de sulfuración se recircula de 1-20 veces en la etapa b) para convertir el compuesto sin reaccionar de Fórmula (I) en el compuesto de Fórmula (V) y para convertir el compuesto de Fórmula (III) a la Fórmula (IV);

- 20 en el que el agente de sulfuración se agrega en una cantidad de 3 a 6 equivalentes con respecto a la cantidad de ligador o el primer nucleótido si el primer nucleótido está adherido directamente al soporte sólido para convertir el compuesto sin reaccionar de Fórmula (I) a Fórmula (V) y para convertir el compuesto de Fórmula (III) a Fórmula (IV); y

en el que no se agrega ningún otro reactivo para recubrir el compuesto sin reaccionar de Fórmula (I); y en el que los compuestos de Fórmulas (I), (II), (III), (IV), y (V) están opcionalmente en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

- 25 Como se utiliza en el presente documento, un experto en la técnica podría determinar "una cantidad de tiempo suficiente" en base a las condiciones de reacción. Por ejemplo, los tiempos previstos en la decimotercera realización, a saber de 0 a 30 minutos, por ejemplo, 0, 5, 10, 15, 20, 25 o 30 minutos, serían "una cantidad de tiempo suficiente".

- 30 Como se utiliza en el presente documento, "convertir sustancialmente por completo" se podría determinar por un experto en la técnica en base a las condiciones de reacción. En particular, convertir sustancialmente por completo significa convertir el 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % del compuesto sin reaccionar de Fórmula (I) a Fórmula (V) o de Fórmula (III) a Fórmula (IV).

- 35 En algunos aspectos de la primera realización, el proceso no incluye una etapa de recubrimiento adicional después de la etapa b. Específicamente, cualquier compuesto sin reaccionar de Fórmula (I), (VI), o (IX) se recubre con los subproductos de la etapa de sulfuración b sin la necesidad de agregar ningún otro reactivo para recubrir cualquier compuesto sin reaccionar de Fórmula (I), (VI), o (IX).

En un aspecto particular de la primera realización,

$R^{11}$  se selecciona del grupo que consiste en citosina, guanina, adenina, timina (o 5-metil uracilo), uracilo, hipoxantina, xantina, 7-metilguanina, 5,6-dihidouracilo, 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina, en la que el

grupo  $\text{NH}_2$  de la nucleobase, si está presente, está protegido por  $\text{PhCO-}$ ,  $\text{CH}_3\text{CO-}$ ,  $\text{iPrCO-}$ ,  $\text{Me}_2\text{N-CH=}$ , o  $\text{Me}_2\text{N-CMe=}$ .

$\text{R}^{12}$  se selecciona del grupo que consiste en H, halo, alcoxi  $\text{C}_{1-4}$ , y alcoxi  $\text{C}_{1-4}$ alcoxi  $\text{C}_{1-4}$ ;

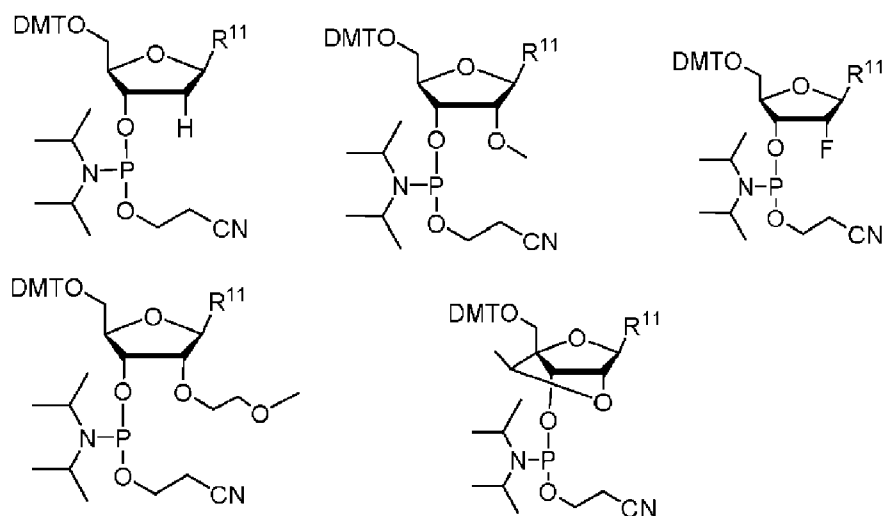
Cada  $\text{R}^{14}$  es independientemente H o forma un anillo de 5 o 6 miembros con el grupo alcoxi de  $\text{R}^{12}$ ;

- 5  $\text{R}^{15}$  es un grupo protector de hidroxilo seleccionado de 4,4'-dimetoxitritilo, [bis-(4-metoxifenil)fenilmetilo] (DMT) o tritilo (trifenilmetilo, Tr).

$\text{R}^{16}$  es alquilo  $\text{C}_{1-4}$  sustituido con  $-\text{CN}$ ; y

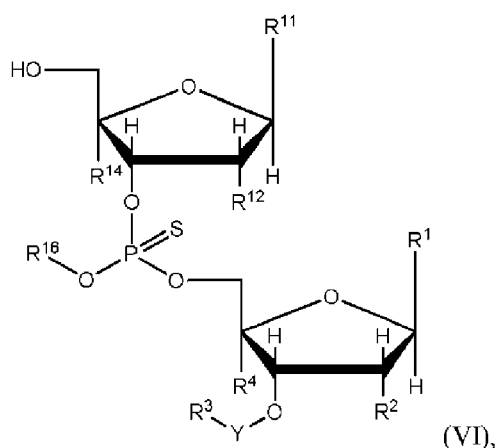
$\text{R}^{17a}$  y  $\text{R}^{17b}$  son independientemente alquilo  $\text{C}_{1-4}$ .

- 10 En un aspecto específico de la primera realización, la Fórmula (II) se selecciona de una cualquiera de las siguientes fórmulas estructurales:



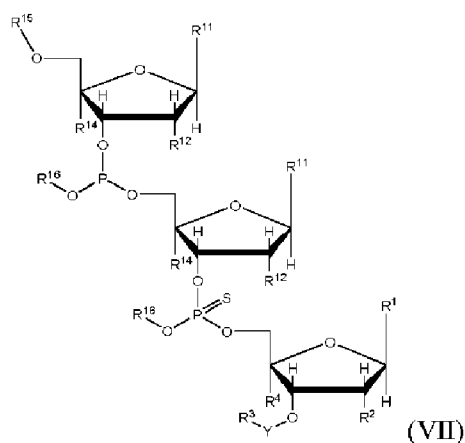
en la que DMTO es el 5'-hidroxilo protegido con 4,4'-dimetoxitritilo y  $\text{R}^{11}$  es como se define para la primera realización.

- 15 Una segunda realización de la invención es un proceso como se describe para la primera realización o cualquier aspecto de la misma, que comprende además la etapa de c) desproteger el compuesto de Fórmula (IV) para formar el compuesto de Fórmula (VI):



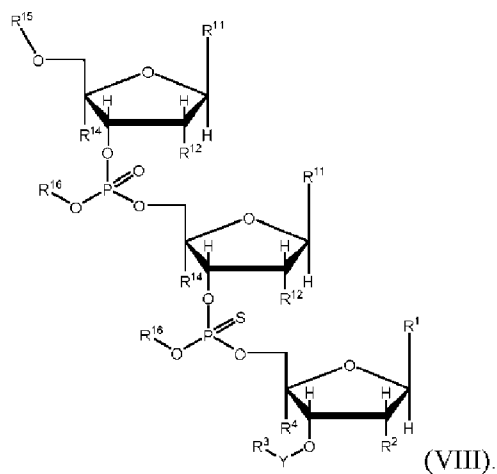
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 20 Una tercera realización de la invención es un proceso como se describe para la segunda realización, que comprende además la etapa de d) hacer reaccionar el compuesto de Fórmula (VI) con un compuesto de Fórmula (II) para formar un compuesto de Fórmula (VII):



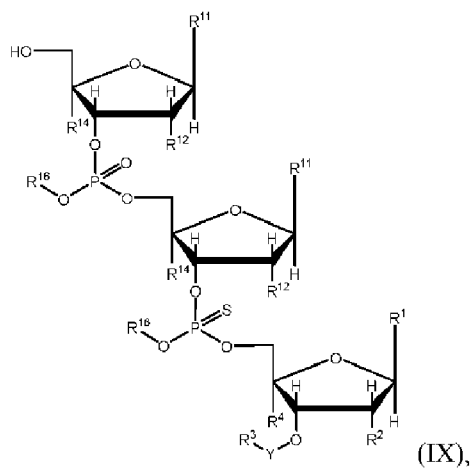
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

e) oxidar el compuesto de Fórmula (VII) con un agente de oxidación para formar un compuesto de Fórmula (VIII):



5

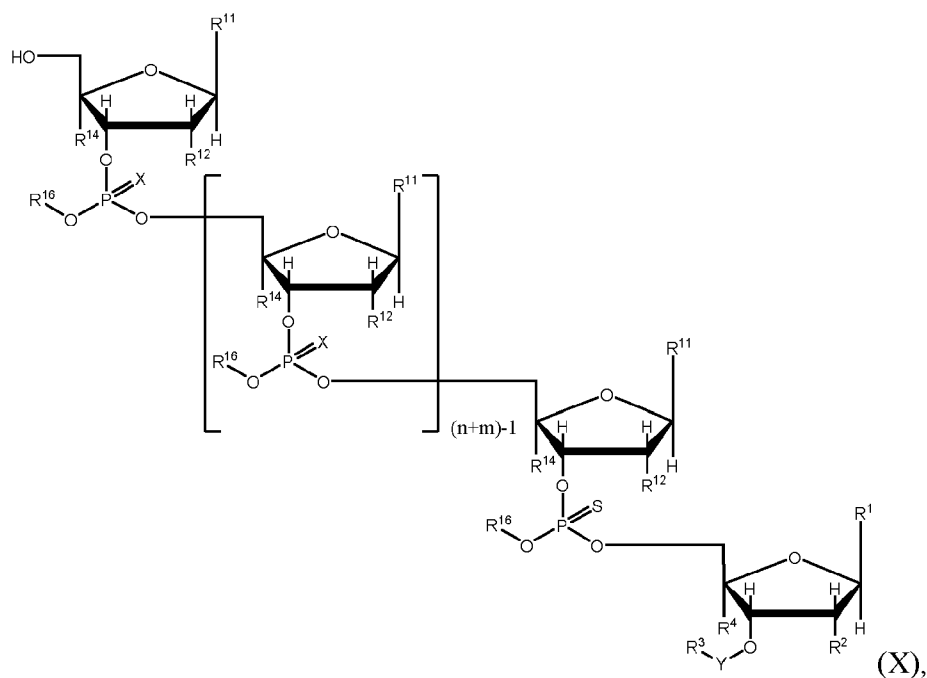
Una cuarta realización de la invención es un proceso como se describe para la tercera realización, que comprende además la etapa de f) desproteger el compuesto de Fórmula (VIII) para formar el compuesto de Fórmula (IX):



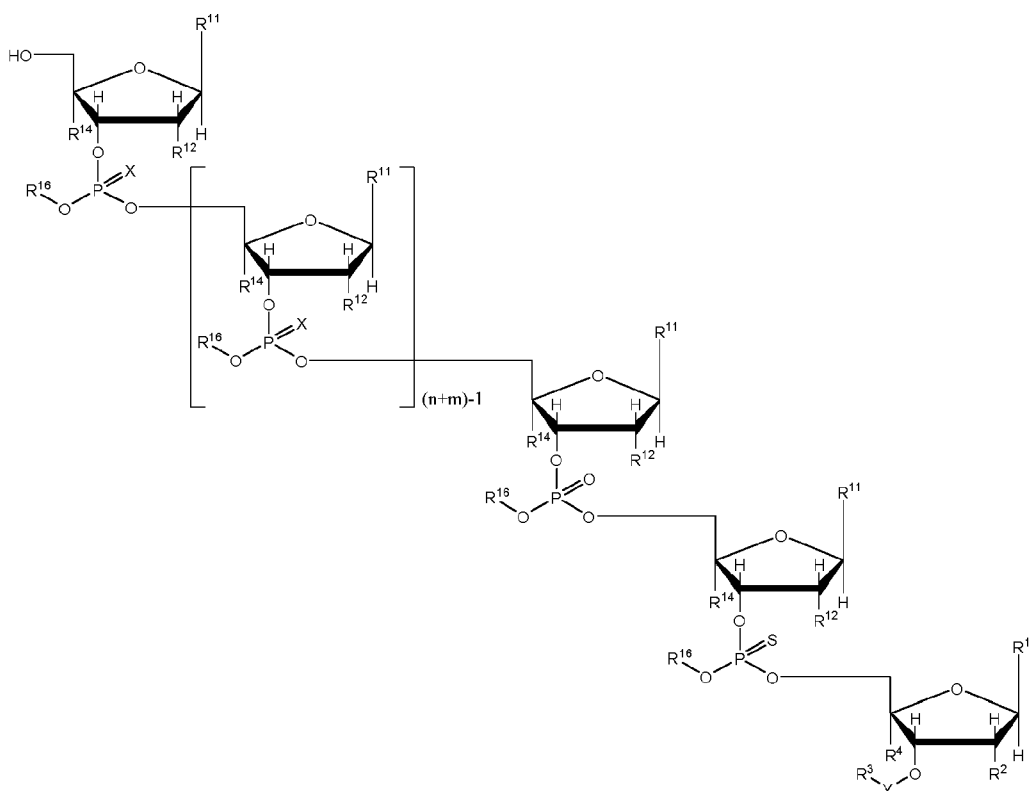
10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Una quinta realización de la invención es un proceso como se describe para la segunda y cuarta realizaciones, en el que comenzando con el compuesto de Fórmula (VI) o el compuesto de Fórmula (IX), las etapas a), b), y c) se repiten n veces y las etapas d), e) y f) se repiten m veces, en donde la repetición de las etapas a), b), y c)

y las etapas d), e) y f) pueden ocurrir en cualquier orden relativo entre sí, en el que n es al menos 1 o más y m es 0, 1, 2, 3 o 4, para formar un oligonucleótido de Fórmula (X) o (XI):



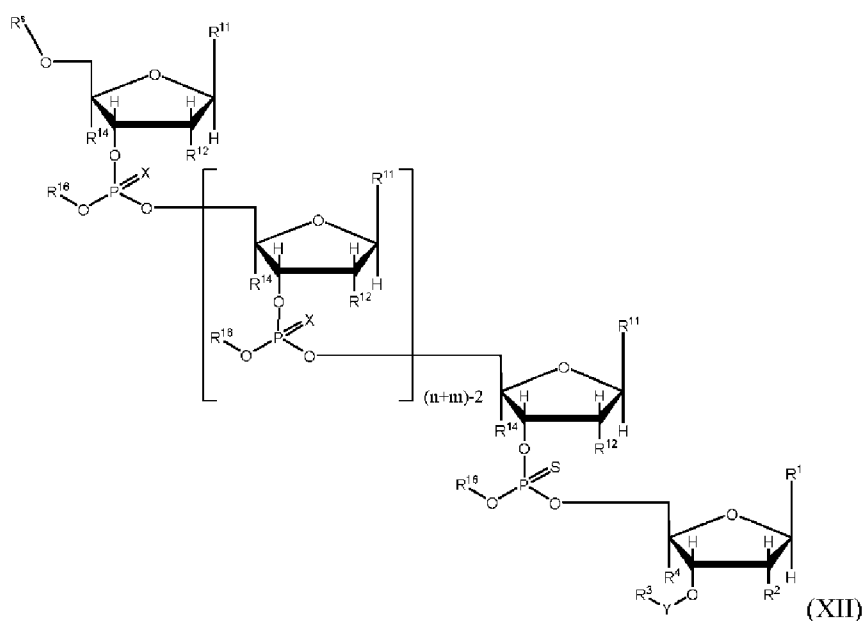
o



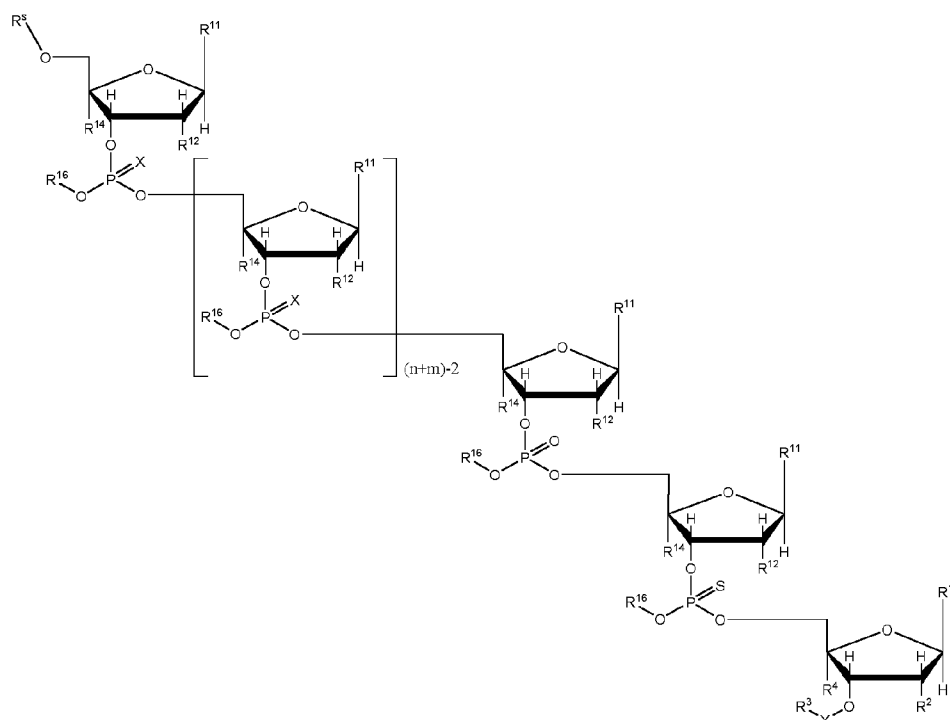
5

(XI) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o forma un oligonucleótido en el que cada repetición de las etapas a, b, y c, o las etapas d, e, y f da como resultado algún compuesto sin reaccionar de Fórmula (VI) y (IX) que reacciona con el exceso de agente de sulfuración o el subproducto del agente de sulfuración después de la etapa de sulfuración para formar un compuesto de Fórmula (XII) o (XIII):





O



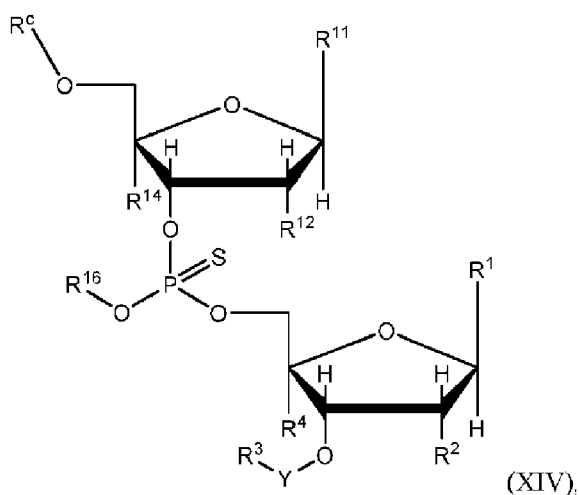
(XIII); en la que cada X se selecciona independientemente de S u O, siempre que X sea O solo 4, 3, 2, 1 o 0 veces en el compuesto de Fórmula (X), (XI), (XII), y (XIII). En particular, n es de 1 a 30, de 5 a 25 o de 10 a 15 y m es 0, 1, 2, 3 o 4.

El proceso descrito anteriormente para la quinta realización implica una adición gradual de nucleótidos para formar el oligonucleótido deseado. Cada una de estas etapas implica tres reacciones para agregar el nucleótido al oligonucleótido en crecimiento. En la primera etapa (correspondiente a las etapas a y d), el extremo 5' de un nucleósido (tal como un compuesto de Fórmula (I)) se acopla al extremo 3' de un nucleótido (tal como un compuesto de Fórmula (II)). Dependiendo de si el ligamiento entre estos dos nucleótidos recién unidos debe ser un fosfotioato (es decir, un enlace P=S, como en, por ejemplo, la Fórmula (IV)) o un fosfodiéster (es decir, un enlace P=O, como en, por ejemplo, la Fórmula (VIII)), el oligonucleótido se sulfura (etapa b) o se oxida (etapa e), respectivamente. Finalmente, se desprotege el siguiente grupo 5'-hidroxilo (etapas c o f, y por ejemplo, Fórmulas (VI) y (IX)) y se repite el proceso para agregar el siguiente nucleósido. Como se describió anteriormente, "algún compuesto sin reaccionar de Fórmula (VI) y (IX)" significa que incluso si se completan

las etapas de acoplamiento a) o d), algún compuesto de Fórmula (VI) y (IX) permanece sin reaccionar y disponible para la reacción de acoplamiento subsiguiente, lo que daría como resultado que a un oligonucleótido le falte un oligonucleótido en relación con el oligonucleótido deseado. Como los oligonucleótidos a los que les falta solo un oligonucleótido ("la impureza N-1") en relación con el oligonucleótido deseado pueden ser difíciles de separar del oligonucleótido deseado, es necesario el recubrimiento del 5-OH hidroxilo sin reaccionar para evitar la formación de la impureza N-1. Por "algunos" se contempla cualquier cantidad, por ejemplo, puede quedar menos del 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o 0.5 %.

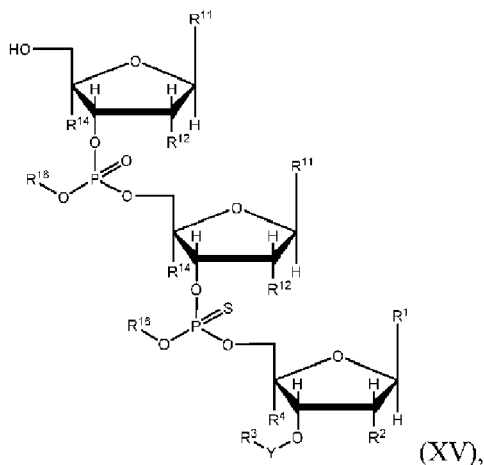
Por lo tanto, este proceso permite la síntesis de un oligonucleótido con cualquier número de enlaces fosfotioato y hasta cuatro fosfodiésteres sin necesidad de ninguna etapa de recubrimiento porque cualquier grupo 5'-hidroxilo sin reaccionar reaccionará con el propio agente de sulfuración o con un subproducto de la reacción del agente de sulfuración con el átomo de fósforo en el ligamiento entre dos nucleósidos. Esto contrasta con la síntesis convencional, donde se realiza una etapa de recubrimiento para bloquear cualquiera de los 5'OH que no hayan reaccionado después de la etapa de acoplamiento.

Una sexta realización de la invención es un proceso como se describe para la tercera realización, que comprende además la etapa de g) hacer reaccionar el compuesto sin reaccionar de Fórmula (VI) con un agente de recubrimiento para formar el compuesto de Fórmula (XIV):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que  $R^c$  es un grupo protector de hidroxilo formado a partir del agente de recubrimiento. Un "agente de recubrimiento" puede ser cualquier agente de recubrimiento conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, anhídrido acético con catalizadores básicos, tales como piridina o N-metilmorfolina.

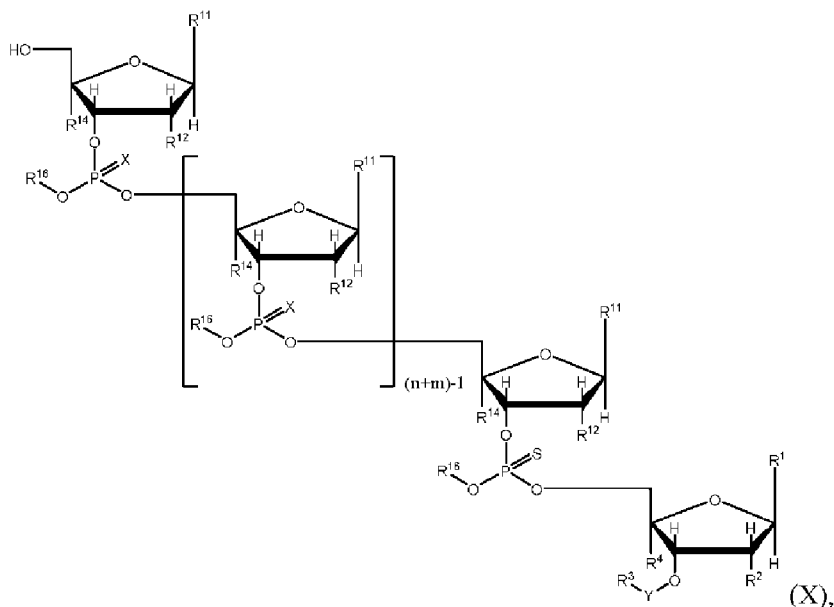
Una séptima realización de la invención es un proceso como se describe para la sexta realización, que comprende además la etapa de h) desproteger el compuesto de Fórmula (VIII) para formar el compuesto de Fórmula (XV):



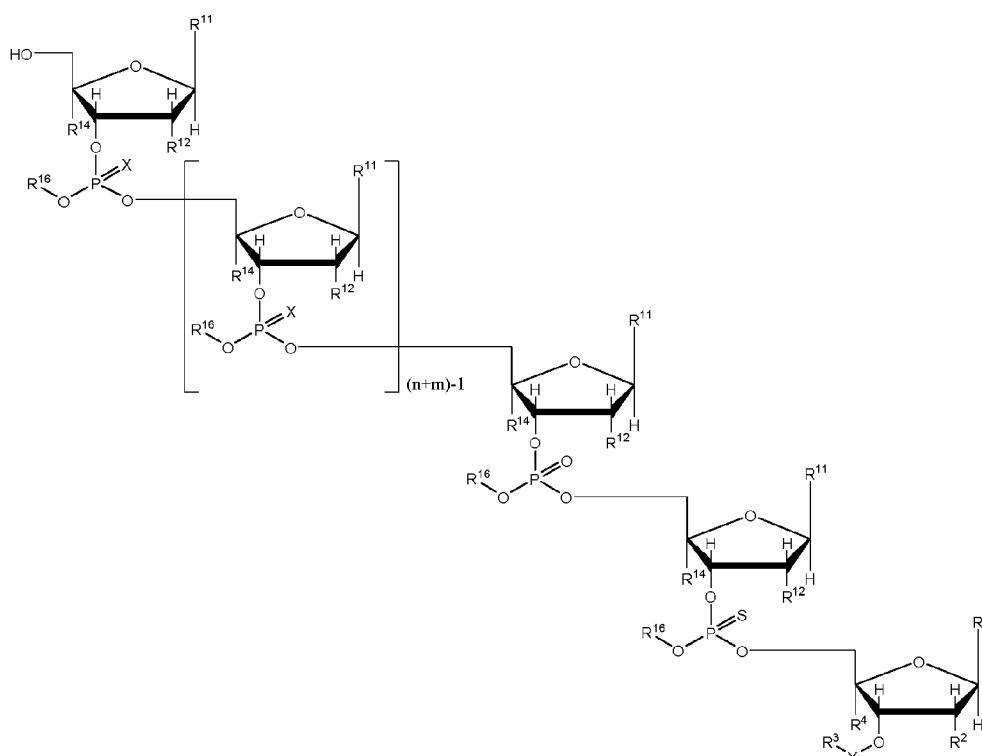
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Una octava realización de la invención es un proceso como se describe para la séptima realización, en el que comenzando con el compuesto de Fórmula (VI) o el compuesto de Fórmula (IX), las etapas a), b), y c) se repiten n veces y las etapas d), e), g) y h) se repiten m veces, en el que la repetición de las etapas a), b), y c) y las etapas d), e), g) y h) pueden ocurrir en cualquier orden relativo entre sí, en el que n es al menos 1 y m es 0 o mayor para formar un oligonucleótido de Fórmula (X) o (XI):

5

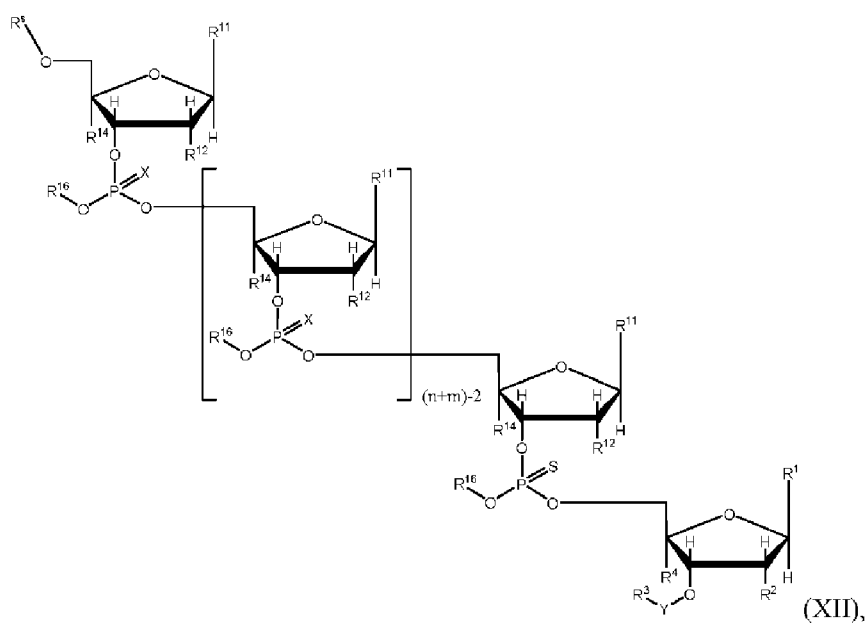


o

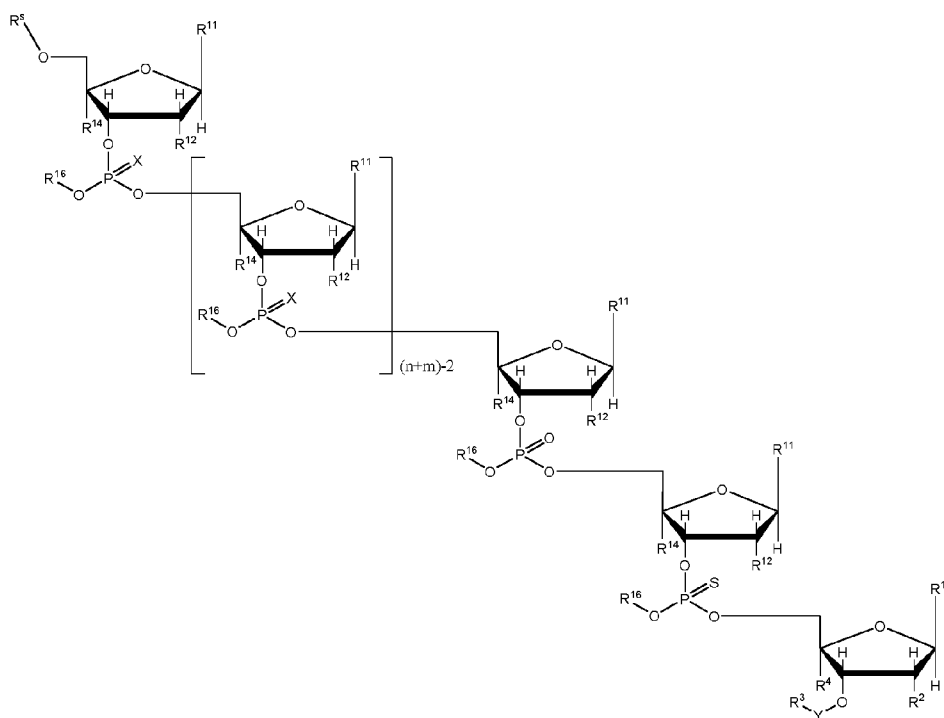


(XI) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o forma un oligonucleótido en el que cada repetición de las etapas a, b, y c, o las etapas d, e, y f da como resultado algún compuesto sin reaccionar de Fórmula (VI) y (IX) que reacciona con el exceso de agente de sulfuración o el subproducto del agente de sulfuración después de la etapa de sulfuración para formar un compuesto de Fórmula XII o XIII:

10



O



(XIII); en la que cada X se selecciona independientemente de S u O. En particular, n es de 1 a 30, de 5 a 25, o de 10 a 15 y m es de 0 a 10, de 0 a 5, o de 5 a 10.

El proceso descrito anteriormente para la octava realización implica una adición gradual de nucleótidos para formar el oligonucleótido deseado. Cada una de estas etapas implica tres reacciones para agregar un nucleótido que contiene un ligamiento fosfotioato al oligonucleótido en crecimiento y cuatro reacciones para agregar un nucleótido que contiene un ligamiento fosfodiéster al oligonucleótido en crecimiento. En la primera etapa (correspondiente a las etapas a y d), el extremo 5' de un nucleósido (tal como un compuesto de Fórmula I) se acopla al extremo 3' de un nucleótido (tal como un compuesto de Fórmula II) para acoplar estos dos nucleótidos (formando compuestos tales como los de Fórmula (III) y (VII)). Dependiendo de si el ligamiento entre estos dos nucleótidos recién unidos debe ser un fosfotioato (es decir, un enlace P=S) o un fosfodiéster (es decir, un enlace P=O), el oligonucleótido se sulfura (etapa b, formando un compuesto tal como los de Fórmula (IV)) o se oxida (etapa e, formando un compuesto tal como los de Fórmula (IV) o (VIII)). A diferencia del proceso descrito anteriormente para la quinta realización, como la octava realización permite un número ilimitado de ligamientos fosfodiéster, se debe completar una etapa de recubrimiento después de cada etapa de oxidación

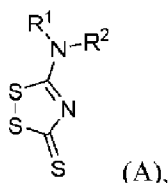
(etapa g). Sin embargo, en cuanto a la quinta realización, no se requiere ninguna etapa de recubrimiento después de la etapa de sulfuración. En cuanto a la quinta realización, se desprotege el siguiente grupo 5'-hidroxi (etapas c o h, y por ejemplo, Fórmulas (VI) y (IX)) y se repite el proceso para agregar el siguiente nucleósido. Por lo tanto, este proceso permite la síntesis de un oligonucleótido con cualquier número de enlaces fosfotioato y enlace fosfodiéster, y requiere una etapa de recubrimiento solo después del ciclo que incluye una etapa de oxidación. Esto contrasta con la síntesis convencional, donde se realiza una etapa de recubrimiento para bloquear cualquiera de los 5'OH sin reaccionar en cada ciclo, incluso aquellos que incluyen una etapa de sulfuración.

En algunos aspectos de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima y octava realizaciones, los compuestos de Fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV), o (XV) no son sales.

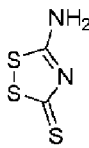
En un aspecto particular de la quinta u octava realización, n es de 2 a 1000. En particular, n es de 2 a 500. En particular, n es de 2 a 50. En particular, n es de 2 a 25.

En una novena realización, el proceso es como se describe para una cualquiera de las primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima y octava realizaciones, o cualquier aspecto de las mismas, en el que se escinde el ligador adherido al soporte sólido.

En una décima realización, el proceso es como se describe para una cualquiera de las primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava y novena realizaciones, o cualquier aspecto de las mismas, el agente de sulfuración es un compuesto de Fórmula A:

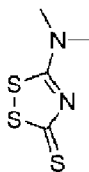


en la que cada uno de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente entre H, un alquilo opcionalmente sustituido y un grupo arilo opcionalmente sustituido. En un aspecto particular de la décima realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son ambos H:



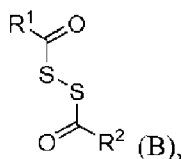
que se conoce como 3-amino-1,2,4-ditiazol-5-tiona (XH o ADTT). En algunos aspectos, R<sup>S</sup> es -C(SH)(=N)-CN.

En un aspecto particular de la décima realización, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son ambos metilo:

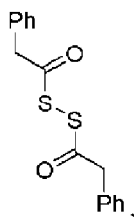


que se conoce como 3-N,N-dimetilamino-metilidenoamino-3H-1,2,4-ditiazol (DDTT). En algunos aspectos, R<sup>S</sup> es -C(=S)NHC(=S)N=CHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

En una undécima realización, el proceso es como se describe para una cualquiera de las primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava y novena realizaciones, o cualquier aspecto de las mismas, el agente de sulfuración es un compuesto de Fórmula B:

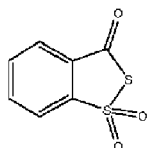


en la que cada uno de  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan independientemente entre H, un alquilo opcionalmente sustituido y un grupo arilo opcionalmente sustituido. En un aspecto particular de la décima realización,  $R^1$  y  $R^2$  son ambos bencilo ( $\text{PhCH}_2$ ):

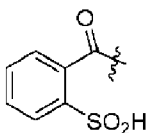


- 5 que se conoce como disulfuro de fenilacetilo (PADS). En un aspecto particular, y  $R^S$  es  $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ .

En una duodécima realización, el proceso es como se describe para una cualquiera de las primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava y novena realizaciones, o cualquier aspecto de las mismas, el agente de sulfuración es 1,1-dióxido de 3H-1,2-benzoditíol-3-ona (reactivo de Beaucage):



- 10 En un aspecto específico de la duodécima realización,  $R^S$  es



- 15 En una decimotercera realización, el proceso es como se describe para una cualquiera de las primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima y duodécima realizaciones, o cualquier aspecto de las mismas, en el que el agente de sulfuración se hace reaccionar al recircular el agente de sulfuración durante 0 a 30 minutos, por ejemplo, 0, 5, 10, 15, 20, 25 o 30 minutos. En una realización, el agente de sulfuración se recircula durante 1 a 30 minutos, 1 a 20 minutos, 1 a 10 minutos o 1 a 5 minutos. En otra realización, el agente de sulfuración se recircula durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 minutos.

- 20 En una decimocuarta realización, el proceso es como se describe para una cualquiera de las primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima y decimotercera realizaciones, o cualquier aspecto de las mismas, en el que el agente de sulfuración se hace reaccionar a 1-20 veces, por ejemplo, 1, 2, 5, 10, 15, 20 veces. En una realización, el agente de sulfuración se recircula de 1-10 veces, o de 1-5 veces.

- 25 En una decimoquinta realización, el proceso es como se describe para una cualquiera de las primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera y decimocuarta realizaciones, o cualquier aspecto de las mismas, el agente de sulfuración se hace reaccionar al recircular de 3 a 6 equivalentes de agente de sulfuración en relación con la cantidad del primer nucleósido adherido al soporte sólido.

- 30 En una decimosexta realización, el proceso es como se describe para una cualquiera de las primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera, decimocuarta y decimoquinta realizaciones, o cualquier aspecto de las mismas, la concentración del reactivo de sulfuración es desde 0.02 M hasta 2.0 M. En algunos aspectos, el agente de sulfuración se disuelve en piridina, 3-picolina, acetonitrilo o una mezcla de los mismos. En un aspecto particular de la decimosexta realización, la concentración del reactivo de sulfuración es desde 0.05 M hasta 0.5 M. En un aspecto particular, el reactivo de sulfuración es 3-(dimetilamino-metilideno)amino-3H-1,2,4-ditiazol (DDTT) agregado a una concentración de 0.02 M a 0.1 M, por ejemplo, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 o 0.1 M disuelto en piridina. En un aspecto particular, el reactivo de sulfuración es 1,1-dióxido de 3H-1,2-benzoditíol-3-ona (reactivo de Beaucage) agregado a una concentración de 0.01 M a 0.2 M, por ejemplo, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.2 M en acetonitrilo (ACN). En un aspecto particular, el reactivo de sulfuración es disulfuro de fenilacetilo (PADS) agregado a una concentración de 0.01 M a 0.2 M, por ejemplo, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.2 M en acetonitrilo (ACN)/3-picolina. En un aspecto particular, el reactivo de sulfuración es 3-amino-1,2,4-ditiazol-5-tiona (XH o ADTT) agregado a una concentración de 0.01 M a 0.2 M,

por ejemplo, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.2 M en piridina.

En ciertas realizaciones, el reactivo de sulfuración descrito anteriormente (por ejemplo, disulfuro de fenilacetilo (PADS) o 3-amino-1,2,4-ditiazol-5-tiona (XH)) se trata con una base (es decir, envejecimiento) antes de su uso en el proceso de la presente invención. La base de ejemplo incluye, pero no se limita a, N-metilimidazol, piridina y 3-picolina. El reactivo de sulfuración se puede envejecer con la base (es decir, tratar con la base) durante 1 minuto a 5 días, por ejemplo, durante 5 minutos a 24 horas, 10 minutos a 12 horas, 30 minutos a 10 horas, 1 hora a 8 horas, 2 horas a 6 horas o 3 horas a 5 horas. En una realización, el reactivo de sulfuración se deja envejecer durante 4 horas. En otra realización, el reactivo de sulfuración PADS se envejece con 3-picolina durante 4 horas antes de que se utilice en el proceso de la presente invención.

En una decimoséptima realización, el proceso es como se describe para una cualquiera de las primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera, decimocuarta, decimoquinta y decimosexta realizaciones, o cualquier aspecto de las mismas, la nucleobase se selecciona del grupo que consiste en citosina, guanina, adenina, timina (o 5-metil uracilo), uracilo, hipoxantina, xantina, 7-metilguanina, 5,6-dihidouracilo, 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina, en el que el grupo  $\text{NH}_2$  de la nucleobase, si está presente, está protegido por  $\text{PhCO-}$ ,  $\text{CH}_3\text{CO-}$ ,  $\text{iPrCO-}$ ,  $\text{Me}_2\text{N-CH=}$ , o  $\text{Me}_2\text{N-CMe=}$ . En una realización particular, la nucleobase se selecciona del grupo que consiste en citosina, guanina, adenina, timina (o 5-metil uracilo), uracilo y 5-metilcitosina, en el que el grupo  $\text{NH}_2$  de la nucleobase, si está presente, está protegido por  $\text{PhCO-}$ ,  $\text{CH}_3\text{CO-}$ ,  $\text{iPrCO-}$ ,  $\text{Me}_2\text{N-CH=}$ , o  $\text{Me}_2\text{N-CMe=}$ .

En una decimooctava realización, el proceso es como se describe para una cualquiera de las primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera, decimocuarta, decimoquinta, decimosexta y decimoséptima realizaciones, o cualquier aspecto de las mismas, cada  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^{12}$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, F y alcoxi  $\text{C}_{1-4}$  opcionalmente sustituido con alcoxi  $\text{C}_{1-4}$ ; cada  $\text{R}^4$  es independientemente H o forma un anillo con el grupo alcoxi de  $\text{R}^2$ , en el que el anillo es un anillo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido con 1 a 3 grupos alquilo  $\text{C}_{1-4}$ ;  $\text{R}^{16}$  es  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ;  $\text{R}^{17a}$  y  $\text{R}^{17b}$  son independientemente alquilo  $\text{C}_{1-4}$ ; y cada  $\text{R}^{14}$  es independientemente H o forma un anillo con el grupo alcoxi de  $\text{R}^{12}$ , en el que el anillo es un anillo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido con 1 a 3 grupos alquilo  $\text{C}_{1-4}$ .

En una decimonovena realización, el proceso es como se describe para una cualquiera de las primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera, decimocuarta, decimoquinta, decimosexta, decimoséptima y decimooctava realizaciones, o cualquier aspecto de las mismas, cada  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^{12}$  se seleccionan independientemente de H o alcoxi  $\text{C}_{1-4}$  opcionalmente sustituido con alcoxi  $\text{C}_{1-4}$ ;  $\text{R}^{15}$  es 4,4'-dimetoxitritilo;  $\text{R}^{16}$  es  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ;  $\text{R}^{17a}$  y  $\text{R}^{17b}$  son independientemente alquilo  $\text{C}_{1-6}$ ; y  $\text{R}^S$  es  $-\text{C(=N)(SH)-CN}$  o  $-\text{C(=O)CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ .

En una vigésima realización, el proceso es como se describe para una cualquiera de las primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera, decimocuarta, decimoquinta, decimosexta, decimoséptima, decimooctava y decimonovena realizaciones, o cualquier aspecto de las mismas, Y es un oligonucleótido que comprende de 2 a 50 nucleótidos, en particular, de 2 a 40 nucleótidos, de 2 a 30 nucleótidos o de 2 a 25 nucleótidos.

En una vigésima primera realización, el proceso es como se describe para una cualquiera de las primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera, decimocuarta, decimoquinta, decimosexta, decimoséptima, decimooctava, decimonovena y vigésima realizaciones, o cualquier aspecto de las mismas, el compuesto de Fórmula (X) o (XI) es un oligonucleótido antisentido que comprende de 2 a 30 nucleótidos. En un aspecto particular, el oligonucleótido antisentido comprende únicamente ARN modificado. Alternativamente, el oligonucleótido antisentido comprende ADN y ARN modificado. En particular, el oligonucleótido antisentido es un gapmer. Alternativamente, el oligonucleótido antisentido comprende únicamente ADN.

En una vigésima segunda realización, el proceso es como se describe para una cualquiera de las primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera, decimocuarta, decimoquinta, decimosexta, decimoséptima, decimooctava, decimonovena, vigésima y vigésima primera realizaciones, o cualquier aspecto de las mismas, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido fosforotioato que tiene una secuencia de (desde 5' hasta 3')

TCACCTTCATAATGCTGG (SEQ ID NO: 1),

en la que cada ligamiento internucleósido del oligonucleótido es un ligamiento fosforotioato, cada nucleósido del oligonucleótido es un nucleósido 2'-O-metoxietilo (MOE) y cada citosina es una 5-metilcitosina. SEQ ID NO: 1 también se conoce como BIIB058 y se describe en los documentos WO2007/002390, WO2010/148249, y US8,980,853.

En una vigésima tercera realización, el proceso es como se describe para una cualquiera de las primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera, decimocuarta, decimoquinta, decimosexta, decimoséptima, decimoctava, decimonovena, vigésima y vigésima primera realizaciones, o cualquier aspecto de las mismas, la secuencia del oligonucleótido antisentido es un gapmer MOE de 5-10-5, que tiene una secuencia de (desde 5' hasta 3')

CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 2),

en la que cada uno de los nucleósidos 1-5 y 16-20 son nucleósidos modificados con 2'-O-metoxietilribosa, y cada uno de los nucleósidos 6-15 son 2'-desoxinucleósidos, en los que los ligamientos internucleósidos entre los nucleósidos 2 a 3, 4 a 5, 16 a 17 y 18 a 19 son enlaces fosfodiéster y los ligamientos internucleósidos entre los nucleósidos 1 a 2, 3 a 4, 5 a 6, 6 a 7, 7 a 8, 8 a 9, 9 a 10, 10 a 11, 11 a 12, 12 a 13, 13 a 14, 14 a 15, 15 a 16, 17 a 18 y 19 a 20 son ligamientos fosforotioato, y en los que cada citosina es una 5'-metilcitosina. SEQ ID NO:2 se describe mediante la siguiente notación química: mCes Aeo Ges Geo Aes Tds Ads mCds Ads Tds mCds Tds Ads mCeo Aes Geo mCes Te; en la que,

A = una adenina,

mC = una 5'-metilcitosina

G = una guanina,

T = una timina,

e = un azúcar modificado con 2'-O-metoxietilribosa,

d = un azúcar 2'-desoxirribosa,

s = un ligamiento internucleósido de fosforotioato, y

o = un ligamiento internucleósido de fosfodiéster.

SEQ ID NO: 2 se conoce como B1IB067 o ISIS 666853 y se describe en el documento WO2015153800.

En una vigésima cuarta realización, el proceso es como se describe para una cualquiera de las primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, undécima, duodécima, decimotercera, decimocuarta, decimoquinta, decimosexta, decimoséptima, decimoctava, decimonovena, vigésima y vigésima primera realizaciones, o cualquier aspecto de las mismas, el oligonucleótido antisentido es un gapmer 4-8-6, que tiene una secuencia de (desde 5' hasta 3'):

GCCCCTAGCGCGCGACUC (SEQ ID NO: 8)

en la que cada uno de los nucleósidos 1-4 y 13-18 son nucleósidos modificados con 2'-O-metoxietilribosa, y cada uno de los nucleósidos 5-12 son 2'-desoxirribonucleótidos, en los que los ligamientos internucleósidos entre los nucleósidos 2 a 3, 3 a 4, 13 a 14, 14 a 15 y 15 a 16 son ligamientos fosfodiéster y los ligamientos internucleósidos entre los nucleósidos 1 a 2, 4 a 5, 5 a 6, 6 a 7, 7 a 8, 8 a 9, 9 a 10, 10 a 11, 11 a 12, 12 a 13, 16 a 17 y 17 a 18 son ligamientos fosforotioato, en los que cada citosina es 5-metilcitosina, y en los que el uracilo es 5-metiluracilo. SEQ ID NO:8 se describe mediante la siguiente notación química:

5' -  $\text{G}^{\text{Me}}\text{C}^{\text{Me}}\text{P}=\text{O}^{\text{Me}}\text{C}^{\text{Me}}\text{P}=\text{O}^{\text{Me}}\text{C}^{\text{Me}}\text{CTAG}^{\text{Me}}\text{C}^{\text{Me}}\text{CG}^{\text{Me}}\text{C}^{\text{Me}}\text{P}=\text{O}^{\text{Me}}\text{G}^{\text{Me}}\text{P}=\text{O}^{\text{Me}}\text{A}^{\text{Me}}\text{P}=\text{O}^{\text{Me}}\text{C}^{\text{Me}}\text{U}^{\text{Me}}\text{C}^{\text{Me}} - 3'$

Subrayado = ribonucleótido MoE

G = guanina

MeC = 5-metilcitosina

T = timina

A = adenina

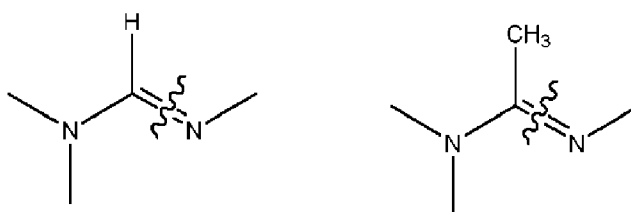
MeU = 5-metiluracilo (también conocido como timina)

P=O = ligamiento internucleósido de fosfodiéster

Cualquier otro ligamiento internucleósido es un ligamiento fosfotioéster.

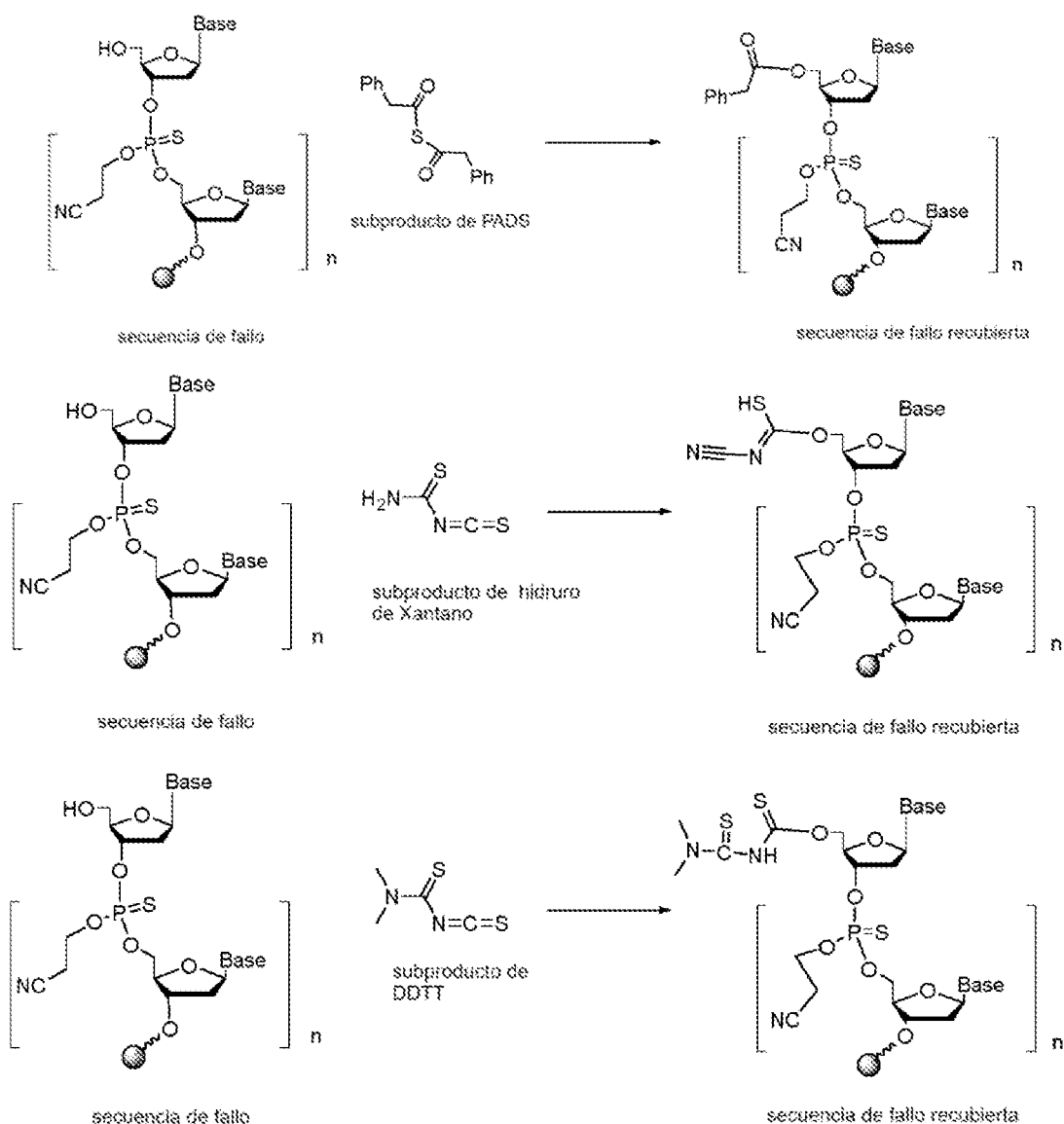
Un "grupo protector de amina" incluye cualquier grupo adecuado para proteger un grupo amina,  $\text{NH}_2$ , por ejemplo, pero no limitado a,  $\text{PhCO}-$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}-$ ,  $\text{iPrCO}-$ , y  $\text{Me}_2\text{N}-\text{CH}=\text{}$ ,  $\text{Me}_2\text{N}-\text{CMe}=\text{}$ . La estructura resultante de un grupo amino protegido por  $\text{Me}_2\text{N}-\text{CH}=\text{}$  y  $\text{Me}_2\text{N}-\text{CMe}=\text{}$  es como sigue:





Se pueden encontrar más grupos protectores de amina en Greene, TW et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Ed., John Wiley and Sons (2007).

- 5 Sin querer limitarse a la teoría, se cree que el 5'-hidroxi que no se acopló durante la etapa de acoplamiento forma un derivado de hidroxilo a partir de la sulfuración con el agente de sulfuración, tal como, por ejemplo, PADS, o un N-cianocarbonimidotioato a partir de hidruro de xantano, o N,N-dimetiltiurea-N-tiocarboxilato de DDTT:



10

Un "grupo protector de hidroxilo" incluye cualquier grupo adecuado para proteger un grupo hidroxilo, OH. Estos grupos protectores y otros ejemplos de grupos protectores de hidrocarburos se pueden encontrar en Greene, TW et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Ed., John Wiley and Sons (2007).

15

En una realización específica, el grupo protector de hidroxilo se forma a partir del agente de recubrimiento (por ejemplo, R<sup>c</sup> en la Fórmula (XIV)), y se puede seleccionar, por ejemplo, de acetilo (Ac); benzoilo (Bz); bencilo (Bn); éter de β-metoxietoximetil (MEM); éter de metoximetilo (MOM); metoxitritilo [(4-metoxifenil)difenilmetilo, MMT]; éter de p-metoxibencilo (PMB); éter de metiltiometilo; pivaloilo (Piv); tetrahidropiraniilo (THP);

tetrahidrofurano (THF); éter de sililo (que incluye, pero no se limita a, éteres de trimetilsililo (TMS), tert-butildimetilsililo (TBDMS), tri-iso-propilsililoximetilo (TOM) y triisopropilsililo (TIPS)); éteres de metilo y éteres de etoxietilo (EE).

- 5 Alternativamente, el grupo protector de hidroxilo bloquea un 5'-hidroxilo de un nucleósido o nucleótido (por ejemplo, R<sup>15</sup> en las Fórmulas (II), (III), (IV), (VII), y (VIII)), y en particular es un grupo protector lábil a los ácidos seleccionado de 4,4'-dimetoxitritilo, [bis-(4-metoxifenil)fenilmetilo] (DMT) o tritilo (trifenilmetilo, Tr).

10 “Nucleobase” significa la porción de base heterocíclica de un nucleósido. Las nucleobases pueden ocurrir de forma natural o se pueden modificar. En ciertas realizaciones, una nucleobase puede comprender cualquier átomo o grupo de átomos capaces de unirse mediante enlaces de hidrógeno a una nucleobase de otro ácido nucleico. En particular, la nucleobase es una base heterocíclica, normalmente purinas y pirimidinas. Además de las nucleobases “no modificadas” o “naturales” tales como las nucleobases de purina adenina (A) y guanina (G), y las nucleobases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U), muchas nucleobases modificadas o miméticas de nucleobases conocidos por los expertos en la técnica son susceptibles de incorporación en los compuestos sintetizados mediante el método descrito en el presente documento. En ciertas realizaciones, una nucleobase modificada es una nucleobase que es bastante similar en estructura a la nucleobase original, tales como por ejemplo una 7-deaza purina, una 5-metil citosina o una abrazadera G. En ciertas realizaciones, los miméticos de nucleobase incluyen estructuras más complicadas, como por ejemplo un mimético de nucleobase de fenoxazina tricíclica. Los métodos para la preparación de las nucleobases modificadas señaladas anteriormente son bien conocidos por los expertos en la técnica.

20 “Nucleósido” significa un compuesto que comprende una fracción de base heterocíclica y una fracción de azúcar.

“Nucleótido” significa un nucleósido que comprende un grupo de ligamiento de fosfato.

25 “Oligonucleótido” se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos ligados. En ciertas realizaciones, se modifica uno o más de la pluralidad de nucleósidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido comprende uno o más ribonucleósidos (ARN) y/o desoxirribonucleósidos (ADN).

“Ligamiento internucleósido” significa un ligamiento covalente entre nucleósidos adyacentes de un oligonucleótido.

30 “Gapmer” significa un compuesto antisentido quimérico en el que una región interna que tiene una pluralidad de nucleósidos que soportan la escisión de la ARNasa H está posicionada entre regiones externas que tienen uno o más nucleósidos, en los que los nucleósidos que comprenden la región interna son químicamente distintos del nucleósido o nucleósidos que comprenden las regiones externas.

35 Como se utiliza en el presente documento, el término “alquilo” se refiere a una fracción de hidrocarburo ramificada o no ramificada completamente saturada. Preferiblemente, el alquilo comprende de 1 a 20 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a 16 átomos de carbono, de 1 a 10 átomos de carbono, desde 1 hasta 6 átomos de carbono o de 1 a 4 átomos de carbono. En algunas realizaciones, un alquilo comprende desde 6 hasta 20 átomos de carbono. Los ejemplos representativos de alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, tert-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo o n-decilo.

40 El término “arilo” se refiere a grupos hidrocarburos aromáticos monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos que tienen desde 6 hasta 14 átomos de carbono en la porción del anillo. En una realización, el término arilo se refiere a grupos hidrocarburos aromáticos monocíclicos y bicíclicos que tienen desde 6 hasta 10 átomos de carbono. Los ejemplos representativos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo, fluorenilo y antracénilo.

45 El término “arilo” también se refiere a un grupo bicíclico o tricíclico en el que al menos un anillo es aromático y está fusionado a uno o dos anillo(s) de hidrocarburos no aromáticos. Los ejemplos no limitativos incluyen tetrahidronaftaleno, dihidronaftaleno e indanilo.

Los sustituyentes opcionales para los grupos alquilo o arilo se seleccionan, en cada ocurrencia, independientemente de alquilo C<sub>1-6</sub>, alquienilo C<sub>2-6</sub>, alquiniilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo de 3 a 7 miembros, heterociclilo de 3 a 7 miembros, halo, -CN, -C(O)R<sup>a</sup>, -C(O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -C(O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, -OR<sup>a</sup>, -N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, -N(R<sup>a</sup>)C(O)R<sup>a</sup>, -N(R<sup>a</sup>)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -N(R<sup>a</sup>)C(O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -N(R<sup>a</sup>)C(O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, -N(R<sup>a</sup>)S(O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SR<sup>a</sup>, -S(O)R<sup>a</sup>, -(SO)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -S(O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, y S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>; y

50 R<sup>a</sup> en cada ocurrencia se selecciona independientemente de H, alquilo C<sub>1-6</sub>, carbociclilo monocíclico de 3 a 6 miembros y heterociclilo monocíclico de 3 a 6 miembros.

55 Como se utiliza en el presente documento, el término “carbociclilo” se refiere a grupos hidrocarburos monocíclicos o bicíclicos saturados o insaturados de 3-7 átomos de carbono, 3-6 o 5-7 átomos de carbono. El término “carbociclilo” abarca grupos cicloalquilo y grupos aromáticos. El término “cicloalquilo” se refiere a grupos de hidrocarburos monocíclicos o bicíclicos completamente saturados de 3-7 átomos de carbono, 3-6

átomos de carbono o 5-7 átomos de carbono. Los grupos carbociclilo monocíclicos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo, ciclobutadienilo, ciclopentadienilo, ciclohexadienilo, cicloheptadienilo, fenilo y cicloheptatrienilo. Los grupos carbociclilo bicíclicos de ejemplo incluyen

biciclo[2.1.1]hexilo, biciclo[2.2.1]heptilo, biciclo[2.2.1]heptenilo, triciclo[2.2.1.0<sup>2,6</sup>]heptanilo, 6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]heptilo o 2,6,6-trimetilbiciclo[3.1.1]heptilo, espiro[2.2]pentanilo y espiro[3.3]heptanilo.

El término "sistema de anillo puenteado", como se utiliza en el presente documento, es un sistema de anillo que tiene un anillo carbociclilo o heterociclilo en el que dos átomos no adyacentes del anillo están conectados (puenteados) por uno o más (preferiblemente de uno a tres) átomos seleccionados entre C, N, O o S. Un sistema de anillo puenteado puede tener desde 6-7 miembros de anillo.

El término "sistema de anillo espiro", como se utiliza en el presente documento, es un sistema de anillo que tiene dos anillos, cada uno de los cuales se selecciona independientemente de un carbociclilo o un heterociclilo, en el que las dos estructuras de anillo tienen un átomo de anillo en común. Los sistemas de anillo espiro tienen desde 5 hasta 7 miembros de anillo.

Como se utiliza en el presente documento, el término "heterociclilo" se refiere a un sistema de anillo saturado o insaturado, monocíclico o bicíclico (por ejemplo, sistemas de anillos puenteados o espiro) que tiene desde 3 hasta 7 miembros de anillo, o en particular de 3 a 6 miembros de anillo o de 5 a 7 miembros de anillo, al menos uno de los cuales es un heteroátomo, y hasta 4 (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de los cuales pueden ser heteroátomos, en los que los heteroátomos se seleccionan independientemente de O, S y N, y en el que C se puede oxidar (por ejemplo, C(O)), N se puede oxidar (por ejemplo, N(O)) o cuaternizar, y S se puede oxidar opcionalmente a sulfóxido y sulfona. Los anillos heterocíclicos insaturados incluyen anillos heteroarilo. Como se utiliza en el presente documento, el término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo monocíclico aromático de 5 o 6 miembros, que tiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente de O, S y N, y en el que N se puede oxidar (por ejemplo, N(O)) o cuaternizar, y S se puede oxidar opcionalmente a sulfóxido y sulfona. En una realización, un heterociclilo es un anillo monocíclico saturado de 3 a 7 miembros o un anillo monocíclico saturado de 3 a 6 miembros o un anillo monocíclico saturado de 5 a 7 miembros. En una realización, un heterociclilo es un anillo monocíclico de 3 a 7 miembros o un anillo monocíclico de 3 a 6 miembros o un anillo monocíclico de 5 a 7 miembros. En otra realización, un heterociclilo es un anillo bicíclico de 6 o 7 miembros. El grupo heterociclilo se puede adherir a un heteroátomo o a un átomo de carbono. Los ejemplos de heterociclilos incluyen aziridinilo, oxiranilo, tiiranilo, oxaziridinilo, dioxiranilo, azetidínilo, oxetanilo, tietanilo, pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, tiolanilo, imidazolidínilo, pirazolidínilo, oxazolidínilo, isoxazolidínilo, tiazolidínilo, isotiazolidínilo, dioxolanilo, ditiolanilo, oxatiolanilo, piperidinilo, tetrahidropiranilo, tianilo, piperazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, dioxanilo, ditianilo, trioxanilo, trítianilo, azepanilo, oxepanilo, tiepanilo, dihidrofuranilo, imidazolinilo, dihidropiranilo y anillos heteroarilo que incluyen azirínilo, oxirenilo, tiirenilo, diazirínilo, azetilo, oxetilo, tietilo, pirrolilo, furanilo, tiofenilo (o tienilo), imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, furazanilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, ditiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, piridinilo, piranilo, tiopiranilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, oxazinilo, tiazinilo, dioxinilo, ditiinilo, oxatianilo, triazinilo, tetrazinilo, azepínilo, oxepínilo, tiepínilo, diazepínilo y tiazepínilo y similares. Los ejemplos de sistemas de anillos heterocíclicos bicíclicos incluyen 3-azabíciclo[3.1.0]hexanilo, 3-azabíciclo[3.1.1]heptanilo, 2-azaspiro[3.3]heptanilo, 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanilo y 5-azaspiro[2.3]hexanilo.

"Halógeno" o "halo" puede ser flúor, cloro, bromo o yodo.

## Ejemplificación

### Ejemplo 1 Síntesis de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos se sintetizaron en una escala de 0.72-2.2 mmol utilizando un sintetizador de fase sólida AKTA 100 con Nittophase HL Unylinker (Kinovate, carga 350 µmol/g) como soporte sólido. El ciclo de síntesis para adherir cada nucleósido consiste en tres etapas de reacción: destritolación, acoplamiento y sulfuración. La etapa de destritolación se realizó con ácido dicloroacético en tolueno (10 %) como reactivo. La etapa de acoplamiento se llevó a cabo al hacer circular una solución de la fosforamidita correspondiente (0.1-0.2 M en acetonitrilo) y 4,5-dicianoimidazol (1.0 M en acetonitrilo que contenía N-metilimidazol 0.1 M) a través del soporte sólido. La etapa de sulfuración se completó al hacer circular cualquiera de las siguientes soluciones: (a) PADS 0.2 M en acetonitrilo/3-picolina (1:1, v/v); (b) 3-amino-1,2,4-ditiazol-5-tiona (XH) 0.2 M en piridina; (c) 1,1-dióxido de 3H-1,2-benzoditiol-3-ona 0.2 M (reactivo de Beaucage) en acetonitrilo; o (d) 3-((dimetilamino-metilideno)amino)-3H-1,2,4-ditiazol-3-tiona 0.1 M (DDTT) en piridina. Para los experimentos de control, la síntesis consiste en cuatro etapas de reacción: destritolación, acoplamiento y sulfuración, y etapa de recubrimiento. Todas las etapas se llevan a cabo de la misma manera que el anterior, excepto que hay una etapa de recubrimiento después de la etapa de sulfuración. El recubrimiento se realizó con una mezcla de anhídrido acético, piridina y N-metilimidazol en acetonitrilo. La escisión de los oligonucleótidos del soporte y la desprotección de la base se realizaron en hidróxido de amonio concentrado a temperatura elevada (50 a 60 °C). Los parámetros de la reacción de síntesis se resumen en la Tabla 1 a continuación. Los productos oligonucleótidos se analizaron mediante LC-MS.

# ES 2 999 138 T3

Tabla 1- Protocolo de proceso

Etapa del proceso	Variable	Ciclo de 3 reacciones	Ciclo de 4 reacciones		Unidades
Soporte de síntesis	Soporte	Nittophase Unylinker HL	Nittophase Unylinker HL		μmol/g
	Carga	350	350		μmol/g
Destritilación	Reactivo	DCA al 10 %	DCA al 10 %		
	Volumen de desbloqueo	3	3		CV*
	Tiempo de reacción	3-6	3-6		Min
Acoplamiento	Eq de amidita	1.5	1.5		eq**
	Concen. de Amidita	0.2	0.2		M
	Relación activador:amidit a	5:1	5:1		
	Activador	DCI [1.0 M] y NMI [0.1 M]	DCI [1.0 M] y NMI [0.1 M]		
	Caudal de reciclaje	240	240		cm/h
	Tiempo de reciclaje	3.2	3.2		min
Sulfuración	Reactivo	PADS 0.2 M en ACN/3-picolina (1:1, v/v) o XH 0.2 M en piridina o reactivo de Beaucage 0.2 M en ACN o DDTT 0.1 M en piridina	PADS 0.2 M en ACN/3-picolina (1:1, v/v)	XH 0.2 M en piridina	
	Volumen de carga	1.1	1.2	1.1	CV
	Tiempo de reacción	Modo reciclaje	Modo de flujo continuo	Modo de reciclaje o flujo continuo	min
		5	3.3	5	
Oxidación	Reactivo	Yodo 0.5 M en agua/piridina	Yodo 0.5 de en agua/piridina		
	Volumen de carga	2.0	2.0		CV
	Tiempo de contacto	5	5	min	
Recubrimiento	Reactivo	NINGUNO	Rec. A, 2:3:5 [NMI/piridina/AC N] Rec. B 1:4 [Ac <sub>2</sub> O/ACN]		
	Volumen de carga de recubrimiento		0.3	CV	

	Tiempo de reacción		3-8	min
Desprotección del fósforo	Reactivo	TEA al 50 %	TEA al 50 %	
	Volumen de carga	1.6	1.6	CV
	Tiempo de reacción	90	90	min
* CV: volumen de columna				
** eq.: equivalente				

Oligonucleótidos preparados por proceso:

1. BIIB 058 (SEQ ID NO: 1), un oligonucleótido fosforotioato de 18 meros, en el que cada riboligonucleótido incluye metoxi-etilo (MoE) en la posición 2'.
- 5 2. BIIB 067 (SEQ ID NO: 2), un oligonucleótido con estructura principal mixta de fosfotioéster y fosfodiéster gapmer 5-10-5. El bloque central de un gapmer es de 10 desoxirribonucleótidos, que está flanqueado por bloques de ribonucleótidos 2'-MoE.
3. Oligonucleótidos de fosforotioato A, B, C, D y E como se muestra en la Tabla 2, a continuación.
- 10 4. BIIB 078 (SEQ ID NO: 8), un oligonucleótido con estructura principal mixta de fosfotioéster y fosfodiéster gapmer 4-8-6. El bloque central de un gapmer es de 8 desoxirribonucleótidos, que está flanqueado por bloques de ribonucleótidos 2'-MoE.



(SEQ ID NO: 8)

subrayado: ribonucleótido MoE

- 15 P=O: fosfodiéster

cualquier otro: fosfotioéster

Tabla 2. Oligonucleótidos de fosforotioato A, B, C, D, y E

Código	Tipo de secuencia	Secuencia de oligonucleótidos de fosforotioato
A	Secuencia de ADN completa	$\text{MeCGA}^{\text{Me}}\text{CT}$ ATA $\text{MeCG}^{\text{Me}}\text{CG}^{\text{Me}}\text{CAA}$ TATGG (SEQ ID NO: 3)
B	Gapmer 5-10-5 El bloque central de un gapmer es de 10 desoxirribonucleótidos, que está flanqueado por bloques de ribonucleótidos 2'-OMe.	$\text{MeCGA}^{\text{Me}}\text{CU}$ ATA $\text{MeCG}^{\text{Me}}\text{CG}^{\text{Me}}\text{CAA}$ UAUGG (SEQ ID NO: 4)
C	Gapmer 5-10-5 El bloque central de un gapmer es 10 desoxirribonucleótidos, que está flanqueado por bloques de ribonucleótidos 2'-MoE.	$\text{MeCGA}^{\text{Me}}\text{CT}$ ATA $\text{MeCG}^{\text{Me}}\text{CG}^{\text{Me}}\text{CAA}$ TATGG (SEQ ID NO: 5)
D	Gapmer 5-10-5 El bloque central de un gapmer es 10 desoxirribonucleótidos, que está flanqueado por bloques de ribonucleótidos cEt.	$\text{MeCGA}^{\text{Me}}\text{CU}$ ATA $\text{MeCG}^{\text{Me}}\text{CG}^{\text{Me}}\text{CAA}$ UAUGG (SEQ ID NO: 6)
E	Gapmer 5-10-5 El bloque central de un gapmer es de 10 desoxirribonucleótidos, que está flanqueado por bloques de 2'-fluororribonucleótidos.	CGACU ATA $\text{MeCG}^{\text{Me}}\text{CG}^{\text{Me}}\text{CAA}$ UAUGG (SEQ ID NO: 7)

Resultados

## 1. BIIB058

BIIB058 se preparó utilizando el proceso de la invención (es decir, el ciclo de 3 reacciones) y se comparó con el proceso convencional de 4 reacciones por ciclo. Se utilizaron PADS e Hidruro de Xantano como agente de sulfuración. La reacción de sulfuración se llevó a cabo en modo de recirculación durante 5 min. Los resultados de cada proceso se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación de pureza y rendimiento del crudo BIIB058

	PADS		Hidruro de xantano
	Ciclo de 4 reacciones	Ciclo de 3 reacciones	Ciclo de 3 reacciones
Rendimiento total de oligo (%)	84.06	86.56	86.31
Rendimiento de oligo DMT (%)	70.81	77.12	76.89
Pureza total (%)	83.08	89.19	89.09
Pureza de MS (%)	91.97	93.29	93.67
Pureza UV (%)	91.59	95.50	95.02

Al comparar el ciclo de 4 reacciones con el ciclo de 3 reacciones con PADS como agente de sulfuración, el rendimiento y la pureza de BIIB058 aumentaron en el ciclo de 3 reacciones y no se generaron nuevas impurezas. El hidruro de xantano en el ciclo de 3 reacciones funcionó de manera similar al PADS. En la Fig. 3 se ofrece una comparación de los cromatogramas de espectrometría de masas.

## 2. BIIB067

BIIB067 se preparó utilizando el proceso de la invención (es decir, el ciclo de 3 reacciones) y se comparó con el proceso convencional de 4 reacciones por ciclo, con PADS utilizado como agente de sulfuración. La reacción de sulfuración se llevó a cabo en modo de recirculación durante 5 minutos. A diferencia de BIIB0058, BIIB067 incluye enlaces P=O y P=S. Por lo tanto, se realizaron tres reacciones diferentes: 1) el ciclo de 4 reacciones, 2) el ciclo de 3 reacciones y 3) el ciclo de 3 reacciones con una etapa de recubrimiento agregado sólo después de la etapa de oxidación. Por lo tanto, se incluiría una etapa de oxidación en lugar de una etapa de sulfuración para ese nucleótido, no se realizó ninguna etapa de recubrimiento después de la etapa de oxidación. Los resultados de cada proceso se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4 Comparación de rendimiento y pureza del crudo BIIB 067

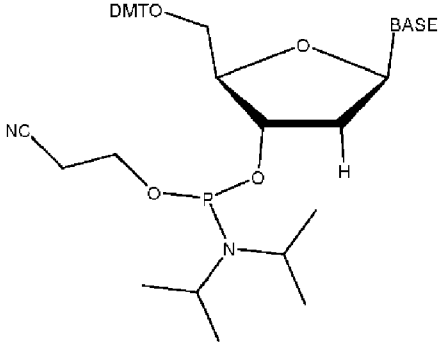
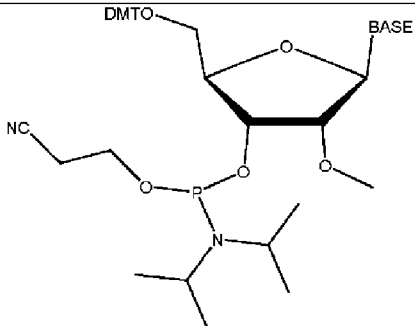
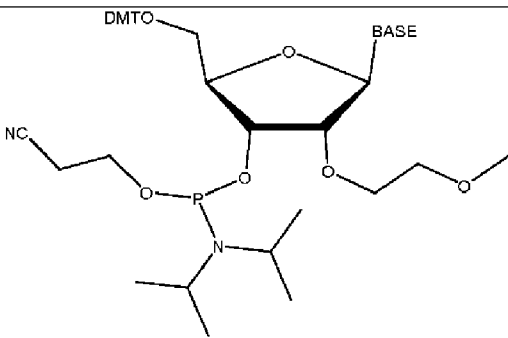
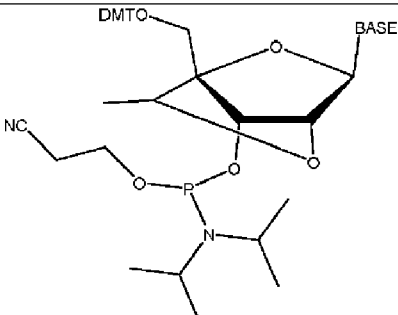
	Ciclo de 4 reacciones	Ciclo de 3 reacciones	
		Sin reacción de recubrimiento después de oxidación	Con reacción de recubrimiento después de oxidación
Rendimiento total de oligonucleótidos (%)	86.60	95.5	101.28
Oligonucleótido DMT-ON (%)	66.70	76.5	80.74
Pureza en masa (%)	89.00	90.70	87.84
Pureza UV (%)	86.50	88.30	90.75
Pureza total (%)	76.99	80.09	79.71

Al comparar el ciclo de 4 reacciones con el ciclo de 3 reacciones sin reacción de recubrimiento después de la oxidación, el rendimiento y la pureza de BIIB067 aumentaron y no se generaron nuevas impurezas. La inclusión de la etapa de recubrimiento después de la reacción de oxidación por sí sola no mejoró la pureza general de BIIB067 preparado mediante el ciclo de 3 reacciones. Por lo tanto, el ciclo de 3 reacciones sin recubrimiento se puede utilizar incluso con oligonucleótidos que incluyen enlaces P=O.

## 3. Oligonucleótidos A, B, C, D, y E

Los oligonucleótidos A, B, C, D, y E se prepararon utilizando el proceso de la invención y se compararon con el proceso convencional de 4 reacciones por ciclo. En la Tabla 5 se proporcionan las amiditas utilizadas para la síntesis. Los agentes de sulfuración utilizados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 5. Amiditas para la síntesis

5'ODMT-desoxi-fosforamidita		H
5'ODMT-2'OMe-fosforamidita		OMe
5'ODMT-2'MoE-fosforamidita		MoE
5'ODMT-cEt-fosforamidita		cEt

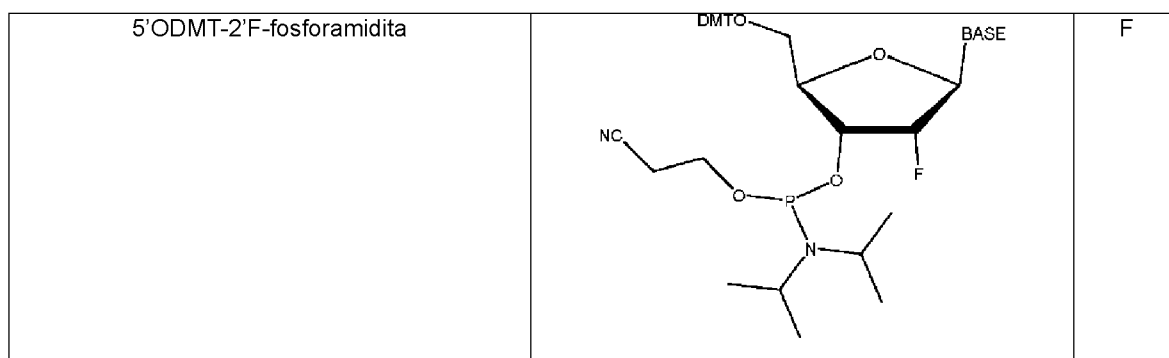


Tabla 6. Reactivos de sulfuración utilizados para la síntesis de los oligonucleótidos correspondientes

Oligonucleótidos	Reactivo de sulfuración	
A	XH	PADS
B	XH	PADS
C	XH	PADS
D	XH	PADS
E	XH	PADS

5 Como se muestra en la Tabla 7, el rendimiento, la pureza UV y el perfil de impurezas MS del oligonucleótido crudo del proceso de la invención son similares al oligonucleótido crudo preparado mediante el proceso convencional de 4 ciclos de reacciones.

Tabla 7. Rendimiento óptico (OD) y pureza por HPLC RPIP de productos DMT-on

Reactivo de sulfuración	Oligonucleótido	Ciclo de 4 reacciones	Ciclo de 3 reacciones	Conclusión
Hidruro de xantano	A	142.1 OD/ $\mu$ mol UV: 73.61 %	146.8 OD/ $\mu$ mol UV: 78.65 %	1. El rendimiento y la pureza UV del crudo del proceso de 3 ciclos de reacciones son similares al crudo del proceso de 4 ciclos de reacciones.  2. El perfil de impurezas de MS del proceso de ciclo de 3 reacciones es compatible con el crudo del proceso de ciclo de 4 reacciones.
	B	149.8 OD/ $\mu$ mol UV: 78.20 %	155.7 OD/ $\mu$ mol UV: 79.71 %	Lo mismo que arriba
	C	150.4 OD/ $\mu$ mol UV: 80.56 %	154.3 OD/ $\mu$ mol UV: 82.36 %	Lo mismo que arriba
	D	126.3 OD/ $\mu$ mol UV: 71.15 %	129.4 OD/ $\mu$ mol UV: 73.31 %	Lo mismo que arriba
	E	133.1 OD/ $\mu$ mol UV: 71.34 %	137.8 OD/ $\mu$ mol UV: 73.10 %	Lo mismo que arriba
PADS	A	146.7 OD/ $\mu$ mol UV: 83.32 %	154.9 OD/ $\mu$ mol UV: 77.66 %	Lo mismo que arriba



	B	150.1 OD/ $\mu$ mol UV: 81.33 %	154.3 OD/ $\mu$ mol UV: 79.17 %	Lo mismo que arriba
	C	158.8 OD/ $\mu$ mol UV: 79.27 %	159.2 OD/ $\mu$ mol UV: 78.80 %	Lo mismo que arriba
	D	107.5 OD/ $\mu$ mol UV: 72.29 %	129.3 OD/ $\mu$ mol UV: 71.13 %	1. El rendimiento y la pureza UV del crudo del proceso de 3 ciclos de reacciones son similares al crudo del proceso de 4 ciclos de reacciones.  2. El perfil de impurezas de MS del proceso de 3 ciclos de reacciones es compatible con el crudo del proceso de 4 ciclos de reacciones. La impureza N-1 para el proceso de 3 ciclos de reacciones es mayor que la del crudo del proceso de 4 ciclos de reacciones.
	E	141.0 OD/ $\mu$ mol UV: 73.90 %	140.9 OD/ $\mu$ mol UV: 75.77 %	1. El rendimiento y la pureza UV del crudo del proceso de 3 ciclos de reacciones son similares al crudo del proceso de 4 ciclos de reacciones.  2. El perfil de impurezas de MS del proceso de ciclo de 3 reacciones es compatible con el crudo del proceso de ciclo de 4 reacciones.
Reactivo de Beaucage	A	167.4 OD/ $\mu$ mol UV: 79.70 %	166.1 OD/ $\mu$ mol UV: 78.39 %	Lo mismo que arriba

## 4. BIIB 078

BIIB078 se preparó utilizando el proceso de la invención (es decir, el ciclo de 3 reacciones) y se comparó con el proceso convencional de 4 reacciones por ciclo. Se utilizó PADS como agente de sulfuración. La reacción de sulfuración se fue en modo de recirculación durante 3 min. Los resultados de cada proceso se muestran en la Tabla 8 y las FIGS. 4-7.

Tabla 8. Comparación de pureza y rendimiento del crudo BIIB 078

	PADS	
	Proceso del ciclo de 4 reacciones	Proceso de ciclo de 3 reacciones
Rendimiento de oligo DMT (%)	63.5	71.7
Pureza total (%)	81.29	83.46
Pureza de MS (%)	86.80	87.82
Pureza UV (%)	93.65	95.04

Al comparar el ciclo de 4 reacciones con el ciclo de 3 reacciones con PADS como agente de sulfuración, el rendimiento y la pureza de BIIB078 aumentaron en el ciclo de 3 reacciones y no se generaron nuevas impurezas. En las FIGS. 4-7 se proporcionan comparaciones de cromatogramas de HPLC y cromatogramas de espectrometría de masas.

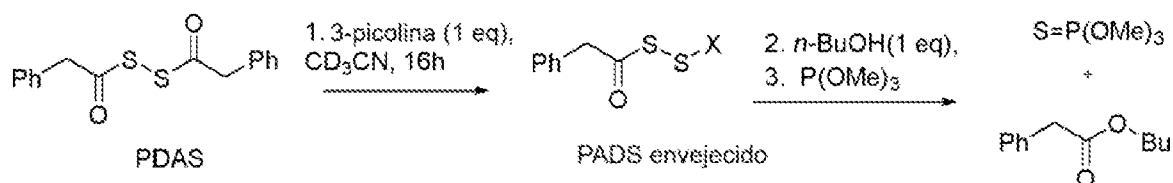
**Ejemplo 2. Estudio de RMN de los roles duales de PADS para la sulfuración y el recubrimiento**

En el primer experimento de RMN, el PADS se envejeció en 3-picolina en acetonitrilo- $d_3$  a 22 °C durante 16 h (Esquema 1). Después del envejecimiento, se agregó n-BuOH a la solución y se tomaron espectros de RMN en diferentes puntos de tiempo. Los espectros mostraron que la formación de  $\text{PHCH}_2\text{CO}_2\text{Bu}$  era muy lento.

En un experimento separado siguiendo el mismo procedimiento que el anterior, después de agregar BuOH, a la mezcla de reacción se agregó  $P(OMe)_3$  y se registraron los espectros de RMN de la mezcla de reacción en diferentes puntos de tiempo.  $P(OMe)_3$  tiene una estructura similar a la de los intermedios de fosfito en la síntesis en fase sólida. Los espectros mostraron que en aproximadamente 2 min se completó la sulfuración de  $P(OMe)_3$  y se produjo la esterificación (recubrimiento) de BuOH (FIG. 8).

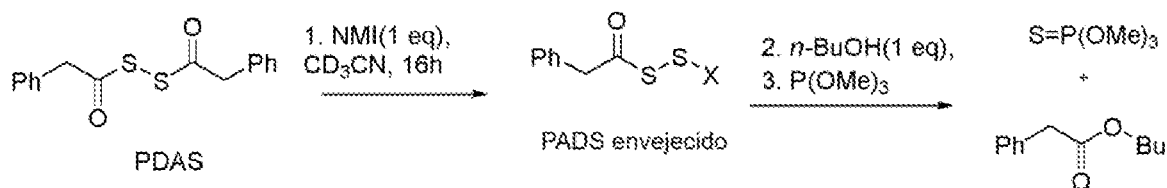
Estos resultados experimentales demostraron que durante la sulfuración se generó un reactivo de recubrimiento activo que recubrió el alcohol presente.

Esquema 1.



- 10 Se repitieron los mismos experimentos con N-metil imidazol como base para envejecer los PADS y se obtuvieron resultados similares (Esquema 2). Sin agregar  $P(OMe)_3$ , la reacción de esterificación fue muy lenta, pero la esterificación de BuOH ocurrió inmediatamente después de la reacción de sulfuración. Estos resultados mostraron nuevamente que la sulfuración y el recubrimiento ocurrieron una vez que ocurrió la sulfuración (FIG. 9).

- 15 Esquema 2. Envejecimiento de PADS en NMI

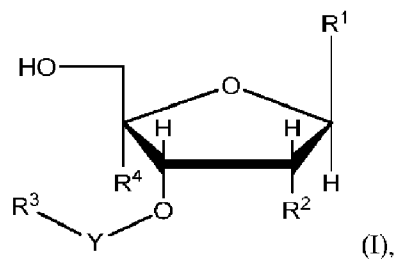


NMI: N-metil imidazol

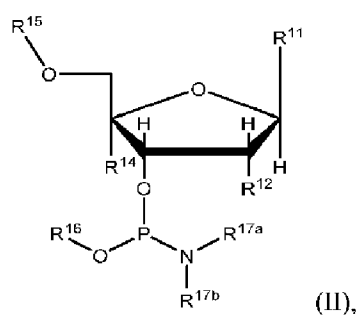
REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar un oligonucleótido que comprende

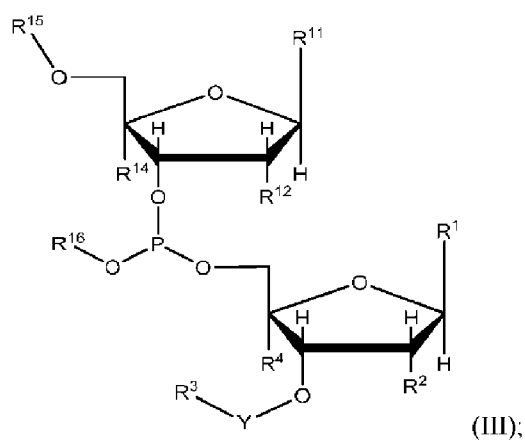
a) hacer reaccionar el compuesto de Fórmula (I):



5 con el compuesto de Fórmula (II):

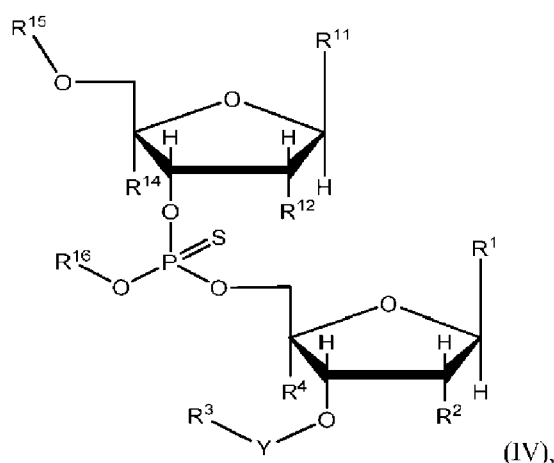


para formar un compuesto de Fórmula (III):

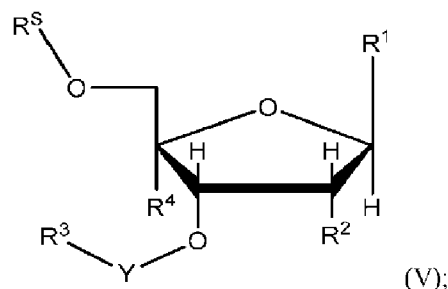


y

10 b) sulfurar el compuesto de Fórmula (III) con un agente de sulfuración para formar un compuesto de Fórmula (IV):



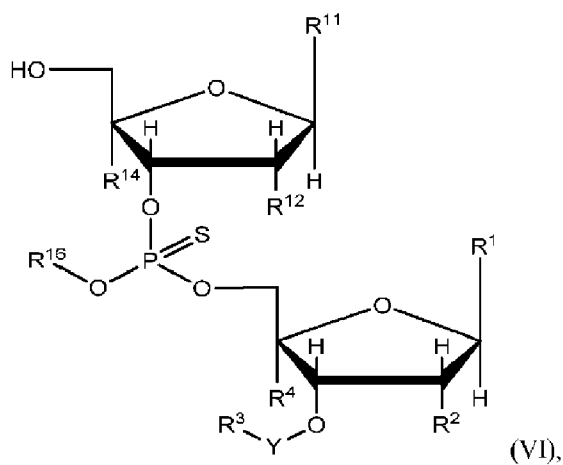
y a partir del compuesto sin reaccionar de Fórmula (I) se forma un compuesto de Fórmula (V):



en el que

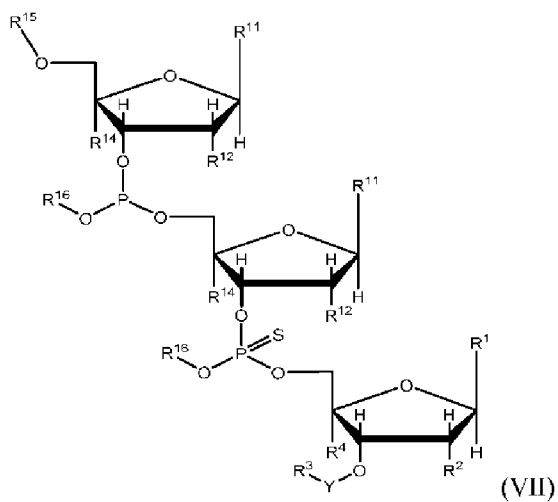
- 5 Cada R<sup>1</sup> y R<sup>11</sup> son independientemente una nucleobase, en el que el NH<sub>2</sub> de la nucleobase, si está presente, está protegido por un grupo protector de amina;  
Cada R<sup>2</sup> y R<sup>12</sup> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, halo y alcoxi C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con alcoxi C<sub>1-6</sub>;
- R<sup>3</sup> es un soporte sólido, que comprende opcionalmente un ligador;
- 10 Y es un oligonucleótido que comprende 2 o más nucleótidos;  
Cada R<sup>4</sup> es independientemente H o forma un anillo con el grupo alcoxi de R<sup>2</sup>;
- Cada R<sup>14</sup> es independientemente H o forma un anillo con el grupo alcoxi de R<sup>12</sup>;
- R<sup>15</sup> es un grupo protector de hidroxilo;
- R<sup>16</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con -CN;
- 15 R<sup>17a</sup> y R<sup>17b</sup> son independientemente alquilo C<sub>1-6</sub>;
- RS es un grupo protector de hidroxilo formado a partir de un subproducto del agente de sulfuración;
- en el que el agente de sulfuración se recircula de 1-20 veces en la etapa b) para convertir el compuesto sin reaccionar de Fórmula (I) en el compuesto de Fórmula (V) y para convertir el compuesto de Fórmula (III) a Fórmula (IV);
- 20 en el que el agente de sulfuración se agrega en una cantidad de 3 a 6 equivalentes con respecto a la cantidad del ligador o del primer nucleótido si el primer nucleótido está adherido directamente al soporte sólido para convertir el compuesto sin reaccionar de Fórmula (I) a Fórmula (V) y para convertir el compuesto de Fórmula (III) a Fórmula (IV);
- en el que no se agrega ningún otro reactivo para cubrir el compuesto sin reaccionar de Fórmula (I); y
- 25 en el que los compuestos de Fórmulas (I), (II), (III), (IV), y (V) están opcionalmente en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

2. El proceso de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de c) desproteger el compuesto de Fórmula (IV) para formar el compuesto de Fórmula (VI):



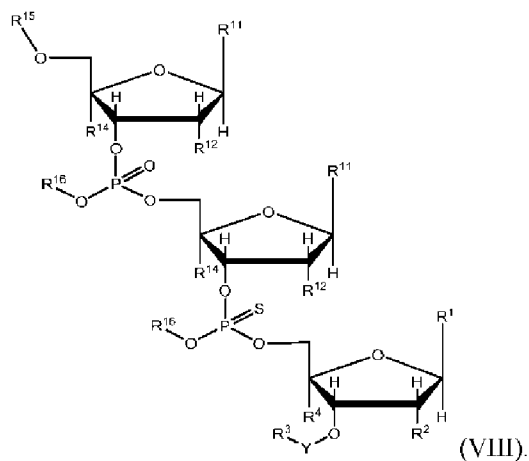
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 3. El proceso de la reivindicación 2, que comprende además la etapa de d) hacer reaccionar el compuesto de Fórmula (VI) con un compuesto de Fórmula (II) para formar un compuesto de Fórmula (VII):

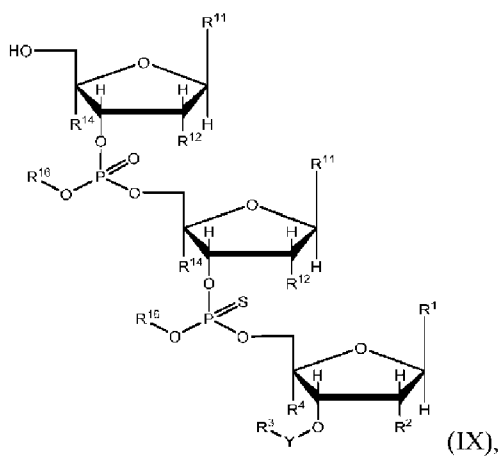


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

- 10 e) oxidar el compuesto de Fórmula (VII) con un agente de oxidación para formar un compuesto de Fórmula (VIII):

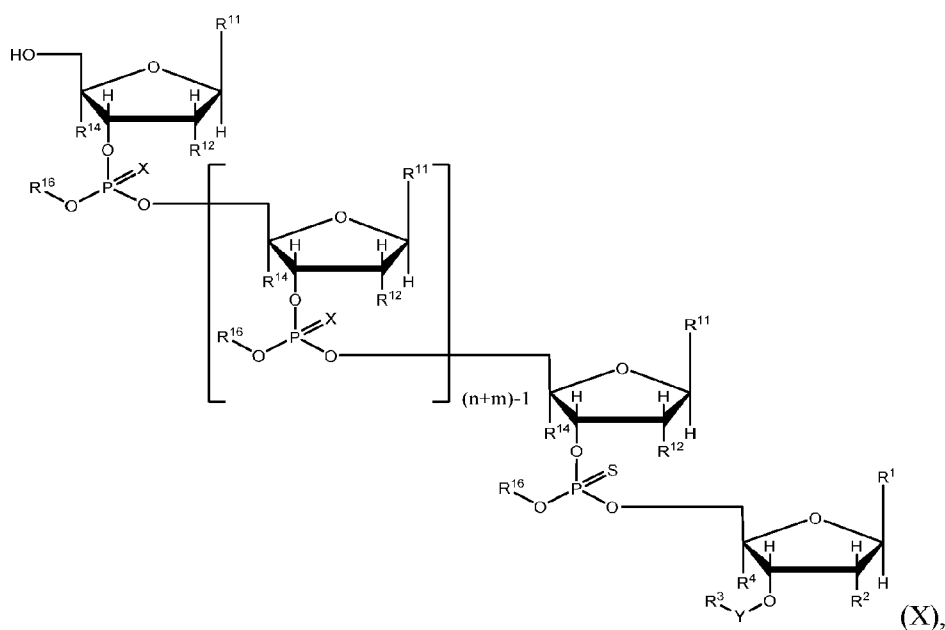


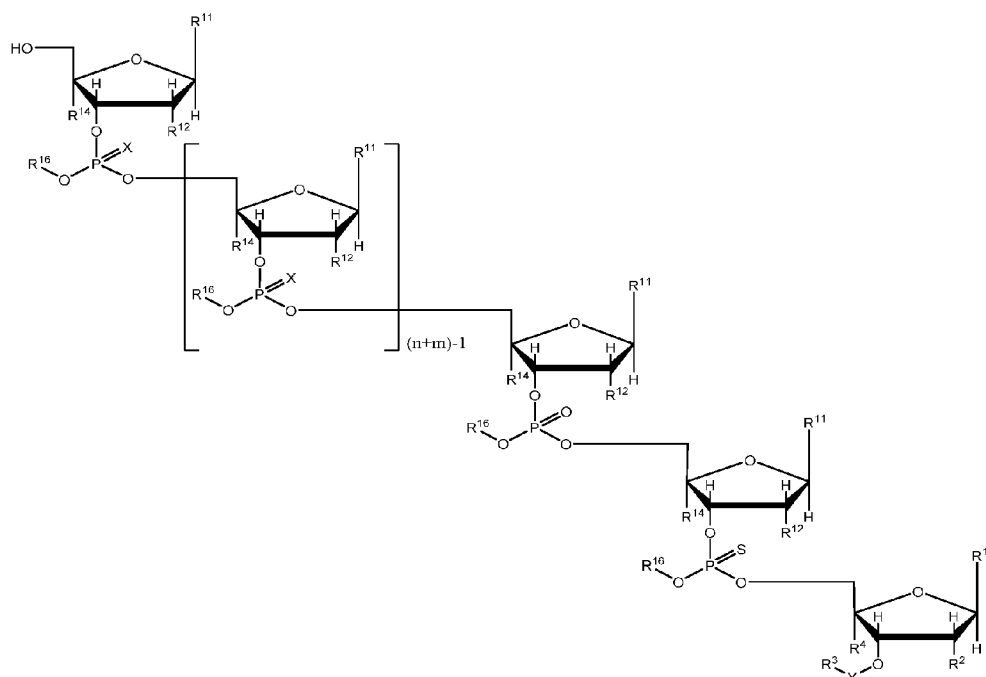
4. El proceso de la reivindicación 3, que comprende además la etapa de f) desproteger el compuesto de Fórmula (VIII) para formar el compuesto de Fórmula (IX):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

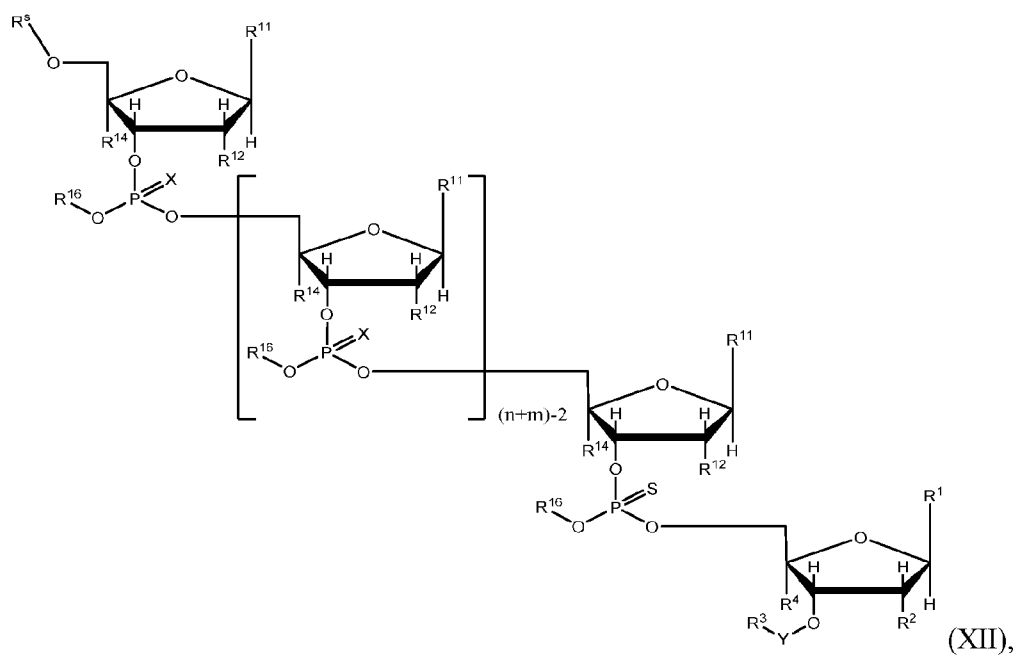
5. El proceso de la reivindicación 2 o 4, en el que a partir del compuesto de Fórmula (VI) o el compuesto de Fórmula (IX), las etapas a), b), y c) se repiten n veces y las etapas d), e), y f) se repiten m veces, en el que la repetición de las etapas a), b), y c) y las etapas d), e) y f) pueden ocurrir en cualquier orden relativo entre sí, en el que n es al menos 1 y m es 0, 1, 2, 3 o 4, para formar un oligonucleótido de Fórmula (X) o (XI):



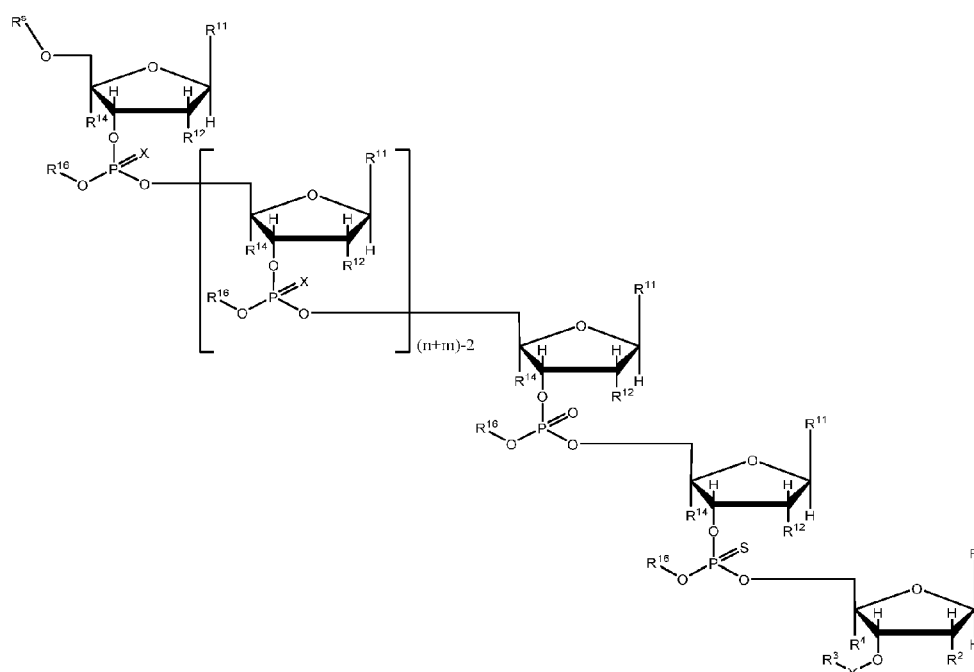


(XI) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o forma un oligonucleótido en el que cada repetición de las etapas a, b, y c, o las etapas d, e, y f da como resultado algún compuesto sin reaccionar de Fórmula (VI) o (IX) que reacciona con el exceso de agente de sulfuración o el subproducto del agente de sulfuración después de la etapa de sulfuración para formar un compuesto de Fórmula (XII) o (XIII):

5

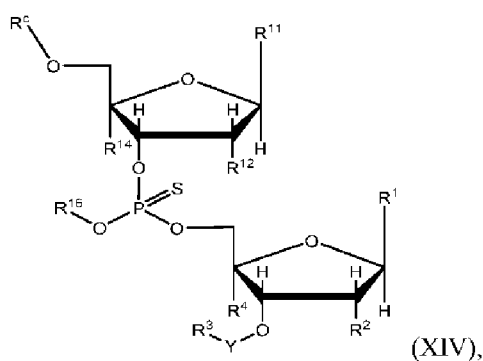


o



(XIII); en la que cada X se selecciona independientemente de S u O, siempre que X sea O solo 4, 3, 2, 1 o 0 veces en el compuesto de Fórmula (X), (XI), (XII), o (XIII).

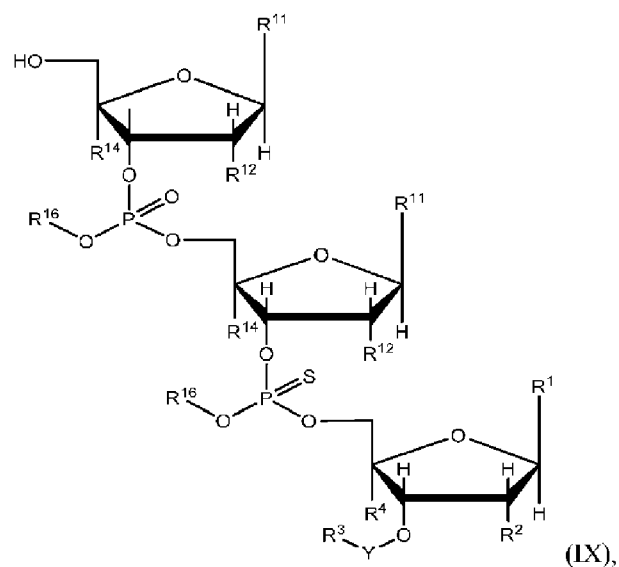
6. El proceso de la reivindicación 3, que comprende además la etapa de g) hacer reaccionar el compuesto sin reaccionar de Fórmula (VI) con un agente de recubrimiento para formar el compuesto de Fórmula (XIV):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que  $R^c$  es un grupo protector de hidroxilo formado a partir del agente de recubrimiento.

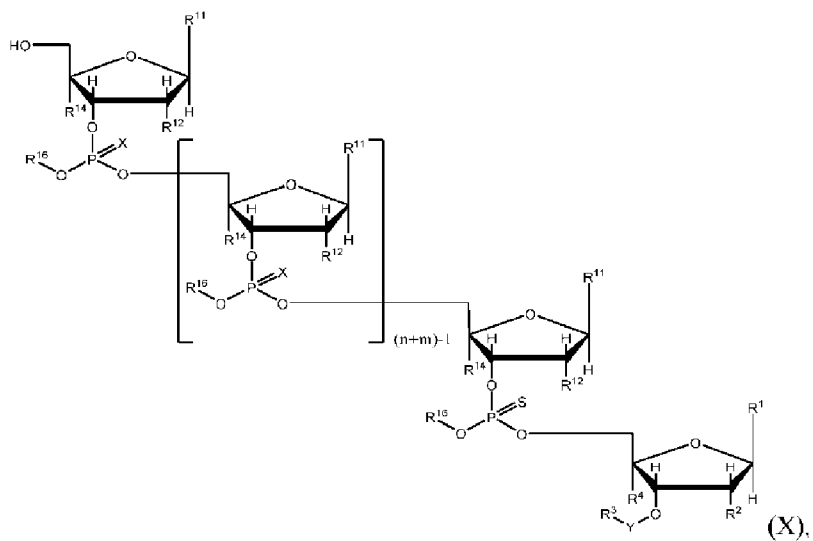
7. El proceso de la reivindicación 6, que comprende además la etapa de h) desproteger el compuesto de Fórmula (XIV) para formar el compuesto de Fórmula (IX):



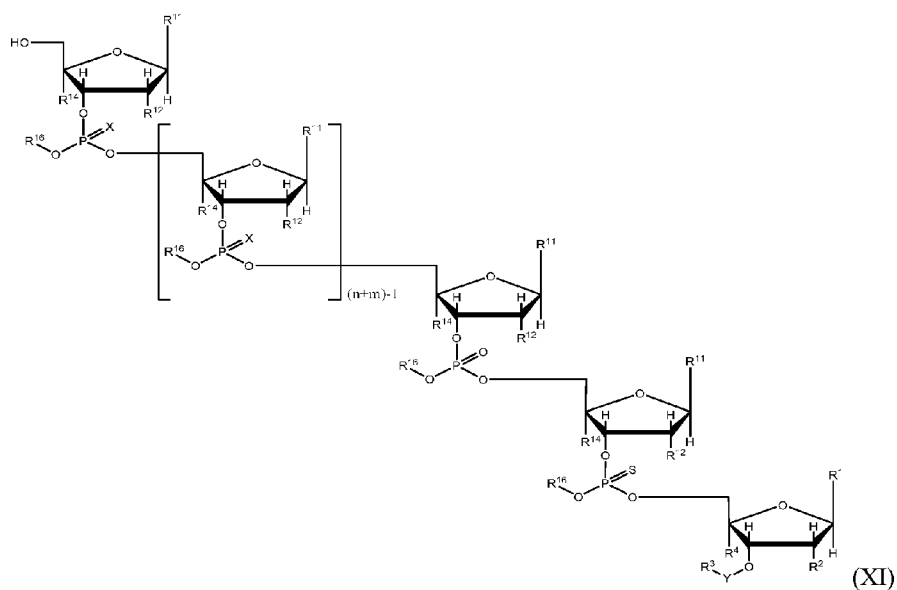


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. El proceso de la reivindicación 7, en el que a partir del compuesto de Fórmula (VI) o el compuesto de Fórmula (IX), las etapas a), b), y c) se repiten n veces y las etapas d), e), g) y h) se repiten m veces, en el que la repetición de las etapas a), b), y c) y las etapas d), e), g) y h) pueden ocurrir en cualquier orden relativo entre sí, en el que n es al menos 1 y m es 0 o mayor para formar un oligonucleótido de Fórmula (X) o (XI):

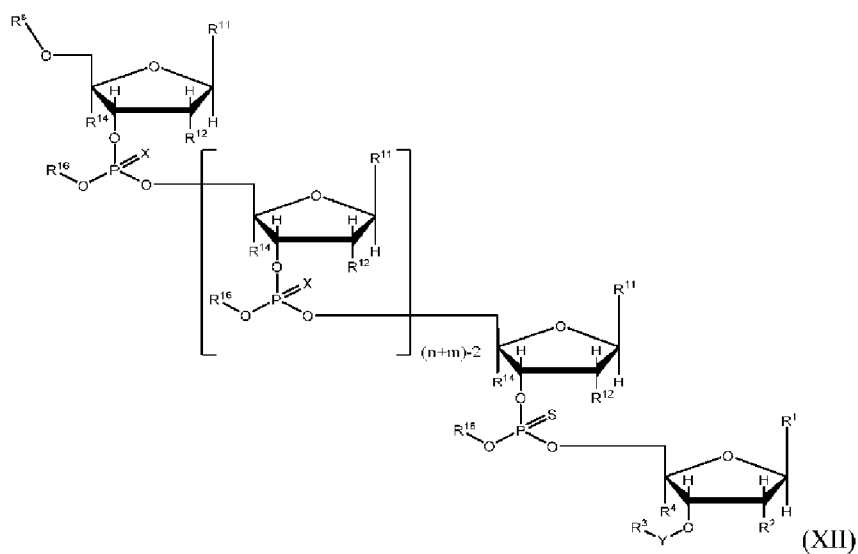


o

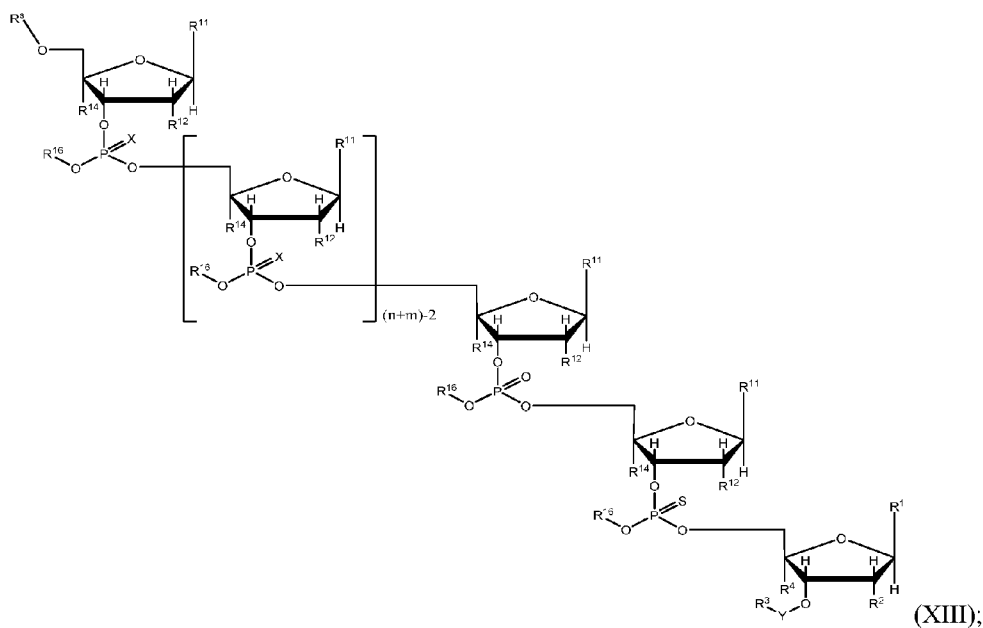


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o forma un oligonucleótido en el que cada repetición de las etapas a, b, y c, o las etapas d, e, y f da como resultado algún compuesto sin reaccionar de Fórmula (VI) o (IX) que reacciona con el exceso de agente de sulfuración o el subproducto del agente de sulfuración después de la etapa de sulfuración para formar un compuesto de Fórmula (XII) o (XIII):

5



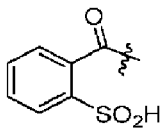
o



en la que cada  $X$  se selecciona independientemente de  $S$  u  $O$ .

9. El proceso de la reivindicación 5 u 8, en el que n es de 2 a 1000, de 2 a 500, de 2 a 100, de 2 a 50 o de 2 a 25.

- 5 10. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que (i) el agente de sulfuración es 3-amino-1,2,4-ditiazol-5-tiona (XH o ADTT) y R<sup>s</sup> es -C(SH)=(N)-CN; (ii) el agente de sulfuración es disulfuro de fenilacetilo (PADS) y R<sup>s</sup> es -C(=O)CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; (iii) el agente de sulfuración es 3-(dimetilamino-metilideno)amino)-3H-1,2,4-ditiazol (DDTT) y R<sup>s</sup> es -C(=S)NHC(=S)N=CHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; o (iv) el agente de sulfuración es 1,1-dióxido de 3H-1,2-benzoditioil-3-ona (reactivo de Beaucage) y R<sup>s</sup> es



- 10
11. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el agente de sulfuración se hace reaccionar al recircular el agente de sulfuración durante 1 a 30, 1 a 20 o 1 a 10 minutos.
12. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el agente de sulfuración se recircula de 1-10 veces, o de 1-5 veces.
13. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el reactivo de sulfuración es 3-(dimetilamino-metilideno)amino)-3H-1,2,4-ditiazol (DDTT) agregado a una concentración de 0.02 M a 0.1 M.
14. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que
- cada R<sup>2</sup> y R<sup>12</sup> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, F y alcoxi C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con alcoxi C<sub>1-4</sub>;
- 20 cada R<sup>4</sup> es independientemente H o forma un anillo con el grupo alcoxi de R<sup>2</sup>, en el que el anillo es un anillo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido con 1 a 3 grupos alquilo C<sub>1-4</sub>;
- R<sup>16</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN;
- R<sup>17a</sup> y R<sup>17b</sup> son independientemente alquilo C<sub>1-4</sub>; y
- cada R<sup>14</sup> es independientemente H o forma un anillo con el grupo alcoxi de R<sup>12</sup>, en el que el anillo es un anillo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido con 1 a 3 grupos alquilo C<sub>1-4</sub>; preferiblemente, en el que:
- 25 cada R<sup>2</sup> y R<sup>12</sup> se seleccionan independientemente de H o alcoxi C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con alcoxi C<sub>1-4</sub>;
- R<sup>15</sup> es 4,4'-dimetoxitritilo;
- R<sup>16</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN;

$R^{17a}$  y  $R^{17b}$  son independientemente alquilo  $C_{1-6}$ ; y

$R^S$  es  $-C(=N)(SH)-CN$  o  $-C(=O)CH_2C_6H_5$ .

- 5 15. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que Y es un oligonucleótido que comprende de 2 a 50 nucleótidos, un oligonucleótido que comprende de 2 a 40 nucleótidos, un oligonucleótido que comprende de 2 a 30 nucleótidos, o un oligonucleótido que comprende de 2 a 25 nucleótidos.
16. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 5-14, en el que el compuesto de Fórmula (X) es un oligonucleótido antisentido que comprende de 2 a 30 nucleótidos, opcionalmente, en el que:
- (i) el oligonucleótido antisentido comprende únicamente ARN modificado;
- (ii) el oligonucleótido antisentido comprende ADN y ARN modificado;
- 10 (iii) el oligonucleótido antisentido es un gapmer;
- (iv) el oligonucleótido antisentido comprende únicamente ADN; o
- (v) la secuencia del oligonucleótido antisentido es SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 8.

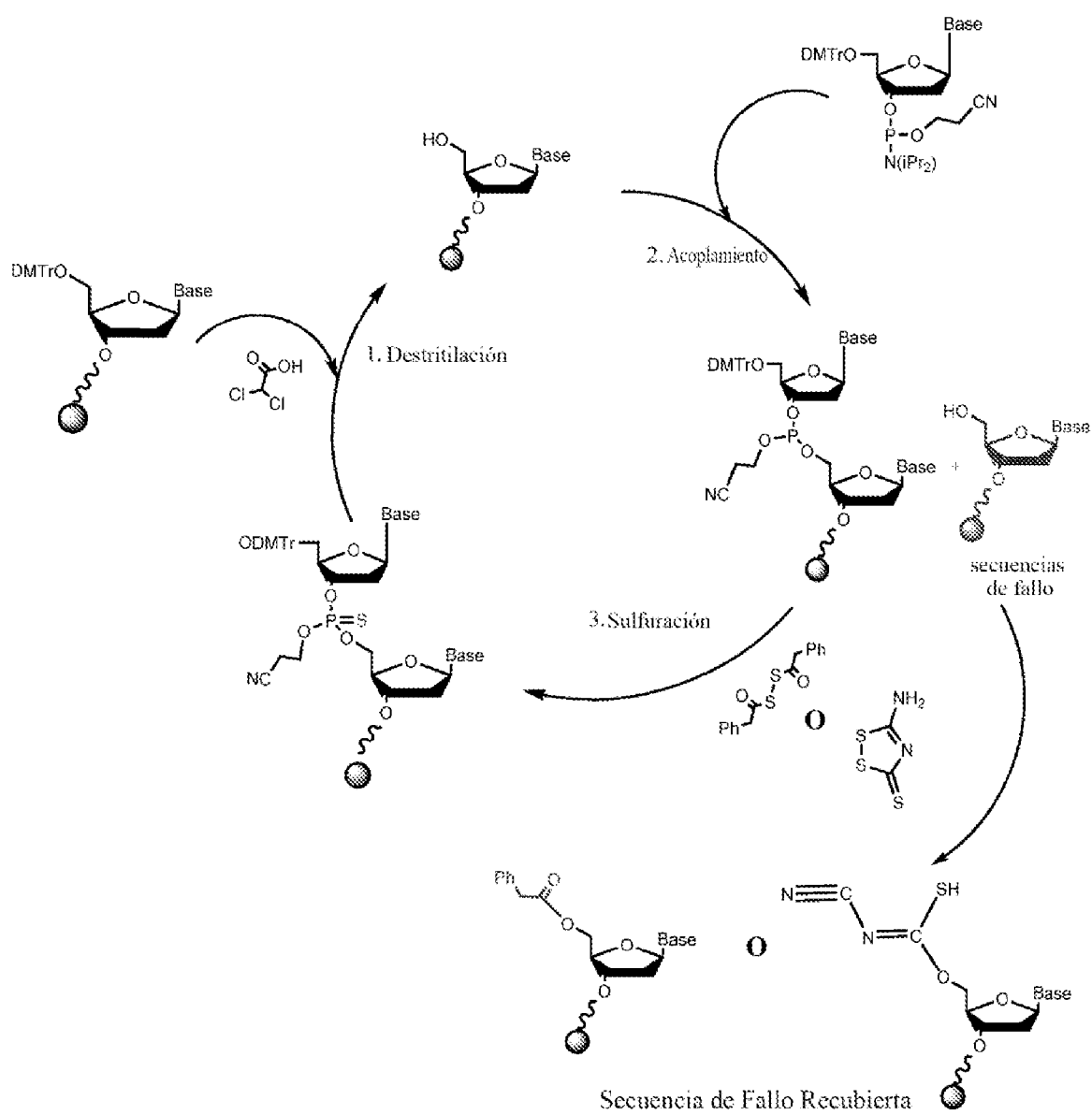


FIG. 1

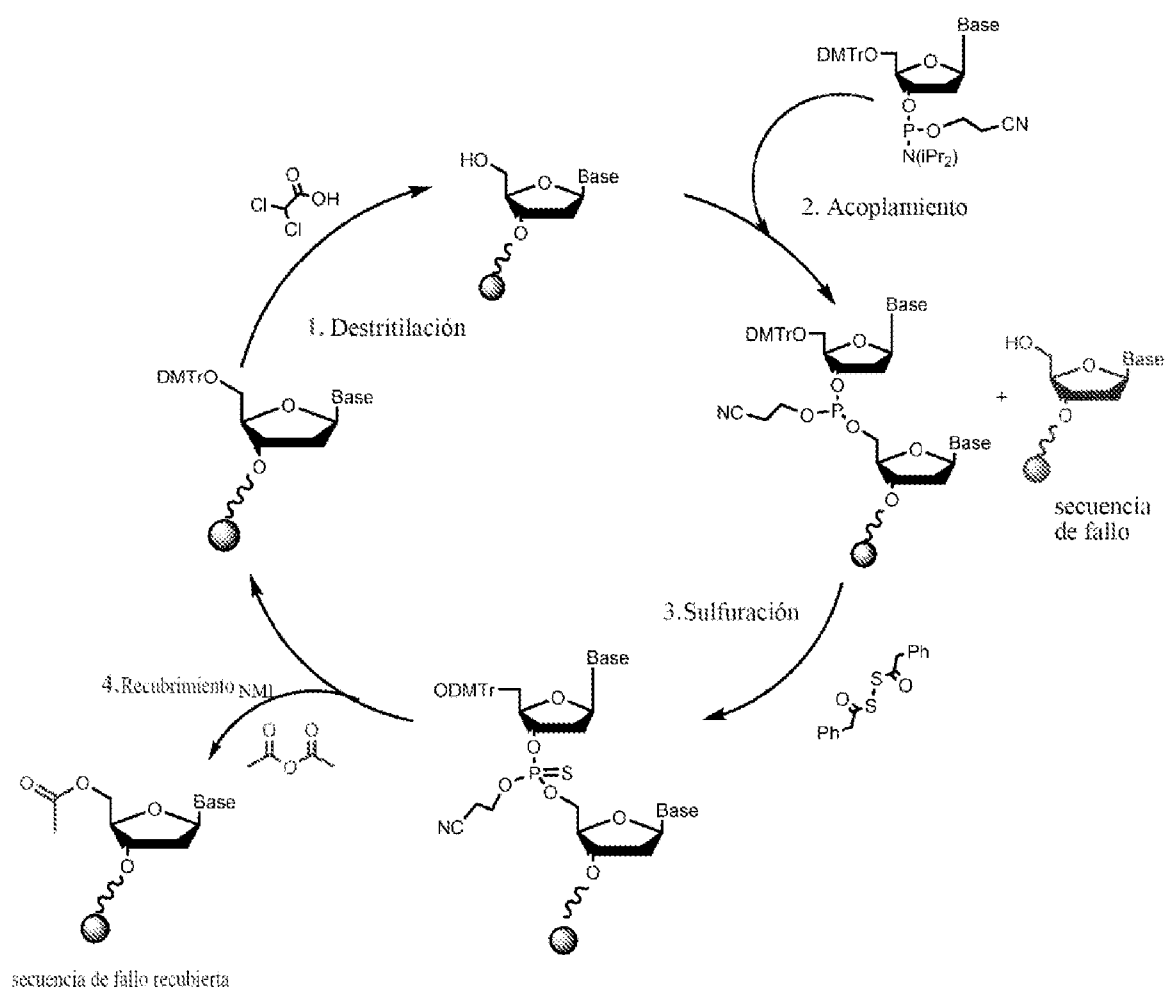


FIG. 2

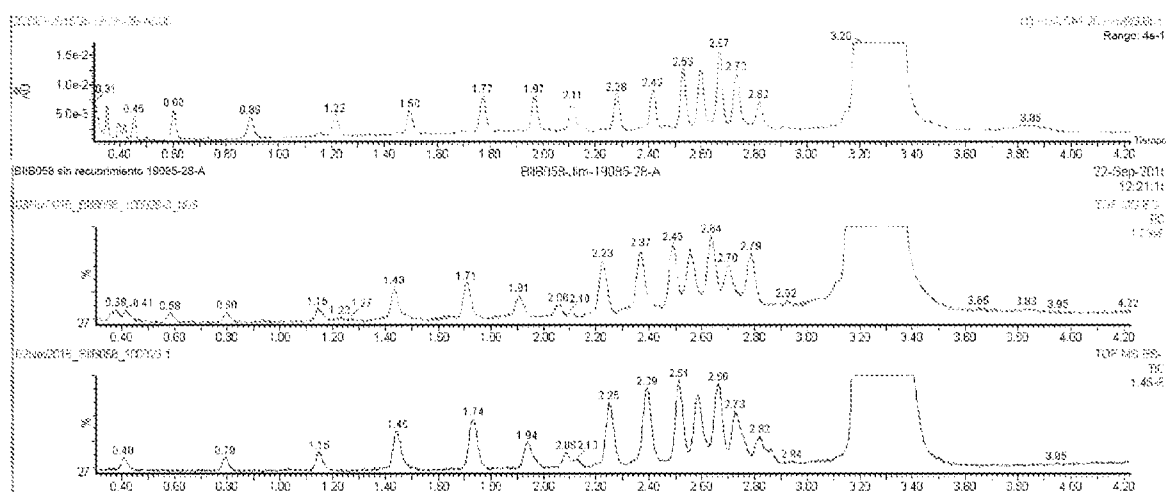


FIG. 3

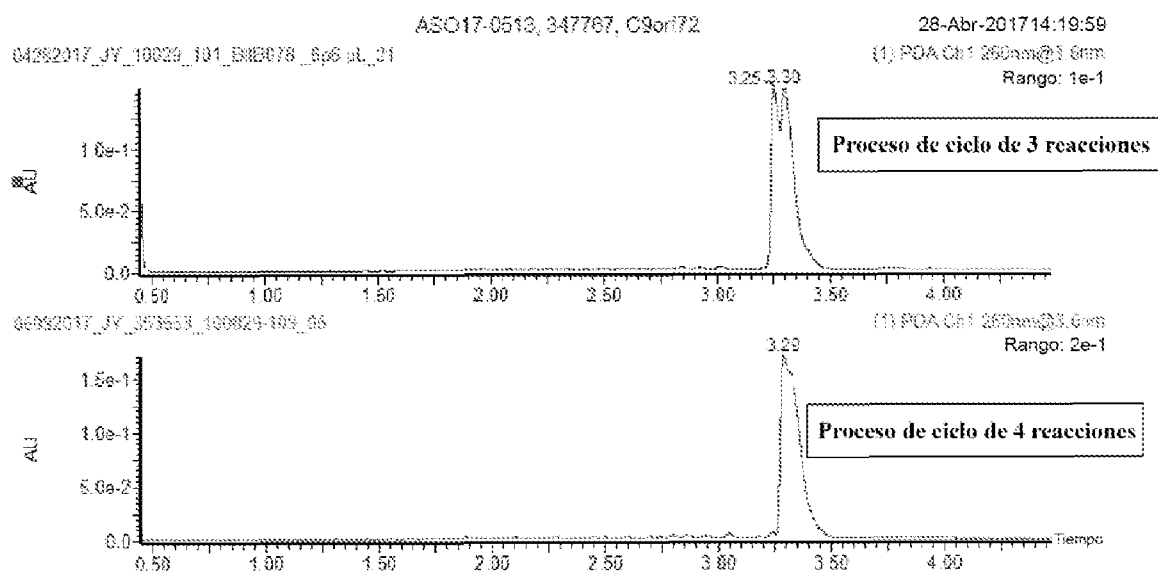


FIG. 4



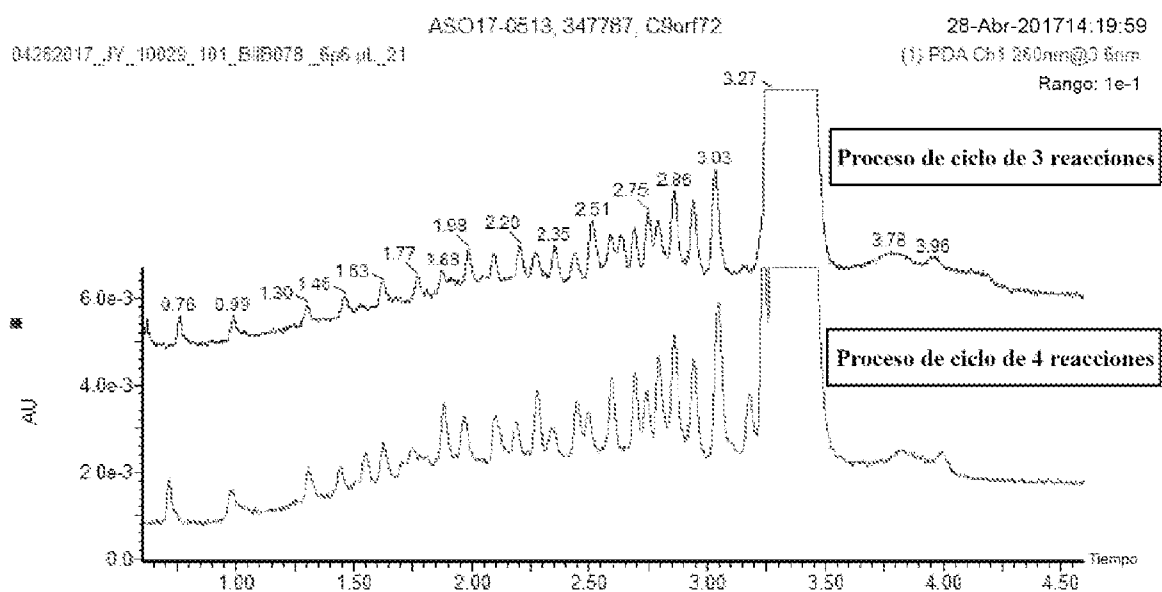


FIG. 5

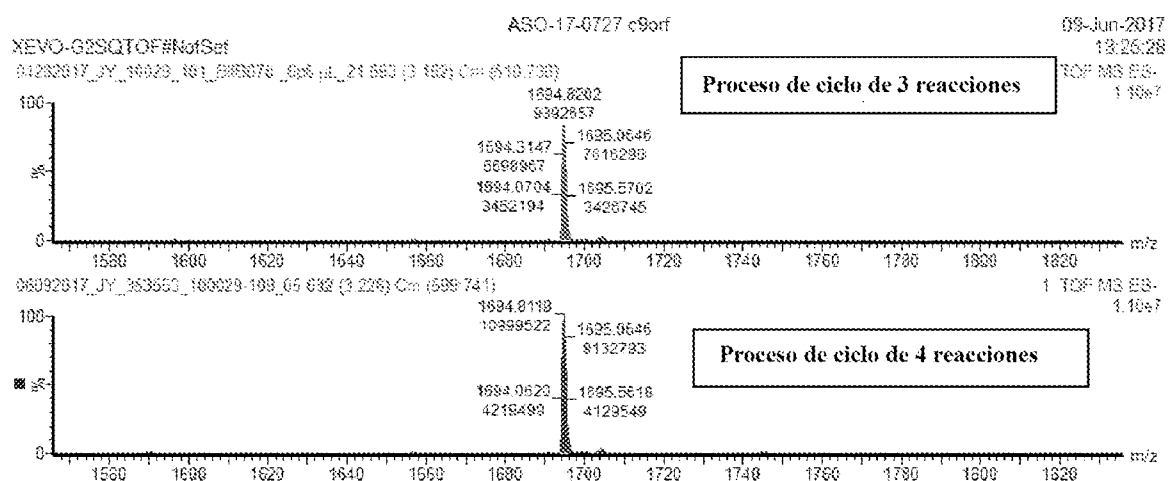


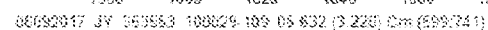
FIG. 6

14:18:58

6408017 JY 0002 101 50070 606 4 21 500 0.1620 C= 4510.700

1-25-55

1.038



1. TOF MS ES.

1.13e5

Proceso de ciclo de 4 reaccion

m/z	Relative Intensity (%)
1589.2876	55.288
1589.5544	64.124
1656.5437	62.071
1690.3154	73.570
1690.3154	100.000
1738.92	73.892
1754.97	75.419
1589.0528	20.734
1661.0510	19.734

43

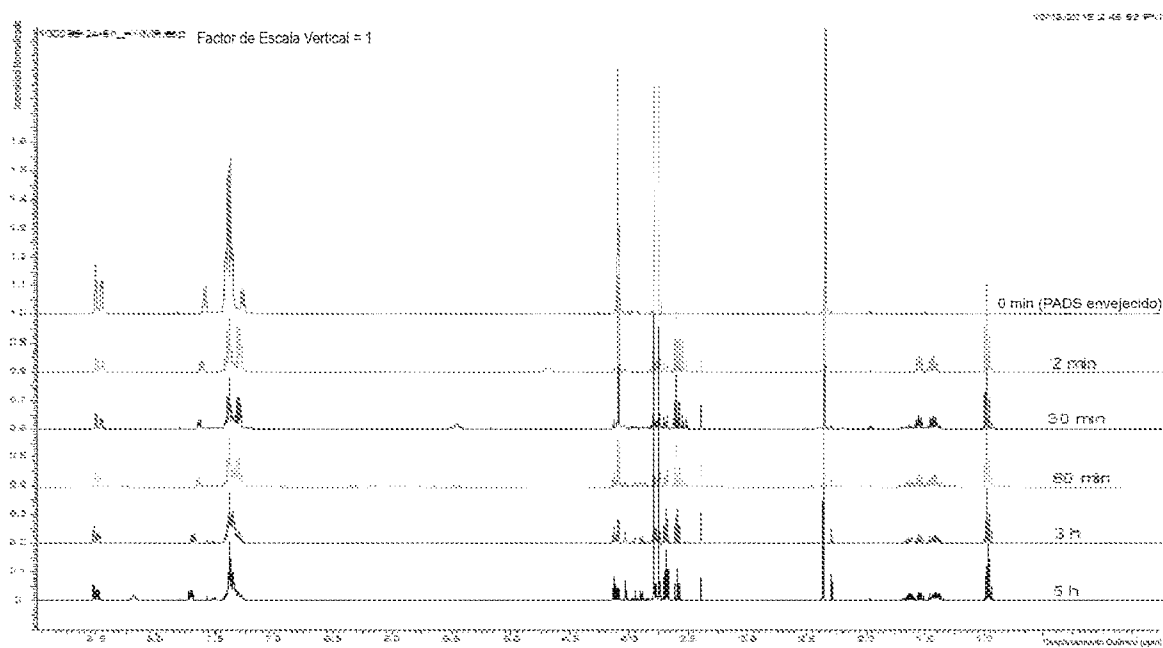


FIG. 8

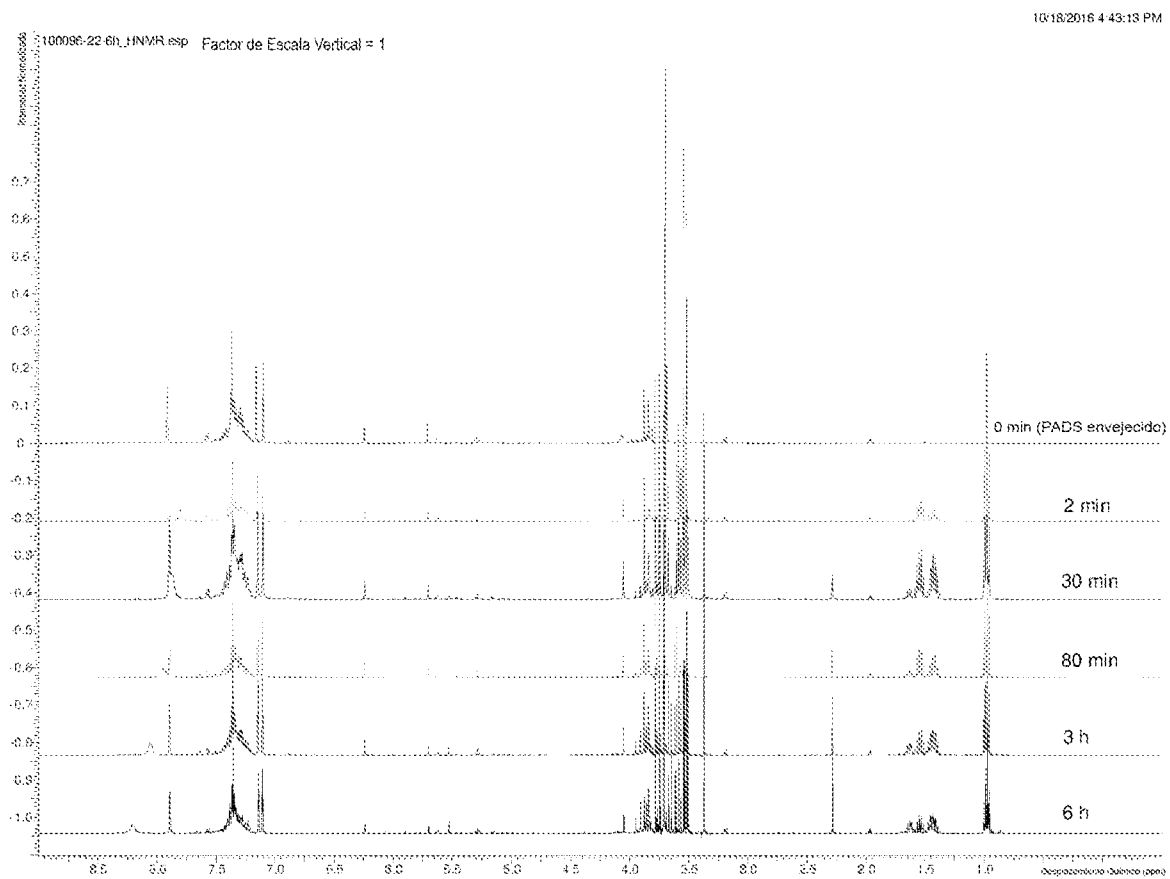


FIG. 9