

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 362**

51 Int. Cl.:

C07H 1/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2017** **PCT/US2017/037126**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.12.2017** **WO17218454**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2017** **E 17733243 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024** **EP 3468981**

54 Título: **Cromatografía de interacción hidrófoba para la purificación de oligonucleótidos**

30 Prioridad:

14.06.2016 US 201662349970 P
01.05.2017 US 201762492402 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
20.11.2024

73 Titular/es:

BIOGEN MA INC. (100.0%)
225 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

GRONKE, ROBERT, S. y
JOSHI, RATNESH, S.

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 2 988 362 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

Cromatografía de interacción hidrófoba para la purificación de oligonucleótidos

5 Referencia a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de conformidad con 35 USC § 119(e) de la Solicitud Provisional de EE. UU. N° 62/349,970, presentada el 14 de junio de 2016, y de la Solicitud Provisional de EE. UU. N° 62/492,402, presentada el 1 de mayo de 2017.

10

Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se presentó por vía electrónica en formato ASCII. Dicha copia de ASCII, creada el 12 de junio de 2017, se denomina 123429-00120_SL.txt y tiene un tamaño de 839 bytes.

15

Antecedentes de la invención

Los oligonucleótidos son oligómeros de ADN o ARN cortos que pueden sintetizarse químicamente con fines de investigación y médicos. Típicamente, los oligonucleótidos se preparan mediante una adición escalonada de residuos de nucleótidos para producir una secuencia específica. Durante la síntesis, puede haber ineficiencias en cualquiera de las etapas, que resulten en un oligómero que carezca de un nucleósido ("la impureza N-1") o que tengan un enlace fosfodiéster en lugar del enlace fosfotioéster deseado ("la impureza P=O"). Además, la exposición a condiciones oxidativas durante o después de la síntesis podría convertir un enlace P=S en un enlace P=O para formar una impureza P=O. Una vez completada la síntesis del oligonucleótido de la secuencia deseada, el oligonucleótido diana se obtiene como una mezcla junto con todas las secuencias con errores y las impurezas N-1 y P=O. Entonces se deben separar estas impurezas del oligonucleótido diana.

20

25

Una técnica de separación comúnmente utilizada es la cromatografía líquida de alta presión en fase inversa (rp-HPLC, por sus siglas en inglés), que se utiliza para purificar oligonucleótidos; sin embargo, la rp-HPLC no puede, por lo general, eliminar con eficacia las impurezas N-1, P=O, ABásicas, CNEt y/o N+1. Otra desventaja de la rp-HPLC incluye el uso de una cantidad significativa de disolventes orgánicos, que crea un problema de desecho, así como la necesidad de llevar a cabo la purificación en instalaciones a prueba de explosiones.

30

35

Por lo tanto, se necesitan métodos de purificación para oligonucleótidos que puedan eliminar las impurezas N-1, P=O, ABásicas, CNEt y/o N+1 y sean adecuados para un procedimiento comercial a gran escala.

40

45

El documento US6087491 describe oligonucleótidos de pureza extremadamente elevada y métodos de sintetizarlos utilizando bloques de dímeros. El documento WO96/01268 describe la purificación de fosforotioatos de oligonucleótidos utilizando cromatografía de intercambio aniónico DEAE-5PW y cromatografía de interacción hidrófoba. El documento WO2004/020449 describe procedimientos para separar y desproteger oligonucleótidos. El documento WO98/47910 describe un método para la síntesis en fase de solución de oligonucleótidos. Ramage R. *et al.*, describe 4-(17-tetrabenzo[a,c,g,i]fluorenylmethyl)-4',4"-dimethoxytrityl Chloride: A Hydrophobic 5'-protecting group for the separation of synthetic oligonucleotides.

Compendio de la invención

La presente invención describe un método para purificar un oligonucleótido diana utilizando cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés). En particular, el método que se describe en la presente incluye aplicar, con una capacidad de carga dinámica particular, una mezcla del oligonucleótido diana e impurezas relacionadas con el producto a la resina (o adsorbente hidrófobo) de la cromatografía de interacción hidrófoba. El método reivindicado produce una separación mejorada de las impurezas N-1 y P=O del oligonucleótido diana, así como la eliminación del uso de disolventes orgánicos durante el procedimiento de purificación. En determinadas realizaciones, el método reivindicado también puede eliminar las impurezas ABásicas, CNEt y/o N+1.

50

55

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 es una gráfica que ilustra la relación entre la capacidad de carga dinámica y la eliminación de la impureza P=O.

60

La FIG. 2 es una gráfica que ilustra la relación entre la capacidad de carga dinámica y la eliminación de la impureza N-1.

65

La FIG. 3 ilustra estructuras ejemplares de impurezas ABásicas, CNEt y P=O.

Descripción detallada

La presente invención se dirige a métodos para separar un oligonucleótido de las impurezas relacionadas con el producto, generadas durante la síntesis del oligonucleótido. Se desarrolló el nuevo procedimiento, en el que una mezcla de oligonucleótidos bruta, que contiene no solamente el oligonucleótido diana, sino también diversas impurezas relacionadas con el producto, se aplica a un adsorbente hidrófobo con una capacidad de carga dinámica particular. Este nuevo método resulta en la eliminación mejorada de determinadas impurezas relacionadas con el producto, incluidas la impureza N-1 y la impureza P=O. Una mejora de este tipo fue sorprendente, dado que se espera que la hidrofobicidad del oligonucleótido diana sea similar en comparación con sus impurezas N-1 y P=O y estas impurezas no se eliminan mediante rp-HPLC a escala del proceso, que también depende de interacciones hidrófobas. En determinadas realizaciones, el método reivindicado también puede eliminar las impurezas ABásicas, las impurezas CNET y las impurezas N+1 que son difíciles de eliminar mediante rp-HPLC.

Una primera realización de la invención es un método para separar un oligonucleótido diana de una mezcla que contiene el oligonucleótido diana y una impureza relacionada con el producto, comprendiendo el método las etapas de:

a) añadir sal a la mezcla, en donde la sal es sulfato de amonio;

b) poner en contacto la mezcla diluida con un adsorbente hidrófobo a una capacidad de carga dinámica de aproximadamente 32 a aproximadamente 78 % de la capacidad del adsorbente hidrófobo, en donde el adsorbente hidrófobo comprende fenilo o hexilo;

c) lavar el adsorbente hidrófobo con una solución salina acuosa;

d) eluir el oligonucleótido diana con una solución de elución; y

e) recoger el eluyente que comprende el oligonucleótido diana;

en donde la impureza relacionada con el producto incluye al menos una impureza N-1, separando con ello el oligonucleótido diana de la impureza relacionada con el producto.

Una segunda realización de la invención es un método para separar un oligonucleótido diana de una mezcla que contiene el oligonucleótido tiolado diana y una impureza relacionada con el producto, comprendiendo el método las etapas de:

a) añadir sal a la mezcla, en donde la sal es sulfato de amonio;

b) poner en contacto la mezcla diluida con un adsorbente hidrófobo a una capacidad de carga dinámica de aproximadamente 40 a aproximadamente 100 % de la capacidad del adsorbente hidrófobo, en donde el adsorbente hidrófobo comprende fenilo o hexilo;

c) lavar el adsorbente hidrófobo con una solución salina acuosa;

d) eluir el oligonucleótido diana con una solución de elución; y

e) recoger el eluyente que comprende el oligonucleótido diana;

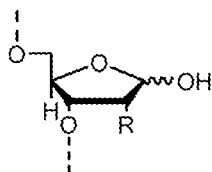
en donde la impureza relacionada con el producto incluye al menos una impureza P=O, separando con ello el oligonucleótido diana de la impureza relacionada con el producto.

Tal como se utiliza en la presente, una "impureza relacionada con el producto" hace referencia a los subproductos no deseados generados durante la síntesis del oligonucleótido diana. En determinadas realizaciones, una impureza relacionada con el producto es una i) impureza N-1; ii) una impureza P=O; iii) o una combinación de las mismas; o iv) una mezcla de cualquiera de estas tres. Tal como se utiliza en la presente, una "impureza N-1" es un oligonucleótido que carece de 1 nucleósido en cualquier posición relativa al oligonucleótido diana debido a una reacción de acoplamiento fallida. Tal como se utiliza en la presente, una "impureza P=O" es un oligonucleótido que contiene un enlace fosfodiéster en lugar de un enlace fosforotioato deseado del oligonucleótido diana debido a una reacción de sulfuración fallida o una oxidación no intencionada después de la síntesis. En determinadas realizaciones, el método descrito para la primera realización puede utilizarse para eliminar la impureza P=O junto con la impureza N-1. En determinadas realizaciones, el método descrito para la segunda realización puede utilizarse para eliminar la impureza N-1 junto con la impureza P=O.

En determinadas realizaciones, las impurezas relacionadas con el producto también pueden incluir una

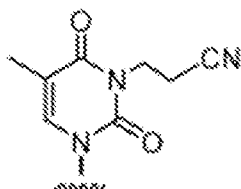
impureza ABásica, CNet y/o N+1. Tal como se utiliza en la presente, una "impureza N+1" es un oligonucleótido que tiene 1 nucleósido adicional en cualquier posición con respecto al oligonucleótido diana. Tal como se utiliza en la presente, una "impureza ABásica" es un oligonucleótido que tiene uno o más nucleósidos que carecen de la nucleobase en comparación con el oligonucleótido diana, en donde el nucleósido tiene la estructura que se muestra a continuación:

5



Una estructura ejemplar para una impureza ABásica se muestra en la FIG. 3. En una realización particular, la nucleobase omitida en la impureza ABásica es adenosina y/o guanina. Tal como se utiliza en la presente, una impureza "CNet" es un oligonucleótido que contiene una nucleobase de timina modificada en lugar de la nucleobase de timina no modificada del oligonucleótido diana, en donde la nucleobase de timina modificada tiene la siguiente estructura:

10



15

Una estructura ejemplar para una impureza CNet se muestra en la FIG. 3.

En determinadas realizaciones, las impurezas relacionadas con el producto incluyen una impureza de tipo shortmer. Tal como se utiliza en la presente, una "impureza de tipo shortmer" es un oligonucleótido que carece de 1, 2, 3, 4 o más nucleósidos en cualquier posición con respecto al oligonucleótido diana.

20

En determinadas realizaciones, las impurezas relacionadas con el producto incluyen una impureza de elución temprana (EEI, por sus siglas en inglés). Tal como se utiliza en la presente, la "impureza de elución temprana" es una impureza que eluye antes que el oligonucleótido diana utilizando los métodos de purificación que se describen en la presente. En una realización, la EEI incluye una impureza de tipo shortmer, tal como una impureza N-1, una impureza P=O y/o una impureza ABásica.

25

En determinadas realizaciones, las impurezas relacionadas con el producto incluyen una impureza de elución posterior (LEI, por sus siglas en inglés). Tal como se utiliza en la presente, la "impureza de elución posterior" es una impureza que eluye después del oligonucleótido diana utilizando los métodos de purificación que se describen en la presente. En una realización, la LEI incluye la impureza N+1.

30

"Oligonucleótido" significa un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos enlazados. En determinadas realizaciones, uno o más de la pluralidad de nucleósidos se encuentran modificados. En determinadas realizaciones, un oligonucleótido comprende uno o más ribonucleósidos (ARN) y/o desoxirribonucleósidos (ADN). En determinadas realizaciones, el oligonucleótido incluye solamente ARN, solamente ADN o incluye tanto ARN como ADN. En una realización particular, el oligonucleótido diana es un gápmero. "Gápmero" significa un compuesto quimérico en el que una región interna que tiene una pluralidad de nucleósidos que brindan sustento a la escisión de la RNasa H se encuentra posicionada entre regiones externas con uno o más nucleósidos, en donde los nucleósidos que comprenden la región interna son químicamente distintos del nucleósido o los nucleósidos que comprenden las regiones externas. En determinadas realizaciones, el oligonucleótido diana comprende 10 a 100, 10 a 50, 10 a 25, 15 a 100, 15 a 50 o 15 a 25 nucleósidos.

35

40

45

"Nucleósido" significa un compuesto que comprende una nucleobase y un resto de azúcar. Los nucleósidos incluyen, pero no se limitan a nucleósidos de origen natural, nucleósidos modificados y nucleósidos que tienen bases miméticas y/o grupos de azúcares. "Nucleósido modificado" hace referencia a un nucleósido que comprende al menos una modificación en comparación con nucleósidos de ARN o ADN de origen natural. Una modificación de este tipo puede encontrarse en el resto de azúcar y/o en la nucleobase. Los nucleósidos pueden modificarse con cualquiera de una diversidad de sustituyentes en la nucleobase o el resto de azúcar.

50

Un "nucleótido" se refiere a un nucleósido que comprende un grupo de enlace, que enlaza dos nucleósidos

entre sí como parte del oligonucleótido. Las dos clases principales de grupos de enlace se definen mediante la presencia o ausencia de un átomo de fósforo. Enlaces representativos que contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a fosfodiésteres ($P=O$), fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidato y fosforotioatos ($P=S$). Grupos de enlace representativos que no contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a metilenmetilimino ($-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$), tiodiéster ($-O-C(O)-S-$), tionocarbamato ($-O-C(O)(NH)-S-$); siloxano ($-O-Si(H)_2-O-$); y N,N'-dimetilhidrazina ($-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-$). En una realización particular, el grupo de enlace es un fosfodiéster ($P=O$) o un fosforotioato ($P=S$). En determinadas realizaciones, el oligonucleótido diana de los métodos descritos para la primera y segunda realizaciones incluye solamente fosfodiésteres ($P=O$), fosforotioatos ($P=S$), o una combinación de los mismos como el grupo de enlace.

Una "nucleobase" significa la parte de base heterocíclica de un nucleósido. En determinadas realizaciones, una nucleobase puede comprender cualquier átomo o grupo de átomos que permitan la unión de hidrógeno a una nucleobase de otro ácido nucleico. Las nucleobases pueden ser de origen natural o pueden estar modificadas. 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) (o 5-metil uracilo), citosina (C) y uracilo (U), muchas nucleobases modificadas o miméticas de nucleobases conocidos por los expertos en la técnica son pasibles de incorporación en los oligonucleótidos diana por separado mediante el método descrito en la primera o segunda realizaciones, incluyendo, por ejemplo, hipoxantina, xantina, 7-metil guanina, 5,6-dihidrouracilo, 5-metilcitosina, 7-deaza purina y 5-hidroximetilcitosina. En determinadas realizaciones, el método es el descrito para la primera o segunda realización y la nucleobase se selecciona de adenina, guanina, timina (5-metil uracilo) y 5-metilcitosina.

"Resto de azúcar" significa un azúcar o sustituto de azúcar natural o modificado.

"Azúcar natural" significa un resto de ribofuranosa de ADN ($2'-H$) o ARN ($2'-OH$).

"Azúcar modificado" significa un resto de ribofuranosa que comprende al menos un sustituyente distinto del de un azúcar natural. Modificaciones de este tipo incluyen, sin limitación, la adición de grupos sustituyentes, el puenteo de átomos de anillo no germinales para formar un ácido nucleico bicíclico (BNA, por sus siglas en inglés), el remplazo del átomo de oxígeno del anillo ribosilo por S, N(R) o C(R¹)(R²) ($R=H$, alquilo C_1-C_{12} o un grupo protector) y combinaciones de estos. En determinadas realizaciones, el azúcar se modifica en la posición 2' para incluir un sustituyente que no sea H u OH ("modificado en 2'" o "sustituido en 2'"). De manera alternativa, la modificación es en la posición 5' del azúcar. En determinadas realizaciones, el azúcar se modifica en la posición 2' y la posición 5' del azúcar.

Ejemplos de modificaciones de azúcares útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a compuestos que comprenden un grupo sustituyente de azúcar seleccionado de: OH, F, O-alquilo, S-alquilo, N-alquilo u O-alquilo-O-alquilo, en donde el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C_1 a C_{10} o alquino C_2 a C_{10} sustituidos o no sustituidos. En determinadas realizaciones, sustituyentes de este tipo se seleccionan de: un haluro (incluyendo, pero no limitado a F), alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C_1-C_{10} , $-OCF_3$, $O-(CH_2)_2-O-CH_3$, $2'-O(CH_2)_2SCH_3$, $O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$ u $O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$, en donde cada uno de los R_m y R_n es, de manera independiente, H o alquilo C_1-C_{10} sustituido o no sustituido. En particular, los nucleósidos modificados adecuados para el uso en los métodos descritos en la primera y segunda realizaciones son: 2'-metoxietoxi ("MOE" o "2'-MOE" o "2'-OCH₂CH₂OCH₃"), 2'-O-metilo ("2'-Ome" o 2'-O-CH₃) o 2'-fluoro (2'-F).

En determinadas realizaciones, los nucleósidos modificados que tienen un grupo sustituyente en la posición 2' se seleccionan de: $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$, $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$ y $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, en donde n y m son de manera independiente de 1 a aproximadamente 10. Otros grupos sustituyentes de azúcares en 2' incluyen: alquilo C_1 a C_{10} , alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo sustituidos, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterociclilo y aminoalquilamino.

En determinadas realizaciones, los nucleósidos modificados que tienen un grupo sustituyente en el átomo de oxígeno en la posición 5' se seleccionan de acetilo (Ac); benzilo (Bz); bencilo (Bn); éter de β-metoxietoximetilo (MEM); dimetoxitritilo, [bis-(4-metoxifenil)fenilmetilo] (DMT); éter de metoximetilo (MOM); metoxitritilo [(4-metoxifenil)difenilmetilo, MMT]; éter de p-metoxibencilo (PMB); éter de metiltiometil; pivaloilo (Piv); tetrahidropirano (THP); tetrahydrofurano (THF); tritilo (trifenilmetilo, Tr); éter de sililo (incluyendo, pero no limitado a trimetilsililo (TMS), terc.-butildimetilsililo (TBDMS), tri-iso-propilsililoximetilo (TOM) y éteres de triisopropilsililo (TIPS)); éteres de metilo, éteres de etoxietilo (EE) y 5'-O(α-metil-6-nitropiperoniloxycarbonilo) (MeNPOC). En una realización particular, la posición 5' es -ODMT.

Ejemplos de nucleósidos que tienen restos de azúcares modificados incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden grupos sustituyentes de 5'-vinilo, 5'-metilo, 5'-ODMT, 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃ y 2'-O(CH₂)₂OCH₃.

En determinadas realizaciones, los grupos sustituyentes de azúcares en 2' se encuentran en la posición arabino

(superior) o en la posición ribo (inferior). En determinadas realizaciones de este tipo, una modificación 2'-arabino es 2'-F arabino (FANA). También pueden realizarse modificaciones similares en otras posiciones en el azúcar, particularmente en la posición 3' del azúcar en un nucleótido 3' terminal o en los oligonucleótidos enlazados en 2'-5' y en la posición 5' del nucleótido 5' terminal.

5

Tal como se usa en la presente, el término "alquilo" hace referencia a un resto hidrocarburo totalmente saturado, ramificado o no ramificado. Preferentemente, el alquilo comprende 1 a 20 átomos de carbono, más preferentemente 1 a 16 átomos de carbono, 1 a 10 átomos de carbono, 1 a 6 átomos de carbono o 1 a 4 átomos de carbono. En algunas realizaciones, un alquilo comprende de 6 a 20 átomos de carbono. Ejemplos representativos de alquilo incluyen, pero no se limitan a metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, sec.-butilo, iso-butilo, terc.-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo o n-decilo.

10

"Alquenilo" hace referencia a un grupo hidrocarburo insaturado que puede ser lineal o ramificado y tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Se pueden preferir grupos alquenilo con 2-6 átomos de carbono. El grupo alquenilo puede contener 1, 2 o 3 dobles enlaces carbono-carbono, o más. Ejemplos de grupos alquenilo incluyen etenilo, n-propenilo, isopropenilo, n-but-2-enilo, n-hex-3-enilo y similares.

15

"Alquinilo" hace referencia a un grupo hidrocarburo insaturado que puede ser lineal o ramificado y tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Se pueden preferir grupos alquinilo con 2-6 átomos de carbono. El grupo alquinilo puede contener 1, 2 o 3 triples enlaces carbono-carbono, o más. Ejemplos de grupos alquinilo incluyen etinilo, n-propinilo, n-but-2-inilo, n-hex-3-inilo y similares.

20

El término "arilo" hace referencia a grupos hidrocarburo aromáticos, monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos que tienen de 6 a 14 átomos de carbono en la parte del anillo. En una realización, el término "arilo" hace referencia a grupos hidrocarburo aromáticos, monocíclicos y bicíclicos, que tienen de 6 a 10 átomos de carbono. Ejemplos representativos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo, fluorenilo y antracenilo. El término "arilo" también hace referencia a un grupo bicíclico o tricíclico en el que al menos un anillo es aromático y está condensado a uno o dos anillos hidrocarburo no aromáticos. Ejemplos no limitativos incluyen tetrahidronaftaleno, dihidronaftalenilo e indanilo. Un "arilalquilo" es un grupo arilo enlazado a través de un enlazador alquileo al resto de la molécula. Un "alcarilo" es un grupo alquilo enlazado a través de un enlazador arileno al resto de la molécula.

25

Tal como se usa en la presente, el término "heterociclilo" hace referencia a un sistema de anillo monocíclico o bicíclico (p. ej., sistemas de anillo puenteados o espiro), saturado o insaturado, que tiene de 3 a 7 miembros del anillo o, en particular, 3 a 6 miembros del anillo o 5 a 7 miembros del anillo, al menos uno de los cuales es un heteroátomo y hasta 4 (p. ej., 1, 2, 3 o 4) de los cuales pueden ser heteroátomos, en donde los heteroátomos se seleccionan de manera independiente de O, S y N, y en donde C puede oxidarse (p. ej., C(O)), N puede oxidarse (p. ej., N(O)) o cuaternizarse y S puede oxidarse opcionalmente y convertirse en sulfóxido y sulfona. Anillos heterocíclicos insaturados incluyen anillos heteroarilo. Tal como se usa en la presente, el término "heteroarilo" hace referencia a un sistema de anillo monocíclico de 5 o 6 miembros aromático, que tiene 1 a 4 heteroátomos, seleccionados de manera independiente de O, S y N, y en donde N puede oxidarse (p. ej., N(O)) o cuaternizarse, y S puede oxidarse opcionalmente y convertirse en 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 puede presentar unión en un heteroátomo o un átomo de carbono.

35

40

45

"Nucleósido bicíclico" o "BNA" significa un nucleósido en donde el resto de azúcar del nucleósido comprende un puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de azúcar, formando con ello un resto de azúcar bicíclico. Ejemplos de BNA incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo ribosilo 4' y 2' ("nucleósido bicíclico 4'-2'"), por ejemplo, un anillo de furanosa que comprende un puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de furanosa para conectar el átomo de carbono 2' y el átomo de carbono 4' del anillo de azúcar.

50

55

En determinadas realizaciones, el oligonucleótido diana incluye uno o más nucleósidos de BNA, en donde el puente comprende una de las fórmulas: 4'-β-D-(CH₂)-O-2' (β-D-LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-α-L-(CH₂)-O-2' (α-L-LNA); 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-C(CH₃)₂-O-2' (véase el documento PCT/US2008/068922); 4'-CH(CH₃)-O-2' ("cEt") y 4'-C-H(CH₂OCH₃)-O-2' (véase la pat. de EE.UU. N° 7,399,845, expedida el 15 de julio. de 2008); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (véase el documento PCT/US2008/064591); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (véase la Solicitud de Patente de EE. UU. publicada US2004-0171570, publicada el 2 de sep. de 2004); 4'-CH₂-N(R)-O-2' (véase la pat. de EE. UU. N° 7,427,672, expedida el 23 de sep. de 2008); 4'-CH₂-C(CH₃)-2' y 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (véase el documento PCT/US2008/066154); y en donde R es, de manera independiente, H, alquilo C₁-C₁₂, o un grupo protector. En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona nucleósidos modificados que comprenden restos de azúcares modificados que no son restos de azúcares bicíclicos.

60

65

"Sustituto de azúcar" hace referencia a una estructura distinta de un anillo de ribofuranosa que tiene la capacidad de sustituir el azúcar de un nucleósido. Ejemplos de sustitutos de azúcares incluyen, pero no se limitan a anillos de 6 miembros, azúcares en los que el oxígeno se reemplaza, por ejemplo, por azufre o nitrógeno, para formar, por ejemplo, morfolinos y azúcares que contengan 4'-tio.

5

En determinadas realizaciones, el oligonucleótido diana separado mediante el método descrito en la primera o segunda realización es un oligonucleótido de fosforotioato con una secuencia de (de 5' a 3')

TCACCTTCATAATGCTGG (SEQ ID NO: 1),

10

en donde cada uno de los enlaces internucleósido del oligonucleótido es un enlace fosforotioato, cada uno de los nucleósidos del oligonucleótido es un nucleósido de 2'-metoxietilo (MOE) y cada una de las citosinas es una 5'-metilcitosina. La SEQ ID NO: 1 también se conoce como B11B058 y se describe en los documentos WO2007/002390, WO2010/148249 y US8,980,853.

15

En determinadas realizaciones, el oligonucleótido diana separado mediante el método descrito en la primera o segunda realización es un gápmo de MOE 5-10-5, que tiene una secuencia de (de 5' a 3')

CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 2),

20

en donde cada uno de los nucleósidos 1-5 y 16-20 son nucleósidos modificados de 2'-O-metoxietilribosa, y cada uno de los nucleósidos 6-15 son 2'-desoxinucleósidos, en donde los enlaces internucleósidos entre los nucleósidos 2 a 3, 4 a 5, 16 a 17 y 18 a 19 son enlaces fosfodiéster y los enlaces 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 enlaces fosforotioato, y en donde cada una de las citosinas es una 5'-metilcitosina. La SEQ ID NO: 2 se describe mediante la siguiente notación química: mCes Aeo Ges Geo Aes Tds Ads mCds Ads Tds Tds Tds mCds Tds Ads mCeo Aes Geo mCes Te; en donde,

25

A = una adenina,

30

mC = una 5'-metilcitosina

G = una guanina,

35

T = una timina,

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

d = un azúcar de 2'-desoxirribosa,

40

s = un enlace internucleósido fosforotioato y

o = un enlace internucleósido fosfodiéster.

45

La SEQ ID NO: 2 también se conoce como B11B067 o ISIS 666853 y se describe en el documento WO2015153800.

El adsorbente hidrófobo (es decir, "resina hidrófoba") es cualquier material al cual se une el oligonucleótido diana de forma tal que pueda separarse de las impurezas relacionadas con el producto en el método descrito en la primera y segunda realizaciones. Por ejemplo, el adsorbente hidrófobo incluye carbohidratos hidrófilos, agarosa reticulada y materiales de copolímeros sintéticos. Según la presente invención, el adsorbente hidrófobo comprende fenilo, butilo o hexilo. Por ejemplo, Hexilo650C es un adsorbente hidrófobo adecuado. Como se describe también en la presente, el adsorbente hidrófobo comprende butilo. Además, el adsorbente hidrófobo está empaquetado a una altura de lecho de al menos 15 cm, por ejemplo, al menos 20 cm, al menos 25 cm, o al menos 30 cm; o de aproximadamente 15 cm a aproximadamente 30 cm; de aproximadamente 15 cm a 20 cm, de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 cm, o aproximadamente 25 cm a aproximadamente 30 cm.

50

55

La "capacidad de carga dinámica" se define como la cantidad de producto (p. ej., producto de oligonucleótido) que se unirá a una resina de cromatografía en condiciones de flujo típicas y se determina en condiciones de flujo específicas y la concentración de sal de carga, entre otros factores de carga conocidos por el experto en la técnica. Se calcula en función de la cantidad que puede cargarse antes de que se midan las concentraciones de producto en el flujo continuo (a lo que se hace referencia como "punto de inflexión"). En particular, el material a separar se aplica a la resina de manera fluida (en oposición a la manera estática de un modo por lotes) a un caudal particular, por ejemplo, aproximadamente 100 a aproximadamente 250 cm/h y, en particular, 200 cm/h. El experto en la técnica sabría cómo seleccionar la concentración de sal en función de la solubilidad del

60

65

producto en esa sal y el caudal en función del tamaño de las perlas, la altura del lecho y otras variables tales como que no se supere la presión de entrada para alcanzar una relación de carga dinámica particular.

Por ejemplo, si la capacidad de un adsorbente hidrófobo para la mezcla de oligonucleótidos es de 50 mg/mL (dinámica), la aplicación de 50 mg/mL de la mezcla sería a una capacidad de carga dinámica del 100 %. De manera similar, para un adsorbente hidrófobo 50 mg/mL, la aplicación de 25 mg/mL de la mezcla sería a una capacidad de carga dinámica del 50 %. Para el método descrito en la primera realización, la capacidad de carga dinámica es aproximadamente 32 % a aproximadamente 78 %, por ejemplo, aproximadamente 32 % a aproximadamente 45 %, aproximadamente 40 % a aproximadamente 50 %, aproximadamente 45 % a aproximadamente 55 %, aproximadamente 50 % a aproximadamente 60 %, aproximadamente 55 % a aproximadamente 65 %, aproximadamente 60 a aproximadamente 70 %, aproximadamente 65 % a aproximadamente 78 % o aproximadamente 32 % a aproximadamente 50 %, aproximadamente 40 a aproximadamente 75 % o aproximadamente 50 % a aproximadamente 78 %. Para el método descrito en la segunda realización, la capacidad de carga dinámica es aproximadamente 40 % a aproximadamente 100 %, por ejemplo, aproximadamente 40 % a aproximadamente 50 %, aproximadamente 50 % a aproximadamente 60 %, aproximadamente 60 % a aproximadamente 70 %, aproximadamente 70 % a aproximadamente 80 %, aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 %, aproximadamente 90 a aproximadamente 100 %, aproximadamente 40 % a aproximadamente 75 %, o aproximadamente 40 % a aproximadamente 60 % o aproximadamente 40 % a aproximadamente 80 %. Para el método descrito en la primera y segunda realizaciones, la capacidad de carga dinámica es aproximadamente 40 % a aproximadamente 78 %, por ejemplo, aproximadamente 40 % a aproximadamente 45 %, aproximadamente 45 % a aproximadamente 50 %, aproximadamente 50 % a aproximadamente 55 %, aproximadamente 55 % a aproximadamente 60 %, aproximadamente 60 % a aproximadamente 65 %, aproximadamente 65 a aproximadamente 70 %, aproximadamente 70 % a aproximadamente 75 %, o aproximadamente 40 % a aproximadamente 50 %, aproximadamente 40 a aproximadamente 75 %, o aproximadamente 50 % a aproximadamente 78 %.

En una tercera realización, el método es el descrito para la primera o segunda realización y la sal se añade a la mezcla como una solución salina acuosa o la sal se disuelve directamente en la mezcla. Como se describe en la presente, la sal incluye cualquier catión de NH_4^+ , K^+ o Na^+ y cualquier catión compuesto por F^- , $[\text{SO}_4]^{-2}$, $[\text{HPO}_4]^{-2}$, acetato o Cl^- o combinaciones de los mismos. Según la presente invención, la sal es sulfato de amonio.

En una cuarta realización, el método es el descrito para cualquiera de la primera, segunda o tercera realizaciones, en donde el caudal de la etapa de lavado es menor que el caudal de carga. En particular, el caudal de la etapa de carga es aproximadamente 150 cm/h a aproximadamente 250 cm/h y el caudal de la etapa de lavado es de aproximadamente 50 cm/h a aproximadamente 150 cm/h, por ejemplo, el caudal de la etapa de carga es de aproximadamente 175 cm/h a aproximadamente 225 cm/h y el caudal de la etapa de lavado es aproximadamente 75 cm/h a aproximadamente 125 cm/h. En particular, el caudal de la etapa de carga es de aproximadamente 200 cm/h y el caudal de la etapa de lavado es de aproximadamente 100 cm/h.

En una quinta realización, el método es el descrito para cualquiera de la primera, segunda, tercera o cuarta realizaciones, la solución de elución se selecciona de agua, una solución salina acuosa, etilenglicol o propilenglicol o mezclas de los mismos. En particular, la sal incluye cualquier catión de NH_4^+ , K^+ o Na^+ y cualquier anión compuesto por F^- , $[\text{SO}_4]^{-2}$, $[\text{HPO}_4]^{-2}$, acetato o Cl^- o combinaciones de los mismos. Específicamente, la sal es sulfato de amonio.

En una sexta realización, el método es el descrito para cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta o quinta realizaciones, en donde la recogida de elución se retrasa de forma tal que no incluya el primer 2-25 %, el primer 2-10 %, el primer 2-8 %, el primer 4-6 %, el primer 5-10 % o el primer 10-25 % del pico de elución del producto. En una realización más específica, la recogida se retrasa de forma tal que no incluya el primer 5 % del pico de elución del producto. En particular, el eluyente se recoge en fracciones y el tamaño de fracción se ajusta para separar el oligonucleótido diana de las impurezas relacionadas con el producto en fracciones separadas. El tamaño de fracción puede ser determinado fácilmente por el experto en la técnica, dependiendo en parte de la diferencia en el tiempo de elución entre el oligonucleótido y la impureza relacionada con el producto, la cantidad de producto bruto que contiene el oligonucleótido diana y las impurezas relacionadas con el producto a separar, etc.

Asimismo, en la sexta realización, el método es el descrito para cualquiera de la primera, segunda, tercera, cuarta o quinta realizaciones, en donde la recogida de elución no incluye el primer y último 2-25 % del pico de elución del producto. Más específicamente, la recogida de elución no incluye el primer y el último 2-10 %, el primer y el último 2-8 %, el primer y el último 4-6 %, el primer y el último 5-10 % o el primer y el último 10-25 % del pico de elución del producto. En otra realización específica, la recogida de elución no incluye el primer y el último 5 % del pico de elución del producto.

En una realización, la solución de lavado se mantiene constante durante la etapa de lavado, lo cual se conoce como modo de lavado isocrático. De manera alternativa, la solución de lavado se somete a variaciones durante

la etapa de lavado, lo cual se conoce como modo de lavado en gradiente. En el lavado en gradiente, la solución de lavado puede variar de una polaridad o fuerza iónica alta a una polaridad o fuerza iónica baja. La disminución de la polaridad o fuerza iónica puede lograrse mediante la disminución de la concentración de sal de la solución acuosa o el aumento de la relación de volumen del disolvente más polar, p. ej., agua, u otros disolventes polares, p. ej., etilen o propilenglicol con respecto a la solución con mayor contenido de sal. De manera alternativa, la solución de lavado puede variar de una polaridad baja o una resistencia iónica alta a una polaridad alta o resistencia iónica baja. En otra alternativa, una etapa de lavado en gradiente puede ser seguida por una etapa de lavado isocrático o viceversa.

- 10 En una realización, la solución de elución se mantiene constante durante la elución, lo cual se conoce como modo de elución isocrática. De manera alternativa, la solución de elución se somete a variaciones durante la etapa de lavado, lo cual se conoce como modo de elución en gradiente. En la elución en gradiente, la solución de elución puede variar de una fuerza iónica alta o polaridad baja a una fuerza iónica baja o polaridad alta. El aumento de la polaridad o la disminución de la fuerza iónica puede lograrse mediante la disminución de la concentración de sal de la solución acuosa o el aumento de la relación de volumen del disolvente más polar, p. ej., agua, u otro disolvente polar, p. ej., etilen o propilenglicol con respecto a la solución con mayor contenido de sal. De manera alternativa, la solución de elución puede variar de una polaridad baja o una resistencia iónica alta a una polaridad alta o resistencia iónica baja. En otra alternativa, una elución en gradiente puede ser seguida por una elución isocrática, o viceversa.

- 20 En una realización, el método de la presente invención que se describe en la presente también puede eliminar EEI y/o LEI. En otra realización, el método de la presente invención que se describe en la presente puede eliminar al menos una impureza relacionada con el producto seleccionada de una impureza de tipo shortmer, una impureza N+1, una impureza ABásica, una impureza CNEt y una impureza P=O. En otra realización, el método de la presente invención que se describe en la presente puede eliminar una impureza N-1, una impureza P=O y al menos una impureza relacionada con el producto seleccionada de entre una impureza de tipo shortmer que no sea la impureza N-1, una impureza N+1, una impureza ABásica y una impureza CNEt. En otra realización, el método de la presente invención que se describe en la presente puede eliminar una impureza N-1, una impureza P=O, una impureza de tipo shortmer que no sea la impureza N-1, una impureza N+1, una impureza ABásica y una impureza CNEt.

- 35 "Separar un oligonucleótido diana de una mezcla que contiene el oligonucleótido diana y una impureza relacionada con el producto" o "eliminar una impureza relacionada con el producto" significa eliminar al menos 15 %, por ejemplo, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 % o 60 %, de una o más de las impurezas relacionadas con el producto que se describen en la presente, por ejemplo, la impureza N-1, la impureza P=O, la impureza ABásica, la impureza CNEt o la impureza N+1 de la mezcla.

Ejemplificación

- 40 Ejemplo 1: Eliminación de la impureza N-1 o P=O

Materiales:

- 45 Columna: 6,84 mL fenil sefarosa de flujo rápido, sublimación alta

Altura de lecho: 20 cm

Tampón de dilución del producto: sulfato de amonio 850 mM, tris 50 mM, pH 8,5

- 50 Tampón de equilibrio: sulfato de amonio 800 mM, tris 50 mM, pH 8,5

Carga de producto bruto: sulfato de amonio 765 mM, tris 50 mM, pH 8,5

- 55 Tampón de lavado: sulfato de amonio 440 mM, tris 50 mM, pH 8,5

Tampón de elución: sulfato de amonio 40 mM, tris 50 mM, pH 8,5

Arrastre: agua desionizada

- 60 Limpieza en sitio: hidróxido de sodio 1 N

Almacenamiento: hidróxido de sodio 0,1 N

Monitor UV: 295 nm

- 65

Método:

- Preparación de la muestra: La muestra (SEQ ID NO: 2) se diluyó 10 veces con tampón de dilución (la concentración de sulfato de amonio final es 765 mM)

- 5 - Método de ciclos: La columna se equilibró con 4 volúmenes de columna (CVs, por sus siglas en inglés) de sulfato de amonio 800 mM, tris 50 mM, pH 8,5, a 200 cm/h. La muestra se cargó a una velocidad de 200 cm/h con tres capacidades de carga dinámica diferentes:

Para la tanda 1: carga con una capacidad de carga dinámica de 8,8 %.

10

Para la tanda 2: carga con una capacidad de carga dinámica de 47 %.

Para la tanda 3: carga con una capacidad de carga dinámica de 100 %.

- 15 La columna se lavó con 7 CVs de sulfato de amonio 440 mM, tris 50 mM, pH 8,5, a 100 cm/h. La columna se eluyó con 6 CVs de sulfato de amonio 40 mM, tris 50 mM, pH 8,5 a 200 cm/h. La columna se arrastró con 2 CVs de agua desionizada a 200 cm/h. La columna se limpió con 3 CVs de hidróxido de sodio 0,1 N a 200 cm/h y se almacenó en 3 CVs de hidróxido de sodio 0,1 N a 200 cm/h.

- 20 *Resultados:*

La cantidad relativa de eliminación de impurezas N-1 y P=O se proporcionará a continuación en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

- 25 Tabla 1- Eliminación de la impureza N-1

Impureza	% de Concentración en Bruto Inicial	Cantidad en Producto Eluido de HCl a una carga baja (4 mg/mL) tanda 1	Cantidad en Producto Eluido de HCl a una carga media (21 mg/mL) tanda 2	Cantidad en Producto Eluido de HCl a una carga alta (45 mg/mL) tanda 3
N-1	3,2	3,2	2,6	4,4

Tabla 2- Eliminación de la impureza P=O

Impureza	% de Concentración en Bruto Inicial	Cantidad en Producto Eluido de HCl a una carga baja (4 mg/mL) tanda 1	Cantidad en Producto Eluido de HCl a una carga media (21 mg/mL) tanda 2
P=O	2,6	3,9	2,1

- 30 En función de los resultados descritos en las Tablas 1 y 2, es necesario el uso de la capacidad de carga dinámica adecuada para eliminar las impurezas N-1 y P=O.

Ejemplo 2: Relación entre la Capacidad de Carga Dinámica y la eliminación de impurezas P=O

- 35 La evaluación del efecto de la capacidad de carga dinámica sobre la eliminación de la impureza relacionada con el producto P=O se completó utilizando el software Design of Experiment (DesignExpert TMv9). El tipo de diseño estadístico fue un material compuesto central. El tipo de estudio fue de superficie de respuesta. Se realizaron 50 tandas con una columna de fenil sefarosa con una altura de lecho de 20 cm y una capacidad de unión dinámica de 45 mg/mL. El tampón de lavado fue sulfato de amonio 440 mM y el tampón de elución fue sulfato de amonio 40 mM. Se utilizaron siete y seis volúmenes de columna de tampón de lavado y de elución, respectivamente. La SEQ ID NO: 2 se utilizó como el oligonucleótido, utilizando las mismas condiciones que se describieron anteriormente en el Ejemplo 1.

- 40 Los resultados del análisis demuestran que para la impureza P=O existe una mejora en la eliminación de la impureza P=O con una capacidad de carga de 42 %-100 % (es decir, 19 mg/mL-45 mg/mL en el diagrama de la FIG. 1).

45

Ejemplo 3: Relación entre la Capacidad de Carga Dinámica y la eliminación de impurezas N-1

- 50 La evaluación del efecto de la capacidad de carga dinámica sobre la eliminación de la impureza relacionada con el producto N-1 se muestra en la FIG. 2. Se representan cinco tandas en la FIG. 2 que corresponden a una capacidad de carga de 9, 24, 47, 69 y 100 % de 45 mg/mL de un adsorbente hidrófobo. El porcentaje de reducción de N-1 se calculó a partir de las concentraciones de N-1 iniciales en el producto bruto. El análisis concluyó que la relación de carga es el único factor significativo en la reducción de N-1. Por lo tanto, otras

variables son insignificantes para la reducción de N-1 según el análisis estadístico.

Materiales:

- 5 Columna: 6,84 mL fenil sefarosa de flujo rápido, sublimación alta (Ge Healthcare Life Sciences, P/C: 17-0973-05)

Altura de lecho: 20 cm

- 10 Tampón de dilución del producto: sulfato de amonio 850 mM, tris 50 mM, pH 8,5

Tampón de equilibrio: sulfato de amonio 800 mM, tris 50 mM, pH 8,5

Carga de producto bruto: sulfato de amonio 765 mM, tris 50 mM, pH 8,5

- 15 Tampón de lavado: sulfato de amonio 440 mM, Tris 50 mM, pH 8,5 sulfato de amonio 400 mM, Tris 50 mM, pH 8,5

- 20 Tampón de elución: sulfato de amonio 40 mM, Tris 50 mM, pH 8,5 sulfato de amonio 10 mM, Tris 50 mM, pH 8,5

Arrastre: agua desionizada

Limpieza en sitio: hidróxido de sodio 1 N

- 25 Almacenamiento: hidróxido de sodio 0,1 N

Monitor UV: 295 nm

- 30 *Método:*

- Preparación de la muestra: La muestra (SEQ ID NO: 2) se diluyó 10 veces con solución tampón de dilución (concentración de sulfato de amonio final de 765 mM).

- 35 - Método de ciclos: La columna se equilibró con 4 volúmenes de columna (CVs) de sulfato de amonio 800 mM, tris 50 mM, pH 8,5, a 200 cm/h. La muestra se cargó a una velocidad de 200 cm/h a cinco relaciones de carga diferentes

que se observan en la Tabla 3.

- 40

Tabla 3- Variables de DoE para la reducción de N-1 en función de la cantidad de tandas de carga

Cantidad Cargada (%)	Tampón de lavado (mM Sulfato de Amonio, Tris 50 mM, pH 8,5)	Lavado CV	Tampón de lavado (mM Sulfato de Amonio, Tris 50 mM, pH 8,5)	Elución CV
9	440	7	40	6
24	400	10	10	10
47	440	7	40	6
69	400	4	10	2
100	440	7	40	6

La columna se lavó a 100 cm/h con el tampón de lavado y los CVs especificados en la Tabla 3. La columna se eluyó a 200 cm/h con el tampón de elución y los CVs especificados en la Tabla 3. La columna se arrastró con 2 CVs de agua desionizada a 200 cm/h. La columna se limpió con 3 CVs de hidróxido de sodio 1 N a 200 cm/h y se almacenó en 3 CVs de hidróxido de sodio 0,1 N a 200 cm/h.

- 45

Tal como se muestra en la FIG. 2, hay una mejora en la eliminación de la impureza N-1 con una capacidad de carga de 40 % a 78 %.

- 50

Ejemplo 4. Eliminación de la impureza ABásica, CNET o N+1

Materiales:

- 55 Columna: 81 mL empaquetada con fenil sefarosa de flujo rápido, sublimación alta

ES 2 988 362 T3

Altura del Lecho: 15 cm; Diámetro del Lecho: 2,6 cm

Tampón de Dilución del Producto: sulfato de amonio 575 mM, tris 50 mM, pH 8,5

5 Tampón de equilibrio: sulfato de amonio 500 mM, tris 50 mM, pH 8,5

Carga de producto bruto: sulfato de amonio 500 mM, tris 50 mM, pH 8,5

10 Tampón de lavado: sulfato de amonio 250 mM, tris 50 mM, pH 8,5

Tampón de elución: sulfato de amonio 10 mM, tris 50 mM, pH 8,5

Arrastre: agua

15 Limpieza en sitio: hidróxido de sodio 1 N

Almacenamiento: hidróxido de sodio 0,1 N

Monitor UV: 295 nm

20

Método:

-Preparación de la muestra: La muestra bruta (SEQ ID NO: 1) se diluyó 7,7 veces con tampón de dilución del producto (la concentración de sulfato de amonio final es 500 mM).

25

-Método de columna de cromatografía: La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna (CVs) de sulfato de amonio 500 mM, tris 50 mM, pH 8,5, a 150 cm/h. La muestra bruta diluida se cargó a un caudal de 150 cm/h a una capacidad de carga dinámica de 47 % (26,5 mg de producto/mL de resina).

30 La columna se lavó con 7 CVs de sulfato de amonio 250 mM, tris 50 mM, pH 8,5 a 75 cm/h. La columna se eluyó con 9 CVs de sulfato de amonio 10 mM, tris 50 mM, pH 8,5 a 150 cm/h y se recogió el pico. La columna se arrastró con 3 CVs de agua desionizada a 150 cm/h. La columna se limpió con 3 CVs de hidróxido de sodio 1 N a 150 cm/h y se almacenó en 3 CVs de hidróxido de sodio 0,1 N a 150 cm/h.

35 *Resultados:*

La cantidad relativa de eliminación de impurezas ABásicas, CNet y N+1 con respecto a la cantidad en el producto bruto se proporcionará a continuación en las Tablas 4, 5 y 6, respectivamente.

40 Tabla 4- Eliminación de la impureza ABásica

Impureza	% de Concentración en Bruto Inicial	% en Producto Eluido de HCl
ABásica	0,34	0,19

Tabla 5- Eliminación de la impureza CNet

Impureza	% de Concentración en Bruto Inicial	% en Producto Eluido de HCl
N+1	0,31	0,20

Tabla 6- Eliminación de la impureza N+1

Impureza	% de Concentración en Bruto Inicial	% en Producto Eluido de HCl
N+1	1,25	0,20

45

En función de los resultados descritos en las Tablas 4, 5 y 6, la carga de la columna de HIC en el centro de su capacidad de carga dinámica permite la eliminación de las impurezas ABásicas, CNet y N+ 1.

REIVINDICACIONES

1. Un método para separar un oligonucleótido diana de una mezcla que contiene el oligonucleótido diana y una impureza relacionada con el producto, comprendiendo el método las etapas de:
5 a) añadir sal a la mezcla, en donde la sal es sulfato de amonio;
b) poner en contacto la mezcla diluida con un adsorbente hidrófobo a una capacidad de carga dinámica de aproximadamente 32 a aproximadamente 78 % de la capacidad del adsorbente hidrófobo, en donde el
10 adsorbente hidrófobo comprende fenilo o hexilo;
c) lavar el adsorbente hidrófobo con una solución salina acuosa;
d) eluir el oligonucleótido diana con una solución de elución; y
15 e) recoger el eluyente que comprende el oligonucleótido diana;
en donde la impureza relacionada con el producto incluye al menos una impureza N-1, separando con ello el oligonucleótido diana de la impureza relacionada con el producto.
20 2. Un método para separar un oligonucleótido diana de una mezcla que contiene el oligonucleótido tiolado diana y una impureza relacionada con el producto, comprendiendo el método las etapas de:
a) añadir sal a la mezcla, en donde la sal es sulfato de amonio;
25 b) poner en contacto la mezcla diluida con un adsorbente hidrófobo a una capacidad de carga dinámica de aproximadamente 40 a aproximadamente 100 % de la capacidad del adsorbente hidrófobo, en donde el adsorbente hidrófobo comprende fenilo o hexilo;
c) lavar el adsorbente hidrófobo con una solución salina acuosa;
30 d) eluir el oligonucleótido diana con una solución de elución; y
e) recoger el eluyente que comprende el oligonucleótido diana;
35 en donde la impureza relacionada con el producto incluye al menos una impureza P=O, separando con ello el oligonucleótido diana de la impureza relacionada con el producto.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la sal se añade a la mezcla como una solución salina acuosa o la sal se disuelve directamente en la mezcla y en donde el caudal de la etapa de lavado es menor que el caudal de carga.
40 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución de elución se selecciona de agua, una solución salina acuosa, etilenglicol o propilenglicol o mezclas de los mismos.
45 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la recogida de la elución se retrasa de forma tal que no incluya el primer 1-25 %, 10-25 % o 5-10 % del pico de elución del producto o el último 1-25 %, 5-10 % o 10-25 % del pico de elución del producto.
50 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el adsorbente hidrófobo se empaqueta a una altura de lecho de al menos 15 cm.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el oligonucleótido diana comprende 15 a 25 nucleótidos.
55 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el oligonucleótido diana comprende nucleobases seleccionadas independientemente del grupo que consiste en adenina, guanina, timina (5-metil uracilo), citosina, hipoxantina, xantina, 7-metil guanina, 5,6-dihidrouracilo, 5-metilcitosina, 7-deaza purina y 5-hidroximetilcitosina, opcionalmente en donde las nucleobases se seleccionan del grupo que consiste en adenina, guanina, timina (5-metil uracilo) y 5-metilcitosina.
60 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el oligonucleótido diana comprende azúcar que está sustituido en la posición 2 'con $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$, $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$ y $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, en donde n y m son independientemente de 1 a aproximadamente 10, opcionalmente en donde el azúcar está sustituido en 2 'con $O(CH_2)_2OCH_3$.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el oligonucleótido diana comprende solamente ARN, solamente ADN, o una combinación de ARN y ADN, opcionalmente en donde el oligonucleótido diana es un gápmero.
- 5 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el oligonucleótido diana incluye fosfodiésteres (P=O), fosforotioatos (P=S), o una combinación de los mismos.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la secuencia del oligonucleótido diana es (SEQ ID NO: 1) o (SEQ ID NO: 2).
- 10 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el oligonucleótido diana comprende 4,4'-dimetoxitritilo (DMT).
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la capacidad de carga dinámica es aproximadamente 40 a aproximadamente 75 % de la capacidad de carga del adsorbente hidrófobo y en donde la impureza relacionada con el producto incluye al menos una impureza N-1 y al menos una impureza P=O.
- 15 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la impureza relacionada con el producto incluye, además, al menos una impureza ABásica, al menos una impureza CNEt o al menos una impureza N+1.
- 20

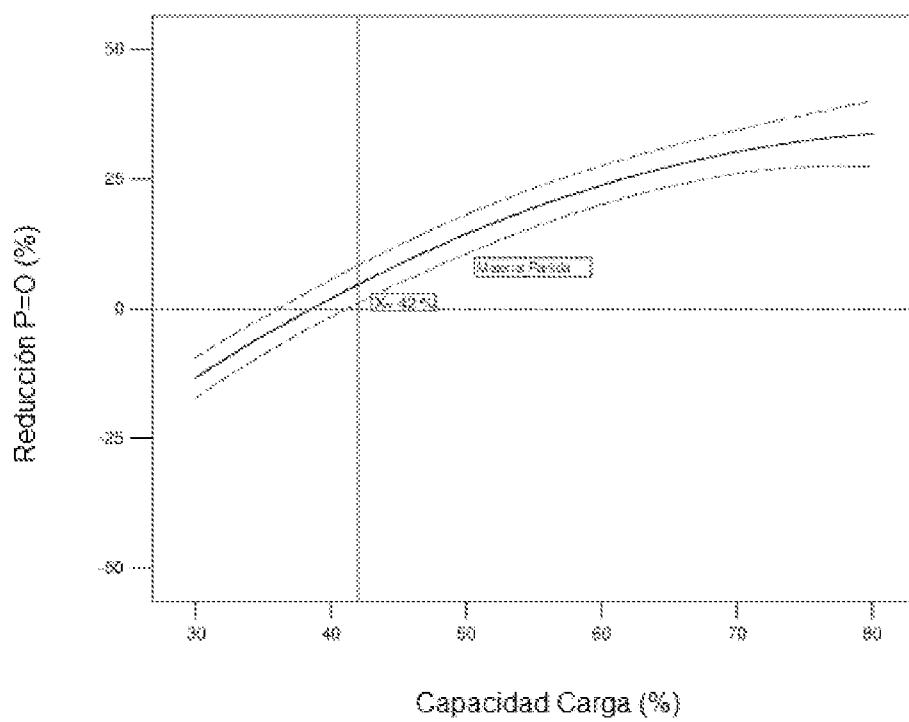


FIG. 1

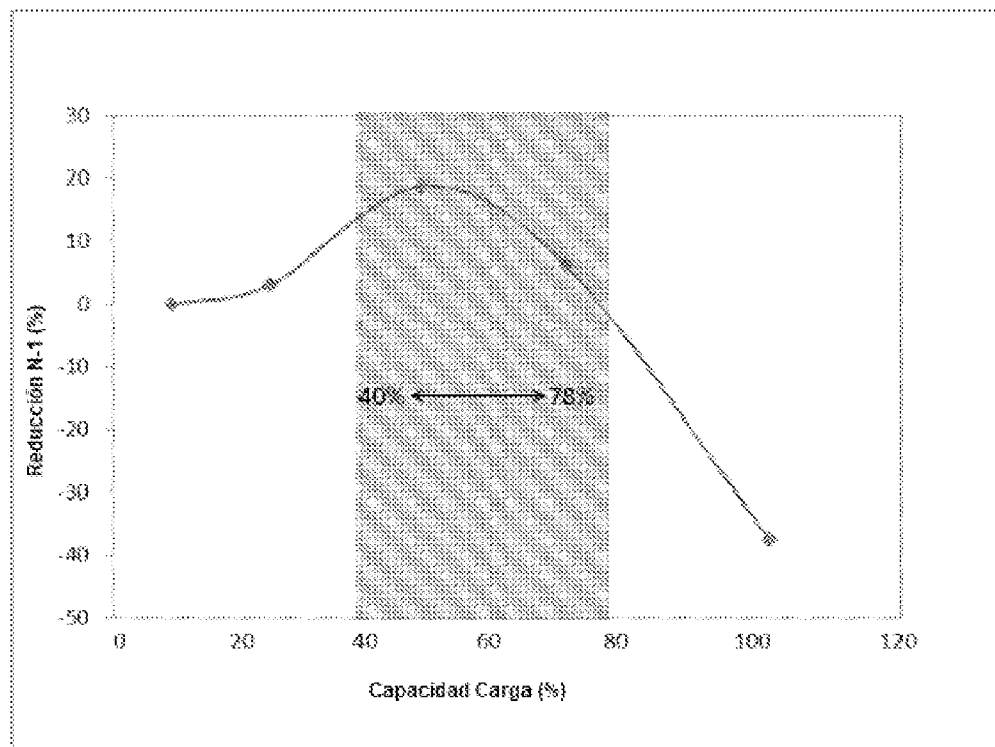


FIG. 2

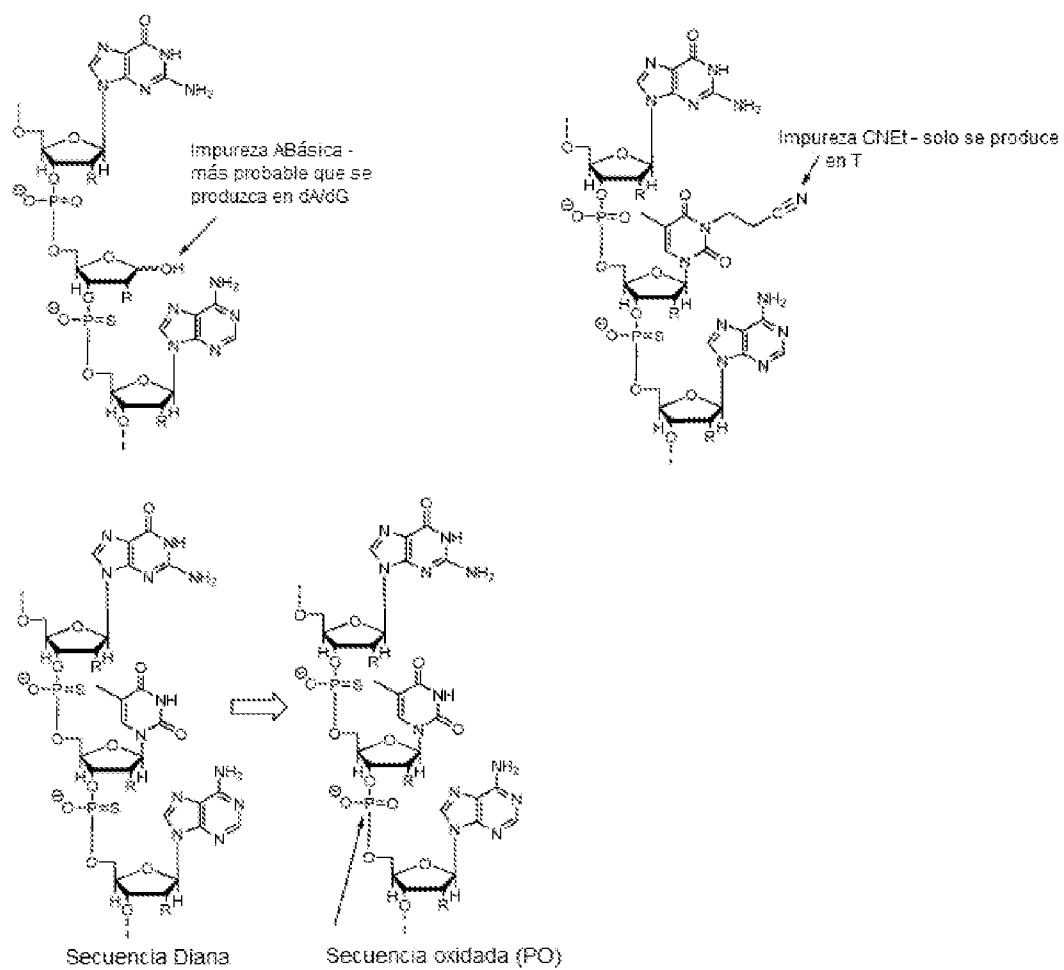


FIG. 3