

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 831 419**

51 Int. Cl.:

C07H 1/00 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2017 PCT/EP2017/067049**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.01.2018 WO18011067**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2017 E 17739936 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2020 EP 3481838**

54 Título: **Nuevos procedimientos para la producción de oligonucleótidos**

30 Prioridad:

11.07.2016 GB 201612011

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

08.06.2021

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY
DEVELOPMENT LIMITED (100.0%)
980 Great West Road, Brentford
Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**CRAMERI, ANDREAS;
HILL, MALCOLM LEITHHEAD;
LOVELOCK, SARAH LOUISE;
SCHOBBER, MARKUS;
TEW, DAVID GRAHAM y
THOMAS, PAMELA JOAN**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 831 419 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

Nuevos procedimientos para la producción de oligonucleótidos

Campo de la invención

La invención se refiere a nuevos procedimientos para la producción de oligonucleótidos que son adecuados para su uso en la producción de oligonucleótidos modificados químicamente, tal como los que se utilizan en terapia.

Antecedentes de la invención

La síntesis química de oligonucleótidos y oligonucleótidos modificados mediante química de fosforamidita está bien establecida y ha sido el procedimiento de elección para la síntesis de estos biopolímeros de secuencia definida durante varias décadas. El procedimiento sintético se ejecuta habitualmente como una síntesis en fase sólida en la que se añaden secuencialmente nucleótidos únicos necesitando cada nucleótido un ciclo de varias etapas químicas para añadir y desproteger el oligonucleótido en crecimiento ("oligo") en la preparación para la etapa posterior. Al final de la adición de nucleótidos secuencial el oligo se libera del soporte de la fase sólida, tiene lugar una desprotección adicional, y luego el oligonucleótido en bruto se purifica mediante cromatografía en columna.

Aunque este procedimiento puede considerarse rutinario y se puede automatizar, esta metodología tiene varias deficiencias, especialmente si el objetivo es preparar oligonucleótidos a gran escala como sería necesario para los oligonucleótidos terapéuticos. Estas deficiencias incluyen, pero no se limitan a:

1) Limitaciones prácticas inherentes al uso de la cromatografía que la hacen inadecuada para la purificación de grandes cantidades de oligonucleótidos. El uso de cromatografía a gran escala es caro y es difícil de conseguir debido a las limitaciones de tamaño y de ejecución de la columna.

2) El número de errores aumenta con la longitud del oligonucleótido que se está sintetizando. En consecuencia, la naturaleza secuencial lineal del procedimiento actual da como resultado una disminución geométrica del rendimiento. Por ejemplo, si el rendimiento de cada ciclo de adición de nucleótidos es del 99 % entonces el rendimiento de un 20 mero sería del 83 %.

3) Limitaciones a escala con los sintetizadores de oligonucleótidos sintéticos y la purificación corriente abajo y el equipo de aislamiento: hasta el presente, la cantidad máxima de producto que se puede producir en un único lote es del orden de 10 kg.

Existe una necesidad, por lo tanto, tanto de reducir (o idealmente eliminar) la cromatografía en columna y llevar a cabo la síntesis de manera que no sea puramente secuencial con el fin de aumentar el rendimiento.

A menudo se utiliza una ADN polimerasa para sintetizar oligonucleótidos para su uso en biología molecular y aplicaciones similares. Sin embargo, la ADN polimerasa no es adecuada para sintetizar oligonucleótidos terapéuticos debido a las longitudes relativamente cortas de los oligonucleótidos y a la necesidad de discriminar entre nucleótidos con diferentes modificaciones de la desoxirribosa o la ribosa. Por ejemplo, los oligonucleótidos terapéuticos a menudo tienen un intervalo de 20 a 25 nucleótidos. La ADN polimerasa necesita al menos 7 u 8 nucleótidos, y óptimamente de 18 a 22 nucleótidos, con un cebador en cada dirección se gana poco intentando sintetizar un oligo terapéutico si los cebadores son similares en tamaño al producto deseado. Además, la ADN polimerasa necesita que estén presentes todos los nucleótidos en la reacción y se basa en el apareamiento de bases de Watson-Crick para alinear los nucleótidos entrantes. Por lo tanto es incapaz de discriminar entre cualquier disposición de modificaciones de la desoxirribosa o la ribosa, tales como las requeridas por un oligómero con huecos, y el resultado sería una mezcla de modificaciones de desoxirribosa o ribosa en una posición determinada.

Sumario de la invención

La invención proporciona un procedimiento para la producción de un producto oligonucleotídico de cadena sencilla que tiene al menos un resto nucleotídico modificado, en el que la modificación se selecciona de entre el grupo que consiste en la modificación en la posición 2' del resto de azúcar, la modificación de la base nucleica, y la modificación del armazón, y en el que el producto se produce a escala de gramos o kilogramos, o mayor, y/o el procedimiento se lleva a cabo en un reactor de 1 l o mayor, que comprende:

- a) proporcionar un oligonucleótido matriz (I) complementario de la secuencia del producto, teniendo dicha matriz propiedades que le permiten que se separe del producto;
- b) proporcionar un agrupamiento de oligonucleótidos (II) que contenga oligonucleótidos que sean segmentos de la secuencia del producto, en el que al menos un segmento contenga al menos un resto nucleotídico modificado y en el que la modificación se selecciona de entre el grupo que consiste en la modificación en la posición 2' del resto de azúcar, la modificación de la base nucleica, y la modificación del armazón;
- c) poner en contacto (I) y (II) en condiciones que permitan la hibridación;
- d) unir el segmento de oligonucleótidos mediante unión enzimática con una ligasa para formar el producto;
- e) cambiar las condiciones para separar cualquier impureza, que comprende la desnaturalización de la matriz hibridada y las cadenas de oligonucleótidos impuro y la separación de las impurezas;
- f) cambiar las condiciones para separar el producto, que comprende la desnaturalización de la matriz hibridada y

las cadenas del producto oligonucleotídico y la separación del producto; y g) reciclar la matriz para su uso en futuras reacciones.

Dicho procedimiento se puede utilizar para generar un producto oligonucleotídico de cadena sencilla y aislarlo de las impurezas, por ejemplo, como un procedimiento de fabricación y purificación.

- 5 El documento WO01/64864A2 desvela una recombinación mediada por una matriz de ácido nucleico de cadena sencilla, el documento WO01/71037A1 desvela procedimientos de detección de la polinucleótido cinasa, el documento US6004826A desvela un procedimiento mediado por reparación para la amplificación y detección de secuencias de ácido nucleico y el documento WO2009/097673A1 desvela la síntesis de ADN de cadena sencilla.

Descripción de las figuras

- 10 FIG. 1 Esquema del procedimiento de la invención, que incluye una etapa de cambio de condiciones para retirar las impurezas, por ejemplo, una etapa de lavado.
FIG. 2 Esquema del procedimiento de la invención, que incluye las etapas de unión/ligamiento del segmento de oligonucleótidos para formar el producto y el cambio de condiciones para retirar las impurezas.
FIG. 3 Esquema de configuraciones de matriz múltiple.
- 15 FIG. 4 Esquema básico del procedimiento de la invención que se lleva a cabo en un sistema de flujo.
FIG. 5 Esquema básico del procedimiento de la invención que se lleva a cabo en un sistema de flujo: a) sección de ligamiento químico, b) sección de ligamiento purificación, y c) sección de ligamiento químico alternativo, y d) sección de purificación alternativa. P.D. las secciones a) y b) (alternativamente c) y d)) se pueden llevar a cabo en una única etapa, por ejemplo, el matraz de recolección en a) = resultado de la etapa de ligamiento en b).
- 20 FIG. 6 Ejemplos de impurezas que se pueden generar durante el procedimiento de la invención.
FIG. 7 Cromatograma que muestra los resultados de una reacción de ligamiento utilizando la ligasa comercial NEB T4 (SEQ ID NO: 3) y ADN no modificado (Ejemplo 1).
FIG. 8 Cromatograma que muestra los resultados de una reacción de ligamiento utilizando una ligasa T4 unida a PERLOZA (SEQ ID NO: 4) y ADN no modificado (Ejemplo 1).
- 25 FIG. 9 Cromatograma que muestra los resultados de una reacción de ligamiento utilizando una ligasa T4 unida a PERLOZA que se expresa de acuerdo con el Ejemplo 2 y fragmentos oligonucleotídicos modificados en 2'-OMe.
FIG. 10 Pistas de HPLC del Ejemplo 4: Pista superior (a) - Control sin ligasa. Pista inferior (b) - A4 hecho. El producto y la matriz se co-eluyen en este procedimiento de HPLC. Se pueden ver dos fragmentos intermedios de ligamiento (segmentos) en la pista del Clon A4 a los 10,3 y 11,2 minutos.
- 30 FIG. 11 Esquema del "eje tri-matriz" que se utiliza en el Ejemplo 13, que comprende un material de soporte al que se hace referencia como "eje" y tres secuencias de matriz.
FIG. 12 Esquema del "eje tri-matriz" que se utiliza en el Ejemplo 13.
FIG. 13 Esquema del aparato de filtración sin salida que se utiliza en el Ejemplo 14.
FIG. 14. Esquema del aparato de filtración de flujo cruzado que se utiliza en el Ejemplo 14.
- 35 FIG. 15 Cromatogramas que muestran los resultados de los experimentos de filtración sin salida utilizando la membrana NADIR MWCO de 10 kDa a 60 °C del Ejemplo 14. La Figura a) es un cromatograma de la solución del retenido, que permanece en la celda de filtración y que contiene principalmente el eje tri-matriz, después de dos volúmenes de diafiltración; y el cromatograma b) es del permeado, una solución enriquecida en el producto después de dos volúmenes de diafiltración.
- 40 FIG. 16 Cromatogramas que muestran los resultados de los experimentos de filtración de flujo cruzado utilizando la membrana Snyder MWCO de 5 kDa a 50 °C y una presión de 3,0 bares, del Ejemplo 14, la Figura a) es un cromatograma de la solución del retenido, que contenía principalmente el eje tri-matriz y el producto, después de 20 volúmenes de diafiltración; y la Figura b) es un cromatograma del permeado, que contenía principalmente los oligonucleótidos del segmento, después de 20 volúmenes de diafiltración.
- 45 FIG. 17 Cromatogramas que muestran los resultados de los experimentos de filtración de flujo cruzado utilizando la membrana Snyder COPM de 5 kDa a 80 °C y una presión de 3,1 bares, del Ejemplo 14. La Figura 17 muestra a) un cromatograma de la solución del retenido, que contenía solo el eje tri-matriz, después de 20 volúmenes de diafiltración; y la Figura b) es un cromatograma de la solución de permeado, que contenía solo el producto, después de 2 volúmenes de diafiltración.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

- Como se utiliza en el presente documento, el término "oligonucleótido", u "oligo" para abreviar, significa un polímero de restos nucleotídicos, sea de desoxirribonucleótido (en los que el oligonucleótido resultante es un ADN), ribonucleótido (en el que el oligonucleótido resultante es un ARN), o una mezcla de los mismos. Un oligonucleótido puede estar compuesto completamente de restos de nucleótido como se encuentra en la naturaleza o puede contener al menos un nucleótido, o al menos un ligamiento entre nucleótidos, que se ha modificado. Los oligonucleótidos pueden ser de cadena sencilla o de cadena doble. Un oligonucleótido de la invención puede conjugarse con otra molécula, por ejemplo, la N-Acetilgalactosamina (GalNAc) o múltiplos de la misma (agrupamientos GalNAc).
- 55

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "oligonucleótido terapéutico" significa un oligonucleótido que

tiene una aplicación terapéutica. Dicho oligonucleótido contiene normalmente uno o más restos de nucleótido o ligamientos modificados. Los oligonucleótidos terapéuticos actúan mediante uno o más mecanismos diferentes, que incluyen, pero no se limitan a, antisentido, cambio de corte y empalme o salto de exón, inmunoestimulación y ARN de interferencia (ARNi), por ejemplo, microARN (miARN) y ARN de interferencia pequeño (ARNip). Un oligonucleótido terapéutico puede ser un aptámero. Los oligonucleótidos terapéuticos tendrán habitualmente, pero no siempre, una secuencia definida.

Como se utiliza en el presente documento, El término "matriz" significa un oligonucleótido con una secuencia que sea un 100% complementaria de la secuencia de la diana (o producto) oligonucleotídica.

A menos de que se especifique otra cosa, como se utiliza en el presente documento, el término "complementario" significa un 100% complementario.

Como se utiliza en el presente documento, el término "producto" significa el oligonucleótido deseado, que tiene una secuencia específica, al que también se hace referencia en el presente documento como un "oligonucleótido diana".

Como se utiliza en el presente documento, el término "agrupamiento" se refiere a un grupo de oligonucleótidos que puede variar de secuencia, pueden ser más cortos o más largos que la secuencia diana, y puede que no tengan la misma secuencia que la secuencia diana. El agrupamiento de oligonucleótidos puede ser el producto de una síntesis oligonucleotídica, por ejemplo, una síntesis química en fase sólida mediante química de fosforamidita, que se utilice con o sin purificación. El agrupamiento de oligonucleótidos puede estar compuesto por segmentos de la secuencia diana. Cada segmento en sí mismo puede estar presente como un agrupamiento de ese segmento y puede ser el producto de síntesis oligonucleotídica, por ejemplo, una síntesis química en fase sólida mediante química de fosforamidita.

Como se utiliza en el presente documento, El término "hibridación" significa la hibridación de oligonucleótidos complementarios de una manera específica de la secuencia. Las "condiciones que permiten la hibridación" dependerán de la T_m de los oligonucleótidos complementarios hibridados y serán evidentes para el experto en la técnica. Por ejemplo, la temperatura de hibridación puede estar por debajo de la T_m de los oligonucleótidos hibridados. De manera alternativa, la temperatura de hibridación puede estar próxima a la T_m de los oligonucleótidos hibridados, por ejemplo, ± 1 , 2 o 3 °C. La temperatura de hibridación no es, en general, más alta de 10 °C por encima de la T_m de los oligonucleótidos hibridados. Las condiciones específicas que permiten la hibridación son las que se esbozan en la sección de ejemplos.

Como se utiliza en el presente documento, el término "desnaturalización" en relación con un oligonucleótido de cadena doble se utiliza para significar que las cadenas complementarias no permanecen hibridadas. La desnaturalización se produce como resultado de un cambio en las condiciones y a veces se hace referencia a esta en el presente documento como separación de las cadenas de oligonucleótido. Dicha separación de cadenas se puede hacer, por ejemplo, mediante una elevación de la temperatura, un cambio del pH, o cambiando la concentración de sales de la solución tampón. La desnaturalización de un oligonucleótido de cadena doble (un "dúplex") da como resultado que se "libere" de la matriz un oligonucleótido de cadena sencilla que podría ser un producto o una impureza.

Como se utiliza en el presente documento, El término "impureza" o "impurezas" significa oligonucleótidos que no tienen la secuencia del producto deseado. Estos oligonucleótidos pueden incluir oligonucleótidos que sean más cortos que el producto (por ejemplo, más cortos en 1, 2, 3, 4, 5 o más restos de nucleótido), y que sean más largos que el producto (por ejemplo, más largos en 1, 2, 3, 4, 5 o más restos de nucleótido). Cuando el procedimiento de producción incluye una etapa por la que se forman ligamientos entre los segmentos, las impurezas incluyen oligonucleótidos que permanecen si hay un fallo en la formación de uno o más de los ligamientos. Las impurezas incluyen también oligonucleótidos cuando se han incorporado nucleótidos incorrectos, dando como resultado una falta de coincidencia cuando se compara con la matriz. Una impureza puede tener una o más de las características descritas anteriormente. La Figura 6 muestra algunas de las impurezas que pueden existir.

Como se utiliza en el presente documento, el término "segmento" es una parte más pequeña de un oligonucleótido más largo, en particular una parte más pequeña de un producto o diana oligonucleotídica. Para un producto determinado, el producto se forma cuando todos sus segmentos se hibridan a su matriz y se ligan en conjunto.

Como se utiliza en el presente documento, La expresión "ligamiento enzimático" significa que la unión entre dos nucleótidos adyacentes se forma de manera enzimática. Este ligamiento puede ser un enlace fosfodiéster (PO) de origen natural, o un ligamiento modificado que incluye, pero no se limita a, fosforotioato (PS) o fosforoamidato (PA).

Como se utiliza en el presente documento, el término "ligasa" significa una enzima que cataliza la unión, es decir, la unión covalente, de dos moléculas de oligonucleótido, por ejemplo, mediante la formación de un enlace fosfodiéster entre el extremo 3' de un oligonucleótido (o segmento) y el extremo 5' del mismo u otro oligonucleótido (o segmento). A menudo se hace referencia a estas enzimas como ADN ligasas o ARN ligasas y utilizan los cofactores: El ATP (en ADN ligasas de eucariotas, víricas y arcaicas) o el NAD (en ADN ligasas de procariotas). A pesar de su existencia en todos los organismos, las ADN ligasas muestran una amplia diversidad de secuencias de aminoácidos, tamaños moleculares y propiedades (Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 28, N.º 21, 4051-4058). Habitualmente son miembros de la Clase Enzimática EC 6,5 según define la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, es decir, las

ligasas que se utilizan para formar enlaces de éster fosfórico. Dentro del ámbito de la invención hay una ligasa capaz de unir un oligonucleótido no modificado a otro oligonucleótido no modificado, una ligasa capaz de unir un oligonucleótido no modificado a un oligonucleótido modificado (es decir, un oligonucleótido modificado en 5' a un oligonucleótido no modificado en 3', y un oligonucleótido no modificado en 5' a un oligonucleótido modificado en 3'), así como una ligasa capaz de unir un oligonucleótido modificado a otro oligonucleótido modificado.

Como se utiliza en el presente documento, una "ligasa termoestable" es una ligasa que es activa a temperaturas elevadas, es decir, por encima de la temperatura del cuerpo humano, es decir, por encima de 37 °C. Una ligasa termoestable puede estar activa a, por ejemplo, 40 °C - 65 °C; o 40 °C - 90 °C; y así.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "resto nucleotídico modificado" u "oligonucleótido modificado" significa un resto nucleotídico u oligonucleótido que contiene al menos un aspecto de su química que es diferente de un resto nucleotídico u oligonucleótido de origen natural. Dichas modificaciones pueden producirse en cualquier parte del resto nucleotídico, por ejemplo, el azúcar, la base o el fosfato. Se desvelan posteriormente ejemplos de modificaciones en los nucleótidos.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "ligasa modificada" significa una ligasa que se diferencia de una ligasa de origen natural, "tipo silvestre", en uno o más restos de aminoácido. Dichas ligasas no se encuentran en la naturaleza. Dichas ligasas son útiles en los nuevos procedimientos de la invención. Se desvelan posteriormente ejemplos de ligasas modificadas. Las expresiones "ligasa modificada" y "ligasa mutante" se utilizan de manera intercambiable.

Como se utiliza en el presente documento, La expresión "oligómero con huecos" significa un oligonucleótido que tiene un "segmento con huecos" interno flanqueado por dos "segmentos alados" externos, en el que el segmento con huecos consiste en una pluralidad de nucleótidos que soportan la escisión por RNasa H y cada segmento alado consiste en uno o más nucleótidos que son químicamente distintos de los nucleótidos de dentro del segmento con huecos.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "material de soporte" significa un compuesto o material de alto peso molecular que aumenta el peso molecular de la matriz, permitiendo de esta manera que se retenga cuando se separan las impurezas y los productos de la mezcla de reacción.

Como se utiliza en el presente documento "el tanto por ciento de identidad" entre una secuencia de ácido nucleico de búsqueda y una secuencia de ácido nucleico objeto es el valor de las "identidades", expresado como un porcentaje, que se calcula mediante el algoritmo BLASTN cuando una secuencia de ácido nucleico objeto tiene un 100% de cobertura de búsqueda con una secuencia de ácido nucleico de búsqueda después de llevarse a cabo un alineamiento BLASTN por pares. Dichos alineamientos BLASTN por pares entre una secuencia de ácido nucleico de búsqueda y una secuencia de ácido nucleico objeto se llevan a cabo utilizando los ajustes por defecto del algoritmo BLASTN disponible en el sitio de internet del Centro Nacional para el Instituto de Biotecnología, con el filtro de regiones de baja complejidad apagado. De manera importante, una secuencia de ácido nucleico de búsqueda puede describirse como una secuencia de ácido nucleico identificada en una o más de las reivindicaciones del presente documento. La secuencia de búsqueda puede ser un 100 % idéntica a la secuencia objeto, o puede incluir hasta cierto número entero de alteraciones de nucleótidos en comparación con la secuencia objeto de manera que el % de identidad sea menor del 100 %. Por ejemplo, la secuencia de búsqueda es al menos un 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99 % idéntica a la secuencia objeto.

Declaración de la invención

En un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para la producción de un producto oligonucleotídico de cadena sencilla que tiene al menos un resto nucleotídico modificado, en el que la modificación se selecciona de entre el grupo que consiste en la modificación en la posición 2' del resto de azúcar, la modificación de la base nucleica, y la modificación del armazón, y en el que el producto se produce a escala de gramos o kilogramos, o más, y/o el procedimiento se lleva a cabo en un reactor de 1 l o mayor, que comprende:

- a) proporcionar un oligonucleótido matriz (I) complementario de la secuencia del producto, teniendo dicha matriz propiedades que le permiten que se separe del producto;
- b) proporcionar un agrupamiento de oligonucleótidos (II) que contenga oligonucleótidos que sean segmentos de la secuencia del producto, en el que al menos un segmento contenga al menos un resto nucleotídico modificado y en el que la modificación se selecciona de entre el grupo que consiste en la modificación en la posición 2' del resto de azúcar, la modificación de la base nucleica, y la modificación del armazón;
- c) poner en contacto (I) y (II) en condiciones que permitan la hibridación;
- d) unir el segmento de oligonucleótidos mediante unión enzimática con una ligasa para formar el producto;
- e) cambiar las condiciones para separar cualquier impureza, que comprende la desnaturalización de la matriz hibridada y las cadenas de oligonucleótidos impuro y la separación de las impurezas;
- f) cambiar las condiciones para separar el producto, que comprende la desnaturalización de la matriz hibridada y las cadenas del producto oligonucleotídico y la separación del producto; y
- g) reciclar la matriz para su uso en futuras reacciones.

En una realización de la invención, sustancialmente no hay nucleótidos en el vaso de reacción. En una realización de

la invención, no hay nucleótidos en el vaso de reacción. En particular, el vaso de reacción no comprende un agrupamiento de nucleótidos, es decir, la reacción está sustancialmente libre, preferentemente libre, de nucleótidos.

Otra realización de la invención proporciona un procedimiento como se ha descrito anteriormente en el presente documento, por el que la desnaturalización resulta de un aumento de la temperatura.

- 5 Otra realización de la invención proporciona un procedimiento como se ha desvelado anteriormente en el presente documento, por el que los oligonucleótidos del segmento se unen mediante un ligamiento químico. En una realización adicional, el ligamiento químico es una reacción química de clic. En una realización de la invención, el ligamiento químico de los oligonucleótidos del segmento tiene lugar en reacciones de matriz que producen ligamientos de fosforoamidato como detallan Kalinowski y col. en ChemBioChem 2016, 17, 1150 - 1155.
- 10 Otra realización más de la invención proporciona un procedimiento como se ha desvelado anteriormente en el presente documento, de modo que los oligonucleótidos del segmento tienen de 3 a 15 nucleótidos de longitud. En una realización adicional de la invención los segmentos tienen de 5 a 10 nucleótidos de longitud. En una realización adicional de la invención los segmentos tienen de 5 a 8 nucleótidos de longitud. En una realización particular hay tres segmentos oligonucleotídicos: un segmento en 5' que tiene 7 nucleótidos de longitud, un segmento central que tiene 6 nucleótidos de longitud y un segmento en 3' que tiene 7 nucleótidos de longitud, que cuando se unen en conjunto forman un oligonucleótido que tiene 20 nucleótidos de longitud (un "20-mero"). En una realización particular hay tres segmentos oligonucleotídicos: un segmento en 5' que tiene 6 nucleótidos de longitud, un segmento central que tiene 8 nucleótidos de longitud y un segmento en 3' que tiene 6 nucleótidos de longitud, que cuando se unen en conjunto forman un oligonucleótido que tiene 20 nucleótidos de longitud (un "20-mero"). En una realización particular hay tres segmentos oligonucleotídicos: un segmento en 5' que tiene 5 nucleótidos de longitud, un segmento central que tiene 10 nucleótidos de longitud y un segmento en 3' que tiene 5 nucleótidos de longitud, que cuando se unen en conjunto forman un oligonucleótido que tiene 20 nucleótidos de longitud (un "20-mero"). En una realización particular hay cuatro segmentos oligonucleotídicos: un segmento en 5' que tiene 5 nucleótidos de longitud, un segmento 5'-central que tiene 5 nucleótidos de longitud, un segmento central-3' que tiene 5 nucleótidos de longitud y un segmento en 3' que tiene 5 nucleótidos de longitud, que cuando se unen en conjunto forman un oligonucleótido que tiene 20 nucleótidos de longitud (un "20-mero").

- Una realización de la invención proporciona un procedimiento como se ha descrito anteriormente en el presente documento, de modo que el producto tiene de 10 a 200 nucleótidos de longitud. En una realización adicional de la invención los productos tienen de 15 a 30 nucleótidos de longitud. En una realización de la invención el producto tiene 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud. En una realización de la invención el producto tiene 20 nucleótidos de longitud, un "20-mero". En una realización de la invención el producto tiene 21 nucleótidos de longitud, un "21-mero". En una realización de la invención el producto tiene 22 nucleótidos de longitud, un "22-mero". En una realización de la invención el producto tiene 23 nucleótidos de longitud, un "23-mero". En una realización de la invención el producto tiene 24 nucleótidos de longitud, un "24-mero". En una realización de la invención el producto tiene 25 nucleótidos de longitud, un "25-mero". En una realización de la invención el producto tiene 26 nucleótidos de longitud, un "26-mero". En una realización de la invención el producto tiene 27 nucleótidos de longitud, un "27-mero". En una realización de la invención el producto tiene 28 nucleótidos de longitud, un "28-mero". En una realización de la invención el producto tiene 29 nucleótidos de longitud, un "29-mero". En una realización de la invención el producto tiene 30 nucleótidos de longitud, un "30-mero".

En una realización de la invención, el procedimiento es un procedimiento para la producción de un oligonucleótido terapéutico. En una realización de la invención, el procedimiento es un procedimiento para la producción de un oligonucleótido terapéutico de cadena sencilla. En una realización de la invención, el procedimiento es un procedimiento para la producción de un oligonucleótido terapéutico de cadena doble.

- 45 Otra realización de la invención proporciona un procedimiento como se ha desvelado anteriormente en el presente documento, en el que la propiedad que permite que la matriz se separe del producto es que la matriz está fijada en un material de soporte. En una realización adicional de la invención, el material de soporte es un material de soporte soluble. En una realización adicional más de la invención, el material de soporte soluble se selecciona del grupo que consiste en: polietilenglicol, un polímero orgánico soluble, ADN, una proteína, un dendrímero, un polisacárido, un oligosacárido, y un carbohidrato. En una realización de la invención el material de soporte es polietilenglicol (PEG). En una realización adicional de la invención, el material de soporte es un material de soporte insoluble. En una realización adicional de la invención el material de soporte es un material de soporte sólido. En una realización adicional, el material de soporte sólido se selecciona de entre el grupo que consiste en: una perla de cristal, una perla polimérica, un soporte fibroso, una membrana, una perla revestida de estreptavidina y celulosa. En una realización el material de soporte es una perla revestida de estreptavidina. En una realización adicional, el material de soporte sólido es parte del propio vaso de reacción, por ejemplo, una pared de reacción.

- Una realización de la invención proporciona un procedimiento como se ha desvelado anteriormente en el presente documento, en el que se fijan múltiples copias repetidas de la matriz de manera continua mediante un único punto de anclaje al material de soporte. Las múltiples copias repetidas de la matriz pueden estar separadas por un engarce, por ejemplo, como se muestra en la Figura 3. Las múltiples copias repetidas de la matriz pueden ser repeticiones directas,

por ejemplo, no se separan por un engarce.

Otra realización más de la invención proporciona un procedimiento como se ha desvelado anteriormente en el presente documento, en el que la propiedad que permite que la matriz se separe del producto es el peso molecular de la matriz. Por ejemplo, las copias repetidas de la secuencia de la matriz pueden estar presentes en un único oligonucleótido, con o sin una secuencia de engarce.

Otra realización de la invención proporciona un procedimiento como se ha desvelado anteriormente en el presente documento, en el que la matriz, o la matriz y el material de soporte, se reciclan para su uso en reacciones futuras, por ejemplo, como se detalla posteriormente. Otra realización de la invención proporciona un procedimiento como se ha desvelado anteriormente en el presente documento, en el que la reacción se lleva a cabo utilizando un procedimiento de flujo continuo o semi-continuo, por ejemplo típico se muestra en la Figuras 4 o la Figura 5.

Como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, el procedimiento es para la fabricación de oligonucleótidos a gran escala, en particular los oligonucleótidos terapéuticos. En el contexto de la presente invención fabricación de oligonucleótidos a gran escala significa la fabricación a una escala mayor o igual a 1 litro, por ejemplo, el procedimiento se lleva a cabo en un reactor de 1 l o mayor. De manera alternativa o adicionalmente, en el contexto de la presente invención fabricación de oligonucleótidos a gran escala significa la fabricación a una escala de gramos de producto, en particular, la producción de más de o igual a 10 gramos de producto. En una realización de la invención, la cantidad de producto oligonucleotídico producido es a escala de gramos. En una realización de la invención la cantidad de producto producido es mayor de o igual a: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 gramos. En una realización de la invención, la cantidad de producto oligonucleotídico producido es mayor de o igual a: 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 o 950 gramos. En una realización de la invención, la cantidad de producto oligonucleotídico producido es de 500 gramos o mayor. En una realización de la invención, la cantidad de producto oligonucleotídico producido es a escala de kilogramos. En una realización de la invención, la cantidad de producto oligonucleotídico producido es de 1 kg o más. En una realización de la invención, la cantidad de producto oligonucleotídico producido es mayor de o igual a: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 kg. En una realización de la invención, la cantidad de producto oligonucleotídico producido es mayor de o igual a: 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 kg.

En una realización de la invención, la cantidad de producto producido está entre 10 gramos y 100 kg. En una realización de la invención, la cantidad de producto producido está entre 10 gramos y 50 kg. En una realización de la invención, la cantidad de producto producido está entre 100 gramos y 100 kg. En una realización de la invención, la cantidad de producto producido está entre 100 gramos y 50 kg. En una realización de la invención, la cantidad de producto producido está entre 500 gramos y 100 kg. En una realización de la invención, la cantidad de producto producido está entre 500 gramos y 50 kg. En una realización de la invención, la cantidad de producto producido está entre 1 kg y 50 kg. En una realización de la invención, la cantidad de producto producido está entre 10 kg y 50 kg.

En una realización de la invención, la fabricación de oligonucleótidos tiene lugar a una escala mayor de o igual a: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 litros, por ejemplo, en un reactor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 l. En una realización de la invención, la fabricación de oligonucleótidos tiene lugar a una escala mayor de o igual a: 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 litros, por ejemplo, en un reactor de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 l. En una realización de la invención, la fabricación de oligonucleótidos tiene lugar a una escala mayor de o igual a: 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 litros, por ejemplo, en un reactor de 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 l.

En una realización de la invención, el volumen del reactor es aproximadamente de 10.000 l, aproximadamente 5000 l, aproximadamente 2000 l, aproximadamente 1000 l, aproximadamente 500 l, aproximadamente 125 l, aproximadamente 50 l, aproximadamente 20 l, aproximadamente 10 l, o aproximadamente 5 l.

En una realización de la invención, el volumen del reactor está entre 5 y 10.000 l, entre 10 y 5000 l, entre 20 y 2000 l, o entre 50 y 1000 l.

Un oligonucleótido de acuerdo con la presente invención tiene al menos una modificación en el armazón, y/o al menos una modificación en el azúcar y/o al menos una modificación en la base en comparación con el oligonucleótido basado en ARN o ADN.

La invención proporciona un procedimiento como se ha desvelado anteriormente en el presente documento, en el que el producto contiene al menos 1 resto nucleotídico modificado. En una realización adicional la modificación está en la posición 2' del resto de azúcar.

Los oligonucleótidos utilizados en el procedimiento de la invención pueden incluir modificaciones del azúcar, es decir, una versión modificada del resto ribosilo, tales como ARN modificado en 2'-O tal como 2'-O-alquilo o 2'-O-alquilo (sustituido) por ejemplo, 2'-O-metilo, 2'-O-(2-cianoetilo), 2'-O-(2-metoxi)etil (2'-MOE), 2'-O-(2-tiometil)etil, 2'-O-butilil, 2'-O-propargil, 2'-O-alil, 2'-O-(3-amino)propil, 2'-O-(3-(dimetilamino)propil), 2'-O-(2-amino)etil, 2'-O-(2-dimetilamino)etil; 2'-desoxi (ADN); 2'-O-(haloalcoxi)metil (Arai K. y col. Bioorg. Med. Chem. 2011, 21, 6285), por ejemplo, 2'-O-(2-cloroetoxi)metil (MCEM), 2'-O-(2, 2-dicloroetoxi)metil (DCEM); 2'-O-alcoxicarbonil, por ejemplo, 2'-O-[2-(metoxicarbonil)etil] (MOCE), 2'-O-[2-(N-metilcarbamoil)etil] (MCE), 2'-O-[2-(N,N-dimetilcarbamoil)etil] (DCME); 2'-

halo, por ejemplo, 2'-F, FANA (2'-F arabinosil ácido nucleico); modificaciones carbazúcar y azazúcar; 3'-O-alquilo, por ejemplo, 3'-O-metil, 3'-O-butil, 3'-O-propargilo; y sus derivados.

En una realización de la invención, la modificación del azúcar se selecciona de entre el grupo que consiste en la 2'-Fluoro (2'-F), 2'-O-metilo (2'- OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), y 2'-amino. En otra realización adicional, la modificación es 2'-MOE.

Otras modificaciones del azúcar incluyen el ácido nucleico "puenteado" o "bicíclico" (BNA), por ejemplo, ácido nucleico bloqueado (LNA), xilo-LNA, α -L-LNA, β -D-LNA, cEt (2'-O,4'-C etilo restringido) LNA, cMOEt (2'-O,4'-C metoxietilo restringido) LNA, ácido nucleico puenteado con etileno (ENA), ADN tricíclico; ácido nucleico no bloqueado (UNA); ácido nucleico ciclohexenilo (CeNA), ácido nucleico altrial (ANA), ácido nucleico hexitol (HNA), HNA fluorado (F-HNA), piranosil-ARN (p-ARN), 3'-desoxipiranosil-ADN (p-ADN); morfolino (como, por ejemplo, en PMO, PPMO, PMOPlus, PMO-X); y sus derivados.

Los oligonucleótidos que se utilizan en el procedimiento de la invención pueden incluir otras modificaciones, tales como un ácido nucleico con base peptídica (PNA), un PNA modificado con boro, ácido nucleico oxi-peptídico basado en pirrolidina (POPNA), ácido nucleico basado en glicol o glicerol (GNA), ácido nucleico basado en treosa (TNA), ácido nucleico basado en treoninol acíclico (aTNA), oligonucleótidos con bases y armazones integrados (ONIB), oligonucleótidos pirrolidina-amida (POM); y sus derivados.

En una realización de la invención, el oligonucleótido modificado comprende un oligómero fosforoamidato morfolino (PMO), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico puenteado (BNA) tal como (S)-cEt-BNA, o un SPIEGELMER.

En una realización adicional, la modificación está en la base nucleica. Las modificaciones de bases incluyen versiones modificadas de las bases de purina y pirimidina naturales (por ejemplo, la adenina, uracilo, guanina, citosina, y timina), tales como la inosina, hipoxantina, el ácido orótico, agmatidina, lisidina, una 2-tiopirimidina (por ejemplo, 2-tiouracilo, 2-tiotimina), G-clamp y sus derivados, una pirimidina sustituida en 5 (por ejemplo, 5-metilcitosina, 5-metiluracilo, 5-halouracilo, 5-propiniluracilo, 5-propinilcitosina, 5-aminometiluracilo, 5-hidroximetiluracilo, 5-aminometilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, Super T), 2,6-diaminopurina, 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, 7-aza-2,6-diaminopurina, 8-aza-7-deazaguanina, 8-aza-7-deazaadenina, 8-aza-7-deaza-2,6-diaminopurina, Super G, Super A, y N4-etilcitosina, o derivados de los mismos; N²-ciclopentilguanina (cPent-G), N²-ciclopentil-2-aminopurina (cPent-AP), and N²-propil-2-aminopurina (Pr-AP), o derivados de las mismas; y bases degeneradas o universales, como el 2,6-difluorotolueno o bases ausentes como en sitios abásicos (por ejemplo, 1-desoxirribosa, 1,2-didesoxirribosa, 1-desoxi-2-O-metilribosa; o derivados de la pirrolidina en los que el anillo de oxígeno se ha sustituido por nitrógeno (azarribosa)). Ejemplos de los derivados de Super A, Super G y Super T se pueden encontrar en el documento US6683173. Se demostró que el cPent-G, cPent-AP y Pr-AP reducen los efectos inmunoestimulantes cuando se incorporan en un ARNip (Peacock H. y col. J. Am. Chem. Soc. (2011), 133, 9200).

En una realización de la invención, la modificación de la base nucleica se selecciona de entre el grupo que consiste en 5-metil pirimidinas, 7-deazaguanosinas y nucleótidos abásicos. En una realización, la modificación es una 5-metil citosina.

Los oligonucleótidos que se utilizan en el procedimiento de la presente invención pueden incluir una modificación del armazón, por ejemplo, una versión modificada del fosfodiéster presente en el ARN, tal como fosfortioato (PS), fosforditioato (PS2), fosfonoacetato (PACE), fosfonoacetamida (PACA), trifosfonoacetato, trifosfonoacetamida, profármaco fosfortioato, H-fosfonato, fosfonato de metilo, fosfontioato de metilo, fosfato de metilo, fosfortioato de metilo, fosfato de etilo, fosfortioato de etilo, boranofosfato, boranofosfortioato, boranofosfato de metilo, boranofosfortioato de metilo, boranofosfonotioato de metilo, boranofosfonotioato de metilo, y sus derivados. Otra modificación incluye fosforamidita, fosforamidato, fosforamidato N3'→P5', fosfordiamidato, fosfordiamidato, sulfamato, dimetilsulfóxido, sulfonato, triazol, oxalilo, carbamato, metilenimino (MMI), y ácido nucleico tioacetamido (TANA); y sus derivados.

En una realización adicional, la modificación está en el armazón y se selecciona de entre el grupo que consiste en: fosfortioato (PS), fosforoamidato (PA) y fosfordiamidato. En una realización de la invención, el oligonucleótido modificado es un oligómero fosforoamidato morfolino (PMO). Un PMO tiene un armazón de metilenomorfolino cíclico con enlaces de fosfordiamidato. En una realización de la invención el producto tiene un armazón de fosfortioato (PS).

En una realización de la invención, el oligonucleótido comprende una combinación de dos o más modificaciones como se desvela anteriormente. Un experto en la técnica apreciará que hay muchos derivados sintéticos de oligonucleótidos.

En una realización de la invención, el producto es un oligómero con huecos. En una realización de la invención las alas 5' y 3' del oligómero con huecos comprende o consiste en nucleótidos modificados en 2'-MOE. En una realización de la invención el segmento del hueco del oligómero con huecos comprende o consiste en nucleótidos que contienen hidrógeno en la posición 2' del resto de azúcar, es decir es tipo-ADN. En una realización de la invención las alas 5' y 3' del oligómero con huecos consiste en nucleótidos modificados en 2'-MOE y el segmento del hueco del oligómero con huecos consiste en nucleótidos que contienen hidrógeno en la posición 2' del resto de azúcar (es decir,

desoxinucleótidos). En una realización de la invención las alas 5' y 3' del oligómero con huecos consiste en nucleótidos modificados en 2'-MOE y el segmento del hueco del oligómero con huecos consiste en nucleótidos que contienen hidrógeno en la posición 2' del resto de azúcar (es decir, desoxinucleótidos) y los enlaces entre todos los nucleótidos son enlaces de fosforotioato.

- 5 Una realización de la invención proporciona un procedimiento como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en el que el producto resultante es más del 90% puro. En una realización adicional, El producto es más del 95 % puro. En una realización adicional, El producto es más del 96 % puro. En una realización adicional, El producto es más del 97 % puro. En una realización adicional, El producto es más del 98 % puro. En una realización adicional, El producto es más del 99 % puro. La pureza de un oligonucleótido puede determinarse utilizando cualquier
- 10 procedimiento adecuado, por ejemplo, por cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC) o espectrometría de masas (MS), en particular cromatografía líquida-MS (LC-MS), HPLC-MS o espectrometría de masas electroforesis capilar (CEMS).

- 15 Otra realización más de la invención proporciona un procedimiento para la producción de oligonucleótidos de cadena doble, en el que se producen 2 oligonucleótidos de cadena sencilla complementarios mediante el procedimiento de cualquier realización precedente y luego se mezclan en condiciones que permitan la hibridación. En una realización, el producto es un ARNip.

- Una realización de la invención proporciona un oligonucleótido producido mediante un procedimiento descrito anteriormente en el presente documento. En una realización de la invención, el oligonucleótido producido es un ARN. En una realización de la invención, el oligonucleótido producido es un ADN. En una realización de la invención, el
- 20 oligonucleótido producido comprende ARN y ADN. En una realización adicional de la invención el oligonucleótido producido es un oligonucleótido modificado. En una realización adicional de la invención el oligonucleótido producido es un oligonucleótido antisentido. En una realización adicional de la invención el oligonucleótido producido es un aptámero. En una realización adicional de la invención el oligonucleótido producido es un miARN. En una realización de la invención, el producto es un oligonucleótido terapéutico.

- 25 La invención desvelada en el presente documento utiliza las propiedades de unión de oligonucleótidos para proporcionar un procedimiento mejorado para su producción. Proporcionando un oligonucleótido de matriz con un 100% de complementariedad con la secuencia diana, y controlando las condiciones de reacción de manera que el producto se pueda liberar y separar en condiciones específicas, se puede obtener un producto con un alto grado de pureza.

- 30 Liberación del producto (o impureza) de la matriz, es decir, desnaturalización del producto (o impureza): matriz dúplex, y separación del producto (o impureza)

- La liberación del producto (o cuando el procedimiento incluye una etapa adicional de liberación de impurezas, cualquier impureza) de la matriz necesita que se rompa un emparejamiento de Watson y Crick entre la cadena oligonucleotídica de la matriz y el producto (o impureza). El producto (o impureza) se puede separar entonces de la matriz. Esto puede
- 35 producirse como dos etapas separadas, o como una etapa combinada.

- La liberación y separación del producto (o impureza) se puede producir en una etapa, si el procedimiento se lleva a cabo en un reactor en columna. La ejecución en un tampón que altere el pH o la concentración de sales, o que contenga un agente químico que altere el emparejamiento de bases (tal como la formamida o urea) se producirá la desnaturalización de las cadenas oligonucleotídicas, y el producto (o impureza) se eluirá en el tampón.

- 40 Cuando el procedimiento se lleva a cabo en otros vasos de reacción, la liberación y separación del producto (o impureza) se puede producir en un procedimiento en dos etapas. Primero, se alteran los pres de bases de Watson-Crick para separar las cadenas, y entonces se retira el producto (o impureza) del vaso de reacción. Cuando la liberación y separación del producto se lleva a cabo como un procedimiento en dos etapas, se puede conseguir la rotura de los pares de bases de Watson-Crick alterando las condiciones del tampón (pH, sal) o la introducción de un agente de
- 45 alteración química (formamida, urea). De manera alternativa, el aumento de la temperatura también producirá la disociación de las dos cadenas. El producto (o impurezas) se puede retirar entonces del vaso de reacción mediante procedimientos que incluyen la separación basada en el peso molecular, la separación basada en la carga, la separación basada en la hidrofobia, separación basada en secuencia específica o una combinación de estos procedimientos.

- 50 Cuando el procedimiento se lleva a cabo en un reactor de flujo continuo o semi-continuo la liberación y separación del producto (o impureza) pueden ser en una etapa o dos etapas. Por ejemplo, la liberación y separación del producto (o impureza) en una etapa se podría efectuar aumentando la temperatura para producir la disociación de las dos cadenas y la separación de las cadenas liberadas basándose en el peso molecular en la misma parte del reactor que es utilizada para elevar la temperatura. La liberación y separación del producto (o impureza) en dos etapas se podría efectuar
- 55 aumentando la temperatura para producir la disociación de las dos cadenas en una parte del reactor y la separación de las cadenas liberadas basándose en el peso molecular en una parte diferente del reactor.

Liberación y separación específicas de impurezas de la matriz, pero manteniendo el producto en la matriz

Las impurezas aparecen cuando se incorpora un nucleótido incorrecto en la cadena del oligonucleótido durante la extensión de la cadena, o cuando la reacción de extensión de la cadena termina prematuramente. Las impurezas también aumentan cuando la reacción incluye la etapa de ligamiento de oligonucleótidos del segmento y hay un fallo en una o más de las etapas de ligamiento. Los tipos de impurezas pueden aumentar como se ilustra en la Figura 6.

- 5 Las propiedades del emparejamiento de Watson-Crick se puede aprovechar para liberar específicamente cualquier impureza unida a la matriz antes de la liberación del producto. Cada oligonucleótido de doble cadena se disociará en condiciones específicas, y esas condiciones son diferentes para las secuencias que no tengan un 100 % de complementariedad cuando se compara con las secuencias con el 100 % de complementariedad. La determinación de dichas condiciones está dentro de las competencias de un experto.
- 10 Una manera común de desnaturalización de oligonucleótidos es aumentando la temperatura. La temperatura a la que la mitad de los pares de bases se disocian, es decir, cuando el 50 % del dúplex está en estado de cadena sencilla, se denomina temperatura de fusión, T_m . El medio más fiable y preciso de determinación de la temperatura de fusión es empíricamente. Sin embargo, esto es engorroso y habitualmente innecesario. Se pueden utilizar varias fórmulas para calcular los valores de la T_m (Nucleic Acids Research 1987, 15 (13): 5069-5083; PNAS 1986, 83 (11): 3746-3750; Biopolymers 1997, 44 (3): 217-239) y se pueden encontrar en internet numerosas calculadoras de la temperatura de fusión, proporcionadas por proveedores de reactivos y universidades. Se sabe que para una determinada secuencia de oligonucleótido, una variante con todos los enlaces fosforotioato se fundirá a una temperatura menor que una variante con todos los enlaces fosfodiéster. Al aumentar el número de enlaces fosforotioato en un oligonucleótido se tiende a disminuir la T_m del oligonucleótido para su pretendida diana.
- 20 Para separar específicamente las impurezas de una mezcla de reacción, primero se calcula la temperatura de fusión del producto:matriz dúplex. Luego se calienta el vaso de reacción hasta una primera temperatura, por ejemplo, una temperatura por debajo de la temperatura de fusión del producto:matriz dúplex, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 grados centígrados por debajo de la temperatura de fusión. Esto producirá la desnaturalización de los oligonucleótidos que no son el producto, es decir, que no sean un 100 % complementarios a la matriz, de la matriz.
- 25 Estos se pueden retirar del vaso de reacción utilizando uno de los procedimientos desvelados anteriormente, por ejemplo, la separación basada en el peso molecular, la separación basada en la carga, la separación basada en la hidrofobia, separación basada en secuencia específica o una combinación de estos procedimientos. Luego el vaso de reacción se aumentará a una segunda temperatura, más alta, por ejemplo, por encima de la temperatura de fusión calculada, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 grados centígrados por encima de la temperatura de fusión, para producir la desnaturalización del producto de la matriz. El producto se puede retirar entonces del vaso de reacción utilizando uno de los procedimientos desvelados anteriormente, por ejemplo, la separación basada en el peso molecular, la separación basada en la carga, la separación basada en la hidrofobia, separación basada en secuencia específica o una combinación de estos procedimientos.
- 30 Se puede utilizar un procedimiento similar cuando el agente de alteración es un agente que produce un cambio del pH, la concentración de sales o un agente de alteración químico. El agente de alteración aumenta en concentración hasta justo debajo de la concentración a la que el producto se disociaría, para producir la desnaturalización de los oligonucleótidos que no sean el producto de la matriz. Estas impurezas se pueden retirar entonces del vaso de reacción utilizando uno de los procedimientos desvelados anteriormente. Se aumenta entonces la concentración del agente de alteración hasta por encima de la concentración a la que el producto se disocia de la matriz. El producto se puede retirar entonces del vaso de reacción utilizando uno de los procedimientos desvelados anteriormente.
- 35 El producto obtenido a partir de un procedimiento tal como se ha desvelado anteriormente tiene un alto grado de pureza sin necesidad de posteriores etapas de purificación. Por ejemplo, el producto obtenido es más del 95 % puro.
- 40

Propiedades de la matriz

- 45 La matriz necesita una propiedad que permita que se mantenga en el vaso de reacción cuando se retira el producto, para evitar que se convierta en una impureza en el producto. En otras palabras, la matriz tiene propiedades que permiten que se separe del producto. En una realización de la invención, esta retención se consigue acoplado la matriz a un material de soporte. Este acoplamiento da como resultado un complejo matriz-soporte que tiene un alto peso molecular, y por lo tanto puede retenerse en el vaso de reacción cuando se retiran las impurezas y el producto, por ejemplo, por filtración. La matriz se puede acoplar a un material de soporte sólido tal como perlas poliméricas, soportes fibrosos, membranas, perlas revestidas de estreptavidina y celulosa. La matriz también se puede acoplar a un material de soporte soluble tal como el polietilenglicol, un polímero orgánico soluble, ADN, una proteína, un dendrímero, un polisacárido, un oligosacárido y un carbohidrato.
- 50

Cada material de soporte puede tener múltiples puntos donde pueda fijarse una matriz, y cada punto de anclaje puede tener múltiples matrices fijadas, por ejemplo, de la manera que se muestra en la Figura 3.

- 55 La matriz puede tener por sí misma un alto peso molecular, sin estar enganchada a un material de soporte, por ejemplo, puede ser una molécula con múltiples copias de la matriz, por ejemplo, separadas por un engarce, de la manera que se muestra en la Figura 3.

La capacidad para retener la matriz en el vaso de reacción también permite que se recicle la matriz para futuras

reacciones, sea siendo recuperada o por su uso en un procedimiento de flujo continuo o semi-continuo.

Procedimientos de separación de la matriz del producto (o impurezas)

Las propiedades de la matriz, como se ha desvelado anteriormente, permiten la separación de la matriz y el producto, o la separación de la matriz unida al producto y las impurezas. Se puede utilizar la separación basada en el peso molecular, la separación basada en la carga, la separación basada en la hidrofobia, la separación basada en secuencia específica o una combinación de estos procedimientos.

En el caso en el que la matriz está enganchada a un soporte sólido, la separación de la matriz del producto o la separación de impurezas del producto unido a la matriz se consigue lavando el soporte sólido en condiciones apropiadas. En los casos en los que la matriz está acoplada a un soporte soluble o está compuesta por sí misma por secuencias de matriz repetidas, la separación de matriz del producto o la separación de la matriz unida al producto de las impurezas se puede conseguir mediante una separación basada en el peso molecular. Esto se puede conseguir utilizando técnicas tales como la ultra-filtración o la nano-filtración en las que el material de filtro se escoge de manera que se retiene la molécula más grande en el filtro y la molécula más pequeña pasa a través. En los casos en los que no es suficientemente eficaz una única etapa de separación de impurezas del complejo matriz producto o la separación del producto de la matriz, se pueden emplear múltiples etapas de filtración secuencial para aumentar la eficacia de separación y generar así un producto que tenga la pureza deseada.

Es deseable proporcionar un procedimiento para la separación de dichos oligonucleótidos que sea eficaz y aplicable en una escala de producción industrial. "Therapeutic oligonucleotides: The state of the art in purification technologies" Sanghvi et. al. Current Opinion in Drug Discovery (2004) Vol. 7 N.º 8 revisa los procedimientos que se utilizan para la purificación de oligonucleótidos.

El documento WO-A-01/55160 desvela la purificación de oligonucleótidos formando enlaces imina con los contaminantes y entonces retirando las impurezas unidas a imina con una cromatografía u otras técnicas. "Size Fractionation of DNA Fragments Ranging from 20 to 30000 Base Pairs by Liquid/Liquid chromatography" Muller y col. Eur. J. Biochem (1982) 128-238 desvela el uso de una columna sólida de celulosa microcristalina sobre la que se ha depositado una fase PEG/dextrano para la separación de secuencias nucleotídicas. "Separation and identification of oligonucleotides by hydrophilic interaction chromatography". Easter y col. The Analyst (2010); 135(10) desvela la separación de oligonucleótidos utilizando una variante de la HPLC que emplea una fase de soporte sólido de sílice. "Fractionation of oligonucleotides of yeast soluble ribonucleic acids by countercurrent distribution" Doctor y col. Biochemistry (1965) 4(1) 49-54 desvela el uso de una columna sólida seca empaquetada con celulosa-DEAE seca. "Oligonucleotide composition of a yeast lysine transfer ribonucleic acid" Madison y col; Biochemistry, 1974, 13(3) desvela el uso de una cromatografía de fase sólida para la separación de secuencias nucleotídicas.

La cromatografía líquida-líquida es un procedimiento de separación conocido. "Countercurrent Chromatography The Support-Free Liquid Stationary Phase" Billardello, B.; Berthod, A; Wilson & 's Comprehensive Analytical Chemistry 38; Berthod, A., Ed.; Elsevier Science B.V.: Amsterdam (2002) pp 177-200 proporciona una descripción general útil de la cromatografía líquida-líquida. Se conocen distintas técnicas de cromatografía líquida-líquida. Una técnica es cromatografía líquida-líquida contra corriente (denominada en el presente documento como "CCC"). Otra técnica conocida es la cromatografía por partición centrífuga (denominada en el presente documento como "CPC").

Los procedimientos desvelados anteriormente y los procedimientos expuestos en el documento WO 2013/030263 se pueden utilizar para separar un producto oligonucleotídico, por ejemplo, de la matriz y/o una impureza.

Oligonucleótidos que se utilizan como materiales de partida

Los oligonucleótidos que se utilizan como material de partida para los procedimientos de la invención se han descrito en el presente documento como si fueran un "agrupamiento" y se proporciona una definición del mismo anteriormente. El agrupamiento no es un conjunto homogéneo de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos que forman el agrupamiento se habrán producido por otros procedimientos de producción de oligonucleótidos, y por lo tanto probablemente contendrán un alto grado de impurezas. Por lo tanto, cuando este agrupamiento de oligonucleótidos se aplica a un procedimiento de la invención, la capacidad para retirar específicamente impurezas como se describe en el presente documento da como resultado la existencia de una etapa de purificación.

El agrupamiento puede contener oligonucleótidos que se pretende que tengan la misma longitud que el oligonucleótido de matriz (aunque contendrá impurezas de diferentes longitudes, así como restos incorporados incorrectamente). El agrupamiento también puede estar compuesto por segmentos de los oligonucleótidos del producto, que se unen en conjunto mientras se ensamblan en la matriz. Cada segmento será un conjunto no homogéneo con impurezas de diferentes longitudes y restos incorporados incorrectamente.

Ligasas

En el procedimiento de la invención reivindicado actualmente, se utiliza una ligasa. En una realización de la invención, la ligasa es una ligasa dependiente del ATP. Las ligasas dependientes del ATP varían en tamaño desde 30 a >100 kDa. En una realización de la invención, la ligasa es una ligasa dependiente del NAD. las enzimas dependientes del

NAD son altamente homólogas y son proteínas monoméricas de 70-80 kDa. En una realización de la invención, la ligasa es una ligasa termoestable. Una ligasa termoestable puede derivarse de una bacteria termófila.

En una realización de la invención, la ligasa es una ligasa modificada. Por ejemplo, una ligasa modificada incluye una ADN ligasa T4, una ligasa CC31 de fago de enterobacteria modificada, una ligasa Shf125875 de fago de Shigella modificada y una ligasa de Chlorella modificada.

En una realización, la ADN ligasa T4 de tipo silvestre se modifica en la posición del aminoácido 368 o la posición de aminoácido 371 de la SEQ ID NO: 3.

En una realización, la ligasa mutante comprende o consiste en la SEQ ID NO: 3 en la que el aminoácido de la posición 368 es R o K.

En una realización, la ligasa mutante comprende o consiste en la SEQ ID NO: 3 en la que el aminoácido de la posición 371 es cualquiera de los siguientes aminoácidos: L, K, Q, V, P, R.

En una realización, el resto(s) correspondiente desvelado anteriormente en relación con la ADN ligasa T4 está mutado en cualquier ligasa CC31 del fago de enterobacterias, la ligasa Shf125875 del fago de Shigella y la ligasa de Chlorella. Las regiones conservadas de las ADN ligasas se desvelan en Chem. Rev. 2006, 106, 687-699 and Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 28, N.º 21, 4051-4058. En una realización, la ligasa está modificada en una región del engarce.

En una realización de la invención, la ligasa comprende o consiste en la SEQ ID NO: 23 o una ligasa con al menos un 90 % de identidad de secuencia con esta, excluyendo una ligasa de tipo silvestre, por ejemplo, la ligasa CC31 del fago de enterobacterias.

En una realización de la invención, la ligasa comprende o consiste en cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos: Las SEQ ID NO: 10-28.

En una realización de la invención, la ligasa está inmovilizada, por ejemplo, en una perla.

En un aspecto de la invención se proporciona el uso de una ligasa que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 8 para el ligamiento de un segmento 5', que contiene uno o más restos de azúcar modificados, a un segmento 3', en el que todos los restos de azúcar dentro del segmento 3' no están modificados. En una realización de la invención se proporciona el uso de una ligasa que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 8 para el ligamiento de un segmento 5', que contiene uno o más restos de azúcar con una modificación en 2'-OMe, a un segmento 3', en el que todos los restos de azúcar dentro del segmento 3' no están modificados. En una realización, todos los restos de azúcar del segmento 5' contienen una modificación 2'-OMe. En una realización, el segmento 5' contiene 5 restos de azúcar con una modificación en 2'-OMe.

Ejemplos

Abreviaturas

OMe	O-Metilo
MOE	O-Metoxietil (armazón de ADN) o Metoxietil (armazón ARN)
CBD	Dominio de unión a celulosa
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
PBS	solución salina tamponada con fosfato
HAA	Acetato de hexilamonio
SDS PAGE	electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico de poliácridamida
CLEM	cromatografía líquida espectrometría de masas
PO	fosfodiéster
DTT	ditiotritol

Ejemplo 1: Ensamblaje y ligamiento del segmento de oligonucleótido (ADN) con la ADN ligasa T4 de tipo silvestre

1.1 Síntesis química de secuencias de partida y control

Con el fin de demostrar que se podrían ensamblar múltiples oligonucleótidos cortos ("segmentos") en el orden correcto sobre una cadena de matriz complementaria y ligarse para dar el producto final deseado ("diana"), se sintetizaron químicamente los segmentos, secuencias diana y de matriz, como se ha indicado en la Tabla 1, utilizando procedimientos convencionales.

1.2 Análisis HPLC

El análisis HPLC se llevó a cabo utilizando una columna Agilent ZORBAX Eclipse Plus XDB-C18 (de 4,6 x 150 mm, 5 µm dp. Agilent P/N 993967-902), circulando a 0,2 ml/min mientras se monitorizaba la absorbancia a 258 nm. La

columna se mantuvo a 60 °C. Se inyectaron 20 µl de muestra y se llevó a cabo un gradiente de 20-31 % del tampón B durante 20 minutos antes de escalonarse hasta el 80 % en tampón B durante 5 minutos.

Tampón A: 75 ml 1 M de HAA, 300 ml de alcohol isopropílico, 200 ml de acetonitrilo, 4425 ml de agua

Tampón B: 650 ml de alcohol isopropílico, 350 ml de acetonitrilo

5

Tabla 1

Nombre	Secuencia	% de pureza de HPLC	Cantidad (mg)
Segmento 5'	5'-GGC CAA-3'	100,0	21,6
Segmento del centro	5'-(p)ACC TCG GC-3'	96,9	58,1
Segmento 3'	5'-(p)T TAC CT-3'	98,8	39,8
Diana	5'-GGC CAA ACC TCG GCT TAC CT-3' (SEQ ID NO:1)	98,4	101,7
Matriz biotinilada	5'-biotina TT TAG GTA AGC CGA GGT TTG GCC-3' (SEQ ID NO: 2)	96,9	130,7

1.3 Procedimiento de ensamblaje y ligamiento de oligonucleótidos con la ADN ligasa T4 comercial (SEQ ID NO: 3)

El segmento 5', el segmento del centro y el segmento 3' se ensamblaron sobre la matriz: cada uno de los segmentos y la matriz se disolvieron en agua a una concentración de 1 mg/ml y entonces se mezclaron de la siguiente manera.

Segmento 5'	2 µl
Segmento del centro	2 µl
Segmento 3'	2 µl
Matriz biotinilada	2 µl
H ₂ O	36 µl

La solución de oligonucleótidos combinados se incubó a 94 °C durante 5 minutos y se enfrió a 37 °C antes de incubarla a 37 °C durante 5 minutos adicionales para permitir que los segmentos se hibridaran con la matriz. Se añadieron entonces 2 µl (equivalentes a 2 µg) de ADN ligasa T4 (NEB) y 4 µl de 1 x Tampón de ligamiento de ADN T4 (NEB) y se incubó la reacción (con un volumen de reacción total de 50 µl) a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, se añadieron 40 µl de perlas magnéticas revestidas de estreptavidina y se incubó la suspensión a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir que la matriz biotinilada se uniera a las perlas de estreptavidina. Las perlas de estreptavidina se lavaron con 2 x 100 µl de PBS para retirar los segmentos no unidos. El lavado se analizó mediante una HPLC. La mezcla de reacción se incubó entonces a 94 °C durante 10 minutos para separar los productos de ligamiento unido (o cualquier segmento unido) de la matriz antes de enfriarse rápidamente sobre hielo para "fundir" el ADN y detener la rehibridación de los productos oligonucleotídicos (o segmentos) a la matriz. Se llevó a cabo entonces el análisis de la reacción de ligamiento mediante una HPLC.

1.4 Procedimiento de ensamblaje y ligamiento de oligonucleótidos con una ADN ligasa T4 casera a una suspensión de perlas

1.4.1 Generación de la suspensión de perlas

Se produjo la ligasa T4 (SEQ ID NO: 4) fusionada en el extremo N a un dominio de unión a celulosa (CBD) utilizando procedimientos de clonación, expresión y extracción convencionales. La secuencia de esta ligasa T4 se diferencia de la ligasa T4 comercial (SEQ ID NO: 3) en que se ha sustituido la metionina (M) del extremo N con glicina y serina (GS). Esto se hizo para ayudar a la generación y expresión de la proteína de fusión CBD. La proteína de fusión CBD-ligasa T4 se expresó en células BL21 A1 (INVITROGEN). El sobrenadante se recolectó y se añadió a 600 µl de perlas PERLOZA 100 (PERLOZA) y se agitó a 26 °C durante 1 hora. Las perlas de celulosa PERLOZA se recolectaron entonces y se lavaron con 2 ml de tampón (50 mM de Tris pH 8,0, 200 mM de NaCl, un 0,1 % de Tween 20, un 10 % de glicerol) seguido por 5 ml de PBS y se re-suspendieron finalmente en 200 µl de PBS (10 mM PO₄³⁻, 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl pH 7,4). Con el fin de analizar la expresión proteica, se mezclaron 15 µl de suspensión de perlas PERLOZA con 5 µl de tampón de carga de SDS y se incubaron a 80 °C durante 10 minutos antes de pasarse por un gradiente en gel de SDS PAGE (4 - 20 %) de acuerdo con un protocolo convencional.

1.4.2 Ensamblaje y ligamiento de oligonucleótidos utilizando la suspensión de perlas

Para la unión de la ligasa T4 a las perlas PERLOZA, el procedimiento de ensamblaje y ligamiento del punto 1.3 anterior se modificó de la siguiente manera. En la mezcla de segmentos inicial, se redujeron los 36 µl de H₂O a 8 µl H₂O. Tras la hibridación, se reemplazaron los 2 µl de ADN ligasa T4 comercial por 20 µl de suspensión de perlas PERLOZA. Antes de añadir las perlas magnéticas con estreptavidina, se centrifugaron las perlas PERLOZA y se retiró el sobrenadante. Se añadieron las perlas magnéticas con estreptavidina y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir que la matriz biotinilada se uniera a las perlas con estreptavidina.

1.5 Resultados y conclusiones

El producto, la matriz y los tres segmentos oligonucleotídicos se resolvieron claramente en el cromatograma de control.

El análisis de HPLC de las reacciones de ligasa demostró que permanecían algunos segmentos oligonucleotídicos sin ligar, pero la ADN ligasa T4 comercial (NEB) era capaz de catalizar el ligamiento de los tres segmentos para generar el producto oligonucleotídico deseado (Figura 7). La ADN ligasa T4 unida a perlas PERLOZA parecía ser menos eficaz en el ligamiento de los segmentos oligonucleotídicos, apareciendo segmentos oligonucleotídicos tanto en la muestra de lavado de control como en la muestra de reacción (Figura 8). Sin embargo, es difícil estar seguros de si se añadió la misma cantidad de enzima en las perlas en comparación con la enzima comercial por lo que no era posible una comparación directa de la eficacia de ligamiento.

Ejemplo 2: Ensamblaje y ligamiento de oligonucleótidos con la ribosa modificada en 2'-OMe con la ADN ligasa T4 de tipo silvestre

2.1. Con 2' OMe en cada una de las posiciones de nucleótidos en cada segmento

Con el fin de determinar si la ADN ligasa T4 era capaz de ligar segmentos oligonucleotídicos con modificación en la posición 2' del anillo de ribosa, se sintetizaron segmentos oligonucleotídicos con la misma secuencia que en el Ejemplo 1, pero la posición 2' del anillo de ribosa se sustituyó con un grupo OMe y la timidina se sustituyó por uridina como se muestra posteriormente.

Tabla 2

Nombre	Secuencia	% de pureza de HPLC	Cantidad (mg)
Segmento 5' 2'-OMe	5'-GGC CAA-3'	21	97,8
Segmento del centro 2'-OMe	5'-(p)ACC UCG GC-3'	15,5	97,7
Segmento 3' 2'-OMe	5'-(p)U UAC CU-3'	21,2	98,1
Diana 2'-OMe	5'-GGC CAA ACC UCG GCU UAC CU-3' (SEQ ID NO: 5)	88	96,9

(p) = fosfato

El ensamblaje, el ligamiento y el análisis de HPLC se llevaron a cabo utilizando los procedimientos del Ejemplo 1, tanto con la ligasa NEB comercial como con la fusión ligasa T4 CBD unida a perlas PERLOZA. La cantidad de agua utilizada en la mezcla de reacción para el experimento con la ADN ligasa T4 (NEB) fue de 26 µl en vez de 36 µl de manera que el volumen de reacción final fue de 40 µl. La cantidad de agua utilizada en la mezcla de reacción para experimento con la suspensión de perlas con ADN ligasa T4 casera fue de 23 µl y la cantidad de perlas que se utilizó fue de 5 µl de manera que el volumen de reacción final también fue de 40 µl. Se llevaron a cabo en paralelo los experimentos de control utilizando ADN sin modificar en oposición al ADN 2'-OMe.

Los resultados de los experimentos de control fueron según el Ejemplo 1. No se detectó ningún producto utilizando la HPLC para los experimentos con 2'-OMe indicando que la ADN ligasa T4 es incapaz de ligar segmentos modificados en 2'-OMe independientemente de que se utilizara una ADN ligasa T4 comercial o una fusión de ADN ligasa T4 CBD casera unida a perlas PERLOZA.

2.2. Con 2' OMe en cada una de las posiciones de nucleótidos en un único segmento

Utilizando una solución de 1 mg/ml de cada oligonucleótido se configuraron las reacciones como se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3

Experimento 1 (control sin ligasa)	Experimento 2 (único segmento 2'-OMe - 3')	Experimento 3 (único segmento 2'-OMe - 5')	Experimento 4 (todos 2'-OMe)	Experimento 5 (todos sin modificar)	Volumen (µl)
matriz	matriz	matriz	matriz	matriz	2
Segmento 5'	Segmento 5'	Segmento 5' sustituido en 2'-OMe	Segmento 5' sustituido en 2'-OMe	Segmento 5'	2
Segmento 3'	Segmento 3' sustituido en 2'-OMe	Segmento 3'	Segmento 3' sustituido en 2'-OMe	Segmento 3'	2
Segmento del centro	Segmento del centro	Segmento del centro	Segmento del centro sustituido en 2'-OMe	Segmento del centro	2

(continuación)

Experimento 1 (control sin ligasa)	Experimento 2 (único segmento 2'-OMe - 3')	Experimento 3 (único segmento 2'-OMe - 5')	Experimento 4 (todos 2'-OMe)	Experimento 5 (todos sin modificar)	Volumen (μl)
H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	hasta un total de 40

El ensamblaje y el ligamiento se llevaron a cabo utilizando los procedimientos del Ejemplo 1 con la ligasa NEB comercial y la ADN ligasa T4 casera unida a PERLOZA.

Las reacciones se incubaron a 94 °C durante 5 minutos, seguido por la incubación durante 5 minutos a 37 °C para permitir la hibridación. Se añadieron 4 μl de 1x tampón de ligamiento de ADN NEB T4 a cada reacción junto con 5 μl (aproximadamente 2 μg) de ADN ligasa T4 casera o 2 μl (aproximadamente 2 μg) de ADN ligasa T4 comercial (diferente del Ejemplo 1 que era un control sin ligasa) y se dejó progresar la reacción de ligamiento durante 2 horas a temperatura ambiente. Entonces se añadieron perlas magnéticas con estreptavidina a cada reacción y se calentaron las reacciones a 94 °C antes de un rápido enfriamiento en hielo como se ha descrito en el Ejemplo 1 para separar la matriz de los materiales de partida y los productos.

Las reacciones procesadas se dividieron en dos: la mitad se analizó mediante HPLC como se ha descrito en el Ejemplo 1 (sección 1.2). La otra mitad de la muestra se retuvo para la espectrometría de masas para confirmar los resultados de la HPLC.

El ligamiento de segmentos oligonucleotídicos no modificados (experimento 5) progresó como se esperaba para producir un producto de longitud completa. Se vio una pequeña cantidad de ligamiento cuando el segmento 5' estaba sustituido en 2'-OMe (Experimento 3) como se muestra en la Figura 9, pero no se vio ligamiento cuando el segmento 3' estaba sustituido en 2'-OMe (Experimento 2). No se vio producto significativo cuando los tres segmentos estaban sustituidos en 2'-OMe (Experimento 4) de acuerdo con 2.1.

2.3. Conclusión

La ADN ligasa T4 es pobre en el ligamiento de segmentos oligonucleotídicos sustituidos en 2'-OMe, pero es ligeramente menos sensible a la modificación del segmento oligonucleotídico 5' que a la del segmento 3'.

Ejemplo 3: Ensamblaje y ligamiento de oligonucleótidos con la ribosa modificada en 2'-OMe con ligasas tipo silvestre y mutantes

3.1 - Materiales

Se produjeron la ligasa CC31 de fago de enterobacterias de tipo silvestre (SEQ ID NO: 6), la ligasa Shf125875 del fago de Shigella de tipo silvestre (SEQ ID NO: 8), y 10 ligasas T4 mutantes de SEQ ID NO: 10-19, cada una fusionada en el extremo N a un CBD, utilizando procedimientos convencionales de clonación, expresión y extracción. Como se desvela en 1.4.1, con el fin de generar y expresar las proteínas de fusión con CBD se reemplazó la metionina (M) del extremo N con glicina y serina (GS) en cada caso (por ejemplo, la SEQ ID NO: 7 para la ligasa CC31 del fago de enterobacterias y la SEQ ID NO: 9 para la ligasa Shf125875 del fago de Shigella).

Se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos mediante procedimientos convencionales en fase sólida.

Tabla 4

Nombre	Secuencia	% de pureza de HPLC	Cantidad (mg)
Segmento 5' *	5'-(OMe)G(OMe)G(OMe)C(OMe)C(OMe)AA-3'	99,35	24,7
Segmento del centro	5'-(p)ACC TCG GC-3'	96,9	58,1
Segmento 3'	5'-(p)TTA CCT-3'	97,88	29,5
Matriz biotinilada	5'-biotin TT TAG GTA AGC CGA GGT TTG GCC-3' (SEQ ID NO: 2)	96,9	130,7
P.D. OMe indica una sustitución 2 metoxi en el anillo de ribosa (p) = fosfato * nótese que los primeros 5 nucleótidos están modificados en 2'-OMe (GGCCA), pero la A final no			

3.2 Procedimiento de ensamblaje y ligamiento de oligonucleótidos con suspensiones de perlas con ligasa

3.2.1 Generación de la suspensión de perlas

Las ligasas fusionadas al CBD se unieron a las perlas PERLOZA como se ha descrito en 1.4 para generar la suspensión de perlas.

3.2.2 Ensamblaje y ligamiento de oligonucleótidos utilizando la suspensión de perlas

Las reacciones de ligamiento se prepararon con los componentes posteriores hasta un volumen final de 50 µl en una placa e 96 pocillos:

2 µl	~1 mg/ml de segmento 5' (2'-OMe)
2 µl	~1 mg/ml de segmento del centro
2 µl	~1 mg/ml de segmento 3'
2 µl	~1 mg/ml de matriz
5 µl	tampón de ADN ligasa T4 NEB
22 µl	H ₂ O
15 µl	suspensión de perlas unidas PERLOZA

Se incubó la reacción durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de la suspensión de perlas PERLOZA para permitir que los segmentos se hibridaran con la matriz. Se añadió la suspensión de perlas PERLOZA y se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la hora de incubación, se transfirió la solución a una placa filtro ACOPREP advance 350 (PN 8082), y la placa filtro se colocó en la parte superior de una sobreplica ABGENE (Thermo Scientific, n.º AB-2800) y se centrifugó durante 10 minutos a 4.000 rpm para retirar la suspensión de perlas PERLOZA. Las soluciones se analizaron entonces mediante HPLC utilizando el procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 1 (sección 1.2).

Cada ensamblaje y ligamiento de oligonucleótidos se repitió 6 veces para cada ligasa.

3.3 Resultados y conclusiones

La ligasa CC31 del fago de Enterobacterias de tipo silvestre (SEQ ID NO: 6) y ligasa Shf125875 del fago de Shigella de tipo silvestre (SEQ ID NO: 8) eran capaces de ligar un segmento 5' sustituido en 2'-OMe que contenía cinco bases nucleicas 2'-OMe y una desoxi-base nucleica a un segmento que contenía solo ADN sin modificar. Además, aunque las ADN ligasas T4 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 3 y 4) son pobres en llevar a cabo esta reacción, como se demuestra en el Ejemplo 2 y se vuelve a confirmar aquí, varias mutaciones en las posiciones 368 y 371 confieren la capacidad de ligar un segmento 5' sustituido en 2'-OMe que contenía bases nucleicas 2'-OMe y una desoxibase nucleica a un segmento que contenía solo ADN sin modificar en la ligasa (SEQ ID NO: 10-19).

Ejemplo 4: Ensamblaje y ligamiento de segmentos oligonucleotídicos con 5-metil pirimidina modificada y ribosa modificada en 2'-MOE con ADN ligasas mutantes

4.1 - Materiales

Se sintetizaron los segmentos oligonucleotídicos modificados como se expone en la Tabla 5 posterior mediante procedimientos convencionales basados en fase sólida.

Tabla 5

Segmento	Secuencia	PM	Masa (mg)	% de pureza
Segmento del centro	5'-(p)dCdCdTdCdGdG-3'	2044,122	39	98,96
Segmento 3' MOE	5'-(p)dCdT mT mAmCmCmT-3'	2699,679	52	97,79
Segmento 5' MOE	5'-mGmGmCmCmAdAdA-3'	2644,771	48	99,13
(p) = fosfato, mX = bases MOE, dX = bases de ADN todas son 5-metil pirimidinas				

Se fusionaron cada una de las ADN ligasas mutantes (SEQ ID NO: 20-28) basadas en la ligasa CC31 del fago de enterobacterias de tipo silvestre, la ligasa T4 de tipo silvestre y la ligasa Shf125875 del fago de Shigella de tipo silvestre en el extremo N a un dominio de unión a celulosa (CBD), utilizando procedimientos convencionales de clonación, expresión y extracción. Las ligasas fusionadas al CBD se unieron a las perlas PERLOZA como se ha descrito en 1.4 para generar la suspensión de perlas. Con el fin de liberar las ligasas de las perlas PERLOZA, se añadieron 2 µl de proteasa TEV a la suspensión y se incubaron durante una noche a 4 °C. La proteína escindida, que ahora carecería del dominio de unión a la celulosa, se recolectó por centrifugación durante 10 min a 4000 rpm.

4.2 Procedimiento

La reacción se configuró de la siguiente manera:

Segmento del centro	20 µM finales
Segmento 3' MOE	20 µM finales
Segmento 5' MOE	20 µM finales

	(continuación)
Matriz	20 µM finales
tampón de ADN ligasa T4	5 µl
NEB	
ADN ligasa mutante	15 µl
H ₂ O	Para hacer un volumen final de reacción de 50 µl

Todos los componentes se mezclaron y removieron antes de la adición de la ADN ligasa. Las reacciones se incubaron durante 1 hora a 35 °C. Después de 1 hora se detuvieron las reacciones calentándolas a 95 °C durante 5 minutos en un bloque PCR.

- 5 Las muestras se analizaron tanto por HPLC como por LCMS para confirmar la identidad del producto de acuerdo con el protocolo de HPLC utilizado en el Ejemplo 1 (sección 1.2). Se incluyeron los controles de ADN ligasa T4 NEB comercial y un control negativo (H₂O en vez de ligasa).

4.3 Resultados y conclusiones

- 10 La Figura 10 muestra los trayectos de HPLC para la reacción de control y la reacción catalizada por la SEQ ID NO: 23 (Clon A4 - ligasa CC31 del fago de enterobacterias mutante). El producto y la matriz se co-eluyen utilizando este procedimiento de HPLC de manera que el producto aparece como un aumento del área del pico del producto + el pico de la matriz. En el trazado de la ligasa mutante (b) no solo aumenta el pico del producto + la matriz sino que aparecen dos nuevos picos a los 10,3 y 11,2 minutos. Estos picos se corresponden al ligamiento del segmento del centro con el segmento 5' MOE o el segmento 3' MOE. Además, los picos de entrada de segmento son sustancialmente más pequeños que el control en línea con el aumento de los picos del producto del producto y el intermedio. El trayecto de la ligasa T4 comercial NEB (as) presentaba un ligero aumento del área del pico para la matriz + el producto, una pequeña cantidad de producto de ligamiento intermedio junto con una disminución concomitante en los segmentos oligonucleotídicos de entrada. La ligasa mutante (SEQ ID NO: 23), sin embargo, presentaba un área del pico de producto + matriz mayor y una reducción concomitante de las áreas del pico para los segmentos oligonucleotídicos de entrada. Así la ligasa mutante (SEQ ID NO: 23) es una ligasa mucho más eficaz para los segmentos sustituidos en 2' MOE que la ADN ligasa T4 comercial. Se presentan mejoras similares para las otras ligasas mutantes (SEQ ID NO: 20, 21, 24-28).

Ejemplo 5: Efecto de diferentes emparejamientos de nucleótidos y el sitio de ligamiento

5.1 - Materiales

- 25 Se produjo la ligasa CC31 de fago de enterobacterias mutante (SEQ ID NO: 23) fusionada en el extremo N a un dominio de unión a celulosa (CBD) utilizando procedimientos de clonación, expresión y extracción convencionales. La proteína de fusión de ligasa CC31 del fago de enterobacterias mutante-CBD extraída se añadió en 25 ml de perlas de celulosa PERLOZA 100 (PERLOZA) y se agitó a 20 °C durante 1 hora. Las perlas PERLOZA se recolectaron entonces y se lavaron con 250 ml de tampón (50 mM de Tris pH 8,0, 200 mM de NaCl, un 0,1 % de Tween 20, un 10 % de glicerol) seguido por 250 ml de PBS y se re-suspendieron finalmente en 10 ml de PBS (10 mM PO₄³⁻, 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl pH 7,4). Con el fin de analizar la expresión proteica, se mezclaron 15 µl de suspensión de perlas PERLOZA con 5 µl de tampón de carga de SDS y se incubaron a 80 °C durante 10 minutos antes de pasarse por un gradiente en gel de SDS PAGE (4 - 20 %) de acuerdo con un protocolo convencional. Para la liberación de la ligasa de las perlas, se añadieron 70 µl de proteasa TEV a la suspensión y se incubaron durante una noche a 4 °C con agitado. La ligasa se recolectó lavando las perlas digeridas con 80 ml de PBS. Entonces se concentró la ligasa hasta 1,2 ml utilizando un filtro 30 Kd MCO Amicon.

- 40 Se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos de matriz de ADN biotinilados (Tabla 6) y oligonucleótidos de segmento de ADN (Tabla 7) mediante procedimientos convencionales de fase sólida. Por favor nótese que los oligonucleótidos en **negrita** son los presentes en el sitio de ligamiento (es decir, los nucleótidos que se unieron en conjunto en la reacción de ligamiento - tabla 7; y los nucleótidos que son complementarios a los que se unen mediante la reacción de ligamiento - tabla 6).

Tabla 6:

Número de matriz	Secuencia (nucleótidos complementarios a los nucleótidos de unión están en negrita)	SEQ ID NO
1	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG ACT GAGGC-3'	30
2	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG AGT GAGGC-3'	31
3	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG ATT GAGGC-3'	32
4	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG AAT GAGGC-3'	33
5	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG TCT GAGGC-3'	34
6	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG TGT GAGGC-3'	35
7	5'-biotina TTTGGTGC GAAGCAG TTT GAGGC-3'	36

(continuación)

Número de matriz	Secuencia (nucleótidos complementarios a los nucleótidos de unión están en negrita)	SEQ ID NO
8	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAG TAT GAGGC-3'	37
9	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAG CCT GAGGC-3'	38
10	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAG CGT GAGGC-3'	39
11	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAG CTT GAGGC-3'	40
12	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAG CAT GAGGC-3'	41
13	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAG GCT GAGGC-3'	42
14	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAG GGT GAGGC-3'	43
15	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAG GTT GAGGC-3'	44
16	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAG GAT GAGGC-3'	45

Tabla 7

Segmento	identificador	Secuencia (los nucleótidos de unión están en negrita)
5'	A	5'-GCCTCAG-3'
5'	B	5'-GCCTCAC-3'
5'	C	5'-GCCTCAA-3'
5'	D	5'-GCCTCAT-3'
3'	E	5'-(p)TCTGCT-3'
3'	F	5'-(p)ACTGCT-3'
3'	G	5'-(p)CCTGCT-3'
3'	H	5'-(p)GCTGCT-3'

(p) = fosfato
P.D. por favor nótese que, a diferencia de los ejemplos previos, las reacciones de ligamiento en este ejemplo implican la unión de dos segmentos juntos: un segmento 5' y un segmento 3', es decir, no hay un segmento del centro.

5.2 Procedimiento

Las reacciones se configuraron de la siguiente manera:

5

Tabla 8

Matriz	Segmento 5'	Segmento 3'
1	A	E
2	B	E
3	C	E
4	D	E
5	A	F
6	B	F
7	C	F
8	D	F
9	A	H
10	B	H
11	C	H
12	D	H
13	A	G
14	B	G
15	C	G
16	D	G

Para cada 50 µl de reacción:

Segmento 3' (1 mM de materia prima, 20 µM finales)	1 µl
Segmento 5' (1 mM de materia prima, 20 µM finales)	1 µl
Matriz (1 mM de materia prima, 20 µM finales)	1 µl
Tampón de ADN ligasa NEB (para la ligasa T4)	5 µl
ADN ligasa CC31 mutante (0,45 mM de materia prima, 90 µM finales)	10 µl
H ₂ O	hasta 50 µl

Cada mezcla de reacción se incubó a 35 °C durante 30 minutos y 1 hora. Cada mezcla de reacción se detuvo calentando a 95 °C durante 5 minutos. Se llevó a cabo un análisis de HPLC.

5.3 Resultados y conclusiones

- 5 Todas las reacciones producían un pico de producto después de 1 hora de incubación en el análisis de HPLC. En consecuencia, el procedimiento de ligamiento funciona para todas las combinaciones de nucleótidos en las uniones que se van a unir. Es posible una optimización para mejorar el rendimiento de producto, pero no era necesario ya que los resultados eran concluyentes y estaba claro que la reacción funcionaba para todas las combinaciones de nucleótidos en las uniones que se van a unir.

Ejemplo 6: Efecto de diferentes modificaciones en el sitio de ligamiento

10 6.1 - Materiales

Se produjo la ligasa CC31 del fago de enterobacterias mutante (SEQ ID NO: 23) como se describió en 5.1 y se adquirió la ADN ligasa del virus de Chlorella (SEQ ID NO: 29, disponible en el mercado como ligasa SplintR, NEB).

Se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos de matriz biotinilados y oligonucleótidos de segmento (Tabla 9) mediante procedimientos convencionales en fase sólida.

15 Tabla 9

Nombre	Secuencia (la modificación de unión en negrita)
Matriz	5'-biotina TTTAGGTAAGCCGAGGTTTGGCC-3' (SEQ ID NO:2)
Segmento 5' (TS)	5'-GGCCAAA-3'
Segmento 5' (Mo1)	5'-GGCCAA(OMe)A-3'
Segmento 5' (Mo2)	5'-GGCCAA(F)A-3'
Segmento del centro (TS)	5'-(p)CCTCGG-3'
Segmento del centro (Mo4A)	5'-(p)(OMe)CCTCGG-3'
Segmento del centro (Mo5A)	5'-(p)(F)CCTCGG-3'
Segmento del centro (Mo7)	5'(p)(Me)CCTCGG-3'
Segmento 3' (TS)	5'-(p)CTTACCT-3'
Segmento 3' (Mo8)	5'-(p)(Me)CTTACCT3'
OMe indica una sustitución 2 metoxi en el anillo de ribosa F indica una sustitución 2' flúor en el anillo de ribosa Todos los restos de azúcar restantes son restos desoxirribosa Me indica 5-metil citosinas	

6.2 Procedimiento

Las reacciones se configuraron de la siguiente manera:

Tabla 10

Reacción	Segmento 5'	Segmento del centro	Segmento 3'
1	TS	TS	TS
2	TS	Mo4A	TS
3	TS	Mo5A	TS
4	TS	Mo7	TS
5	Mo1	TS	TS
6	Mo1	Mo4A	TS
7	Mo1	Mo5A	TS
8	Mo1	Mo7	TS
9	Mo2	TS	TS
10	Mo2	Mo4A	TS
11	Mo2	Mo5A	TS
12	Mo2	Mo7	TS
13	TS	TS	Mo8
14	TS	Mo4A	Mo8
15	TS	Mo5A	Mo8
16	TS	Mo7	Mo8
17	Mo1	TS	Mo8
18	Mo1	Mo4A	Mo8
19	Mo1	Mo5A	Mo8

(continuación)

Reacción	Segmento 5'	Segmento del centro	Segmento 3'
20	Mo1	Mo7	Mo8
21	Mo2	TS	Mo8
22	Mo2	Mo4A	Mo8
23	Mo2	Mo5A	Mo8
24	Mo2	Mo7	Mo8

Para cada 50 µl de reacción:

Segmento 3' (1 mM, de materia prima, 20 µM finales)	1 µl
Segmento del centro (1 mM, de materia prima, 20 µM finales)	1 µl
Segmento 5' (1 mM, de materia prima, 20 µM finales)	1 µl
Matriz (1 mM, de materia prima, 20 µM finales)	1 µl
H ₂ O	hasta 50 µl

Para la ligasa CC31 del fago de enterobacterias mutante (SEQ ID NO: 23)

Tampón de ADN ligasa (50 mM de Tris-HCl, 1 mM de DTT)	5 µl
ADN ligasa CC31 mutante (0,45 mM)	10 µl
MnCl ₂ (50 mM)	5 µl
ATP (10 mM)	10 µl

Mientras que la ADN ligasa del virus de Chlorella (SEQ ID NO: 29, disponible en el mercado como ligasa SplintR, NEB)

Tampón de ADN ligasa NEB (para Chlorella)	5 µl
ADN ligasa del virus de Chlorella	2 µl

Cada mezcla de reacción se incubó a 20 °C 1 hora. Cada mezcla de reacción se detuvo calentando a 95 °C durante 10 minutos. Se llevó a cabo el análisis de HPLC utilizando el procedimiento del Ejemplo 1.

6.3 Resultados y conclusiones

Todas las reacciones producían un pico de producto en el análisis de HPLC. En consecuencia, el procedimiento de ligamiento funciona para todas las combinaciones de modificaciones ensayadas en las uniones que se van a unir. Es posible una optimización para mejorar el rendimiento de producto, pero no era necesario ya que los resultados eran concluyentes y estaba claro que la reacción funcionaba para todas las combinaciones de modificaciones ensayadas en las uniones que se van a unir.

Ejemplo 7: Capacidad para utilizar diferentes cantidades de segmentos para construir oligonucleótidos mayores

7.1 - Materiales

Se produjo la ligasa CC31 del fago de enterobacterias mutante (SEQ ID NO: 23) como se describió en 5.1.

Se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos ADN de matriz biotinilados y oligonucleótidos ADN del segmento de (Tabla 11) mediante procedimientos convencionales en fase sólida.

Tabla 11

Nombre	Secuencia
Matriz	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAGAAGGTAAGCCGAGGTTTGGCC-3' (SEQ ID NO:47)
Segmento 5' (1)	5'-GGCCAAA-3'
Segmento del centro (2)	5'-(p)CCTCGG-3'
segmento del centro/segmento 3' (5)	5'-(p)TCTGCT-3'
Segmento del centro (3)	5'-(p)CTTACCT-3'
Segmento 3' (4)	5'-(p)TCGCACC-3'
(p) = fosfato,	

7.2 Procedimiento

Las reacciones se configuraron de la siguiente manera:

Tabla 12

Segmento 5'	Segmento(s) del centro	Segmento 3'	Número total de segmentos
1	2 y 3	5	4
1	2, 3 y 5	4	5

Las reacciones se procesaron en solución salina tamponada con fosfato, pH = 7,04 en un volumen total de 100 µl y se configuraron de la siguiente manera: -

- 5 Matriz (20 µM finales)
Cada segmento (20 µM finales)
MgCl₂ (10 µM finales)
ATP (100 µM finales)
ADN ligasa CC31 mutante (25 µM finales)

- 10 Cada reacción se incubó a 28 °C durante una noche antes de detenerse calentando a 94 °C durante 1 minuto. Los productos se analizaron por HPLC espec de masas.

7.3 Resultados y conclusiones

- 15 La reacción utilizando 4 segmentos producía un producto completamente ligado de 27 pares de bases de longitud. La reacción utilizando 5 segmentos producía un producto de 33 pares de bases de longitud. En ambos casos la masa del producto observada estaba en concordancia con la esperada para la secuencia deseada. En conclusión, es claramente posible ensamblar múltiples segmentos para generar oligonucleótidos de la longitud deseada y una secuencia según se define por la secuencia matriz complementaria apropiada.

- 20 **Ejemplo 8: Ensamblaje y ligamiento de segmentos 5-10-5 para formar un oligómero con huecos, en el que los segmentos 5' y 3' comprenden (i) modificaciones de azúcar en la ribosa 2'-OMe, (ii) enlaces fosforotioato o (iii) modificaciones de azúcar en la ribosa 2'-OMe y enlaces fosforotioato; y en el que el segmento central es ADN sin modificar**

8.1 - Materiales

- 25 Se produjo la ligasa CC31 del fago de enterobacterias mutante (SEQ ID NO: 23) como se describió en 5.1, los siguientes oligonucleótidos ADN de matriz biotinilada y oligonucleótidos del segmento (Tabla 13) se sintetizaron mediante procedimientos convencionales en fase sólida.

Tabla 13

Nombre	Secuencia
Matriz	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAGACTGAGGC-3' (SEQ ID NO:30)
Segmento 3' (30Me)	5'-(p)(OMe)G(OMe)C(OMe)C(OMe)T(OMe)C-3'
Segmento 3' (3PS+OMe)	5'-(p)(OMe)G*(OMe)C*(OMe)C*(OMe)T*(OMe)C-3'
Segmento 3' (3PS)	5'-(p)G*C*C*T*C-3'
Segmento del centro (D)	5'-(p)AGTCTGCTTC-3'
Segmento 5' (50Me)	5'-(OMe)G(OMe)C(OMe)A(OMe)C(OMe)C-3'
Segmento 5' (5PS+OMe)	5'-(OMe)G*(OMe)C*(OMe)A*(OMe)C*(OMe)C-3'
Segmento 5' (5PS)	5'-G*C*A*C*C-3'
OMe indica una sustitución 2 metoxi en el anillo de ribosa Todos los restos de azúcar restantes son restos desoxirribosa * fosforotioato	

8.2 Procedimiento

Las reacciones se configuraron de la siguiente manera:

Tabla 14

Reacción	Segmento 3'	Segmento(s) del centro	Segmento 5'
1	3PS	D	5PS
2	3OMe	D	5OMe
3	3PS+OMe	D	5PS+OMe

- 30 Cada una de las reacciones 1, 2 y 3 se configuraron con un volumen final de 100 µl en solución salina tamponada con

fosfato con los siguientes componentes:-

Segmento 3'	20 µM finales
Segmento del centro	20 µM finales
Segmento 5'	20 µM finales
Matriz	20 µM finales
MgCl ₂	10 mM finales
ATP	50 µM finales
Enzima	25 µM finales

Cada mezcla de reacción se incubó a 20 °C durante una noche. Cada mezcla de reacción se detuvo calentando a 95 °C durante 10 minutos. Se llevó a cabo una HPLC espec. de masas.

8.3 Resultados y conclusiones

- 5 El producto oligonucleotídico correspondiente al ligamiento satisfactorio de los tres fragmentos se produjo en las tres reacciones.

En consecuencia, la ligasa CC31 del fago de enterobacterias mutante (SEQ ID NO: 23) es capaz de ligar 3 segmentos en conjunto para formar un 'oligómero con huecos' en el que las 'alas' 5' y 3' tienen un armazón de fosforotioato, mientras que la región central tiene un armazón de fosfodiéster, y todos los restos de azúcar del oligómero con huecos son restos de desoxirribosa. La ligasa CC31 del fago de enterobacterias (SEQ ID NO: 23) también es capaz de ligar 3 segmentos en conjunto para formar un 'oligómero con huecos' en el que las 'alas' 5' y 3' tienen restos de 2'-metoxirribosa (2'- OMe), mientras que la región central tiene restos de desoxirribosa, y todos los enlaces son enlaces fosfodiéster. Por último, la ligasa CC31 del fago de enterobacterias (SEQ ID NO: 23) es capaz de ligar 3 segmentos en conjunto para formar un 'oligómero con huecos' en el que las 'alas' 5' y 3' tienen las modificaciones combinadas (un armazón de fosforotioato y restos de 2'-metoxirribosa), mientras que la región central tiene restos de desoxirribosa y enlaces fosfodiéster.

Ejemplo 9: Ensamblaje y ligamiento de segmentos que comprenden Ácidos Nucleicos Bloqueados (LNA)

9.1 - Materiales

- 20 Se produjo la ligasa CC31 del fago de enterobacterias mutante (SEQ ID NO: 23) como se describió en 5.1. Se produjo una ligasa dependiente de NAD de Staphylococcus aureus mutante (NAD-14) como se describe en 13.1

Se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos ADN de matriz biotinilados y oligonucleótidos de segmento (Tabla 15) mediante procedimientos convencionales en fase sólida.

Tabla 15

Nombre	Secuencia
Matriz	5'-biotina TTTGGTGCGAAGCAGACTGAGGC-3' (SEQ ID NO:30)
Segmento-5'	5'-GCCTCAG-3'
Segmento-5' LNA (oligo 1)	5'-GCCTCA(LNA)G-3'
Segmento del centro	5'-(p)TCTGCT-3'
Segmento del centro de LNA (oligo 2)	5'-(p) (LNA)TCTGCT-3'
(p) = fosfato	
LNA = ácido nucleico bloqueado	

9.2 Procedimiento

- 25 Las reacciones se configuraron de la siguiente manera:

	Volumen de reacción 100 µl
Matriz	20 µM finales
Enzima	25 µM finales
Todos los segmentos oligonucleotídicos	20 µM finales

Las reacciones se configuraron variando la enzima (ligasa CC31 de fago de enterobacterias mutante (SEQ ID NO: 23) o NAD-14), el catión divalente (Mg^{2+} o Mn^{2+}) y combinaciones de segmentos oligonucleotídicos como se expone en la Tabla 16.

Tabla 16

Enzima	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 23	NAD-14	NAD-14
Catión divalente	$MgCl_2$ 10 mM	$MnCl_2$ 10 mM	$MgCl_2$ 10 mM	$MnCl_2$ 10 mM
Cofactor	ATP 100 μ M	ATP 100 μ M	NAD 100 μ M	NAD 100 μ M
Tampón	PBS, pH = 7,04	PBS, pH = 7,04	50 mM KH_2PO_4 , pH 7,5	50 mM KH_2PO_4 , pH 7,5
Segmento 5' + segmento del centro	Producto	Producto	Producto	Producto
Oligo 1 + segmento del centro	Producto	Producto	Producto	Producto
Segmento 5' + Oligo 2	Producto	Producto	Producto	Producto
Oligo 1 + oligo 2	No producto	No producto	No producto	No producto

- 5 Cada mezcla de reacción se incubó a 28 °C durante una noche. Cada mezcla de reacción se detuvo calentando a 94 °C durante 1 minuto. Se llevó a cabo un análisis de HPLC espec. de masas.

9.3 Resultados y conclusiones

- 10 El producto oligonucleotídico se produjo en las reacciones de control (solo con los oligonucleótidos no modificados) y cuando se incluyó un único ácido nucleico bloqueado en un segmento en la unión del ligamiento independientemente de si era el lado 3' o 5' de la unión. Cuando se incluían ácidos nucleicos bloqueados en ambos lados (oligo 1 + oligo 2) no se detectó ningún producto. Los datos eran similares para ambas enzimas e independientemente de que se utilizara Mg^{2+} o Mn^{2+} .

Se podrían llevar a cabo mutaciones enzimáticas y exploraciones de selección para identificar una enzima capaz de ligar segmentos con un ácido nucleico bloqueado tanto en el lado 3' como el 5' de la unión.

- 15 **Ejemplo 10: Ensamblaje y ligamiento de tres segmentos (7-6-7) para formar un oligómero con huecos en el que los segmentos 5' y 3' comprenden modificaciones 2' MOE de azúcar en la ribosa y todos los enlaces son enlaces fosforotioato, utilizando una variante de la ligasa CC31 del fago de enterobacterias en presencia de Mg^{2+} o Mn^{2+}**

10.1 Formación del enlace fosforotioato

- 20 Con el fin de determinar si una ligasa CC31 del fago de enterobacterias mutante (SEQ ID NO: 23) era capaz de ligar segmentos oligonucleotídicos modificados con un armazón de fosforotioato, se llevaron a cabo modificaciones 2' MOE de azúcar en la ribosa y bases de pirimidina 5-metiladas, utilizando los segmentos oligonucleotídicos que se muestran en la Tabla 15. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de iones de Mg^{2+} y Mn^{2+} .

10.2 - Materiales

- 25 Los oligonucleótidos se sintetizaron químicamente usando procedimientos convencionales como se muestra posteriormente:

Tabla 17

Nombre	Secuencia
Segmento 5' 2'- MOE PS	5'-mG*mG*mC*mC*mA*dA*dA-3'
Segmento del centro PS	5'-(p)*dC*dC*dT*dC*dG*dG-3'
Segmento 3' 2'- MOE PS	5'-(p)*dC*dT*mU*mA*mC*mC*mU-3'
Matriz biotinilada	5'-biotina dT dT dA dG dT dA dA dG dC dC dG dA dG dG dT dT dT dG dG dC dC-3' (SEQ ID NO: 2)
(p)* = 5-fosforotioato, * = enlace de fosforotioato, mX = bases MOE, dX = las bases de ADN de todos los segmentos y el producto tienen 5-metil pirimidinas (con la excepción de la matriz) mT y m (Me)U se considera que son equivalentes P.D. la molécula diana 2'-MOE PS producida por ligamiento de los segmentos de la tabla 17, cuando se hibridan a la matriz biotinilada que se muestra en la tabla 17, es: 5'-mG*mG*mC*mC*mA*dA*dA*dC*dC*dT*dC*dG*dG*dC*dT*mU*mA*mC*mC*mU-3' (SEQ ID NO: 1)	

La ligasa CC31 del fago de enterobacterias mutante purificada (SEQ ID NO: 23) se preparó como se describió en el ejemplo 5.1. Se llevó a cabo un análisis de HPLC.

10.3 Procedimiento de ensamblaje y ligamiento de oligonucleótidos con una variante de la ligasa CC31 del fago de enterobacterias (SEQ ID NO: 23)

las reacciones se prepararon de la siguiente manera:

Reacción con MgCl ₂	
10 x Tampón de ADN ligasa T4 (NEB)*	5 µl
matriz	20 µM de concentración final
Segmento 5' 2' MOE PS	20 µM de concentración final
Segmento del centro PS	20 µM de concentración final
Segmento 3' 2' MOE PS	20 µM de concentración final
Ligasa (24,3 µM)	10 µl
agua	llevado hasta 50 µl
*1 x de tampón que contiene 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de MgCl ₂ , 1 mM de ATP, 10 mM de DTT, pH 7,5	

Reacción con MnCl ₂	
10x de tampón de ligasa*	5 µl
ATP (10 mM)	5 µl
MnCl ₂ (50 mM)	5 µl
matriz	20 µM de concentración final
Segmento 5' 2' MOE PS	20 µM de concentración final
Segmento del centro PS	20 µM de concentración final
Segmento 3' 2' MOE PS	20 µM de concentración final
Ligasa (24,3 µM)	10 µl
agua	llevado hasta 50 ml
*1 x de tampón que contiene 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de DTT, pH 7,5	

- 5 Las reacciones finales contienen 20 µM de cada segmento y matriz, 5 mM de MgCl₂ o 5 mM MnCl₂, 1 mM de ATP, 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de DTT, pH 7,5 y 4,9 µM de ligasa. Se prepararon reacciones adicionales que no contenían enzima y que servían como control negativo. Las reacciones se incubaron durante 16 horas a 25 °C y luego se interrumpió calentando a 95 °C durante 5 minutos. Las proteínas precipitadas se aclararon mediante centrifugación y se analizaron las muestras por HPLC.

10 10.4 Resultados y conclusiones

- El producto, matriz y oligonucleótidos de segmento se resolvieron claramente en el cromatograma de control y no se observó ningún ligamiento. Las reacciones de ligasa que se llevaron a cabo en presencia de 5 mM de MgCl₂ dieron lugar a la formación de un producto intermedio formado a partir del ligamiento del segmento 5' y el segmento del centro, pero no se detectó un producto de longitud completa. Las reacciones de ligasa que se llevaron a cabo en presencia de MnCl₂ producían tanto el producto de longitud completa como el intermedio (segmento 5' más segmento del centro intermedio). Ambas reacciones de ligasa demostraron que permanecían segmentos oligonucleotídicos sin ligar. Sin embargo, es posible la optimización del protocolo con el fin de maximizar el rendimiento del producto.

- Ejemplo 11: Ensamblaje y ligamiento de tres segmentos (7-6-7) para formar un oligómero con huecos en el que los segmentos 5' y 3' comprenden modificaciones 2' MOE de azúcar en la ribosa y todos los enlaces son enlaces fosforotioato, utilizando la ADN ligasa del virus de Chlorella en presencia de Mg²⁺ nativo**

11.1 - Materiales

- Con el fin de determinar si la ADN ligasa del virus de Chlorella (SEQ ID NO: 29, disponible en el mercado como ligasa SplintR, NEB) era capaz de ligar segmentos oligonucleotídicos modificados con un armazón de fosforotioato, se llevaron a cabo modificaciones 2' MOE de azúcar en la ribosa y bases de pirimidina 5-metiladas, utilizando los segmentos oligonucleotídicos que se muestran en el ejemplo 10.2 tabla 17. Las reacciones se llevaron a cabo a 25 °C, 30 °C y 37 °C para investigar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

11.2 Procedimiento de ensamblaje y ligamiento de oligonucleótidos con la ADN ligasa del virus de Chlorella comercial (SEQ ID NO: 29)

- Cada uno de los segmentos oligonucleotídicos y la matriz se disolvieron en agua libre de nucleasas como se detalla posteriormente:

Matriz biotinilada	249,6 ng/µl
Segmento 5' 2' MOE PS	182,0 ng/µl
Segmento del centro PS	534,0 ng/µl
Segmento 3' 2' MOE PS	531,0 ng/µl

las reacciones se prepararon de la siguiente manera:

10 x de tampón (NEB)*	6 µl
matriz	3,8 µl
Segmento 5' 2' MOE PS	18,1 µl
Segmento del centro PS	4,8 µl
Segmento 3' 2' MOE PS	6,3 µl
agua	15 µl
ligasa SplintR (25 U/µl)	6 µl
*1 x de tampón que contiene 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de MgCl ₂ , 1 mM de ATP, 10 mM de DTT, pH 7,5	

Las reacciones finales contienen 20 µM de cada segmento y matriz, 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de ATP, 10 mM de DTT, pH 7,5 y 2,5 U/µl de ligasa. Las reacciones se incubaron a 25 °C, 30 °C y 37 °C. Se prepararon reacciones adicionales que no contenían enzima y que servían como control negativo. Después de 16 horas de incubación, se detuvieron las reacciones calentando a 95 °C durante 10 minutos. Las proteínas precipitadas se aclararon mediante centrifugación y se analizaron las muestras por HPLC.

11.3 Resultados y conclusiones

El producto, matriz y oligonucleótidos de segmento se resolvieron claramente en el cromatograma de control y no se observó ningún ligamiento. El análisis de HPLC de las reacciones de ligasa demostró que permanecían segmentos oligonucleotídicos sin ligar, pero la ADN ligasa del virus de Chlorella era capaz de ligar satisfactoriamente los segmentos. La actividad de la ligasa aumentaba con el aumento de temperatura. A 25 °C la ADN ligasa del virus de Chlorella era capaz de ligar satisfactoriamente el segmento 5' y el segmento del centro pero no se observó el producto de longitud completa. A 30 °C y 37 °C, se detectó el producto de longitud completa además del intermedio formado por el segmento 5' y el segmento del centro.

Ejemplo 12: Exploración de un panel de 15 ligasas ATP y NAD en cuanto a la actividad hacia el ligamiento de tres segmentos (7-6-7) para formar un oligómero con huecos en el que los segmentos 5' y 3' comprenden modificaciones 2' MOE de azúcar en la ribosa y todos los enlaces son enlaces fosforotioato

12.1 - Materiales

Ligasas dependientes de ATP y NAD de tipo silvestre descritas en la tabla 18 y 19 fusionadas cada una en el extremo N a un CBD. Se sintetizaron los genes, se clonaron en un pET28a y se expresaron en E. coli BL21(DE3) utilizando procedimientos convencionales de clonación, expresión y extracción.

Tabla 18

Ligasas dependientes de ATP		
Nombre	Origen	SEQ ID
M1I5D1_Pbcv	Virus NE-JV-4 de Chlorella Paramecium bursaria	SEQ ID NO: 48
M1I998_Pbcv	Virus NYs1 de Chlorella Paramecium bursaria	SEQ ID NO: 49
M1HX09_Pbcv	Virus NE-JV-1 de Chlorella Paramecium bursaria	SEQ ID NO: 50
M1HUL0_Atcv	Virus Canal-1 de Chlorella Acanthocystis turfacea	SEQ ID NO: 51
M1HRK1_Atcv	Virus Br0604L de Chlorella Acanthocystis turfacea	SEQ ID NO: 52
M1I273_Atcv	Virus NE-JV-2 de Chlorella Acanthocystis turfacea	SEQ ID NO: 53
M1I600_Atcv	Virus TN603.4.2 de Chlorella Acanthocystis turfacea	SEQ ID NO: 54
M1H4A4_Atcv	Virus GM0701.1 de Chlorella Acanthocystis turfacea	SEQ ID NO: 55
F5B464_Sphage	fago S-CRM01 de Synechococcus	SEQ ID NO: 56
A0A0F9M1S3	proteína no caracterizada del mutagenoma de sedimento marino	SEQ ID NO: 57

Tabla 19

Ligasas dependientes de NAD		
Nombre	Origen	SEQ ID
MtNAD	Mycobacterium tuberculosis (cepa ATCC 25618/H37Rv)	SEQ ID NO: 58
EfNAD	Enterococcus faecalis (cepa ATCC 700802/V583)	SEQ ID NO: 59
HiNAD	Haemophilus influenzae (cepa ATCC 51907/DSM 11121/KW20/Rd)	SEQ ID NO: 60
SaNAD	Staphylococcus aureus	SEQ ID NO: 61
SpNAD	Streptococcus pneumoniae (cepa P1031)	SEQ ID NO: 62

Se unieron las fusiones CBD-ligasa a perlas PERLOZA como se ha descrito en 1,4 con las siguientes modificaciones. las proteínas de fusión CBD-ligasa se obtuvieron del crecimiento de una única colonia de células BL21(DE3) (NEB) y

se cultivaron en un cultivo de expresión de 50 ml. Las células se recolectaron mediante centrifugación, se resuspendieron en 5-10 ml de Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) y se lisaron por sonicación. El lisado se aclaró mediante centrifugación y se añadió 1 ml de perlas PERLOZA 100 (PERLOZA) (suspensión al 50%, preequilibradas con 50 mM de Tris-HCl pH 7,5) al sobrenadante que se agitó a 20 °C durante 1 hora. Las perlas de celulosa PERLOZA se recolectaron entonces y se lavaron con 30 ml de tampón (50 mM de Tris pH 8,0, 200 mM de NaCl, un 0,1 % de Tween 20, un 10 % de glicerol) seguido por 10 ml de Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) y se re-suspendieron finalmente en 1 ml de Tris-HCl (50 mM, pH 7,5). Con el fin de analizar la expresión proteica, se mezclaron 20 µl de suspensión de perlas PERLOZA con 20 µl de tampón de carga de SDS y se incubaron a 95 °C durante 5 minutos antes de pasarse por un gradiente en gel de SDS PAGE (4 - 20 %) de acuerdo con un protocolo convencional.

10 12.2. Procedimiento de ensamblaje y ligamiento de oligonucleótidos modificados con 2' MOE y fosforotioato

Se utilizaron los segmentos oligonucleotídicos modificados con un armazón de fosforotioato, modificaciones 2' MOE de azúcar en la ribosa y bases de pirimidina 5-metiladas que se muestran en el ejemplo 10.2 tabla 17. Cada uno de los segmentos oligonucleotídicos y la matriz se disolvieron en agua libre de nucleasas como se detalla posteriormente:

Matriz biotinilada	1500 ng/µl
Segmento 5' 2' MOE PS	1008 ng/µl
Segmento del centro PS	725 ng/µl
Segmento 3' 2' MOE PS	1112 ng/µl

La mezcla de ensayo de ATP se preparó de la siguiente manera:

matriz	85,6 µl
Segmento 5' 2' MOE PS	43,5 µl
Segmento del centro PS	46,8 µl
Segmento 3' 2' MOE PS	40,1 µl
DTT 1M	8 µl
MgCL2 1M	4 µl
ATP (50 mM)	16 µl
Tris 0,5 M	80 µl
agua	476 µl

15 La mezcla de ensayo de NAD se preparó de la siguiente manera:

matriz	85,6 µl
Segmento 5' 2' MOE PS	43,5 µl
Segmento del centro PS	46,8 µl
Segmento 3' 2' MOE PS	40,1 µl
DTT 1M	8 µl
MgCL2 1M	4 µl
NAD (50 mM)	1,6 µl
Tris 0,5 M	80 µl
agua	490,4 µl

Cada proteína inmovilizada (40 µl, suspensión de perlas PERLOZA al 50%) se pipeteó en un tubo de PCR. Las perlas se aglomeraron mediante centrifugación y el sobrenadante se retiró pipeteándolo. La mezcla de ensayo (40 µl) se añadió a cada reacción (las reacciones finales contenían 20 µM de cada segmento y matriz, 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de ATP o 100 µM NAD, 10 mM de DTT, pH 7,5 y 40 µl de ligasa sobre perlas PERLOZA). Una reacción que no contenía proteína servía como control negativo. Las reacciones se incubaron durante 18 horas a 30 °C y luego se interrumpió calentando a 95 °C durante 10 minutos. Las proteínas precipitadas se aclararon mediante centrifugación y se analizaron las muestras por HPLC.

12.3 Resultados y conclusiones

El producto, matriz y oligonucleótidos de segmento se resolvieron claramente en el cromatograma de control y no se observó ningún ligamiento. El análisis de HPLC de las reacciones de ligasa mostraba que todas las proteínas catalizaban el ligamiento satisfactorio del segmento 5' y el segmento del centro para formar un producto intermedio, pero solo algunas ligasas catalizaban el ligamiento de los tres segmentos para dar lugar al producto de longitud completa como se describe en la tabla 20. La ligasa dependiente de NAD de *Staphylococcus aureus* (SaNAD, SEQ ID NO: 61) daba lugar al producto de más longitud completa. Es posible una optimización para mejorar el rendimiento de producto y dentro de la experiencia del experto.

Tabla 20

Nombre del gen	SEQ ID NO	Conversión (%)*	
		Intermedio	producto
M1I5D1_Pbcv	48	5,0	0,8
M1I998_Pbcv	49	5,1	0,0
M1HX09_Pbcv	50	14,4	6,6
M1HUL0_Atcv	51	9,5	2,0
M1HRK1_Atcv	52	2,8	9,4
M1I273_Atcv	53	12,0	6,4
M1I600_Atcv	54	8,8	5,1
M1H4A4_Atcv	55	2,1	0,0
F5B464_Sphage	56	2,1	0,0
A0A0F9M1S3_ms_metagenome	57	1,4	0,0
MtNAD	58	7,1	0,0
EfNAD	59	19,1	0,0
HiNAD	60	0,3	0,0
SaNAD	61	10,5	11,8
SpNAD	62	19,0	0,0

* La conversión se calculó a partir del área del pico de HPLC con respecto a la matriz que no se consumió en la reacción y que sirve como referencia interna. Conversión = área del producto/(matriz + área del producto) * 100

Ejemplo 13: Reacción de ligamiento semi-continua**13.1 - Materiales**

- 5 Se produjo una ligasa de *Staphylococcus aureus* mutante (NAD-14) fusionada en el extremo N a un CBD utilizando procedimientos convencionales de clonación, expresión y extracción. La ligasa mutante NAD-14-CBD se unió entonces a perlas PERLOZA: se añadieron 50 ml de proteína a 7,5 ml de perlas PERLOZA, se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se recolectaron las perlas en una columna de cristal (Columna Econo de BioRad de 10 cm de longitud, 2,5 cm diámetro n.º 7372512). Las perlas se lavaron con 200 ml de Tampón Y (50 mM de Tris8, 500 mM de NaCl, un 0,1 % de Tween 20, un 10 % de glicerol), y luego con 200 ml de Tampón Z (50 mM de Tris8, 200 mM de NaCl, un 0,1 % de Tween 20, un 10 % de glicerol) y 200 ml PBS. La concentración estimada de ligasa NAD-14 mutante en las perlas era de 69 µM de ligasa por ml de perlas.

Se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos ADN de matriz biotinilados y oligonucleótidos de segmento (Tabla 21) mediante procedimientos convencionales en fase sólida.

Tabla 21

Segmento	Secuencia	PM	% de pureza de HPLC
Matriz 3	5' TTTGGTGC GAAGCAGACTGAGGC-3' (SEQ ID NO:30)		
Segmento del centro	5'-(p)dTdTdTdTdTdTdT-3'	1865,4	97,5
Segmento 3' MOE	5'-(p)dTdTdTdTdTdTdTdTdT-3'	2546,7	98,0
Segmento 5' MOE	5'-mGmCmCmUmCdAdG-3'	2492,7	98,3

(p) = fosfato, mX = bases MOE, dX = bases de ADN
todas son 5-metil pirimidinas
todos los enlaces son enlaces fosfodiéster

- 15 Se produjo un "eje tri-matriz" (de aproximadamente 24 kDa) que comprendía un material de soporte al que se hace referencia como "eje" y tres secuencias de matriz (Figura 11). Cada copia de la matriz se unió covalentemente, en su propio punto de enganche individual, al "eje". La molécula del "eje tri-matriz" tiene un peso molecular mayor que el oligonucleótido diana (producto) (con un 100% de complementariedad con la secuencia de la matriz), permitiendo de esta manera que se retenga cuando se separan las impurezas y los productos de la mezcla de reacción. Se debería señalar que en este caso en particular la secuencia de la matriz era la SEQ ID NO: 30 y había tres copias enganchadas en el eje. En el siguiente ejemplo, también se produjo un eje tri-matriz, pero con una secuencia de matriz diferente. En consecuencia, como la secuencia de matriz varía entre los ejemplos, también lo hace el eje tri-matriz.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción (con un volumen total de 5 ml):

250 µl	1 mM de KH ₂ PO ₄ , pH 7,5	(50 mM finales)
108 µl	Segmento del centro 0,07011 M	(1,5 mM finales)

137 µl	Segmento 3' 0,05481 M	(1,5 mM finales)
168 µl	Segmento 5' 0,04461 M	(1,5 mM finales)
750 µl	Eje (Matriz) 0,00387M	(0,55 mM finales)
350 µl	50 mM de NAD ⁺	(3,5 mM finales)
1000 µl	MgCl ₂ 50 mM	(10 mM finales)
2237 µl	H ₂ O libre de nucleasas	

13.2 Procedimientos

Se configuró un sistema semi-continuo como se muestra en la Figura 12.

Se empaquetaron 4 ml de perlas PERLOZA y la ligasa NAD-14 mutante inmovilizada en una columna XK16 de Pharmacia (B). Se utilizó un baño de agua y una bomba peristáltica (C) para mantener la temperatura de la columna, utilizando el compartimento de agua de la columna, a 30 °C. Las perlas se equilibraron corriendo 120 ml (30x el volumen de la columna) de tampón que contenía 50 mM de KH₂PO₄ a pH 7,5 durante 120 minutos a 1 ml/min. Se utilizó una bomba A1 (A) explorer AKTA para crear el flujo a través de la columna XK16 de Pharmacia.

A continuación del equilibrado de la columna, la mezcla de reacción de 5 ml (mezclada bien mediante removido) se cargó en la columna, se recolectó en el tubo de depósito (D) y se recirculó a través de la columna utilizando la bomba A1 explorer AKTA. La mezcla de reacción se recirculó a través del sistema con un caudal de 1 ml/min en modo de circulación continua durante 16 horas. Las muestras se recolectaron después de 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 14 horas y 16 horas para el análisis de HPLC.

13.3 Resultados y conclusiones

Tabla 22

Muestra	Segmento 5' (%)	Segmento del centro (%)	Segmento 3' (%)	Intermedio 5' + centro (%)	Producto (%)
30 min	7,80	11,00	24,00	39,40	4,40
60 min	3,30	4,50	18,80	41,50	18,90
90 min	2,10	2,80	15,10	33,80	34,40
4 h	1,80	2,40	9,60	19,20	56,80
5 h	1,72	2,40	8,30	15,70	61,50
6 h	1,69	2,50	8,60	15,90	69,40
7 h	1,70	2,40	8,30	14,80	70,90
14 h	2,00	2,70	1,60	5,40	88,10
16 h	0,80	1,90	1,70	3,30	89,50

El porcentaje de cada segmento, intermedio y producto se expresa como el área del pico fraccional con respecto al área del pico del eje tri-matriz.

En conclusión, la reacción de flujo semi-continuo funcionó y después de 16 horas la reacción estaba casi completa.

Ejemplo 14: Separación de oligonucleótidos de diferentes tamaños mediante filtración: a) separación de un oligonucleótido 20-mérico (SEQ ID NO: 1) y un eje que comprende tres oligonucleótidos 20-méricos no complementarios (SEQ ID NO: 30); (b) separación de un oligonucleótido 20-mérico (SEQ ID NO: 1) del segmento 6-mérico y oligonucleótidos 8-méricos (véase la Tabla 1) y un eje que comprende tres oligonucleótidos 20-méricos complementarios (SEQ ID NO: 2)

14.1 - Materiales

Todos los oligonucleótidos que se utilizaron se sintetizaron mediante procedimientos convencionales en fase sólida.

Se utilizó un eje tri-matriz, como se ha descrito en 13.1 (Figura 11).

Se utilizaron una variedad de filtros con cortes de peso molecular variados y de diferentes fabricantes como se muestra en las Tablas 23 y 24.

14.2 Procedimientos

14.2.1 Configuración de filtración sin salida y del protocolo para la exploración de membranas poliméricas: (protocolo 1)

Se configuró un sistema de filtración sin salida como se muestra en la Figura 13, que comprendía una celda de filtración sin salida MET colocada en un baño de agua situada sobre un agitador magnético y una placa caliente. La presión dentro de la celda se proporcionaba a partir de un flujo de nitrógeno.

La copa de membrana (de 14 cm²) que se va a ensayar se cortó primero al tamaño apropiado y se colocó en la celda.

La membrana se acondicionó primero con agua de calidad para la HPLC (200 ml) y luego con tampón PBS (200 ml). La celda se despresurizó entonces, se retiró la solución restante de PBS y se reemplazó con una solución que contenía los oligonucleótidos (40 ml de oligonucleótidos en PBS a una concentración de 1 g/l). La celda se colocó sobre una placa de agitado caliente y la solución se calentó hasta la temperatura deseada mientras se agitaba utilizando un agitado magnético. Se aplicó presión a la célula (con un objetivo de aproximadamente 3,0 bares; en cada caso se registró la presión actual). El agitado de la solución se paraba o continuaba y se recolectó la solución de permeado (aproximadamente 20 ml) y se analizó por HPLC. Se registró el flujo. El sistema se despresurizó entonces para permitir el muestreo y el análisis de HPLC de la solución de retenido. Se añadió entonces más tampón PBS (20 ml) a la celda de filtración y se repitió el procedimiento anterior 3 veces. La membrana se lavó finalmente con tampón PBS.

10 Todas las muestras se analizaron por HPLC sin ninguna dilución.

14.2.2 Configuración de filtración sin salida y del protocolo para la exploración de membranas poliméricas: (protocolo 2)

Se configuró un sistema de filtración de flujo cruzado como se muestra en la Figura 14. El vaso de alimentación (1) consistía en un matraz cónico que contenía la solución de oligonucleótidos que se va a purificar. La solución se bombeó hacia una celda de filtración de flujo cruzado (4) utilizando una bomba de HPLC (2) mientras la temperatura dentro de la celda se mantenía utilizando una placa de calor (3). La solución dentro de la celda se hacía recircular utilizando una bomba de engranaje (6). Un indicador de presión (5) hacía posible que se leyera la presión durante el experimento. Las muestras de la solución de retenido se tomaron a partir de la válvula de muestreo (7) mientras que las muestras de solución de permeado se tomaron del vaso de recolección de permeado (8).

20 La copa de membrana que se va a ensayar se cortó primero al tamaño apropiado y se colocó en la celda. El sistema se lavó con solución PBS (100 ml). La temperatura de la solución se ajustó hasta el punto de ajuste deseado. Se alimentó el sistema con una solución que contenía productos oligonucleotídicos en PBS (7,5 ml a 1 g/l). La solución de PBS se bombeó entonces en el sistema utilizando la bomba de HPLC con un caudal que coincidía con el caudal de la solución de permeado (normalmente 3 ml/min). La presión se registró utilizando el indicador de presión. La muestra de solución de retenido se tomó para el análisis de HPLC cada 5 volúmenes de diafiltración. La muestra de solución de retenido se tomó para el análisis de HPLC cada volumen de diafiltración. El experimento se detuvo después de 20 volúmenes de diafiltración.

En el caso del experimento que utiliza la membrana Snyder que tiene un corte de peso molecular de 5 kDa (número de lote 120915R2) y SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 30, se modificó la metodología anterior de la siguiente manera. La copa de membrana que se va a ensayar se cortó primero al tamaño apropiado y se colocó en la celda. El sistema se lavó con una solución de fosfato potásico (100 ml, 50 mM, pH 7,5). La temperatura de la solución se ajustó hasta el punto de ajuste deseado. Se añadió una solución que contenía los productos oligonucleotídicos en fosfato potásico (aproximadamente 1 g/l) a ácido etilendiaminoacético (EDTA) (230 µl de una solución 500 mM). La solución entonces se introdujo en el sistema. La solución de tampón de fosfato potásico se bombeó entonces en el sistema utilizando la bomba de HPLC con un caudal que coincidía con el caudal de la solución de permeado (normalmente 4 ml/min). La presión se registró utilizando el indicador de presión. La muestra de solución de retenido se tomó para el análisis de HPLC cada 5 volúmenes de diafiltración. La muestra de solución de retenido se tomó para el análisis de HPLC cada volumen de diafiltración. El experimento se detuvo después de 15 volúmenes de diafiltración.

14.3 Resultados

Tabla 23: resultados para los experimentos de filtración sin salida siguiendo el protocolo 1 (14.2.1)

Agitado (Sí o No)	Membrana	COPM (kDa)	número de lote	SEQ ID NO	Temp. (°C)	Rechazo (%)	
						Producto	Eje tri-matriz
Sí	NADIR	10	226162	1 y 30	60	38	96
Sí	NADIR	10	226162	1 y 2	60	90	98
					80	40	43
					60	83	92
Sí	NADIR	10	226162	1 y 2	65	77	84
					70	38	41
					75	12	20
Sí	NADIR	5	226825	1 y 2	60	97	95
					65	99	93
					70	97	92
No	NADIR	5	226825	1 y 2	75	90	95
					75	66	96
					75	80	80
No	Snyder	5	120915R2	1 y 2	75	97	98
No	Osmonics	5	622806PT	1 y 2	75	99	98
No	Osmonics	10	622806PW	1 y 2	75	86	95

(continuación)

Agitado (Sí o No)	Membrana	COPM (kDa)	número de lote	SEQ ID NO	Temp. (°C)	Rechazo (%)
COPM = corte de pesos moleculares						

- 5 En el experimento utilizando la membrana NADIR con un COPM de 10 kDa a 60 °C, se demostraba una clara separación entre la secuencia del producto (SEQ ID NO: 1) y el eje tri-matriz no complementario (que comprendía la SEQ ID NO: 30). La Figura 15 muestra a) un cromatograma de la solución del retenido, que permanece en la celda de filtración y que contiene principalmente el eje tri-matriz, después de dos volúmenes de diafiltración; y b) un cromatograma del permeado, solución enriquecida en el producto, después de dos volúmenes de diafiltración.

Tabla 24: resultados para los experimentos de filtración de flujo cruzado siguiendo el protocolo 2 (14.2.2)

Membrana	COPM (kDa)	número de lote	SEQ ID NO	Temp. (°C)	Presión	Volumen de diafiltración	Rechazo (%)				Producto
							Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3		
Osmonics	10	622806PW	1 y 2	75	3,1	0	N/D	N/D	N/D	100	
						5	N/D	N/D	N/D	64	
						10	N/D	N/D	N/D	40	
Snyder	5	120915R2	1 y 2	75	3,1	15	N/D	N/D	N/D	12	
				0		N/D	N/D	N/D	100		
				5		N/D	N/D	N/D	88		
				10		N/D	N/D	N/D	98		
				15		N/D	N/D	N/D	98		
Snyder	5	120915R2	1 y 2	75	3,1	20	N/D	N/D	N/D	96	
				85		0	N/D	N/D	N/D	99	
				5		N/D	N/D	N/D	63		
				10		N/D	N/D	N/D	79		
				15		N/D	N/D	N/D	100		
Snyder	5	120915R2	1 y 2 + segmentos de la tabla 1	50	3,0	20	N/D	N/D	N/D	100	
				0		100	100	100	100		
				5		39	39	40	100		
				10		82	86	86	100		
				15		77	81	79	100		
						20	*	*	*	100	
Snyder	5	120915R2	1 y 2	80	3,1	0	N/D	N/D	N/D	96	
						5	N/D	N/D	N/D	22	
						10	N/D	N/D	N/D	10	
Snyder	5	120915R2	46 y 30	80	3,4	20	N/D	N/D	N/D	38	
						0	N/D	N/D	N/D	98	
						5	N/D	N/D	N/D	83	
						10	N/D	N/D	N/D	68	
						15	N/D	N/D	N/D	72	
COPM = corte de pesos moleculares											
concentración de solutos demasiado baja que impide un análisis significativo											

En el experimento que utiliza la membrana Snyder con un COPM de 5 kDa a 50 °C y una presión de 3,0 bares, se demostraba una clara separación entre las secuencias de segmento (véase la tabla 1) y el eje tri-matriz complementario (que comprendía la SEQ ID NO: 2) y el producto (SEQ ID NO: 1). La Figura 16 muestra a) un cromatograma de la solución del retenido, que contenía principalmente el eje tri-matriz y el producto, después de 20 volúmenes de diafiltración; y b) un cromatograma del permeado, que contenía principalmente los oligonucleótidos del segmento, después de 20 volúmenes de diafiltración.

En el experimento que utiliza la membrana Snyder con un COPM de 5 kDa a 80 °C y una presión de 3,1 bares, se demostraba una clara separación entre el eje tri-matriz complementario (que comprendía la SEQ ID NO: 2) y el producto (SEQ ID NO: 1). La Figura 17 muestra a) un cromatograma de la solución del retenido, que contenía solo el eje tri-matriz, después de 20 volúmenes de diafiltración; y b) un cromatograma de la solución del permeado, que contenía solo el producto, después de 2 volúmenes de diafiltración.

14.4. Conclusiones

Se pueden separar los oligonucleótidos de diferentes longitudes y pesos moleculares utilizando la filtración. Como se ha mostrado anteriormente, el tipo de membrana y las condiciones, tales como la temperatura, afectan al nivel de separación. Para un determinado conjunto de oligonucleótidos de diferentes longitudes/pesos moleculares, se pueden seleccionar membranas y condiciones adecuadas para permitir la separación necesaria. Por ejemplo, los inventores han demostrado que los oligonucleótidos de segmento (cortómeros de 6 y 8 nucleótidos de longitud), como se expone en la tabla 1, se pueden separar del producto oligonucleotídico (oligonucleótidos 20-mérico que tiene la SEQ ID NO:1) y el eje tri-matriz (que comprende 3 x 20-meros de SEQ ID NO: 2 enganchados a un soporte sólido), y el producto oligonucleotídico y el eje tri-matriz pueden, a su vez, separarse entre ellos.

Conclusiones totales

Los inventores han demostrado que es posible sintetizar oligonucleótidos, incluyendo oligonucleótidos con un intervalo de modificaciones químicas terapéuticamente relevantes, en una solución mediante el ensamblado de segmentos oligonucleotídicos cortos sobre una matriz complementaria, el ligamiento de los segmentos en conjunto y la separación del producto oligonucleotídico de tanto las impurezas como de su matriz complementaria en un procedimiento eficaz que es escalable y adecuado para la fabricación de oligonucleótidos terapéuticos a gran escala.

Sintetizando los oligonucleótidos en solución, los inventores han evitado las restricciones de subir de escala que imponen los procedimientos en fase sólida. Al utilizar las propiedades inherentes del ADN para reconocer las secuencias complementarias de manera específica y la unión con secuencias complementarias con una afinidad que refleja tanto la fidelidad de la secuencia complementaria como la longitud de la secuencia complementaria, los inventores han sido capaces de producir oligonucleótidos con alta pureza sin la necesidad de cromatografía. Esto mejora tanto la eficacia del procedimiento de producción como la escalabilidad del procedimiento. Al recuperar la matriz en un estado sin cambios durante el procedimiento de separación los inventores fueron capaces de reutilizar la matriz para rondas posteriores de síntesis y así evitar las consecuencias económicas de tener que hacer un equivalente de la matriz para cada equivalente de producto oligonucleotídico formado.

Por último, aunque se sabe que las ligasas de tipo silvestre ligan el ADN normal con eficacia, los inventores han demostrado que las modificaciones del ADN dan como resultado una disminución de la eficacia de ligamiento y que múltiples modificaciones de ADN se añaden a este efecto sobre la disminución de la eficacia de ligamiento, lo que puede, en algunos casos, dar lugar a una ADN ligasa completamente ineficaz. Los inventores han demostrado que mediante una mutación y evolución apropiadas de la ADN ligasas, Se puede restaurar la eficacia de ligamiento y las ADN ligasa modificadas apropiadamente son catalizadores eficaces para la síntesis de oligonucleótidos que contengan múltiples modificaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO	Identificador de Secuencia
1	Secuencia del producto oligonucleotídico deseado ("diana") del Ejemplo 1
2	Secuencia de la matriz oligonucleotídica del Ejemplo 1-4, 6, 10 y 11
3	Secuencia proteica de la ADN ligasa T4 de tipo silvestre
4	Secuencia proteica de la ADN ligasa T4 de tipo silvestre (cuando se fusiona al CBD)
5	Secuencia diana del Ejemplo 2
6	Secuencia proteica de la ADN ligasa CC31 del fago de enterobacterias de tipo silvestre
7	Secuencia proteica de la ADN ligasa CC31 del fago de enterobacterias de tipo silvestre (cuando se fusiona al CBD)
8	Secuencia proteica de la ADN ligasa Shf125875 del fago de Shigella de tipo silvestre
9	Secuencia proteica de la ADN ligasa Shf125875 del fago de Shigella de tipo silvestre (cuando se fusiona al CBD)
10	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón T4)
11	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón T4)
12	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón T4)

(continuación)

SEQ ID NO	Identificador de Secuencia
13	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón T4)
14	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón T4)
15	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón T4)
16	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón T4)
17	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón T4)
18	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón T4)
19	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón T4)
20	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón T4)
21	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón T4)
22	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón T4)
23	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón CC31 del fago de enterobacterias - clon A4)
24	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón CC31 del fago de enterobacterias)
25	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón CC31 del fago de enterobacterias)
26	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón CC31 del fago de enterobacterias)
27	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón CC31 del fago de enterobacterias)
28	Secuencia proteica de ligasa mutante (armazón Shf125875 del fago de Shigella)
29	Secuencia proteica de ligasa de Chlorella de tipo silvestre
30	Secuencia de la matriz oligonucleotídica del Ejemplo 5, 8 y 9
31	Secuencia de la matriz oligonucleotídica del Ejemplo 5
32	Secuencia de la matriz oligonucleotídica del Ejemplo 5
33	Secuencia de la matriz oligonucleotídica del Ejemplo 5
34	Secuencia de la matriz oligonucleotídica del Ejemplo 5
35	Secuencia de la matriz oligonucleotídica del Ejemplo 5
36	Secuencia de la matriz oligonucleotídica del Ejemplo 5
37	Secuencia de la matriz oligonucleotídica del Ejemplo 5
38	Secuencia de la matriz oligonucleotídica del Ejemplo 5
39	Secuencia de la matriz oligonucleotídica del Ejemplo 5
40	Secuencia de la matriz oligonucleotídica del Ejemplo 5
41	Secuencia de la matriz oligonucleotídica del Ejemplo 5
42	Secuencia de la matriz oligonucleotídica del Ejemplo 5
43	Secuencia de la matriz oligonucleotídica del Ejemplo 5
44	Secuencia de la matriz oligonucleotídica del Ejemplo 5
45	Secuencia de la matriz oligonucleotídica del Ejemplo 5
46	Secuencia de oligonucleótidos "20-méricos" del Ejemplo 14
47	Secuencia de la matriz oligonucleotídica del Ejemplo 7
48	Ligasa NE-JV-4 del virus de Chlorella Paramecium bursaria
49	Ligasa NYs1 del virus de Chlorella Paramecium bursaria
50	Ligasa NE-JV-1 del virus de Chlorella Paramecium bursaria
51	Ligasa Canal-1 del virus de Chlorella Acanthocystis turfarea
52	Ligasa del virus Br0604L de Chlorella Acanthocystis turfarea
53	Ligasa del virus NE-JV-2 de Chlorella Acanthocystis turfarea
54	Ligasa del virus TN603.4.2 de Chlorella Acanthocystis turfarea
55	Ligasa del virus GM0701.1 de Chlorella Acanthocystis turfarea
56	Ligasa S-CRM01 del fago de Synechococcus
57	Ligasa del metagenoma de sedimento marino
58	Ligasa del Mycobacterium tuberculosis (cepa ATCC 25618/H37Rv)
59	Ligasa del Enterococcus faecalis (cepa ATCC 700802/V583)
60	Ligasa del Haemophilus influenzae (cepa ATCC 51907/DSM 11121/ KW20/Rd)
61	Ligasa del Staphylococcus aureus
62	Ligasa del Streptococcus pneumoniae (cepa P1031)

SEQ ID NO: 1
GCCAAACCTCGGCTTACCT

SEQ ID NO:2
TTTAGGTAAGCCGAGGTTTGGCC

SEQ ID NO: 3

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVRRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGMLTLTDMLDIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAPQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGLDLFLDAYPENSKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIDVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 4

GSILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVRRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGMLTLTDMLDIEFTLA
 ATRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAPQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 EPEGLDFLDAYPENSKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDV
 RFSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIDVDLKIVGI
 YPHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
 VKLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 5

5 GGC CAA ACC UCG GCU UAC CU

SEQ ID NO: 6

MILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVRFRMTYDGKLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAQRV
 VTGNAAKEKLEIALSQTSDADADEVVKKVLLRDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQMLASSYDEKGIEKNIKFPAFA
 QLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGLDLLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPLD
 DIFGDLPELSKAKEFKEESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFRAL
 LMVQGYSSQMILIHIVHNLDEAKVIYRKYVDEGLEGIILKNIGAFWENTRSKNLYKFKEVITIDLRIVDIYHSKQ
 PGKAGGFYLESEGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAAEGRTDYVKLFLPI
 AIKMRRDKDVANTFADIWGDFFHEVTGL

SEQ ID NO: 7

GSILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVRFRMTYDGKLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAQRV
 VVTGNAAKEKLEIALSQTSDADADEVVKKVLLRDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQMLASSYDEKGIEKNIKFPAF
 AQLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGLDLLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPL
 DDIFGDLPELSKAKEFKEESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFRAL
 LELMVQGYSSQMILIHIVHNLDEAKVIYRKYVDEGLEGIILKNIGAFWENTRSKNLYKFKEVITIDLRIVDIYHS
 KQPGKAGGFYLESEGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAAEGRTDYVKLFL
 LPIAIKMRRDKDVANTFADIWGDFFHEVTGL

SEQ ID NO: 8

10

MILDILNQIAAIGSTKTKQEILKKNKDNKLLERVYRLTYARGIQYYIKKWPGPGERSQAYGELLEDDMLDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIKELMGYIADGKPDDVEVLRRVMMRDLEVGASVSIANKVWPGLIQLQPQMLASAYDEKLITKNIK
 WPAFAQLKADGARCFAEVRDDGVQFFSRAGNEYHGLTLLADELMEMTKEARERHPNGVLIDGELVYHSFDIKKA
 VSSGNDLSFLFGDNEESEEVQVADRSTSNGLANKSLQGTISPKEAEGMVLQAWDYVPLDEVYSDGKIKGQKYDV
 RFAALENMAEGFKRIEPIENQLVHNLDEAKVYKKYVDQGLEGIIKNRDSYWENKRSKNLIKFEVIDIALEVVG
 YYEHSKDPNKLGGVELVSRCRITTDGSGFKDTTHKTVDGVKVLPLDERHDLDRERLMAEAREGKLIGRIADC
 ECNGWVHSGREGTVGIFLPIIKGFRFDKTEADSFEDVFGPWSQTGL

SEQ ID NO: 9

GSILDILNQIAAIGSTKTKQEILKKNKDNKLLERVYRLTYARGIQYYIKKWPGPGERSQAYGELLEDDMLDFIEFTL
 ATRKLTGNAAIKELMGYIADGKPDDVEVLRRVMMRDLEVGASVSIANKVWPGLIQLQPQMLASAYDEKLITKNIK
 WPAFAQLKADGARCFAEVRDDGVQFFSRAGNEYHGLTLLADELMEMTKEARERHPNGVLIDGELVYHSFDIKKA
 VSSGNDLSFLFGDNEESEEVQVADRSTSNGLANKSLQGTISPKEAEGMVLQAWDYVPLDEVYSDGKIKGQKYDV
 RFAALENMAEGFKRIEPIENQLVHNLDEAKVYKKYVDQGLEGIIKNRDSYWENKRSKNLIKFEVIDIALEVVG
 YYEHSKDPNKLGGVELVSRCRITTDGSGFKDTTHKTVDGVKVLPLDERHDLDRERLMAEAREGKLIGRIADC
 ECNGWVHSGREGTVGIFLPIIKGFRFDKTEADSFEDVFGPWSQTGL

SEQ ID NO: 10

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRKYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGMLTLTDMDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGLDLFLDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIENQVWNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIIKNIDGLWENARSKNLYKFKRVIDVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYYV
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

5

SEQ ID NO: 11

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRKYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGMLTLTDMDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGLDLFLDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIENQVWNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIIKNIDGLWENARSKNLYKFKGVIDVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYYV
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 12

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGMLTLTDMLDIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGLDLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIIILKNIDGLWENARSKNLYKFKKVIDVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTIMENQNYIIGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 13

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGMLTLTDMLDIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGLDLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVILVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTIMENQNYIIGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 14

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGMLTLTDMLDIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGLDLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIKVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTIMENQNYIIGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

5

SEQ ID NO: 15

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGMLTLTDMLDIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGYYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGLDLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIQVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTIMENQNYIIGKILECECNGWLKSDGRDYY
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 16

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVRILTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGMLTLTDMLDIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGLDLFLDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRTDYV
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 17

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVRILTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGMLTLTDMLDIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGLDLFLDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIRVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRTDYV
 KI FI PTATRI RFDKTKANTFFDVFGDFHFVTGI

SEQ ID NO: 18

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVRILTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGMLTLTDMLDIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGLDLFLDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEAIDVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRTDYV
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

5

SEQ ID NO: 19

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVRILTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGMLTLTDMLDIEFTLA
 TRKLTGNAAIEELTGITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
 PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
 PEGLDLFLDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
 FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEKIDVDLKIVGIY
 PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRTDYV
 KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 20

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVRILTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGMLTLTDMLDIEFTLA
TRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
PEGLDFLFDAYPENSKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKRVIVDLKIVGIY
PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 21

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVRILTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGMLTLTDMLDIEFTLA
TRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
PEGLDFLFDAYPENSKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKKVIIEVDLKIVGIY
PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

SEQ ID NO: 22

MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVRILTYSRGLQYYIKKWPKGIATQSFGMLTLTDMLDIEFTLA
TRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKF
PAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE
PEGLDFLFDAYPENSKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR
FSKLEQMTSGYDKVILIENQVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKKVIHVDLKIVGIY
PHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTRIMENQNYIYGKILECECNGWLKSDGRDYY
KLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL

5

SEQ ID NO: 23

MILDIINEIASIGSTKEKEAIRRHKDNELLKRVRMTYDGKLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKR
VTGNAAKEKLEIALSQTSDADADEVVKKVLLRDLRCGASRSIANKVWNLIPEQPQMLASSYDEKGIEKNIKFPAFA
QLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGLDLLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPLD
DIFGDLPELSKAKEFKEESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFALE
LMVQGYSQMILIHIVHNLDEAKVIYRKYVDEGLEGIILKNIGAFWENTRSKNLYKFKRVIVIDLRIVDIYEHKQ
PGKAGGFYLESEGLIKVAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAAEGRTDYVKLFLPI
AIKMRRDKDVANTFADIWGFHEVTGL

SEQ ID NO: 24

MILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVFRMTYDGKLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKR
 VTGNAAKEKLEIALSQTSDADAIEVVKVLLRDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQMLASSYDEKGIEKNIKFP
 QLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGDLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPLD
 DIFGDLPELSKAKEFKESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFR
 LMVQGYSGMILIHIVHNLDEAKVIYRKVYDEGLEGIILKNIGAFWENTRSKNLYKFKKVIKIDLRIVDIYH
 PGKAGGFYLESECGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAAEGRTDYVKL
 AIKMRRDKDVANTFADIWGDFFHEVTGL

SEQ ID NO: 25

MILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVFRMTYDGKLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKR
 VTGNAAKEKLEIALSQTSDADAIEVVKVLLRDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQMLASSYDEKGIEKNIKFP
 QLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGDLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPLD
 DIFGDLPELSKAKEFKESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFR
 LMVQGYSGMILIHIVHNLDEAKVIYRKVYDEGLEGIILKNIGAFWENTRSKNLYKFKGVIFIDLRIVDIYH
 PGKAGGFYLESECGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAAEGRTDYVKL
 AIKMRRDKDVANTFADIWGDFFHEVTGL

SEQ ID NO: 26

MILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVFRMTYDGKLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKR
 VTGNAAKEKLEIALSQTSDADAIEVVKVLLRDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQMLASSYDEKGIEKNIKFP
 QLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGDLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPLD
 DIFGDLPELSKAKEFKESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFR
 LMVQGYSGMILIHIVHNLDEAKVIYRKVYDEGLEGIILKNIGAFWENTRSKNLYKFKGVIFIDLRIVDIYH
 PGKAGGFYLESECGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAAEGRTDYVKL
 AIKMRRDKDVANTFADIWGDFFHEVTGL

5

SEQ ID NO: 27

MILDIINEIASIGSTKEKEAIIRRHKDNELLKRVFRMTYDGKLQYYIKKWDTRPKGDIHLTLEDMLYLLEEKLAKR
 VTGNAAKEKLEIALSQTSDADAIEVVKVLLRDLRCGASRSIANKVWKNLIPEQPQMLASSYDEKGIEKNIKFP
 QLKADGARAFAEVRGDELDDVKILSRAGNEYLGDLKQQLIEMTKEARERHPGGVMIDGELVYHASTLPAGPLD
 DIFGDLPELSKAKEFKESRTMSNGLANKSLKGTISAKEAAGMKFQVWDYVPLDVVYSEGKQSGFAYDVRFR
 LMVQGYSGMILIHIVHNLDEAKVIYRKVYDEGLEGIILKNIGAFWENTRSKNLYKFKRVIFIDLRIVDIYH
 PGKAGGFYLESECGLIKVKAGSGLKDKPGKDAHELDRTRIWENKNDYIGGVLESECNGWLAAEGRTDYVKL
 AIKMRRDKDVANTFADIWGDFFHEVTGL

SEQ ID NO: 28

MILDILNQIAAIGSTKTKQEILKKNKDNKLLERVYRLTYARGIQYYIKKWPGPGERSQAYGLLELDDMLDFIEFTLA
 TRKLTGNAAIKELMGYIADGKPDDVEVLRRVMMRDLEV GASVSIANKVWPGLIQLQPQMLASAYDEKLITKNIK
 WPAFAQLKADGARCFAEVRDDGVQFFSRAGNEYHGLTLLADELMEMTKEARERHPNGVLIDGELVYHSFDIKKA
 VSSGNDLSFLFGDNEESEEVQVADRSTSNGLANKSLQGTISPKEAEGMVLQAWDYVPLDEVYSDGKIKGQKYDV
 RFAALENMAEGFKRIEPIENQLVHNLDEAKVVYKKYVDQGLEGIIILKNRDSYWENKRSKNLIKFKRVIVIALEVVG
 YYEHSKDPNKLGGVELVSRCTRITDCGSGFKDTTHKTVDGKVLPLDERHDLDRERLMAEAREGKLIGRIADC
 ECNGWVHSGREGTVGIFLPIIKGFRFDKTEADSFEDVFGPWSQTGL

SEQ ID NO: 29

MAITKPLLAATLENIEDVQFPCLATPKIDGIRSVKQTQMLSRTEFKPIRNSVMNRLLTELLPEGSDGEISIEGATFQD
 TTSVMTGHKMYNAKFSYYWFDYVTDDPLKKYIDRVEDMKNYITVHPHILEHAQVKIIPVEINNITELLQYER
 DVLKSGFEGVMIRKPDGKYKFRSTLKEGILLKMKQFKDAEATIISMTALFKNTNTKTKDNFGYSKRSTHKSCHKV
 EEDVMGSIEVDYDGVVFSIGTGFDADQRRDFWQNKESYIGKMKVKFYFEMGSKDCPRFPVFIGIRHEEDR

	<u>SEQ ID NO: 30</u>
5	TTTGGTGCGAAGCAGACTGAGGC
	<u>SEQ ID NO: 31</u>
	TTTGGTGCGAAGCAGAGTGAGGC
	<u>SEQ ID NO: 32</u>
	TTTGGTGCGAAGCAGATTGAGGC
10	<u>SEQ ID NO: 33</u>
	TTTGGTGCGAAGCAGAATGAGGC
	<u>SEQ ID NO: 34</u>
	TTTGGTGCGAAGCAGTCTGAGGC
	<u>SEQ ID NO: 35</u>
15	TTTGGTGCGAAGCAGTGTGAGGC
	<u>SEQ ID NO: 36</u>
	TTTGGTGCGAAGCAGTTTGAGGC
	<u>SEQ ID NO: 37</u>
	TTTGGTGCGAAGCAGTATGAGGC
20	<u>SEQ ID NO: 38</u>
	TTTGGTGCGAAGCAGCCTGAGGC
	<u>SEQ ID NO: 39</u>
	TTTGGTGCGAAGCAGCGTGAGGC
	<u>SEQ ID NO: 40</u>
25	TTTGGTGCGAAGCAGCTTGAGGC
	<u>SEQ ID NO: 41</u>
	TTTGGTGCGAAGCAGCATGAGGC
	<u>SEQ ID NO: 42</u>
	TTTGGTGCGAAGCAGGCTGAGGC
30	<u>SEQ ID NO: 43</u>
	TTTGGTGCGAAGCAGGGTGAGGC
	<u>SEQ ID NO: 44</u>
	TTTGGTGCGAAGCAGGTTGAGGC
	<u>SEQ ID NO: 45</u>
35	TTTGGTGCGAAGCAGGATGAGGC
	<u>SEQ ID NO: 46</u>
	<u>GCCUCAGTCTGCTTCGCACC</u>
	<u>SEQ ID NO: 47</u>
	TTTGGTGCGAAGCAGAAGGTAAGCCGAGGTTTGCC
40	<u>SEQ ID NO: 48</u>

MAITKPLLAATLENIEDVQFPCLATPKIDGIRSVKQTQMLSRTFKPIRNSVMNRLLTELLPEGSDGEISIEGATFQD
TTSAVMTGHKMYNAKFSYYWFDYVTDPLKKYSRVEDMKNYITAHPHILDHEQVKIIPVEINNITELLQYE
RDVLSKGFEGVMIRKPDGKYKFRSTLKEGILLKMKQFKDAEATIISMTALFKNTNTKTKDNFGYSKRSTHKNKG
VEEDVMGSIEVDYDGVVFSIGTGFDADQRRDFWQNKESYIGKMKVKFYFEMGSKDCPRFPVFIGIRHEEDH

SEQ ID NO: 49

MTIAKPLLAATLENLDDVKFCLVTPKIDGIRSLKQQHMLSRTFKPIRNSVMNKLLSELLPEGADGEICIEDSTFQA
TTSAVMTGHKVYDEKFSYYWFDYVDDPLKSYTDRVNDMKKYVDDHPHILEHEQVKIIPVEINNIDELSQYE
RDVLAKGFEGVMIRRPDGKYKFRSTLKEGILLKMKQFKDAEATIISMSPLKNTNAKSKDNLGYSKRSTHKSJK
VEEETMGSIEVDYDGVVFSIGTGFDDEQRKHFVENKDSYIGKLLKFYFEMGSKDAPRFPVFIGIRHEEDC

SEQ ID NO: 50

MTAIQKPLLAASFKKLTADVVPVFATPKLDGIRALKIDGAFVSRTFKPIRNRAIADALQDLLPNGSDGEILSGST
FQDASSAVMTAKAGIGANTIFYWFDYVKDDPNKPYLDRMTDMENYLKERPEILNDDRIKIVPLIPKKIETKDELD
TFEKICLDQGFEGVMIRSGAGKYKFRSTEKEGILIKIKQFEDDEAVVIGFTPMQNTNDKSMNELGDMKRSSH
DGKVNLDTLGALEVDWNGITFSIGTGFDHALRDKLWSEKDKLIGKIVKFYFAQGVKTAPRFPVFIGFRDPDDM

5

SEQ ID NO: 51

MAIQKPLLAASLKMSVGDLTFFPVFATPKLDGIRALKVGGTIVSRTFKPIRNSAISEVLASILPDGSDGEILSGKTF
QESTSTVMTADAGLGSMTFFWFDYVKDDPNKGYLDRIADMKSFDRHPEILKDKRVTIVPLFPKKIDTTEELHE
FEKWCLDQGFEGVMVRNAGGKYKFRSTEKEQILVKIKQFEDDEAVVIGVSALQNTNDKKLNQLGEMRRTSH
QDGKVELEMLGALDVDWNGIRFSIGTGFDRTVDLWKRREGVIGKIVKFYFSQGIKTAPRFPVFLGFRDKDD
M

SEQ ID NO: 52

MAIQKPLLAASLKLSVDDLTFPVYATPKLDGIRALKIDGTLVSRTFKPIRNTTISKVLTSLLPDGSDGEILSGKTFQ
DSTSTVMSADAGIGSGTTFWFDYVKDDPNKGYLDRIADIKKFIDCRPEILKDSRVIIIVPLFPKKIDTAEELNVFEK
WCLDQGFEGVMVRNAGGKYKFRSTEKEQILVKIKQFEDDEAVVIGVSALQNTNDKKVNELGEMRRTSHQDG
KVDLDMLGALDVDWNGIRFGIGTGFDKDTREDLWKRDSIIGKIVKFYFSQGVKTAPRFPVFLGFRDKNDM

10 SEQ ID NO: 53

MAIQKPLLAASLKLSVDDLTFPVYATPKLDGIRALKIDGTIVSRTFKPIRNTTISNVLSLLPDGSDGEILSGKTF
QDSTSTVMSADAGIGSGTTFWFDYVKDDPNKGYLDRIADMKKFVDSHPEILKDRRVTVPLIPKKIDTVEELNV
FEQWCLDQGFEGVMVRNAGGKYKFRSTEKEQILVKIKQFEDDEAVVIGVSALQTNVNDKKMNELGDMRRTSH
KDGTKIDLEMLGALDVEWNGIRFGIGTGFDKDTREDLWKKRDSIIGKVKFKYFSQGIKTAPRFPVFLGFRDEND
M

SEQ ID NO: 54

MAIQKPLLAASLKKMSVDNLTFPVYATPKLDGIRALKIDGTLVSRTFKPIRNTTISKVLASLLPDGSDGEILSGKTF
QDSTSTVMTTDAIGSDTTFFWFDYVKDDPKGYLDRIADMKTQFVDQHPEILKDSCVTIVPLFPKKIDTPEELHV
FEKWCLDQGFEGVMVRTAGGKYKFGSTEKEQILVKIKQFEDDEAVVIGVSALQNTNTNDKKLNQLGEMRRTSH
QDGKVDLMDLGDVDWNGIRFSIGTGFDKDTREDLWKQRDSIVGKVVFKYFSQGIKTAPRFPVFLGFRDEN
DM

SEQ ID NO: 55

MAIQKPLLAASLKKMSVDDLTFPVYTPKLDGIRALKIDGTLVSRTFKPVRNSAISEVLASLLPDGSDGEILSGKTF
QDSTSTVMTTDAIGSDTTFFWFDYVKDDPNKGYLDRIADMKTQFVDQHPEMLKDNHVTIVPLIPKKIDTVEELNI
FEKWCLDQGFEGVMVRNAGGKYKFGSTEKEQILVKIKQFEDDEAVVIGVSALQNTNTNDKKLNQLGEMRRTSH
QDGKIDLEMLGDVDWNGIRFSIGTGFDRTVDLWKRRDGIVGRTIKFKYFGQGIKTAPRFPVFLGFRDKDD
M

SEQ ID NO: 56

MLAGNFDPKKAKFPYCATPKIDGIRFLMVNGRALSRTFKPIRNEYIQKLLSKHLPDGIDGELTCGDTFQSSTSAIM
RIAGEPDFKAWIFDYVDPDSTSILPFIERFDQISDIIYNGPIPFKHQVLGQSILYNIDDLNRYEEACLNIEGYEVMML
RDPYGTYKFGRSSTNEGILLKVKRFEDAEATVIRIDEKMSNQIAEKDNFGRTRSSCLDGMVPMETT GALFVRN
SDGLEFSIGSGLNDEMREIWKNKSSYIGKLVKYKYPQGVKDLPRHPVFLGFRDPDDM

5

SEQ ID NO: 57

MDAHELMKLNIEYAERQNKQKKQITKPMPLAASLKDITQLDYSKGYLATQKLDGIRALMIDGKLVSRFTKPIRNN
HIREMLEDVLPDGADGEIVCPGAFQATSSGVMSSANGEPEFIYYMFDYVKDDITKEYWRRQTDMVQWLINQGP
RTPGLSKLKVPTLIKNDHLKTYETECIDKGFEGVILRTPDSPYKCGRSTAKQEWLLKLRKFADDEAVVIGFTEK
MHNDNEATKDKFGHTVRSSHENKRPAGTLGSLIVRDIKTEIEFEIGTGFDDELRLQKIWDARPEWDGLCVKYKH
FAISGVKEKPRFSPFIGVRDVEDM

SEQ ID NO: 58

MSSPDADQTAPVLRQWQALAEVREHQFRYYVRDAPIIISDAEFDELLRRLEALEEQHPELRTPDSPTQLVGGA
GFATDFEPVDHLERMLSLDNAFTADELAAGRIHAIEVGDAAHYLCLEKIDGVALSLVYREGRLTRASTRGDGR
TGEDVTLNARTIADVPERLTPGDDYPVPEVLEVRGEVFFRLDDFQALNASLVEEGKAPFANPRNSAAGSLRQKDF
AVTARRRLRMICHGLGHVEGFRPATLHQAYLALRAWGLPVSEHTTLATDLAGVRERIDYWGEHRHEVDHEIDG
VVVKVDEVALQRRLGSTSRAPRWAIAYKYPPEEAQTLLDIRVNVGRTGRITPFAFMTVPKVAGSTVGQATLHN
ASEIKRKGVLIGDTVIRKAGDVIPEVLGPVVELRDGSEREFIMPTTCPECGSPLAPEKEGDADIRCPNARGCPGQ
LRERVHVASRNLIDIEVLGYEAGVALLQAKVIADEGELFALTERDLLRTDLFRTKAGELSANGKRLLVNLDKAKA
APLWRVLVALSIRHVGPTAARALATEFGSLDAIAAASTDQLAAVEGVGPTIAAAVTEWFAVDWHREIVDKWRRA
GVRMVDERDESVRPTLAGLTIVVTGSLTGFSRDDAKEAIVARGGKAAGSVSKKTNVYVAGDSPGSKYDKAVELG
VPILDEDGFRLLADGPASRT

10 SEQ ID NO: 59

MEQQPLTLTAATTRAQELRKQLNQYSHEYVVKDQPSVEDYVYDRLYKELVDIETEFPLITPDSPTQRVGGKVLS
 GFEEKPHDIPMYSLNDGFSKEDIFAFDERVRKAIGKPVAYCCCLKIDGLAISLRYENGVFVRGATRGDGTVENIT
 ENLRTVRSVPMRLTEPISVEVRGECYMPKQSFVALNEEREENGQDIFANPRNAAAGSLRQLDTKIVAKRNLNTFL
 YTVADFGPMKAKTQFEALEELSAIGFRTNPERQLCQSIDEVWAYIEEYHEKRSTLPYEIDGIVIKVNEFALQDELG
 FTVKAPRWAIAYKFPPEEAETVVEDIEWTIGRTGVVTPTAVMAPVRVAGTTVSRASLHNADFIQMKDIRLNDHVI
 IYKAGDIIPEVAQVLVEKRAADSQPYEMPTHCPICHSELVHLDEEVALRCINPKCPAQIKEGLNHFVSRNAMNIDG
 LGPRVLAQMYDKGLVKDVADLYFLTEEQLMTLDKIKEKSANNIYTAIQGSKENSVERLIFGLGIRHVGAKAAKILA
 EHFGDLPTLSRATAEEIVALDSIGETIADSVVTFYFENEVHELMAELEKAQVNLTYKGLRTEQLAEVESPFKDKTV
 VLTGKLAQYTREEAKEKIEENLGGKVTGSVSKKTDIVVAGEDAGSKLTKAESLGVTWNEQEMVDALDASHF

SEQ ID NO: 60

MTNIQTQLDNLKTLRQYEYEHVLDNPSVPDSEYDRLFHQLKALELEHPEFLTSDSPTQRVGAKPLSGFSQIRH
 EIPMLSLDNAFSDAEFNAFVKRIEDRLILLPKPLTFCCEPKLDGLAVSILYVNGELTQAATRGDGTTGEDITANIRT
 IRNVPLQLLTDNPPARLEVRGEVFMHAGFERLNKYALEHNEKTFANPRNAAAGSLRQLDPNITSKRPLVLNAYGI
 GIAEGVDLPTTHYARLQWLKSIGIPVNPEIRLCNGADEVLGFYRDIQNKRSSLGVDIDGTVLKINDIALQNELGFI
 SKAPRWAIAYKFPAQEELTLLNDVEFQVGRGTGAIPTVAKLEPVFVAGVTVSNATLHNGDEIERLNIAIGD TVVIRR
 AGDVIPQIIGVLHERRPDNAKPIIFPTNCPVCDSQIIRIEGEAVARCTGGLFCAAQRKEALKHFVSRKAMDIDGVG
 GKLIEQLVDRELIHTPADLFLDLTTLRLERMGAKSANALNSLENAKSTTLARFIFALGIREVGEATLNLANHF
 KTLDAKLDANLEELQQVPDVGEVVANRIFIFWREAHNVAVEDLIAQGVHWETVEVKEASENLFKDKTVVLTGT
 LTQMGRNEAKALLQQLGAKVSGSVSSKTD FVIAGDAAGSKLAKAQELNITVLTEEEFLAQITR

SEQ ID NO: 61

MADLSSRVNELHDLNQSYESYVEDNPSVPDSEYDKLLHELIKIEEEHPEYKTVDSPTVRVGGEAQASFNKVNH
 DTPMLSLGNAFNEDDLRKFDQRIREQIGNVEYMCCLKIDGLAVSLKYVDGYFVQGLTRGDGTTGEDITENLKTIH
 AIPLKMKEPLNVEVRGEAYMPRRSFLRLNEEKEKNDEQLFANPRNAAAGSLRQLDSKLTAKRKL SVFIYSVNDFT
 DFNARSQSEALDELDKLGFTTNKNRARNIDGVLEYIEKWTSQRESLPYDIDGIVIKVNDLDQQDEMFTQKS
 PRWAIAYKFPAAEVTKLLDIELSIGRTGVVTPTAILEPVKVAGTTVSRASLHNEDLIHDRDIRIGDSVVVKAGDI
 IPEVVR SIPERRPEDAVTYHMPHCPSCGHELVRIEGEVALRCINPKCQQLVEGLIH FVSRQAMNIDGLGTKIIQ
 QLYQSELIKDVADIFYLTEEDLLPLDRMGQKKVDNLLAAIQQAKDNSLENLLFGLGIRHLGVKASQVLAEKYETID
 RLLTVTEAELVEIHIDIGDKVAQSVVTYLENEDIRALIQLKDKHVNMIYKGIKTS DIEGHPEFSGKTIVLTGKLHQ
 MTRNEASKWLASQGAKVTSSVTKN TDVVIAGEDAGSKLTKAQLGIEIWTEQQFVDKQNELNS

5

SEQ ID NO: 62

MNKR MNELVALLNRYATEYYTSDNPSVSDSEYDRLYRELVELETAYPEQVLADSPTHR VGGKVLDGFEKYSHQY
PLYSLQDAFSREELDAFDARVRKEVAHPTYICELKIDGLSISLTYEKGILVAGVTRGDGSGIGENITENLKRVKDIPL
TLPEELDITVRGECYMPRASFDQVNQARQENGEPEFANPRNAAAGTLRQLDTAVVAKRNLATFLYQEASPSTRD
SQEKGLKYLEQLGFVVPKRILAENIDEIWNFIQEVGQERENLPYDIDGVVKNVDLASQEELGFTVKAPKWAVA
YKFPAEEKEAQLLSVDWTVGRTGVVTPPTANLTPVQLAGTTVSRATLHNVDYIAEKDIRKDDTVIVYKAGDIIPAV
LRVVESKRVSSEKLDIPTNCPSCNSDLLHFEDEVALRCINPRCPAQIMEGLIHFASRDAMNITGLGPSIVEKLFAN
LVKDVADIYRLQEEDFLLLEGVKEKSAKLYQAIQASKENSAEKLLFGLGIRHVGSKASQLLLQYFHSIENLYQADS
EEVASIESLGGVIAKSLQTYFATEGSEILLRELKETGVNLDYKGQTVVADAALSGLTWLTGKLERLKRSEAKSKLE
SLGAKVTGSVSKKTDLVVVGADAGSKLQKAQELGIQVRDEAWLESL

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de un producto oligonucleotídico de cadena sencilla que tiene al menos un resto nucleotídico modificado, en el que la modificación se selecciona de entre el grupo que consiste en la modificación en la posición 2' del resto de azúcar, la modificación de la base nucleica, y la modificación del armazón, y en el que el producto se produce a escala de gramos o kilogramos, o mayor, y/o el procedimiento se lleva a cabo en un reactor de 1 l o mayor, que comprende:
 - a) proporcionar un oligonucleótido matriz (I) complementario de la secuencia del producto, teniendo dicha matriz propiedades que le permiten que se separe del producto;
 - b) proporcionar un agrupamiento de oligonucleótidos (II) que contenga oligonucleótidos que sean segmentos de la secuencia del producto, en el que al menos un segmento contenga al menos un resto nucleotídico modificado y en el que la modificación se selecciona de entre el grupo que consiste en la modificación en la posición 2' del resto de azúcar, la modificación de la base nucleica, y la modificación del armazón;
 - c) poner en contacto (I) y (II) en condiciones que permitan la hibridación;
 - d) unir el segmento de oligonucleótidos mediante unión enzimática con una ligasa para formar el producto;
 - e) cambiar las condiciones para separar cualquier impureza, que comprende la desnaturalización de la matriz hibridada y las cadenas de oligonucleótidos impuro y la separación de las impurezas;
 - f) cambiar las condiciones para separar el producto, que comprende la desnaturalización de la matriz hibridada y las cadenas del producto oligonucleotídico y la separación del producto; y
 - g) reciclar la matriz para su uso en futuras reacciones.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, por el que la desnaturalización resulta de un aumento de la temperatura, un cambio del pH, o un cambio en la concentración de sales de una solución tampón.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que incluye dos etapas de aumento de la temperatura: i) para desnaturalizar cualquier impureza hibridada y ii) para desnaturalizar el producto hibridado.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los segmentos tienen de 3 a 15 nucleótidos de longitud.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el producto tiene de 10 a 200 nucleótidos de longitud, opcionalmente de 20 a 30 nucleótidos de longitud, opcionalmente de 20 a 25 nucleótidos de longitud.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho producto tiene 20 nucleótidos de longitud, comprendiendo dicho producto tres segmentos oligonucleotídicos:
 - (i) un segmento en 5' que tiene 7 nucleótidos de longitud, un segmento central que tiene 6 nucleótidos de longitud y un segmento en 3' que tiene 7 nucleótidos de longitud;
 - (ii) un segmento en 5' que tiene 6 nucleótidos de longitud, un segmento central que tiene 8 nucleótidos de longitud y un segmento en 3' que tiene 6 nucleótidos de longitud; o
 - (iii) un segmento en 5' que tiene 5 nucleótidos de longitud, un segmento central que tiene 10 nucleótidos de longitud y un segmento en 3' que tiene 5 nucleótidos de longitud.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la propiedad que permite que la matriz se separe del producto es que la matriz está fijada en un material de soporte.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el material de soporte es un material de soporte soluble, opcionalmente en el que el material de soporte se selecciona de entre el grupo que consiste en polietilenglicol, un polímero orgánico soluble, ADN, una proteína, un dendrímero, un polisacárido, un oligosacárido, y un carbohidrato.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el material de soporte es un material de soporte insoluble, opcionalmente en el que el material de soporte se selecciona del grupo que consiste en: una perla de cristal, una perla polimérica, un soporte fibroso, una membrana, una perla revestida con estreptavidina, celulosa o es parte del propio vaso de reacción, por ejemplo, una pared de reacción.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que se fijan múltiples copias repetidas de la matriz de manera continua mediante un único punto de anclaje al material de soporte.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la propiedad que permite que la matriz se separe del producto es el peso molecular de la matriz.
12. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la reacción se lleva a cabo utilizando un procedimiento de flujo continuo o semi-continuo.
13. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la modificación está en la posición 2' de resto de azúcar y se selecciona de entre el grupo que consiste en 2'-F, 2'-OMe, 2'-MOE, y 2'-amino, o en la que el oligonucleótido comprende un PMO, un LNA, un PNA, un BNA, o un SPIEGELMER.

14. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la modificación está en base nucleica y se selecciona de entre el grupo que consiste en 5-metil pirimidina, una 7-deazaguanosina y un nucleótido abásico.
- 5 15. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la modificación está en el armazón y se selecciona de entre el grupo que consiste en fosforotioato, fosforoamidato y fosforodiamidato.
16. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el producto resultante es puro al menos al 90%, opcionalmente en el que el producto resultante es puro al menos al 95 %, opcionalmente en el que el producto es puro al menos al 98 %.
- 10 17. Un procedimiento para la producción de un producto oligonucleotídico de cadena doble, en el que se producen 2 oligonucleótidos de cadena sencilla complementarios mediante el procedimiento de cualquier reivindicación precedente y luego se mezclan en condiciones que permitan la hibridación.
18. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el procedimiento es para la producción de un oligonucleótido terapéutico.
- 15 19. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 o 18, en el que el producto oligonucleotídico es un oligómero con huecos.

Figura 1

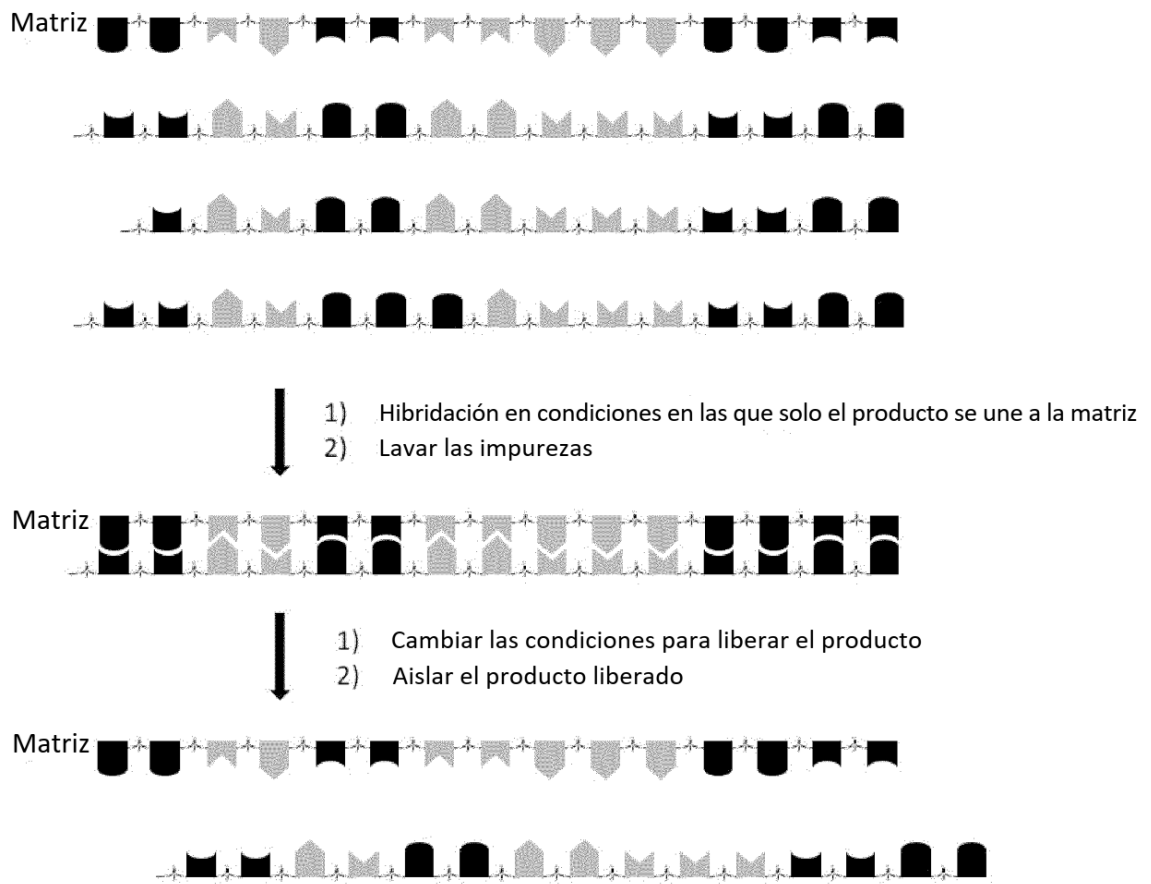


Figura 2

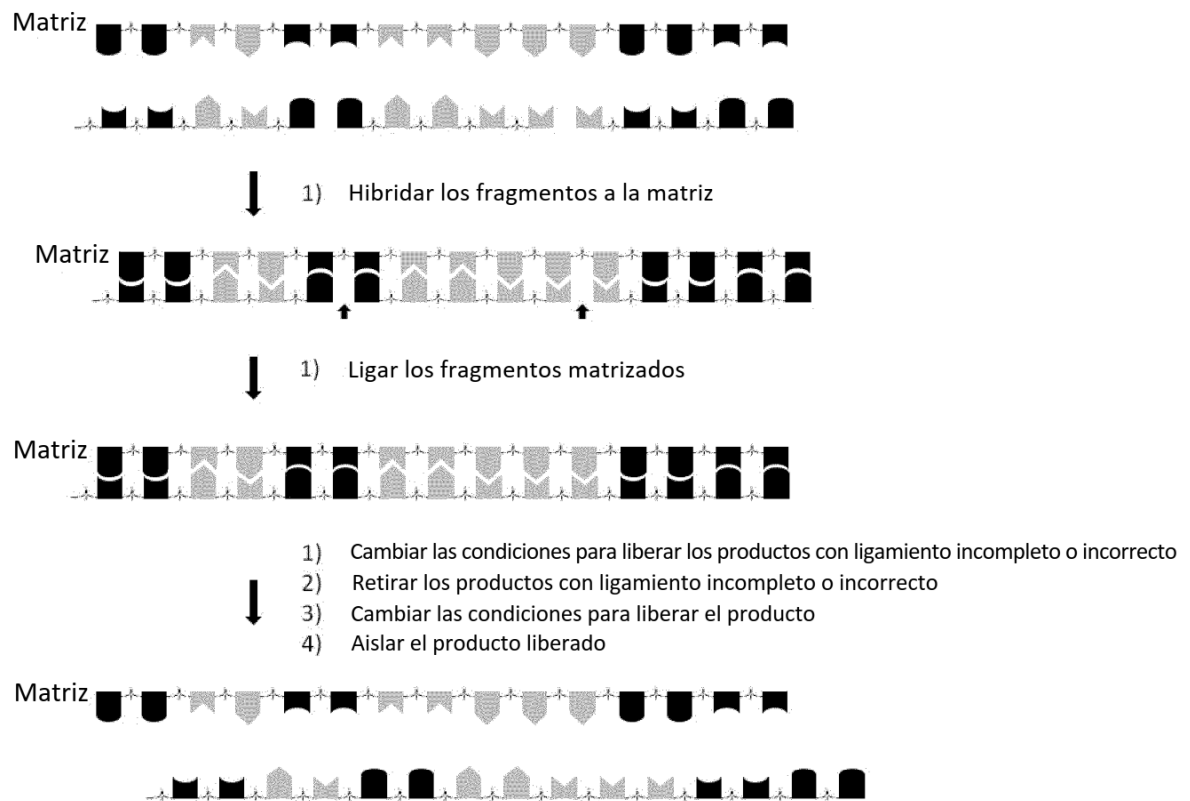


Figura 3

Matriz sencilla



Matriz con repetición

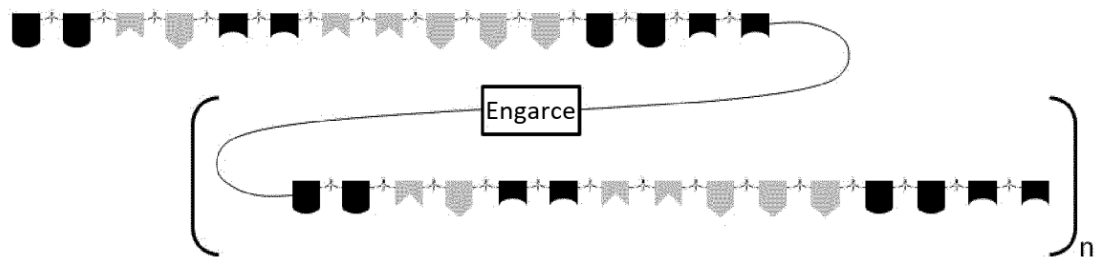


Figura 4

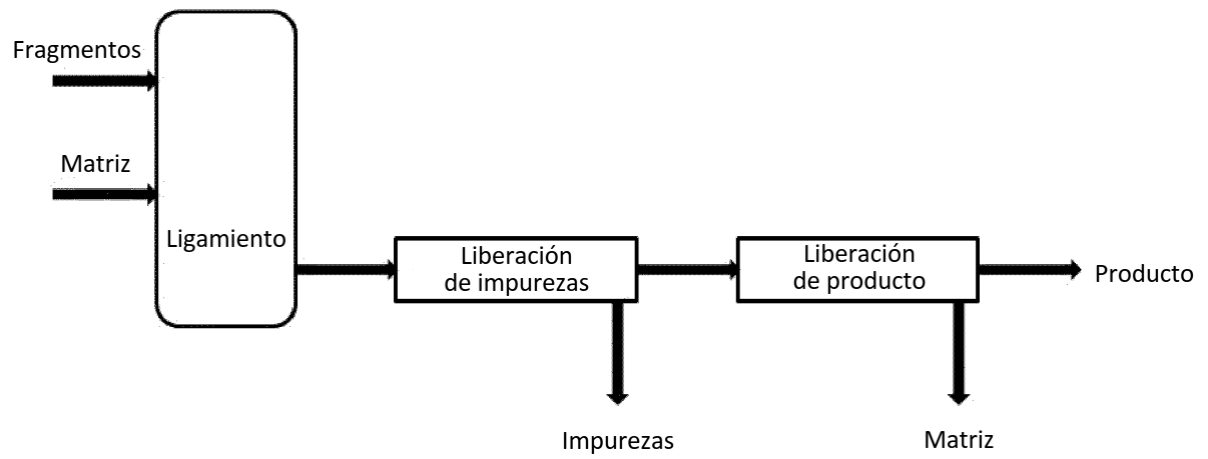
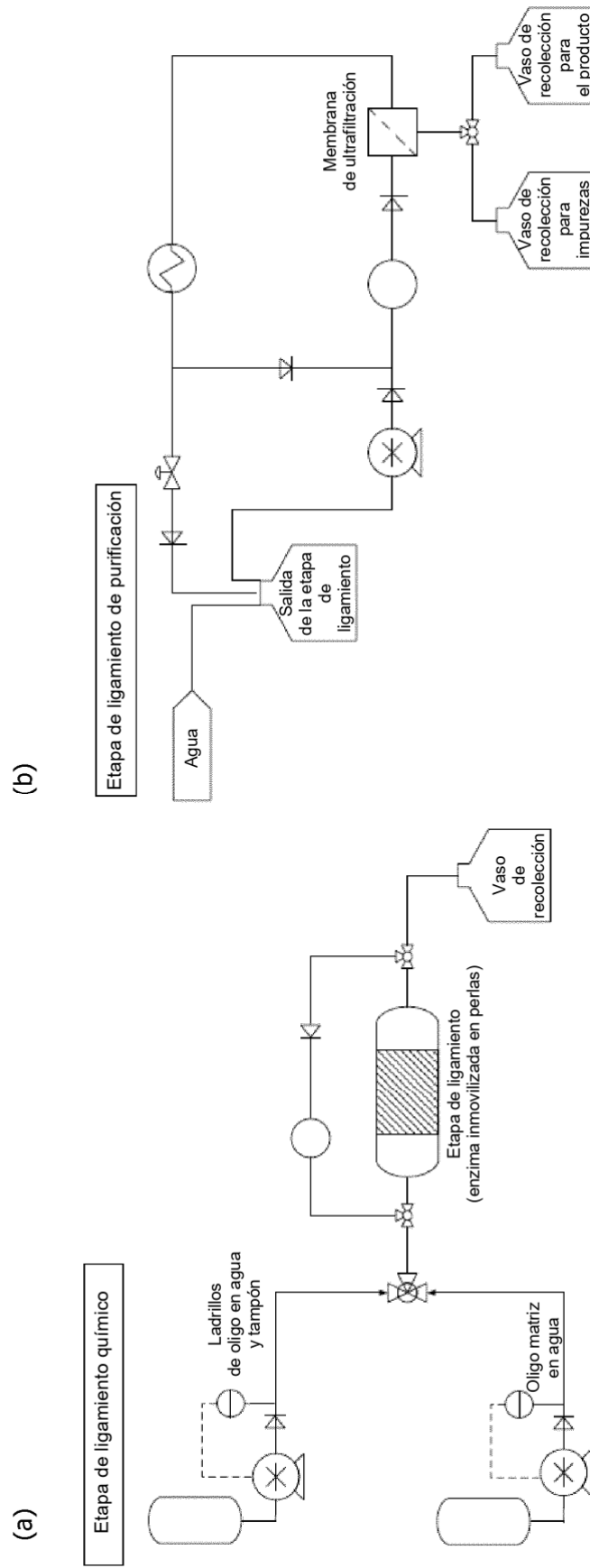
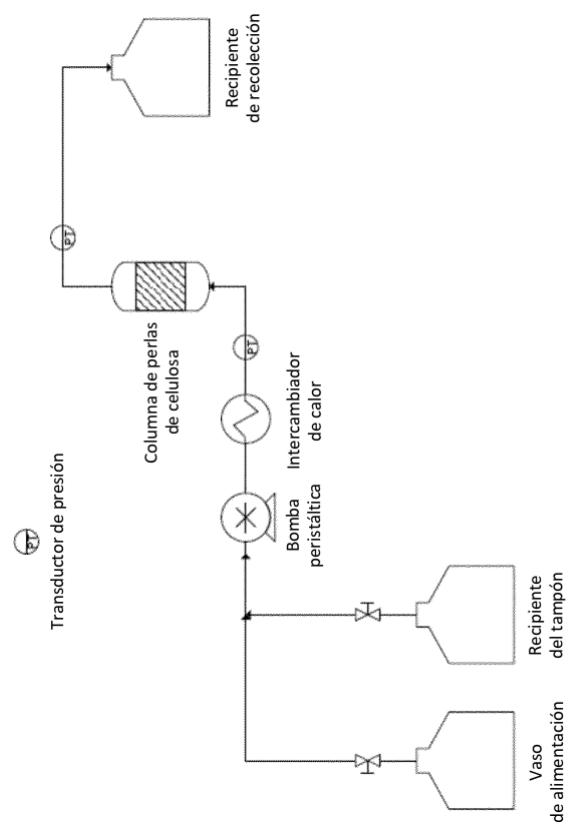


Figura 5



(c)



(d)

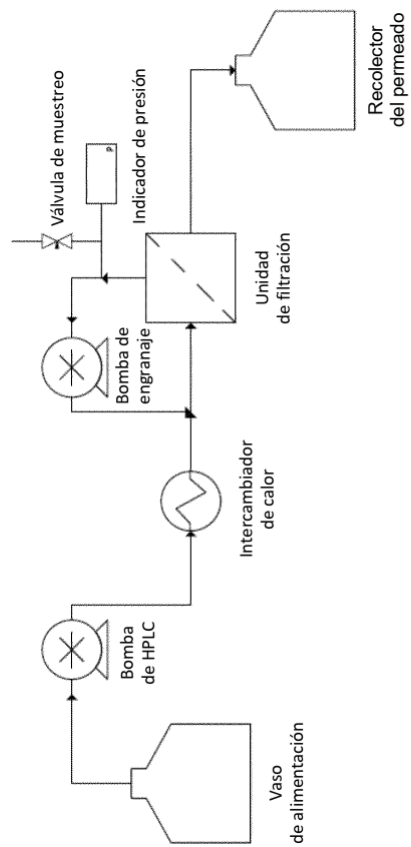
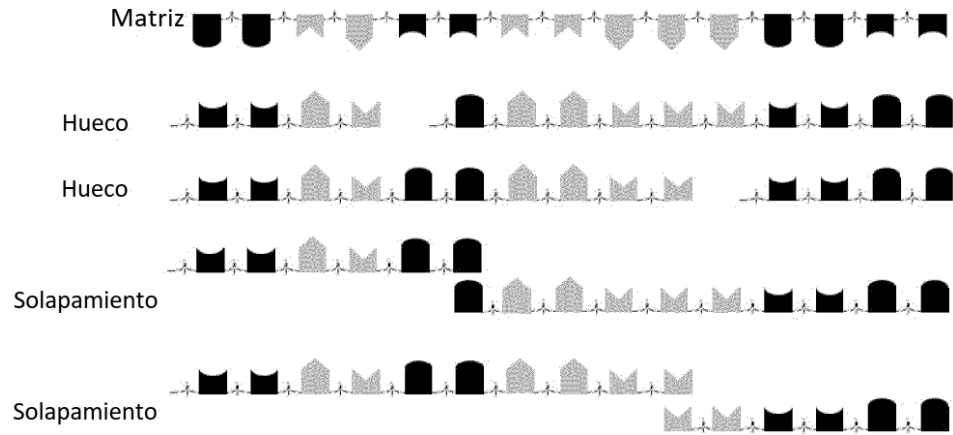


Figura 6

Huecos o solapamientos que aparecen
por nucleótidos omitidos o adicionales



Impurezas que aparecen por
nucleótidos omitidos o adicionales

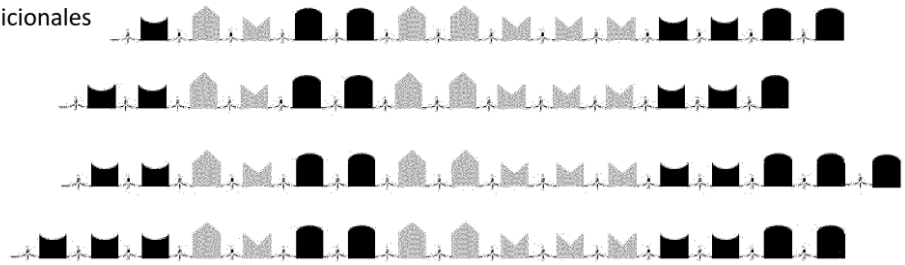


Figura 7

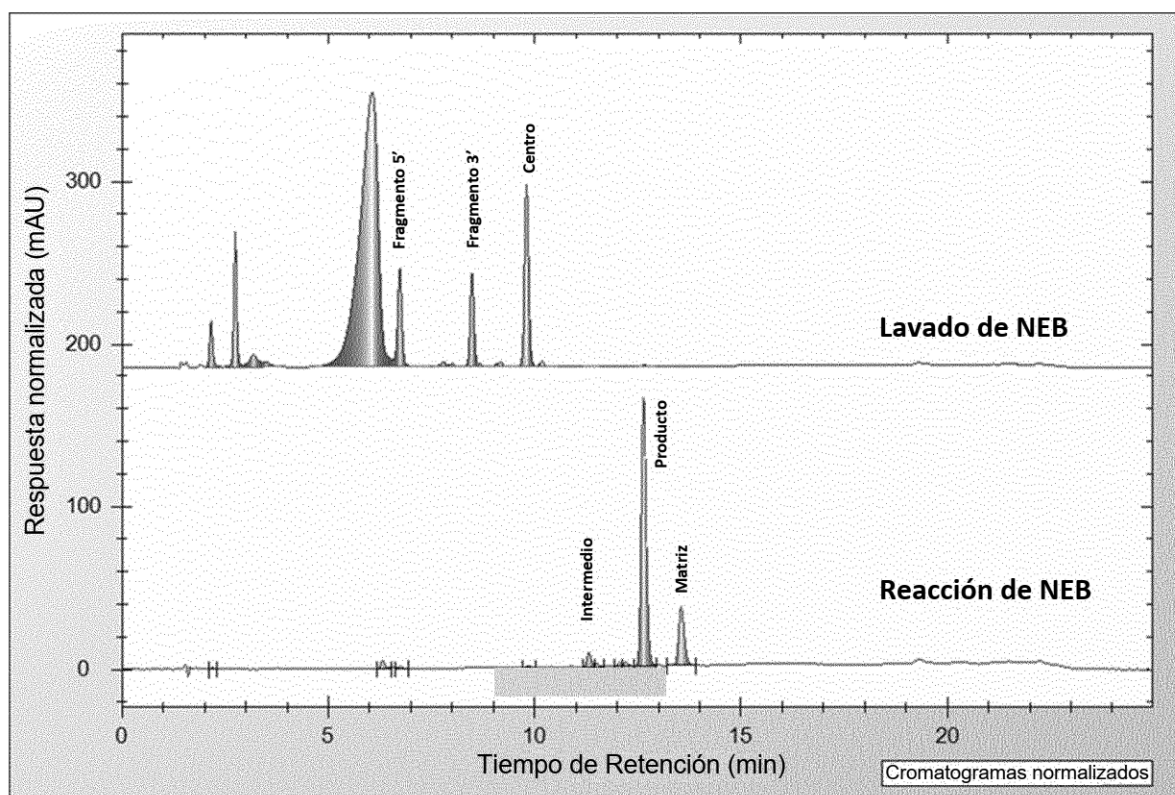


Figura 8

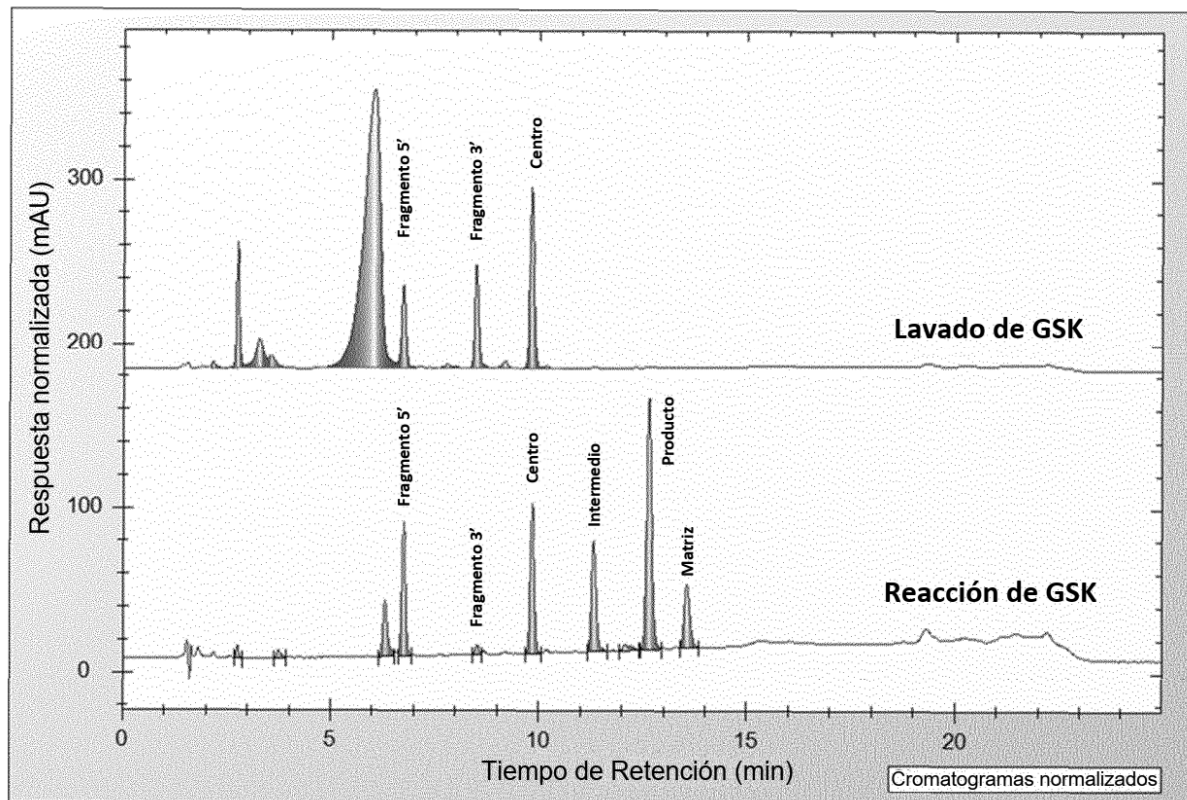
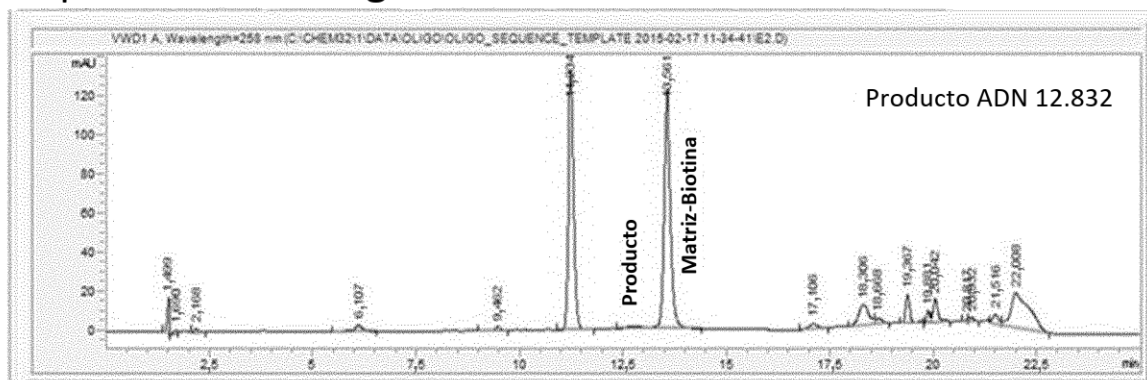
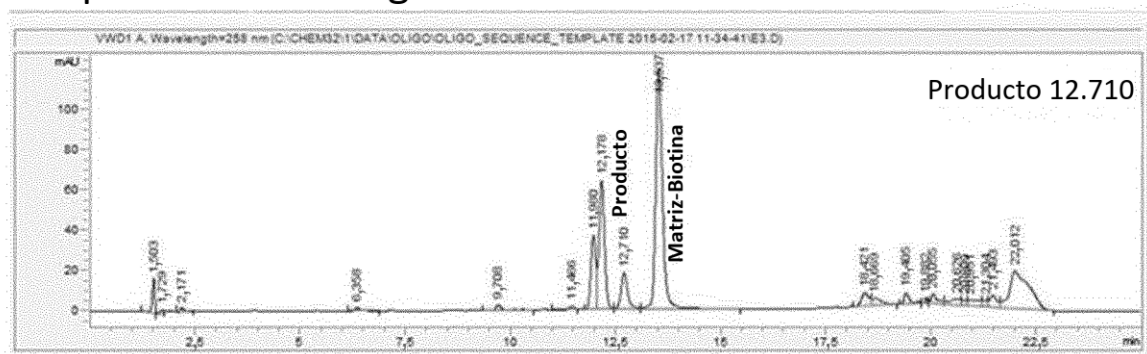


Figura 9

Experimento 2: fragmento 3' sustituido en 2'MeO



Experimento 3: fragmento 5' sustituido en 2'MeO



Experimento 4: todos los fragmentos sustituidos en 2'OMe

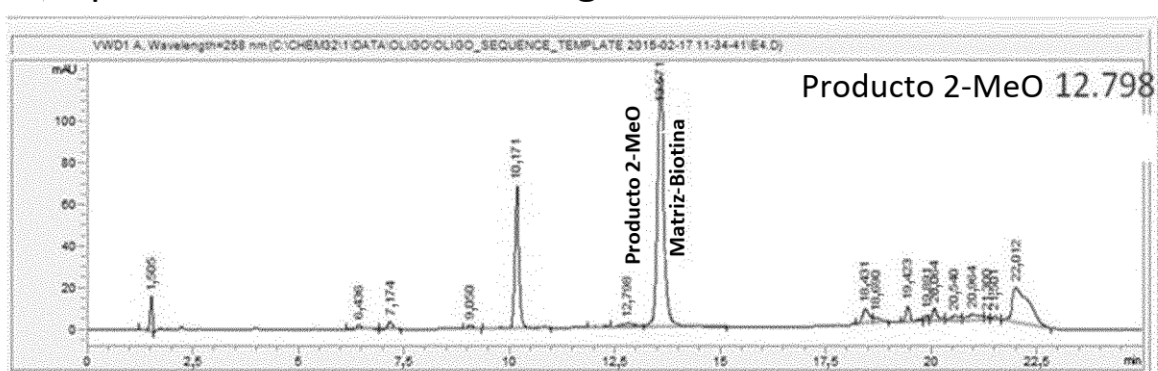
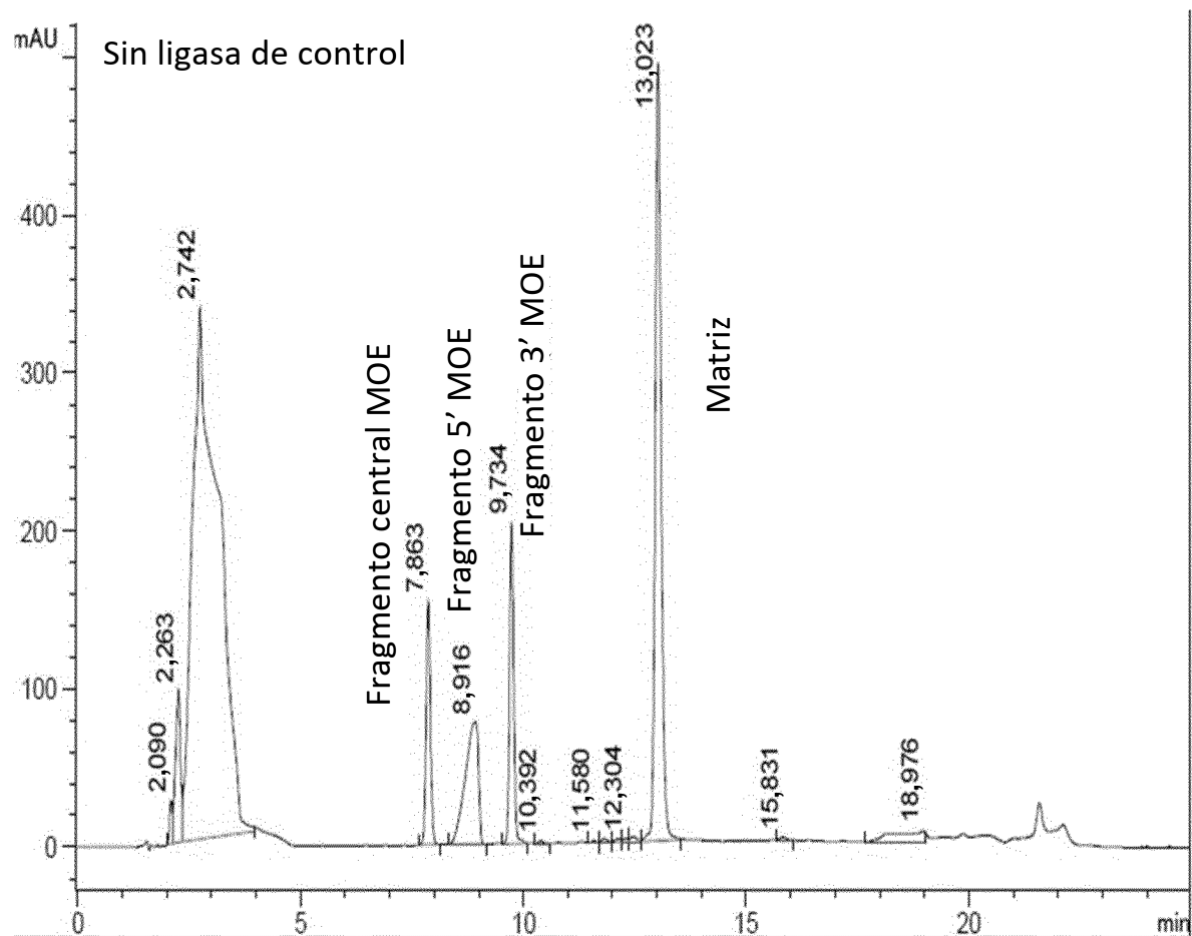


Figura 10

(a)



(b)

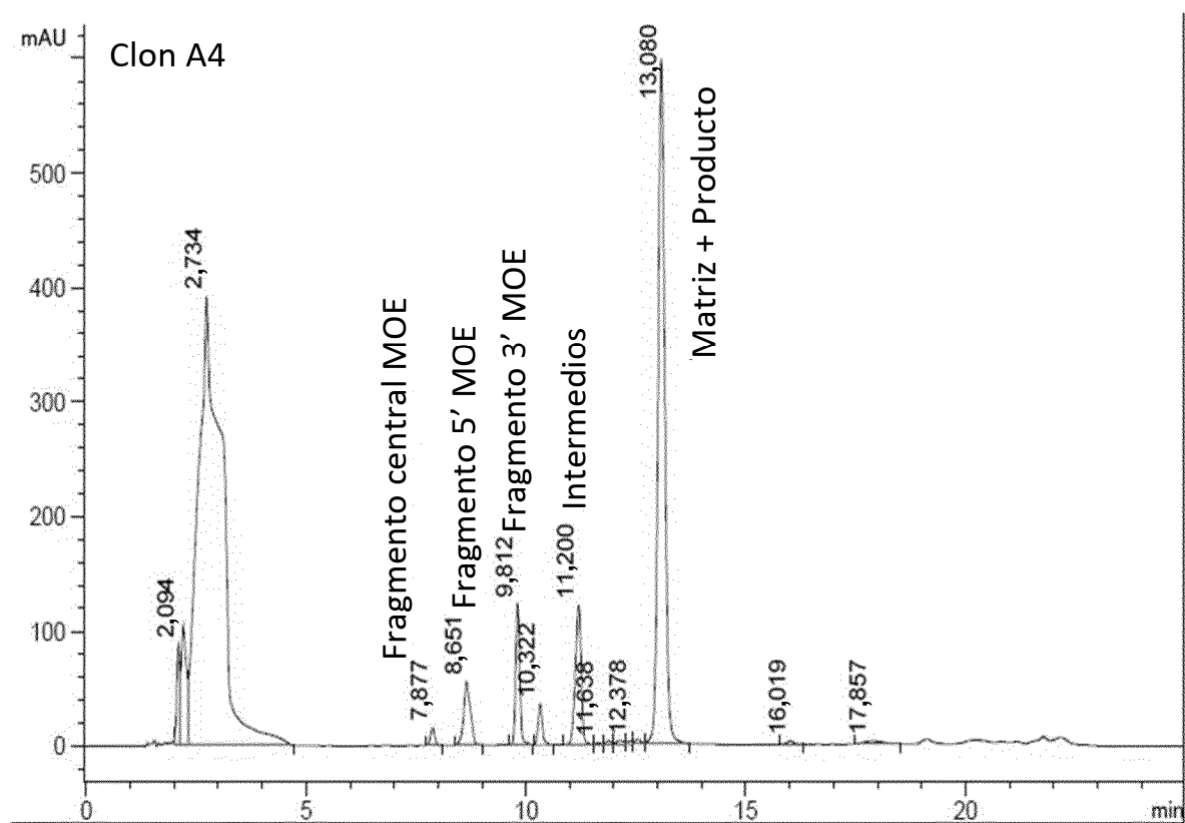


Figura 11

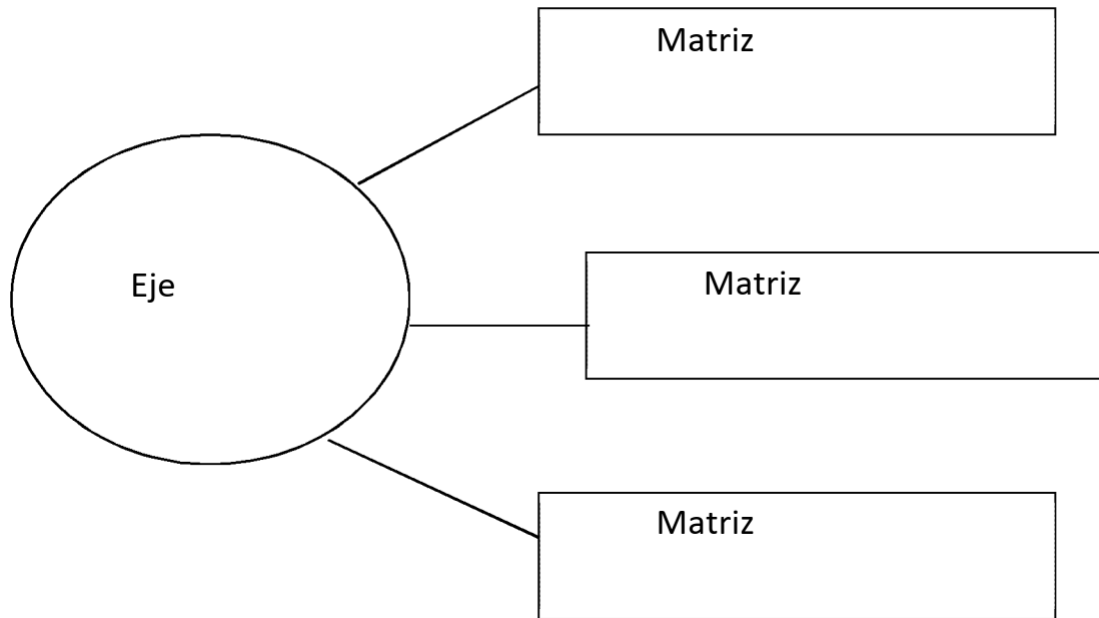


Figura 12

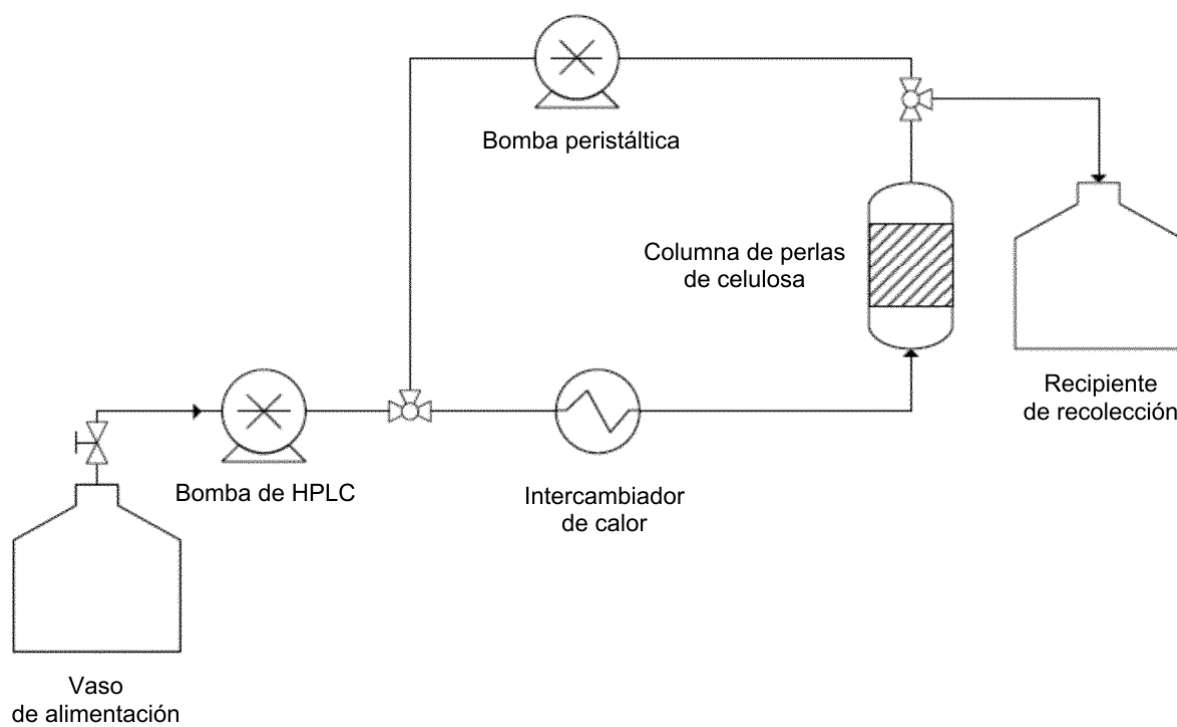


Figura 13

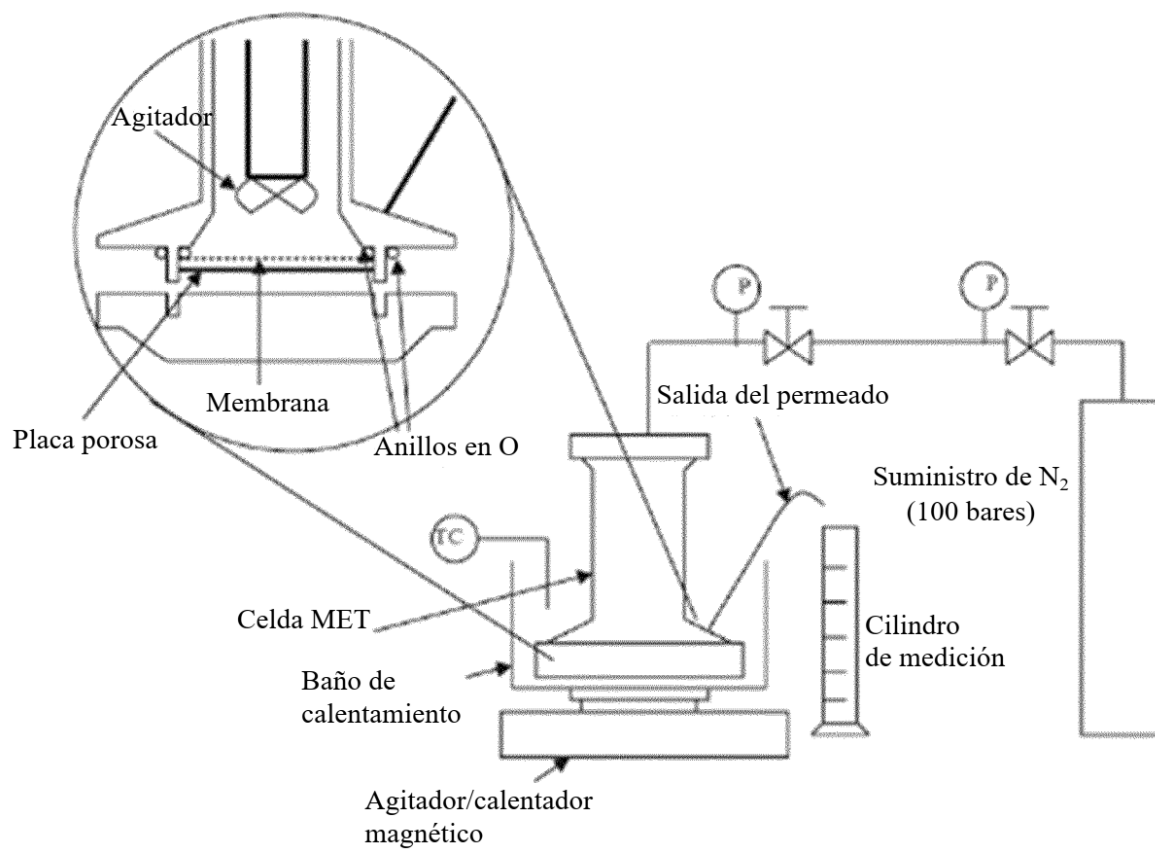


Figura 14

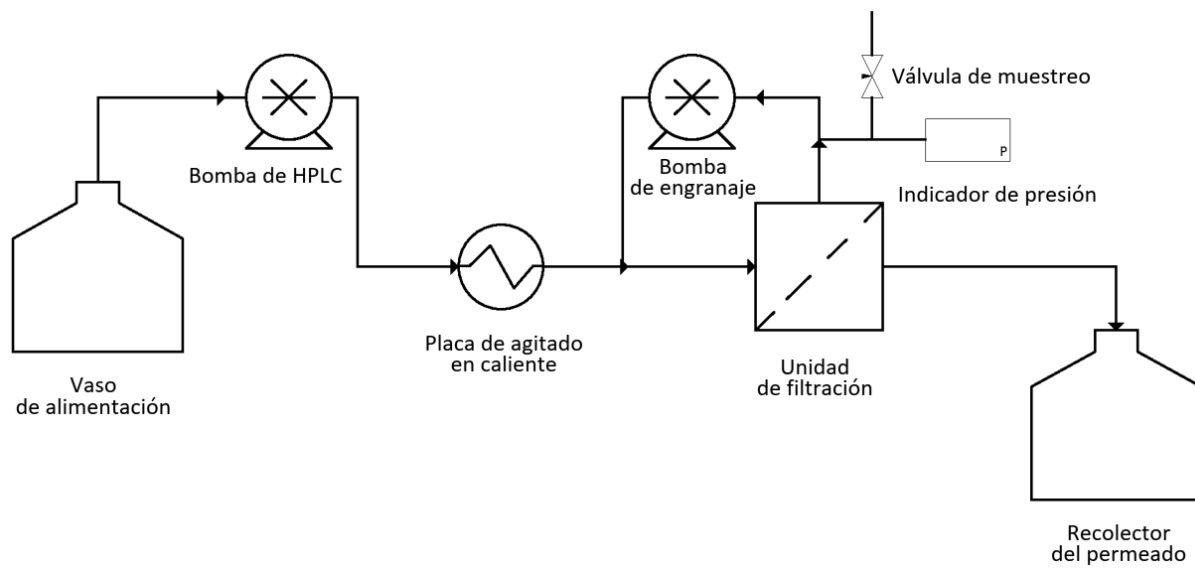
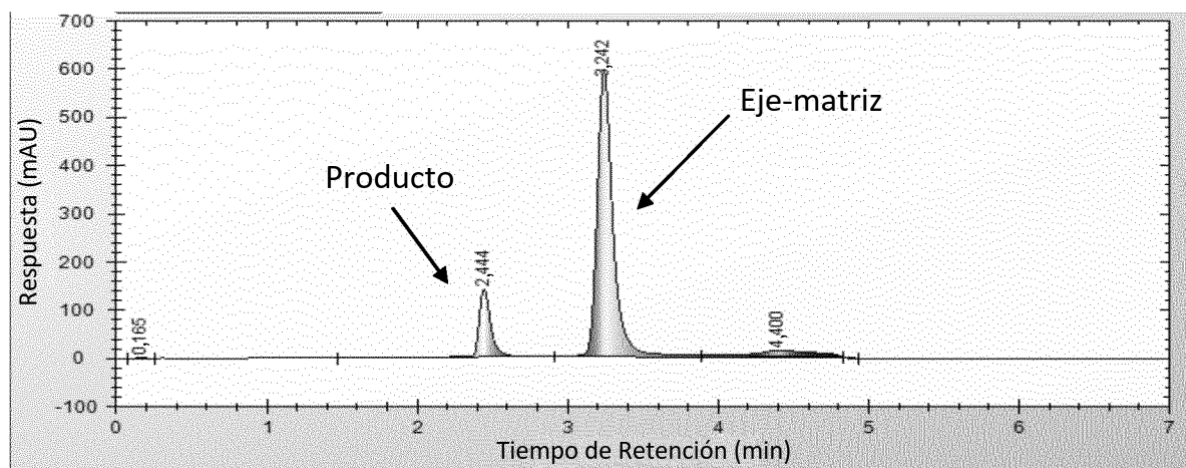


Figura 15

(a)



(b)

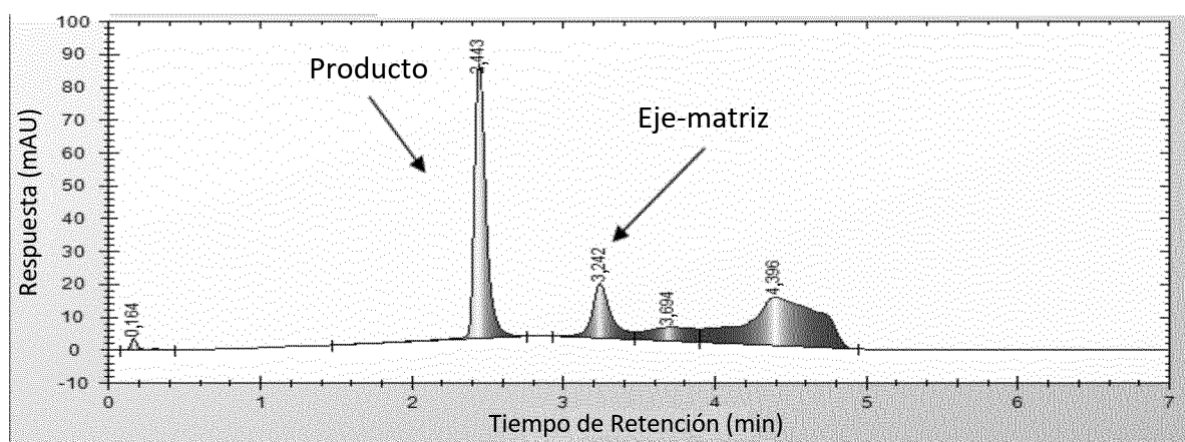
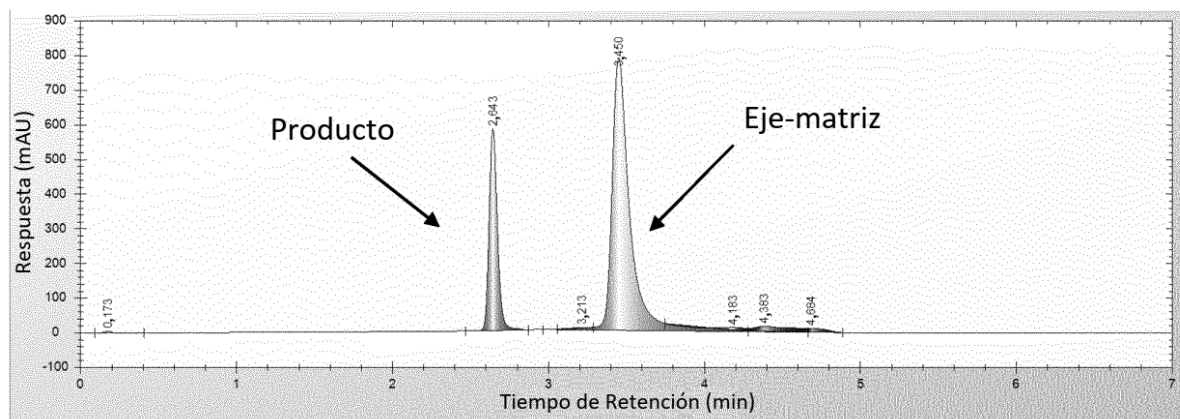


Figura 16

(a)



(b)

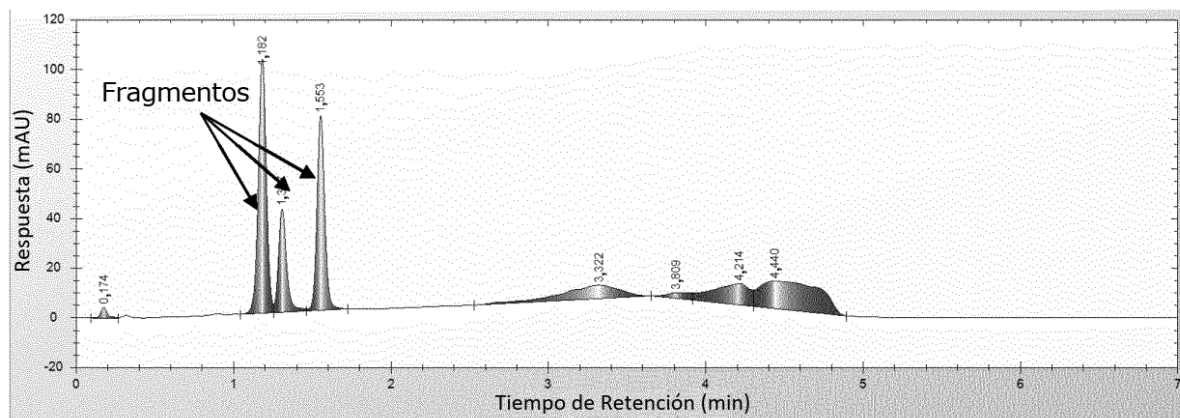
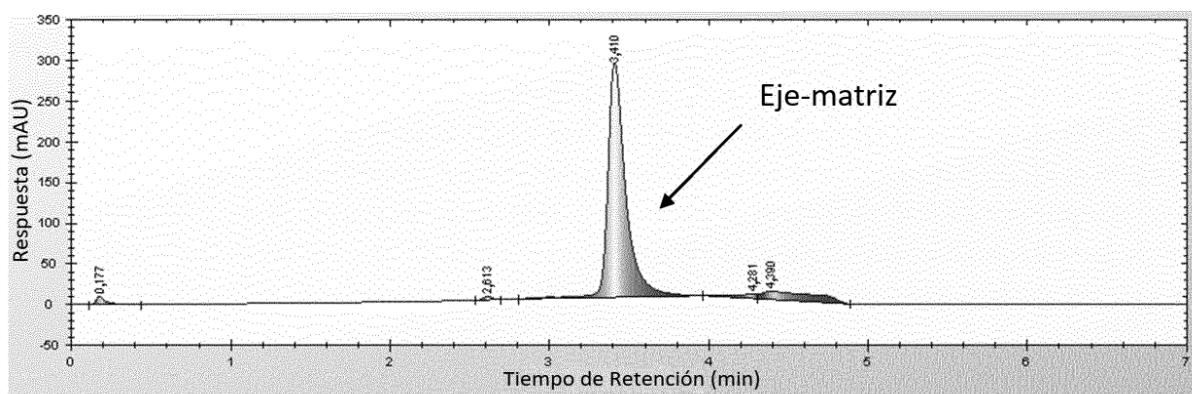


Figura 17

(a)



(b)

